

La Microscopie Multiphoton : Principe et Applications

Anne Colonna

L'Oréal Recherche

Laboratoire Microscopie Photonique

Réunion Pédagogique GNMEBA-01/12/2006

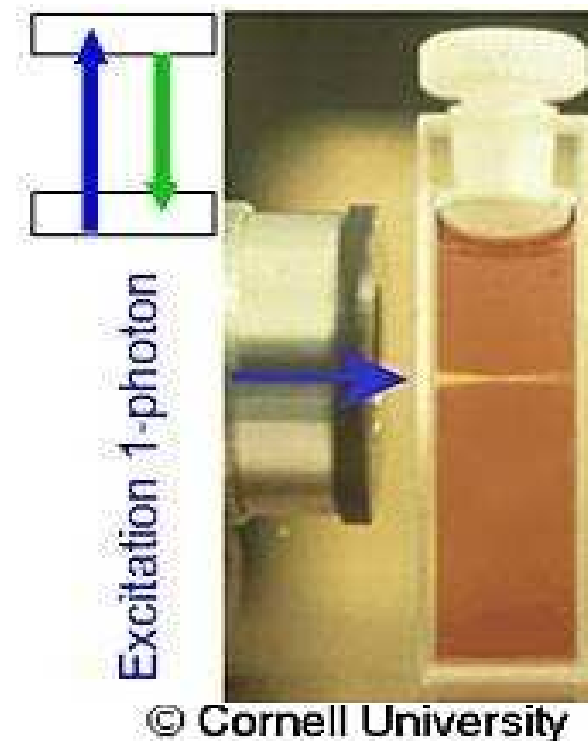
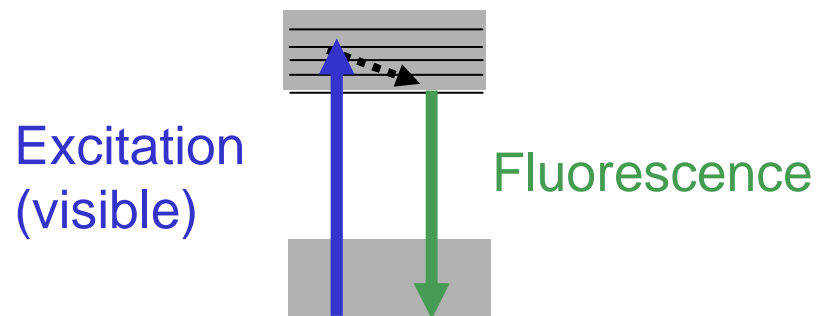
LA MICROSCOPIE MULTIPHOTON: PRINCIPES ET APPLICATIONS

- ✓ Présentation de la microscopie multiphoton:
 - Principe et avantages
 - Utilisation de lasers fs
 - Utilisation pour l'imagerie 3D

- ✓ Applications en biologie:
 - Imagerie par excitation de composants endogènes des tissus
 - Imagerie de dermes humains
 - Imagerie de l'épiderme
 - De l'in vitro à l'in vivo

- ✓ La microscopie CARS:
 - Principe de l'imagerie vibrationnelle
 - Applications: imagerie lipidique, imagerie du stratum

LA MICROSCOPIE A 1 PHOTON « CLASSIQUE »

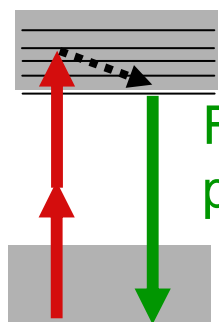


Limitations

- Cône d'excitation: problème d'endommagement photoinduit
- Nécessité d'utiliser un diaphragme pour une image tri-dimensionnelle
- Faible profondeur de pénétration à cause de l'absorption du faisceau excitateur
- Utilisation de colorants fluorescents

LA MICROSCOPIE MULTIPHOTON

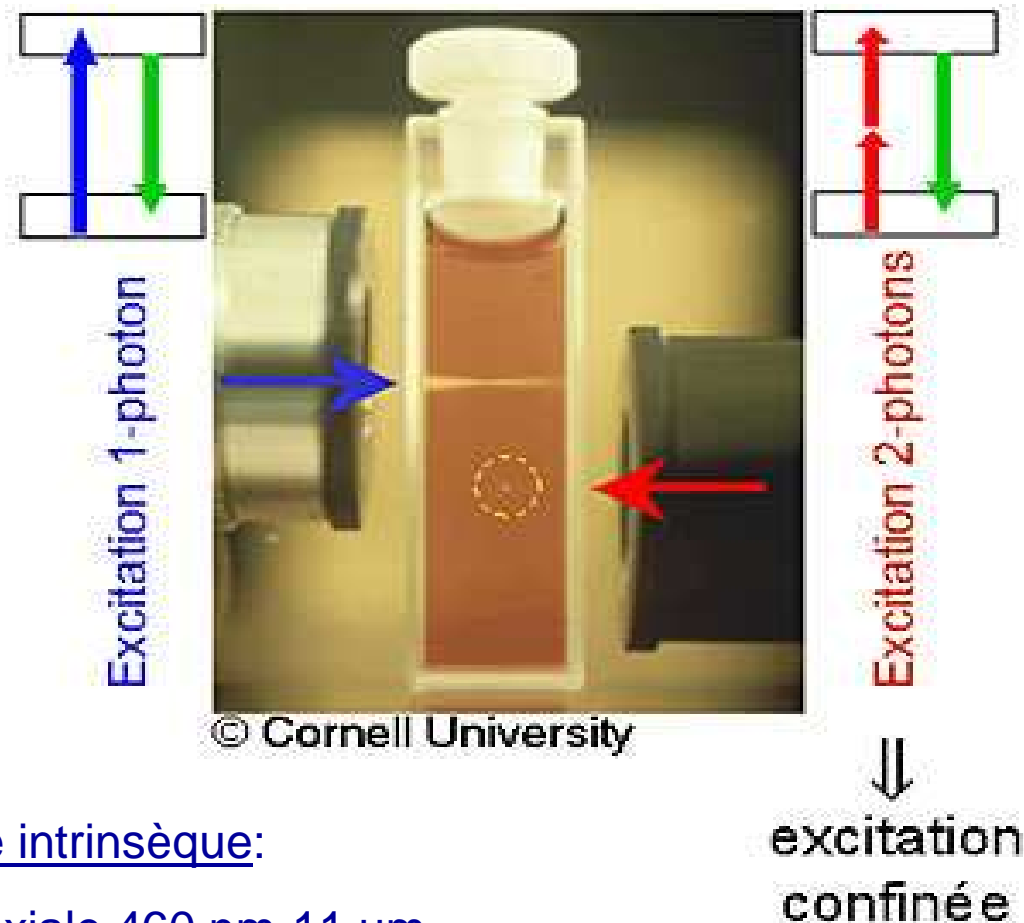
Excitation
(infrarouge)



Fluorescence à 2
photons

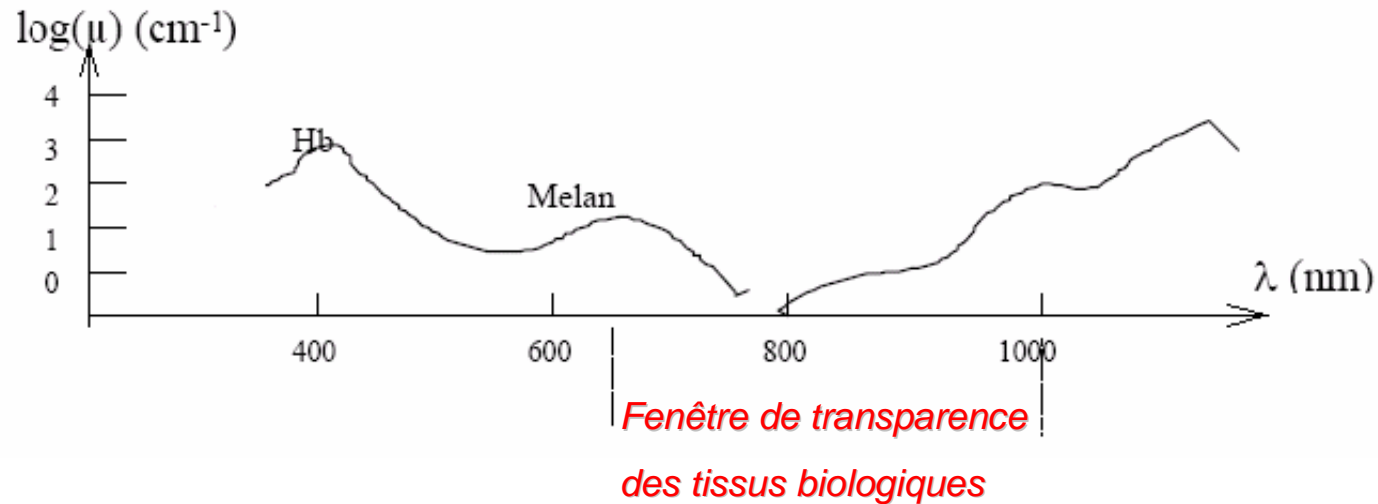
Avantages

- Imagerie en profondeur (100 – 600 μm)
- Endommagement photoinduit réduit:
confinement de l'excitation au volume focal.
- Résolution tridimensionnelle submicrométrique intrinsèque:
résolution latérale 240 nm-1000 nm, résolution axiale 460 nm-11 μm
- Accès à une plus grande gamme de sondes fluorescentes
- Excitation de composants intrinsèques de la peau



CARACTERISTIQUES DES LASERS UTILISES

- Excitation **infrarouge** (700-1000 nm)



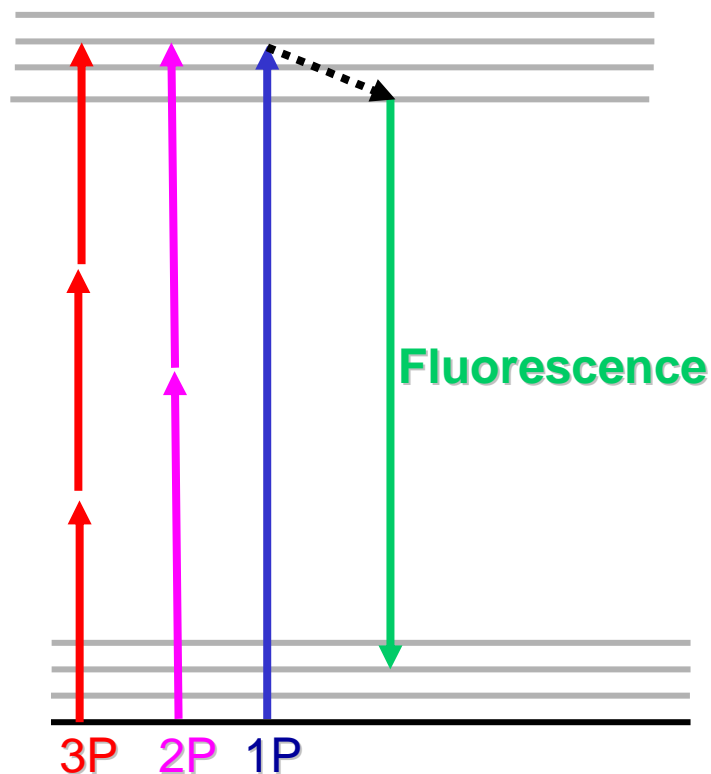
- Puissance importante: excitation impossible en régime continu \rightarrow **régime pulsé**



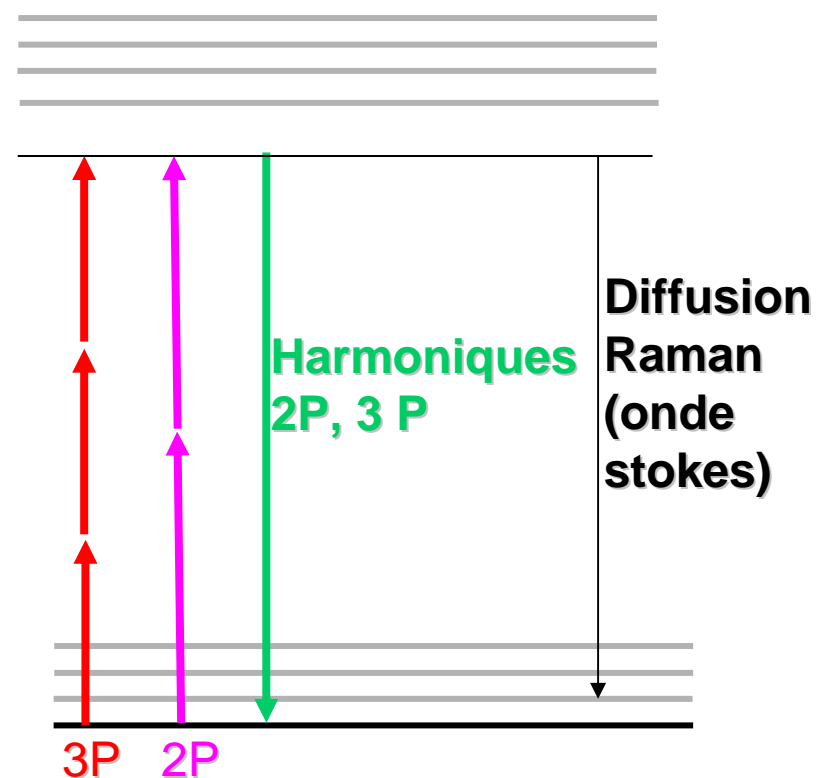
- Concentration temporelle des photon \rightarrow **lasers femtosecondes**

LES EXCITATIONS EN MULTIPHOTON

Excitation résonante

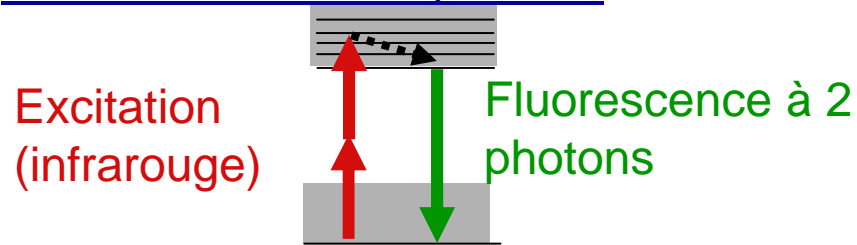


Excitation non résonante



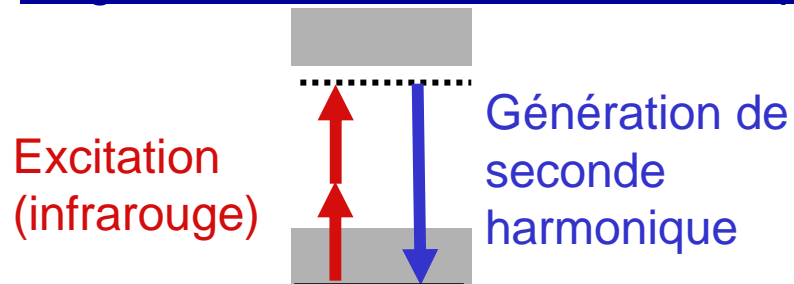
LES TROIS TYPES DE MICROSCOPIE MULTIPHOTON UTILISES POUR L'IMAGERIE 3D

1. La fluorescence à 2 photons



- Imagerie de la kératine, de l'élastine, des fibroblastes

2. La génération de seconde harmonique



- Imagerie du collagène collagène fibrillaire I, III. (Collagène VII?)

3. La microscopie CARS

Informations morphologiques et spécificité chimique

Informations morphologiques

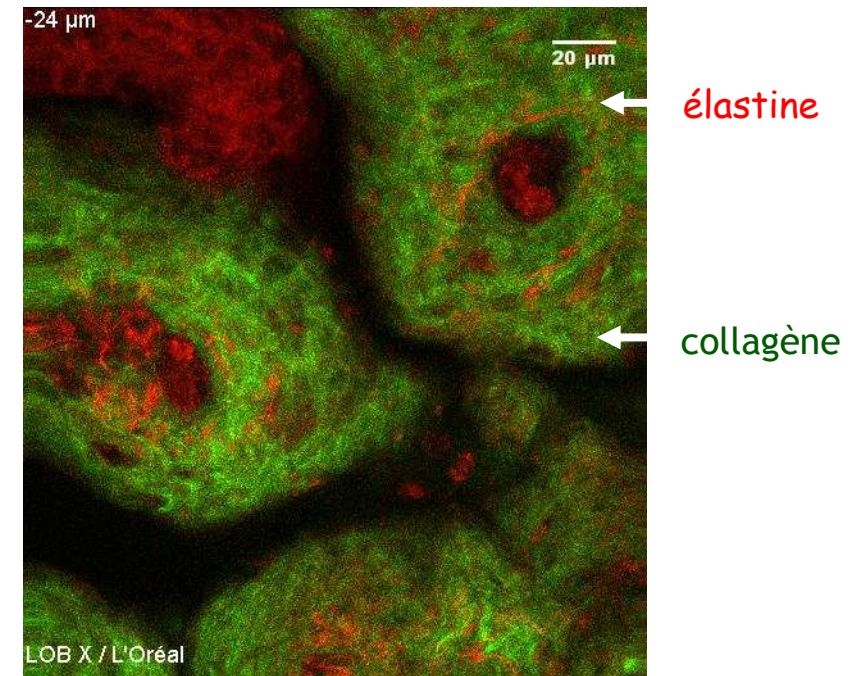
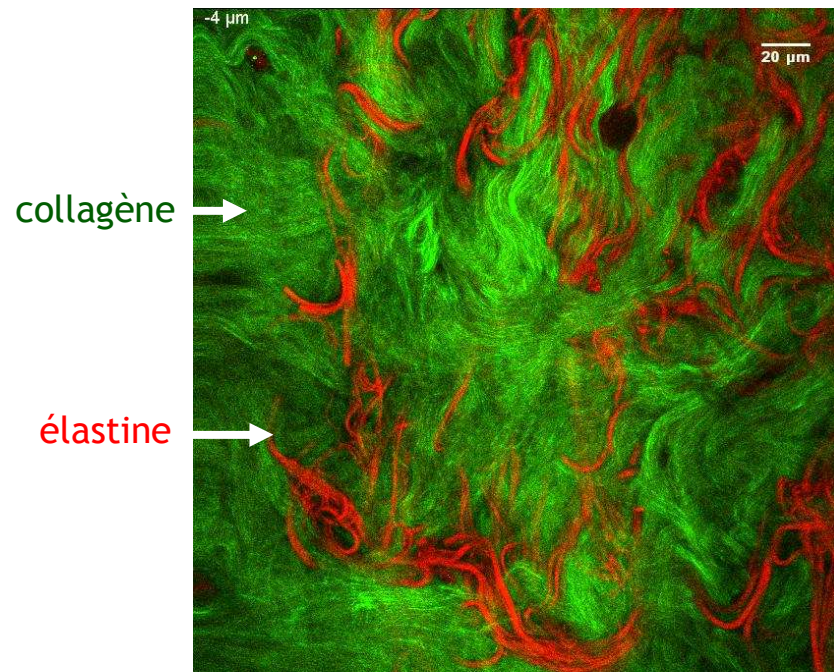
LA MICROSCOPIE MULTIPHOTON: PRINCIPES ET APPLICATIONS

- ✓ Présentation de la microscopie multiphoton:
 - Principe et avantages
 - Utilisation de lasers fs
 - Utilisation pour l'imagerie 3D

- ✓ Applications en biologie:
 - Imagerie par excitation de composants endogènes des tissus
 - Imagerie de dermes humains
 - Imagerie de l'épiderme
 - De l'in vitro à l'in vivo

- ✓ La microscopie CARS:
 - Principe de l'imagerie vibrationnelle
 - Applications: imagerie lipidique, imagerie du stratum

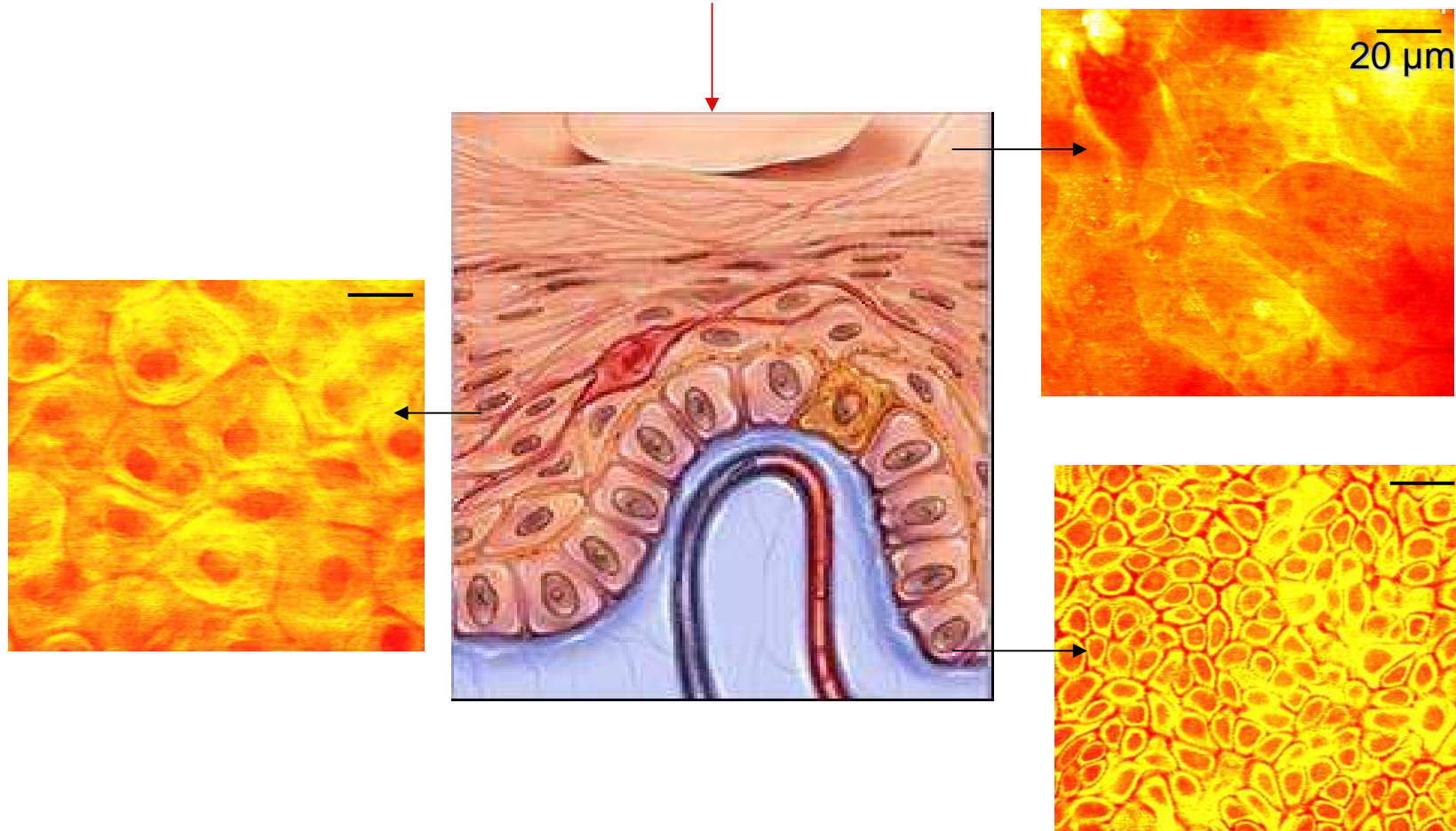
IMAGERIE DE DERMES HUMAINS



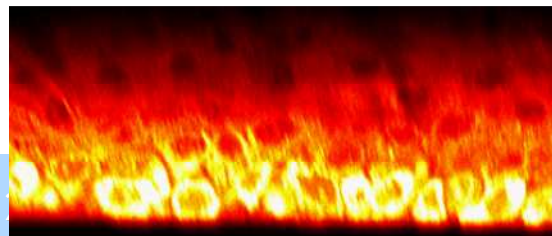
Collaboration MC Schanne-Klein, E. Beaufepaire,
Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole Polytechnique - INSERM - CNRS

Imagerie de l'épiderme

Faisceau laser excitateur

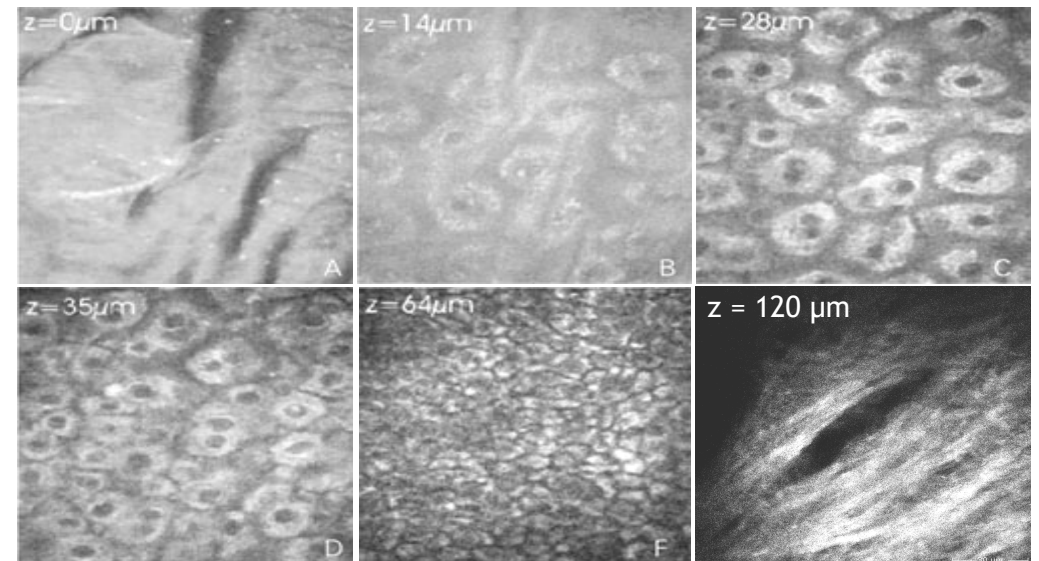


→ Reconstitution en z



De l'in vitro à l'in vivo

- Méthode non invasive
- Système in vivo développé par la société JenLab GMBH



Source des photos: www.jenlab.de

LA MICROSCOPIE MULTIPHOTON: PRINCIPES ET APPLICATIONS

- ✓ Présentation de la microscopie multiphoton:
 - Principe et avantages
 - Utilisation de lasers fs
 - Utilisation pour l'imagerie 3D

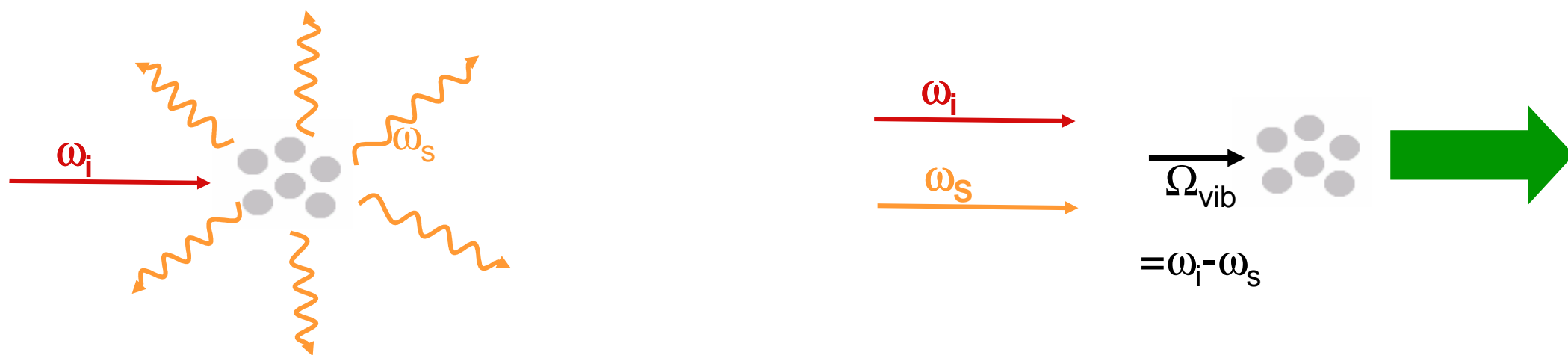
- ✓ Applications en biologie:
 - Imagerie par excitation de composants endogènes des tissus
 - Imagerie de dermes humains
 - Imagerie de l'épiderme
 - De l'in vitro à l'in vivo

- ✓ La microscopie CARS:
 - Principe de l'imagerie vibrationnelle
 - Applications: imagerie lipidique, imagerie du stratum

Principe de la microscopie CARS: imagerie vibrationnelle

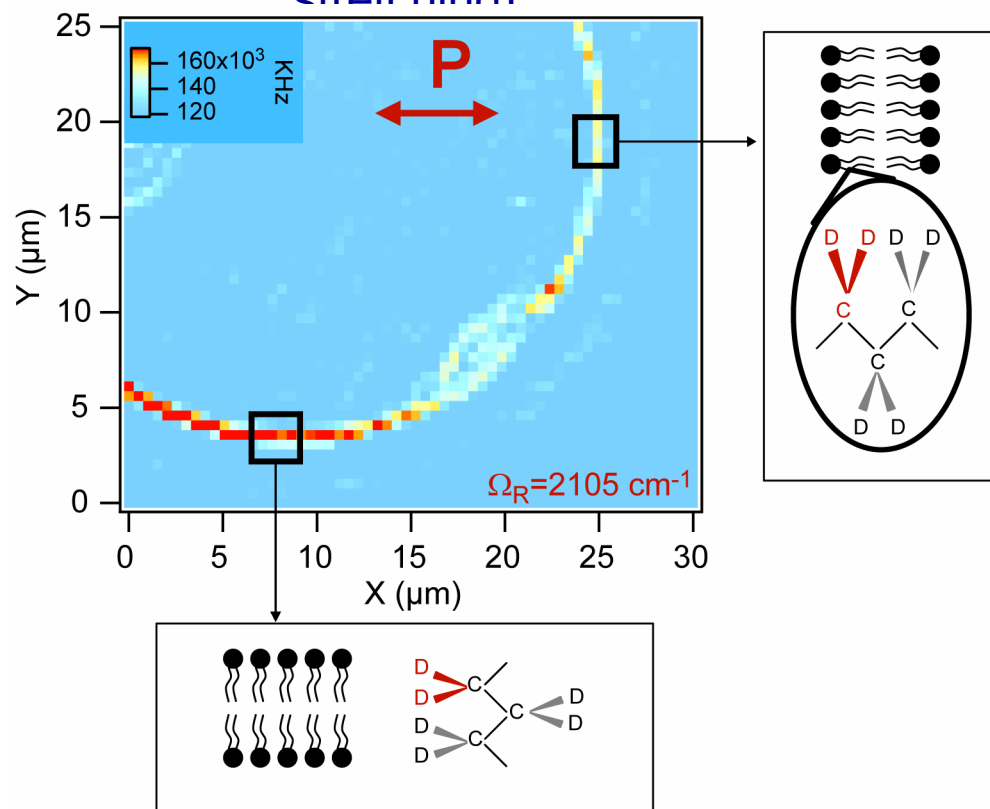
Avantages

- Meilleure sensibilité que le Raman conventionnel
- Imagerie utilisant le contraste vibrationnel : spécificité chimique sans aucun marquage fluorescent (électrons délocalisés, cycles benzéniques, C=C)
- Possibilité d'imager même en milieu fluorescent

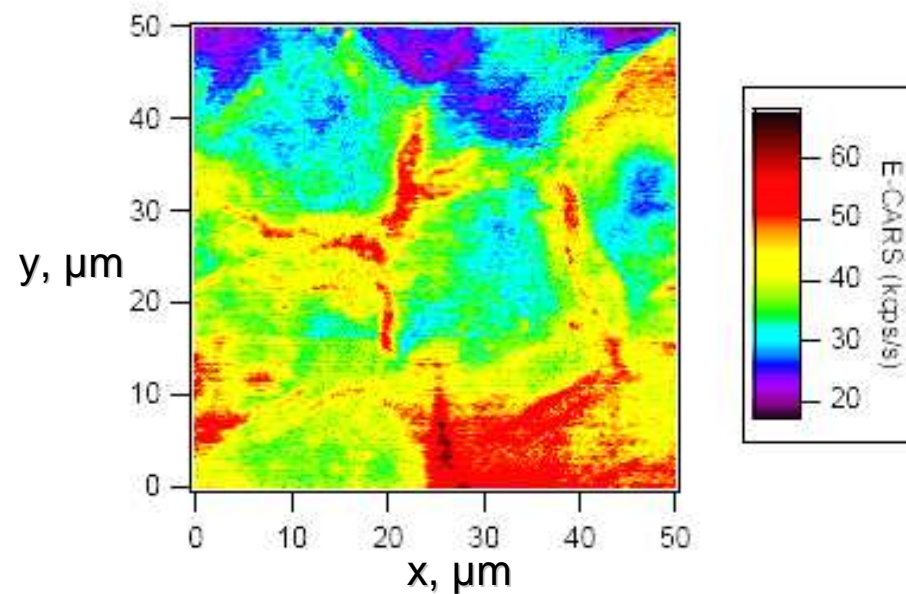


EXEMPLES D'APPLICATION DU CARS

Imagerie de liposomes unilamellaires géant (VUG) deutérés (CD_2 stretching)



Imagerie de stratum corneum humain (CH_2 stretching)



Collaboration F. Billard, N. Djaker, H. Rigneault, Institut Fresnel, Marseille

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- ✓ Avantages de la microscopie multiphoton:
 - Résolution 3D intrinsèque
 - Meilleure pénétration dans les tissus
 - Accès à une plus grande gamme de sondes fluorescentes
 - Imagerie des composants endogènes des tissus
 - Méthode non invasive: application à l'in vivo
- ✓ Imagerie et information chimique : la microscopie CARS
- ✓ Perspectives:
 - Passage de 3 à 5D (dimension temporelle, influence de l'environnement)
 - Endoscopie