

Table des matières

Avant-propos. Imagerie photonique pour la biologie : de la microscopie à la super-résolution	1
Jean-Baptiste SIBARITA	
 Chapitre 1. Principes de la microscopie optique	5
Guillaume DUPUIS	
1.1. Introduction.	5
1.2. Principe de formation des images.	7
1.2.1. Approche géométrique.	7
1.2.2. Approche ondulatoire	8
1.2.3. Formation des images en éclairage cohérent	16
1.2.4. Résolution d'un microscope (limité par la diffraction)	18
1.2.5. Théorie d'Abbe de la formation des images	19
1.3. Techniques de sectionnement optique en microscopie de fluorescence	27
1.3.1. Techniques plein-champ.	28
1.3.2. Techniques point par point	34
1.4. Conclusion	37
1.5. Bibliographie.	37
 Chapitre 2. Imagerie sans marquage par contraste et mesure de phase	39
Pierre BON	
2.1. Introduction, l'objet biologique un objet d'indice	39
2.2. Le contraste de phase de Zernike	42
2.2.1. Mise en pratique concrète et limitations.	44

2.3. Le contraste interférentiel différentiel	46
2.3.1. Mise en pratique concrète et limitations.	47
2.4. Autres méthodes de contraste sur objets transparents	50
2.5. Mesurer quantitativement la phase : au-delà d'un simple contraste . . .	51
2.6. Conclusion	54
2.7. Bibliographie	54

Chapitre 3. Fluorophores et méthodes de marquage

pour la microscopie à fluorescence 57

Jip WULFFELÉ et Dominique BOURGEOIS

3.1. Introduction.	57
3.2. Principes fondamentaux de la photophysique des fluorophores	58
3.3. Protéines fluorescentes	59
3.4. Fluorophores organiques	66
3.5. Conclusion	71
3.6. Bibliographie	72

Chapitre 4. FRAP et FCS : approches quantitatives 77

Cyril FAVARD

4.1. Pas de vie sans mouvement	77
4.2. FRAP	80
4.2.1. Principes fondamentaux du FRAP	80
4.2.2. Principes quantitatifs du FRAP en une seule position.	81
4.2.3. Expression analytique des principales origines des récupérations de fluorescence	84
4.2.4. FRAP à rayons variables.	87
4.2.5. FRAP et imagerie quantitative	88
4.2.6. Perte de fluorescence sous photoblanchiment continu	90
4.2.7. Photoactivation/photoconversion.	90
4.3. FCS	91
4.3.1. Principe de base de la spectroscopie de corrélation	91
4.3.2. Mathématiques de la FCS	93
4.3.3. Expressions analytiques des différentes origines de fluctuations de concentration	96
4.3.4. Spectroscopie de corrélation spatio-temporelle	98
4.4. Conclusion	104
4.5. Bibliographie	105

Chapitre 5. Suivi de particules individuelles et dynamique à l'échelle nanométrique dans des échantillons biologiques 109

Antony LEE et Laurent COGNET

5.1. Introduction.	109
5.2. Localisation à l'échelle nanométrique	110
5.3. Reconstitution de trajectoires	112
5.4. Dynamique à l'échelle nanométrique.	114
5.4.1. Propriétés fondamentales du mouvement brownien.	115
5.4.2. Quantification des trajectoires expérimentales	116
5.4.3. Diffusion variable dans le temps	118
5.4.4. Au-delà du mouvement brownien : diffusion anormale	120
5.5. Bibliographie.	123

Chapitre 6. Microscopie 3D 125

Tom DELAIRE et Rémi GALLAND

6.1. Introduction.	125
6.2. Microscopie confocale	127
6.2.1. Principe.	127
6.2.2. Microscopie confocale à disque rotatif	130
6.2.3. Limites	131
6.2.4. Méthodes de réassignement des photons – les nouveaux systèmes confocaux.	132
6.3. Microscopie multiphotonique (MPM – <i>MultiPhoton Microscopy</i>) . . .	135
6.3.1. Principe.	135
6.3.2. Montage optique pour microscopie multiphotonique à balayage laser	139
6.3.3. Microscopie multiphotonique à champ large par focalisation temporelle	140
6.4. Microscopie de fluorescence à feuille de lumière	142
6.4.1. Principes et avantages	142
6.4.2. Création et propriétés d'une feuille de lumière.	145
6.4.3. Aperçu général de la mise en œuvre	147
6.5. Méthodes computationnelles.	151
6.6. Défis futurs pour l'imagerie 3D d'échantillons complexes	153
6.6.1. Aberrations optiques	154
6.6.2. Méthodes d'imagerie 3D rapide	157
6.6.3. Gestion, analyse et visualisation des données	160
6.7. Bibliographie.	160

Chapitre 7. La microscopie à illumination structurée 167

Alexandra FRAGOLA

7.1. Introduction.	167
7.2. Le principe de la microscopie à illumination structurée.	168
7.2.1. Pré-requis : l'effet Moiré.	168
7.2.2. L'illumination structurée pour dépasser la limite de diffraction en microscopie de fluorescence.	169
7.2.3. Comment utiliser l'effet Moiré pour améliorer la résolution spatiale d'un microscope optique ?	170
7.3. La reconstruction de l'image SIM 2D	172
7.4. Mise en œuvre expérimentale du SIM 2D.	173
7.4.1. Le montage : comment illuminer l'échantillon avec une mire sinusoïdale ?	173
7.4.2. Un gain en résolution limité à un facteur 2	174
7.4.3. Sectionnement optique pour le SIM 2D : application à l'imagerie biologique	175
7.5. Le SIM 3D	176
7.6. Le SIM saturé, ou SSIM (pour <i>Saturated SIM</i>) : un gain en résolution au-delà d'un facteur 2	177
7.7. Conclusion et perspectives	178
7.8. Bibliographie	180

Chapitre 8. Imagerie STED de la morphologie neuronale 183

Veera Venkata Gopala Krishna INAVALLI et Urs Valentin NÄGERL

8.1. Introduction.	183
8.2. Principe	187
8.3. Instrumentation STED	190
8.3.1. Marquage et optimisation de la technique STED	200
8.4. Nouveaux développements.	204
8.4.1. Optique adaptative pour la microscopie 3D-STED	204
8.4.2. Imagerie d'ombre super-résolue (SUSHI)	207
8.4.3. Imagerie corrélative avec STED et SMLM.	208
8.5. Résumé et perspectives	209
8.6. Bibliographie	211

**Chapitre 9. Microscopie de molécules uniques
pour la biologie cellulaire quantitative 219**

Marina S. DIETZ et Mike HEILEMANN

9.1. Introduction.	219
----------------------------	-----

9.2. Concepts pour la microscopie de localisation de molécules individuelles.	220
9.3. Multiplexage	225
9.4. Extraction d'informations quantitatives à partir des données SMLM. . .	228
9.5. Conclusion	231
9.6. Remerciements.	231
9.7. Bibliographie.	232

Chapitre 10. Traitement et analyse d'images de microscopie. 239

Daniel SAGE et Anaïs BADOUAL

10.1. Introduction	239
10.2. Contexte général	240
10.2.1. Images multidimensionnelles	240
10.2.2. Défis majeurs en bioimagerie.	242
10.2.3. Logiciel pour la bioimagerie.	243
10.2.4. Pipeline d'analyse d'images	245
10.3. Traitement des bioimages.	248
10.3.1. Opérations fondamentales de traitement d'images.	249
10.3.2. Débruitage des images de microscopie	252
10.3.3. Déconvolution d'images de microscopie	254
10.3.4. Recalage d'images	257
10.4. Analyse des bioimages	257
10.4.1. Détection de caractéristiques et détection d'objets.	258
10.4.2. Segmentation d'images.	260
10.4.3. Classification d'images.	262
10.4.4. <i>Tracking</i> d'objets biologiques.	264
10.5. Discussion.	267
10.5.1. Bénéfices et risques du <i>deep learning</i>	267
10.5.2. Transition vers une approche centrée sur la conception des données	268
10.5.3. Microscopie intelligente	269
10.6. Bibliographie	269

Liste des auteurs. 277

Index 279