

# Imagerie de superrésolution basée sur la détection de molécules uniques dans le proche infrarouge



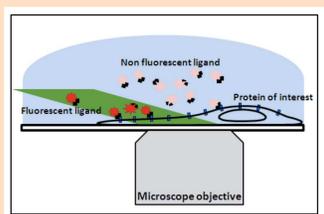
C. BUSQUET, A. GODIN, B. LOUNIS, L. COGNET  
 busquet.caroline@gmail.com, antoine.godin@u-bordeaux1.fr,  
 brahim.lounis@u-bordeaux1.fr, lcognet@u-bordeaux1.fr



## Présentation du uPAINT

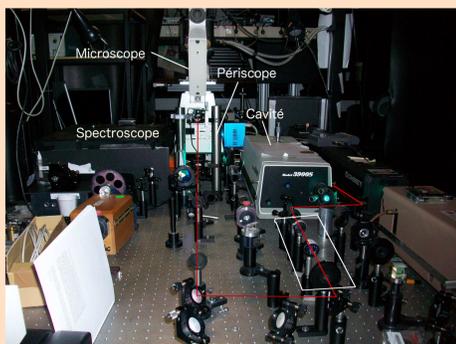
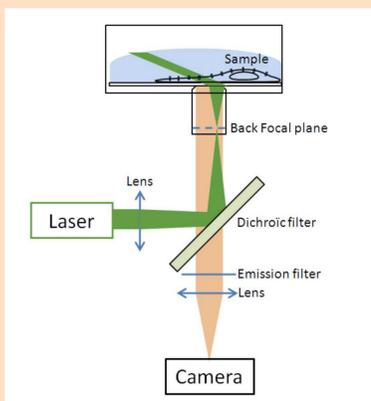
Depuis quelques années, on assiste à l'essor de l'étude de molécules individuelles pour faire de l'imagerie superrésolution. En effet, la résolution des images obtenues en microscopie classique est limitée par la diffraction de la lumière. Une stratégie pour atteindre la superrésolution consiste à détecter chaque molécule individuellement et déterminer le centre de chaque molécule, représentée par une tâche lumineuse appelée *Point Spread Function* (PSF). On parvient ainsi à reconstituer l'image avec une résolution nettement supérieure, de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Une technique d'imagerie superrésolution développée au LP2N est le uPAINT (*universal Point Accumulation Imaging Nanoscale Topography*), basée sur la microscopie de fluorescence en champ large. Elle repose sur l'observation en temps réel des fluorophores couplés à des anticorps lorsqu'ils se lient aux récepteurs des membranes des cellules cibles. L'enregistrement de plusieurs séries d'images augmente le nombre de particules détectées (et donc la statistique), ce qui permet de déterminer leur localisation pour reconstruire une image. De plus, le uPAINT nécessite une illumination oblique de l'échantillon, qui permet d'observer uniquement les molécules fluorescentes fixées aux cellules, et non celles qui sont diffusées en solution. L'objectif du stage est de développer le uPAINT dans l'infrarouge, car l'étude des tissus épais sera facilitée pour ces longueurs d'onde, en comparant la photophysique de nouveaux fluorophores, ZWIR ("The Flare Foundation") et CWIR (<http://biosupport.licor.com>), pour sélectionner le plus adapté.

## Microscopie de fluorescence en champ large



Avec cette technique on observe des structures grâce à des fluorophores. En effet, lorsque le faisceau du laser est dirigé sur l'échantillon marqué par les fluorophores, ces derniers sont excités à une longueur d'onde caractéristique, la longueur d'onde d'absorption. Puis ils émettent un rayonnement en revenant à leur état fondamental avec une plus grande longueur d'onde (longueur d'onde d'émission), dû à l'effet Stokes. Par conséquent, en séparant spectralement l'émission de l'excitation pour chaque fluorophore, on obtient une image des molécules fluorescentes présentes dans la cellule.

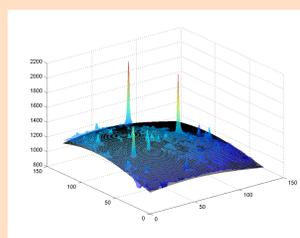
## Schéma et photos du montage expérimental



## Détection de molécules uniques

L'analyse des données consiste à faire du "particle tracking", c'est-à-dire à identifier chaque molécule fluorescente pour reconstituer sa trajectoire. La théorie prédit un disque d'Airy pour le Point-Spread Function (PSF). On peut reconstituer la topographie des molécules sur l'échantillon ainsi que leurs trajectoires avec une précision de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres. Une technique est basée sur la correspondance entre une gaussienne bidimensionnelle et le modèle de l'intensité du spot :

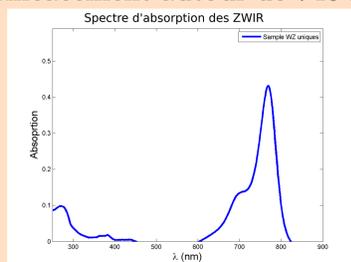
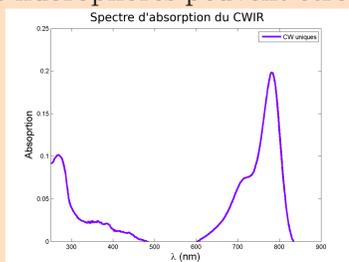
$$I(x, y) = A_n \exp\left(-\frac{(x - x_n)^2 + (y - y_n)^2}{2\sigma_n^2}\right)$$



Exemple d'une modélisation par des gaussiennes d'une image contenant des ZWIR individuels. Sur l'axe vertical : intensité. Sur les axes horizontaux : les positions en x et y.

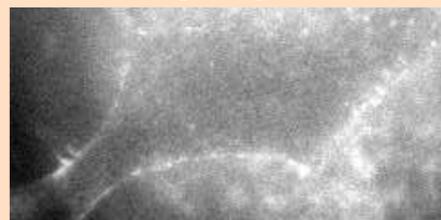
## Spectroscopie d'absorption

Les fluorophores peuvent être ainsi excités efficacement autour de 740 nm.



## Images superresolution dans le visible

Pour vérifier la fixation des anticorps, on a couplé le ZWIR (ou le CWIR) et l'ATTO 532 à l'anticorps pour vérifier leur fixation sur les cellules pour faire des images superrésolution sur le montage uPAINT à 532 nm.



## Perspectives

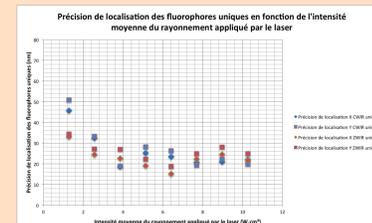
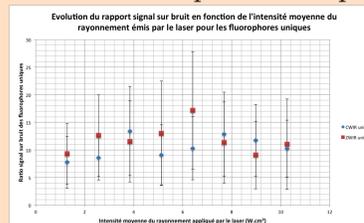
Ceci permettra de réaliser les premières images superresolution dans le proche infrarouge. L'étude des molécules uniques offre des perspectives intéressantes pour comprendre le mécanisme du corps humain, et ainsi apporter une contribution aux recherches médicales sur des maladies telles que le cancer, l'alzheimer..

## Références bibliographiques

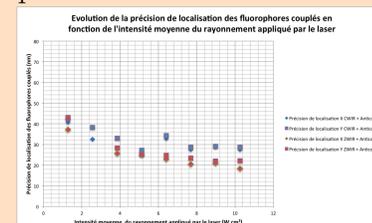
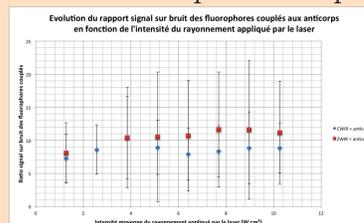
- [1] Grégory Giannone et al. *High-content super-resolution imaging of live cell by uPAINT*, Methods in Molecular Biology, (2013)
- [2] Russel E. Thompson et al. *Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes*, Biophysical Journal, (2011)

## Comparaison des fluorophores

### Etude des fluorophores uniques



### Etude des fluorophores couplés aux anticorps



Avec un meilleur rapport signal à bruit, et une meilleure précision de pointé, le ZWIR est un meilleur fluorophore que le CWIR, même quand les fluorophores sont couplés aux anticorps. La précision de pointé est comparable après couplage. La meilleure résolution obtenue est de 20 nm, soit  $\lambda/40$ . Nous avons ainsi obtenu un gain d'un facteur 20 par rapport à la résolution en microscopie classique de  $\lambda/2$ .