HAL
open science

IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE 3D Amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence.

Olivier Haeberlé

To cite this version:

Olivier Haeberlé. IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE 3D Amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence.. Master. 2013. sfo-00933328

HAL Id: sfo-00933328

https://hal-sfo.ccsd.cnrs.fr/sfo-00933328v1

Submitted on 20 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE 3D

Amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence.

Olivier Haeberlé
Laboratoire MIPS – EA2332, Université de Haute-Alsace
IUT de Mulhouse, 61 rue Albert Camus, F-68093 MULHOUSE Cedex, FRANCE
olivier.haeberle@uha.fr

Résumé :

Le microscope optique, en particulier de fluorescence, est devenu un instrument-clé pour la compréhension des mécanismes biologiques, grâce à ces possibilités uniques d'imagerie en 3D, sur des spécimens vivants. Sa résolution reste cependant limitée quand on la compare aux résultats obtenus en microscopie électronique, ou par les techniques de microscopie en champ proche (électronique ou optique).

Diverses techniques ont été proposées ces dernières années pour améliorer la résolution de cet instrument, avec dans certains cas des résultats spectaculaires.

Ce cours a pour but de présenter ces techniques et leurs principes de mise en œuvre.

Mots clés :

Microscopie Optique, Diffraction, Résolution, Mécanisme de Formation d'Images, Réponse Impulsionnelle Optique.

1. DECONVOLUTION

Cette partie est directement inspirée de la thèse de Bruno Colicchio (Université de Haute-Alsace, 2004). Qu'il en soit remercié ici.

1.1. principe

Du point de vue du physicien qui étudie le microscope en optique diffractive, le processus de formation d'image se comprend comme suit à l'aide de la RIO : chaque point lumineux de la source va être transformé par le microscope en une tache d'Airy en 3D. L'image obtenue est donc un collection de RIO, parfaitement déterministe.

D'un point de vue de physicien en mécanique quantique, qui considère les photons individuellement se propageant à travers le système optique, la RIO s'interprète comme la probabilité pour un photon émis par un point lumineux de la source d'être collecté à un endroit précis dans l'espace image. L'image se forme photon par photon, et seule une très grande accumulation de photon (moyennage) permet de réobtenir la RIO telle que prévue par l'optique diffractive. Dans ce cas, l'image est considérée comme une collection de photons, et s'interprète d'un point de vue statistique.

Lorsque l'on envisage de traiter les images en provenance d'un microscope de manière numérique, il convient de donner une description mathématique du processus de formation d'image. On retrouve alors ces deux approches physiques différentes dans les deux types de description mathématique du phénomène de formation d'image : les modèles déterministes et les modèles statistiques ou Bayesiens.

Pour montrer l'intérêt et les difficultés de la déconvolution en microscopie de fluorescence, il est cependant plus simple de se baser sur le modèle déterministe de convolution de l'objet par la réponse impulsionelle optique du microscope. En négligeant l'influence du bruit et en supposant le système linéaire et invariant, on peut donc décrire le processus de formation d'image par l'équation de convolution :

$$g(x) = \int h(x,x_1) f(x,x_1) dx_1 \qquad (1)$$

où f(x) est l'objet de départ, h(x) la PSF du système et g(x) l'image obtenue. Si l'on réécrit cette équation dans l'espace de Fourier, on obtient alors :

$$G(\omega) = H(\omega) F(\omega) \qquad (2)$$

où H(ω) est la réponse fréquentielle du système (Optical Transfer Function: OTF) qui est donc la transformée de Fourier 3D de la réponse impulsionelle optique.

Si on considère le systèm du point de vue de l'automaticien ou de l'électronicien, c'est-à-dire comme un filtre, l'OTF permet donc de caractériser ce filtre : le système de mesure H échantillonne une quantité F du monde réel en un ensemble de données numériques G entachées d'erreurs expérimentales (et de bruit B). Le dispositif de mesure ne fournit pas la quantité exacte F mais une version dégradée de celle-ci. Après avoir identifié la transformation subie par les données originales, on peut envisager la transformation inverse qui permet sinon de retrouver F, du moins de restaurer les données G pour obtenir une image plus fidèle de F. La transformation H peut être déterminée à partir de considérations physiques sur le dispositif de mesure à l'aide d'un modèle, ou mesurée expérimentalement.

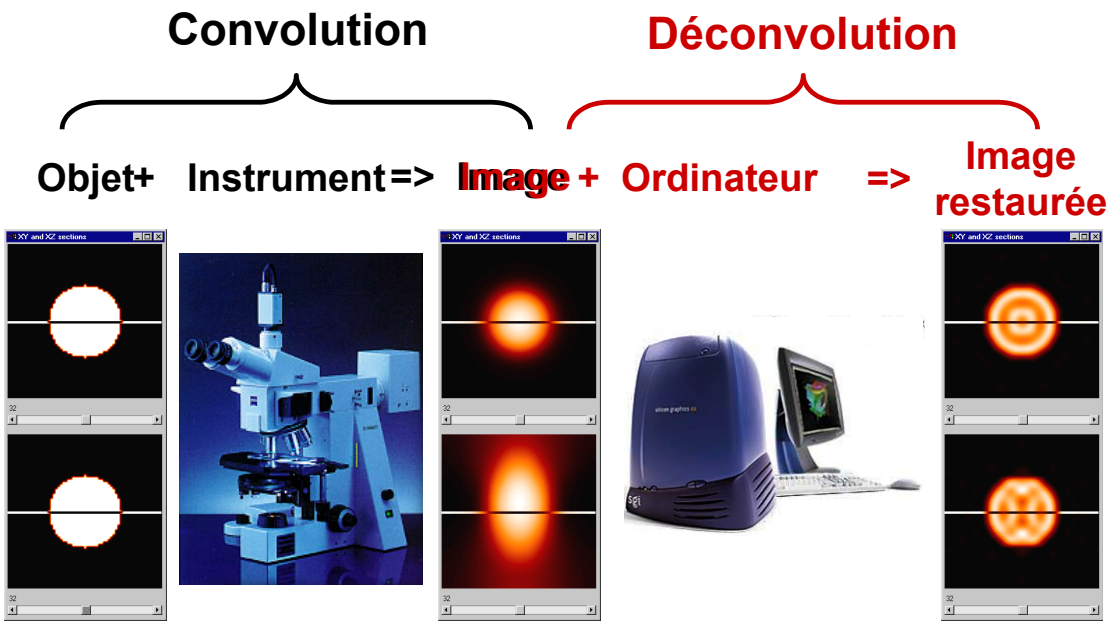

FIG. 1. Amélioration de la résolution par calcul numérique. Le microscope fournit une image dégradée de l'objet observé. On restaure les données à l'ordinateur.

L'idée de la déconvolution est donc de reconstruire le plus fidèlement possible les données de départ à l'aide d'un système numérique. En effet, comme pour tout système, le microscope en donne une version dégradée (Figure 1).

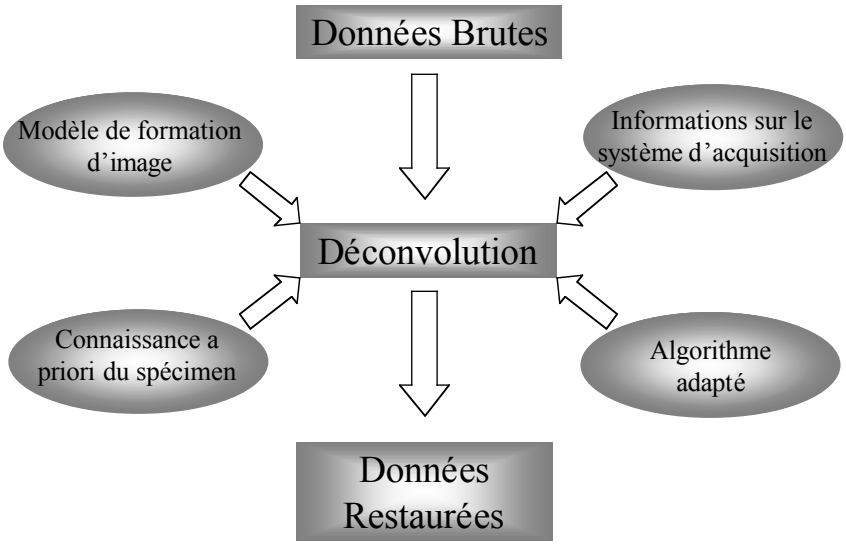

FIG. 2. Eléments intervenant dans un algorithme de déonvolution.

Cette dégradation est d'autant plus notable que l'on cherche à voir de petits détails, c'est-à-dire qu'on se rapproche de la limite de résolution du système. Pour parvenir à un résultat le plus satisfaisant possible, le système de déconvolution devrait idéalement combiner comme le résume la Figure 2 :

-un modèle de formation d'image correct

-une bonne connaissance des paramètres d'acquisition

-un algorithme de déconvolution adapté

-des connaissances a priori sur le spécimen

A titre d'exemple, on peut donner certaines caractéristiques particulières du microscope optique. La Figure 3 montre en trois dimensions son OTF 3D. L'axe η représente les fréquences longitudinales (le long de l'axe optique z). Les fréquences latérales μ sont groupées sous la forme $\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2)^{1/2}$ avec μ_x et μ_y les fréquences selon l'axe x et l'axe y respectivement. Cette figure illustre bien les spécificités d'un tel instrument.

-Les fréquences latérales et longitudinales sont liées : à la fréquence latérale zéro, aucune fréquence longitudinale, et donc aucune information, n'est transmise. De même à une fréquence longitudinale données, seules certaines fréquences latérales sont transmises.

-L'OTF présente un cône de fréquences non-transmises (missing cone), dont l'ouverture est lié à l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.

-Le pic de Dirac à l'origine traduit le fait que chaque plan de l'image, qui est normalement l'image d'un seul plan de l'objet, contient en fait des informations de tous les plans de l'objet.

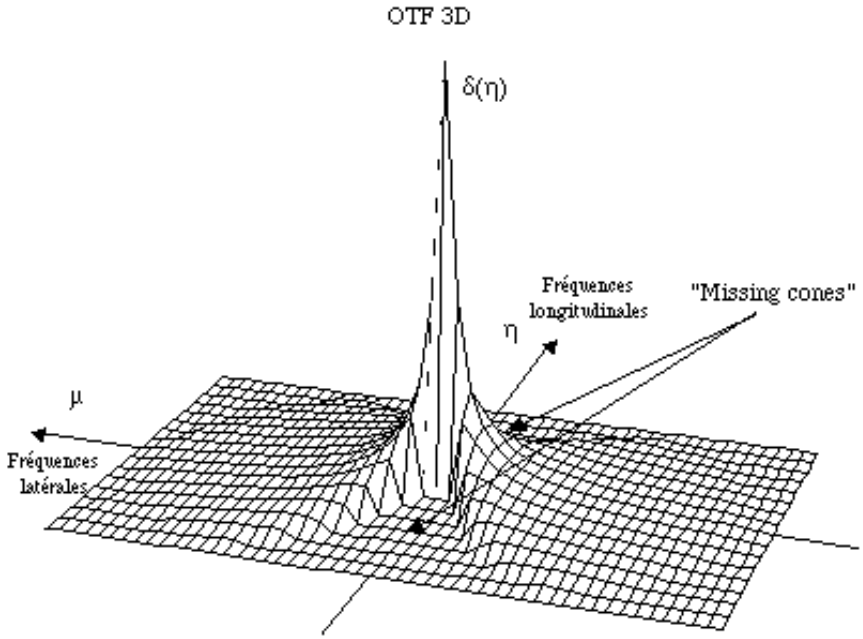

FIG. 3. Fonction de transfert optique d'un microscope conventionnel.

La conséquence en est qu'un objet vu à travers un microscope optique est :

- flou, à cause de l'effet de filtrage de l'OTF (atténuation des hautes fréquences)
- déformé, à cause du filtrage différent en x-y et en z (allongement selon l'axe z)
- déformé, à cause du mélange d'information des plans (présence du pic de Dirac)

A cause de ces déformations, l'image brute d'un microscope optique est inutilisable pour toute mesure quantitative. Un algorithme de déconvolution adapté à la microscopie optique devrait donc tenir compte de ces spécificités pour restaurer correctement l'image. En particulier pour redonner sa forme correcte à l'objet, il faudra "remplir" le missing cone.

Enfin, on a vu que la PSF d'un microscope confocal idéal peut être calculée en première approximation à partir de la PSF d'un microscope classique par élévation au carré. En conséquence, l'OTF d'un microscope confocal est obtenue par convolution de l'OTF d'un microscope classique avec elle-même.

Cette opération de convolution va remplir le missing cone, ce qui explique les propriétés intrinsèque de sectionnement optique du microscope confocal par rapport au microscope classique. D'autre part, une opération de convolution ayant pour effet d'élargir le support de l'OTF, plus de fréquences étant transmises, la PSF du microscope confocal est donc plus compacte que la PSF du microscope classique. Cette approche "filtrage" est en fait complémentaire de l'approche physique pour bien comprendre les propriétés imageantes de ces systèmes.

1.2. Quelques algorithmes utilisés en microscopie

Dans cette partie, on présente rapidement quelques algorithmes couramment utilisés en microscopie de fluorescence (la déconvolution fait l'objet d'un autre cours de cette école). Ces algorithmes sont disponibles au travers de logiciels commerciaux vendus par les fabricants de microscopes ou des sociétés tierces, ainsi que via des logiciels publics tels que COSMOS de l'Université Memphis, ou ImageTrak (Ottawa Health Research Institute), ICY, ImageJ… (certains ont été introduits dans le chapitre calcul des PSF)

On peut classer (très grossièrement) les algorithmes en deux catégories. Les algorithmes basés sur des inversions directes sont généralement rapides et peu gourmants en mémoire. Ils sont cependant souvent plus sensibles à la qualité de départ des images (bruit), et donne une reconstruction moins fidèle des objets observés. Les algorithmes itératifs sont généralement très fidèles en termes de reconstruction et sont peu sensibles au bruit, mais les temps de calcul sont souvent longs, et ils demandent beaucoup de mémoire.

1.2.1. Algorithme LLS (Linear Least Square)

Cet algorithme basé sur une inversion directe s'applique aux systèmes linéaires et à des données contaminées par un bruit blanc gaussien additif. Reprenons l'équation de convolution de formation des images, avec g l'image enregistrée, h la PSF, b le bruit et f l'objet :

$$g = [H]\, f + b \qquad (3)$$

Puisque la réponse impulsionnelle optique du système d'acquisition d'image est singulière ou quasi-singulière, l'inversion d'un tel système est un problème mal posé. Par conséquent, il faut le régulariser. Cette régularisation ne tient compte que de certaines valeurs

propres minorées de la matrice H. L'erreur de la restauration au sens des moindres carrés est due d'une part au bruit, d'autre par au "bias".

Ce filtre possède la forme suivante :

$$\hat{f} = \Phi_{LLS}\, g = \left[H^t\, H + \frac{R_b}{R_f} \right]^{-1} H^t\, g \tag{4}$$

R_b et R_f sont respectivement la matrice de corrélation du bruit b et de l'image f.

La spécificité de cet algorithme est qu'il utilise la jauge de Joyce & Root pour que l'inversion soit le meilleur compromis (au sens des moindres carrés) entre la stabilité (robustesse, caractérisée par la variance de la solution) et la précision (erreur de biais). La variance *Var{s}* et l'erreur de biais *Bias{s}* sont directement liées au nombre de valeurs propres à utiliser lors de l'inversion. L'algorithme LLS cherche alors le nombre optimal de valeurs propres à utiliser dans l'opération d'inversion ce qui consiste à faire :

$$\hat{f} = \left[H'^{\,t}\, H' \right]^{-1} H'^{\,t}\, g \tag{5}$$

H' étant la matrice H après régularisation.

Cet algorithme effectue donc successivement :

-La transformée de Fourier rapide (FFT) de la PSF h afin de trouver les valeurs propres.

-La saisie du seuil minimal de la valeur propre ρ.

-La mise à zéro des valeurs propres dont le module est inférieur à ρ.

-L'inversion par l'algorithme des moindres carrés en ne prenant que les valeurs propres non-nulles.

Cette méthode est donc rapide. Elle corrige cependant peu les déformations longitudinales de l'objet, et est relativement sensible au bruit. C'est pourquoi on l'utilise de préférence sur des images de bonne qualité (rapport signal/bruit), de spécimens peu épais.

1.2.2. MAP (Maximum a Posteriori)

Cette méthode est basée sur un modèle Bayesien de formation d'image. La solution non-itérative au sens du maximum du maximum a posteriori ressemble, dans le cas d'un bruit blanc gaussien additif, à un filtrage de Wiener :

$$\Phi_{MAP} = \frac{H^t}{H^t\, H + \frac{R_b}{R_f}} = \frac{H^*}{H^*\, H + \gamma} = \frac{H^*}{|H|^2 + \gamma} \tag{6}$$

La solution en sens du MAP est une variante de filtre de Wiener et s'écrit :

$$\tilde{\Phi}_{MAP} = \frac{H^*}{|H|^2 + \gamma} = \frac{OTF^*}{|OTF|^2 + \gamma} = \frac{OTF^*}{|OTF|^2 + 2\alpha\left(\omega_x^2 + \omega_y^2 + \omega_z^2\right)} \tag{7}$$

où ω_x, ω_y, ω_z sont les coordonnées dans l'espace de Fourier. α est un paramètre ajustable qui est déterminé de manière expérimentale. Ce paramètre doit rester constant pour les mêmes conditions expérimentales. La détermination précise de ce paramètre représente un des challenge de cette technique.

L'algorithme LLS ne restaure l'image qu'avec un nombre minoré de valeurs propres (on supprime les petites valeurs propres responsables de l'amplification catastrophique du bruit). L'algorithme MAP, lui, modifie les valeurs propres en fonction de α.

Cette méthode est aussi très rapide, et donne des résultats un peu meilleurs que LLS.

1.2.3. ML-EM (Maximum de vraisemblance)

Le phénomène de fluorescence est bien décrit par la statistique de Poisson. Une méthode bien adaptée à ce type de bruit est l'algorithme itératif du maximum de vraisemblance. On calcule de manière itérative l'équation :

$$\hat{f}^{k+1}(x,y,z) = \hat{f}^{k}(x,y,z)\ \frac{1}{H(0)}\, h(x,y,z) \otimes \left(\frac{g(x,y,z)}{h(x,y,z) \otimes \hat{f}^{k}(x,y,z)} \right) \tag{8}$$

où $\otimes$ représente l'opérateur de convolution 3D. Il s'agit d'un algorithme itératif qui maximise l'espérance mathématique. Dans la littérature, on trouve de nombreuses évaluations et applications de cette méthode.

Elle a pour avantage d'être très efficace en termes de reconstruction des formes et des intensités et d'être robuste au bruit. Elle est par contre souvent lente, car une reconstruction efficace peut nécessiter un grand nombre d'itérations (>500), et gourmande en mémoire. Ceci est de moins en moins un problème, grâce aux développements rapides de l'informatique.

1.2.4. Méthode de Carrington

La déconvolution au sens des moindres carrés ne peut pas donner une solution stable. La méthode LLS régularise le problème en éliminant les petites valeurs propres. Walter Carrington a proposé une autre approche de régularisation. Sa méthode consiste en une minimisation au sens des moindres carrés avec contraintes. Cette approche conduit à une déconvolution 3D itérative. Cet algorithme est un des premiers mis sur le marché et donne des résultats intéressants à condition de ne pas sortir de son domaine de validité. La méthode consiste à minimiser la fonction suivante :

$$\min_{\{f \geq 0\}} \sum \left| \tilde{g}_i - \int\int\int h_i(x,y,z)\, f(x,y,z)\ dxdydz \right|^2 + \alpha \int\int\int |\, f(x,y,z)\ |^2\, dxdydz \tag{9}$$

avec les contraintes que d'un espace convexe :

- Non-négativité.
- Etendue spatiale limitée.

Le premier terme de l'équation précédente représente l'écart entre les données originelles et les données restaurées. Le second terme détermine le lissage que l'on applique aux données. La méthode suppose que le spécimen biologique à restaurer ne présente pas de transition brusque. Si le second terme est petit, les données restaurées sont lissées et peu sensibles au bruit, mais la précision de la restauration sera dégradée. Le facteur α permet

d'établir un compromis entre l'exactitude et la robustesse de la solution. Par expérimentation, l'auteur suggère une valeur de $\alpha = 10^{-5}$.

Cette méthode donne d'excellents résultats sur des spécimens peu épais, pour lesquels la reconstruction est très bonne, et cette méthode est relativement peu sensible au bruit.

1.2.5. Exemple de déconvolution

A titre d'illustration, la Figure 4 montre une image de cellule de cordon ombilical CD34 obtenue avec un microscope de fluorescence conventionnel (Dr G. Jung, Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Emile Muller, Mulhouse). Les sites de fluorescence sont repartis en surface de la cellule. On note sur cette image un bruit de fond assez important, et un flou caractéristique des images acquises avec un microscope de fluorescence.

Cette image a été déconvoluée à l'aide de l'algorithme MAP, après un préfiltrage du bruit à l'aide d'un filtre de Wiener (B. Colicchio , Laboratoire MIPS, Université de Haute-Alsace, Mulhouse). Notons la très nette diminution du bruit de fond, et l'amélioration de la résolution, approximativement d'un facteur 2 à 3 dans ce cas.

Il est à noter que la déconvolution ne s'applique pas seulement aux images de microscopie de fluorescence. Toutes les techniques d'imagerie microscopiques peuvent en bénéficier. Cependant, il faut adapter les algorithmes au mode de formation des images. Ainsi en microscopie de contraste de phase, on fait appel au propriété de cohérence de la lumière, il faudrait en tenir compte.

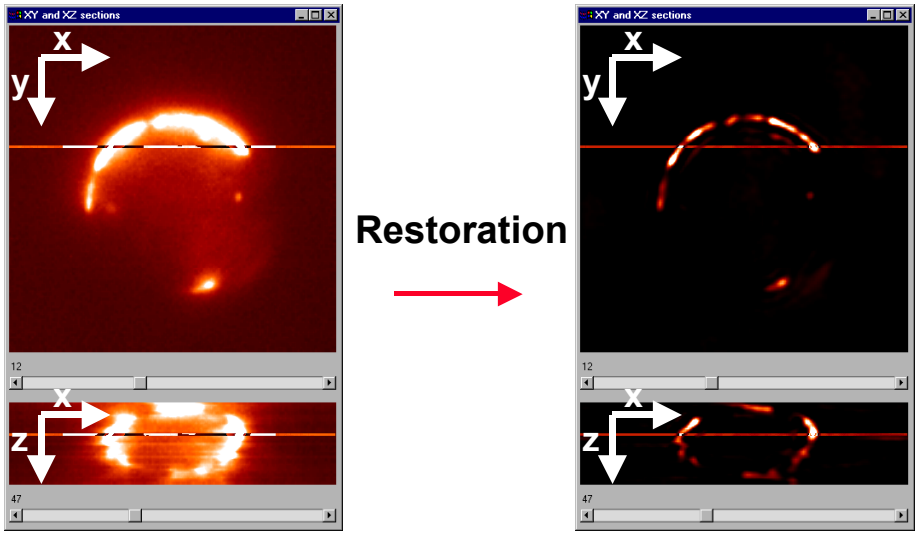

FIG. 4. Exemple de déconvolution sur une image de fluorescence (Image : Dr G. Jung, Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Emile Muller, Mulhouse. Déconvolution : B. Colicchio, Laboratoire MIPS, Université de Haute-Alsace, Mulhouse).

Les algorithmes de déconvolution ont connu de nombreux développements ces dernières années, et sont maintenant disponibles aussi bien dans logiciels libres ou gratuits (COSMOS, ImageTrak, modules pour ImageJ ou Icy etc..) que dans de nombreux outils commerciaux. Leur utilisation a été grandement simplifiée, mais il convient toujours de garder à l'esprit qu'une déconvolution est un calcul numérique, qui donne toujours un résultat, mais dont il faut savoir apprécier la qualité, ce qui nécessite de l'expérience.

2. LUMIERE STRUCTUREE

2.1. Sectionnement optique

Une modification originale du système d'illumination du microscope permet d'obtenir d'excellents résultats en termes de sectionnement optique.

Pour comprendre les techniques d'imagerie en lumière structurée, il faut revenir sur le mécanisme de formation des images. En technique de champ large, l'image enregistrée est le résultat d'un produit de convolution entre la réponse impulsionelle optique du microscope et l'objet :

$$g(x,y) = \iint h(x_1 + x, y_1 + y) S(x_1, y_1) f(x_1, y_1) dx_1 dy_1 \tag{10}$$

mais cette équation suppose une illumination uniforme de l'objet S(x,y)=1.

Supposons maintenant que le spécimen est illuminé par un motif périodique sous la forme d'une grille à une dimension à la fréquence spatiale ω :

$$S(x_1, y_1) = 0.5(1 + \cos(\omega x_1 + \varphi)) \tag{11}$$

où m est la profondeur de modulation et φ une phase spatiale arbitraire. On montre alors que l'image obtenue peut se décomposer en trois termes sous la forme :

$$g(x,y) = g_0(x,y) + g_c(x,y)\cos\varphi + g_s(x,y)\sin\varphi \tag{12}$$

Dans cette équation :

g_0 représente l'image standard obtenue à une fréquence de modulation nulle S(x,y)=1

g_c représente une image formée par une grille de la forme $\cos(\omega x_1)$

g_s représente une image formée par une grille de la forme $\sin(\omega x_1)$

La technique consiste alors à acquérir trois images g_1, g_2 et g_3 correspondant aux trois phases spatiales φ=0, φ=2π/3, φ=4π/3. En recombinant correctement ces images, on obtient une image qui ne contient plus g_0, et donc qui correspond à une coupe optique (g_0 contient en fait un mélange de tous les plans observés) :

$$g = \left|(g_1 - g_2)^2 + (g_1 - g_3)^2 + (g_2 - g_2)^2\right|^{1/2} \tag{13}$$

Le Figure 5 explique qualitativement cette technique. Dans le plan focal, on voit que la grille de lumière, projetée par l'objectif sur le spécimen, produit 3 illuminations différentes, qui donneront trois images différentes. Le point essentiel est que chaque grille est est nette dans le plan focal, mais floue au-dessus et en dessous de celui-ci. Les 3 images en illumination structurée sont donc différentes dans leur composante venant du plan focal, mais essentiellement identiques à celles obtenues en illumination classique pour le fond diffus hors du plan focal (point A). Dans l'équation (11), les opération g_i-g_j ont donc essentiellement pour effet de soustraire ce fond diffus venant des plans défocalisés et de reconstruire la composante continue venant du plan focal (les points B et C seront illuminés successivement, et différemment dans les trois images, alors que le point A est toujours illuminé de la même manière) . On reconstruit ainsi une image de coupe optique « propre ».

Le succès de cette technique vient de sa simplicité dans le montage optique. Cependant, il faut s'assurer de la qualité de la projection des franges, et de l'immobilité du

spécimen durant l'aquisition des 3 images pour éviter la formation d'artéfacts de reconstruction. Stricto senso, cette méthode n'améliore pas la résolution, mais fournit des coupes sériées optiques de qualité. Elle n'a pas d'intérêt sur des spécimens minces ! Cette technique de coupes sériées est maintenant disponible (par exemple chez Zeiss sous le nom d'Apotome), sous la forme d'un module additionnel pour microscope conventionnel.

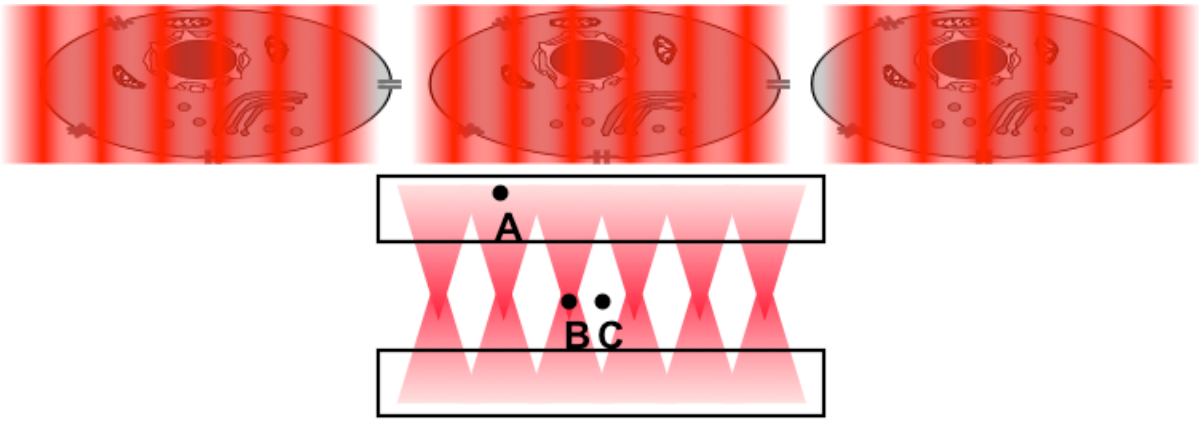

FIG. 5. Principe des coupes sériées optiques par illumination structurée. Cette technique permet de supprimer le fond continu, et d'obtenir des coupes optique « propres ».

2.2. Amélioration de la résolution latérale et longitudinale

Une étude plus poussée de l'illumination structurée montre que si on projette une grille suffisamment fine, on peut étendre le domaine des fréquences spatiales observables en microscopie en champ large (les images modulées contiennent en fait des fréquences spatiales plus élevées absentes dans g_0).

La Figure 5 en décrit le principe qualitativement. On considère un objet composé de segments fluorescents espacés de λ/4 (en bleu). Si l'object est illuminé uniformément (en vert), la résolution en détection (limitée à λ/(2NA), λ/2 au mieux dans l'air), les segments ne sont pas résolus, et on obtient une image a peu près uniforme. Si on illumine l'objet par un jeu de franges d'interférences, celles-ci ont une période de λ/2, soit une largeur à mi-hauteur de λ/4. L'image obtenue montre une modulation. On décale ensuite le jeu de franges. On obtient une deuxième image, avec une information différente et complémentaire.

Cette approche se formalise facilement. On rappelle l'équation de formation des images avec une illumination structurée (en une dimension pour plus de facilité) :

$$g(x) = \iint h(x_1 + x,)S(x_1)f(x_1)dx_1 \qquad S(x_1) = 0.5(1+\cos(\omega x_1)) \tag{14}$$

Si on raisonne dans l'espace de Fourier, on obtient :

$$\tilde{g}(k_x) = \tilde{h}(k_x)\left[\tilde{f}(k_x) + \tfrac{1}{2}\tilde{f}(k_x - \omega) + \tfrac{1}{2}\tilde{f}(k_x + \omega)\right] \tag{15}$$

On voit donc que la transformée de l'image obtenue en illumination structurée contient 3 termes, l'image standard, produit de la transformée de Fourier de l'objet par la transformée de la réponse impulsionnelle, mais aussi deux termes contenant des fréquences de l'objet, décalées de ω. On reconnait une technique de modulation.

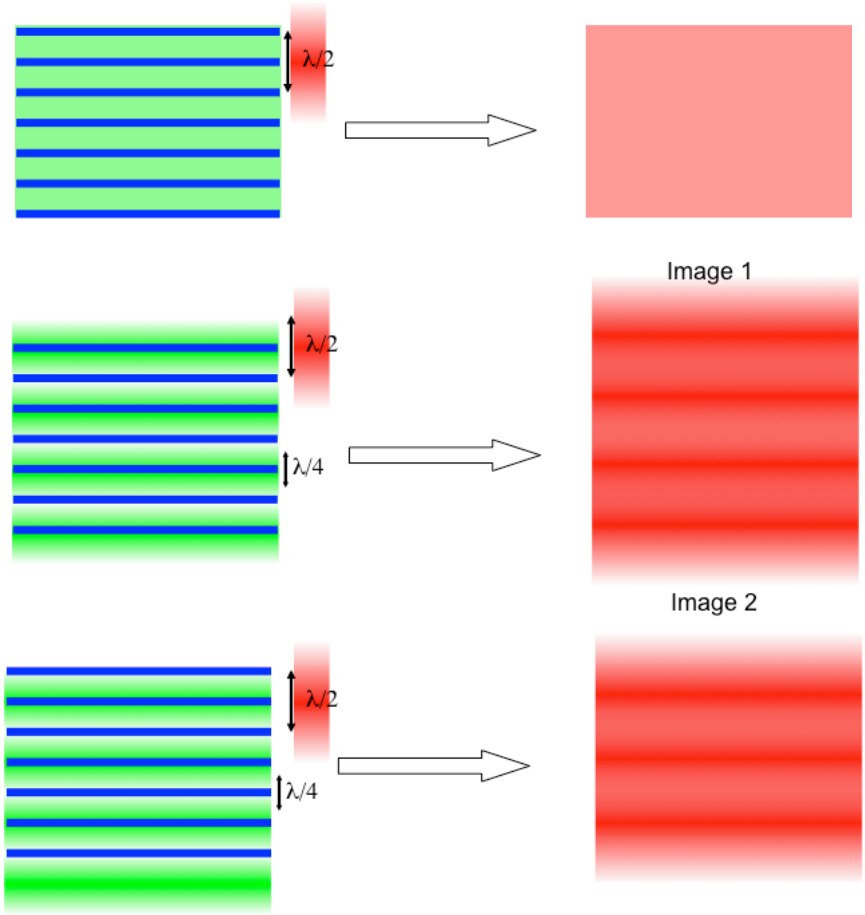

FIG. 5. Principe de l'illumination structurée pour améliorer la résolution.

La difficultée est donc de démoduler l'image. Pour cela, on prend trois images en déphasant la modulation de 0, -2π/3 et +2π/3. On obtient trois images I_0, $I_{-2\pi/3}$, et $I_{2\pi/3}$. On montre alors que :

$$\begin{bmatrix} \tilde{I}_0 \\ \tilde{I}_{-2\pi/3} \\ \tilde{I}_{+2\pi/3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{+2\pi/3} & e^{-2\pi/3} \\ 1 & e^{-2\pi/3} & e^{+2\pi/3} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_0 \\ S_{-2\pi/3} \\ S_{+2\pi/3} \end{bmatrix} \tag{16}$$

où S_0, $S_{-2\pi/3}$, et $S_{2\pi/3}$ sont les trois spectres démodulés. Après inversion de cette équation matricielle, on les réassemble dans l'espace de Fourier pour obtenir un spectre étendu. Si la fréquence de modulation ω correspond à la fréquence de coupure du système optique, on obtient au final un spectre deux fois plus étendu, et on double donc la résolution.

Ce principe s'étend en 2D et même en 3D pour améliorer aussi la résolution longitudinale, et donne des résultats spectaculaires. Cette approche est maintenant disponible commencialement (par exemple sous le nom N-SIM chez Nikon). Cette technique, contrairement au microscope confocal, ne rejette pas de lumière, ce qui est intéressant pour les spécimens peu lumineux. Par contre, il est impératif que le spécimen soit absolument immobile durant les prises de vues nécessaires, ce qui la rend peu rapide, surtout en 3D.

3. MICROSCOPES A OBJECTIFS MULTIPLES

3.1. Microscopie 4Pi

L'idée du microscope 4Pi est de combiner un système interférentiel au système d'illumination ou/et de détection du microscope. En ce sens, il améliore le microscope à ondes stationnaires, dont le principe a été proposé dans les années 80, mais qui est resté peu utilisé. Cette technique a été proposée au début des années 90 par Stefan Hell qui dirige maintenant le groupe de NanoBioPhotonique au Max Planck Institut de Göttingen (RFA).

Un microscope 4Pi utilise deux objectifs colinéaires pour illuminer de manière cohérente le spécimen et/ou détecter de manière cohérente l'émission de fluorescence. On distingue donc plusieurs types de microscopie 4Pi, suivant que l'excitation soit cohérente, et la détection confocale (4Pi type A), que l'excitation soit confocale et la détection cohérente (4Pi type B), ou que l'excitation et la détection se fasse au travers des deux objectifs (4Pi type C). La Figure 6 décrit très brièvement le principe de ces trois types de microscopes 4Pi.

Pour l'illumination, on utilise un faisceau laser, comme pour un microscope confocal. Ce faisceau est divisé en deux par une lame séparatrice, et chaque faisceau est focalisé par un objectif. La difficulté vient de l'alignement des points focaux des deux objectifs qui doivent parfaitement coïncider.

Pour la détection, le problème comporte une difficulté supplémentaire, qui est la très faible longueur de cohérence de la lumière en fluorescence, typiquement inférieure à 20 µm. Les deux bras de détection doivent donc avoir des longueurs identiques à cette longueur de cohérence près, ce qui constitue une limitation sévère à la généralisation de cette technique.

Pour calculer la PSF d'illumination, on additionne donc de manière cohérente les champs des deux objectifs. En première approximation, on considérera une focalisation dans un milieu homogène (pas de problème d'aberration en particulier). Le champ du premier objectif est alors donné par les équations de Richards et Wolf. On a donc pour deux objectifs, et en supposant que les PSF de détection et d'illumination sont identiques :

$$PSF_{ill}(x,y,z) = PSF_{\det}(x,y,z) = \left|E(x,y,z) + E'(x,y,z)\right|^2 \tag{17}$$

La symétrie du problème impose pour les intégrales de diffraction :

$$I_n = I_n(x,y,z) \qquad I'_n = I_n(x,y,-z) \qquad \mathrm{n} = 1,2,3 \tag{18}$$

Et on obtient alors :

$$PSF_{\det}^{4Pi}(x,y,z) = \mathrm{Re}\{I_0\}^2 + 2\mathrm{Re}\{I_1\}^2 + \mathrm{Re}\{I_2\}^2 \tag{19}$$

On obtient pour un microscope 4Pi type C (en première approximation) :

$$PSF^{4PiC}(x,y,z) = \left[\mathrm{Re}\{I_0\}^2 + 2\mathrm{Re}\{I_1\}^2 + \mathrm{Re}\{I_2\}^2\right]^2 \tag{20}$$

La Figure 7 montre les PSF théoriques (a) : d'illumination, (b) de détection , et (c) 4PiC pour un objectif d'ouverture numérique 0.8, calculées en considérant une excitation à 400 nm et une détection à 450 nm. Ces longueur d'onde correspondent à l'utilisation du colorant Cascade Blue de Molecular Probes. Mais la présence de nombreuses franges d'interférence aura pour résultat de brouiller l'image obtenue, ce qui limitera en particulier

les possibilités de restauration (tout comme en microscopie à ondes stationnaires). Il faut donc utiliser un objectif de forte ouverture numérique et restaurer l'image pour réduire au maximum les franges résiduelles, toujours présentes comme le montre la Figure 7 (d), qui présente la PSF 4PiC pour un objectif d'ouverture numérique 1.4. Pour cet objectif, le gain en résolution longitudinale est spectaculaire, puisque la frange centrale donne une résolution d'environ 70 nm Le gain en résolution latérale est plus modeste avec une largeur à mi-hauteur (FWHM) de 120 nm.

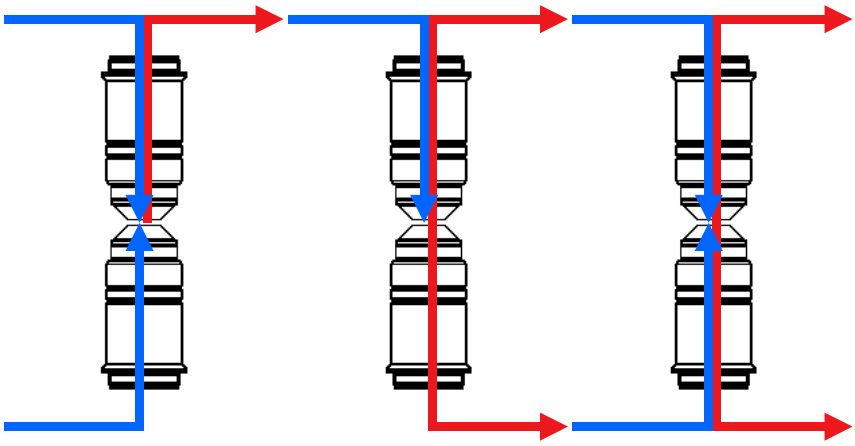

FIG. 6. Principe de la microscopie 4Pi en illumination cohérente et détection confocale (4Pi type A), illumination confocale et détection cohérente (4Pi type B), et illumination et détection cohérente (4Pi type C).

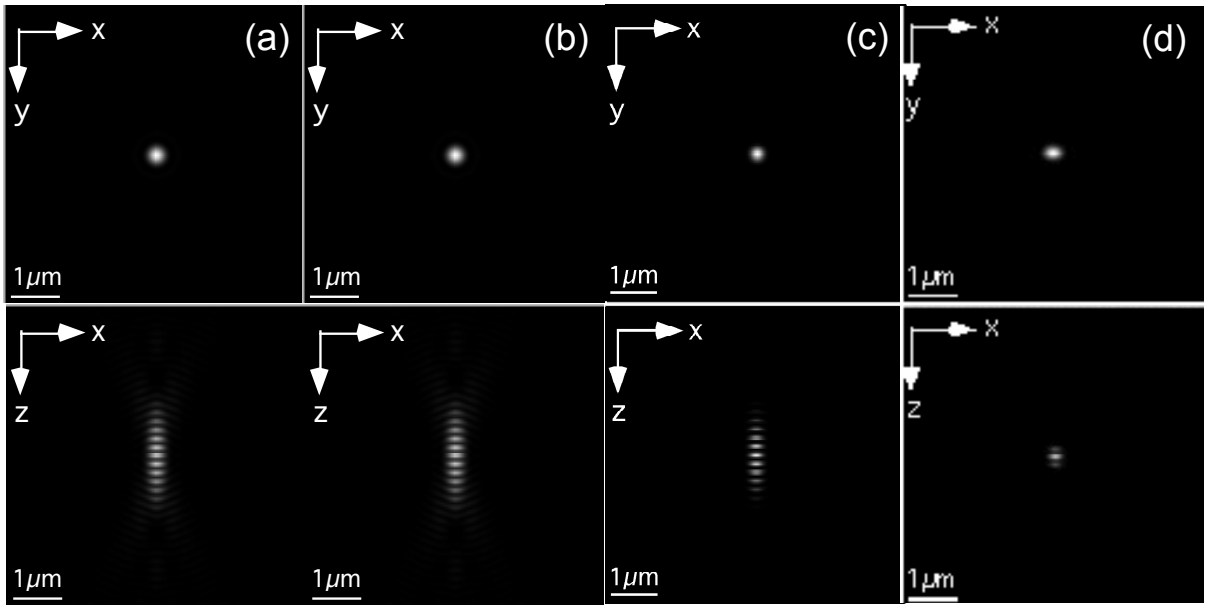

FIG. 7. PSFs en microscopie 4Pi pour des objectifs d'ouverture numérique 0.8. (a) illumination 4PiA. (b) détection 4PiB. (c) Microscope 4PiC. (d) Microscope 4PiC avec objectifs d'ouverture numérique 1.4. Notez la présence de franges d'interférences résiduelles (même pour NA=1.4)

Un tel microscope a été vendu par Leica, mais est maintenant abandonnée, à cause de la difficulté de l'alignement d'un système interféromètrique en fluorescence (longueur de cohérence très faible).

3.2. Microscopie théta

En microscopie classique et même confocale, un compromis entre distance de travail et résolution doit être accepté. Les objectifs à grande distance de travail ont généralement une faible ouverture numérique, et donc une mauvaise résolution, en particulier le long de l'axe optique. Les objectifs à grande ouverture numérique permettent une bien meilleure résolution, mais au prix d'une distance de travail très courte. Nikon a récemment introduit un nouveau standard d'objectifs permettant d'allonger la distance de travail. Cette solution a cependant l'inconvénient de rendre obsolète les matériels existants, de plus ce "standard" n'est pour l'heure suivi que par Nikon.

Le microscope thêta a été proposé par E. Stelzer et son équipe de l'European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg – RFA) pour combiner haute résolution et grande distance de travail voici quelques années déjà. Il présente l'avantage unique de permettre l'étude de grands spécimens biologiques avec une bonne résolution. L'idée est de diminuer la taille de la tache de focalisation en utilisant deux objectifs de microscopes croisés. Ainsi, la résolution longitudinale plus faible de l'objectif de détection est compensée par le fait que son axe optique correspond à un axe latéral de l'objectif d'illumination.

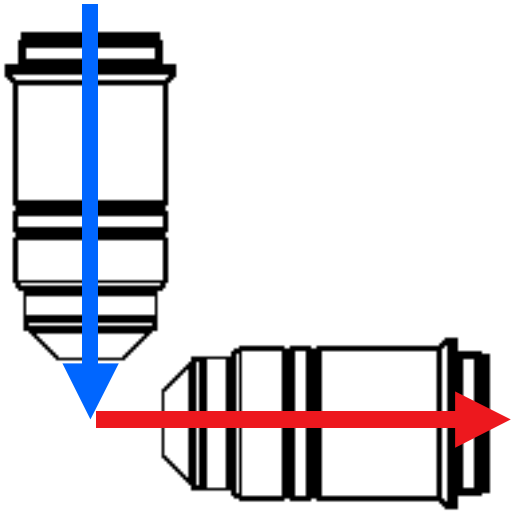

FIG. 8. Principe du microscope thêta. Le spécimen est illuminé à travers un objectif, la détection se fait par un second objectif placé perpendiculairement au premier.

La Figure 8 décrit la configuration considérée. L'objectif 1 est utilisé pour l'excitation de fluorescence, et l'objectif 2 sert à la détection confocale. La configuration optique considérée impose d'utiliser des objectifs sans lamelle.

Le traitement classique du microscope thêta (et du microscope confocal) consiste à considérer que la molécule fluorescente excitée se comporte comme un émetteur isotropique, émettant une onde non-polarisée. La PSF finale est alors simplement calculée en multipliant la PSF d'illumination avec la PSF de détection. Pour un montage thêta, on obtient alors :

$$PSF^{theta}(x,y,z) = PSF_{\det}(x,y,z) \times PSF_{ill}(-z,y,x) \tag{21}$$

On simplifie généralement encore le modèle en calculant la PSF de détection comme la PSF d'illumination en utilisant le modèle de Richard et Wolf.

La Figure 9 présente les PSF d'excitation, de détection et globale pour un microscope thêta calculée en considérant une excitation à 400 nm et une détection à 450 nm. On considère des objectifs à immersion à eau d'ouverture numérique N.A.=0.8 avec une distance de travail de 3.3 mm qui permettent un montage thêta.

La PSF finale promet une bien meilleure résolution selon l'axe optique de l'objectif de détection car l'émission selon cet axe est bien limitée par la PSF d'excitation. Le microscope thêta est donc caractérisé par une PSF quasi-isotrope. La résolution est cependant plus faible que pour d'autres types de microscopes à plusieurs objectifs (voir paragraphe suivant), à cause de l'emploi d'objectifs à faible ouverture numérique.

Le modèle utilisé pour calculer ces PSF est cependant une approximation supposant l'émission de fluorescence isotrope et non-polarisée. En appliquant les développements du microscope confocal exposés dans les paragraphes précédant à la configuration particulière du microscope thêta, on peut étendre la description de ce type d'instrument tenant compte de la nature polarisée de la lumière de fluorescence (modèle dipolaire) et de la théorie électromagnétique de la diffraction appliquée aux objectifs à grande ouverture numérique.

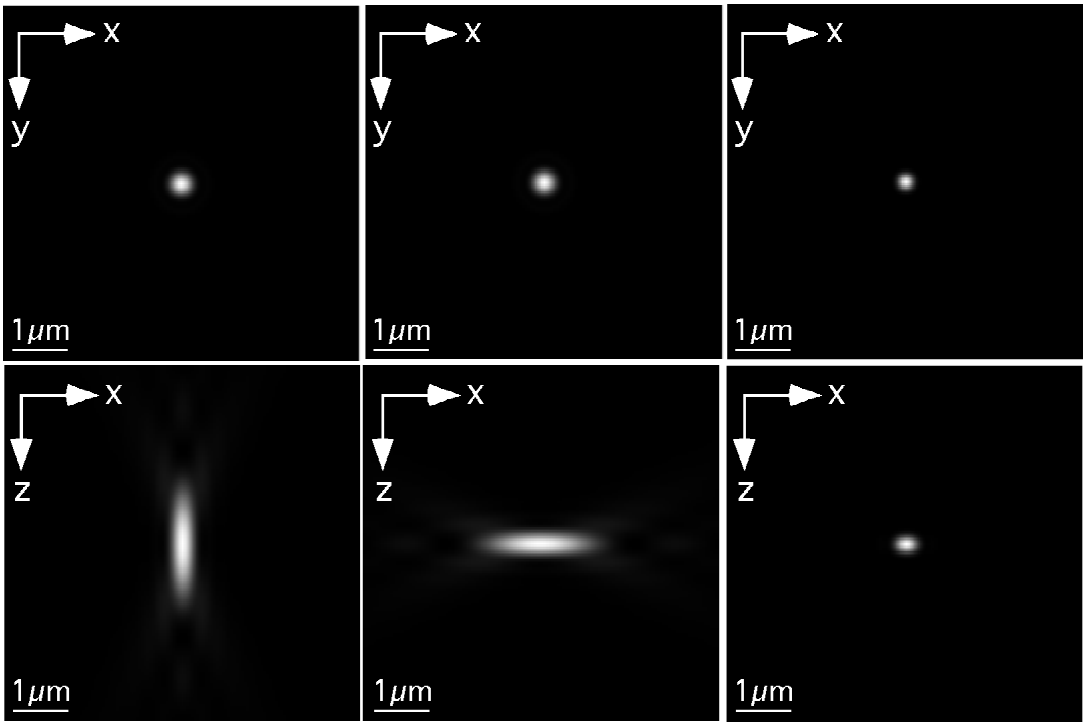

FIG. 9. PSF d'un microscope thêta utilisant des objectifs d'ouverture numérique 0.8. (a) : illumination à 400nm. (b) détection à 450 nm. (c) PSF finale. On obtient une résolution quasi isotrope, bien meilleure que pour un confocal classique.

Notons un inconvénient majeur de cet instrument : les points focaux des deux objectifs doivent toujours coïncider, ce qui est en pratique très difficile (c'est la même raison pour laquelle les microcopes confocaux en transmission ont rencontré peu de succès).

Ces difficultés ont conduit à l'abandon progressif de cette technique, pour la simplifier, ce qui a donné naissance à la technique de la microcopie à feuille de lumière.

3.3. Microscopie à feuille de lumière

La difficulté à maintenir les deux spots bien confocaux en microscopie theta a conduit à relacher une contrainte, tout en maintenant la possibilité de faire un bon sectionnement optique en gardant une configuration perpendiculaire entre illumination et détection.

La technique consiste à utiliser non plus un faisceau focalisé en deux dimensions, mais en une dimension seulement, pour créer une feuille de lumière à l'aide d'une lentille cylindrique. Cette feuille « tranche » optiquement le spécimen. La détection se fait via le deuxième objectif, en mode grang champ cette fois-ci. La Figure 10 en décrit le principe. Cette microscopie est connue sous plusieurs noms : Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM), Light Sheet Microscopy, Ultramicroscopy.

Cette idée, récente en fluorescence, est en fait très ancienne, et a été introduite en 1902 par Richard Adolf Zsigmondy et Henry Siedentopf dans leur ultramicroscope conçu pour observer les colloïdes (ce qui vaudra à Zsigmondy le prix Nobel de Chimie en 1925). Stricto-senso, il n'y a pas d'amélioration de la résolution en elle-même, mais une amélioration spéctaculaire de la qualité des images obtenues pour de grands spécimens. L'ultramicroscope est en fait une variante de microscopie à champ sombre

Cette technique est relativement simple d'un point de vue instrumental, mais sa diffusion a été freinée par les problèmes de reconstructions des images 3D ainsi obtenues. En effet, l'observation de « grands » spécimens (embryon de zebrafish ou de madeka, embryon de drosophile, cultures cellulaires en 3D) à l'échelle cellulaire induit :

- d'énormes volumes de données à traiter.
- des effets d'ombrage, ou de déformation devant être corrigés.
- une manipulation délicate du spécimen.

Un tel système est maintenant disponible commercialement chez Zeiss. Il faut aussi citer l'initiative OpenSPIM (http://openspim.org), qui réunit un consortium de plusieurs laboratoires européens visant à diffuser cette technique, et qui met à disposition les plans complets, listes de pièces et logiciels nécessaires à la construction d'un tel instrument.

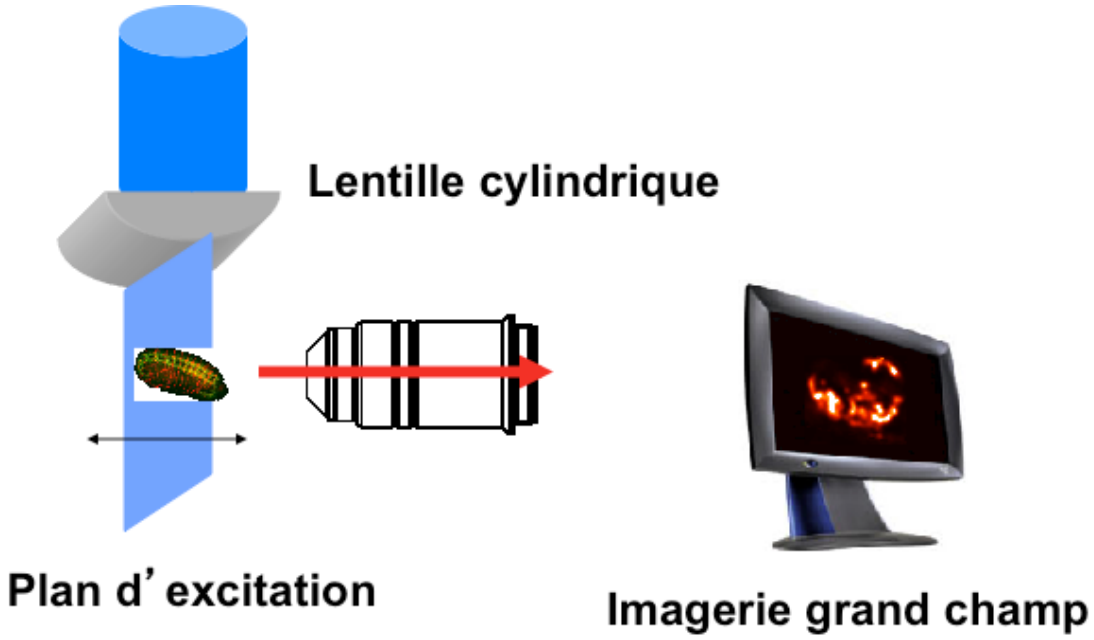

FIG. 10. Schéma de principe d'un microscope à feuille de lumière.

4. MICROSCOPE STED

La technique STED (Stimulated Emission Depletion) représente le progrès le plus spectaculaire de ces dernières années en microscopie de fluorescence. Cette technique a été proposée au début des années 90 par Stefan Hell, mais il a fallu attendre le début du XXIème siècle pour voir ses premières applications à l'imagerie biologique.

Le principe est basé sur l'analyse du diagramme de Jablonski, en tirant parti de l'effet d'émission stimulée prédit par Einstein, et utilisé couramment dans les lasers. La Figure 11 en décrit le principe.

Le faisceau d'excitation fait passer les molécules fluorescence de l'état de repos S_0 vers l'état excité S_1^{vib}. La molécule étant complexe, les états de repos et excité sont en effet constitués de bandes, et non d'un état simple comme pour un atome. L'électron passe ensuite de l'état S_1^{vib} à l'état S_1 par une transition non-radiative. Il reste dans l'état S_1 pour une durée typique de la durée de vie de fluorescence (dans le domaine ns). Puis il descend à l'état S_0^{vib} par la transition de fluorescence, et enfin à l'état S_0 par une seconde transition non-radiative. Les états de repos et excité étant constitués de bandes, le spectre de fluorescence des molécules complexes est un spectre large, et non un spectre de raies.

L'idée de la microscopie STED est de mettre à profit la durée non-nulle de l'état S_1 pour forcer certaine molécule à descendre sur un état S_0^{vib} *bien défini* à l'aide d'un laser émettant à une longueur d'onde bien précise, qui va provoquer une émission stimulée. Les molécules ayant subi cette émission stimulée ne peuvent alors plus contribuer au signal de fluorescence standard. On filtre simplement l'émission stimulée de l'émission de fluorescence libre pour distinguer les deux signaux.

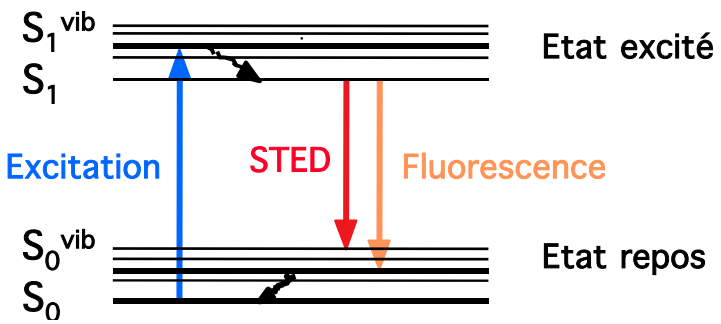

FIG. 11. Principe de la microscopie STED.

Pour obtenir une amélioration de la résolution, il faut encore séparer spatialement les molécules subissant l'effet STED de celles émettant une fluorescence libre. Pour cela, on utilise simplement des faisceaux correctement mis en forme. La Figure 12 décrit le principe d'un microscope confocal STED. Le faisceau d'excitation est celui d'un microscope confocal standard (a), du point de vue de la forme. Pour bien distinguer les différents effets d'un point de vue temporel, on utilise cependant un faisceau d'excitation femtoseconde. Lorsque les molécules sont excités, et se trouve dans l'état S_1, on provoque l'émission stimulée à l'aide d'un faisceau STED creux (b). On peut obtenir ce genre de faisceau à l'aide d'un lame de phase 1/2 onde sur la moitié de l'ouverture numérique de l'objectif par exemple. La zone excitée, mais ne subissant pas l'effet STED, est alors réduite (c). Un filtre sélectionne spectralement cette zone (l'émission STED se faisant de toute façon vers l'avant, mais cela élimine aussi les possibles réflexions parasites), et la PSF finale de fluorescence libre est alors fortement réduite (d) par rapport à la zone d'émission de fluorescence normale d'un microscope confocal (e).

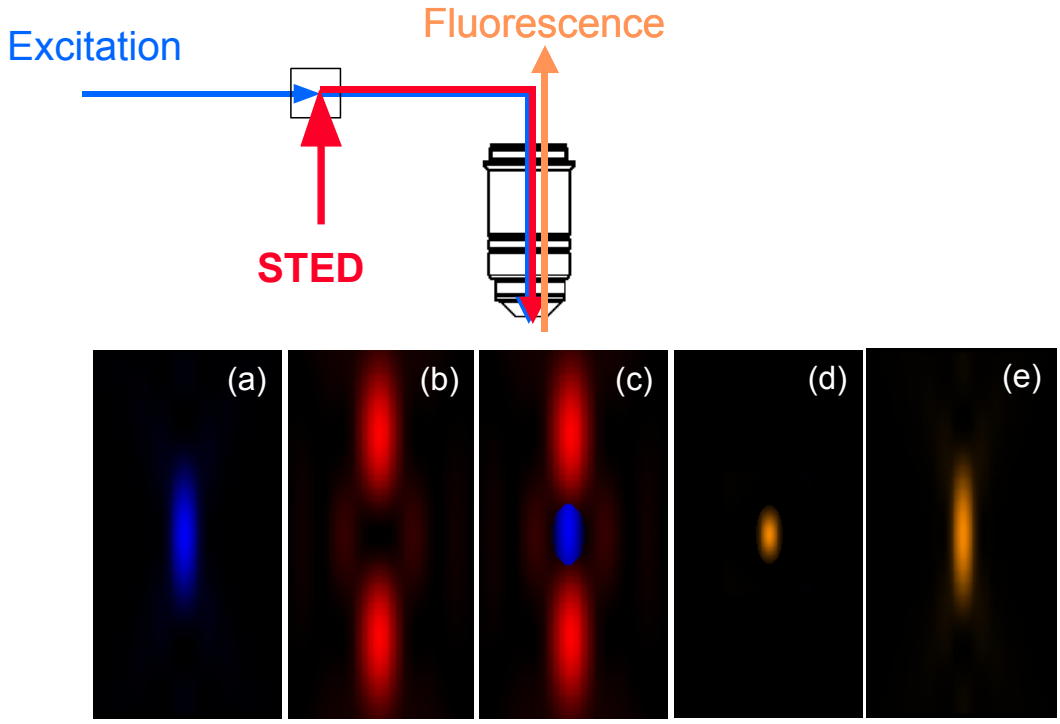

FIG. 12. PSFs utilisés en microscopie STED. (a) PSF d'excitation. (b) PSF STED. (c) supersposition de (a) et (b). La PSF résultante (d) est beaucoup plus compacte que la PSF classique de fluorescence (e).

A l'aide de cette technique, l'équipe de Stefan Hell a démontré des résolutions inférieure à 100 nm en 3D, dans des spécimens biologiques vivants. Dans certains cas, une résolution de 30 nm a été obtenue en combinant microscopie 4Pi et microscopie STED.

Cette technique n'est (en théorie) limitée que par la capacité à correctement superposer correctement les faisceaux d'excitation et STED dans un spécimen (problème des aberrations), à la tenue des molécules aux différentes excitations (phénomènes de photobleaching, photo-dissociation), et au rapport signal sur bruit obtenu (le nombre de molécules émettrices diminuant directement avec la résolution, la qualité des images se dégrade).

Cette technique est maintenant commercialisée par Leica, et a donné naissance à plusieurs variantes basée sur d'autres effets : T-Rex (**T**riplet **RE**la**X**ation), GSDIM (Ground State Depletion microscopy), embrassées sous la dénomination plus générale de microscopie RESOLFT : **RE**versible **S**aturable **O**ptica**L** **F**luorescence **T**ransitions. Le lecteur intéressé trouvera sur le site de l'équipe de Stefan Hell les nombreuses publications décrivant ces différentes approches. Leica commercialise depuis peu un microscope STED 3D.

5. MICROSCOPIE POINTILLISTE

Une autre technique apparue récemment (2006) est la microscopie pointilliste. Il en existe diverses variantes (PALM, STORM, F-PALM, dSTORM…), mais qui reposent toutes sur le même principe.

Si la résolution d'un instrument optique est toujours limitée par sa réponse impulsionnelle optique, la précision de repérage d'un émetteur unique (molécule fluorescence) peut, elle, être bien plus élevée. Typiquement, la théorie de l'émission lumineuse tenant compte du bruit de Poisson montre que :

$$P \propto \frac{FWHM(PSF)}{\sqrt{N}} \tag{21}$$

C'est à dire que la précision de pointé du sommet de la PSF est proportionnelle à la largeur de la PSF, divisée par la racine carré du nombre de photons détectés.

On en déduit donc que plus la PSF est mesurée précisément, plus la position de la molécule émettrice est connue avec précision. Cette technique impose cependant de n'avoir que des molécules individuelles qui émettent à un instant t, c'est à dire qu'elles doivent être suffisemment distantes les unes des autres pour que les PSF de se chevauchent pas. On accumule donc un grand nombre d'images de molécules individuelles, que l'on traite une par une, et on additionne à la fin des images composées des positions identifiées des molécules, ce qui a donné le nom de microscopie pointilliste à ces techniques.

La Figure 13 rappelle le principe de formation des image par accumulation de PSF. La Figure 14 décrit brièvement le principe des microscopies pointillistes (si on utilise la propriété de photoblanchiement : PALM).

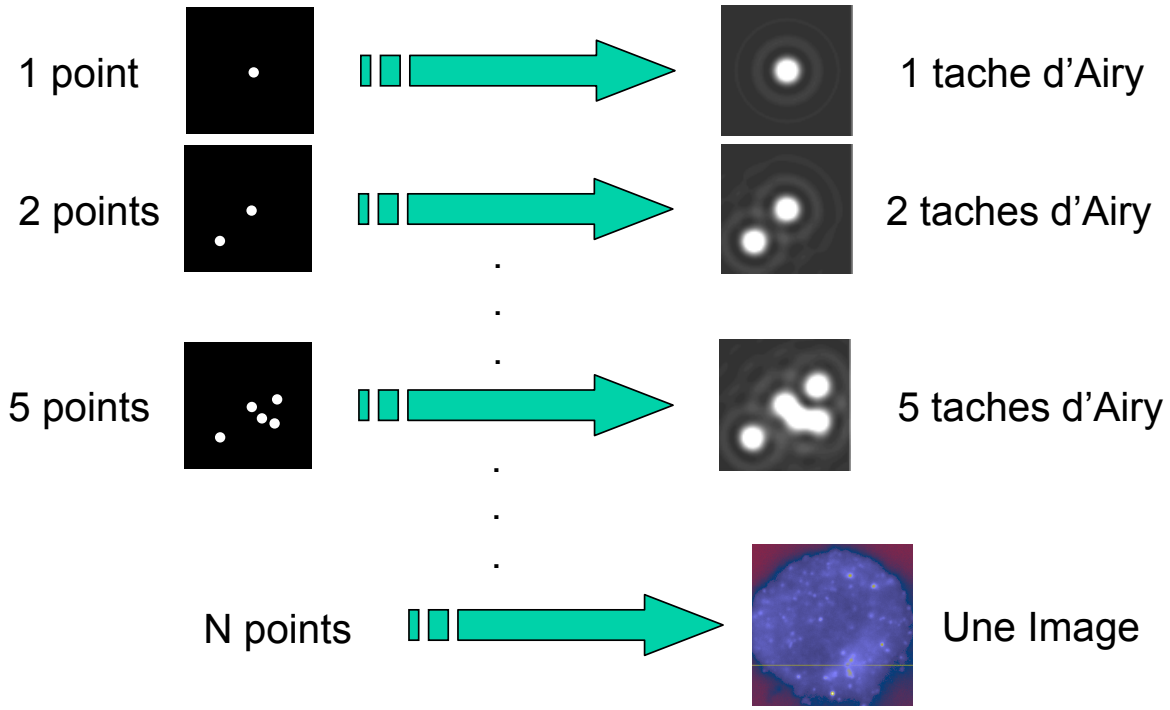

FIG. 13. Formation des images par accumulation de Réponses Impulsionnelles Optiques

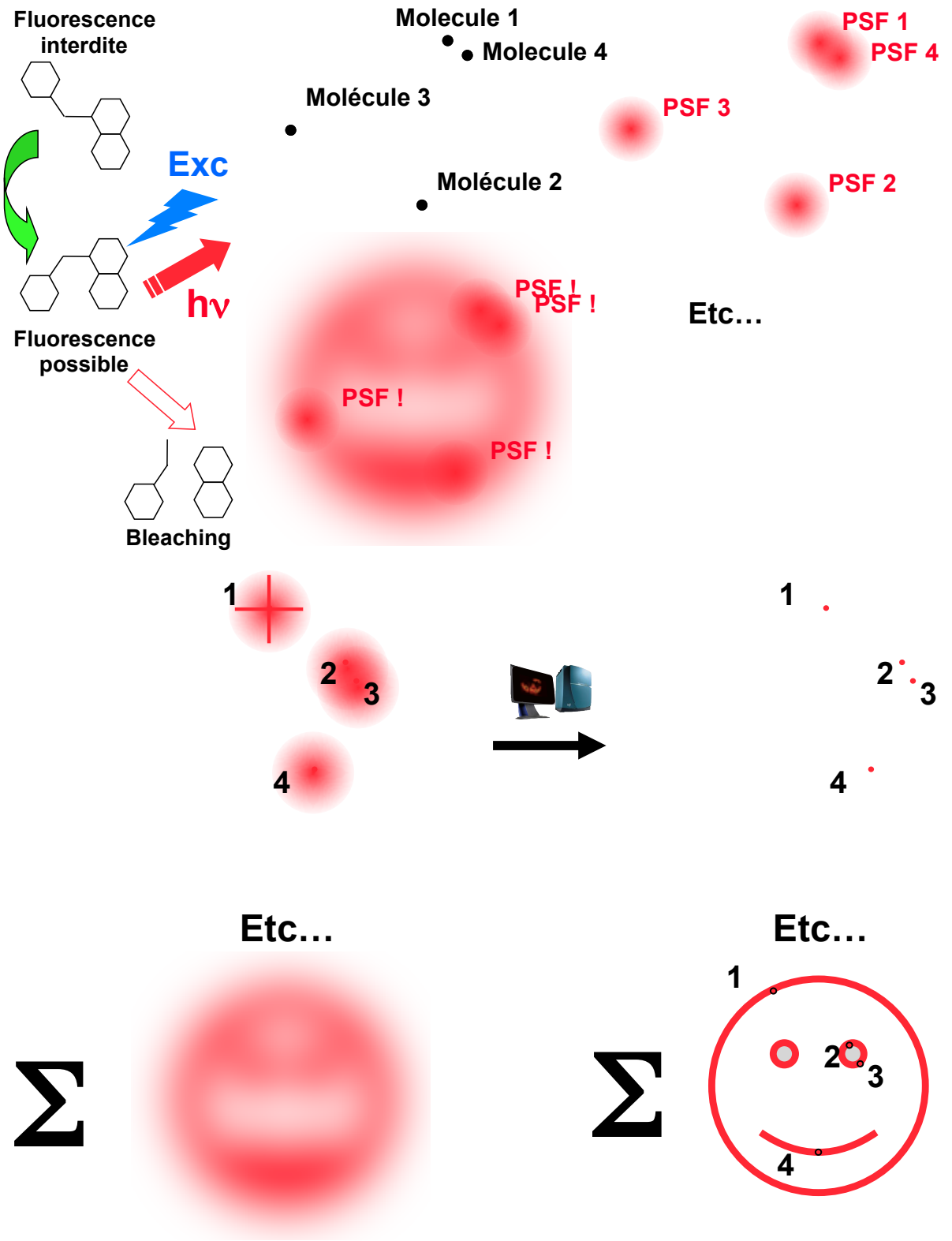

FIG. 13.Principe des microscopies pointillistes, par traitement d'un grand nombre d'images intermédiaires contenant peut d'information, et sommation des images traitées pour obtenir une image finale améliorée : des molécules trop proches habituellement deviennent distinguables si les PSF qu'elles engendrent peuvent être traitées individuellement.

Si on additionne l'ensemble des PSF mesurées, on obtient une image floue (objet convolué par la PSF) comme dans la Figure 13, mais si on traite d'abord les images intermédiaires (Figure 14), constituées de très peu de points bien séparés spatialement, et qu'on les additionne ensuite, on obtient une image reconstruite délivrant bien plus de détails.

Ces techniques ont connu un grand succès ses dernières années, en particulier à cause de leur relative simplicité technique (comparée à la technique STED). Par contre, de nombreux artéfacts peuvent apparaître, à cause des temps de pose relativement longs, de possibles bougés du spécimen etc. Le marquage est souvent délicat. Les traitements de grands nombres d'images peuvent être longs.

Enfin, l'extension à la 3D de cette technique a été rendue possible en utilisant des techniques d'ingéniérie de PSF (astigmatisme, PSF en hélice), ou des techniques interférométriques (iPALM) assez proches dans leur principe de la technique 4Pi (et donc plus difficile à mettre en œuvre).

6. CONCLUSION

La microscopie optique est une technique ancienne, mais toujours pleine d'avenir. Le couplage du microscope à l'informatique offre en effet des perspectives renouvelées en termes d'imagerie 3D, voire 4D (3D plus temps) ou plus (temps de vie, spectroscopie etc..)

Depuis la fin du XIXème siècle et les travaux de Ernst Abbe, la limite de résolution constituée par le critère de Rayleigh semblait infranchissable. Ce critère sous-entend cependant une hypothèse, qui est que tous les points de la source émettent leur lumière de manière identique.

En termes de résolution, des progrès spectaculaires ont ainsi été réalisés ces dernières années. En microscopie de fluorescence en particulier, les limites ont été repoussées largement sous la barre des 100 nm, et on peut prévoir à relativement court terme le développement de la nanoscopie optique, qui ouvrira des possibilités encore insoupçonnées aux biologistes.

D'autres techniques, comme l'utilisation de photons jumeaux, de faisceaux mis en forme, ou d'effets non-linéaires devrait aussi permettre de s'affranchir du critère d'Abbe en microscopie en réflexion ou en transmission.

Un grand travail d'analyse de cet instrument reste cependant encore nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes de formation des images, pour pouvoir maîtriser les conditions d'acquisition, mieux utiliser l'outil informatique pour traiter les images, ou encore rechercher de nouveaux phénomènes physiques permettant d'obtenir une autre information du spécimen, ou d'obtenir cette information avec une meilleure sensibilité ou une meilleure résolution.

7. REFERENCES

La littérature proposée est loin d'être exhaustive, ce domaine de recherche étant particulièrement productif ces dernière années. Aussi ne sont donnés ici que les références principales (souvent historiques) du domaine de l'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence.

7.1. Déconvolution (en microscopie optique principalement)

B.R. Hunt, Inter. J. of Mod. Phys. C **5**, p. 151 (1994)

T.J. Holmes, J. Opt. Soc. Am. A **5**, p. 666 (1988)

T.J. Holmes, J. Opt. Soc. Am A **8**, p. 893 (1991)

J.A. Conchello and E.W. Hansen, App. Opt. **29**, p. 3795 (1990)

J.G. M^c^Nally, C. Preza, J.A. Conchello and L.J. Thomas Jr, J. Opt. Soc. Am. A **11**, p. 1056 (1994)

J.A. Conchello, J.J. Kim and E.W. Hansen, App. Opt. **33**, p. 3740 (1994)

J.A. Conchello, SPIE **2302**, p. 369 (1994)

J.A. Conchello, J. Opt. Soc. Am. A **15**, p. 2609 (1998)

J.A. Conchello, "Three-dimensional reconstruction of noisy images from partially confocal scanning microscope", Ph.D. dissertation (Dartmouth College, Hanover, N.H., 1990)

P.J. Verveer and T.M. Jovin, J. Opt. Soc. Am. A **14**, p. 1696 (1997)

C. Preza *et al.*, J. Opt. Soc. Am. A, **10,** p. 1078 (1992)

C. Preza, M.I. Miller and J.-A. Conchello, SPIE **1905,** p. 129 (1993)

E.S. Meinel, J. Opt. Soc. Am. **3**, p. 787 (1986)

W.A. Carrington, proc. SPIE **1205**, p. 72 (1990)

L.S. Joyce and W.L. Root, J. Opt. Soc. Am. A. **1**, p.149 (1984)

W.L. Root, J. Opt. Soc. Am. A. **4**, p.171 (1987)

E. Sekko, G. Thomas and A. Bourkrouche, Signal Proc. **72**, p. 23 (1999)

P.J. Verveer and T.M. Jovin, J. Opt. Soc. Am. A **14**, p. 1696 (1997)

P.J. Verveer and T.M. Jovin, J. Opt. Soc. Am. A **15**, p. 1077 (1998)

A. Chomik *et al.*, J. Opt. **28** p. 225 (1997)

G.M.P Van Kempen, L.J. Van Vliet, P.J. Verveer and H.T.M. Van Der Voort, J. Microsc. **185**, p. 354 (1996)

7.2. Microscopie en lumière structurée

B. Bailey, D.L. Farkas, D. Lansing Taylor and F. Lanni, Nature **366**, 44-48 (1993)

M.A.A Neil, R. Juskaitis and T. Wilson, Opt. Lett. **24**, 1905-1907 (1997)

M.G.L. Gustafsson, J. Microsc. **198**, 82 (2000)

M.G.L. Gustafsson, L. Shao, D.A. Agard and J.W. Sedat, "*Nonlinear structured illumination microscopy*," in Technical Digest of Focus on Microscopy 2003 (Genoa, Italy 13-16 April 2003), p. 58 (2003).

7.3. Microscopes à objectifs multiples et à feuille de lumière

Thêta :

S. Lindek, N. Salmon, C. Cremer und E. H. K. Stelzer, Optik **98**, 15-20 (1994)

E. H. K. Stelzer and S. Lindek, Opt. Commun. **111**, p. 536 (1994)

S. Lindek, R. Pick and E.H.K. Stelzer, Rev. of Sci. Instr. **65**, 3365-3372 (1994)

E. H. K. Stelzer, S. Lindek, S. Albrecht, R. Pick, G. Ritter, N. J. Salmon und R. Stricker, J. Microsc. **179**, 1-10 (1995)

S. Lindek und E. H. K. Stelzer, J. Opt. Soc. Am. A **13**, 479-482 (1996):

O. Haeberlé, H. Furukawa and K. Tenjimbayashi, C. R. Physique **3**, 1445–1450 (2002)

4Pi :

S.W. Hell and E.H.K Stelzer., Opt. Comm. **93**, 277-282 (1992)

S. Lindek, E. H. K. Stelzer und S. W. Hell: *Two new high-resolution confocal fluorescence microscopies (4Pi, Theta) with one- and two-photon excitation*, in: J. B. Pawley (ed.): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2. Ausg., Plenum Press, New York, 417-430 (1995)

S. W. Hell, *"Topics in Fluorescence Microscopy Vol. 5"* p. 361, J. Lakowicz ed. Penum Press, New York, (1997)

M. Schrader, M. Kozubek, S. W. Hell, and T. Wilson, Opt. Lett. **22**, 436-439 (1997)

S.W. Hell and M. Nagorni, Opt. Lett. **23**, 1567-1569 (1998)

M. Nagorni and S.W. Hell, J. Opt. Soc. Am. **A** 18, p.49 (2001)

O. Haeberlé *et al.*, Opt. Lett. **26**, 1684-1686 (2001)

K. Bahlmann, S. Jakobs, S. W. Hell, Ultramicr. **87,** 155–164 (2001)

A. Egner, S. Jakobs, and S. W. Hell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 3370–3375 (2002)

SPIM :

A. H. Voie, D. H. Burns, F. A. Spelman, Journal of Microscopy **170** p. 229 (1993)

J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, E. H. Stelzer, Science **305**, p. 1007 (2004)

P. J. Verveer,*et al.,* Nature Methods **4**, p. 311 (2007)

K. Greger, J. Swoger, E. H. Stelzer, Review of Scientific Instruments **78**, p. 023705 (2007)

P. A. Santi, Journal of Histochemistry & Cytochemistry **59** p. 129 (2011).

T. Mappes *et al*. Angewandte Chemie International Edition **51** p. 11208 (2012).

Peter G Pitrone, *et al.* Nature Methods **10**, p. 598 (2013).

7.4. Microscopie STED

S.W. Hell and J. Wichmann, Opt. Lett. **19**,780-782 (1994)

T. A. Klar and S W. Hell, Opt. Lett. **24**, 954-956 (1999)

M. Dyba and S.W. Hell, Phys. Rev. Lett. **88,** 163901 (2002)

S.W. Hell, Nature Biotech. **21**, 1347-1355 (2003)

V. Westphal, L. Kastrup and S.W. Hell, Appl. Phys. B **77**, 377-380 (2003)

S.W. Hell, S. Jakobs and L. Kastrup, Appl. Phys. A **77**, 859-860 (2003)

T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 8206-8210 (2000)

S.W. Hell, Phys. Lett. A **326**, 140-145 (2004)

7.5. Microscopie pointilliste

E. Betzig *et al.,* Science **313**, p. 1642 (2006)

M.J. Rust, M. Bates and X. Zhuang, Nature Methods **3**, p. 793 (2006)

S. T. Hess, T. P. K. Girirajan and M. D. Mason, Biophys. J. **91,** p. 4258 (2006)

H. Shroff *et al.* Nature Methods **5,** p. 417 (2008)

M. F Juette *et al.* Nature Methods **5,** p. 527 (2008)

G. Shtengel, *et al.* Proc. Natl Acad. Sci. USA **106**, p. 3125 (2009)