UNIVERSITÉ BORDEAUX SEGALEN

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Année 2013

Thèse N° : 2130

Thèse

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
Mention : Sciences, Technologie, Santé
Option : Bioinformatique

Présentée et soutenue publiquement
Le 20 décembre 2013

Par
Mohamed Adel Kechkar
Né le 1 avril 1986 à Coventry/ Royaume Uni

Méthodes de reconstruction et de quantification pour la microscopie de super-résolution par localisation de molécules individuelles

Membres du jury

NÄGERL Valentin	Professeur (Université Bordeaux 2)	Président du jury
KERVRANN Charles	Directeur de recherche (INRIA)	Rapporteur
SALAMERO Jean	Directeur de recherche (CNRS)	Rapporteur
ZIMMER Christophe	Chef de laboratoire (Institut Pasteur)	Examinateur
SIBARITA Jean-Baptiste	Ingénieur de recherche (CNRS)	Directeur de thèse

Remerciements

Louange à Allah, Seigneur de l'univers.

Très honoré par leur présence, je tiens à remercier les membres du jury : le Prof. Valentin Nägerl, le Dr. Charles Kervrann, le Dr. Jean Salamero et le Dr. Christophe Zimmer d'avoir accepté d'évaluer l'ensemble du travail qui a occupé mes trois années de thèse.

Je remercie le Dr. Daniel Choquet pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire interdisciplinaire de neurosciences.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Jean-Baptiste SIBARITA pour m'avoir accueilli au sein de son équipe; au début pour un stage de fin d'étude et puis pour une thèse. Je voudrais lui adresser un immense merci pour sa patience, sa disponibilité, sa rigueur et son optimisme permanent. Merci de m'avoir fait découvrir le domaine de l'imagerie cellulaire et notamment celui de la microscopie de super-résolution. Je voudrai également remercier sa belle mère Anne-Joël d'avoir corrigé le manuscrit et à qui je dois la qualité de ce manuscrit.

Je tiens aussi à remercier mon tuteur le Prof. Derrick Robinson pour ses différents précieux conseils pendant la réunion de mi-thèse.

Un grand merci à Dr. Deepak Nair, chocolat man, avec qui j'ai pu faire l'acquisition de ma première image de super-résolution. Un grand merci également à Dr. Eric Hosy qui m'a initié à l'univers des synapses et des récepteurs AMPAs. Je le remercie également de m'avoir aidé pendant la rédaction du manuscrit. Je remercie également le petit thésard Corey Butler avec qui j'ai travaillé durant la dernière partie de ma thèse et je lui souhaite un bon courage pour sa thèse. Ce fût un réel plaisir de travailler et collaborer avec vous les gars.

Je tiens à remercier la société Photometrics de m'avoir accueilli à Tucson (USA) pendant deux semaines ; même si le projet de collaboration n'a pas abouti par la suite.

Je remercie également la société Molecular Devices de nous avoir ouvert les portes afin de pouvoir faire le temps-réel.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe Sibarita : Ammar, Marouen, Makhlad, Rémi, Ghislain, Philippe, Vincent, Florian, Isabelle. Merci pour les nombreuses discussions sur la science et les nombreux délires (Retreat, …).

Merci à mes parents et à toute ma famille pour m'avoir fait confiance année après année et pour leur soutien indéfectible.

Et merci à toi Kouki, ma chérie, de m'avoir accompagné et soutenu pendant toutes ces années malgré la distance physique.

Résumé

Le domaine de la microscopie de fluorescence a connu une réelle révolution ces dernières années, permettant d'atteindre des résolutions nanométriques, bien en dessous de la limite de diffraction prédite par Abbe il y a plus d'un siècle. Les techniques basées sur la localisation de molécules individuelles telles que le PALM (Photo-Activation Light Microscopy) ou le (d)STORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) permettent la reconstruction d'images d'échantillons biologiques en 2 et 3 dimensions, avec des résolutions quasi-moléculaires. Néanmoins, même si ces techniques nécessitent une instrumentation relativement simple, elles requièrent des traitements informatiques conséquents, limitant leur utilisation en routine. En effet, plusieurs dizaines de milliers d'images brutes contenant plus d'un million de molécules doivent être acquises et analysées pour reconstruire une seule image. La plupart des outils disponibles nécessitent une analyse post-acquisition, alourdissant considérablement le processus d'acquisition. Par ailleurs la quantification de l'organisation, de la dynamique mais aussi de la stœchiométrie des complexes moléculaires à des échelles nanométriques peut constituer une clé déterminante pour élucider l'origine de certaines maladies. Ces nouvelles techniques offrent de telles capacités, mais les méthodes d'analyse pour y parvenir restent à développer.

Afin d'accompagner cette nouvelle vague de microscopie de localisation et de la rendre utilisable en routine par des expérimentateurs non experts, il est primordial de développer des méthodes de localisation et d'analyse efficaces, simples d'emploi et quantitatives. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons développé dans un premier temps une nouvelle technique de localisation et reconstruction en temps réel basée sur la décomposition en ondelettes et l'utilisation des cartes GPU pour la microscopie de super-résolution en 2 et 3 dimensions. Dans un second temps, nous avons mis au point une méthode quantitative basée sur la visualisation et la photophysique des fluorophores organiques pour la mesure de la stœchiométrie des récepteurs AMPA dans les synapses à l'échelle nanométrique.

Mots clefs : Microscopie de super-résolution, localisation de molécules individuelles, traitement temps-réel, décomposition en ondelettes, GPU, photophysique de fluorophores, récepteurs post-synaptiques.

Abstract

The field of fluorescence microscopy has witnessed a real revolution these last few years, allowing nanometric spatial resolutions, well below the diffraction limit predicted by Abe more than a century ago. Single molecule-based super-resolution techniques such as PALM (Photo-Activation Light Microscopy) or (d)STORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) allow the image reconstruction of biological samples in 2 and 3 dimensions, with close to molecular resolution. However, while they require a quite straightforward instrumentation, they need heavy computation, limiting their use in routine. In practice, few tens of thousands of raw images with more than one million molecules must be acquired and analyzed to reconstruct a single super-resolution image. Most of the available tools require post-acquisition processing, making the acquisition protocol much heavier. In addition, the quantification of the organization, dynamics but also the stoichiometry of biomolecular complexes at nanometer scales can be a key determinant to elucidate the origin of certain diseases. Novel localization microscopy techniques offer such capabilities, but dedicated analysis methods still have to be developed.

In order to democratize this new generation of localization microscopy techniques and make them usable in routine by non-experts, it is essential to develop simple and easy to use localization and quantitative analysis methods. During this PhD thesis, we first developed a new technique for real-time localization and reconstruction based on wavelet decomposition and the use of GPU cards for super-resolution microscopy in 2 and 3 dimensions. Second, we have proposed a quantitative method based on the visualization and the photophysics of organic fluorophores for measuring the stoichiometry of AMPA receptors in synapses at the molecular scale.

Key words: Super-resolution microscopy, single-molecule localization, real-time processing, wavelet decomposition, GPU, fluorophore photophysics, post-synaptic receptors.

Abbréviations

AMPA: α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

CPU: Central Processing Unit

CUDA: Compute Unified Device Architecture

dSTORM: direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy

EMCCD: Electron Multiplying Charge Coupled Device

FPALM: Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy

FWHM: Full Width at Half Maximum

FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching

GFP: Green Fluorescent Protein

GPGPU: General Purpose Graphics Processing Unit

GPU: Graphics Processing Unit

GSDIM: Ground State Depletion Microscopy

MLE: Maximum-Likelihood Estimation

MTF: Modulation Transfer Function

NLLS: Non Linear Least Squares

PALM: PhotoActivated Localization Microscopy

PSF: Point Spread Function

QD: Quantum Dot

SIM: Structured Illumination Microscopy

SIMD: Single Instruction Multiple Data

SNR: Signal to Noise Ratio

SPT: Single Particle Tracking

STED: STimulated Emission Depletion

STORM: STochastic Optical Reconstruction Microscopy

TIRFM: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

FWT: Fast Wavelet Transform

Sommaire

1. Introduction 10

1.1. Contexte scientifique 10

1.2. Contributions 13

1.3. Organisation du manuscrit 14

2. Microscopie de super-résolution optique 15

2.1. Microscopie optique de fluorescence 15

2.1.1. Principe et limites 15

2.1.2. Fluorescence 18

2.2. Microscopie de super-résolution basée sur la localisation de molécules individuelles . 23

2.2.1. Principe de fonctionnement des méthodes de localisation 25

2.2.2. (f)PALM, (d)STORM, GSD, … 27

2.2.3. Acquisition 30

2.3. Problèmes de localisation de molécules individuelles 32

2.3.1. Détection du signal 34

2.3.2. Sources de bruit 35

2.3.3. Localisation axiale de molécules individuelles 36

2.3.4. Algorithmes et précisions de localisation 37

2.3.5. Densité de molécules 40

3. Méthode de localisation de molécules individuelles par les ondelettes 41

3.1. Décomposition en ondelettes 42

3.1.1. La transformation de Fourier 42

3.1.2. Définition d'une ondelette 42

3.1.3. Décomposition en ondelettes continues 43

3.1.4. Décomposition en ondelettes discrètes : algorithme à trous 43

3.1.5. Segmentation par seuillage 46

3.1.6. Algorithme de Watershed 47
3.1.7. Calcul de barycentre 48
3.2. Données de simulations 49
3.2.1. Précision de localisation 50
3.2.2. Temps d'analyse 52
3.2.3. Fonction MTF 54
3.3. Données expérimentales 57
3.4. Conclusion 59
4. Localisation de molécules uniques et reconstruction en temps réel 60
4.1. GPGPU 61
4.1.1. Architecture du GPU 62
4.1.2. CUDA 62
4.2. WaveTracer : une nouvelle méthode logiciel pour le traitement temps-réel des données de localisation 63
4.2.1. Principe 64
4.2.2. Localisation latérale en temps-réel 66
4.2.3. Localisation axiale post-acquisition 67
4.2.4. Contrôle automatique de l'intensité du laser 71
4.3. Données de simulation 72
4.3.1. Implémentation GPU vs. Implémentation CPU 72
4.3.2. WaveTracer VS. QuickPALM VS. RapidSTORM 73
4.4. Données expérimentales 77
4.5. Conclusion 78
5. Application biologique : composition des sous-unités des récepteurs AMPA 79
5.1. Neurones et synapses 80
5.2. Organisation 3D des récepteurs AMPA et de la protéine auxiliaire PSD95 82

5.2.1. PSD95-Alexa647 84
5.2.2. GluA1-Alexa647 84
5.2.3. PSD95-Rhod-RedX/GluA1-Alexa647 85
5.3. Structure des récepteurs AMPA par super-résolution optique : rêve ou réalité ? 86
5.3.1. Revue des méthodes récentes de quantification de stœchiométrie des récepteurs AMPA 87
5.3.2. Méthode basée sur la photophysique des fluorophores 90
5.4. Conclusion 97
6. Conclusion et perspectives 99
Bibliographie 102
Annexe 1 : Protocoles biologiques et montage optique 107
Marquage par l'immunocytochimie 107
Marquage de microtubules 107
Marquage des sous-unités GluA1 et de la protéine PSD95 pour l'imagerie dSTORM en 3 dimensions 107
Préparation du milieu de montage de l'échantillon pour la microscopie dSTORM 108
Imagerie en microscopie dSTORM 108
Annexe 2 : Interface graphique du logiciel WaveTracer 110
Principal interface 110
Localization tab 110
Display tab 111
Avanced tab 112
Laser tab 112
Real-time mode (Online) 113
Step 1: Choose the threshold 113
Step 2: Parameters for streaming mode 113

Step 3: Run acquisition and real-time localization/reconstruction of the super-resolution image 114

Post-acquisition treatment Mode (Offline) 115

3D calibration 115

2D and 3D localization 115

1. Introduction

1.1. Contexte scientifique

Depuis la nuit des temps, les hommes ont toujours désiré observer l'infiniment petit. Les premières lentilles de verre ont été datées du XII^{ème} siècle avant JC., alors que dans l'Antiquité, les Romains utilisaient des émeraudes ou des sphères de verre remplies d'eau comme moyen grossissant. Mais ce n'est qu'au XVII^{ème} siècle que le Britannique Robert Hooke et le Hollandais Antoni Van Leeuwenhoek ont développé le premier microscope scientifique constitué de plusieurs lentilles convexes. Ils ont permis pour la première fois l'observation de cellules végétales inaccessibles à l'œil nu. Depuis, des travaux majeurs en optique se sont succédé, notamment au début du XIX^{ème} siècle avec la mise au point de lentilles et d'objectifs de plus en plus précis. Ces progrès ont engendré de multiples découvertes majeures en biologie telles que la cellule, le noyau cellulaire, la division cellulaire ou les agents pathogènes qui ont engendré les premiers vaccins.

Ernest Abbe a démontré en 1873, par la fameuse formule qui porte son nom, que la résolution d'un microscope optique était limitée par le phénomène de diffraction de la lumière. Du fait de cette limite, il était impossible de résoudre les structures d'objets de dimensions inférieures à 200 nm avec la lumière du visible. Des travaux parallèles concernant la nature de la lumière ont fait le lien entre le caractère ondulatoire de la lumière et ce phénomène de diffraction. Dès lors, de nombreux physiciens ont développé des systèmes d'imagerie optique plus performants les uns que les autres pour tenter de dépasser cette limite de diffraction, barrière infranchissable jusqu'à il y a peu de temps.

Plus d'un siècle plus tard, en 1994, le physicien Stefan Hell montre pour la première fois, théoriquement, qu'il est possible de descendre en dessous de cette limite avec la microscopie optique STED (STimulated Emission Depletion). En 2000, un travail tout aussi remarquable a été réalisé par le chercheur Mats Gustaffson, avec le développement de la microscopie par illumination structurée, ou SIM (Structured Illumination Microscopy), permettant de diviser la résolution optique latérale par un facteur deux. Ces nouvelles techniques de microscopie, et d'autres qui vont suivre un peu plus tard ont été appelées super-résolution optique grâce à leur capacité de « casser » la barrière de la limite de diffraction optique. Elles ont complètement révolutionné le domaine de la biologie cellulaire, offrant des résolutions intermédiaires entre la microscopie électronique et la microscopie optique conventionnelle.

En 2006, une nouvelle génération de techniques de microscopie de super-résolution a été mise au point quasi simultanément par deux groupes de recherche : Eric Betzig et Sam Hess ont développé la technique de PALM (PhotoActivated Localization Microscopy) et Xiawey Zhuang le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). Malgré leurs acronymes différents, ces techniques sont similaires dans le principe. Elles consistent à rendre transitoirement et aléatoirement fluorescentes une faible fraction des fluorophores, avec des densités suffisamment faibles pour pouvoir les individualiser et les localiser. La répétition de ce processus plusieurs dizaines milliers de fois permet la reconstruction d'images de super-résolution avec une résolution nanométrique. Ces méthodes empruntent leur principe de localisation aux techniques de suivi de particules individuelles développées dans les années 80, en y ajoutant une nouvelle dimension permettant le contrôle de l'état de fluorescence des fluorophores. Chacune de ces techniques utilise un mécanisme spécifique pour contrôler l'état fluorescent des molécules. Le PALM s'appuie sur la photoactivation ou la photoconversion de protéines fluorescentes de fusion photoactivables ou photoconvertibles. Le STORM, quant à lui, utilise des fluorophores organiques photocommutables spécifiques. D'autres évolutions de ces techniques ont été mises au point un peu plus tard comme le direct STORM (dSTORM) ou le GSD (Ground State Depletion) développés par les groupes de Markus Sauer et de Stephan Hell respectivement, et permettant de photocommuter quasiment l'ensemble des fluorophores organiques. L'amélioration des propriétés photophysiques des sondes fluorescentes, de leur spécificité et moyens d'attachement aux biomolécules, combinée à la simplicité expérimentale de mise en œuvre de ces techniques, ont permis à cette nouvelle génération de microscopie basées sur la localisation de molécules individuelles de s'imposer rapidement. Ces techniques offrent aujourd'hui au biologiste un outil robuste, quantitatif et simple à mettre en œuvre pour l'imagerie cellulaire à l'échelle moléculaire.

Les cellules sont constituées d'un ensemble de protéines et structures macromoléculaires dont les dimensions sont bien inférieures à la limite de diffraction de la lumière. Auparavant, l'information relative à l'organisation de protéines au sein de cellules in vivo à l'échelle nanométrique ne pouvait être extraite que si ces ensembles de protéines étaient suffisamment dilués et contrastés. Il est désormais possible d'observer l'organisation et la dynamique de l'ensemble des protéines avec une précision quasi-moléculaire. On peut citer quelques exemples d'applications biologiques majeures tirant profit des possibilités offertes par la microscopie de super-résolution par localisation : la visualisation nanométrique de la structure 3D des protéines d'adhésion, l'analyse de la distribution moléculaire des récepteurs et protéines auxiliaires dans

les synapses ou encore la distribution spatiale de la protéine chemotaxis dans les bactéries E. Coli. Témoins d'une réelle révolution, de nombreux travaux utilisant la microscopie super-résolution sont publiés mensuellement dans les journaux scientifiques les plus prestigieux. Ces techniques sont de plus en plus employées afin de déchiffrer les mécanismes moléculaires impliqués dans le fonctionnement cellulaire, mais aussi dans les dysfonctionnements pathologiques.

La détermination numérique de la position des molécules individuelles en microscopie de localisation est une étape clef et très délicate étant donné les différentes déformations subies par le signal de fluorescence (bruit, pixellisation et aberrations optiques). De plus, même si la problématique n'est pas nouvelle car déjà utilisée en suivi de particules individuelles depuis les années 80, ce nouveau principe de microscopie produit énormément de données à analyser. En effet, la reconstruction d'une seule image de super-résolution peut nécessiter l'acquisition et l'analyse de plusieurs dizaines de milliers d'images contenant plus d'un million de molécules individuelles à localiser. L'ajustement par une fonction Gaussienne bidimensionnelle appliqué sur chaque molécule détectée est la méthode la plus utilisée car la plus précise. Néanmoins, cette méthode nécessite des temps du calcul très importants, qui peuvent devenir prohibitifs en pratique vu la quantité de données à traiter en microscopie de super-résolution par localisation. Cette limite a motivé plusieurs équipes de recherche dans le but de développer des algorithmes performants, respectant le compromis entre la précision de localisation et le temps nécessaire du traitement. Récemment, la démocratisation des architectures matérielles parallèles en informatique, telles que les multiprocesseurs ou les cartes graphiques performantes, a permis une réduction considérable du temps de calcul. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à cette problématique de localisation de molécules individuelles.

Afin d'accompagner cette nouvelle vague de microscopie de localisation et de la rendre utilisable en routine par des expérimentateurs non experts, il était primordial de développer des outils d'analyse efficaces, simples d'emploi et quantitatifs. L'objectif est d'accompagner le biologiste dans son travail d'investigation et de compréhension des complexes biomoléculaires à des échelles nanométriques. L'organisation, la dynamique mais aussi la mesure de la stœchiométrie de ces complexes peuvent constituer une clé déterminante pour élucider l'origine de certaines maladies. La capacité de ces nouvelles techniques d'accéder au niveau de la molécule individuelle ouvre de telles perspectives, et il devient possible d'étudier la dynamique mais également de compter les molécules dans des complexes moléculaires. Dans le cadre de ce

travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la stœchiométrie des récepteurs AMPA dans les synapses.

1.2. Contributions

Les principales contributions de ce travail de thèse sont listées ci-dessous :

- Nous avons proposé une nouvelle méthode de localisation 2D de molécules individuelles basée sur la décomposition d'ondelettes. Nous avons validé notre méthode par comparaison avec la méthode de référence de l'ajustement Gaussien. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue Optics Express
- Nous avons développé une nouvelle méthode « temps-réel » pour la localisation 2D de molécules individuelles et la reconstruction d'images de super-résolution durant le processus d'acquisition.
- Nous avons mis au point une méthode de localisation 3D combinant la décomposition en ondelettes et l'ajustement Gaussien.
- Nous avons optimisé l'ensemble du processus d'analyse 2D/3D en utilisant le processeur GPU, que nous avons ensuite intégré à l'analyse en temps réel.
- L'ensemble a été implémenté dans une interface logicielle baptisée « WaveTracer », permettant l'analyse et la reconstruction en temps-réel, tout en offrant le contrôle automatique de l'intensité des lasers afin d'optimiser des paramètres d'acquisition. Nous avons validé et testé notre solution logicielle avec les logiciels de référence existants et participé au challenge ISBI (http://bigwww.epfl.ch/palm/).
- WaveTracer a fait l'objet d'un dépôt APP (01/08/2012), d'un dépôt de brevet (EP12166450.2), et d'un transfert de technologie auprès de la société Molecular Devices. Il est distribué commercialement comme un plugin du logiciel MetaMorph.
- Nous avons utilisé l'imagerie dSTORM 3D pour l'étude tridimensionnelle de l'organisation des récepteurs AMPA et de la protéine d'échaudage PSD-95, dont nous avons présenté des données préliminaires.
- Nous avons mis au point une nouvelle méthode d'analyse quantitative de stœchiométrie basée sur la visualisation et exploitant la photophysique des fluorophores. Nous avons appliqué cette méthode pour tenter de résoudre la structure tétramérique des récepteurs AMPA, dont nous avons illustré quelques résultats préliminaires.

1.3. Organisation du manuscrit

Ce manuscrit s'organise en quatre chapitres principaux.

Le chapitre 2 est consacré à la microscopie de super-résolution optique. Nous introduirons tout d'abord les principes et limites de la microscopie de fluorescence, qui seront suivis d'un bref rappel sur le phénomène de fluorescence. Nous détaillerons ensuite les différentes méthodes de microscopie de super-résolution basée sur la localisation de molécules individuelles ainsi que la problématique de la localisation de molécules individuelles.

Dans le chapitre 3, nous présenterons notre nouvelle approche de localisation de molécules individuelles basée sur la décomposition d'ondelettes. La première partie présentera la théorie de la décomposition en ondelettes discrètes et l'algorithme à trous ainsi que les différentes étapes du processus de localisation. La seconde partie s'intéressera à la validation de notre méthode à travers des données de simulation et des données expérimentales. Nous la comparerons avec la méthode de référence de l'ajustement Gaussien bidimensionnel en termes de précision et de vitesse de calcul.

Le chapitre 4 est dédié à la description de notre nouvelle méthode temps-réel de localisation et reconstruction de molécules individuelles en microscopie super-résolution. La première partie sera consacrée à l'introduction de l'architecture et du principe de fonctionnement des processeurs graphiques GPU. Dans une seconde partie nous détaillerons les optimisations réalisées pour la localisation 2D et 3D en temps-réel. L'intérêt du temps-réel y sera décrit et notamment la possibilité d'ajuster automatiquement les conditions d'illumination pour une acquisition optimale. La dernière partie sera consacrée à la validation des performances de notre logiciel grâce à sa comparaison avec d'autres logiciels de référence de la littérature.

Enfin, dans le chapitre 5 nous présenterons une application biologique de la microscopie super-résolution pour l'étude de l'organisation des récepteurs AMPA dans les synapses. La première partie illustre brièvement le contexte biologique. Dans une deuxième partie, nous présenterons des résultats préliminaires obtenus en microscopie dSTORM 3D pour l'étude de l'organisation des récepteurs AMPA et de la protéine d'échaudage PSD95. Nous terminerons ce chapitre en présentant une nouvelle méthode d'analyse quantitative de stœchiométrie basée sur la visualisation et exploitant la photophysique des fluorophores. Nous présenterons quelques résultats préliminaires pour tenter de déterminer la structure tétramérique des récepteurs AMPA dans des cellules COS et des synapses de neurones en culture.

2. Microscopie de super-résolution optique

La microscopie optique de fluorescence a toujours été un outil privilégié des biologistes cellulaires pour étudier le vivant. Elle permet une observation spécifique à l'échelle de quelques centaines de nanomètres, grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents utilisés dès les années 1990 pour la détection de biomolécules. Malgré les progrès considérables de la microscopie de fluorescence, ses applications restent réduites à l'étude de « gros » objets biologiques à l'échelle cellulaire. Elle est en effet limitée par la barrière de diffraction de la lumière à une résolution d'environ 250 nm, ce qui empêche de distinguer des détails plus petits. Cette limite de diffraction a été dépassée dans le début des années 2000 par l'arrivée de nouvelles techniques dites de super-résolution optique, comme le STED, le SIM ou encore les techniques de localisation (PALM, STORM). Elles offrent une résolution spatiale pouvant descendre jusqu'à quelques nanomètres. Par conséquent il est désormais possible grâce à la microscopie super-résolution d'élucider des relations entre l'organisation spatiale, la fonction et la structure des complexes macromoléculaires.

Ce chapitre se compose de trois parties. Dans la première, nous rappelons quelques généralités sur la microscopie optique de fluorescence et plus particulièrement son principe et ses limites. Dans la deuxième, nous détaillons une famille de techniques de super-résolution basée sur la localisation de molécules individuelles. Les différentes stratégies de fluorescence employées y seront aussi décrites. Enfin, nous évoquerons la problématique de la localisation latérale et axiale ainsi que les travaux existants.

2.1. Microscopie optique de fluorescence

2.1.1. Principe et limites

Avec la microscopie optique conventionnelle, la limite du pouvoir de résolution est imposée par le phénomène de diffraction de la lumière ou principe de Huygens-Fresnel. Ce phénomène est dû à la nature ondulatoire de la lumière. Il est visible lorsqu'on essaie d'imager une source ponctuelle (source fluorescente de petite taille, quelques dizaines de nanomètres par exemple) à travers un système optique (Figure 2-1).

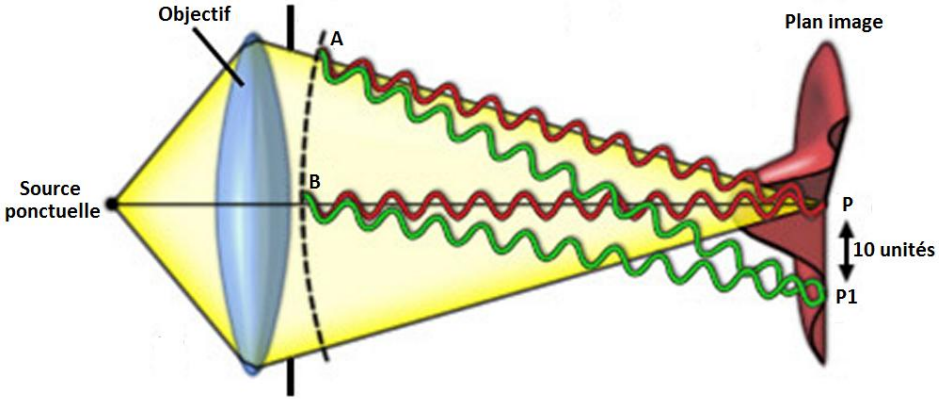


Figure 2-1 : Limite de résolution optique par la diffraction de la lumière à travers une ouverture circulaire.

Au lieu d'obtenir une source ponctuelle dans le plan image, on perçoit une tache plus grande. Cette tache de diffraction, connue sous le nom de ***tache d'Airy*** (Figure 2-2), est constituée d'une zone brillante centrale entourée d'anneaux moins intenses.

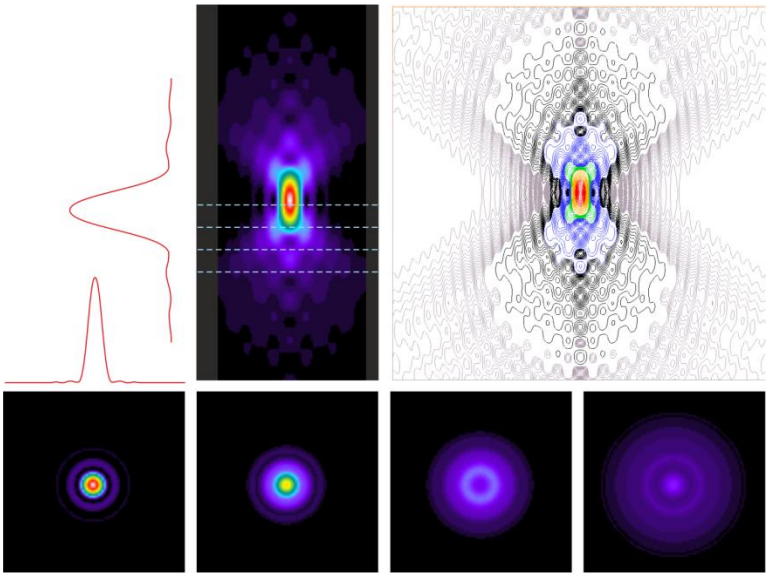


Figure 2-2 : Tache de diffraction d'Airy en 2 et 3 dimensions.

En pratique, elle définit la réponse impulsionnelle du système optique, appelée PSF (de l'anglais Point Spread Function), dans le cas de systèmes linéaires et invariants par translation.

En 2 dimensions, sa formule analytique est donnée par la théorie de la diffraction:

$$h(v,u) = 2\int_0^1 P(\rho)J_0(v\rho)\rho\, d\rho \qquad 2\text{-}1$$

avec $\rho = \frac{\sqrt{x+y}}{a}$ et $v = \frac{2\pi NA}{\lambda}\sqrt{x+y}$. P est la fonction pupillaire de rayon a, J_0 est la fonction de Bessel d'ordre 0, λ la longueur d'onde d'émission et NA l'ouverture numérique de l'objectif.

Par simplification, la PSF 2D peut-être approximée par une fonction Gaussienne bidimensionnelle (Kubitscheck et al., 2000) :

$$PSF(x,y) = \frac{I_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{\left(-\frac{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}{2\sigma^2}\right)} \quad 2\text{-}2$$

où I_0 est l'intensité maximale, (x_0, y_0) sont les coordonnées du centre et σ est l'écart-type.

Selon la théorie du physicien allemand Ernest Abbe (1873), le pouvoir de résolution du microscope optique à champ large correspond à la taille de la tache centrale d'Airy, soit :

$$r_{x,y} = \frac{\lambda}{2NA} \quad 2\text{-}3$$

où λ est la longueur d'onde utilisée. Plus l'ouverture numérique est importante, plus la tache d'Airy est étroite et meilleure est la résolution optique.

La résolution latérale est plus souvent définie selon le critère de Rayleigh comme la distance minimale en-dessous de laquelle on ne peut pas résoudre deux points proches (Figure 2-3) :

$$r_{x,y} = 0.61\frac{\lambda}{NA} \quad 2\text{-}4$$

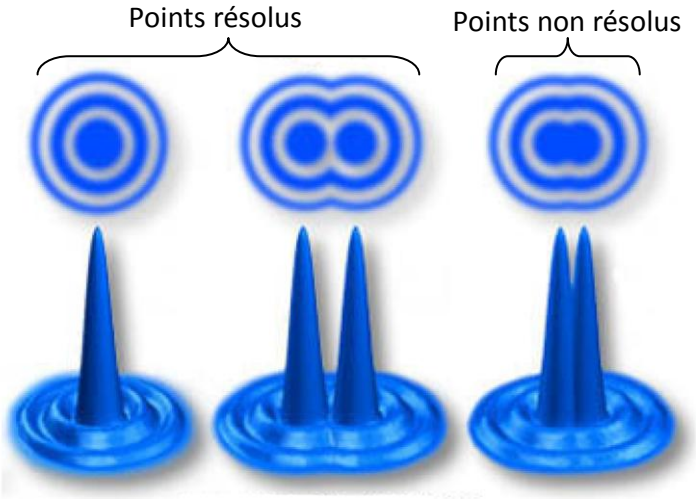


Figure 2-3 : Limite de résolution entre deux points adjacents.

De la même manière, la résolution axiale est définie par :

$$r_{axial} = \frac{2\lambda n}{NA^2} \quad 2\text{-}5$$

où *n* est l'indice de réfraction du milieu de montage de l'échantillon.

Le développement de la microscopie confocale (Minsky, 1957, Pawley, 2006) a certainement été une des révolutions majeures en microscopie de fluorescence. Elle est intervenue dans les années 80 et a permis une amélioration de la résolution optique axiale d'un facteur ~2. Adel Kechkar

Contrairement à l'illumination en champ large, la microscopie confocale consiste à focaliser une source ponctuelle lumineuse (souvent d'une source cohérente comme un laser) sur l'échantillon et à rejeter une partie du signal de fluorescence provenant des plans-objets hors foyer par l'ajout d'un « pinhole » (Figure 2-4). En pratique, le pinhole est placé au foyer optique conjugué de l'objectif afin de filtrer les photons provenant des plans non-focaux avant d'atteindre le détecteur. Ce dispositif a permis l'imagerie d'échantillons épais avec une résolution axiale d'environ 500 nm.

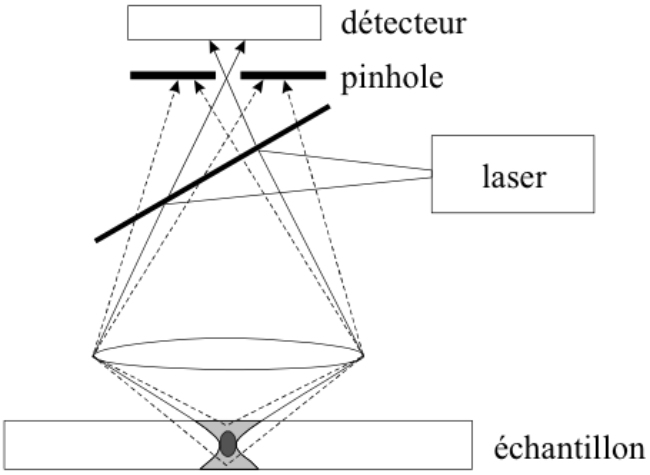


Figure 2-4 : Principe de la microscopie confocale. Un pinhole est placé au niveau du détecteur permettant de supprimer les photons provenant des plans situés en dehors du plan focal.

En parallèle, la microcopie à déconvolution a été développée pour l'illumination de champ large. Elle s'appuie sur une approche numérique algorithmique qui consiste à restaurer l'information contenue dans le flou optique en se basant sur la connaissance de la fonction PSF du système optique. Elle a permis d'améliorer la résolution d'un facteur ~2 dans les 3 dimensions (Agard et al., 1989, Wallace et al., 2001, Sibarita, 2005).

2.1.2. Fluorescence

Diverses modalités permettent d'imager un échantillon biologique avec la lumière du visible, les deux principales sont la transmission (contraste d'absorption, contraste de phase, interférentiel, …) et la fluorescence. Ce chapitre est consacré à la microscopie de fluorescence, utilisée dans le cadre de la super-résolution optique.

2.1.2.1. Principe

Une molécule possède plusieurs niveaux d'énergie électronique. Elle peut passer d'un niveau à un autre soit par absorption, soit par émission de lumière. En ce qui concerne l'absorption,

plusieurs sources d'énergies sont possibles, telles que le rayonnement électromagnétique (un faisceau laser par exemple), les réarrangements électroniques ou bien la réaction chimique. On distingue principalement trois niveaux d'énergie différents : l'état fondamental, l'état singulet excité et l'état triplet (Figure 2-5).

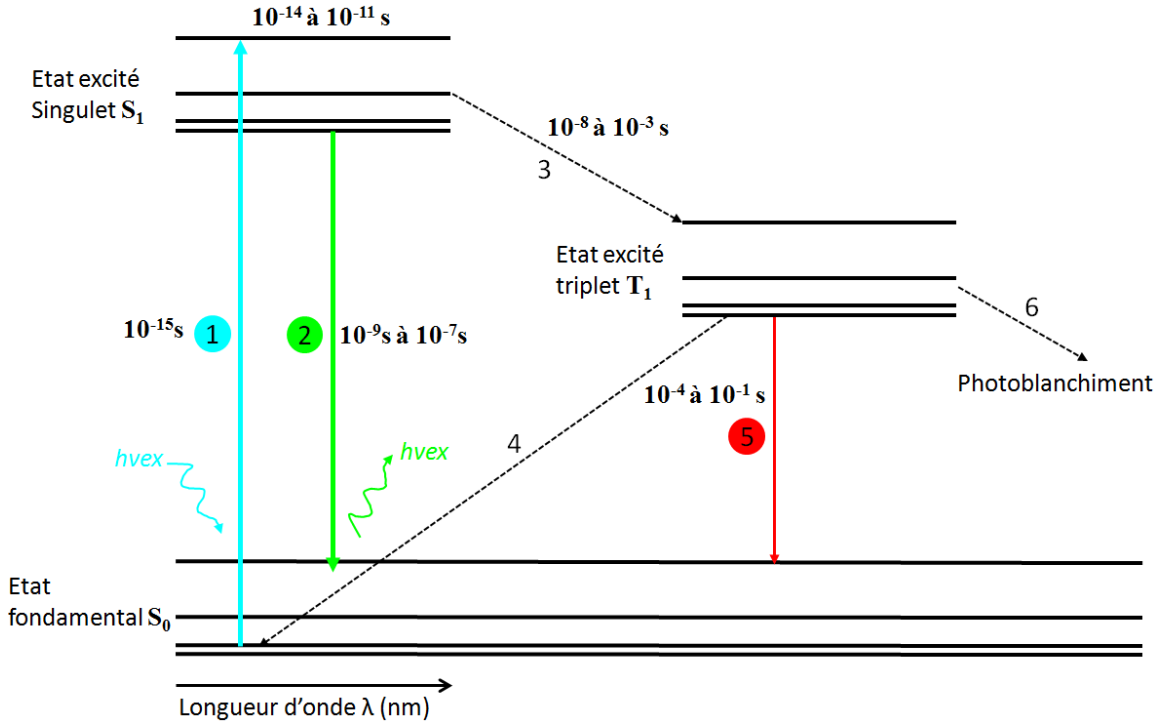


Figure 2-5 : Diagramme de Jablonski des états énergétiques de la fluorescence. (1) Absorption de photon d'excitation portant le fluorophore de l'état fondamental S_0 à l'état excité singulet S_1. (2) Fluorescence produite lors du passage du fluorophore de l'état S_0 à l'état S_1 en émettant un photon. (3) Conversion intersystème, passage dans l'état triplé. (4) Retour de l'état triplet T_1 à l'état fondamental S_0. (5) Phosphorescence. (6) Photoblanchiment.

La fluorescence est un phénomène d'émission lumineuse provoqué par l'absorption ou l'excitation d'une molécule (généralement un photon). La molécule possédant la propriété de fluorescence est appelée fluorophore. Dans un premier temps, le fluorophore est porté de l'état fondamental à l'état excité en absorbant un photon (1). La fluorescence est produite lors du retour de l'état excité à l'état fondamental (2). Ce retour à l'état fondamental s'accompagne en général de l'émission d'un photon avec une certaine longueur d'onde décalée vers le rouge, plus grande que la longueur d'onde d'excitation. La différence entre la longueur d'onde du pic d'excitation et la longueur d'onde du pic d'émission s'appelle le décalage de Stokes. En microscopie de fluorescence, on utilise généralement une source d'excitation monochromatique, telle qu'un laser, un monochromateur, une lampe couplée à des filtres d'excitation ou encore des diodes. Une molécule peut également passer de l'état excité à l'état

fondamental sans émettre de lumière (relaxation non radiative). Ce phénomène est appelé phosphorescence (5).

Une molécule portée dans un état excité peut subir une réaction photochimique qui la transforme irréversiblement en une molécule non fluorescente après en général plusieurs centaines de milliers de cycles de fluorescence. Ce phénomène appelé photoblanchiment (6) nuit en général à la qualité des images en microscopie de fluorescence. Néanmoins, certaines techniques de fluorescence tirent profit de ce phénomène, comme le FRAP (Fluorescence Recovery After Phobleaching), technique très populaire développée par (Axelrod et al., 1976), permettant de mesurer la mobilité de molécules dans les systèmes biologiques vivants. Une technique de microscopie de super-résolution optique beaucoup plus récente, la microscopie PALM, s'appuie sur ce mécanisme de photoblanchiment pour la localisation de molécules individuelles.

La fluorescence, du fait de l'émission radiative, crée des radicaux libres toxiques pour la cellule qui peuvent affecter les comportements biologiques étudiés. Par conséquent, il faut la réduire au maximum en utilisant des puissances de laser appropriées notamment sur cellules vivantes (Carlton et al., 2010).

2.1.2.2. Caractéristiques photophysiques de fluorescence

Parmi les caractéristiques les plus importantes des molécules fluorescentes, on peut citer :

- ***Les spectres d'absorption (ou d'excitation) et d'émission***, qui sont deux gammes de longueurs d'ondes lumineuses (Figure 2-6), permettent respectivement à une molécule fluorescente de passer de l'état fondamental à l'état excité et de retourner de l'état excité à l'état fondamental.
- ***Le décalage de Stokes*** est la différence entre les deux pics des spectres d'absorption et d'émission. Plus il est important, plus il sera aisé de séparer les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission.
- ***Le rendement quantique*** désigne le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Il correspond aussi à la fraction de molécules qui retournent à l'état fondamental en émettant un photon dans le spectre d'émission. Il est inférieur à 1 à cause de la perte d'énergie liée à la relaxation non radiative.

- ***La durée de vie*** correspond à la durée moyenne pendant laquelle la molécule reste à l'état excité. Elle est de l'ordre de la nanoseconde pour la plupart des molécules fluorescentes.
- ***Le coefficient d'extinction*** ε se définit comme la probabilité qu'une molécule absorbe un photon. Plus ε est important, plus la fluorescence est intense, à excitation lumineuse et rendement quantique égaux. Sa valeur est comprise en général entre 5000 et 250 000 $cm^{-1}.M^{-1}$.

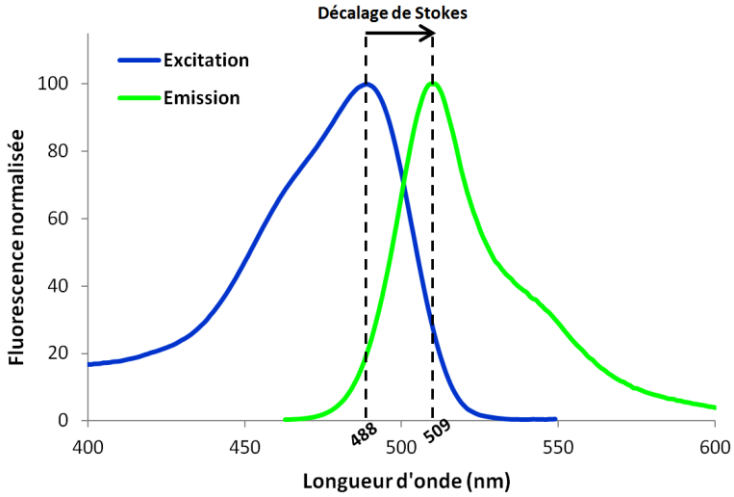


Figure 2-6 : Spectres d'absorption et d'émission de la protéine de fusion EGFP.

2.1.2.3. Marqueurs fluorescents

La détection optique d'une biomolécule nécessite un marquage fluorescent spécifique. Pour ce faire, différentes stratégies de marquage existent telles-que l'immunochimie ou la fusion de protéines.

On peut regrouper l'ensemble des marqueurs fluorescents en trois familles :

- **Les fluorophores organiques :** ce sont des molécules de synthèse composées principalement de doubles liaisons alternées. Afin d'être utilisables en biologie cellulaire, elles sont généralement conjuguées à des anticorps primaires ou secondaires. Elles représentent, à travers leur spectre d'émission, une palette de couleurs diverses de la lumière visible, allant de bleu profond au rouge lointain. Parmi les plus connus on peut citer les Alexa fluor et les carbocyanines (Tableau 2-1).

	Excitation (nm)	Emission (nm)	ε ($cm^{-1}.M^{-1}$)	Rendement quantique
Alexa fluor 488	495	519	71000	0.92
Alexa fluor 568	578	603	91300	0.69
Alexa fluor 647	650	665	239000	0.33
Alexa fluor 750	749	775	240000	0.12
Cy2	489	506	150000	0.12
Cy3	550	570	150000	0.15
Cy5	649	670	250000	0.28
Cy7	747	776	200000	0.28

Tableau 2-1 : Caractéristiques de fluorescence de certaines molécules organiques de la famille des Alexa fluor et des carbocyanines.

- **Les protéines fluorescentes :** ce sont des fluorophores naturels produits génétiquement par la cellule elle-même après l'introduction du gène de la protéine fluorescente fusionnée avec la protéine d'intérêt. La GFP, issue d'une méduse Aequorea victoria, était la première protéine fluorescente utilisée, en 1994, pour le marquage cellulaire (Chalfie et al., 1994).

Plusieurs variantes mutantes de la GFP ont été développées afin d'élargir la gamme des longueurs d'ondes et d'améliorer ses caractéristiques de fluorescence (Tableau 2-2).

	Excitation (nm)	Emission (nm)	ε ($cm^{-1}.M^{-1}$)	Rendement quantique
EBFP	380	440	31000	0.18
ECFP	434	477	26000	0.40
EGFP	488	509	55000	0.60
EYFP	515	529	80400	0.61
mEosFP	505	516	67200	0.64
Kaede	508	518	98800	0.88

Tableau 2-2 : Caractéristiques de fluorescence des différentes variantes de la GFP.

- **Les nano-cristaux fluorescents, ou quantum-dots (QD) :** ce sont des nanoparticules de semi-conducteurs de plusieurs couches. Leur taille peut aller de quelques nanomètres jusqu'à quelques dizaines de nanomètres. Leurs propriétés de fluorescence sont ajustables par le contrôle de leurs dimensions. Ces nano-cristaux peuvent couvrir pratiquement tout le spectre de lumière visible avec la particularité d'offrir un spectre d'excitation très large et un spectre d'émission très étroit. Ils sont considérés comme les marqueurs fluorescents les plus performants grâce à leur forte brillance et à leur résistance au photoblanchiment. Par contre, d'un cœur de quelques nanomètres, le diamètre d'un nano-cristal semi-conducteur fonctionnalisé

atteint finalement entre 20 et 30 nm, ce qui retreint leur utilisation en imagerie biologique.

2.2. Microscopie de super-résolution basée sur la localisation de molécules individuelles

La microscopie de fluorescence a permis l'observation de la cellule et de ses nombreuses organelles à l'échelle de quelques centaines de nanomètres. Néanmoins, ces techniques ne permettent pas une observation à l'échelle moléculaire de protéines et de structures macromoléculaires nanométriques à cause de la limite de diffraction. En pratique, si on essaie d'imager deux marqueurs fluorescents (Figure 2-3) dont la distance est inférieure à la résolution optique conventionnelle (~ 250 nm), il sera impossible de les distinguer dans le plan image. Plusieurs nouvelles techniques de microscopie de fluorescence ont été développées récemment ; elles permettent d'augmenter « artificiellement » le pouvoir de résolution, jusqu'alors infranchissable à cause de la limite de diffraction optique. Connues sous le nom de ***microscopie de super-résolution***, ces techniques peuvent atteindre une résolution latérale théorique de quelques nanomètres.

On peut regrouper les différentes techniques de super-résolution en trois catégories, elles-mêmes regroupées en deux familles : les déterministes et les stochastiques.

- La microscopie STED (STimulation Emission Depletion) est la première méthode déterministe à avoir été mise au point. Publiée par Stefan Hell en 1994 (Hell and Wichmann, 1994), elle consiste à réduire la taille de la tache d'Airy en introduisant un laser de déplétion en forme de « donut » partiellement superposé au laser d'excitation, empêchant les fluorophores d'émettre des photons (Figure 2-7B). L'acquisition des données se fait par balayage de l'échantillon par les 2 faisceaux, comme pour la microscopie confocale. Cette méthode a permis une amélioration considérable de la résolution latérale en atteignant quelques dizaines de nanomètres. De même, la résolution axiale peut être améliorée jusqu'à environ 125 nm avec un « donut » 3D.
- Dans la même famille, la microscopie SIM (Structure Illumination Microscopy), a été introduite par Mats Gustafsson en 2000 (Gustafsson, 2000). Le SIM est une technique de champ large dans laquelle un motif d'illumination périodique est superposé sur l'échantillon afin de générer des interférences de Moiré. Ce motif est translaté et tourné en plusieurs étapes pour chaque acquisition d'une image. L'image finale est

reconstruite informatiquement à partir des images intermédiaires. Cette méthode a permis de diviser la limite de résolution optique latérale et axiale par 2 (Figure 2-7A). Son gros avantage est qu'elle ne nécessite pas de fluorophores particuliers. La microscopie SSIM (Saturated Structure Illumination Microscopy) (Gustafsson, 2005) est une technique dérivée du SIM en prenant en compte la fluorescence non-linéaire, de manière similaire à la microscopie STED. Des résolutions latérales inférieures à 50 nm ont été obtenues avec cette technique.

- Les méthodes stochastiques sont, quant à elles, basées sur la localisation d'un grand nombre de molécules individuelles activées séquentiellement (Figure 2-7C). Elles ont émergé en 2006 avec le PALM (PhotoActivation Localization Microscopy) (Betzig et al., 2006, Hess et al., 2006) puis le STORM (Rust et al., 2006). Cette famille de techniques se base sur le principe, exploité depuis les années 80 dans les techniques de suivi de particules individuelles (SPT), qu'il est possible de déterminer informatiquement la position d'une molécule individuelle isolée dans le plan image avec une précision bien inférieure à la limite de résolution optique.

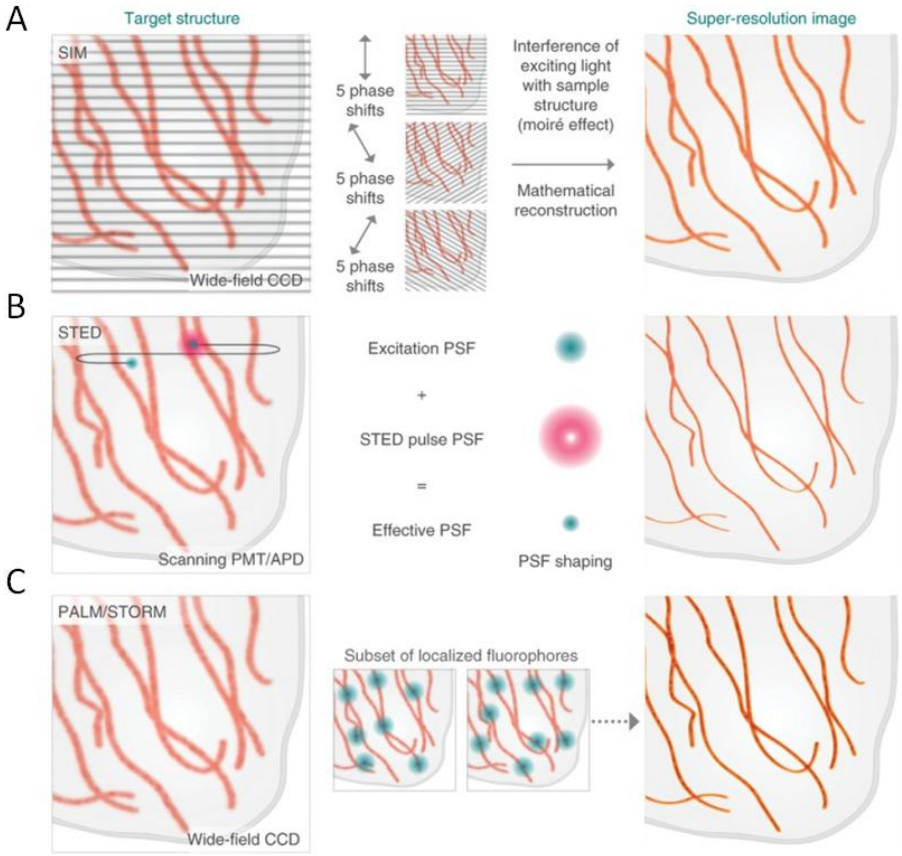


Figure 2-7 : Schéma des principales méthodes de super-résolution optiques. (A) Microscopie SIM. (B) Microscopie STED. (C) Microscopie par localisation (PALM/(d)STORM, …). (Maglione and Sigrist, 2013).

2.2.1. Principe de fonctionnement des méthodes de localisation

Prenons le cas d'un marqueur fluorescent isolé observé en microscopie de fluorescence : même s'il a une taille de quelques nanomètres, la diffraction de la lumière fera que son image, un disque d'Airy, aura un diamètre apparent d'au minimum ~ 250 nm (Figure 2-1). Dans le cas idéal, la position (x, y) du maximum d'intensité de la tache de diffraction donne la position de ce marqueur. Néanmoins, l'échantillonnage et le bruit des images ne permettent pas d'obtenir aussi facilement ses coordonnées. Ces dernières doivent alors être estimées par des algorithmes de localisation. La précision avec laquelle cette position peut être déterminée dépend principalement du rapport signal sur bruit et donc du nombre de photons collectés pour chaque marqueur individuel, mais également de l'algorithme de localisation. Dans le meilleur des cas, il est possible d'atteindre des précisions de quelques nanomètres (Betzig et al., 2006, Selvin et al., 2007).

A cause de leur taille apparente, la séparation de deux marqueurs fluorescents ne peut se faire que s'ils sont séparés de 250 nm au moins, même si leur taille réelle n'est que de quelques nanomètres (Figure 2-3). Considérons maintenant plusieurs molécules fluorescentes de 1 nm situées à l'intérieur d'un cercle de diamètre inférieur au pouvoir de résolution. L'observation simultanée de l'ensemble de ces marqueurs par microscopie à fluorescence donnera une seule tache de diffraction. Si par contre toutes ces molécules sont observées séquentiellement les unes après les autres, il sera possible de les localiser individuellement avec une précision nanométrique et ainsi de reconstruire l'image dite de super-résolution. Autrement dit, on doit contrôler leur fluorescence dans le temps et l'espace de manière à les visualiser séparément. Pour ce faire, les molécules sont rendues transitoirement et aléatoirement fluorescentes, le temps de les observer. C'est possible grâce à la nature stochastique de la fluorescence et grâce aux propriétés qu'ont certains fluorophores d'être photo-convertibles. Statistiquement, il faut que dans une surface correspondant à une tache de diffraction, un seul marqueur soit fluorescent pendant que tous les autres sont éteints. En répétant la procédure un nombre suffisant de fois (de 10^4 à 10^5 images), la position de tous les marqueurs sera déterminée et l'image de super-résolution pourra être reconstruite.

Plus précisément, à un temps donné (t_1), un seul marqueur au maximum doit être visible (fluorescent) à l'intérieur d'un cercle de rayon au minimum 250 nm, afin de déterminer sa position. A un autre temps (t_2), on visualise un autre marqueur et on détermine à nouveau sa position, et ainsi de suite (t_3, … t_n). On peut ainsi reconstruire une image de l'objet observé avec

une résolution proportionnelle à la précision de localisation de chaque marqueur fluorescent, soit quelques nanomètres (Figure 2-8). Plusieurs centaines de milliers de localisations peuvent être nécessaires à la reconstruction de l'image de super-résolution d'un échantillon biologique avec la densité adéquate. Le contrôle stochastique de la fluorescence des fluorophores est réalisé grâce à l'utilisation de lasers d'activation et de lasers d'imagerie.

Le principe de la microscopie de super-résolution par localisation de molécules individuelles peut se résumer en trois étapes séquentielles répétées : fluorescence, localisation et reconstruction, comme illustré dans la Figure 2-8.

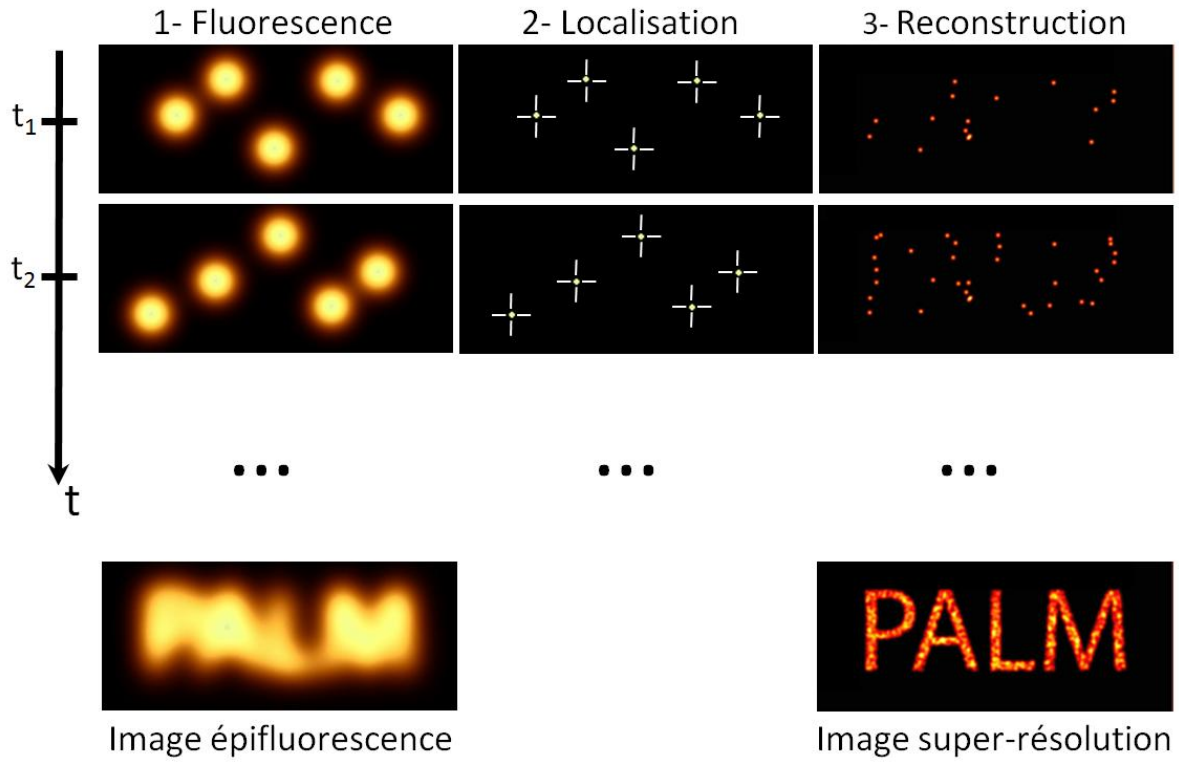


Figure 2-8 : Principe de la microscopie de super-résolution basée sur la localisation de molécules individuelles. L'image finale de super-résolution est obtenue en répétant plusieurs dizaines de milliers de fois les trois étapes séquentielles : fluorescence, localisation et reconstruction.

Ce principe a pu être appliqué suite à la découverte de nouveaux marqueurs fluorescents dont les propriétés de fluorescence peuvent être contrôlées grâce à la lumière (voir détails ci-dessous). Le pouvoir de résolution de l'instrument n'est pas amélioré intrinsèquement car on ne peut pas s'affranchir de la diffraction de la lumière. Néanmoins, la microscopie de super-résolution par localisation permet de reconstruire des images en 2 et 3 dimensions avec une précision nanométrique. Un avantage majeur de cette technique, comparativement aux techniques déterministes introduites précédemment, c'est qu'elle ne nécessite pas de système optique complexe. Un simple microscope à champ large, de préférence à ondes évanescentes

(TIRF), convient (voir chapitre 2.2.3). Une des difficultés réside néanmoins dans le processus de localisation et de la gestion de la grande quantité d'images générées par ces méthodes de localisation. La Figure 2-9 présente une des premières images de super-résolution obtenues par la technique PALM (Betzig et al., 2006).

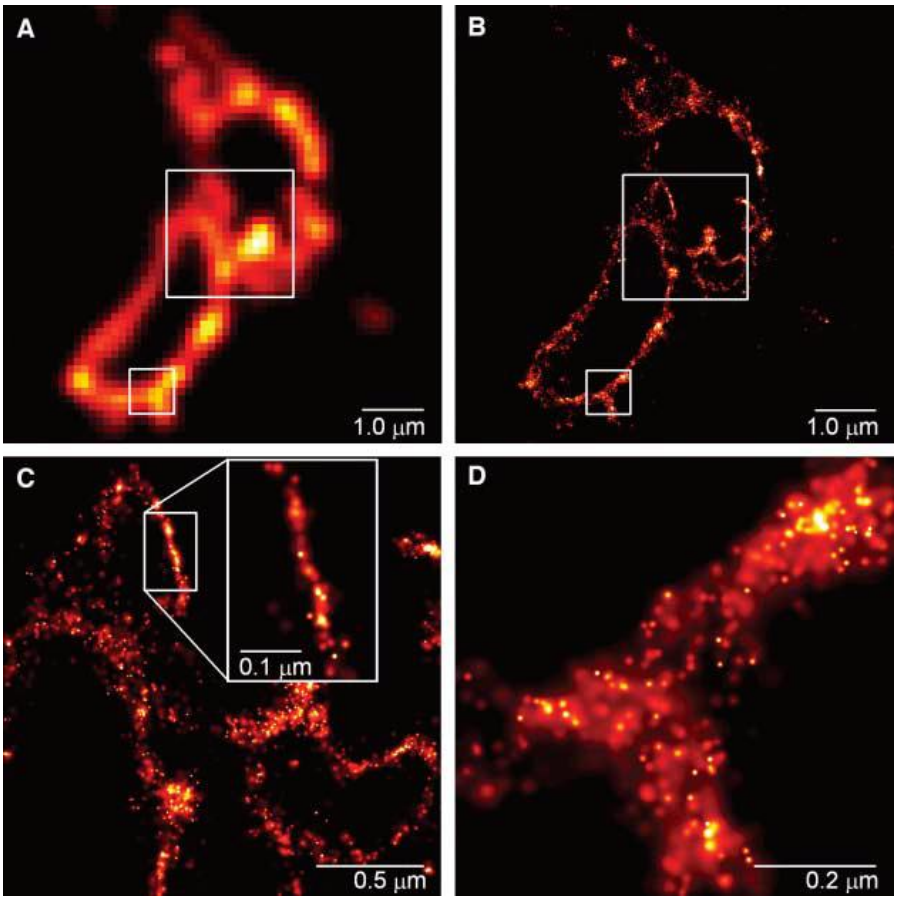


Figure 2-9 : Images de lysosomes (protéine CD63) de cellules COS7 observées à l'aide de la microscopie de fluorescence classique (A) et à l'aide de la microscopie de super-résolution par localisation de fluorophores photoactivables PA-FP Kaede (B, C, D) ; la précision de localisation d'une molécule est de l'ordre de 20 nm. (Betzig et al., 2006).

2.2.2. (f)PALM, (d)STORM, GSD, …

Toutes les techniques stochastiques sont basées sur le même principe de localisation introduit précédemment. La différence entre les techniques PALM, STORM, etc., consiste dans le type de marqueurs fluorescents et leurs mécanismes de fluorescence.

- **(f)PALM :** cette technique se base principalement sur l'utilisation de protéines fluorescentes de fusion qui ont la propriété de pouvoir changer leurs spectres d'excitation et d'émission. Ces marqueurs existent principalement sous deux formes :
    - **Les protéines photoactivables :** Les protéines fluorescentes photo-activables ont deux états possibles : l'état non fluorescent (éteint) et l'état fluorescent

(Figure 2-11A). Deux lasers de longueurs d'ondes différentes sont nécessaires, l'un, d'une très faible intensité dans le proche UV (405nm de l'ordre du µW/cm²), pour la photoactivation du marqueur ; l'autre à la longueur d'onde appropriée (de l'ordre du mW/cm²) pour son excitation effective dans son état fluorescent et son photoblanchiment. Le passage de l'état non fluorescent à l'état fluorescent est irréversible. La première protéine fluorescente de cette famille est la PA-GFP (Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002).

- **Les protéines photoconvertibles :** contrairement à la première forme de protéines fluorescentes, celles-ci possèdent deux états fluorescents : un état fluorescent natif (par exemple vert) et un état fluorescent activé (par exemple orange ou rouge). La photoconversion de l'état non activé à l'état activé se fait de manière irréversible par l'intermédiaire d'un laser de faible intensité dans le proche UV (Figure 2-11B). Les protéines Kaeda, Eos et Dendra représentent les marqueurs les plus utilisés de cette famille.

L'ajustement de l'intensité des lasers d'imagerie et la vitesse d'acquisition permet de voir les molécules individuelles sur plusieurs images avant leur photoblanchiment. La technique de sptPALM (Manley et al., 2008, Manley et al., 2011, Heidbreder et al., 2012), combine les techniques de suivi de protéines individuelles (SPT) et de PALM. Après l'étape de localisation, les coordonnées des molécules sont reliées entre elles en fonction de leur proximité spatiale et temporelle dans le but de construire des trajectoires de protéines individuelles. En plus des informations de localisation offertes par la technique de PALM, il devient alors possible d'extraire une cartographie de la dynamique des biomolécules marquées (Figure 2-10).

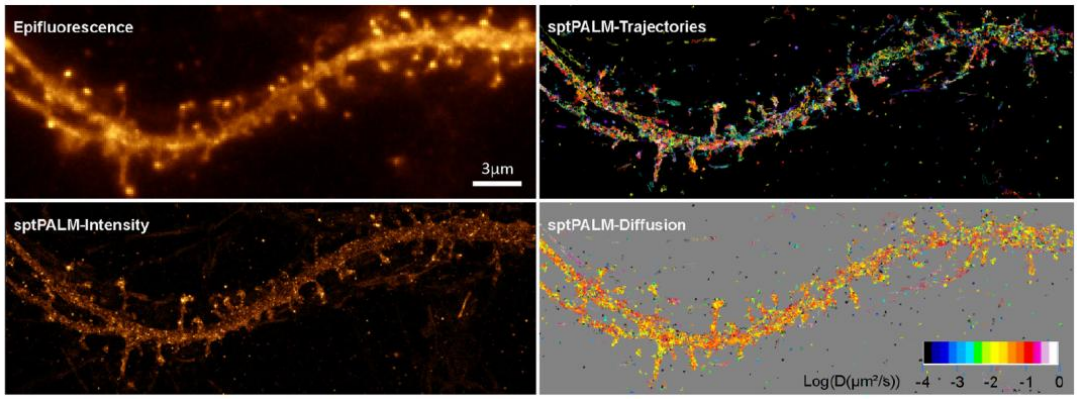


Figure 2-10 : Images d'épifluorescence et de super-résolution en utilisant la technique sptPALM exprimant EOS::GluA1 dans des neurones vivants en culture (gauche). Cartographies des trajectoires et des coefficients de diffusion (droite). (Nair et al., 2013).

- **STORM\(d)STORM\GSDIM :** Ces techniques emploient des molécules synthétiques telles que les Alexafluor et les carbocyanines. Ces marqueurs organiques sont photocommutables (Figure 2-11C), c'est-à-dire qu'ils peuvent alterner réversiblement entre l'état excité et l'état fondamental. La microscopie STORM dans sa version initiale (Rust et al., 2006) emploie une paire de fluorophores : un activateur (Cy3) et un récepteur (Cy5). Une fois le fluorophore activateur excité, son émission permet de réactiver le fluorophore récepteur photocommutable.

  L'imagerie avec un simple fluorophore a été rendue possible grâce au dSTORM (Heilemann et al., 2008) et au GSDIM (Folling et al., 2008). Une fois le fluorophore porté de l'état fondamental S_0 à l'état excité S_1, il y a deux façons de le ramener à l'état S_0 : la fluorescence classique à partir de S_1 (Figure 2-5(2)), ou la transition par un état triplet (Figure 2-5(4)). Cet état triplet étant très stable par rapport à la durée de vie de fluorescence (~ns), le fluorophore peut s'y maintenir pendant plusieurs secondes avant de retourner à l'état fondamental. Une fois toutes les molécules passées à l'état triplet par absorption d'une forte puissance lumineuse (de l'ordre du kW/cm²), il devient alors possible de conserver uniquement une petite fraction de molécules individuelles fluorescentes. En pratique, l'état triplet peut être assimilé à un réservoir de molécules servant à l'approvisionnement pendant l'acquisition. Le dSTORM favorise le passage de fluorophores organiques à l'état triplet par l'utilisation d'un milieu spécifique pour la réduction d'oxygène (ROXS). L'emploi d'agents réducteurs ainsi que l'utilisation d'une puissance laser importante restreignent exclusivement l'application de cette technique à l'étude de cellules

fixées. Il est possible d'accélérer le retour depuis l'état triplé vers l'état fondamental par l'absorption de lumière dans le bleu (idéalement à 405 nm).

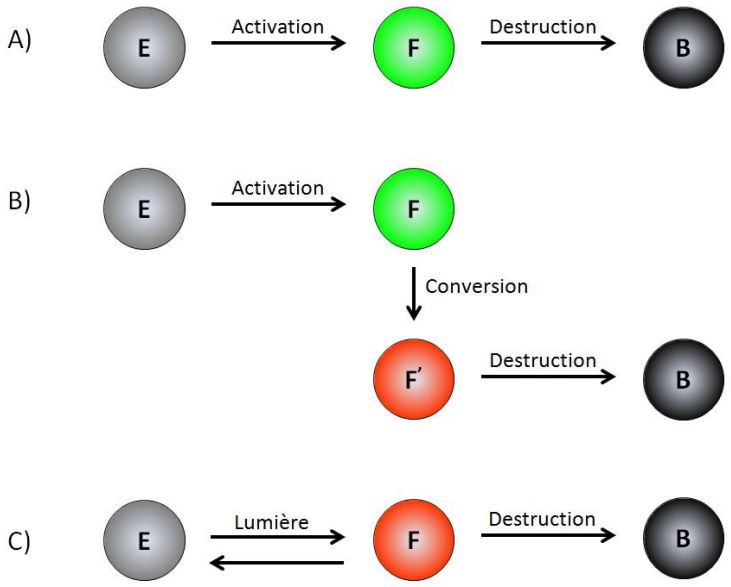


Figure 2-11 : Mécanismes de fluorescence en microscopie de super-résolution par localisation. (A) Fluorophores photoactivables. (B) Fluorophores photoconvertibles. (C) Fluorophores photocommutables. E = état éteint, F = état fluorescent, F' = état fluorescent activé, B = fluorophore photoblanchi.

2.2.3. Acquisition

Un élément clef en imagerie de molécules individuelles est le contraste avec lequel chaque molécule sera imagée. Il est donc crucial de collecter un maximum de photons issus des molécules dans le plan focal tout en réduisant au maximum le fond lié aux molécules fluorescentes situées hors du plan focal. En illumination à épifluorescence champ large (Figure 2-12A), les molécules en dehors du plan focal vont générer un signal de fond et ainsi réduire considérablement le contraste des molécules individuelles dans le plan d'acquisition. L'élimination de la fluorescence parasite en dehors du plan focal améliore le rapport signal-sur-bruit (SNR), et par conséquent la précision de localisation. Divers mécanismes sont employés en microscopie de fluorescence à champ large dans le but de limiter l'excitation et la détection de marqueurs dans un plan de l'échantillon. La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFM) (Axelrod, 2001) est la plus utilisée en microscopie de localisation.

La microscopie TIRFM exploite les propriétés uniques des ondes évanescentes qui se génèrent dans une région fine de l'échantillon immédiatement adjacente à l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents (Figure 2-12B), l'échantillon en milieu aqueux d'une part et la lamelle de verre d'autre part.

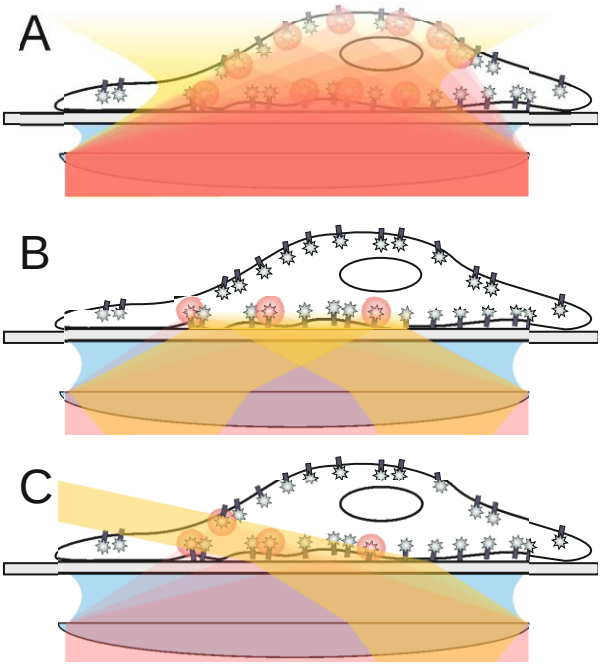


Figure 2-12 : Différents modes d'imagerie pour l'acquisition de molécules uniques. (A) Champ large. (B) TIRF. (C) Oblique.

La microscopie TIRFM se base sur un phénomène physique bien établi appelé *réflexion totale interne*. A partir d'un certain angle incident (*angle critique*), le faisceau d'excitation subit une réflexion totale. A cet angle critique, une onde évanescente se propage à l'interface verre/eau, excitant les fluorophores sur une centaine de nanomètres à proximité de cette interface, avec une intensité exponentiellement décroissante. Ce mode d'illumination permet de réduire le fond efficacement, seuls les fluorophores situés exclusivement à cette interface étant activés. La microscopie TIRFM constitue un outil idéal pour l'étude de mécanismes et de dynamiques de protéines membranaires. Elle est couramment employée en microscopie de super-résolution par localisation.

Néanmoins, la microscopie TIRF reste limitée à l'étude en 2 dimensions, ce qui reste très restrictif. Il est possible d'utiliser la microscopie à illumination oblique (Giannone et al., 2010). En décalant légèrement le laser focalisé sur la pupille arrière de l'objectif à l'intérieur par rapport à l'angle critique utilisé, le faisceau laser traversera l'échantillon suivant un angle de quelques degrés (Figure 2-12C). Ainsi, les fluorophores seront excités par une fine feuille de lumière, d'une épaisseur d'environ 1 µm en fonction de l'angle utilisé. Les fluorophores situés en dehors du plan focal ne seront pas excités, réduisant fortement le fond. Cette technique est idéale pour faire de la localisation en 3D.

2.3. Problèmes de localisation de molécules individuelles

L'étape de localisation en microscopie de super-résolution de molécules individuelles constitue une étape cruciale. En effet, la précision de localisation conditionne la résolution finale de l'image reconstruite. Avant tout il est important de bien distinguer la précision de localisation *p* de la résolution *r*. La précision de localisation est définie par l'erreur quadratique moyenne entre la position réelle d'une molécule et l'estimation numérique de cette position :

$$p = \langle (\Delta x)^2 \rangle^{1/2} \qquad 2\text{-}6$$

Dans le cas le plus fréquent où la distribution de cette erreur suit une loi normale, la relation entre la précision de localisation et la résolution est définie comme la distance permettant de séparer 2 molécules :

$$r = 2{,}3\ \mathrm{p} \qquad 2\text{-}7$$

où *r* représente alors la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la distribution Gaussienne de l'erreur de localisation. La Figure 2-13 illustre la différence entre la résolution (A) et la précision de localisation (C).

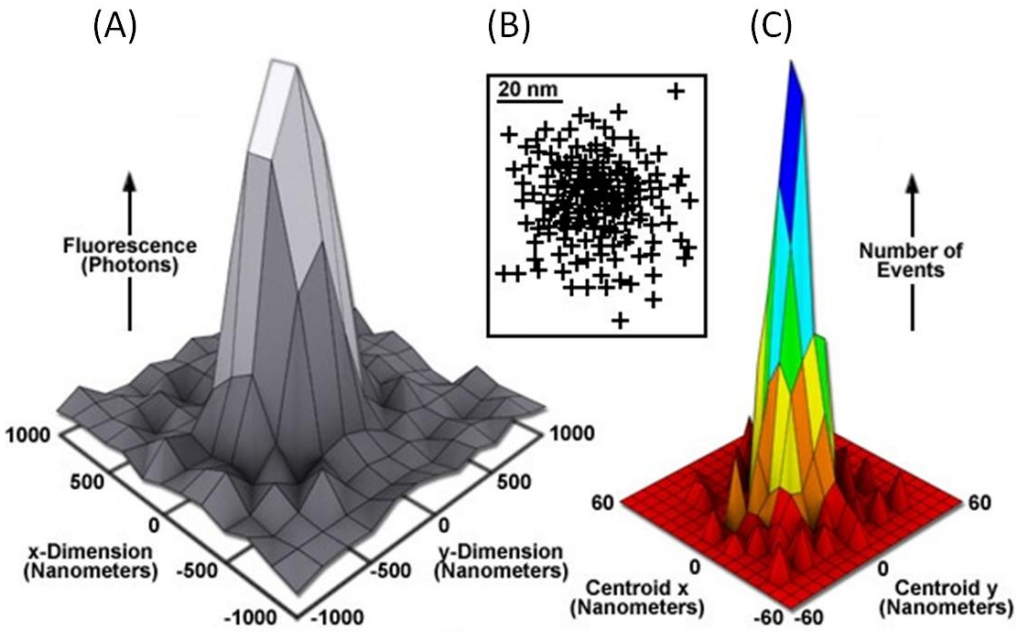


Figure 2-13 : Précision de localisation et résolution. (A) Profil d'intensité de l'image d'une molécule fluorescente individuelle. (B) Distribution des barycentres issus de plusieurs localisations du même fluorophore. (C) Profil d'intensité de la distribution des localisations. (http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/stormintro.html).

L'étape de localisation consiste à déterminer les différents paramètres associés à la position d'une molécule isolée *(x, y, z et intensité)*. En microscopie de fluorescence, l'image d'une source

ponctuelle est déformée par plusieurs facteurs tels que la PSF, la pixellisation (échantillonnage), le bruit (de photons et électronique) et le fond (fluorescence hors du plan focal, auto-fluorescence, …). La Figure 2-14 illustre les différentes déformations subies par le signal provenant d'une molécule fluorescente. Toutes ces dégradations altèrent significativement la précision avec laquelle les molécules seront localisées.

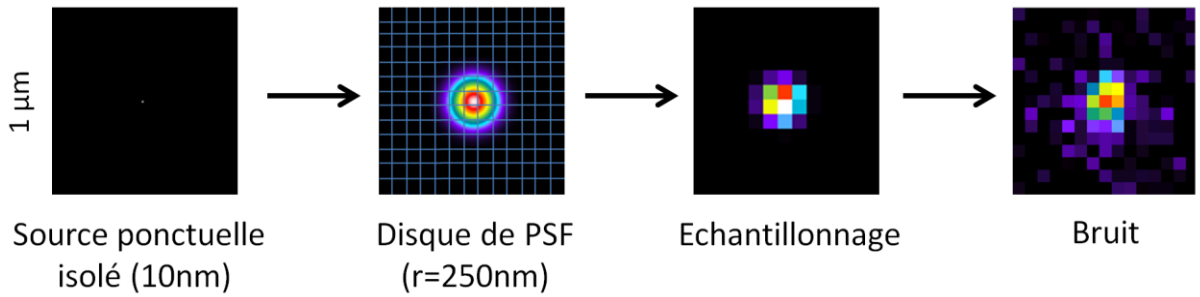


Figure 2-14 : Déformation de l'image de la source ponctuelle lumineuse lors de l'étape d'acquisition à travers un microscope. Le signal de fluorescence émis par un fluorophore est déformé par plusieurs facteurs tels que la PSF, l'échantillonnage et le bruit photonique et électronique.

D'autres types de dégradations, comme les aberrations optiques, peuvent également dégrader la précision de localisation. On peut citer par exemple les aberrations sphériques liées au changement d'indices de réfraction entre la lamelle et le spécimen. Elles peuvent introduire des déformations du signal (Figure 2-15), réduisant son intensité du signal dans le plan de focalisation. L'optimisation du milieu de montage de l'échantillon et de l'indice de réfraction de l'huile d'immersion est indispensable pour réduire leurs effets (Olivier et al., 2013). Ces aberrations peuvent également provenir de lamelles d'épaisseur non idéale. Dans la pratique, il est indispensable de contrôler et optimiser la qualité de la PSF de manière à optimiser la précision de localisation.

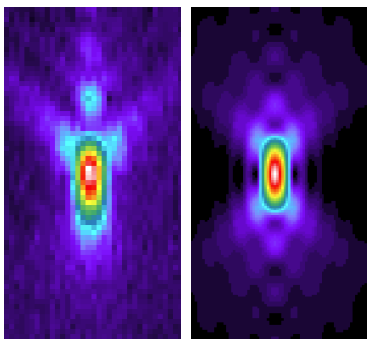


Figure 2-15 : Exemple type d'aberrations sphériques liées aux non concordances entre les indices de réfraction des différents milieux ou à l'utilisation d'une lamelle de mauvaise épaisseur. A gauche, la présence d'aberrations sphériques, visible par une rupture de la symétrie axiale de la PSF, réduit l'intensité du signal dans le plan focal. A droite, PSF théorique idéale.

Dans le paragraphe suivant, nous allons nous focaliser principalement sur l'échantillonnage et le bruit.

2.3.1. Détection du signal

La microscopie de localisation a tiré profit des derniers progrès technologiques, notamment en ce qui concerne les détecteurs. Avec l'arrivée des caméras EMCCD, à très haute sensibilité, la détection de molécules individuelles est devenue de plus en plus performante. En effet, leur efficacité quantique - rapport entre le nombre de photons collectés par la caméra et le nombre de photons incidents sur la caméra - avoisine les 90%. Cela permet également la détection de très faibles signaux de fluorescence, ce qui peut être le cas pour l'observation de molécules individuelles. La technique d'amplification électronique du signal avant sa lecture permet la réduction du bruit de lecture, ce qui est un autre avantage. Cette famille de caméras offre une résolution temporelle relativement bonne, qui peut aller jusqu'à 20 MHz pour les modèles les plus récents, compatible avec la plupart des applications de microscopie de localisation. Sa technologie de transfert de frame (FT) lui permet d'être utilisée en streaming, parallélisant les étapes d'exposition et de lecture et offrant la possibilité d'acquérir des images à la fréquence maximale de la caméra (par exemple à 50 images par seconde avec 20 msec de temps d'exposition par image).

L'échantillonnage spatial est un élément important en microscopie optique. Selon le théorème de Nyquist-Shannon (Shannon, 1949), la taille du pixel optimale dans le plan image (ou pas d'échantillonnage) doit être inférieure ou égale à la moitié de la résolution latérale, soit inférieure ou égale à 110 nm à 520 nm de longueur d'onde d'émission pour les objectifs à forte ouverture numérique. Néanmoins, il est crucial de collecter un maximum de photons par pixel pour augmenter le rapport signal sur bruit. Ce dernier critère favorise l'utilisation de grands pixels. Dans la pratique, on utilisera un pixel au plus proche de la moitié de la résolution. Le capteur le plus utilisé en microscopie de super-résolution est le capteur EEV-512B. Il possède un pixel de 16 µm de côté, soit 160 nm dans le plan image avec un objectif 100x. C'est pourquoi, il est souvent couplé avec un grossissement supplémentaire de 1,5x au niveau de la lentille de tube pour vérifier le théorème d'échantillonnage.

Une publication récente (Huang et al., 2013) a démontré la possibilité d'employer une nouvelle génération de caméra sCMOS, dont le rendement quantique est de ~ 70%, mais dont les performances en termes de vitesse d'acquisition sont exceptionnelles. A l'aide d'un algorithme spécifique prenant en compte le bruit de lecture, important et non homogène avec ce type de

caméra, il a été possible d'acquérir des images à des fréquences d'acquisition très élevées de 100 images/seconde pour un champ de 207 × 207 µm².

2.3.2. Sources de bruit

Diverses sources de bruit existent dans les images, venant se superposer les unes aux autres. On peut distinguer trois principaux types de bruit :

2.3.2.1. Bruit noir

Il correspond au bruit généré par la caméra elle-même lorsque celle-ci ne reçoit aucune illumination. Il est lié à l'électronique du capteur, et particulièrement à sa réponse thermique. Pour les caméras EMCCD, il est négligeable grâce à leur système de refroidissement (~ -80°C).

2.3.2.2. Bruit de lecture

Il intervient lors de l'étape de conversion analogique/numérique du signal. Il est de nature Gaussienne et proportionnel à la fréquence d'acquisition de la caméra. Grâce à l'amplification électronique du signal des caméras EMCCD, le bruit de lecture est limité pour les forts taux d'amplification.

2.3.2.3. Bruit de photon

Il est lié à la nature photonique de la lumière. Il suit une distribution Poissonienne, c'est-à-dire à partir de *N* photons émis en moyenne suite à un phénomène de fluorescence (si on néglige toute perte entre la source d'émission et le capteur), la probabilité de détecter *n* photons au niveau du détecteur suit la loi de Poisson :

$$p(n) = N^n e^{-N}/n! \qquad 2\text{-}8$$

La probabilité maximale est obtenue pour *n*=*N*, et l'écart type de la distribution est $\sqrt{N}$. Ainsi, le SNR lié au bruit Poissonien est $\sqrt{N}$.

Pour les grandes valeurs de *N*, la loi de Poisson se confond avec la distribution Gaussienne, soit:

$$p(n) \propto e^{-(N-n)^2/2N} \qquad 2\text{-}9$$

Il est important de rappeler que ces photons seront distribués dans la tache de diffraction du microscope.

2.3.3. Localisation axiale de molécules individuelles

Bien que les techniques de microscopie de super-résolution par localisation aient surtout amélioré la résolution latérale des images, la plupart des organites et des structures cellulaires ne peuvent être observés sans prendre en compte une imagerie dans les trois dimensions *(x, y, z)*. L'imagerie de fluorescence 3D a été le plus souvent réalisée à l'aide de la microscopie confocale ou multiphotonique où la résolution axiale est comprise entre 500 et 800 nm (Zipfel et al., 2003). La résolution axiale a pu être améliorée drastiquement jusqu'à environ 100 nm grâce à la microscopie 4Pi et i5M (Hell et al., 1994, Gustafsson et al., 1999).

De nombreuses techniques ont été développées pour l'extraction de la position axiale de molécules individuelles. On peut les classer en trois grandes familles :

- La première famille repose sur la déformation de la PSF en fonction de la position axiale de la molécule. L'astigmatisme (Holtzer et al., 2007, Huang et al., 2008) est la méthode la plus populaire. Il est induit par l'ajout d'une lentille cylindrique sur le trajet optique au niveau de l'émission, de manière à générer 2 foyers et transformer la PSF d'une forme circulaire en forme elliptique non symétrique par rapport au plan de focalisation. La hauteur et la largeur permettront d'extraire la position axiale des molécules. Différentes variantes de cette méthode ont été proposées afin de mieux contrôler cette déformation, telles que : la double-hélice (Pavani et al., 2009) ou encore la spirale (Lew et al., 2011), offrant une profondeur axiale plus importante mais limitant la densité de molécules.
- La seconde famille, appelée bi-plans (Juette et al., 2008), repose sur l'imagerie simultanée de deux plans légèrement défocalisés l'un par rapport à l'autre, permettant d'extraire la position axiale de la molécule en fonction de la forme relative de la PSF dans les deux plans.
- La troisième famille, appelée iPALM (Shtengel et al., 2009) pour PALM interférométrique, s'appuie sur l'interférométrie. Comme pour le 4Pi, deux objectifs sont utilisés pour qu'un photon émis par l'échantillon puisse interférer avec lui-même après avoir été recombiné avec un séparateur de faisceau. Le rapport d'intensité des images fournit une mesure de la position axiale de la molécule. Cette méthode offre la meilleure résolution axiale (~10 nm), dépassant même la résolution latérale (~20 nm), mais reste très difficile à mettre en œuvre et d'une application restreinte à des objets très peu épais.

La Figure 2-16 illustre les trois approches ainsi que le montage optique employé pour chacune d'entre d'elles.

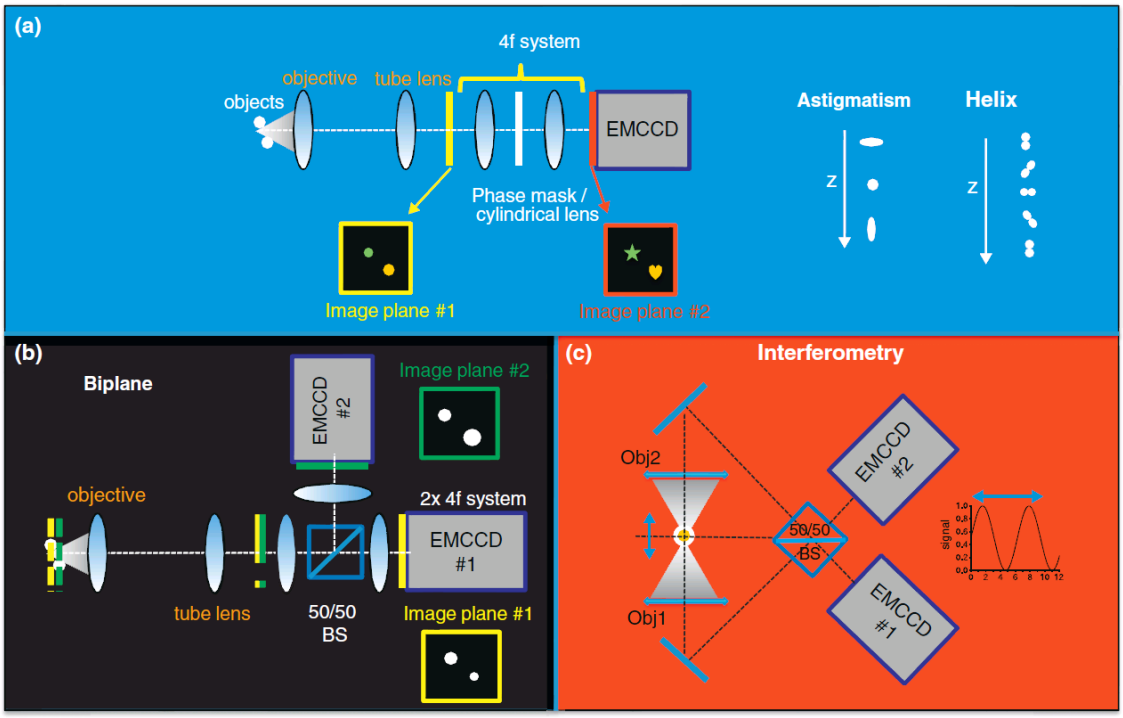


Figure 2-16 : Techniques pour la localisation 3D de molécules individuelles. (A) Déformation de la PSF en fonction de la position axiale de la molécule en différentes formes telles que l'astigmatisme, la double-hélice et la spirale. (B) Bi-plans. (C) iPALM. (Manley et al., 2011).

Dans tous les cas, plus le nombre de photons collectés est important, meilleure sera la précision de localisation. Récemment, (Xu et al., 2013) ont mis au point un microscope avec deux objectifs (similaire au 4Pi mais sans interférence), de manière à collecter par le second objectif les photons perdus, permettant ainsi d'augmenter la précision de localisation d'environ $\sqrt{2}$ fois.

2.3.4. Algorithmes et précisions de localisation

Depuis la mise au point des techniques de SPT et avec, plus récemment, l'émergence de la microscopie de super-résolution par localisation, plusieurs méthodes algorithmiques ont été développées dans le but de dépasser les différents obstacles liés au bruit et à la pixellisation évoqués précédemment. La connaissance de la PSF du système optique est exploitée afin de déterminer la position et l'intensité de chaque molécule identifiée.

L'approximation Gaussienne de la PSF (2-2) ne prend pas en considération l'effet de pixellisation de caméra. En général, la formulation suivante est utilisée :

$$\mu_k(x,y) = \int_{A_k} PSF(u,v)\, du\, dv + B_k \qquad 2\text{-}10$$

où $\mu_k(x,y)$ est l'intensité du pixel *k*, $B_k$est le fond et l'intégrale est réalisée sur la région A_k du pixel *k*.

En pratique, l'ajustement Gaussien appliqué sur l'image de molécules fluorescentes individuelles est la méthode la plus populaire car la plus précise (Cheezum et al., 2001). Il existe principalement deux méthodes pour l'ajustement de la fonction PSF : les moindres carrés non linéaires (NLLS) et le maximum de vraisemblance (MLE).

- La méthode NLLS s'appuie sur la minimisation de la fonction S pour calculer les paramètres θ de la PSF :

$$S = \sum_{k=1}^{K}(I_k - \mu_{\theta,k})^2 \qquad 2\text{-}11$$

où I_k est l'intensité du pixel *k* dans les données réelles, $\mu_{\theta,k}$ l'intensité moyenne du pixel *k* obtenue à priori avec la fonction $PSF_{\theta,k}$ du système d'acquisition et *K* le nombre de pixels utilisés pour l'ajustement.

Le travail de (Thompson et al., 2002) a démontré que la précision de localisation dans le cadre de la méthode NLLS dépendait principalement du nombre de photons *N*, du bruit Gaussien *b* et de l'échantillonnage *a* :

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{\sigma^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi\sigma^4 b^2}{a^2 N^2} \qquad 2\text{-}12$$

où σ est l'écart type de la PSF (2-2). Cette formule est généralement simplifiée comme suit :

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{\sigma^2}{N} \qquad 2\text{-}13$$

- La méthode MLE se base, quant à elle, sur la maximisation de la vraisemblance entre les données réelles et les données estimées selon la fonction ξ :

$$\xi(\theta|I_1, \dots\dots\dots, I_K) = \sum_{k=1}^{K}(I_k.\ln(\mu_{\theta,k}) - \mu_{\theta,k}) \qquad 2\text{-}14$$

La limite inférieure de Cramér-Rao (Kagan, 2001) permet d'estimer la précision de localisation théorique de la méthode MLE. Une estimation de cette borne inférieure est donnée par (Ober et al., 2004) :

$$\delta_x = \delta_y = \frac{\lambda_{em}}{2\pi.NA\sqrt{\gamma A t}} \qquad 2\text{-}15$$

où λ_{em}, NA, γ, *A* et *t* sont respectivement la longueur d'onde d'émission du fluorophore, l'ouverture numérique de l'objectif, l'efficacité quantique du système optique, le taux

d'émission du fluorophore et le temps d'exposition. Le terme γAt correspond au nombre *N* de photons détectés par molécule par image.

Selon ces formules, la précision de localisation peut atteindre quelques nanomètres lorsque le nombre de photons détectés par molécule par image est très grand ; 10^4 photons permettent théoriquement d'améliorer la résolution d'un facteur 100 et de descendre en dessous de 10 nm.

Les deux méthodes sont implémentées à l'aide d'algorithmes itératifs. En effet, l'optimisation des deux fonctions respectives se fait itérativement à partir de valeurs initiales des paramètres. Le choix de ces valeurs est important pour que l'ajustement converge le plus rapidement possible vers une solution optimale.

Cependant, ces techniques d'ajustement Gaussien restent très lourdes en termes de temps de calcul, et elles peuvent devenir un facteur limitant dans le cas de la reconstruction d'images de super-résolution composées de plusieurs centaines de milliers de localisations. De nombreux travaux ont été proposés récemment afin de respecter le meilleur compromis entre la précision de localisation et le temps de calcul. Parmi les plus remarquables, on peut citer :

- LivePALM (Hedde et al., 2009) : ce travail utilise l'algorithme algébrique de fluoroBancroft inspiré du système de localisation GPS (Global Positioning System).
- QuickPALM (Henriques et al., 2010) : ce logiciel est implémenté comme un plugin dans la plateforme logicielle ImageJ. Il utilise l'algorithme de Högbom 'CLEAN' pour l'étape de la localisation.
- L'ajustement MLE (Smith et al., 2010) : l'ajustement Gaussien MLE est optimisé sur le processeur GPU.
- RapidSTORM (Wolter et al., 2010, Wolter et al., 2012) : une version optimisée de l'ajustement Gaussien MLE en utilisant l'algorithme de maximum locaux de Neubeck et Van Gool.
- Centres de symétrie radiale (Parthasarathy, 2012) : l'algorithme des centres de symétrie radiale est appliqué sur les images de molécules individuelles.

Certains de ces travaux se sont fortement inspirés par d'autres domaines scientifiques tels que l'astronomie par exemple, confrontée elle aussi à la même problématique, à savoir : localiser des étoiles au lieu de marqueurs fluorescents. La plupart de ces méthodes sont basées sur des algorithmes massivement parallèles, en utilisant soit l'architecture multiprocesseurs, soit des

cartes graphiques performantes (GPU). Ces implémentations ont permis une réduction considérable du temps de calcul.

2.3.5. Densité de molécules

Tous ces travaux sont basés sur le principe fondamental que chaque molécule doit être bien isolée de ses voisines. Lorsque ce n'est pas le cas, à savoir quand plusieurs molécules sont fluorescentes dans un voisinage inférieur à la taille de la tache de diffraction, on risque une erreur importante de localisation, l'algorithme prenant la plupart du temps le centre géométrique des différentes molécules à proximité. Pour pouvoir être séparées, les molécules doivent être idéalement distantes de plus de 250 nm. Si les molécules étaient organisées de manière régulière avec une distance entre elles de 250 nm, la densité idéale serait de 25 molécules/µm². Malheureusement, la nature stochastique du processus d'activation ne nous permet pas le contrôle déterministe, et la densité idéale moyenne tombe alors à 0 ,5 mol/µm².

Une autre famille d'algorithmes a été récemment introduite, permettant la localisation de molécules à très haute densité (> 1 molécule/μm^2). Il s'agit de l'algorithme basé sur la théorie du CS (Compressed Sensing) (Zhu et al., 2012) et de l'algorithme DAOSTORM (Holden et al., 2011). Augmenter la densité permet d'augmenter la vitesse d'acquisition puisqu'il faut proportionnellement moins de temps pour localiser un nombre donné de molécules. Néanmoins, ces techniques offrent des précisions moindres par rapport aux techniques à faible densité, et ne fonctionnent pour l'instant qu'en 2 dimensions.

3. Méthode de localisation de molécules individuelles par les ondelettes

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2.3, les images de molécules individuelles acquises en microscopie de localisation sont contaminées par diverses sources de bruit. Cela limite la précision avec laquelle les molécules individuelles sont localisées. Un ensemble de techniques de filtrage existe dans la littérature afin de réduire le bruit dans les images de fluorescence. Néanmoins, leur efficacité est peu satisfaisante dans le cadre d'images de molécules individuelles, car elles affectent le signal et dégradent par conséquent la précision de localisation. Des techniques de filtrage adaptatif développées plus récemment ont prouvé leur efficacité à réduire le bruit tout en conservant le signal d'intérêt (Boulanger et al., 2008, Carlton et al., 2010). Mais elles nécessitent des temps de calculs très longs, ce qui reste encore incompatible avec la quantité massive de données à traiter par la microscopie de localisation, à savoir plusieurs dizaines de milliers d'images par cellule. Dans le cas spécifique des images de molécules individuelles, le signal détecté par une caméra CCD peut être séparé en deux niveaux spectralement distincts : le bruit, majoritairement présent dans les hautes fréquences, et le signal effectif de molécules individuelles. Cette signature spectrale spécifique, couplée à la dilution du signal, nous a naturellement guidés vers l'utilisation de techniques de multi-résolution (Starck et al., 1998, Baatz and Schäpe, 2000). La décomposition en ondelettes est l'outil mathématique adéquat pour ce genre de problématique.

Dans ce chapitre, nous présenterons une nouvelle approche de localisation de molécules individuelles basée sur la décomposition en ondelettes. En pratique, l'image initiale est décomposée en plusieurs images contenant chacune une partie de l'information initiale. L'objectif est d'isoler le signal provenant des molécules individuelles du bruit, afin de faciliter l'étape de segmentation et d'extraire les différentes statistiques de localisation.

Ce chapitre s'articule en trois sections. Dans la première, nous rappelons brièvement le cadre théorique de la décomposition en ondelettes et son application aux images de molécules individuelles. Puis nous évaluerons les différentes performances de notre méthode à travers des données de simulation. Enfin, nous exposerons des résultats obtenus à l'aide de notre méthode sur des données expérimentales.

3.1. Décomposition en ondelettes

L'analyse par ondelettes a été introduite au début des années 1980, principalement pour des applications d'exploration pétrolière. Depuis, les ondelettes n'ont cessé de se développer et de trouver de nouveaux champs d'application. Elles mettent à disposition un formalisme mathématique permettant de décomposer n'importe quel signal (ou image) en une série de « petites vaguelettes ». La théorie des ondelettes (Mallat, 1998) a fait ses preuves pour de nombreux type de données. Des algorithmes sont associés à ce formalisme et permettent de faire ces décompositions rapidement (Starck et al., 1998) .

3.1.1. La transformation de Fourier

La transformée de Fourier est une opération mathématique qui consiste à décomposer une fonction selon un spectre de fréquences. Elle transforme une fonction *f*, qui dépend du temps en une nouvelle fonction *F*, qui dépend de la fréquence. Cette nouvelle fonction exprime combien de sinus et de cosinus de chaque fréquence sont contenus dans la fonction initiale. N'importe quel signal périodique, même discontinu, peut se décomposer en une somme de fonctions trigonométriques (sinus et cosinus) de différentes fréquences. C'est ce qu'on appelle une série de Fourier. La transformée en ondelettes découle naturellement de la transformée de Fourier.

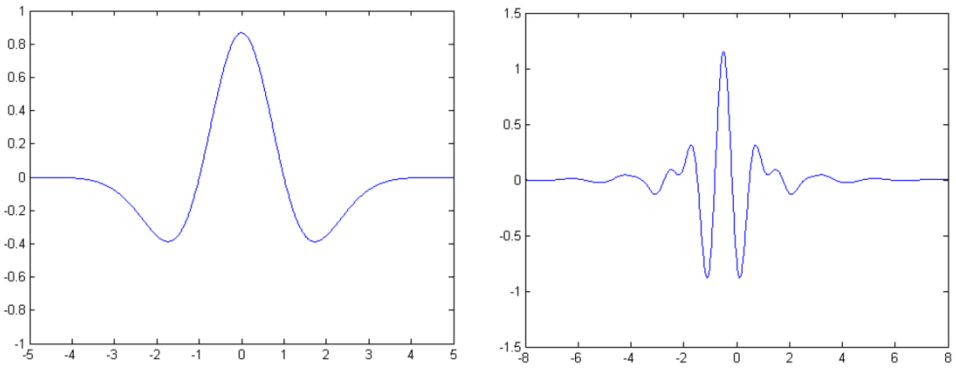
3.1.2. Définition d'une ondelette

Une ondelette (Mallat, 1998) est une fonction de $L_2(R)$ (espace de Hilbert) intégrable et suffisamment oscillante pour que son intégrale totale soit nulle. L'énergie d'une ondelette est idéalement contenue dans un intervalle fini, et l'ondelette est une fonction nulle en dehors d'un intervalle fini. Un grand nombre d'ondelettes existent, offrant une grande diversité d'analyse. La Figure 3-1 illustre deux ondelettes célèbres, le chapeau mexicain (Daubechies, 1992) et l'ondelette de Meyer (Meyer, 1990).

A partir d'une ondelette mère $\psi(x)$, on définit une famille d'ondelettes $\psi_{a,b}(x)$ par des opérations de dilatation et translation:

$$\psi_{a,b}(x) = \frac{1}{\sqrt{a}}\psi\left(\frac{x-b}{a}\right), \quad (a,b) \in R_+^* \times R \qquad 3\text{-}1$$

où *a* est le paramètre de dilatation et *b* le paramètre de translation.



A) Chapeau mexicain B) Meyer

Figure 3-1 : Exemples d'ondelettes

3.1.3. Décomposition en ondelettes continues

La transformée en ondelettes continues de la fonction f de L_2 (R^2) avec une famille d'ondelettes $\psi_{a,b}$ est écrite comme :

$$Wf(a,b) = \frac{1}{\sqrt{c_\psi}} \int \psi_{a,b}(x)\, f(x)\, dx, \quad (a,b) \in R_+^* \times R \qquad 3\text{-}2$$

où Wf est appelé coefficient d'ondelette à l'échelle a et la position b, et $1/\sqrt{(c_\psi)}$ est un facteur de normalisation. On peut assimiler cette transformée à une décomposition atomique dont les atomes sont issus d'une même fonction, l'ondelette mère, par opérations de translation et de dilatation. Ainsi, la fonction f peut être reconstruite à partir de coefficients d'ondelettes sans perte d'informations comme suit :

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{c_\psi}} \iint \frac{1}{|a^2|} Wf(a,b) \psi_{a,b}(x)\ da\, db, \quad (a,b) \in R_+^* \times R \qquad 3\text{-}3$$

3.1.4. Décomposition en ondelettes discrètes : algorithme à trous

La transformée d'ondelettes rapide (FWT) (Mallat, 1998) est l'algorithme le plus utilisé pour les signaux discrets et plus particulièrement pour les images. Elle se base sur un échantillonnage où le paramètre a est une échelle dyadique $a = 2^j, j \in Z$ et le paramètre de dilatation b devient $k.2^j, k \in Z$. Cela permet de garder seulement le minimum de coefficients d'ondelettes nécessaires pour la reconstruction du signal initial. Cette transformée n'est pas redondante, ce qui est souhaitable pour des applications telles que la compression d'informations. L'inconvénient majeur de cette transformée est qu'elle n'est pas invariante en translation. Pratiquement, considérons deux images de la même molécule individuelle avec un léger décalage, leur transformée sera différente.

Chaque plan d'ondelettes *j* représente un niveau de détail différent de l'image initiale. Pour une image de taille N^2, son premier plan d'ondelettes de FWT contient N^2 coefficients tandis que son deuxième plan est représenté seulement avec $N^2/4$ coefficients. Et comme le premier plan contient de hautes fréquences (majoritairement du bruit), les fréquences les plus basses, potentiellement des molécules individuelles, seront représentées par peu de coefficients d'ondelettes ce qui laisse place à des trous dans les plans supérieurs. Cela pourrait affecter la précision de localisation de molécules individuelles sachant que la représentation d'une molécule ne dépend pas de sa position dans l'image. L'algorithme à trous (Holschneider et al., 1990, Shensa, 1992) a été développé afin de contourner ces limites. Il utilise la même échelle dyadique que la décomposition FWT, par contre toutes les positions *b* sont conservées ce qui évite le sous-échantillonnage. Ainsi tous les plans d'ondelettes sont représentés par le même nombre de pixels que l'image initiale.

Une décomposition en ondelettes discrètes transforme l'image initiale *f(x, y)* en un ensemble de *n* plans d'ondelettes : $\{w_j(k)\}_{j=1,2,\dots,n}$. D'après l'échantillonnage de l'algorithme à trous et la discrétisation de la formule 3-2, ces plans s'écrivent :

$$w_j(k) = Wf(2^j, k) \qquad 3\text{-}4$$

Des images intermédiaires, appelées plans lissés $\{c_j(k)\}_{j=1,2,\dots,n}$, sont utilisées, représentant l'image initiale avec de moins en moins de détails. En effet, chaque plan lissé c_j correspond à l'image initiale lissée *j* fois. Elles sont utilisées afin de simplifier le calcul des plans d'ondelettes $w_j(k)$ à la résolution *j* et la position k selon les deux relations suivantes :

$$c_j(k) = \sum_l h(l) c_{j-1}(k + 2^{j-1} l) \qquad 3\text{-}5$$

$$w_j(k) = c_{j-1}(k) - c_j(k) \qquad 3\text{-}6$$

où *h* est un filtre discret passe-bas. Il est choisi de telle sorte qu'il soit séparable, c'est-à-dire $h_{2d} = h_{1d} * h_{1d}$. Cela permet de remplacer une convolution 2D par deux convolutions 1D successives, offrant ainsi une optimisation en termes du nombre de multiplications nécessaires pour la convolution par ce filtre. La discrétisation de la fonction échelle continue B-spline de troisième ordre (Starck et al., 1998), issue de l'ondelette chapeau mexicain (Figure 3-1A), donne le filtre 1D passe-bas suivant :

$$h = \left(\frac{1}{16} \ \frac{1}{4} \ \frac{3}{8} \ \frac{1}{4} \ \frac{1}{16}\right) \qquad 3\text{-}7$$

L'utilisation de cette ondelette dans l'algorithme à trous est parfaitement adaptée à la segmentation d'objets isotropes sur différents niveaux de détails (Racine, 2006), dont celui de molécules individuelles.

En pratique, le plan lissé c_0 est confondu avec l'image initiale. Le plan c_1 est obtenu par convolution entre c_0 et le filtre $h_1 = h$. c_2 est obtenu par convolution entre c_1 et le filtre $h_2 = (\frac{1}{16}\ 0\ \frac{1}{4}\ 0\ \frac{3}{8}\ 0\ \frac{1}{4}\ 0\ \frac{1}{16})$, qui est une version à trous du filtre h. La Figure 3-2 illustre le déroulement de la décomposition en ondelettes par l'algorithme à trous sur une image expérimentale de molécules individuelles. Seuls les trois premiers plans sont calculés.

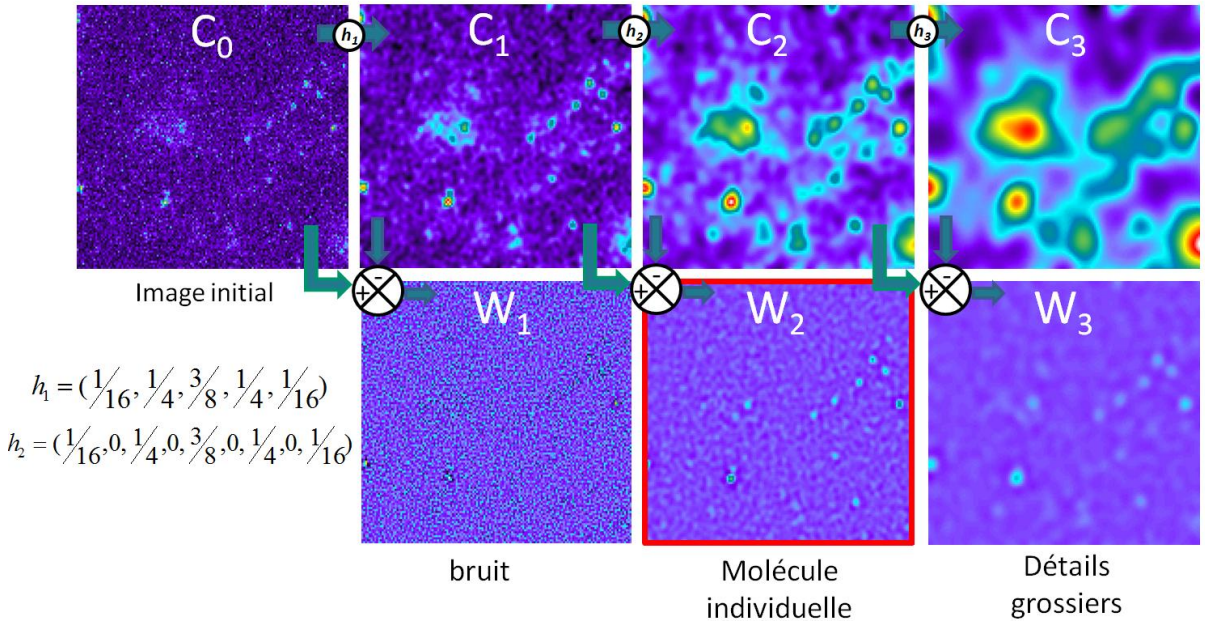


Figure 3-2 : Décomposition en ondelettes par l'algorithme à trous appliqué sur une image de molécules individuelles. Les plans intermédiaires C_j sont obtenus en lissant l'image initiale (C_0) j fois par un filtre à trous d'ordre j. Les plans d'ondelettes sont ensuite calculés selon la formule 3-6. Le deuxième plan d'ondelettes est employé pour la détermination des positions de molécules individuelles.

Il apparaît clairement sur l'exemple de la Figure 3-2 que le premier plan d'ondelettes w_1 contient majoritairement du bruit, alors que le second plan w_2 contient le signal de molécules individuelles. Les petits détails correspondant au signal de molécules individuelles disparaissent progressivement à partir du troisième plan.

L'ondelette va exalter les structures qui lui ressemblent dans l'image initiale ; si une partie de l'image ressemble à l'ondelette, ses coefficients d'ondelette vont être grands. A l'inverse, les parties de l'image qui ne ressemblent pas à l'ondelette vont être filtrées du fait de leurs faibles coefficients d'ondelettes.

L'algorithme à trous est suivi par d'autres étapes pour la segmentation et la détermination des coordonnées *(x, y)* de chaque localisation de molécules.

3.1.5. Segmentation par seuillage

Une fois le deuxième plan d'ondelettes calculé, une segmentation par seuillage est appliquée sur ce dernier. Généralement, nous utilisons un seuil variant entre 0.5 et 2 fois l'écart type du bruit de fond. Une estimation du bruit Gaussien peut être calculée automatiquement à partir de premier plan d'ondelettes (Donoho and Johnstone, 1995). Néanmoins, si le signal utile est « sparse », ou très dilué, critère indispensable pour la microscopie de super-résolution par localisation, l'écart type de l'image initiale est une bonne estimation du niveau de bruit et donc du seuil à utiliser. Les seuils utilisés pour la segmentation des images illustrées dans la 4ème colonne de la Figure 3-4 est de 0,5 fois l'écart type de l'image initiale. Cependant, lorsque le signal de molécules individuelles est très intense, il influence l'écart type du bruit dans l'image initiale et dans le 1er plan d'ondelettes, comme on peut le voir sur le SNR 10 de la Figure 3-4. Par conséquent, cela a pour effet de surestimer la valeur du seuil, ce qui réduit les performances de localisation aux molécules les plus intenses. Pour éviter ce biais, nous avons implémenté un algorithme itératif adapté de la méthode statistique du « sigma clipping ». Le seuil est ajusté dans le second plan d'ondelette en plusieurs itérations : la première itération consiste à calculer l'écart type de l'image initiale et à appliquer ce seuil sur l'image du second plan d'ondelette. Les pixels correspondant aux molécules les plus intenses seront sélectionnés. Dans les itérations suivantes, l'écart type est calculé uniquement sur les pixels de l'image sélectionnés avec le seuil de l'itération précédente, et ceci jusqu'à la dernière itération de l'algorithme. Cette méthode permet d'ajuster la détermination de l'écart type du bruit dans des régions de l'image ne contenant pas de signal de molécules individuelles. Sur nos données, qu'elles soient expérimentales ou simulées, cette méthode converge au bout de trois itérations. La Figure 3-3 illustre le déroulement de cet algorithme sur des données expérimentales au cours des trois itérations, détaillant l'évolution de l'écart type et du nombre de détections.

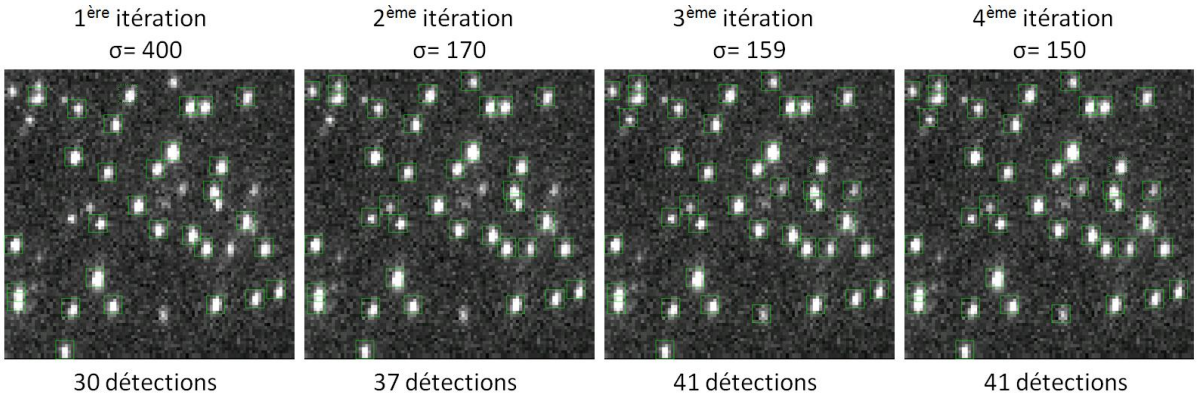


Figure 3-3 : Détermination automatique itérative du seuil de détection au cours des 4 premières itérations.

3.1.6. Algorithme de Watershed

La microscopie de super-résolution basée sur la localisation de molécules individuelles requiert un grand nombre de localisations afin de reconstruire une image de super-résolution. Pour la plupart des applications biologiques, et notamment l'étude sur cellules vivantes, il est crucial de réduire au maximum le temps total d'acquisition. Cela peut être réalisé de deux manières : (i) augmenter la fréquence d'acquisition et (ii) augmenter la densité de molécules dans l'état fluorescent. Plus la densité de molécules fluorescentes est élevée, plus la distance moyenne entre les molécules diminue. Le chevauchement de multiples PSF dû aux différentes molécules fluorescentes voisines va induire des erreurs dans la localisation. Quelques algorithmes existent dans la littérature afin de remédier à cette problématique de chevauchement (Holden et al., 2011, Huang et al., 2011). Nous avons choisi d'appliquer l'algorithme de ligne de partage des eaux (Watershed) (Vincent and Soille, 1991) sur le deuxième plan d'ondelettes, de manière à fragmenter les structures déjà segmentées par seuillage et composées de plusieurs particules. Le principe de cet algorithme est de faire croitre et grossir en parallèle des structures élémentaires (les minima locaux par exemple) jusqu'à la segmentation entière de l'image. L'idée consiste à considérer l'image comme une carte d'altitude qui se remplit d'eaux à partir de différentes sources placées dans les structures élémentaires. Les niveaux d'eau de toutes les sources vont monter progressivement et simultanément et on va placer au fur et à mesure des barrages (ou des lignes de partage des eaux) entre les différents bassins pour empêcher le mélange des eaux. Lorsque l'eau inonde toute la carte, les bassins représentent les structures segmentées.

En ce qui concerne le cas de molécules individuelles, l'algorithme de watershed n'est pas utilisé pour la segmentation mais dans le but d'améliorer la segmentation par ondelettes afin de fragmenter des structures contenant plus d'une particule.

Afin de pouvoir appliquer cet algorithme sur les coefficients d'ondelettes, ces derniers sont inversés de telle sorte que les pixels les plus intenses décrivent de basses altitudes. Puis, des minima locaux sont calculés sur le deuxième plan d'ondelettes seuillé et inversé. Ensuite, on fait grossir les structures de ces minima au sein des structurés déjà segmentées par le seuillage. Si une structure segmentée contient *n* minima locaux, alors elle contiendra potentiellement *n* particules. La sur-segmentation est un problème inhérent de l'algorithme watershed. Son application sur le second plan d'ondelettes limite la sur-segmentation due au bruit. Néanmoins, nous avons opté pour accompagner l'ensemble du processus de segmentation d'une étape de filtrage sur la taille des objets segmentés, garantissant que les particules issues de la segmentation possèdent une taille compatible avec la taille des molécules individuelles, soit au moins 4 pixels.

3.1.7. Calcul de barycentre

Après avoir appliqué la décomposition d'ondelettes et les algorithmes de seuillage et de watershed sur l'image de molécules individuelles, les coordonnées (x, y) de chaque particule sont déterminées en utilisant un algorithme de barycentre, ou centre de masse pondéré, sur l'ensemble des pixels du deuxième plan d'ondelettes contenus dans chaque structure segmentée.

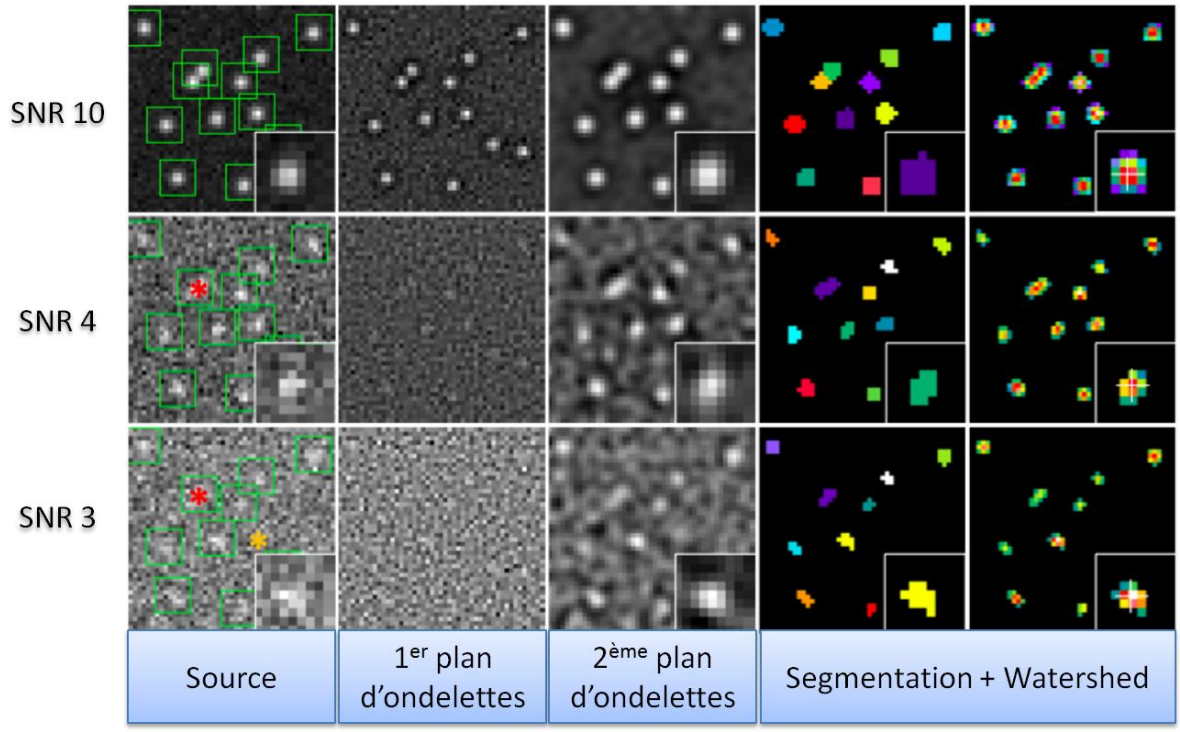


Figure 3-4 : Etapes de localisation de molécules individuelles pour différents niveaux de SNR. L'image initiale (1ère colonne) est d'abord décomposée en deux plans d'ondelettes. Ensuite, le seuillage (segmentation) et

l'algorithme watershed sont appliqués uniquement sur le 2ème plan d'ondelettes (3ème colonne) afin de déterminer les barycentres de chaque molécule détectée (5ème colonne).

3.2. Données de simulations

Afin d'évaluer les performances de notre approche basée sur la décomposition en ondelettes, nous avons réalisé plusieurs jeux de données de simulation réalistes.

- Un ensemble de coordonnées réelles (*x*, *y*) de sources ponctuelles isolées ont été générées aléatoirement dans un intervalle de (]1, 254[;]1, 254[), avec une intensité et une densité donnée.
- L'image est convoluée par une PSF 2D au profil Gaussien de sigma d'un pixel, soit une largeur à mi-hauteur (FWHM) de 2,3 pixels.
- Le signal résultant est ensuite échantillonné sur une matrice de 256x256 pixels, avec un pixel de 100 nm.
- Un fond constant est ajouté simulant le courant d'obscurité.
- Les images sont bruitées par une combinaison de bruit Gaussien et Poissonien (simulant respectivement le bruit de lecture et le bruit de photons).

Ces simulations ont été effectuées avec plusieurs valeurs de SNR (Kubitscheck et al., 2000) et densités de molécules : de 2,6 à 10,3 pour le SNR et de 0,1 molécule/µm^2 à 1 molécule/µm^2 pour la densité. Ces valeurs couvrent l'ensemble des conditions expérimentales rencontrées en imagerie de super-résolution par localisation. Les faibles valeurs de SNR reflètent les sondes fluorescentes à faible rendement quantique et les sondes photo-activables utilisées pour le suivi de particules individuelles (sptPALM) (Manley et al., 2008), deux cas où le nombre de photons détectés par particule par image est faible. Les fortes valeurs de SNR sont caractéristiques des fluorophores organiques utilisés en dSTORM. Pour chaque paire de valeurs de SNR et de densité, une série de 100 images a été générée. La Figure 3-5 illustre quelques exemples de données synthétiques pour différentes densités de particules et un SNR de 6.6 (Figure 3-5A) et pour plusieurs valeurs de SNR à densité constante de 0.1 molécule/µm^2 (Figure 3-5B). La Figure 3-5C montre des profils d'intensité de PSF de particules individuelles avec différents niveaux de bruit. A titre de comparaison, la valeur moyenne du SNR de nos données expérimentales de PALM représentées sur la Figure 3-11 est de 5,3.

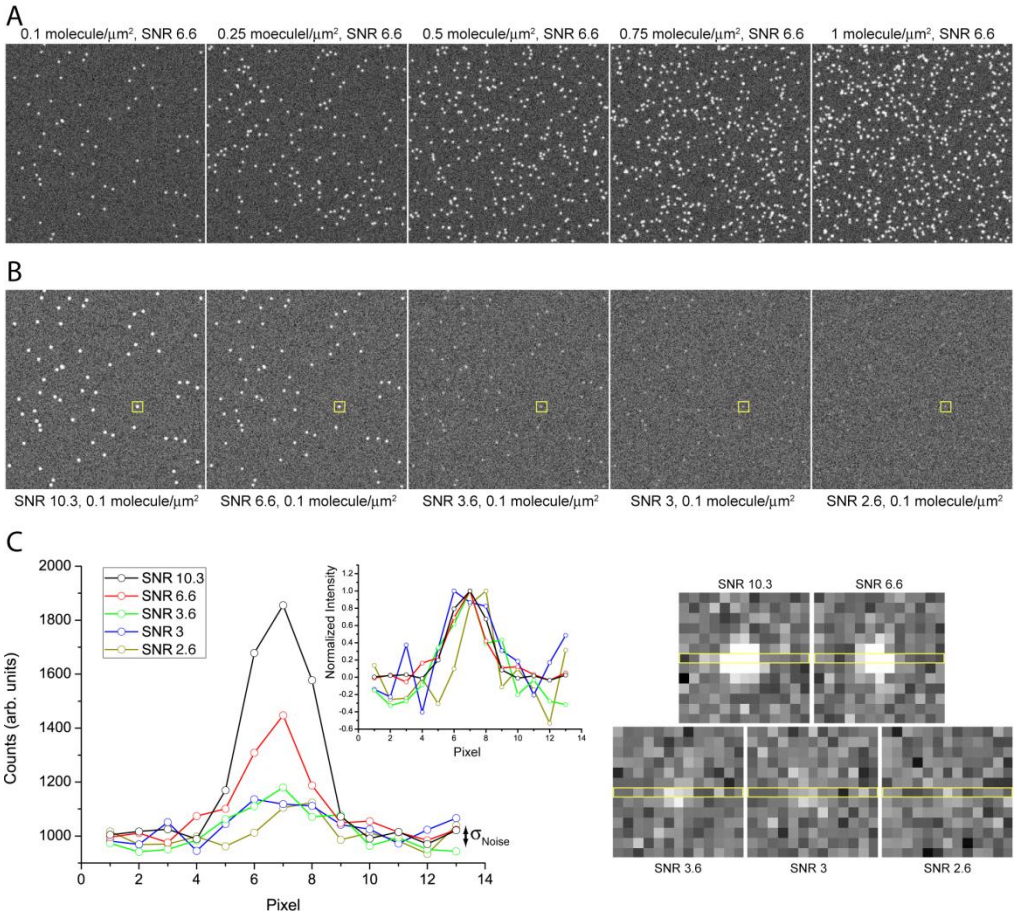


Figure 3-5 : Simulation de molécules individuelles. (A) Exemples d'images de molécules individuelles simulées avec un SNR constant de 6,6 et une densité de molécules variant entre 0,1 et 1 molécule/µm^2. (B) Exemples d'images de molécules individuelles simulées avec une densité de molécules constante de 0.1 molécule/µm^2 et un SNR variant entre 10,3 et 2,6. (C) Profils d'intensités normalisés d'une molécule individuelle (gauche) et les images brutes correspondant (droite) à différents niveaux de SNR.

Nous avons ensuite utilisé les images simulées pour comparer les performances de notre méthode de segmentation par ondelettes et l'algorithme MTT d'ajustement Gaussien (Serge et al., 2008) en termes de précision de localisation et de temps du calcul.

3.2.1. Précision de localisation

Nous avons calculé l'erreur de localisation en mesurant la distance euclidienne entre les coordonnées des particules simulées et les coordonnées de localisation les plus proches dans un voisinage de 1 pixel. Nous avons défini la précision de localisation comme la valeur moyenne de l'erreur calculée pour l'ensemble des détections et pour toutes les conditions de simulation (SNR et densité). La Figure 3-6 illustre les performances des deux méthodes de localisation en fonction du SNR et de la densité de molécules. Comme prévu, la précision de la localisation est inversement proportionnelle au SNR et à la densité. La précision de localisation avec les

ondelettes est comparable à celle de l'ajustement Gaussien, et seulement moins bonne de 10% en moyenne.

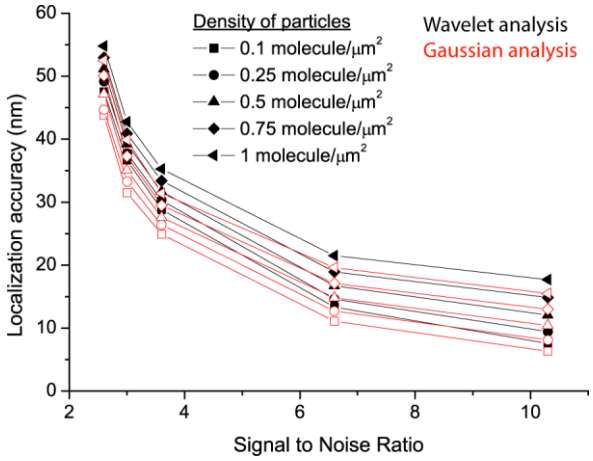


Figure 3-6 : Comparaison de la précision de localisation entre notre méthode de décomposition en ondelettes et l'algorithme d'ajustement Gaussien MTT. La précision de localisation est calculée comme l'erreur moyenne estimée sur toutes les positions de molécules détectées pour chaque condition de simulation. Elle est tracée en fonction du SNR pour plusieurs niveaux de densité de molécules.

La fiabilité de localisation est un autre critère d'évaluation important pour les algorithmes de localisation. Il s'agit de la capacité de l'algorithme à détecter des particules individuelles dans une image bruitée sans en manquer aucune ni induire de fausses détections. Lorsqu'une particule présente dans les données simulées n'a pas de détection correspondante dans les données analysées dans un rayon de 1 pixel (100 nm), elle est considérée comme un faux négatif. De même, un faux positif est défini lorsqu'une particule est présente dans les données analysées mais pas dans les données simulées dans un rayon de 1 pixel. La Figure 3-7 illustre le taux des faux positifs (A) et des faux négatifs (B) en fonction du SNR et de la densité. Cette figure montre que les taux de faux positifs et de faux négatifs sont similaires pour les deux algorithmes, et qu'ils dépendent fortement du SNR, sauf avec la méthode en ondelettes, où le taux de faux positifs reste relativement constant à densité donnée. Il faut noter également que le choix du seuil minimum pour la segmentation pourrait avoir un impact sur le taux de faux positifs et négatifs, sans compromettre les performances en termes de précision de localisation et de temps de calcul.

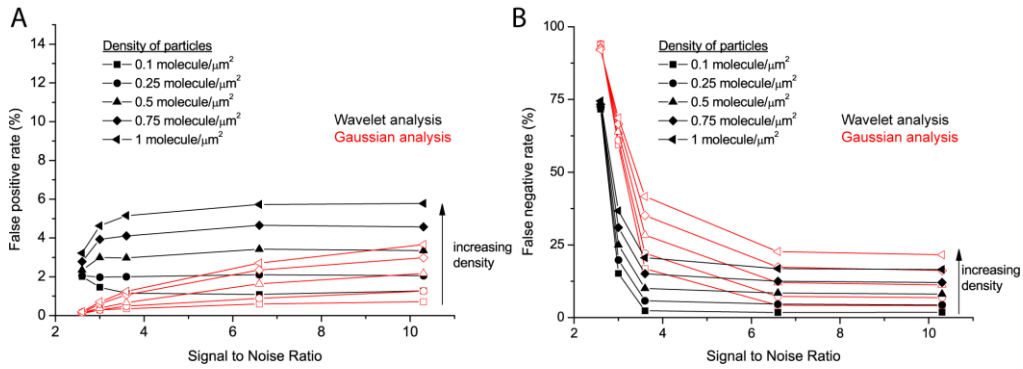


Figure 3-7 : Comparaison du taux de fausses détections entre la méthode de décompositon en ondelettes et l'ajustement Gaussien MTT. (A) Taux de faux positif en fonction du SNR pour plusieurs densités de molécules. (B) Taux de faux négatif en fonction du SNR pour plusieurs densités de molécule.

3.2.2. Temps d'analyse

Un élément majeur en imagerie cellulaire est la capacité d'obtenir des résultats dans le temps le plus court, idéalement pendant ou juste après l'acquisition. C'est particulièrement important dans les expériences sur cellules vivantes, où le temps effectif de l'expérience sous le microscope est limité afin de maintenir des conditions physiologiques optimales pour les échantillons. Un temps de traitement post-acquisition important peut limiter considérablement les applications de la super-résolution en biologie, nécessitant l'analyse quantitative de centaines de milliers de localisations par cellule, et plusieurs cellules par conditions biologiques. Avoir un retour directement pendant l'expérience permet à l'utilisateur de s'apercevoir au plus vite que l'expérience n'a pas fonctionné (pour des raisons qui peuvent être d'ordre biologique ou technique), de stopper l'acquisition en cours, de changer de lamelle et d'éviter de stocker et transférer des giga-octets de données pour les analyser plus tard alors qu'elles sont sans intérêt. En plus du confort d'utilisation, cela permet d'augmenter considérablement la production et la capacité à faire de l'imagerie de super-résolution en routine.

Nous avons effectué les analyses sur une station de Dell Precision T7500 (deux processeurs quad Intel Xeon E5520 2,26 GHz et une mémoire vive de 48 Go de RAM), en n'utilisant qu'un seul processeur. Une comparaison du temps de calcul entre notre méthode d'ondelettes et la méthode MTT révèle une amélioration du temps de calcul d'environ 20 fois. La Figure 3-8 montre le temps nécessaire pour l'analyse d'une série de 100 images, avec une large gamme de valeurs de SNR et de densités de particules. Ce gain en temps de calcul est constant quelles que soient les conditions de SNR et de densité. Le temps de calcul augmente pour les deux méthodes en fonction du SNR et de la densité de particules. Cela est dû au fait que les deux méthodes détectent plus de molécules quand le SNR et la densité augmentent.

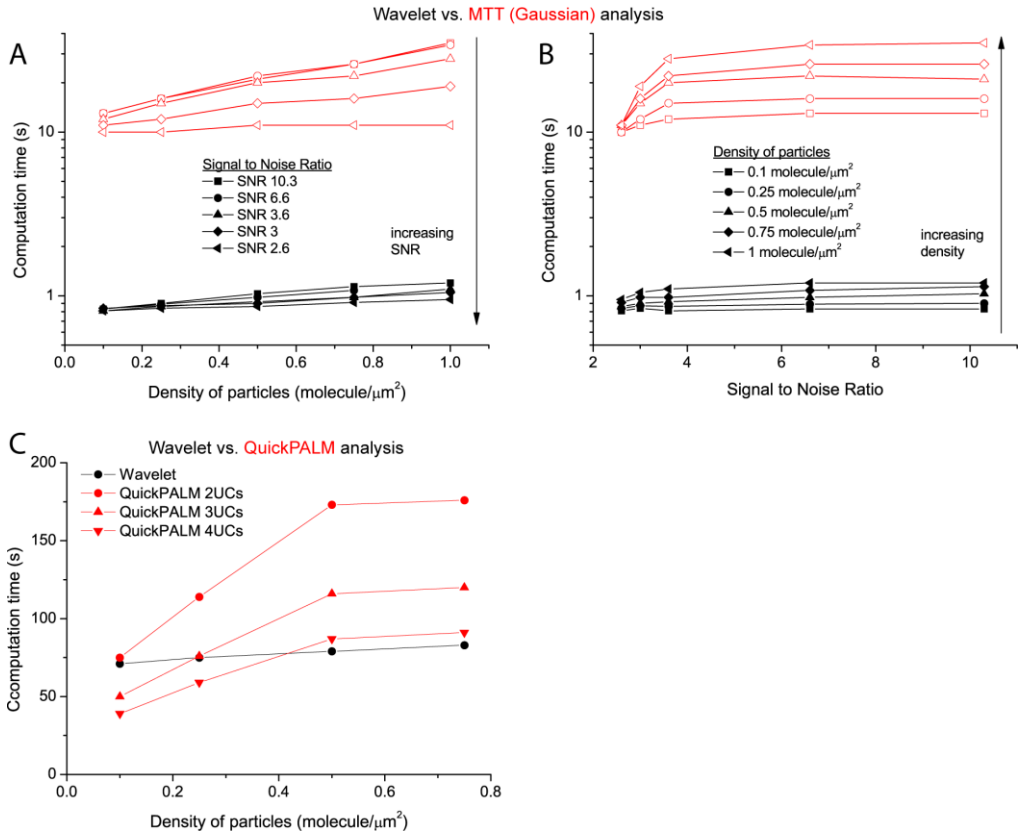


Figure 3-8 : Temps de traitement. (A-B) Comparaison des temps de traitement entre la méthode de décomposition en ondelettes et l'algorithme d'ajustement Gaussien MTT. Le temps total nécessaire pour la détection et la détermination des positions des molécules individuelles simulées sur une série de 100 images est représenté en fonction de la densité de molécule pour plusieurs niveaux de SNR (A), et en fonction du SNR pour plusieurs densités de molécules (B). (C) Comparaison entre la méthode de décomposition en ondelettes et le logiciel QuickPALM sur une série de 4000 images pour différentes densités de molécule. Entre deux et quatre processeurs CPU ont été utilisés avec QuickPALM.

Nous avons également comparé l'efficacité de notre méthode avec le logiciel QuickPALM (Henriques et al., 2010), algorithme rapide de référence. Cet algorithme se base sur une approche de multithreading, qui consiste à partitionner le programme en plusieurs tâches (threads) pouvant être traitées en parallèle, reliant ses performances au nombre de processeurs utilisés. Nous avons comparé les deux méthodes sur les mêmes données de simulation que celles utilisées ci-dessus, avec une densité de particules allant de 0,1 à 0,75 molécule/µm^2 et en utilisant 1 à 4 processeurs pour l'algorithme QuickPALM. Ces tests montrent que notre méthode est plus efficace pour des densités élevées (> 150 molécules par image), même avec l'utilisation de quatre processeurs par le QuickPALM. Pour des densités faibles (< 150 molécules par image), les deux algorithmes montrent des performances similaires, avec une variabilité en fonction du nombre de processeurs utilisés. Il est à noter que notre algorithme utilise un seul processeur, même avec une architecture multiprocesseur. Néanmoins, étant donné que dans notre

segmentation par ondelettes les images sont traitées indépendamment les unes des autres, une implémentation multithreading reste envisageable.

3.2.3. **Fonction MTF**

Afin de caractériser davantage les résultats représentés ci-dessus, nous avons généré un motif de test composé de bandes alternatives noires et blanches de largeur variant entre 6 nm et 200 nm (Figure 3-9A). Cette approche est utilisée en radiologie pour déterminer la résolution de systèmes d'imagerie à rayons X (Sprawls, 1995). Nous avons simulé et analysé quatre configurations différentes de molécules individuelles où les bandes blanches sont remplies par des molécules individuelles avec différents paramètres de SNR et de densité (Figure 3-9B). L'intérêt de l'utilisation de ce motif est tout d'abord d'avoir un aperçu visuel des résultats de localisation et d'autre part de pouvoir calculer la fonction de transfert de modulation (MTF) à partir de l'image de super-résolution reconstruite, ce qui permet d'estimer la résolution sans disposer du jeu de données de simulation. La fonction MTF(f) est calculée pour chaque fréquence f du motif test comme le rapport C(f)/C(0), où C(f) est le contraste d'intensité de la fréquence f et C(0) est le contraste maximal obtenu pour la plus faible fréquence. Dans la Figure 3-9C, la fonction de contraste est représentée à gauche et la fonction MTF(f) à droite, cela pour les différentes configurations de simulation. La résolution de l'image est alors estimée comme l'inverse de la fréquence de coupure (f_c), obtenue pour MTF(f_c) = 0.

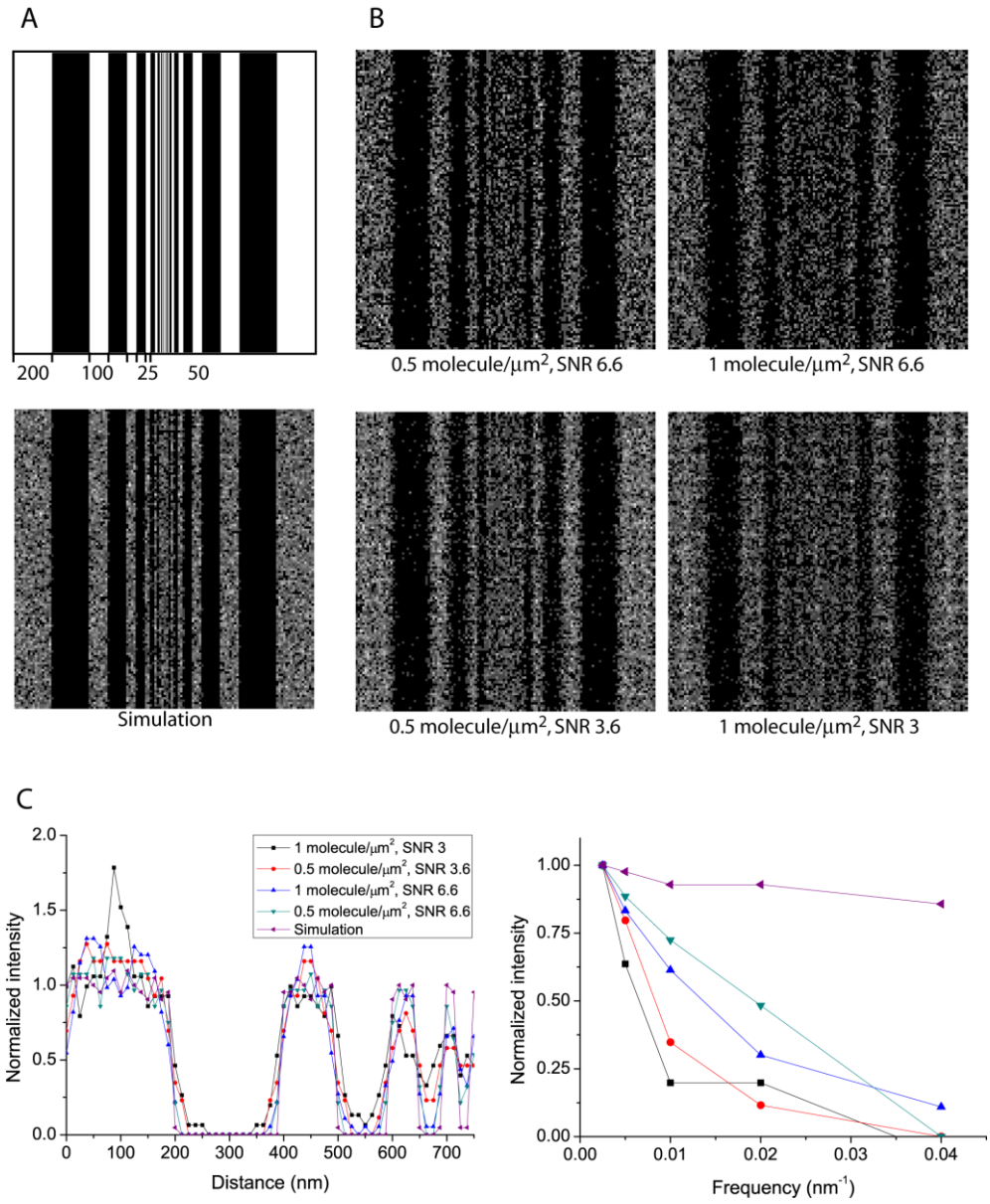


Figure 3-9 : Simulation dans un motif test formé de bandes verticales alternatives de largeur comprise entre 200 nm (périphérie) et 6 nm (centre). (A) Motif simulé, idéal (en haut) et reconstruit à partir des données de localisation simulées (bas). (B) Reconstructions avec la méthode de décomposition en ondelettes pour différents SNR et densités de molécules. (C) Fonctions de contraste reconstruites à partir des reconstructions (gauche) et leurs fonctions de transfert (droite).

La fonction MTF confirme le fait que la réduction du SNR et l'augmentation de la densité de particules à partir d'une configuration optimale (densité de 0,5 molécule/µm^2 et un SNR de 6.6, où la résolution mesurée est estimée à environ 25 nm) réduisent la résolution de l'image de super-résolution. Ceci est illustré par une perte de contraste pour les lignes de 50 nm, voire de 100 nm dans le cas d'une densité de 1 molécule/µm^2 et d'un SNR de 3. En plus de son aspect visuel, cette représentation est complémentaire à la simulation précédente et ne nécessite pas la connaissance de coordonnées de molécules détectées, ce qui la rend plus adaptée pour tout

utilisateur qui désire tester les performances d'un algorithme donné. En outre, elle permet également la quantification de l'effet de la densité de molécules détectées sur la résolution, connue pour être cruciale en microscopie de super-résolution de localisation (Figure 3-10). Même si cet aspect n'a pas été quantifié dans cette étude, il montre que, pour une résolution donnée, un nombre insuffisant de localisations affecte la fonction MTF de l'image simulée et donc la résolution.

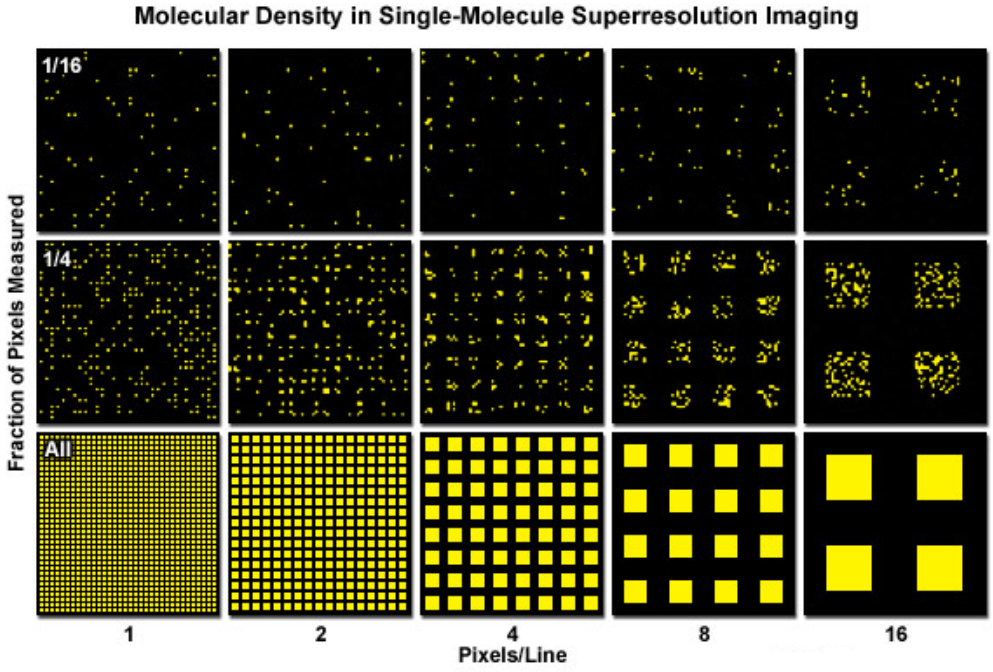


Figure 3-10 : Résolution VS. densité de localisation. Les images sont reconstruites en variant la résolution (colonnes) et la densité (lignes). Cette figure illustre le lien fondamental entre la résolution et la densité de molécules. Plus de résolution nécessite plus de densité, ce qui implique un temps d'acquisition plus long. Un compromis doit être fait entre la résolution spatiale et la durée d'acquisition afin d'optimiser la reconstruction. (Shroff et al., 2008).

Enfin, pour chaque condition, nous avons effectué une interpolation linéaire de la fonction MTF en utilisant seulement les premiers points où MTF(f)> 15% (seuil au-dessous duquel le contraste est trop bruité pour être significatif) pour le calcul de la fréquence de coupure. Les résultats, résumés dans le Tableau 3-1, sont en accord avec les résolutions calculées précédemment à partir des coordonnées de simulation.

	SNR 10,3	SNR 6,6	SNR 3,6	SNR 3	SNR 2,6
0,1 molécule/µm²	9,2 nm	13,4 nm	28,9 nm	37,2 nm	47,6 nm
0,25 molécule/µm²	10,8 nm	14,7 nm	30,3 nm	38,1 nm	49 nm
0,5 molécule/µm²	13,2 nm	17 nm (11,9 nm)	31,8 nm (20,4 nm)	39,6 nm	50,3 nm
0,75 molécule/µm²	15,7 nm	19,4 nm	33,4 nm	40,9 nm	51,9 nm
1 molécule/µm²	18,4 nm	22,2 nm (15,6 nm)	35,4 nm	42,4 nm (35,7 nm)	54,8 nm

Tableau 3-1 : Résumé de la précision de localisation obtenue avec notre méthode de localisation par ondelettes pour l'ensemble des simulations, pour différents SNR et densités de molécules. Les valeurs entre parenthèses représentent la précision de localisation déterminée par la fréquence de coupure de la fonction MTF.

3.3. Données expérimentales

L'évaluation à partir de ces données de simulation a montré que l'approche de localisation par les ondelettes ne compromettait pas la précision de localisation ni le nombre de particules détectées, comparativement à la méthode de référence de l'ajustement Gaussien, tout en divisant le temps par 20.

Nous avons comparé les performances des deux algorithmes sur des données expérimentales. Pour cela, nous avons effectué des expériences d'imagerie PALM sur des neurones dissociés d'hippocampe de rat exprimant l'actine fusionnée à la protéine fluorescente photo-convertible ABP-tdEosFP. La Figure 3-11A (gauche) montre l'image basse-résolution limitée par la diffraction, obtenue par l'acquisition de la forme pré-convertie des fluorophores. L'image de super-résolution a été obtenue à partir de l'acquisition de 50000 images de 50 msec chacune (soit 42 min d'acquisition). Nous avons ensuite analysé les données brutes avec les deux algorithmes et reconstruit les images de super-résolution (Figure 3-11A milieu et droite).

Les deux algorithmes ont localisé un nombre de molécules équivalent, soit 1 058 886 et 1 092 266 spots détectés respectivement par les ondelettes et le MTT. Le temps total de calcul était seulement 7,7 minutes avec l'approche des ondelettes, contre 116 minutes avec l'algorithme d'ajustement Gaussien. Les images de super-résolution reconstruites ne montrent aucune différence significative. La Figure 3-11B montre la comparaison des profils d'intensités dans l'axe perpendiculaire à la dendrite entre l'image basse résolution et les reconstructions de super-résolution effectuées avec les deux algorithmes. Nous avons ensuite analysé le SNR des fluorophores détectées dans une région contenant une seule épine dendritique (Figure 3-11C). Dans cette région, un nombre total de 45878 spots individuels ont été détectés à partir de 50000 images en utilisant l'algorithme de segmentation par ondelettes.

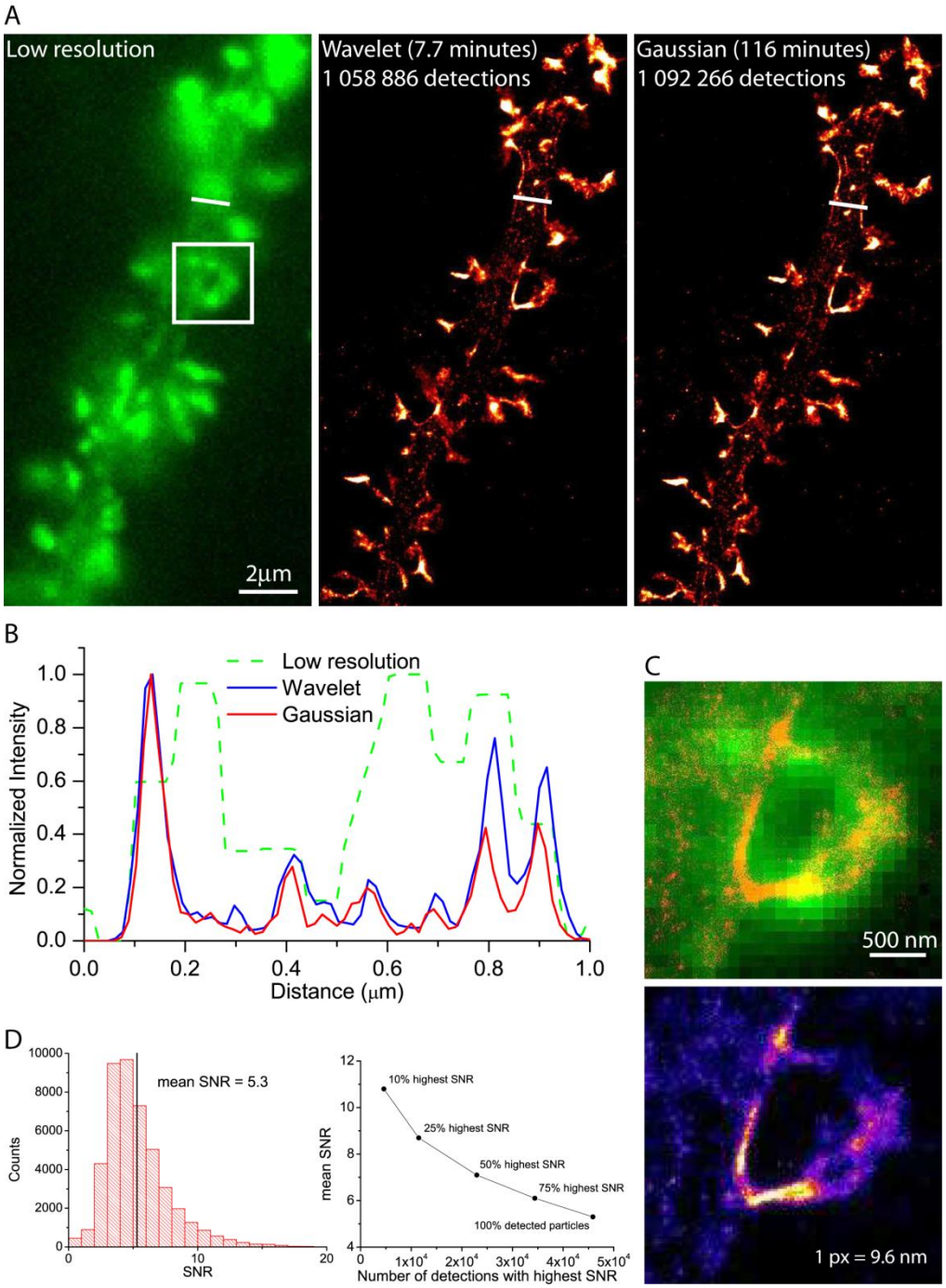


Figure 3-11 : Données expérimentales issues de la microscopie PALM. (A) Images d'épifluorescence (gauche) et de super-résolution (centre et droite) de neurones dissociées d'hippocampe de rat exprimant l'actine fusionnée à la protéine fluorescente photo-convertible ABP-tdEosFP. 50000 images de molécules individuelles ont été analysées ; l'analyse avec la méthode d'ondelettes a pris 7,7 minutes et a localisé 1058886 molécules. L'ajustement Gaussien, quant à lui, a nécessité 116 minutes et a localisé 1092266 molécules. (B) Comparaison des profils d'intensité de la branche de dendrite sélectionnée sur les images (A) (indiqué par la ligne blanche). (C) Région de 2,65 x 2,65 µm^2 sélectionnée dans (A) contenant une épine dendritique où 45878 molécules individuelles ont été détectées avec la méthode d'ondelettes. En haut, les particules détectées sont superposées avec l'image de diffraction ; en bas l'image de super-résolution reconstruite est affichée avec un pixel de 9.6 nm, où chaque localisation est représentée par un pixel d'intensité unitaire. (D) Histogramme des SNR calculé pour les fluorophores détectés dans cette région et les valeurs moyennes de SNR pour 10%, 25%, 50%, 75%, et 100% de détections.

L'histogramme du SNR (Figure 3-11D) montre son hétérogénéité pour l'ensemble des molécules, avec une moyenne d'environ 5,3 correspondant à une résolution moyenne de l'ordre de 30 nm en se référant aux résultats de simulation. On pourrait être tenté d'augmenter la résolution de l'image reconstruite en filtrant les localisations en fonction du SNR et en ne conservant que les localisations les plus précises. Néanmoins, appliquer un tel filtrage se ferait aux dépens de la densité de localisation, paramètre également important dans le processus de reconstruction d'images, comme discuté en 3.2.3.

3.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons proposé une nouvelle approche pour la localisation 2D de molécules individuelles, basée essentiellement sur la décomposition d'ondelettes. Nous avons opté pour l'algorithme à trous pour ses performances et ses capacités à séparer efficacement le signal de molécules individuelles du bruit. La combinaison avec l'algorithme de watershed permet de mieux séparer les particules proches les unes des autres. Nous avons ensuite comparé notre approche avec la méthode de référence de l'ajustement Gaussien sur des données simulées et expérimentales. L'évaluation des deux approches a été réalisée principalement selon deux critères : la précision de localisation et le temps traitement. Notre approche a des performances de localisation très similaires à l'ajustement Gaussien tout en étant environ 20 fois plus rapide. Cela permet d'obtenir des temps de calcul inférieurs aux temps d'acquisition, ce qui rend une implémentation en temps réel possible.

4. Localisation de molécules uniques et reconstruction en temps réel

La reconstruction d'une seule image en microscopie de super-résolution de localisation requiert l'acquisition d'une dizaine de milliers d'images de molécules individuelles, à partir desquelles plusieurs centaines de milliers de molécules individuelles doivent être localisées. Par conséquent, même avec l'utilisation d'algorithmes rapides, comme la décomposition en ondelettes présentée dans le chapitre précédent, ces traitements peuvent encore nécessiter une dizaine de minutes de calcul par cellule. De plus, la microscopie de localisation a l'énorme avantage de pouvoir déterminer la position axiale des molécules avec des précisions de quelques dizaines de nanomètres (voir 2.3.3). Néanmoins, cette étape ne peut être utilisée par une méthode de barycentre comme la méthode en ondelettes, et nécessite en général l'utilisation de l'ajustement Gaussien, très lourd en temps de calcul.

Malgré les efforts importants déployés par la communauté pour réduire le temps de calcul, ces travaux restent limités au traitement post-acquisition, où les étapes d'acquisition et de localisation sont dissociées l'une de l'autre. Cela implique dans la pratique que l'expérimentateur doit travailler en trois étapes :

- Dans un premier temps, il doit faire l'acquisition d'images de molécules individuelles sur microscope, soit typiquement de l'ordre de 2,5 Go par cellule pour 20000 images.
- Dans une seconde étape, il doit transférer sur un poste d'analyse toutes les données acquises après chaque séance de microscopie, ce qui peut représenter plusieurs dizaines de Giga-octets pour quelques heures d'enregistrement.
- Enfin, il doit charger séquentiellement toutes ces données sur un ordinateur d'analyse pour effectuer la localisation et la reconstruction. Dans le meilleurs des cas, il dispose d'un système de traitement par lots, ou batch, lui permettant de traiter automatiquement toutes les données, soit plusieurs heures de calcul pour un minimum de temps passé devant l'ordinateur. Malheureusement, la majorité des logiciels n'offrent pas l'accès à ces modalités de traitement par lot, alourdissant considérablement le temps passé à l'ordinateur à traiter les séquences d'images les unes après les autres.

Dans ce chapitre, nous allons présenter une nouvelle méthode basée sur l'utilisation des processeurs des cartes graphiques (les GPU pour Graphics Processing Unit) pour la localisation et la reconstruction en temps réel des images en 2 et 3 dimensions.

Ce chapitre est composé de trois sections. Dans la première, nous présenterons un bref aperçu sur les processeurs graphiques GPU, leur architecture ainsi que leur utilisation. Dans la deuxième, nous exposerons notre module de localisation temps-réel WaveTracer. En outre, nous détaillerons les différentes optimisations faites pour la localisation latérale et axiale. Enfin, dans la dernière section, nous comparerons notre méthode avec deux autres méthodes qui font référence dans la littérature à l'aide d'un nouveau jeu de données de simulation.

4.1. GPGPU

Une carte graphique programmable peut ne pas être exploitée uniquement dans le domaine du graphisme car, en plus de sa fonction graphique, elle possède une fonction calculatrice (Erik, 2008). En effet, étant donné que les GPU dernière génération ont une architecture extrêmement parallèle, étant composés de plusieurs centaines de processeurs indépendants (chacun ayant ses propres ressources), ils peuvent être considérés comme une unité de calcul très puissante servant même à alléger le CPU (Central Processor Unit). Ce nouveau domaine, appelé GPGPU, vise à répondre à la question suivante : « comment utiliser la carte graphique comme coprocesseur ? ». Plus d'informations sur ce sujet se trouvent sur le site www.gpgpu.org.

Grâce à la croissance quasi-exponentielles des performances des cartes GPU depuis le début des années 2000 (Figure 4-1), plusieurs domaines scientifiques y ont eu recours pour accélérer les temps de calcul tels que : les simulations nucléaires ou climatiques, la physique, la finance et les sciences du vivant. Les GPU représentent une solution de calcul simple et efficace avec un très bon rapport performances/prix, on peut trouver des cartes GPU très performantes à des prix ne dépassant pas 1000 euros.

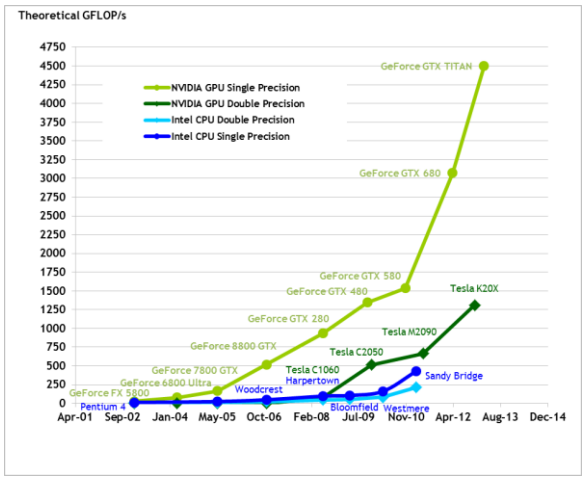


Figure 4-1 : Evolution des performances du GPU par rapport à celle du CPU. (http://docs.nvidia.com/cuda/cuda-c-programming-guide/index.html).

4.1.1. Architecture du GPU

Les cartes GPU ont une architecture matérielle SIMD (Single Instruction Multiple Data) ; la même instruction est exécutée simultanément à plusieurs données. L'ensemble des processeurs du GPU est organisé en plusieurs étages multiprocesseurs, comportant chacun le même nombre de processeurs. Chaque processeur est doté d'une mémoire rapide et tous les processeurs du même étage multiprocesseurs partagent une mémoire locale. Une mémoire globale, plus grande et moins rapide que les autres types de mémoire, est accessible par tous les processeurs. La Figure 4-2 illustre cette architecture. A titre d'exemple, la carte graphique Nvidia GeForce GTX 780 comporte 2304 processeurs et 3 Go de mémoire.

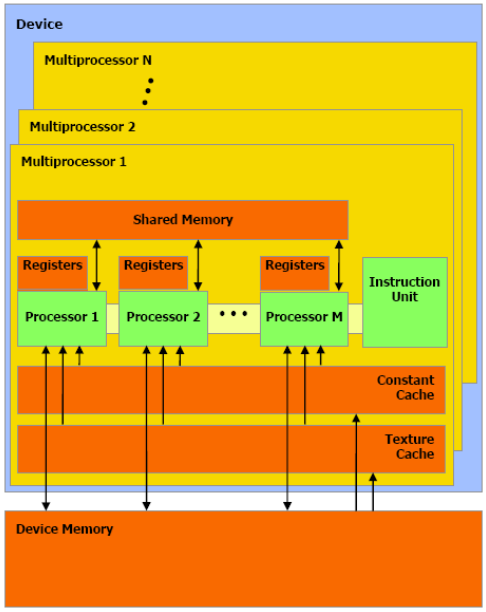


Figure 4-2 : Architecture d'un GPU.

4.1.2. CUDA

La société de processeurs graphiques Nvidia a conçu un langage de programmation de GPGPU pour ses propres cartes graphiques, appelé CUDA. CUDA est une architecture logicielle pour la gestion et le lancement de calculs parallèles sur GPU.

Un calcul porté sur GPU est vu comme étant une grille de blocs dont chacun est divisé en une matrice de processus parallèles (ou threads) comme illustré sur la Figure 4-3. Un thread correspond au traitement à appliquer sur les données chargées en mémoire globale du GPU. Ainsi, plusieurs centaines de threads peuvent être exécutées simultanément grâce à l'architecture matérielle massivement parallèle du GPU.

Il est important de préciser que tous les d'algorithmes ne sont pas adaptés au portage sur GPU. L'algorithme doit être de type local, c'est-à-dire que les traitements effectués sur différentes données doivent être les plus indépendants possible les uns des autres. L'opération de convolution en est le parfait exemple : le calcul de la valeur d'un pixel est complètement indépendant du calcul des autres pixels de l'image. Elle se prête par conséquent parfaitement à une implémentation GPU.

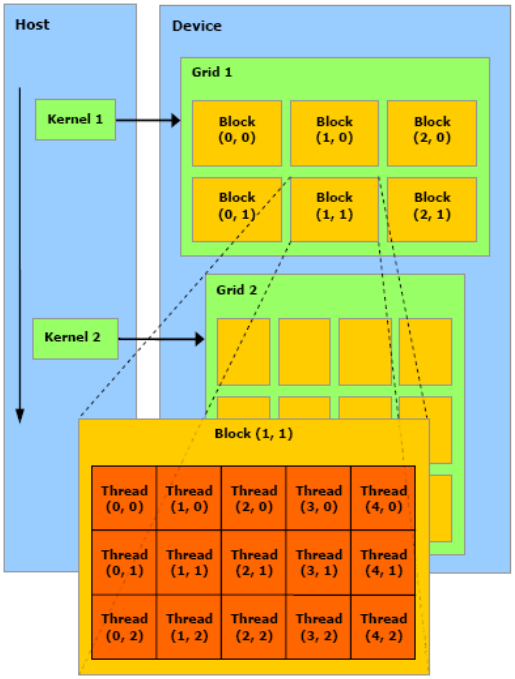


Figure 4-3 : Structure d'un programme sur GPU.

4.2. WaveTracer : une nouvelle méthode logiciel pour le traitement temps-réel des données de localisation

Grâce aux performances obtenues avec notre approche de localisation de molécules individuelles par la décomposition en ondelettes, l'analyse et la reconstruction de l'image super-résolution en temps réel sont maintenant possibles. En effet, le temps pour traiter une image de molécules individuelles est compatible avec la cadence des caméras rapides modernes EMCCD. Dans l'exemple du chapitre 3.3, il a fallu seulement 7,7 minutes sur un ordinateur conventionnel pour traiter les 50000 images acquises en 40 minutes à la cadence de 20 images par seconde. Par conséquent, même en augmentant la cadence d'acquisition par 5 (soit 100 images par secondes), le temps de calcul reste inférieur au temps d'acquisition. Il devient alors envisageable de traiter les données en parallèle avec le processus d'acquisition.

Nous avons développé une solution logicielle, baptisée WaveTracer qui permet la localisation et la reconstruction en temps réel d'images de super-résolution en 2 et 3 dimensions. Notre logiciel a été conçu comme un module additionnel du logiciel MetaMorph, édité par la société américaine Molecular Devices (http://www.moleculardevices.com/). En pratique, la localisation de molécules et la reconstruction sont réalisées en parallèle de l'acquisition, ce qui offre aux expérimentateurs un suivi temps-réel de l'acquisition de données de super-résolution, un confort de travail et un gain de temps considérable. Nous avons tiré profit du calcul temps réel pour implémenter également un contrôle automatique de l'intensité lumineuse du laser de photoconversion afin de garantir une densité optimale de molécules tout au long de l'acquisition. Ce nouveau logiciel tire profit de l'architecture massivement parallèle des GPU, qui permet d'optimiser le temps de calcul de l'étape de localisation latérale et rend possible la localisation axiale directement sur le microscope sans nécessiter d'étape de traitement post-acquisition. Si nécessaire, seules les coordonnées et informations relatives aux localisations peuvent être sauvegardées, réduisant considérablement l'espace disque.

Pour résumer, le module WaveTracer offre une optimisation en temps (pas de traitement post-acquisition), en espace disque (pas d'images sauvegardées) et permet l'optimisation des paramètres d'acquisition, tout en offrant à l'expérimentateur un retour en temps-réel sur l'observation en cours.

4.2.1. Principe

Nous avons mis en œuvre un système optimisé pour la microscopie super-résolution 2D en temps réel, c'est-à-dire que les étapes de localisation et de reconstruction sont effectuées en parallèle avec l'acquisition. Ces étapes sont suivies, si besoin, par un traitement post-acquisition pour la reconstruction 3D. Les statistiques calculées pendant la localisation en temps réel permettent un contrôle automatique de la puissance du laser de photoconversion au cours de l'acquisition, dans le but d'optimiser la densité de molécules fluorescentes et de compenser le photoblanchiment. La Figure 4-4A illustre comment l'intensité laser (en bleu) est ajustée à chaque fois que le nombre de molécules (en vert) descend en-dessous d'une limite inférieure (en rouge). L'organigramme de notre implémentation est détaillé dans la Figure 4-4B, dont les deux principales étapes sont listées ci-dessous :

- Les images sont analysées et reconstruites en temps-réel en utilisant l'algorithme de décomposition en ondelettes décrit dans le chapitre 3. Nous l'avons optimisé en optant pour une implémentation hybride CPU/GPU. Si la localisation 3D est requise,

les positions et les intensités de toutes les molécules localisées sont stockées en mémoire vive.

- La localisation 3D basée sur l'astigmatisme est effectuée juste après la fin de l'acquisition par l'ajustement d'une fonction Gaussienne anisotrope sur une région de 7x7 pixels centrée autour de chaque molécule localisée en 2D. L'ajustement Gaussien s'effectue en parallèle sur la carte GPU.

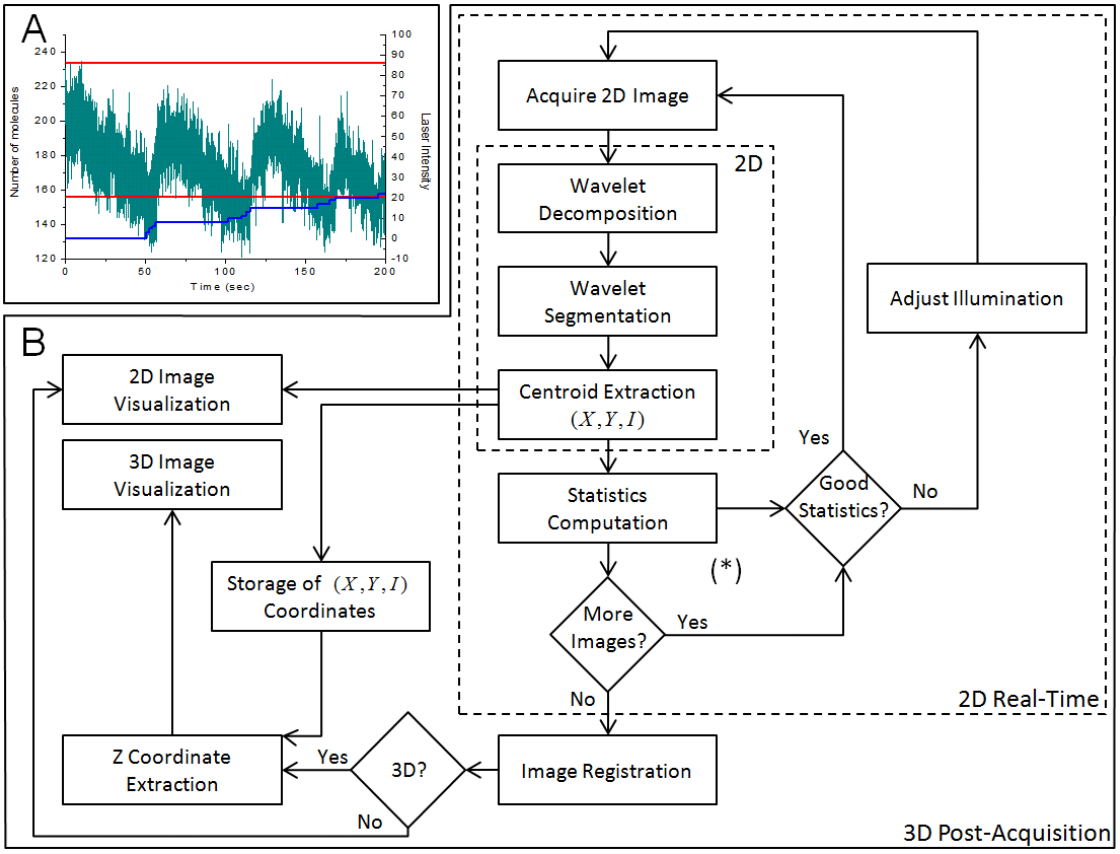


Figure 4-4 : Architecture du logiciel WaveTracer. (A) Graphe illustrant le contrôle automatique en temps-réel du nombre de molécules détectées par image. Le nombre de localisations (ligne verte) fluctue entre un maximum et un minimum (ligne rouge) définis par l'utilisateur. Il est contrôlé par le laser 405 nm (ligne bleue). Lorsque le nombre de molécules localisées dépasse l'intervalle défini par seuils, la puissance du laser est ajustée automatiquement afin de maintenir une densité de molécules idéale. (B) Organigramme du système de reconstruction en temps-réel pour la microscopie de super-résolution. La localisation 2D est effectuée en temps-réel accompagnée par un contrôle automatique du laser en se basant sur les statistiques calculées au cours de l'acquisition. La détermination des coordonnées axiales est faite à la fin de l'acquisition. Si un marqueur fiduciaire est présent dans l'échantillon, il sera suivi sur toutes les images acquises afin de corriger la dérive éventuelle des coordonnées de molécules individuelles dans l'image finale de super-résolution.

L'implémentation détaillée de ces deux étapes ainsi que du flux de données sont décrits dans les deux sections suivantes.

4.2.2. Localisation latérale en temps-réel

Pendant le processus d'acquisition, les images sont stockées temporairement dans la mémoire tampon de la caméra CCD (Figure 4-5(1)). En mode streaming, chaque image reste dans cette mémoire tampon pendant un temps court correspondant au temps d'exposition de caméra (soit moins de 20 msec en pratique). Puis, cette image est transférée dans un espace mémoire dédié de l'ordinateur et remplacée par l'image acquise suivante. Par conséquent, l'accès, le traitement et la visualisation des images doivent se faire pendant ce court intervalle de temps pour être réalisés en temps-réel.

La Figure 4-5 détaille l'implémentation de notre logiciel WaveTracer pour la localisation 2D et la reconstruction en temps-réel, dont les principales étapes sont listées ci-dessous :

(1) L'image est acquise par la caméra CCD
(2) L'image dans la mémoire tampon est transférée à la mémoire globale du GPU.
(3) L'image est divisée en petites régions de 16x16 pixels avec un léger chevauchement.
(4) La décomposition en ondelettes est effectuée en parallèle sur chaque région 16x16. L'algorithme à trous pour la décomposition en ondelettes discrètes que nous appliquons utilise des convolutions 1D sur 5 pixels où chaque pixel peut être calculé indépendamment des autres pixels. Cette étape d'ondelettes est donc bien adaptée à l'architecture massivement parallèle du GPU.
(5) Une fois la décomposition en ondelettes réalisée, le deuxième plan d'ondelettes est reconstruit à partir des sous-images et transféré dans la mémoire du CPU.
(6) Le seuillage et l'algorithme de watershed sont appliqués afin d'identifier les molécules potentielles et de séparer des molécules adjacentes. Les coordonnées de localisation et l'intensité de chaque molécule détectée sont ensuite extraites après le calcul du barycentre de chaque région segmentée.
(7) La liste de molécules localisées est stockée en mémoire et est utilisée pour la reconstruction 2D en temps-réel de l'image de super-résolution. Si nécessaire, la liste des coordonnées est conservée jusqu'à la fin de l'acquisition pour la reconstruction post-acquisition 3D.

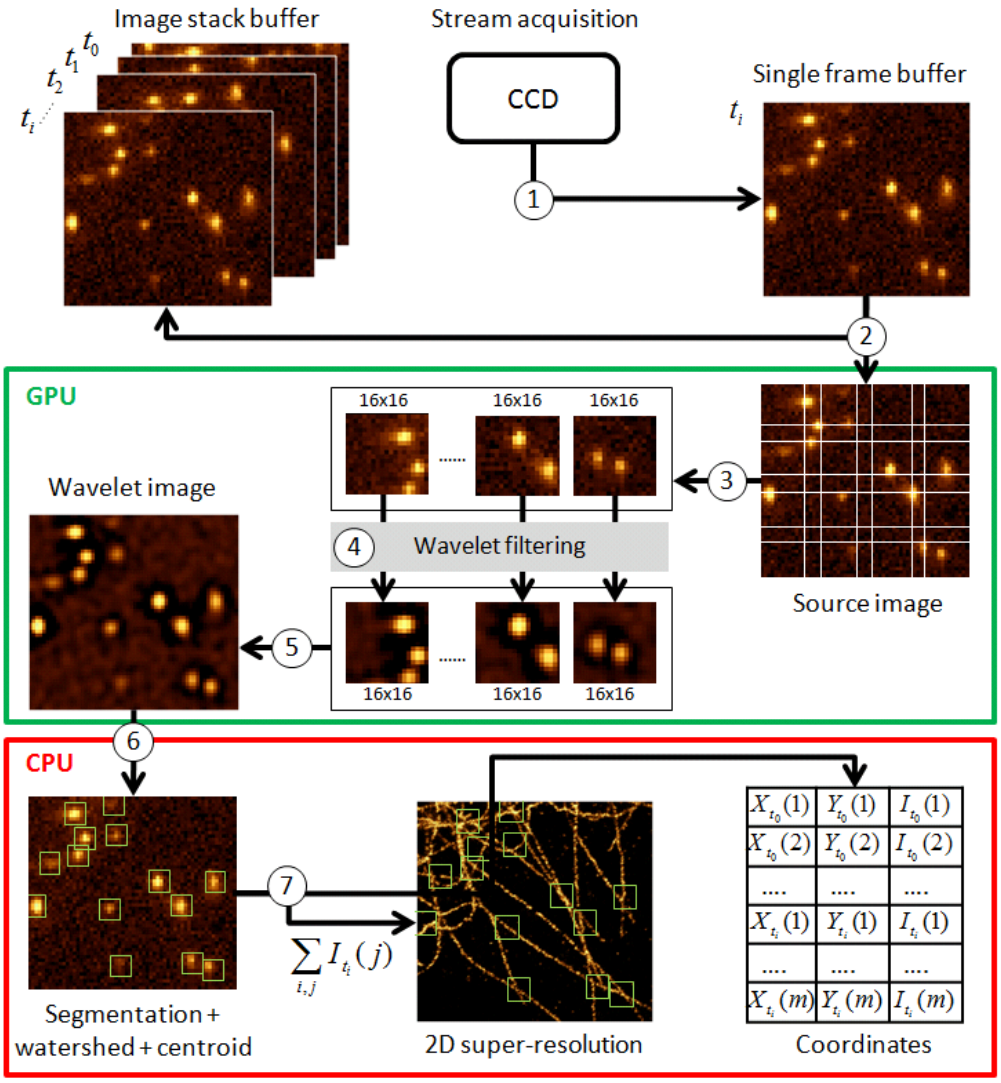


Figure 4-5 : Flux de données pour la localisation 2D. 1) Pendant l'étape d'acquisition, les images sont transférées temporairement dans la mémoire tampon de la caméra CCD. 2) L'image courante est transférée vers la mémoire du GPU pour le traitement. 3) L'image est divisée en régions de 16x16 pixels. Elles sont envoyées ensuite aux différents processeurs du GPU. 4) La décomposition des ondelettes est appliquée en parallèle sur chaque sous-image. 5) L'image du deuxième plan d'ondelettes est reconstruite à partir de ces sous-images. 6) L'image reconstruite est transférée au CPU pour appliquer le seuillage, l'algorithme watershed et l'extraction des barycentres. 7) L'image de super-résolution est enfin reconstruite et la liste des coordonnées des molécules détectées est sauvegardée en mémoire pour la détection 3D.

4.2.3. Localisation axiale post-acquisition

Il existe plusieurs techniques optiques pour la détermination de la position axiale des molécules individuelles en microscopie super-résolution (voir section 2.3.3). Nous avons opté pour la plus populaire des méthodes, à savoir l'astigmatisme. En pratique, une lentille cylindrique de focale environ 2m est introduite dans le système optique, entre la lentille de tube et la caméra CCD. Cette lentille déforme la PSF du microscope, initialement circulaire et symétrique (voir section

2.1.1), en la transformant en une ellipse non symétrique, dont l'orientation et la taille dépendent de la position axiale (Figure 4-6A).

Il est nécessaire de réaliser au préalable une calibration afin de déterminer la correspondance entre la forme de l'ellipse et la position axiale des molécules. Pour cela, des images de billes fluorescentes réalisées sur différents plans sont ajustées par une fonction Gaussienne anisotrope de la forme :

$$PSF_z(x,y) = I_0\, exp\left(-\frac{\left((x-x_0).cos\theta - (y-y_0).sin\theta\right)^2}{2\sigma_x^2} - \frac{\left((x-x_0).sin\theta + (y-y_0).cos\theta\right)^2}{2\sigma_y^2}\right) \quad 4\text{-}1$$

où (x_0, y_0) sont les coordonnées de molécule, I_0 est son intensité, (σ_x, σ_y) sont la largeur et la hauteur de l'ellipse respectivement et θ l'angle de rotation d'ellipse qui est constante.

Puis, les 2 courbes représentant les largeurs (σ_x) et hauteur (σ_y) des PSF en fonction de la position axiale Z sont ajustées par une fonction polynomiale (Figure 4-6B) de la forme :

$$\sigma(Z) = \sigma_0\sqrt{1 + + \left(\frac{Z-Z_0}{d}\right)^2 + A\left(\frac{Z-Z_0}{d}\right)^3 + B\left(\frac{Z-Z_0}{d}\right)^4} \quad 4\text{-}2$$

où σ_0 est l'écart type au niveau du plan focal $Z = Z_0$, Z_0 est la position axiale relative du plan focale, *d* est la profondeur de champ de l'objectif et *A* et *B* sont des constants empiriques. L'ensemble du protocole de calibration est détaillé dans l'annexe.

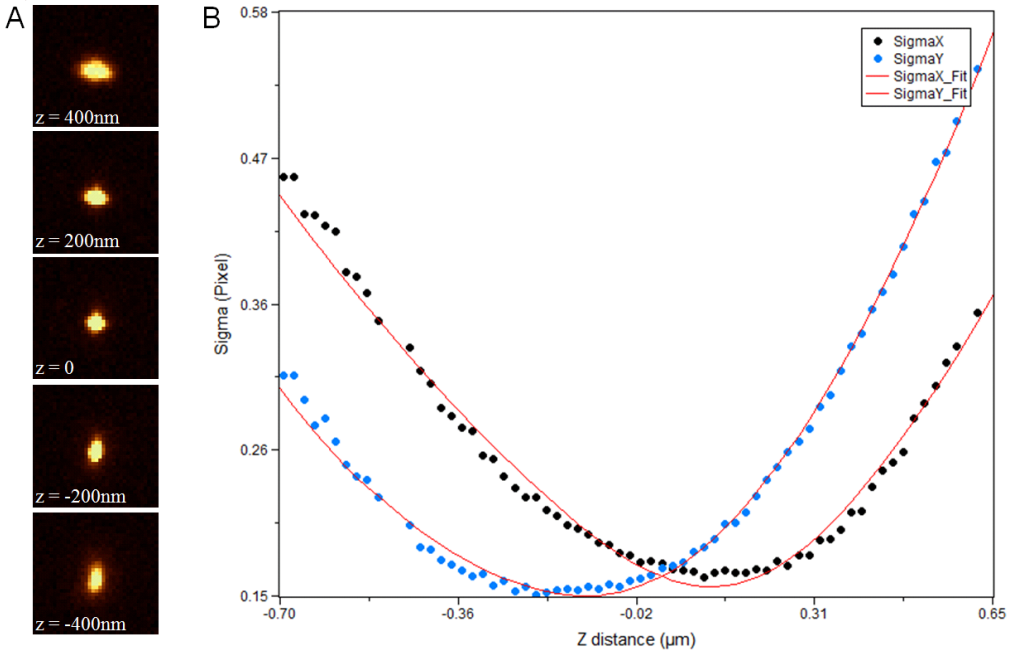


Figure 4-6 : Détection 3D par l'astigmatisme. A) Déformation de la PSF le long de l'axe optique dans le cas de l'astigmatisme. B) Courbes de calibration 3D correspondantes.

Une fois l'étape de calibration du système optique réalisée, la détermination de la coordonnée axiale de chaque molécule est réalisée par minimisation entre les paramètres d'ellipse déterminés par ajustement Gaussien et les courbes de calibration.

L'ajustement Gaussien est une étape très coûteuse informatiquement car il nécessite plusieurs itérations avant la convergence, ajoutant à cela le nombre de particules à traiter qui peut dépasser un million par cellule. Il se prête parfaitement à une implémentation GPU car il doit être réalisé localement sur une région autour des molécules localisées au préalable par la segmentation en ondelettes, de manière totalement indépendante des autres régions de l'image. Afin d'exploiter au mieux le niveau de parallélisme offert par le GPU (plusieurs centaines de processeurs), nous avons opté pour le traitement simultané d'un très grand nombre de molécules correspondant à la totalité des molécules localisées, et non pour le traitement en temps-réel image par image. Cette approche permet de surmonter les contraintes liées à la cadence caméra en mode streaming qui empêchent un ajustement Gaussien en temps-réel (voir Figure 4-10).

A partir des images acquises et de la liste des coordonnées de localisation 2D calculées en temps-réel, des petites régions de 7x7 pixels centrées sur chacune des coordonnées de localisation sont transférées au GPU et traitées en parallèle par un ajustement Gaussien anisotrope. Nous avons utilisé la minimisation NLLS (Non Linear Least-Square) et plus précisément l'optimisation de Levenberg-Marquardt (Moré, 1978) afin de déterminer la largeur et la hauteur (σ_x, σ_y) de chaque PSF. Notre choix pour la méthode de minimisation NLLS par rapport au MLE a été motivé par le fait qu'elles offrent toutes les deux des précisions de localisation très similaires, avec un léger avantage pour la méthode NLLS concernant le temps de calcul (Abraham et al., 2009). Ensuite, la coordonnée axiale de chaque molécule est déterminée par la minimisation de l'erreur quadratique moyenne en utilisant les courbes de calibration astigmatique $Z(\sigma_x, \sigma_y)$ (Figure 4-6B). Cette étape est également réalisée en parallèle sur GPU. Enfin, l'image 3D de super-résolution est reconstruite à partir de la liste des coordonnées *(X, Y, Z, I)*. Nous avons utilisé un maximum de 10 itérations pour la minimisation NLLS, bien que la convergence de l'algorithme soit obtenue en moyenne à partir de la cinquième itération (Figure 4-7) sur les données de simulation, et cela dans le but d'avoir un intervalle de confiance assez confortable. Cette rapidité de convergence est liée à la combinaison entre la localisation en ondelettes et l'ajustement Gaussien. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la

localisation en ondelettes donne une estimation très proche du fit Gaussien, ce qui permet une convergence très rapide de l'algorithme de minimisation.

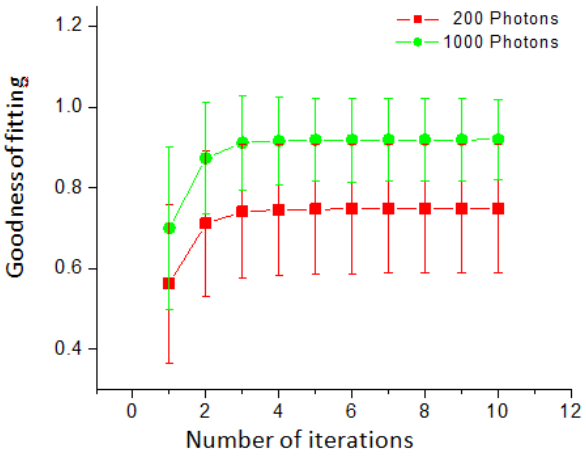


Figure 4-7 : Convergence de l'ajustement Gaussien anisotrope de l'algorithme de minimisation NLLS sur une région de 7x7 pixels. Les mesures ont été réalisées sur 1000 localisations simulées avec 200 et 1000 photons par molécule.

La Figure 4-8 illustre en détail les différentes étapes de la localisation axiale post-acquisition. Cette implémentation a l'avantage d'effectuer l'ajustement Gaussien de plus d'un million de molécules en seulement quelques secondes à l'aide d'une carte GPU standard peu coûteuse.

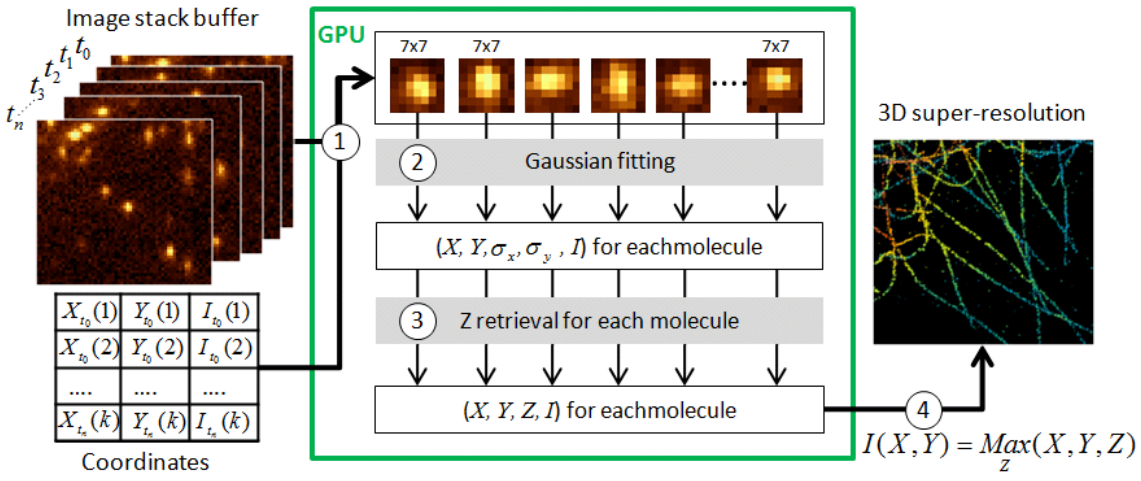


Figure 4-8 : Flux de données pour la localisation 3D. 1) Les images sont divisées en sous-images de 7x7 pixels centrées autour des coordonnées des molécules détectées en 2D. 2) L'ajustement Gaussien anisotrope est appliqué sur chaque sous-image en parallèle sur GPU. 3) La détermination de la position axiale est effectuée en parallèle sur GPU. 4) La reconstruction 3D est réalisée à partir des coordonnées (X, Y, Z) de toutes les localisations.

En combinaison avec la localisation 2D en temps-réel et le contrôle automatique de l'intensité du laser de photoconversion, notre méthode outrepasse celles de traitement post-acquisition

existantes. Elle nécessite d'attendre quelques secondes seulement après l'acquisition pour obtenir la reconstruction 3D de l'image de super-résolution.

4.2.4. Contrôle automatique de l'intensité du laser

Afin de garder une densité de molécules optimale tout au long du processus d'acquisition, nous effectuons un contrôle automatique de la puissance du laser de photoconversion. Au cours de l'acquisition, le photoblanchiment va engendrer une baisse progressive de la densité de localisation en dessous de son optimale, rallongeant le temps nécessaire pour réaliser l'acquisition. Le contrôle automatique va permettre de compenser la baisse de la densité de molécules par une augmentation du taux de photoconversion, maintenant ainsi la densité de molécules à son optimale.

Pratiquement, pour chaque image acquise les densités moyennes et maximales de molécules par sous-régions de 64x64 pixels sont calculées. Si pendant 20 images consécutives la densité reste au-dessus ou au-dessous d'un seuil fixé à +/- 15% de la densité initiale, l'intensité du laser à 405 nm utilisé pour photoconvertir les molécules est ajustée en conséquence. Le contrôle automatique permet d'optimiser le processus d'acquisition et n'est possible que grâce à la localisation en temps-réel. La Figure 4-9 illustre une optimisation effectuée sur les 3000 premières images d'une même région d'échantillon. La Figure 4-9A montre l'évolution du nombre de localisations au cours de l'acquisition ; il reste constant avec le contrôle automatique, contrairement à une acquisition sans contrôle automatique où il diminue. Cela est plus perceptible sur les Figure 4-9C et Figure 4-9D, où 18000 molécules supplémentaires sont détectées grâce au contrôle automatique. Le temps nécessaire pour localiser un nombre fixe de molécules sera proportionnellement plus court avec le contrôle automatique et par conséquent l'acquisition plus efficace et optimale.

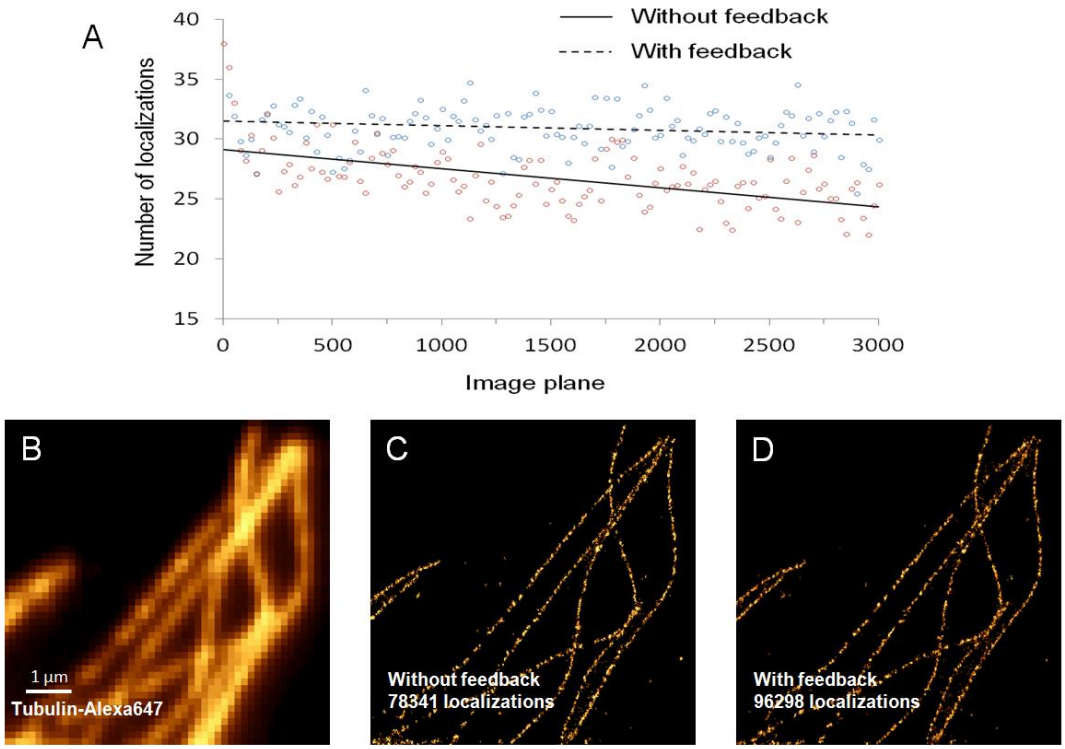


Figure 4-9 : Effet du contrôle automatique du laser de photoconversion. (A) Nombre de localisations en fonction du nombre d'images acquises avec (bleu) et sans (rouge) le contrôle du laser. Les lignes en pointillé et continue représentent la tendance respective. Pour plus de visibilité, un point sur 25 est affiché. (B) Image d'épifluorescence de microtubules marqués avec Alexa-647-Tubuline. (C) Image de super-résolution obtenue sans le contrôle du laser, composée de 78341 localisations. (D) Image de super-résolution obtenue avec le contrôle du laser, composée de 96298 localisations.

4.3. Données de simulation

4.3.1. Implémentation GPU vs. Implémentation CPU

Nous avons comparé les performances de l'implémentation sur GPU de l'ajustement Gaussien pour la localisation axiale avec l'implémentation sur CPU. La Figure 4-10A illustre les performances de chaque implémentation en fonction du nombre de molécules à localiser et de la taille de région utilisée pour l'ajustement (7x7 et 9x9 pixels). L'ajustement sur GPU est environ 70 fois plus rapide que celui réalisé sur CPU, quelle que soit le nombre de molécules. L'ajustement Gaussien d'un million de molécules sur une région de 7x7 pixels dure 13 secondes sur GPU contre 14 minutes sur CPU. Ce gain est dû à la nature locale de l'algorithme d'ajustement et au grand nombre de processeurs disponibles sur la carte GPU, soit 256 pour la carte graphique Nvidia Quadro 4000 que nous avons utilisée.

Nous avons également évalué la localisation 2D sur GPU et CPU dans l'objectif d'effectuer le traitement en temps-réel. Comme les données sont analysées image par image pour respecter les contraintes du temps-réel, nous avons opté pour une implémentation hybride CPU/GPU car

le GPU est moins adapté pour le traitement de petites quantités de données. La Figure 4-10B illustre le gain entre l'implémentation hybride et l'implémentation CPU, en fonction du nombre de molécules localisées. On voit que dans un temps de calcul donné, l'implémentation hybride détecte deux fois plus de molécules que l'implémentation CPU. Ainsi, en 20 msec, correspondant au temps disponible lors d'une acquisition à 50 images/seconde, l'implémentation hybride détecte jusqu'à 570 molécules par image, alors que 250 molécules seulement sont localisées par l'implémentation sur CPU. Ces performances restent largement compatibles avec les vitesses d'acquisition offertes par les EMCCD rapides et les densités nécessaires à la microscopie de super-résolution par localisation.

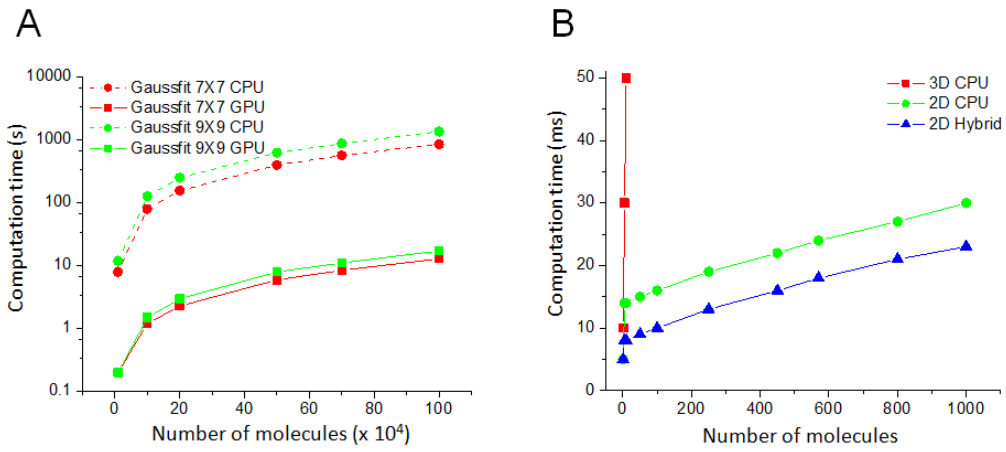


Figure 4-10 : GPU vs. CPU. (A) Performances en termes de temps de calcul de l'ajustement Gaussien anisotrope, avec (lignes continues) et sans (lignes pointillées) utilisation du GPU, pour deux différentes tailles de région. Un facteur d'accélération d'environ 70 est obtenu avec l'implémentation sur GPU par rapport à l'implémentation sur CPU. (B) Performances de l'algorithme de localisation en temps-réel (traitement d'une seule image). La localisation 2D est effectuée image par image en temps-réel sur CPU (ligne verte) et GPU (ligne bleue). L'ajustement Gaussien sur CPU (ligne rouge) peut localiser uniquement quelques molécules en 50 ms. L'ensemble des algorithmes a été testé sur un ordinateur doté d'un processeur Intel Xeon E5645@2.4 GHz et une carte graphique Nvidia Quadro 4000.

4.3.2. WaveTracer VS. QuickPALM VS. RapidSTORM

Dans ce paragraphe, nous avons testé notre méthode hybride de localisation sur des données de simulation et comparé ses performances avec deux logiciels open-sources de référence : QuickPALM (Henriques et al.) et RapidStorm (Wolter et al., 2010, Wolter et al., 2012). Ces deux méthodes sont basées sur une implémentation multithreading consistant à paralléliser l'analyse sur plusieurs processeurs en reliant leurs performances au nombre de processeurs disponibles (cinq pour nos tests). Nous n'avons pas pu comparer notre méthode avec une autre méthode GPU de la littérature (Smith et al.) car elle ne contient que l'étape d'ajustement Gaussien et pas l'étape de prétraitement. Cependant, cette méthode a été évaluée récemment comme

légèrement moins performante que le logiciel RapidStorm (Wolter et al., 2012) étudié ici. RapidStorm emploie un mélange des deux algorithmes de minimisation Levenberg-Marquardt et MLE; QuickPALM s'appuie quant à lui sur l'algorithme de Hogbom 'CLEAN' pour identifier les molécules, suivi par un algorithme de barycentre pour déterminer la position et la forme de chaque molécule (largeur et hauteur pour localisation axiale).

Pour chacune des trois méthodes, nous avons évalué la précision de localisation, les taux de localisation (ratio, rappel et précision) ainsi que la vitesse de calcul en mode post-acquisition et en temps-réel pour la localisation latérale et axiale. Considérons *NS* le nombre total de particules de simulation, *TP* le nombre de particules localisées présentes dans un rayon d'un pixel dans les données de simulation, *FN* le nombre de faux négatifs et *FP* le nombre de faux positifs. Nous avons utilisé les trois mesures suivantes : ratio = *TP/NS*, rappel = *TP/(TP+FN)* et précision = *TP/(TP+FP)*. Ces mesures ont été réalisées sur des données de molécules individuelles simulées dans des motifs en forme de rayons du soleil alternant 20 rayures noires et 20 rayures blanches (Figure 4-11A). Pour les simulations 2D, les molécules ont été placées aléatoirement dans les bandes blanches. Pour les simulations 3D basées, les molécules ont été placées à l'intérieur des bandes blanches, chaque bande étant située à une certaine position *Z* variant entre -500 nm et +500 nm autour du plan focal. Les bandes 3D consécutives sont séparées axialement de 50 nm (Figure 4-11A). Nous avons effectué des simulations comprenant des sources ponctuelles isolées localisées à l'intérieur des rayures blanches et convoluées par une PSF Gaussienne isotrope et anisotrope pour les cas 2D ou 3D respectivement. Les molécules ont été réparties de façon aléatoire avec une densité moyenne idéale de 0,5 molécule/μm^2. Le signal a été ensuite échantillonné sur une matrice pixélisée de 64x64, avec une taille de pixel de 100 nm respectant le critère d'échantillonnage de Nyquist dans le spectre de lumière visible (Figure 4-11C). Enfin, les images numériques ont été corrompues par une combinaison de bruit Poissonien et Gaussien simulant respectivement le bruit de photons et le bruit électronique. Afin de tester l'efficacité de la localisation de chaque méthode pour différents types de marqueurs fluorescents, nous avons simulé trois jeux de données : 100, 200 et 1000 photons détectés par molécule par image. Pour chaque configuration, nous avons généré une pile de 30000 images composées de 286665 molécules. Ces reconstructions permettent d'illustrer la précision de localisation et le temps de calcul pour chaque méthode, pour différents SNR, en 2D et 3D. Les résultats correspondants sont synthétisés dans la Figure 4-12. La Figure 4-12A détaille les temps de calcul des trois méthodes. En mode traitement post-acquisition, notre méthode a pris plus de temps que RapidSTORM car notre localisation 2D est réalisée image par image afin qu'elle soit en temps

réel. Nous n'avons pas optimisé notre méthode de localisation 2D en utilisant l'architecture massivement parallèle des GPU, notre objectif principal étant la localisation en temps réel. Notre méthode permet la localisation d'environ 150 molécules en moins de 10 ms (Figure 4-10B), ce qui est suffisant pour traiter les images à la volée en mode streaming avec une caméra EMCCD rapide. Dans le cas 3D, la localisation 2D est effectuée en temps réel et la détermination de la coordonnée axiale effectuée post-acquisition. Dans cette configuration, notre logiciel WaveTracer tire pleinement parti des capacités du GPU et surpasse RapidSTORM avec plus de 80000 localisations 3D par seconde. En termes de précision de localisation (Figure 4-12B), les trois méthodes montrent des performances similaires avec un avantage pour WaveTracer et RapidSTORM par rapport à QuickPALM, comme illustré sur les reconstructions de la Figure 4-11. De même, les taux de détection (Figure 4-12C) sont similaires pour les trois méthodes, avec un léger avantage pour WaveTracer dans sa capacité à localiser les vrais positifs (ratio et rappel) même pour les faibles SNR, grâce à la combinaison avec la segmentation par ondelettes.

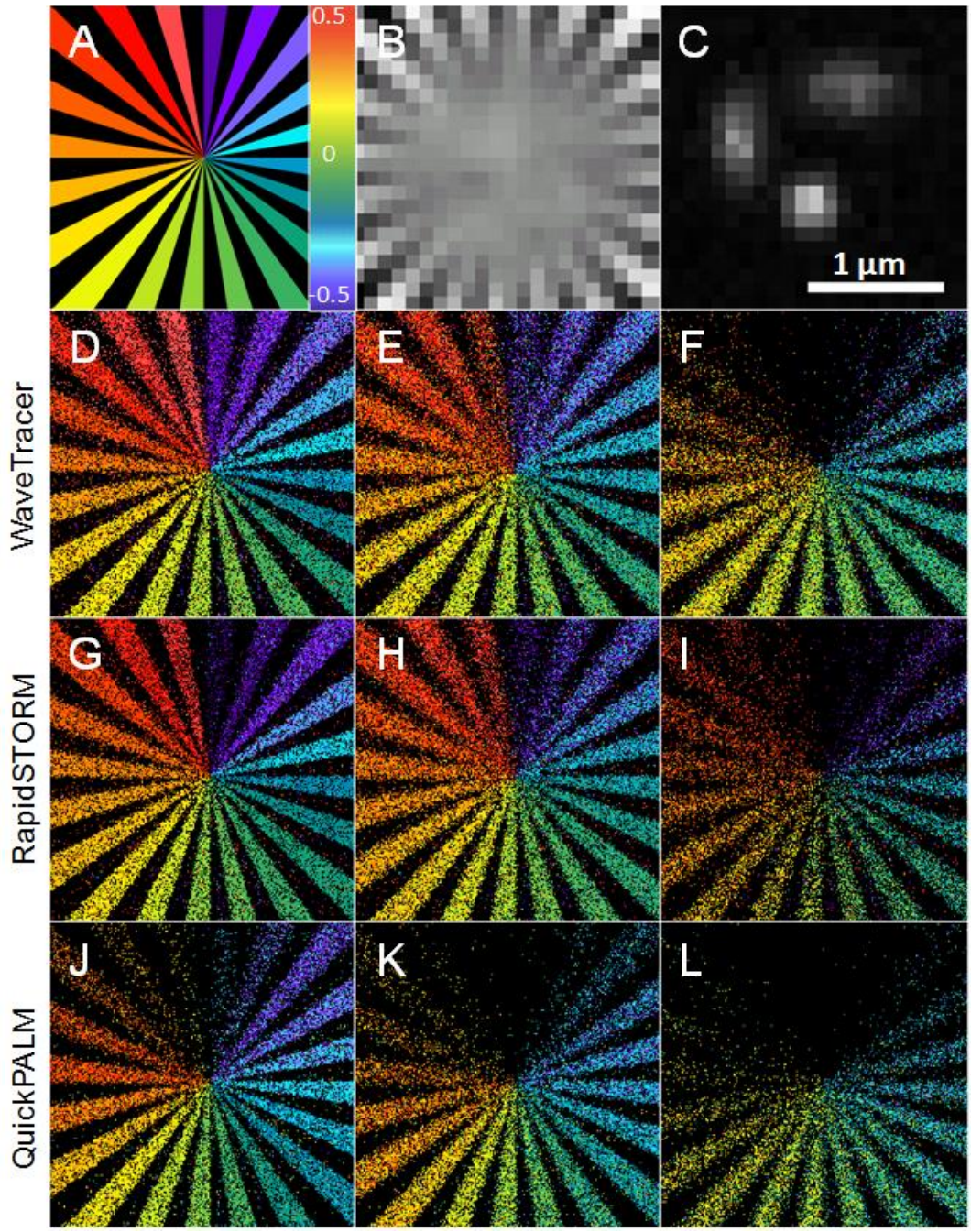


Figure 4-11 : Reconstruction de données de simulation par les trois méthodes logicielles testées. (A) Motif test 3D en forme de rayons du soleil constitué de 40 rayures noires et blanches alternées, utilisé pour les simulations en microscopie de super-résolution par localisation de molécules individuelles. Le motif est d'une épaisseur de 1µm et les rayures voisines sont espacées de 50 nm dans la dimension axiale. (B) Image limitée par la diffraction du motif test. (C) Exemple de molécules individuelles isolées localisées à l'intérieur du motif test, convoluées par une PSF astigmatique. (D–F) Reconstruction du motif test effectuée par le module WaveTracer pour 1000, 200 et 100 photons/molécule/image respectivement. (G–I) Reconstruction du motif test effectuée par le logiciel RapidSTORM pour 1000, 200 et 100 photons/molécule/image respectivement. (J–L) Reconstruction de motif test effectuée par le logiciel QuickPALM pour 1000, 200 et 100 photons/molécule/image respectivement.

A

	Computing speed (seconds)			
	2D		3D	
	Offline	Online	Offline	Online
QuickPALM (5 UCs)	100	NA	100	NA
RapidStorm (5 UCs)	6	NA	7	NA
WaveTracer (GPU)	46	0*	49	2.7

100 50 0

B

	Localization accuracy (nm)					
	2D			3D		
Nb photons/molecule	100	200	1000	100	200	1000
QuickPALM (5 UCs)	26.4	17.2	10.9	141.2	107.2	75.2
RapidStorm (5 UCs)	20.6	14.4	7.6	96.3	78.3	45.2
WaveTracer (GPU)	21.7	15	7.9	109.9	77.1	38.6

150 75 0

C

		Localization rate (%)								
		Ratio			Recall			Precision		
	Nb photons/molecule	100	200	1000	100	200	1000	100	200	1000
2D	QuickPALM (5 UCs)	73.8	76.3	76.5	74.9	77.5	77.8	98.2	97.6	96.3
2D	RapidStorm (5 UCs)	85.3	87.5	87.2	86.8	89	89	98.4	98	97.3
2D	WaveTracer (GPU)	93.5	93.4	93.5	95.1	95.1	95.3	98.2	98	98
3D	QuickPALM (5 UCs)	26.2	43.1	54	26.4	43.5	54.6	98.3	98.1	97
3D	RapidStorm (5 UCs)	26.5	74.6	78.4	26.8	75.7	79.7	92.5	96.4	96.8
3D	WaveTracer (GPU)	61	75.6	78.6	61.8	76.5	79.9	88.7	87.1	89.2

100 50 0

Figure 4-12 : Performances des trois méthodes testées. (A) Comparaison du temps de calcul en mode temps-réel et post-acquisition, pour la localisation en 2 et 3 dimensions avec notre méthode, QuickPALM et RapidSTORM. La comparaison a été effectuée à partir de 30000 images contenant 286665 molécules. La valeur 0* indiquée pour la localisation 2D en temps-réel signifie que la localisation est faite en parallèle avec l'acquisition et qu'aucun temps de traitement supplémentaire n'est nécessaire. (B) Précision de localisation en 2D et 3D pour trois conditions de nombre de photons par molécule et comparaison avec les logiciels QuickPALM et RapidSTORM. (C) Taux de localisation (ratio, rappel et précision) en 2D et 3D pour trois conditions de nombre de photons par molécule et comparaison avec les logiciels QuickPALM et RapidSTORM.

4.4. Données expérimentales

Nous avons validé notre méthode de localisation temps-réel sur des marquages de microtubules dans des cellules COS7 observées en dSTORM. Les microtubules sont des échantillons biologiques très souvent utilisés pour tester les méthodes de reconstruction grâce à leurs structures linéaires bien connues. Ils ont été marqués avec l'Alexa-647 couplée à la tubuline (détails dans l'annexe). La Figure 4-13 illustre les reconstructions 2D et 3D obtenues en temps-réel avec notre méthode. Plus de 1,2 millions de localisations 2D ont été calculées et visualisées en parallèle du processus d'acquisition. Les 20000 images ont été acquises à la fréquence de 50 images par seconde, nécessitant une moyenne de 3000 localisations par seconde, réalisable sans

problème même sans accélération GPU (Figure 4-10). Les localisations axiales n'ont nécessité quant à elles que 15 secondes après la fin de l'acquisition. La reconstruction en temps réel de l'image de super-résolution permet à l'expérimentateur de suivre l'évolution de l'acquisition (Figure 4-13D et H).

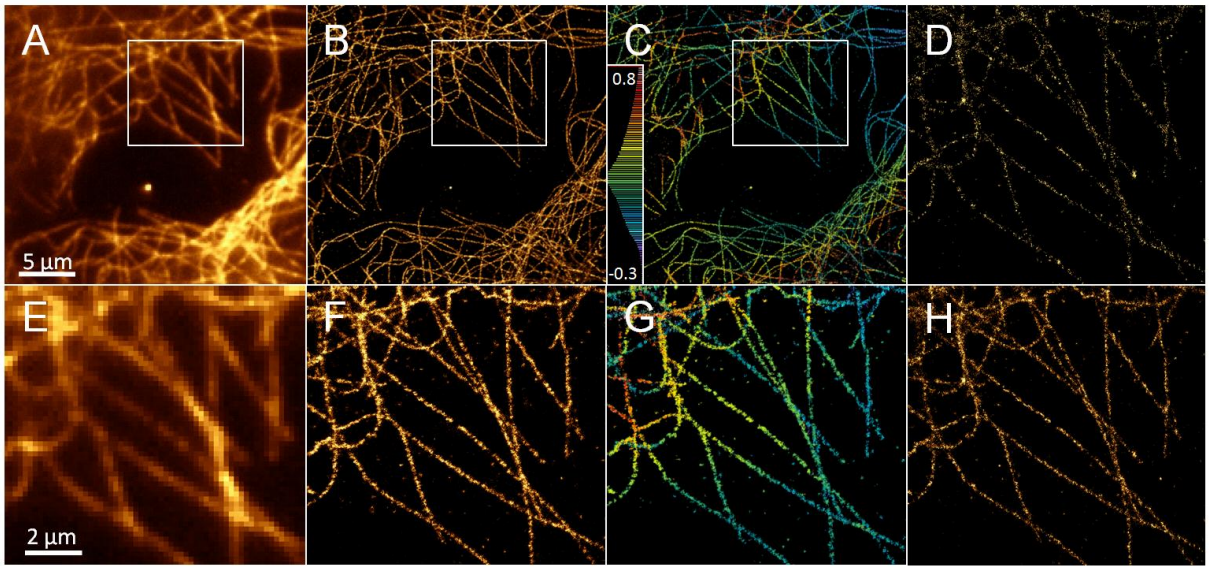


Figure 4-13 : Imagerie de super-résolution temps réel. (A) Image d'épifluorescence de microtubules marqués avec Alexa-647-Tubuline. (B) Image de super-résolution 2D reconstruite en temps réel à partir de 20000 images et 1,2 million de localisations de molécules individuelles. (C) Image de super-résolution 3D des microtubules de la figure (A) obtenue seulement 15 secondes après la fin d'acquisition. Les couleurs représentent la position axiale en µm. (E) Région d'intérêt sélectionnée de la figure (A). (F) Région d'intérêt sélectionnée de la figure (B). (G) Région correspondant à la figure (C). (D), (H) Images intermédiaires obtenues durant le processus d'acquisition temps réel après l'acquisition respectivement de 1000 et 4000 images.

4.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un nouveau système optimisé pour la microscopie de super-résolution par localisation permettant d'effectuer la localisation et la reconstruction de l'image de super-résolution en 2D et 3D en temps-réel au cours de l'acquisition. Un contrôle automatique de l'intensité du laser de photoconversion est intégré afin d'optimiser la densité de molécules pendant toute l'acquisition. Notre système permet également d'obtenir les reconstructions 3D directement sur le microscope, grâce à une implémentation sur le carte GPU, offrant des performances jusqu'à 70 fois plus rapides que sur CPU. Cette approche épargne à l'expérimentateur les limites imposées par les étapes de traitement post-acquisition, à savoir l'obligation de sauvegarder, transférer et traiter les données. Nous avons ensuite testé et validé notre solution avec deux logiciels de référence sur des données de simulation 2D et 3D, puis sur des données expérimentales de microtubules.

5. Application biologique : composition des sous-unités des récepteurs AMPA

La microscopie de fluorescence a toujours été largement utilisée en neurosciences pour étudier les volumes tissulaires *in vivo* à l'échelle du micron. Elle a permis l'étude approfondie du fonctionnement du cerveau au niveau des neurones et des circuits neuronaux. Cependant, l'organisation à l'échelle moléculaire de la synapse et de ses sites pré- et postsynaptiques restait jusqu'à récemment inaccessible aux techniques de microscopie de fluorescence à cause de la limite de résolution de ~250 nm. Récemment, l'émergence de la microscopie de super-résolution a entièrement bouleversé notre capacité d'investigation des mécanismes impliqués dans la transmission synaptique. Ces nouvelles techniques ont permis de décrire pour la première fois l'organisation et la dynamique de protéines individuelles sur des neurones vivants, avec des résolutions de 10 à 100 nm. Nous pouvons citer ici quelques travaux majeurs très récents tirant profit de ces nouvelles approches, comme la détermination de la structure du cytosquelette axonal et la zone active cytomatricielle des synapses chez la drosophile (Liu et al., 2011), l'étude des changements dynamiques dans la morphologie d'épine et de la distribution de l'actine par la microscopie STED (Frost et al., 2010), l'analyse de la distribution spatiale des récepteurs et des protéines d'échaudage en synapses à l'aide de la microscopie STORM 3D multi-couleurs (Dani et al., 2010) ou encore l'organisation en nanodomaines des récepteurs AMPA à la post-synapse (MacGillavry et al., 2013, Nair et al., 2013, Pertsinidis et al., 2013).

D'une manière générale, de nombreux efforts sont consacrés actuellement à la compréhension de la mobilité et de l'architecture des complexes protéiques, notamment ceux impliqués dans la communication neuronale. En effet, les protéines à l'intérieur des cellules sont assemblées en complexes macromoléculaires réactifs. Les diverses interactions entre ces complexes, et les changements moléculaires qui en découlent représentent le réseau d'interactions et de réactivités qui forme la base physique et chimique de la régulation cellulaire. L'analyse de ces réseaux est au cœur de notre compréhension des fonctions cellulaires. La plupart des dysfonctionnements cellulaires, à l'origine de certaines pathologies, sont liés à l'absence ou à l'altération de l'un des partenaires d'un complexe macromoléculaire. Pour comprendre ces maladies et éventuellement les combattre plus efficacement, il est essentiel de développer des outils de mesure permettant de fournir des informations quantitatives sur la stœchiométrie (comptage des molécules), l'organisation relative (clusters) et la dynamique (interactions) des différents complexes protéiques.

Adel Kechkar

La plupart des protéines membranaires sont formées de sous-unités multimériques. La stœchiométrie d'un complexe protéique est régulée précisément et est fondamentale pour la compréhension de ses propriétés fonctionnelles. Plusieurs approches ont été développées afin de mesurer la composition sous-unitaire de ces protéines, comme les méthodes d'électrophysiologie ou de biochimie. Grâce aux récents progrès de la microcopie de super-résolution optique, il est aujourd'hui possible de localiser, compter et suivre ces biomolécules avec des précisions nanométriques et des résolutions temporelles de l'ordre de la milliseconde.

Dans ce dernier chapitre, nous nous sommes focalisés sur l'étude des récepteurs AMPA dans les sites postsynaptiques. Ces récepteurs jouent un rôle fondamental dans les mécanismes de transmission et de plasticité synaptique. Nous avons tenté de déterminer leur stœchiométrie sous-unitaire à l'aide de la microscopie de super-résolution. Ce chapitre se compose de trois sections. Dans la première section, nous énonçons une brève introduction sur le rôle et le fonctionnement des neurones et des synapses. Dans la deuxième section, nous présentons des résultats préliminaires obtenus en microscopie dSTORM 3D sur l'organisation des récepteurs AMPA et de la protéine auxiliaire PSD95. Enfin, une nouvelle méthode quantitative basée sur la photo-physique des fluorophores est proposée dans la dernière section pour tenter de déterminer la stœchiométrie des récepteurs AMPA. Cette méthode sera validée sur des données de simulation, puis testée sur des données expérimentales.

5.1. Neurones et synapses

La compréhension du fonctionnement du système nerveux central (SNC) est depuis toujours considérée comme un enjeu majeur de la recherche fondamentale en neurosciences. Cet organe est responsable des fonctions cognitives supérieures telles que l'apprentissage et la mémoire. Le SNC est constituée d'un ensemble de réseaux neuronaux où les neurones sont connectés entre eux à travers des jonctions intercellulaires spécialisées appelées synapses, comme illustré dans la Figure 5-1.

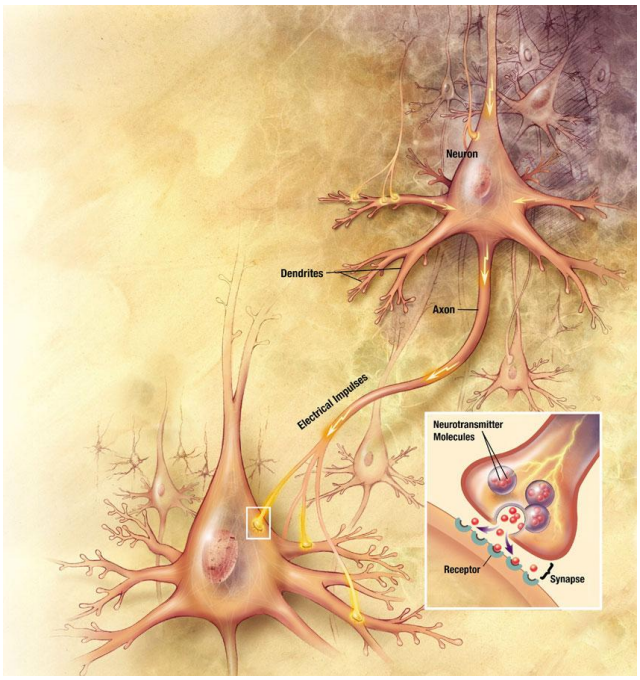


Figure 5-1 : Connexions synaptiques entre deux neurones (http://fr.wikipedia.org/wiki/Synapse)

Le cerveau humain peut compter jusqu'à 10^{11} neurones et 10000 contacts synaptiques par neurone. La zone de contact synaptique assure le transfert d'information entre les neurones. Elle comporte trois compartiments spécifiques : la pré-synapse, la fente synaptique et la post-synapse (Figure 5-2). La terminaison pré-synaptique contient des centaines de vésicules remplies de neurotransmetteurs. Lorsque ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, suite à l'entrée de calcium issue d'un potentiel d'action, les neurotransmetteurs sont libérés dans la fente synaptique, un espace d'environ 20 nm situé entre les cellules pré- et post-synaptiques pour les synapses chimiques. Les neurotransmetteurs libérés se lient alors à des récepteurs-canaux spécifiques fixés dans la membrane de la région post-synaptique. Une fois activés, les récepteurs-canaux entraînent des changements de la perméabilité membranaire et la dépolarisation locale. C'est ainsi que se font la transmission synaptique et la circulation d'information entre les neurones.

Dans les synapses excitatrices, le glutamate est le principal neurotransmetteur responsable de la signalisation synaptique. La famille des récepteurs-canaux glutamatergiques (ou ionotropiques) comporte plusieurs sous-familles comme les récepteurs AMPA (pour acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)), les récepteurs NMDA (pour N-methyl-D-aspartate) et les récepteurs kaïnates.

Les récepteurs AMPA sont responsables de la majorité de la transmission excitatrice rapide et jouent un rôle important dans la plasticité synaptique qui implique les deux fonctions cognitives de la mémoire et de l'apprentissage.

5.2. Organisation 3D des récepteurs AMPA et de la protéine auxiliaire PSD95

Les récepteurs AMPA sont des homo ou des hétéro-tétramères formés par la combinaison des sous-unités GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4 (Rosenmund et al., 1998). Dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, on trouve essentiellement à l'état basal des hétéromères GluA1/GluA2 et GluA2/GluA3 (Wenthold et al., 1996). La fonction des récepteurs AMPA est fortement liée à leur composition en sous-unités, par exemple, la présence de la forme épissée de GluA2 permet de bloquer la perméabilité au calcium des récepteurs. De même, le phénomène de plasticité appelé potentiation à long terme, mécanisme à la base de la mémoire, passe par l'apport de nouveaux récepteurs AMPA spécifiquement composés de quatre sous-unités GluA1. De nombreux travaux montrent que le trafic (Shepherd and Huganir, 2007) et les propriétés biophysiques (Isaac et al., 2007) des récepteurs AMPA sont liés à leur composition et donc la détermination de cette composition spécifique est essentielle à la compréhension des mécanismes moléculaires sous tendant la transmission synaptique.

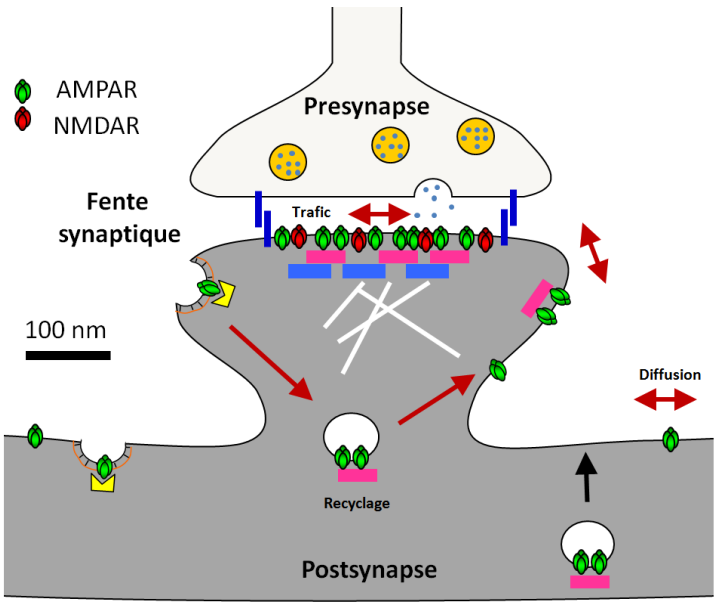


Figure 5-2 : Synapse et récepteurs postsynaptiques.

L'adressage des récepteurs AMPA à la membrane de la post-synapse passe par de nombreuses étapes (Figure 5-2). Nous allons évoquer ici uniquement leur trafic de surface. L'ensemble des travaux effectués sur le trafic des récepteurs AMPA a mis en évidence, d'une part que les

récepteurs peuvent changer de comportement en quelques secondes, alternant entre diffusion libre, confinement et immobilisation (Borgdorff and Choquet, 2002, Tardin et al., 2003) et d'autre part qu'ils diffusent dans le plan de la membrane plasmique (Ashby et al., 2006, Heine et al., 2008). De plus, les récepteurs AMPA sont immobilisés aux synapses par leurs interactions avec la protéine d'échafaudage PSD-95 (Bats et al., 2007).

Une publication récente (Nair et al., 2013) a mis en évidence, grâce à l'utilisation de plusieurs techniques de super-résolution, que les récepteurs AMPA à l'intérieur de synapses sont organisés en clusters de 70 nm de diamètre environ qui contiennent en moyenne 20 récepteurs chacun. Les récepteurs AMPA sont stabilisés réversiblement à l'intérieur de ces nanodomaines et diffusent librement en dehors. En outre, ces nanodomaines sont souvent partiellement colocalisés avec des clusters plus importants de la protéine d'échafaudage PSD-95. Les résultats préliminaires que nous allons présenter dans ce chapitre s'inscrivent dans la continuité de cette dernière publication.

Le développement de la microscopie de super-résolution optique par localisation de molécules individuelle a permis d'améliorer considérablement la résolution latérale (10-40 nm) et axiale (40-100 nm) de la microscopie de fluorescence. Nous avons étudié les récepteurs AMPA et la protéine d'échafaudage PSD-95 en 3D grâce à la microscopie de super-résolution dSTORM 3D basée sur l'astigmatisme. Couplée à une illumination laser en mode oblique (Giannone et al., 2010) cette technique permet d'observer les cultures de neurones sur une profondeur de 1 µm environ à proximité de la lamelle, idéale pour l'étude de la synapse dont la dimension est de 1 μm^3 environ. Grâce à notre solution logicielle présentée dans la section 4.2.3 installée sur un microscope inversé équipé d'un banc laser de forte puissance avec excitation oblique (voir l'annexe pour une description détaillée), nous avons réalisé l'acquisition et la reconstruction des données 3D de super-résolution. Nous avons utilisé des neurones d'hippocampe fixés dont la sous-unité GluA1 et la protéine PSD-95 sont marquées par des fluorophores organiques. Dans un premier temps, chaque protéine a été couplée avec le fluorophore Alexa647 et imagée séparément. Puis, les deux protéines ont été acquises ensemble séquentiellement, la sous-unité GluA1 ayant été marquée avec le fluorophore Alexa646 et la protéine PSD-95 avec le fluorophore Rhodamine-RedX. Le double marquage nous a permis d'observer les colocalisations éventuelles entre les deux protéines endogènes à l'échelle nanométrique (voir détails dans l'annexe).

5.2.1. PSD95-Alexa647

La Figure 5-3 illustre les résultats obtenus en microscopie dSTORM 3D en utilisant le marquage PSD95-Alexa647. On peut observer que la protéine PSD-95 est concentrée en clusters de taille d'environ 500 nm, eux-mêmes organisés en sous-clusters d'environ 150 nm (Figure 5-3B) (Nair et al., 2013), ne pouvant pas être résolus en microscopie d'épifluorescence classique (Figure 5-3A). Inversement, la Figure 5-3B nous montre bien que ces clusters sont hétérogènes dans leurs formes et dimensions. La Figure 5-3C montre des images 3D par projection d'intensité maximale (xy, xz) de quelques clusters sélectionnés. Il apparaît clairement que ces clusters ont, dans l'espace 3D, des structures relativement homogènes en forme de banane ou de lettre U, illustrant l'apport crucial de la 3D à ces niveaux de résolution.

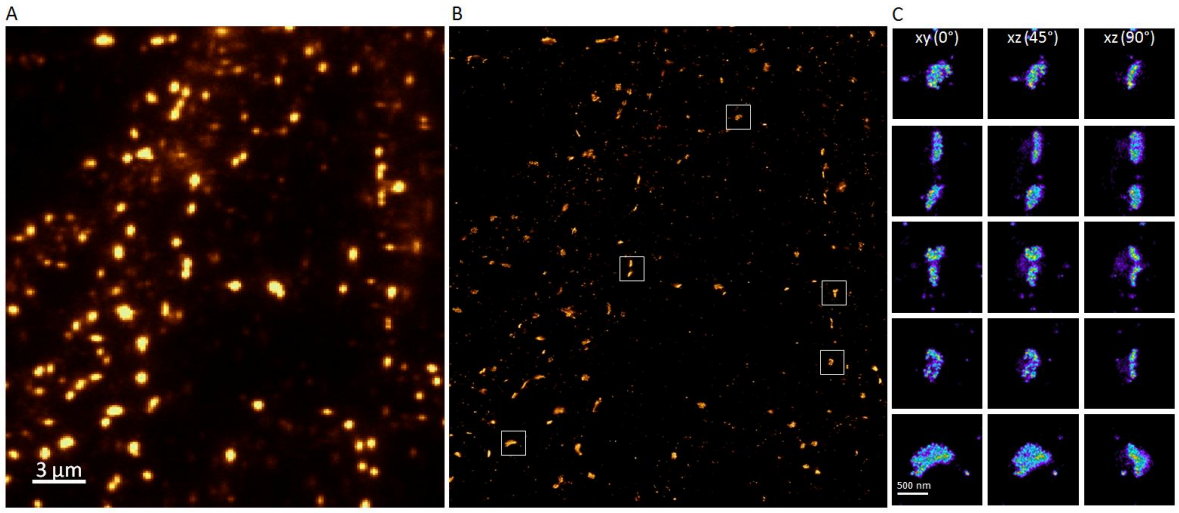


Figure 5-3 : Imagerie dSTORM 3D de la protéine PSD95. (A) Image d'épifluorescence des neurones marqués avec PSD95-Alexa647. (B) Image de super-résolution 2D. (C) Images super-résolution 3D projection d'intensité maximale de régions sélectionnées dans l'image (B) pour les angles (0°, 45° et 90°).

5.2.2. GluA1-Alexa647

Dans cette seconde expérience, nous avons observé GluA1-Alexa647 en microscopie dSTORM 3D (Figure 5-4). Ces résultats indiquent que les clusters de GluA1, ou nanodomaines, sont généralement moins gros (en moyenne de 70 nm de diamètre) que ceux de PSD-95 (Figure 5-4B). Cette observation est en adéquation avec les mesures effectuées récemment (Nair et al., 2013). La 3D confirme que les clusters ne sont pas un effet de projection dans des régions un peu plus denses en récepteurs. Contrairement à PSD-95, les nanodomaines de récepteurs AMPA composés de sous-unité GluA1 n'ont pas de forme 3D détaillée (Figure 5-4C) car ils ont des dimensions très proches de la limite de résolution axiale de notre système, estimée à environ 40 nm pour l'Alexa647. Sur ces reconstructions de neurones fixés, on peut clairement identifier des

récepteurs isolés distribués un peu partout sur la membrane postsynaptique, ainsi que des nanodomaines plus présents au niveau de la tête de l'épine.

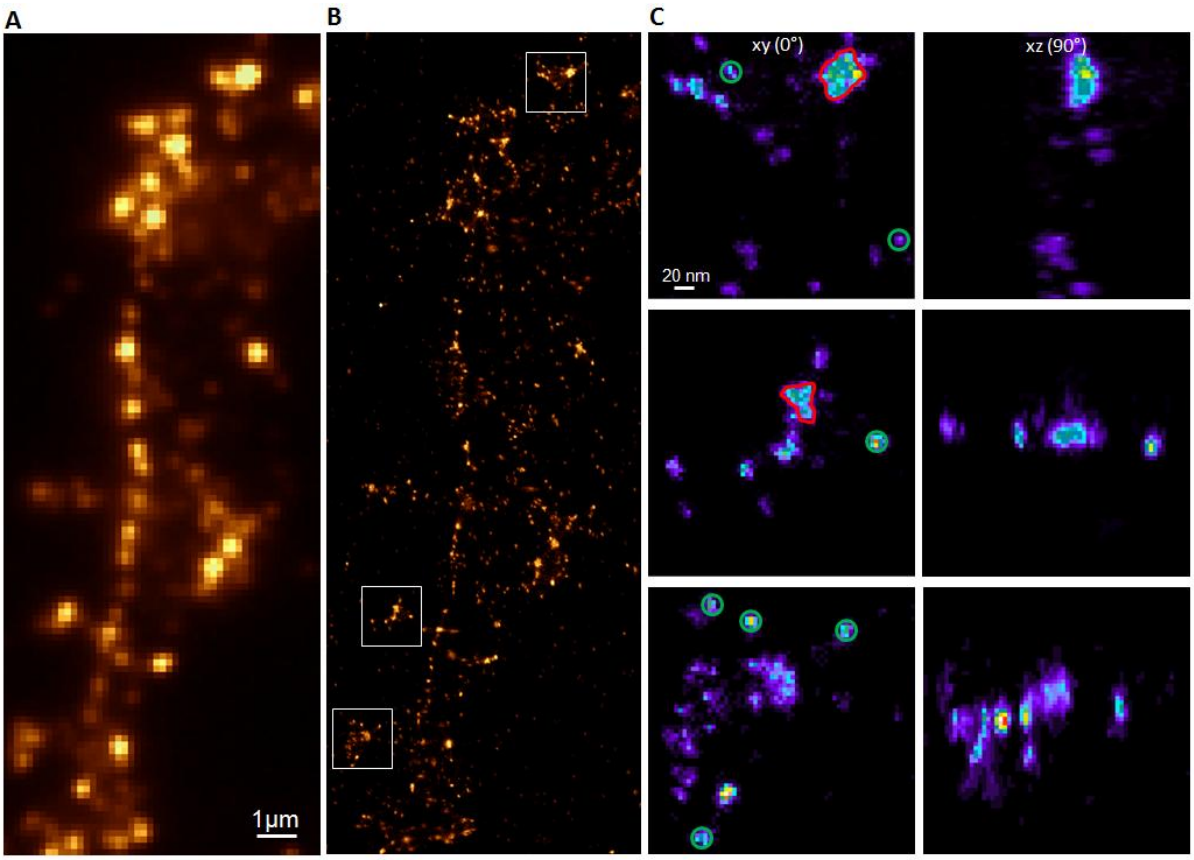


Figure 5-4 : Imagerie dSTORM 3D de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA marqués avec GluA1-Alexa647. (A) Image d'épifluorescence. (B) Image de super-résolution 2D. (C) Images de super-résolution 3D des régions sélectionnées dans l'image (B) pour les angles (0°et 90°). Les régions en vert et en rouge désignent respectivement les récepteurs individuels et les nanodomaines.

5.2.3. PSD95-Rhod-RedX/GluA1-Alexa647

Afin de comparer la localisation relative des sous-unités GluA1-Alexa647 et de PSD95-Rhod, nous avons réalisé de l'imagerie dSTORM 3D en deux couleurs. Ceci est rendu possible grâce à l'utilisation de deux fluorophores ayant des spectres d'excitation et d'émission bien distincts, mais également grâce à la compatibilité des fluorophores à scintiller dans les même conditions d'oxydo-réduction (voir détails dans l'annexe). L'image de super-résolution 2D deux couleurs ne nous permet pas toujours de distinguer si oui ou non il y a colocalisation entre les deux protéines d'intérêt (Figure 5-5A). C'est néanmoins plus évident sur les images de super-résolution 3D, ce qui met en évidence une colocalisation partielle entre le GluA1 et PSD95 (Figure 5-5B). Cela s'explique par le fait que PSD-95 n'est pas la seule protéine d'échafaudage responsable de la création et de la stabilisation des nanodomaines, conformément aux conclusions du papier (Nair

et al., 2013). Seule la surexpression de PSD-95 engendre une augmentation importante de la colocalisation avec la sous-unité GluA1.

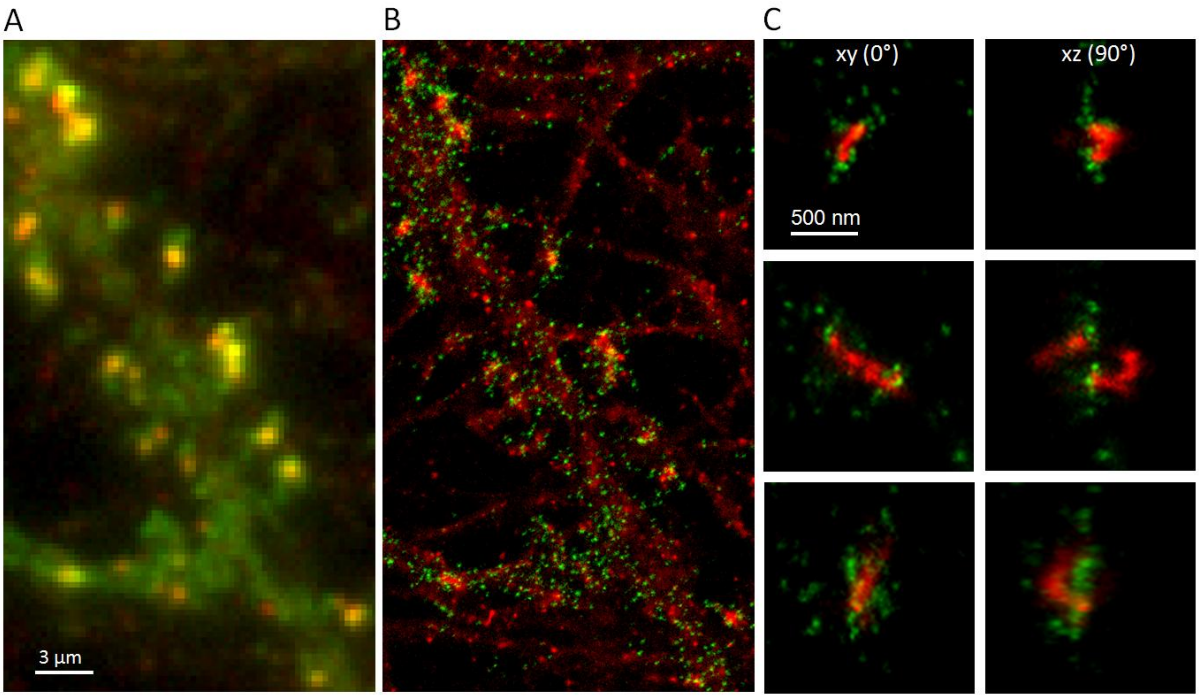


Figure 5-5 : Imagerie dSTORM 3D deux couleurs de la sous-unité GluA1-Alexa647 et la protéine d'échafaudage PSD95-Rhod en neurones. (A) Image d'épifluorescence. (B) Image de super-résolution 2D. (C) Images de super-résolution 3D de quelques régions dans l'image (B) pour les angles (0°et 90°).

A travers ces résultats préliminaires, nous avons illustré l'intérêt d'utiliser la microscopie de super-résolution par localisation 3D dans l'étude de l'organisation de petites structures moléculaires comme c'est le cas pour les récepteurs AMPA et la protéine d'échafaudage PSD-95.

5.3. Structure des récepteurs AMPA par super-résolution optique : rêve ou réalité ?

Dans ce chapitre, nous nous sommes posés la question de savoir s'il est envisageable, avec les techniques de super-résolution optiques les plus résolutives, de résoudre la structure tétramérique des récepteurs AMPA. Plusieurs approches méthodologiques existent dans la littérature pour l'étude de la composition des récepteurs AMPA dans des organismes modèles. On peut citer l'utilisation de l'électrophysiologie ou des outils de biochimie comme le western blot (Lu et al., 2009). Bien évidemment, la microscopie de fluorescence est un outil de choix, notamment grâce à la possibilité de marquer spécifiquement les sous-unités par des anticorps primaires ou secondaires ou bien par fusion génétique.

Dans les domaines transmembranaires, la distance entre les sous-unités est de l'ordre de 5,5 nm tandis qu'elle varie entre 9 nm et 14 nm au niveau de l'espace extracellulaire (Sobolevsky et al.,

2009). Cette échelle n'est bien évidemment pas à la portée de la microscopie de fluorescence conventionnelle. Néanmoins, c'est une échelle accessible pour la microscopie de super-résolution optique par localisation de molécules individuelles. La détermination de la stœchiométrie des récepteurs AMPA ainsi que la localisation de leurs sous-unités apparaît aujourd'hui envisageable.

Nous avons alors essayé d'estimer la stœchiométrie des récepteurs AMPA ainsi que l'observation nanométrique des sous-unités au sein du même récepteur AMPA. Après avoir détaillé les différentes méthodes de la littérature pour la mesure de la stœchiométrie des assemblages biomoléculaires, nous présenterons la méthode que nous avons choisie pour l'estimation du nombre et la visualisation des sous-unités par récepteur. Cette méthode, basée sur la photophysique des fluorophores en dSTORM, sera tout d'abord validée à travers des données de simulation. Puis, nous présenterons des résultats préliminaires obtenus à partir de données expérimentales collectées sur cellules COS exprimant GluA1-Alexa647.

5.3.1. Revue des méthodes récentes de quantification de stœchiométrie des récepteurs AMPA

La plupart des protéines membranaires sont formées de sous-unités organisées en multimètres. Leur stœchiométrie influence fortement leurs propriétés fonctionnelles, comme nous l'avons évoqué dans le cas des récepteurs AMPA. Généralement, la stœchiométrie de ces protéines est estimée en utilisant des analyses biochimiques et macroscopiques fonctionnelles. Parfois, ces analyses se révèlent imprécises comme dans le cas des canaux cationiques contrôlés par les nucléotides cycliques (CNG) dont on a longtemps pensé qu'ils étaient composés de 2:2 sous-unités CNGA1 et CNGB1 (He et al., 2000) avant que l'on démontre quelques années plus tard qu'il s'agit en réalité d'une stœchiométrie de 3:1 des sous-unités CNGA1 et CNGB1 (Zheng et al., 2002, Zhong et al., 2002). Dans la suite, nous allons discuter les différentes méthodes de quantification existantes basées sur l'utilisation de molécules individuelles. Contrairement à la méthode que nous présenterons ensuite, ces méthodes sont globales car elles déduisent la stœchiométrie à partir du signal de fluorescence et non de la localisation.

5.3.1.1. Comptage d'étapes de photoblanchiment

Cette méthode consiste à déduire la stœchiométrie de protéines membranaires à partir du nombre d'étapes de photoblanchiment de fluorophores. Elle exige l'utilisation de marqueurs génétiques fluorescents dont le passage à la fluorescence est irréversible, issues de la famille des GFPs par exemple, qui garantissent un marquage très spécifique monovalent de 1:1 avec la sous-

unité de la protéine d'intérêt. Il est crucial que le processus de photoblanchiment des protéines fluorescentes soit un processus discret ; crucial également le fait que le passage du fluorophore de l'état fluorescent à l'état noir soit irréversible. Par conséquent l'intensité de fluorescence d'un complexe protéique marqué avec une ou plusieurs molécules GFP baissera d'une manière progressive avec étapes discrètes au fil du temps à cause du photoblanchiment irréversible. Le nombre d'étapes révèle alors le nombre de sous-unités marquées dans le complexe.

La Figure 5-6 illustre l'utilisation de cette méthode pour la mesure de la stœchiométrie des récepteurs AMPA homo-tétramériques marqués avec GluA1-GFP (Hastie et al., 2013).

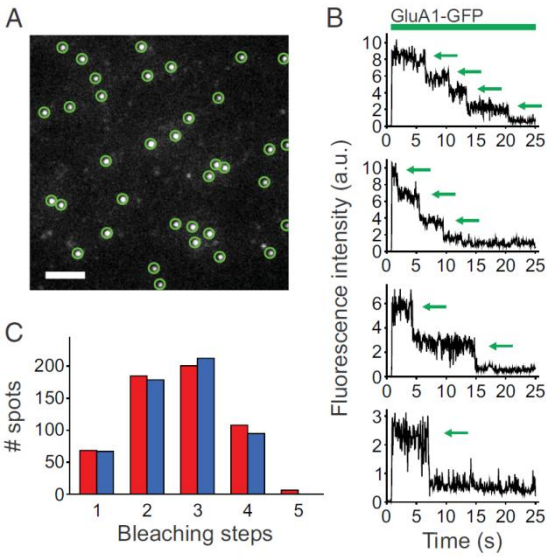


Figure 5-6 : Comptage des sous-unités GluA1 marquées avec la GFP par les méthodes de photoblanchiment discret. (A) Image de récepteurs GluA1-GFP dans la membrane d'ovocytes de Xenopus (échelle 2 µm). (B) Evolution de l'intensité de quelques spots dans le temps montrant quatre, trois, deux et une étape de photoblanchiment. (C) Histogramme du nombre d'étapes de photoblanchiment de GluA1-GFP (Hastie et al., 2013).

Les spots détectés et analysés dans la Figure 5-6A possèdent entre une et quatre sous-unités GluA1-GFP.

Une limite à cette méthode est que les récepteurs doivent être bien séparés les uns des autres, ce qui n'est pas possible dans les épines par exemple où la densité des récepteurs est trop importante à l'échelle de la limite de diffraction. De plus, l'utilisation de protéines de fusion nécessite une surexpression empêchant donc l'extension de cette méthode à l'étude des récepteurs natifs.

5.3.1.2. *Méthode de quantification basée sur la calibration*

Contrairement à la méthode précédemment décrite, la technique de quantification basée sur la calibration emploie des fluorophores organiques couplées avec des anticorps secondaires. Le protocole consiste à calibrer dans un premier temps les distributions des intensités totales de fluorescence pour chaque nombre de protéines possibles, soit d'1 à 6 pour l'exemple ci-dessous (Figure 5-7A). Ces distributions sont déterminées à partir des données de calibration où une seule protéine est marquée par un seul anticorps secondaire couplé à des fluorophores. Pour ce faire, les anticorps secondaires isolés par une dilution adéquate sont disposés directement sur la lamelle. Les distributions pour les nombres supérieures à 1 sont estimées en utilisant la distribution log-normale. Une fois les données expérimentales acquises, leur distribution statistique est comparée à celle de la calibration (Figure 5-7B), permettant l'estimation du nombre de sous-unités. La Figure 5-7C illustre les résultats obtenus par cette méthode pour la caractérisation des cinq protéines SV2 se trouvant au niveau des vésicules synaptiques (Mutch et al., 2007, Mutch et al., 2011).

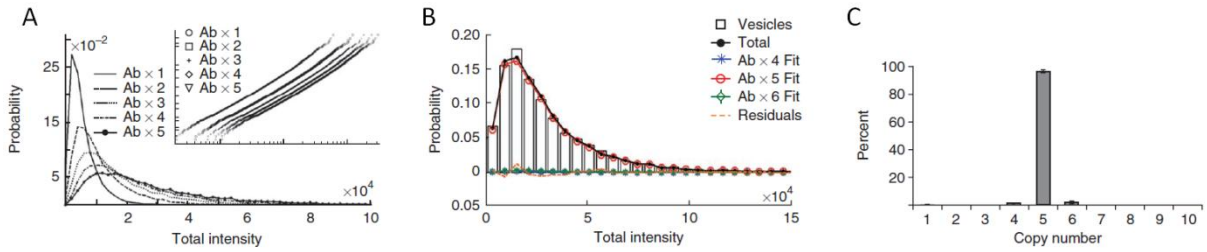


Figure 5-7 : Ajustement des données expérimentales de l'échantillon sur les données de calibration pour l'estimation du nombre de protéines par vésicule synaptique. (A) Distributions des intensités totales de fluorescence de 1 à 6 protéines marquées avec des anticorps. (B) Comparaison des distributions d'intensités des données expérimentales et de calibration (avec 4, 5 et 6 protéines). (C) Estimation du nombre de protéines SV2 se trouvant au niveau des vésicules synaptiques (Mutch et al., 2011).

Cette méthode basée sur la calibration exige une importante stabilité du système optique de manière à ce que les intensités de fluorescence mesurées sur les anticorps secondaires et sur l'échantillon biologique soient reproductibles et du même ordre de grandeur. De plus, sachant que la photophysique des anticorps change en fonction de leur environnement, il est probable que le nombre de photons émis par les fluorophores sur lamelle diffère de celui en condition cellulaire. Enfin, comme dans la méthode précédente, il est nécessaire que les récepteurs soient bien séparés les uns des autres pour pouvoir être résolus optiquement avant l'analyse.

5.3.2. Méthode basée sur la photophysique des fluorophores

Les méthodes précédentes ne sont pas entièrement satisfaisantes ni applicables dans le cadre de notre étude consistant à déterminer la stœchiométrie et la localisation sous-unitaire des récepteurs AMPA endogènes dans les neurones. Nous avons exploré une nouvelle méthode quantitative exploitant la microscopie dSTORM et des fluorophores organiques très brillants offrant une précision de localisation nanométrique grâce à leur photophysique (Dempsey et al., 2011).

La précision de localisation en microscopie de molécules individuelles est estimée selon la formule 2-13. Pour des signaux intenses, elle est d'une part inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre de photons *N* collectés par détection d'une molécule individuelle par image. Plus le nombre de photons est important, meilleure est la précision de localisation. D'autre part, la précision de localisation est proportionnelle à la largeur de la PSF. Plus la PSF est étroite, soit dans les longueurs d'ondes courtes selon la formule 2-4, meilleur est la précision de localisation. Pour un ensemble de données issues du même système d'acquisition et pour un même fluorophore, cette largeur reste relativement homogène aux effets 3D près.

En microscopie de super-résolution par localisation, les photons émis par les fluorophores sont collectés de préférence par le biais d'une caméra EMCCD, étant donné son efficacité quantique très élevé (~90%). Ce type de caméra nous permet de retrouver précisément le nombre de photons collectés à partir des intensités de l'image. En effet, une certaine linéarité entre le signal et le nombre de photons est respectée, même après les différentes étapes de conversion et d'amplification. La relation entre les deux mesures est donnée approximativement par la formule suivante :

$$N_{photons} = \frac{I_{numérique} * Gain_{analogique}}{Gain_{électronique}} \qquad 5\text{-}1$$

où $I_{numérique}$ est le signal mesuré en niveaux de gris ou ADU (Analogic to Digital Unit), $Gain_{électronique}$ est le gain EM en nombre d'électrons par photons et $Gain_{analogique}$ est le gain analogique, exprimé en électrons par ADU. La Tableau 5-1 donne un exemple de valeurs des gains pour la caméra EMCCD EVOLVE512B (Photometrics), utilisées pour calculer le nombre de photons.

Configuration	Gain mesuré (électrons/ADU)
1	11,7
2	6,7
3	3,2

Tableau 5-1 : Tableau des gains analogiques pour la caméra CCD ELVOLVE512.

L'estimation du nombre de photons par localisation permet de déterminer la précision de localisation pour chaque molécule détectée. Ceci va nous permettre de prendre en considération la photophysique des fluorophores utilisés dans leur contexte cellulaire, ce qui est particulièrement important dans le cas des fluorophores organiques. En effet, la photophysique des fluorophores organiques en microscopie dSTORM est très sensible aux différents paramètres d'imagerie, dont l'environnement chimique local dans l'échantillon. Le Tableau 5-2 récapitule les propriétés photophysiques de plusieurs fluorophores organiques pour la microscopie dSTORM, pour 2 milieux tampons différents (MEA et βME) (Dempsey et al., 2011). On voit très clairement que le nombre de photons par cycle de fluorescence et le nombre de cycles, 2 paramètres majeurs en microscopie dSTORM, sont très variables en fonction du milieu. Pour l'Alexa647 par exemple, le milieu βME est plus adapté, ce qui n'est pas le cas pour tous les fluorophores. Par conséquent, le choix du milieu pour optimiser le « blinking » des fluorophores est très délicat, notamment lorsqu'il s'agit de faire des expériences multi-couleurs. De plus, ces mesures sont assujetties à des fluctuations en conditions cellulaires car elles ont été estimées à partir d'anticorps individuels disposés sur lamelle. Pour toutes ces raisons, chaque fluorophore individuel peut être considéré comme étant un système quantique unique perturbé par plusieurs facteurs locaux empêchant d'opter pour une approche globale pour la mesure de la stœchiométrie. Voilà pourquoi, il est peu envisageable d'utiliser une approche quantitative basée sur la calibration, comme celle présentée précédemment : elle ne serait pas reproductible.

| Summary of switching properties of the 26 dyes tested in this study

					Detected photons per switching event		Equilibrium on-off duty cycle (400–600 s)		Survival fraction after illumination for 400 s		Number of switching cycles (mean)	
Dye	Excitation maximum (nm)[a]	Emission maximum (nm)[a]	Extinction (M^{-1} cm^{-1})[b]	Quantum yield[c]	MEA	βME	MEA	βME	MEA	βME	MEA	βME
Red-absorbing												
Alexa Fluor 647	650	665	239,000	0.33	3,823	5,202	0.0005	0.0012	0.83	0.73	14	26
Cy5	649	670	250,000	0.28	4,254	5,873	0.0004	0.0007	0.75	0.83	10	17
Atto 647	645	669	120,000	0.2	1,526	944	0.0021	0.0016	0.46	0.84	10	24
Atto 647N	644	669	150,000	0.65	3,254	4,433	0.0012	0.0035	0.24	0.65	9	39
Dyomics 654	654	675	220,000	–	3,653	3,014	0.0011	0.0018	0.79	0.64	20	19
Atto 655	663	684	125,000	0.3	1,105	657	0.0006	0.0011	0.65	0.78	17	22
Atto 680	680	700	125,000	0.3	1,656	987	0.0019	0.0024	0.65	0.91	8	27
Cy5.5	675	694	250,000	0.28	5,831	6,337	0.0069	0.0073	0.87	0.85	16	25

Tableau 5-2: Tableau récapitulatif de différentes propriétés photophysiques des fluorophores organiques utilisés pour le dSTORM dans le spectre d'émission rouge lointain en fonction du milieu tampon (Dempsey et al., 2011).

Notre méthode est basée sur l'utilisation du nombre de photons mesuré par détection comme critère de filtrage, dans le but de déterminer et représenter la structure des récepteurs AMPA avec la précision adéquate. Le tri des localisations sur le nombre de photons détectés va nous

permettre de « nettoyer » l'image de super-résolution avec une résolution minimale déterminée. Ceci n'est possible qu'avec l'utilisation des fluorophores organiques et la méthodologie dSTORM, car les fluorophores peuvent cycler jusqu'à quelques dizaines de fois avant le photoblanchiment entre l'état fluorescent et l'état noir.

Pratiquement, les images de molécules individuelles acquises sont analysées par l'algorithme de localisation en ondelettes décrit dans le chapitre 3. La liste des coordonnées (*x, y*) est utilisée comme valeurs initiales pour l'étape d'ajustement Gaussien 2D similaire à celle utilisée en 3D dans le chapitre 4. Le but de l'ajustement Gaussien est d'estimer la largeur de la PSF et le nombre total de photons de chaque événement de détection et d'en déduire la précision de localisation par la formule 2-13. Ainsi, toutes les localisations ayant une précision de localisation suffisante seront conservées et représentées par une distribution Gaussienne d'écart-type égale à la précision de localisation. L'intérêt de cette approche est de pouvoir filtrer les données et de reconstruire l'image de super-résolution en fonction de la précision de localisation par détection.

Dans la suite, nous allons nous focaliser sur l'analyse de données de simulations et expérimentales de récepteurs AMPA hétérotétramères composés de sous-unités GluA1 et GluA2.

5.3.2.1. Simulations

Nous avons simulé le processus d'acquisition d'images de molécules individuelles en microscopie dSTORM afin de déterminer les conditions expérimentales nécessaires pour pouvoir résoudre les structures tétramériques des récepteurs AMPA. Dans notre modèle, les deux sous-unités du même type ont été fixées à une distance de 14 nm l'une de l'autre. Un tirage aléatoire de 50 localisations par sous-unité a été effectué afin de simuler le « blinking » des fluorophores liés à chacune des sous-unités. Nous avons simulé quatre conditions, fixant le nombre de photons par détection à 200, 500, 700 et 1000 photons. Ces valeurs couvrent à la fois différents types de fluorophores mais également un ensemble de valeurs expérimentales pour le fluorophore Alexa647 en conditions cellulaires (Figure 5-10D). Chaque PSF a été simulée avec un profil Gaussien d'écart type 1.4 pixel et un pixel de 100nm, écart type moyen mesuré sur les données expérimentales. Le processus de simulation est similaire à celui utilisé dans les chapitres 3 et 4. Le Tableau 5-3 synthétise l'ensemble des mesures estimées théoriquement pour chaque jeu de simulation, la résolution (définie par la largeur à mi-hauteur de la PSF) étant estimée à $2{,}3\sigma_{\text{précision}}$.

# photons	$\sigma_{précision}$ (nm)	Résolution (nm)
200	10	23
500	6.2	14
700	5.3	12
1000	4.3	10

Tableau 5-3 : Mesures de la précision et de la résolution estimées théoriquement pour chaque condition de simulation.

Chaque localisation d'une molécule individuelle est représentée dans l'image de super-résolution par une distribution gaussienne d'écart type $\sigma_{\text{précision}}$, pondérée par le nombre de photons détectés comme illustré dans la Figure 5-8.

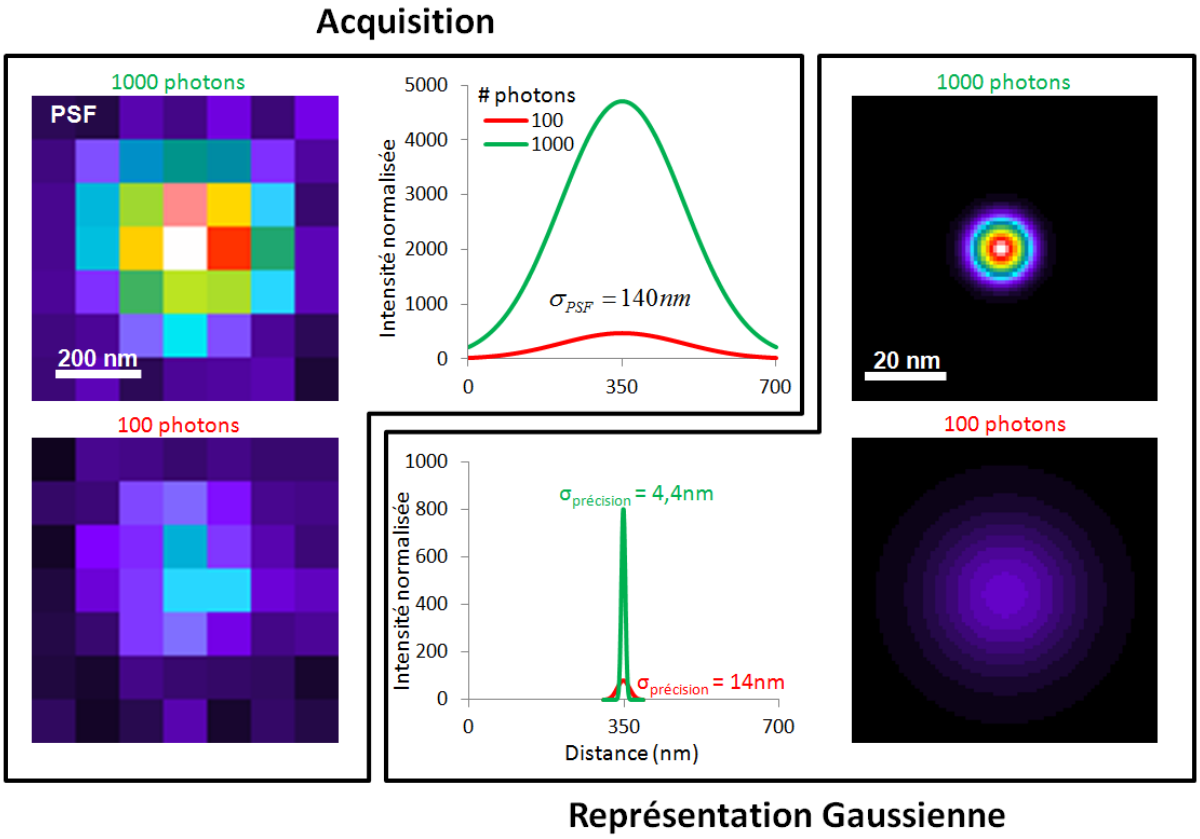


Figure 5-8 : Représentation d'une localisation par une distribution Gaussienne de largeur proportionnelle à la racine carrée du nombre de photons détectés.

La Figure 5-9A illustre les images de super-résolution reconstruites à partir des différents jeux de simulation. Nous pouvons voir sur les profils d'intensités des différentes simulations de la Figure 5-9B que la séparation entre deux sous-unités commence à être visible lorsque le nombre de photons est égal ou supérieur à 700, et réellement distinguable au sens de la résolution (c'est-à-dire que le minimum d'intensité est situé à la mi-hauteur) au-delà de 1000 photons. Ce résultat est légèrement plus pessimiste que l'estimation théorique donnée par la formule 2-7 et le

Tableau 5-3, qui donnent une résolution théorique de 10 nm dans ces conditions de simulation et seulement 500 photons pour pouvoir séparer les récepteurs. Ce seuil déterminé sur les simulations va nous permettre de filtrer les données expérimentales afin d'améliorer la reconstruction et tenter de résoudre les différentes sous-unités des récepteurs.

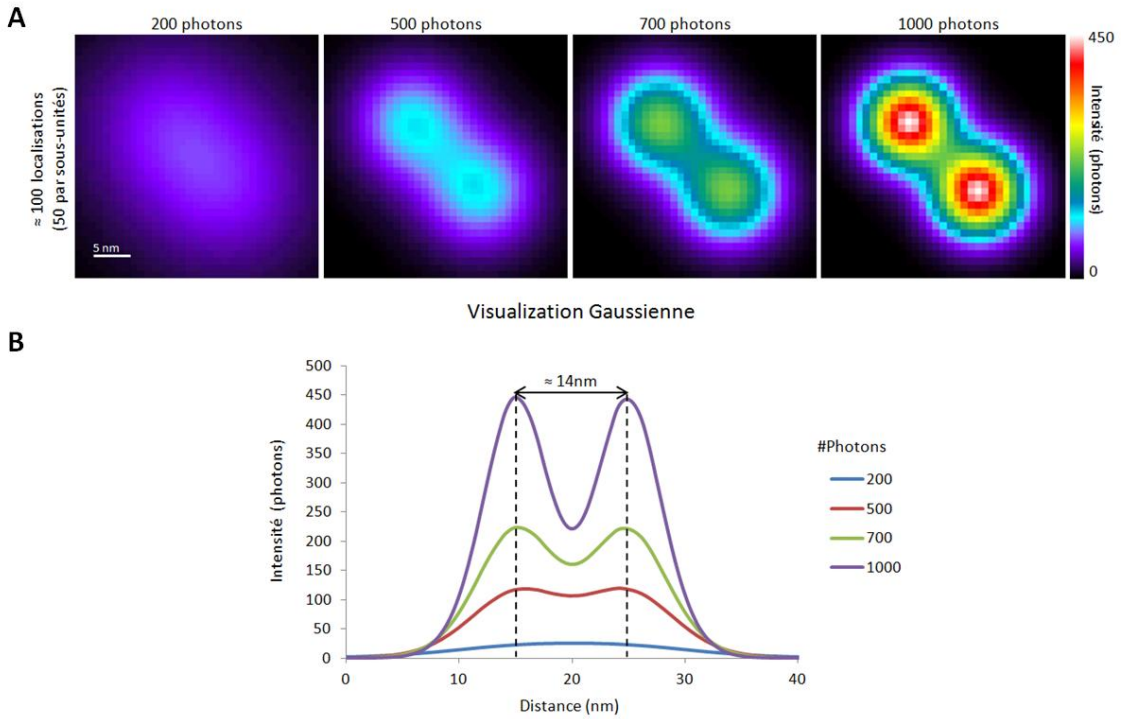


Figure 5-9 : Simulation de deux sous-unités de récepteurs AMPA distantes de 14 nm par dSTORM. (A) Images de super-résolution reconstruites pour les différentes configurations (200, 500, 700 et 1000 photons). (B) Profils d'intensité correspondant à chaque condition.

5.3.2.2. Résultats expérimentaux préliminaires

Afin de pouvoir imager des récepteurs AMPA bien isolés les uns des autres sur l'image de super-résolution, nous avons utilisé dans un premier temps des cellules COS transfectées avec les sous-unités GluA1 et GluA2. Les cellules ont été fixées et marquées par des anticorps primaires et secondaires couplés avec les fluorophores organiques Alexa647-GluA1 et Rhodamine6G-GluA2. L'ensemble du protocole biologique et la description du système microscopique d'acquisition de données sont détaillés dans l'annexe.

Dans une première étape, les récepteurs potentiels ont été identifiés à partir de l'image de super-résolution reconstruite à partir de toutes les localisations (Figure 5-10A) en utilisant un seuil portant sur la taille des régions sélectionnées (< 40nm). Ensuite, chaque région sélectionnée (Figure 5-10B) a été analysée en détail, filtrée et reconstruite en prenant en compte le nombre de photons par détection.

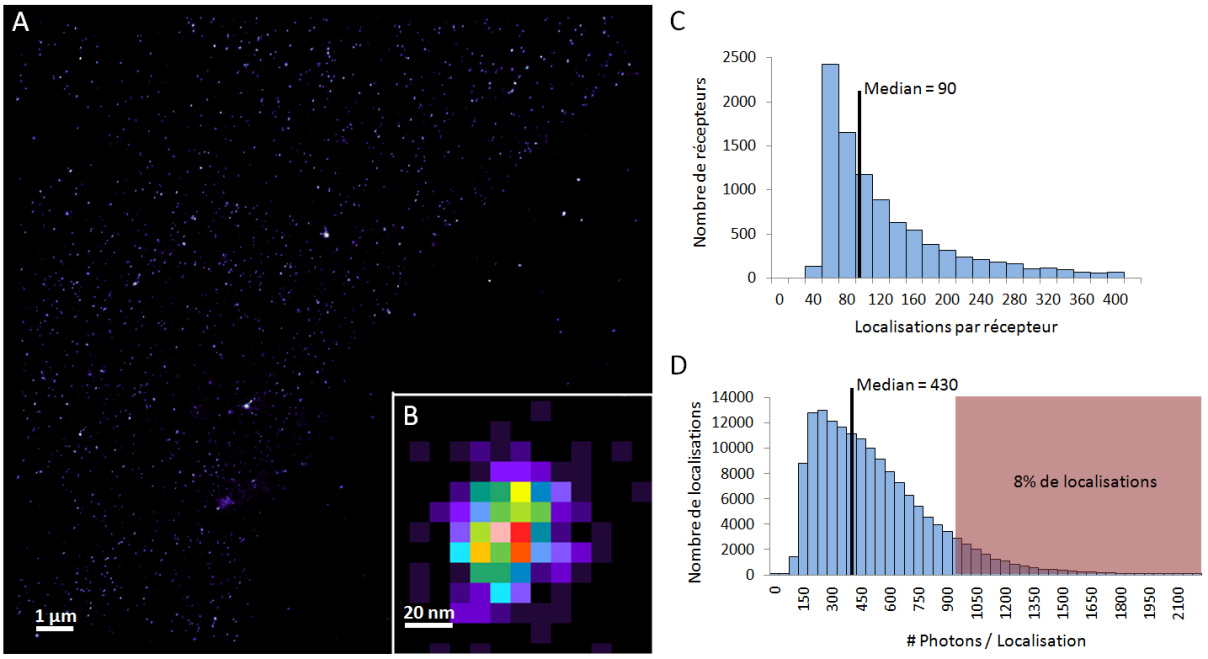


Figure 5-10 : Données expérimentales de GluaA1-Alexa647 dans les cellules COS. (A) Image de super-résolution reconstruite à partir de toutes les localisations. (B) Image de super-résolution d'un récepteur isolé. (C) Histogramme du nombre de localisations par récepteurs. (D) Histogramme du nombre de photons par événement de localisation.

La Figure 5-11 illustre l'application de notre méthode sur deux récepteurs isolés. La visualisation classique, où chaque localisation sans exception est ajoutée dans l'image de super-résolution de pixel de 8 nm de côté ne permet pas de résoudre la structure des récepteurs. Grâce à la visualisation Gaussienne prenant en compte le nombre de photons (Figure 5-8) sur toutes les localisations, deux pics commencent à émerger. Cela se confirme en filtrant les données, et en ne conservant que les détections supérieures à 1000 photons. Ce filtrage conserve uniquement environ 10% du nombre totale de localisations par récepteur isolé. Malgré ce filtrage, il subsiste plusieurs localisations par récepteur, permettant de reconstruire sa structure. Ceci est possible grâce au couplage de plusieurs fluorophores par sous-unité GluA1 et le grand nombre de cycles par fluorophore de l'Alexa647 (Dempsey et al., 2011). La distance entre les deux pics est estimée entre 16 et 18 nm ce qui est cohérent, compte tenu de la taille des anticorps primaires et secondaires. Cela nous garantit également que le signal de fluorescence est bien issu de deux anticorps secondaires différents et non pas des fluorophores appartenant au même anticorps secondaire car les fluorophores d'un anticorps secondaire donné sont disposés dans un espace restreint de quelques nanomètres. Par conséquent, ce sont bien deux sous-unités différentes du même récepteur AMPA, même si des anticorps secondaires à plusieurs fluorophores ont été utilisés.

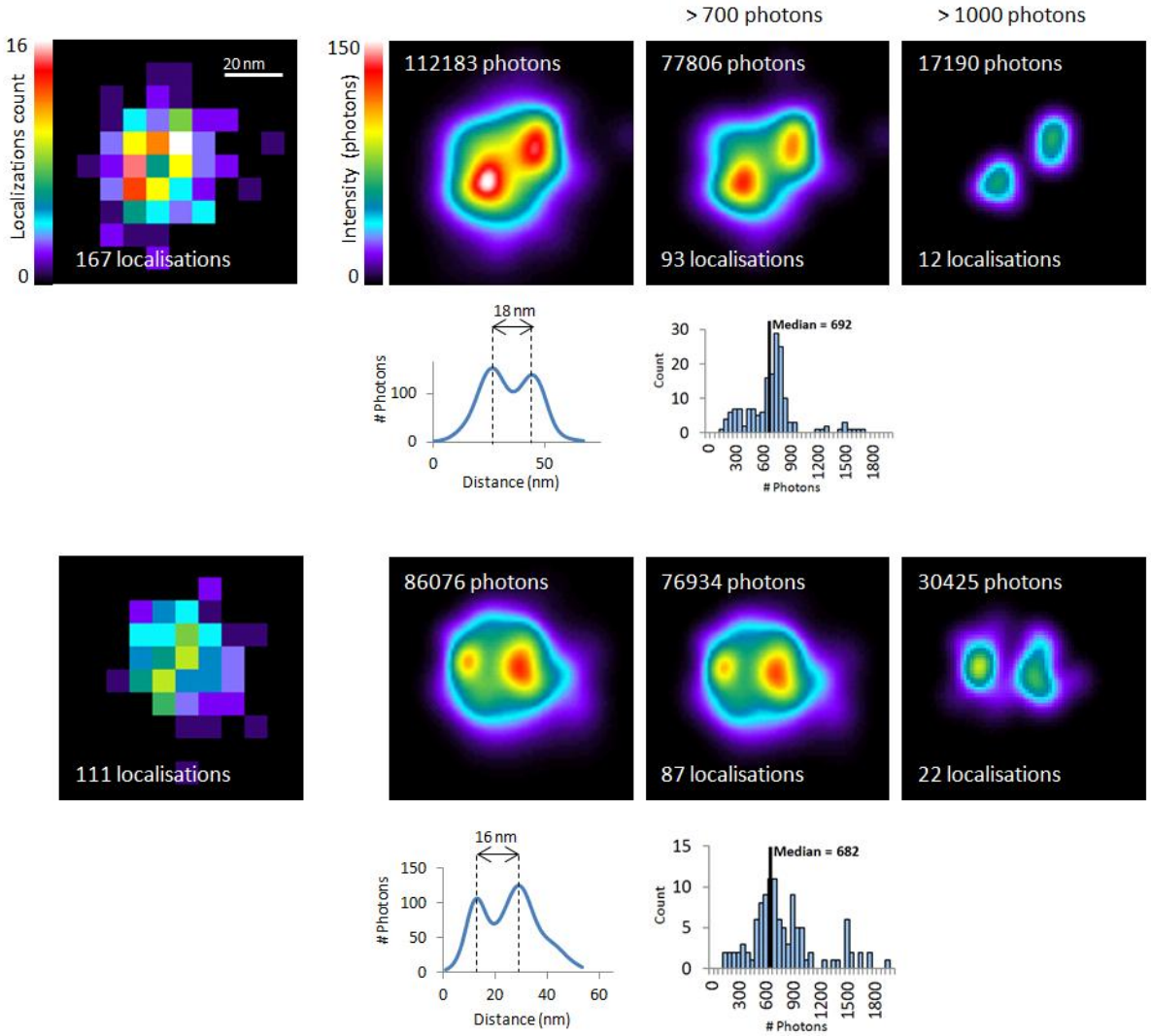


Figure 5-11 : Visualisation et quantification des sous-unités GluA1-Alexa647 de récepteurs AMPA isolés. La 1ère colonne à gauche représente les images de super-résolution reconstruites avec une visualisation classique (chaque localisation est représentée par un pixel d'intensité unitaire). La 2ème colonne illustre la visualisation Gaussienne de toutes les localisations. La 3ème et 4ème colonne illustre la visualisation Gaussienne avec un filtrage des localisations de moins de 700 et 1000 photons respectivement. Les distances entre les deux unités GluA1-Alexa647 sont estimées entre 16 et 18 nm.

Dans un second temps, nous avons tenté de résoudre la structure des récepteurs AMPA dans des cultures de neurones à partir de données acquises au cours d'une précédente étude (Nair et al., 2013). Il s'agit de neurones marqués par des anticorps primaires et secondaires couplés avec les fluorophores organiques Alexa647-GluA1. Contrairement aux données acquises sur COS, l'histogramme du nombre de photons par événement de localisation (Figure 5-12E) illustre l'impossibilité de résoudre la structure des récepteurs AMPA avec ces données. On observe en effet un nombre de photons très inférieur, impliquant une dégradation importante de la résolution latérale d'environ 37nm en moyenne. Cet écart important observé entre les données

sur cellules COS (médiane = 456 photons par molécule) et celles de neurones (médiane = 97 photons par molécule) est certainement dû aux conditions d'imagerie telles que les puissances des lasers, qui sont ajustées généralement d'une façon empirique. D'autres critères, comme le milieu de montage, peuvent également avoir une influence sur la photophysique des fluorophores. Malgré cela, la visualisation Gaussienne (Figure 5-12C) permet d'améliorer la qualité de la visualisation et de révéler plus précisément la structure des nanodomaines et des récepteurs périphériques.

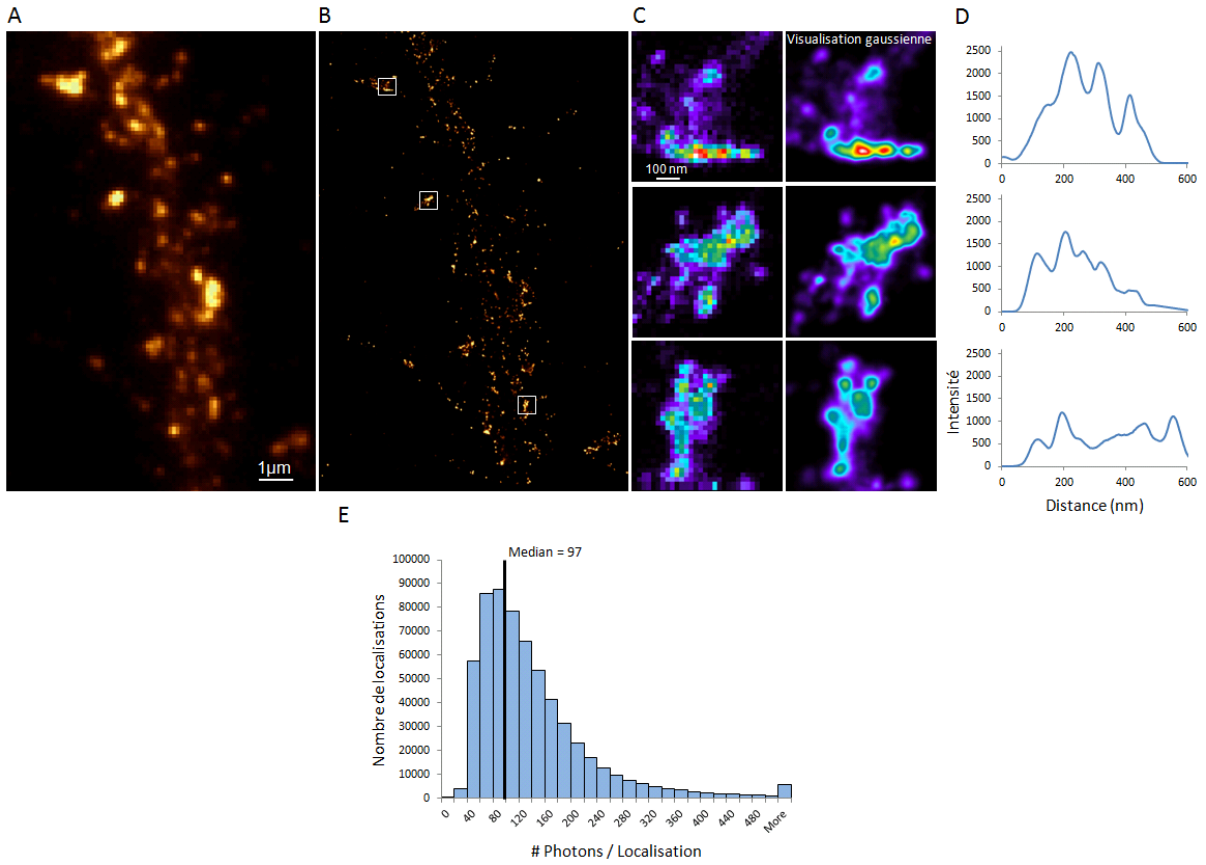


Figure 5-12 : Imagerie dSTORM de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA marqués avec GluA1-Alexa647. (A) Image d'épifluorescence. (B) Image de super-résolution. (C) Images de super-résolution des régions sélectionnées dans l'image (B) pour la visualisation par intensité (gauche) et par nombre de photons (droite). (D) Profils d'intensité correspondant à chaque région où les pics représentent potentiellement des récepteurs. (E) Histogramme du nombre de photons par événement de localisation.

5.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré l'intérêt d'employer la microscopie de super-résolution par localisation dSTORM pour l'étude des récepteurs AMPA. Grâce à l'imagerie 3D des récepteurs AMPA et de la protéine d'échaudage PSD-95 nous avons confirmé leur organisation en clusters et démontré l'intérêt de la microscopie 3D à ces niveaux de résolution. Nous avons ensuite proposé une nouvelle approche quantitative pour l'analyse et la visualisation basée sur le

nombre de photons détectés par événement de localisation. Nous avons tout d'abord généré des données de simulation à partir de données empiriques afin de déterminer les conditions expérimentales optimales pour résoudre la structure des récepteurs AMPA. Nous avons par la suite testé cette méthode sur des données expérimentales préliminaires dans des cellules COS et nous avons pu estimer dans quelques exemples une distance de 16 à 18 nm entre deux sous-unités GluA1 du même récepteur AMPA.

Nous avons par la suite tenté d'appliquer notre méthode de visualisation sur des données de neurones acquises antérieurement. Malheureusement, pour des raisons qui peuvent être multiples, la distribution du nombre de photons par localisation n'a pas permis d'obtenir des résolutions latérales suffisantes pour permettre de résoudre la structure des récepteurs AMPA à l'échelle nanométrique, comme sur les cellules COS. Cette expérience montre qu'il pourrait être primordial de développer un outil de quantification de la résolution latérale directement sur le microscope, afin de guider l'expérimentateur pour ajuster au mieux les conditions expérimentales d'acquisition.

Néanmoins, aux vues des niveaux de résolution pouvant être atteints par ces nouvelles techniques, il est indispensable d'optimiser le marquage afin de réduire les artefacts induits par la taille des anticorps primaires et secondaires classiques, qui empêchent d'apprécier les distances réelles. Les pistes envisageables possibles sont l'utilisation de fragments d'anticorps (Fab) ou d'anticorps de lama (nanobodies) directement couplés aux fluorophores afin de diminuer la taille de l'anticorps primaire et de supprimer l'utilisation de l'anticorps secondaire, le tout sur des récepteurs endogènes. Une autre possibilité est l'utilisation de la technologie HALO-tag, très avantageuse par sa spécificité (Los et al., 2008) mais qui nécessite malheureusement l'utilisation de récepteurs génétiquement fusionnés aux tags et donc d'une surexpression.

6. Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à optimiser des techniques de super-résolution basées sur la localisation de molécules individuelles, tant sur les aspects de l'acquisition et du traitement, que sur la représentation et l'exploitation quantitative des données. Notre motivation est que cette nouvelle génération de techniques, certainement une des plus performantes dans le domaine de la super-résolution, reste encore sous-exploitée et limitée dans son utilisation en routine par des biologistes non spécialistes.

Nous avons tout d'abord proposé une nouvelle approche de localisation 2D de particules basée sur la décomposition d'ondelettes. Nous en avons évalué les performances sur des données de simulation en la comparant à la méthode de référence d'ajustement Gaussien. Nous avons obtenu des précisions de localisation nanométriques similaires, à 10%, tout en étant 20 fois plus rapide. Sur des données expérimentales de neurones en culture marqués à l'actine-tdEOS acquises en PALM, nous avons réduit le temps de calcul de 117 minutes à 7 minutes, pour plus d'un million de molécules détectées et 50000 images acquises.

A partir de ces résultats, nous avons développé une stratégie permettant la localisation et la reconstruction d'images de molécules individuelles en temps réel. Ces travaux ont été motivés par le fait que les temps de calcul obtenus avec la méthode de décomposition d'ondelettes étaient inférieurs aux temps d'acquisition.

Néanmoins, cette technique basée sur le barycentre ne permettait pas la localisation axiale par les méthodes telles que l'astigmatisme. Nous avons optimisé l'étape d'ajustement Gaussien en utilisant les cartes GPU et avons obtenu un gain en temps de calcul de 70x par rapport aux CPU, avec plus de 80000 ajustements effectués par seconde. Ces performances nous ont permis de mettre en place une solution logicielle de localisation 2D/3D en temps-réel, que nous avons baptisée WaveTracer. Nous avons également implémenté la possibilité d'ajuster automatiquement le niveau de photoconversion en fonction des statistiques de densités de localisation calculées au cours de l'acquisition. Ceci nous permet d'optimiser la densité de molécules fluorescentes pendant toute la durée de l'enregistrement, réduisant ainsi le temps nécessaire à l'acquisition et la reconstruction de l'image de super-résolution. Comme précédemment, nous avons évalué et comparé notre solution logicielle à plusieurs logiciels de référence publiés récemment dans la littérature et participé à l'ISBI challenge 2012. Notre méthode a fait l'objet de deux publications scientifiques, d'un dépôt légal, d'un dépôt de brevet et d'un transfert de technologie industriel.

Adel Kechkar

Les niveaux de résolution obtenus en microscopie dSTORM, déterminés expérimentalement à environ 10x10x40 nm^3 avec le fluorophore Alexa647, nous ont motivé pour tenter d'élucider l'organisation et la structure des récepteurs AMPA dans les neurones en culture. Dans un premier temps, nous avons montré l'intérêt d'employer la microscopie dSTORM 3D pour observer l'organisation des récepteurs AMPA et la protéine d'échaudage PSD-95 à l'échelle nanométrique. Les résultats obtenus pour les récepteurs AMPA confirment ceux obtenues en 2D, permettant d'observer l'organisation des récepteurs sous la forme de nanodomaines d'une 60aine de nanomètres de diamètre. Les clusters de PSD-95, quant à eux, sont organisés en structures relativement homogènes en forme de bananes de quelques centaines de nanomètres de longueur, colocalisant partiellement avec les récepteurs AMPA. Dans un second temps, nous avons exploré une nouvelle méthode quantitative pour la mesure de la stœchiométrie des récepteurs AMPA, basée sur la visualisation et la photophysique des fluorophores organiques. Grâce à cette approche, nous avons pu visualiser et distinguer les deux sous-unités GluA1 d'un même récepteur à des distances de 16 à 18 nm. Cette distance est légèrement au dessus de la distance réelle attendue, certainement à cause de la taille des anticorps secondaires et primaires.

La continuité de ce travail est d'étendre les possibilités offertes par ces techniques de localisation. Tout d'abord, nous avons illustré dans notre dernière étude que la résolution offerte par la microscopie de super-résolution est du même ordre de grandeur, voire meilleure, que la précision des techniques de marquage standards. A ces niveaux de résolution, le marquage par des anticorps secondaires des sous-unités de récepteurs AMPA et d'une façon générale des protéines, peut biaiser les distances mesurées en microscopie de super-résolution à cause de leur taille. Une optimisation des techniques de marquage s'impose afin d'obtenir des localisations plus proches de la réalité. Les pistes envisagées sont l'utilisation de fragments d'anticorps (Fab) ou d'anticorps de lama (nanobodies) directement couplés aux fluorophores afin de diminuer la taille de l'anticorps primaire et de supprimer l'utilisation de l'anticorps secondaire, le tout sur des récepteurs endogènes. Une autre possibilité est l'utilisation de la technologie HALO-tag, très avantageuse par sa spécificité (Los et al., 2008) mais qui nécessite malheureusement l'utilisation de récepteurs génétiquement fusionnés aux tags et donc d'une surexpression.

Parmi les directions de développement privilégiées, dans la droite ligne de ce travail, nous allons étendre notre approche temps-réel au suivi automatique de molécules individuelles. En effet, les techniques de sptPALM et de uPAINT offrent la capacité de suivre un grand nombre de biomolécules marquées avec une résolution spatiale nanométrique et une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. En plus de l'organisation, ces techniques fournissent une cartographie de la dynamique des différentes protéines à l'échelle moléculaire, nous informant sur leurs interactions. Néanmoins, l'étape de suivi est une étape très lourde en temps de calcul. L'intérêt d'une approche en temps-réel est d'éviter les limites imposées par le traitement post-acquisition. De plus, le suivi de molécules individuelles en temps réel permettrait de mettre au point une plateforme de criblage à haut contenu (HCS) à l'échelle nanométrique, où la quantité des données ainsi que les temps de traitement nécessaires sont multipliés par le nombre de conditions à tester, constituant un véritable obstacle à employer le HCS en routine avec la microscopie de super-localisation. Une telle approche pourrait permettre l'étude de certaines physiopathologies cellulaires à l'échelle quasi-moléculaire.

Bibliographie

Abraham AV, Ram S, Chao J, Ward ES, Ober RJ (2009) Quantitative study of single molecule location estimation techniques. Opt Express 17:23352-23373.

Agard DA, Hiraoka Y, Shaw P, Sedat JW (1989) Fluorescence microscopy in three dimensions. Methods in cell biology 30:353-377.

Ashby MC, Maier SR, Nishimune A, Henley JM (2006) Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26:7046-7055.

Axelrod D (2001) Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. Traffic 2:764-774.

Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. Biophysical journal 16:1055-1069.

Baatz M, Schäpe A (2000) Multiresolution Segmentation: an optimization approach for high quality multi-scale image segmentation. In: Angewandte Geographische Informationsverarbeitung XII Beiträge zum AGIT-Symposium Salzburg 2000, Karlsruhe, Herbert Wichmann Verlag(Strobl, J., ed), pp 12-23.

Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. Neuron 53:719-734.

Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science (New York, NY) 313:1642-1645.

Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. Nature 417:649-653.

Boulanger J, Sibarita JB, Kervrann C, Bouthemy P, Ieee (2008) Non-parametric regression for patch-based fluorescence microscopy image sequence denoising. In: 2008 Ieee International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Vols 1-4, pp 748-751.

Carlton PM, Boulanger J, Kervrann C, Sibarita JB, Salamero J, Gordon-Messer S, Bressan D, Haber JE, Haase S, Shao L, Winoto L, Matsuda A, Kner P, Uzawa S, Gustafsson M, Kam Z, Agard DA, Sedat JW (2010) Fast live simultaneous multiwavelength four-dimensional optical microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:16016-16022.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science (New York, NY) 263:802-805.

Cheezum MK, Walker WF, Guilford WH (2001) Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. Biophysical journal 81:2378-2388.

Dani A, Huang B, Bergan J, Dulac C, Zhuang X (2010) Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. Neuron 68:843-856.

Daubechies I (1992) Ten lectures on wavelets: SIAM.

Dempsey GT, Vaughan JC, Chen KH, Bates M, Zhuang X (2011) Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. Nat Methods 8:1027-1036.

Donoho DL, Johnstone IM (1995) Adapting to Unknown Smoothness via Wavelet Shrinkage. Journal of the American Statistical Association 90:1200-1224.

Erik L (2008) NVIDIA Tesla: A Unified Graphics and Computing Architecture. vol. 28 (John, N. et al., eds), pp 39-55.

Folling J, Bossi M, Bock H, Medda R, Wurm CA, Hein B, Jakobs S, Eggeling C, Hell SW (2008) Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. Nat Methods 5:943-945.

Frost NA, Shroff H, Kong H, Betzig E, Blanpied TA (2010) Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. Neuron 67:86-99.

Giannone G, Hosy E, Levet F, Constals A, Schulze K, Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E, Tampe R, Choquet D, Cognet L (2010) Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. Biophysical journal 99:1303-1310.

Gustafsson MG (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. Journal of microscopy 198:82-87.

Gustafsson MG (2005) Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:13081-13086.

Gustafsson MG, Agard DA, Sedat JW (1999) I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution. Journal of microscopy 195:10-16.

Hastie P, Ulbrich MH, Wang HL, Arant RJ, Lau AG, Zhang Z, Isacoff EY, Chen L (2013) AMPA receptor/TARP stoichiometry visualized by single-molecule subunit counting. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:5163-5168.

He Y, Ruiz M, Karpen JW (2000) Constraining the subunit order of rod cyclic nucleotide-gated channels reveals a diagonal arrangement of like subunits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:895-900.

Hedde PN, Fuchs J, Oswald F, Wiedenmann J, Nienhaus GU (2009) Online image analysis software for photoactivation localization microscopy. Nat Methods 6:689-690.

Heidbreder M, Zander C, Malkusch S, Widera D, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Nair D, Choquet D, Sibarita JB, Heilemann M (2012) TNF-alpha influences the lateral dynamics of TNF receptor I in living cells. Biochimica et biophysica acta 1823:1984-1989.

Heilemann M, van de Linde S, Schuttpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M (2008) Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. Angewandte Chemie (International ed in English) 47:6172-6176.

Heine M, Groc L, Frischknecht R, Béïque J-C, Lounis B, Rumbaugh G, Huganir RL, Cognet L, Choquet D (2008) Surface Mobility of Postsynaptic AMPARs Tunes Synaptic Transmission. Science (New York, NY) 320:201-205.

Hell SW, Stelzer EH, Lindek S, Cremer C (1994) Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy. Opt Lett 19:222.

Hell SW, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt Lett 19:780-782.

Henriques R, Lelek M, Fornasiero EF, Valtorta F, Zimmer C, Mhlanga MM (2010) QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. Nat Methods 7:339-340.

Hess ST, Girirajan TP, Mason MD (2006) Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. Biophysical journal 91:4258-4272.

Holden SJ, Uphoff S, Kapanidis AN (2011) DAOSTORM: an algorithm for high- density super-resolution microscopy. Nat Methods 8:279-280.

Holschneider M, Kronland-Martinet R, Morlet J, Tchamitchian P (1990) A Real-Time Algorithm for Signal Analysis with the Help of the Wavelet Transform. In: Wavelets(Combes, J.-M. et al., eds), pp 286-297: Springer Berlin Heidelberg.

Holtzer L, Meckel T, Schmidt T (2007) Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells. Appl Phys Lett 90.

Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X (2008) Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. Science (New York, NY) 319:810-813.

Huang F, Hartwich TMP, Rivera-Molina FE, Lin Y, Duim WC, Long JJ, Uchil PD, Myers JR, Baird MA, Mothes W, Davidson MW, Toomre D, Bewersdorf J (2013) Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms. Nat Methods 10:653-+.

Huang F, Schwartz SL, Byars JM, Lidke KA (2011) Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging. Biomed Opt Express 2:1377-1393.

Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. Neuron 54:859-871.

Juette MF, Gould TJ, Lessard MD, Mlodzianoski MJ, Nagpure BS, Bennett BT, Hess ST, Bewersdorf J (2008) Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. Nat Methods 5:527-529.

Kagan A (2001) Another look at the Cramer-Rao inequality. Am Stat 55:211-212.

Kubitscheck U, Kuckmann O, Kues T, Peters R (2000) Imaging and tracking of single GFP molecules in solution. Biophysical journal 78:2170-2179.

Lew MD, Lee SF, Badieirostami M, Moerner WE (2011) Corkscrew point spread function for far-field three-dimensional nanoscale localization of pointlike objects. Opt Lett 36:202-204.

Liu KS, Siebert M, Mertel S, Knoche E, Wegener S, Wichmann C, Matkovic T, Muhammad K, Depner H, Mettke C, Buckers J, Hell SW, Muller M, Davis GW, Schmitz D, Sigrist SJ (2011) RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. Science (New York, NY) 334:1565-1569.

Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, Wood MG, Learish R, Ohana RF, Urh M, Simpson D, Mendez J, Zimmerman K, Otto P, Vidugiris G, Zhu J, Darzins A, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV (2008) HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. ACS chemical biology 3:373-382.

Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, Sprengel R, Seeburg PH, Nicoll RA (2009) Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. Neuron 62:254-268.

MacGillavry HD, Song Y, Raghavachari S, Blanpied TA (2013) Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic AMPA receptors. Neuron 78:615-622.

Maglione M, Sigrist SJ (2013) Seeing the forest tree by tree: super-resolution light microscopy meets the neurosciences. Nature neuroscience 16:790-797.

Mallat S (1998) A wavelet tour of signal processing: AcademicPress.

Manley S, Gillette JM, Patterson GH, Shroff H, Hess HF, Betzig E, Lippincott-Schwartz J (2008) High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. Nat Methods 5:155-157.

Manley S, Gunzenhauser J, Olivier N (2011) A starter kit for point-localization super-resolution imaging. Current opinion in chemical biology 15:813-821.

Meyer Y (1990) Ondelettes et Opérateurs I : Ondelettes, II : Opérateurs de Caldéron-Zygmund, III : Opérateurs multilinéaires. Hermann.

Minsky M (1957) Microscopy apparatus. (U.S. Patent 3, 467, Dec. 19, 1961 filed Nov. 1957., ed).

Moré J (1978) The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory. In: Numerical Analysis, vol. 630 (Watson, G. A., ed), pp 105-116: Springer Berlin Heidelberg.

Mutch SA, Fujimoto BS, Kuyper CL, Kuo JS, Bajjalieh SM, Chiu DT (2007) Deconvolving single-molecule intensity distributions for quantitative microscopy measurements. Biophysical journal 92:2926-2943.

Mutch SA, Gadd JC, Fujimoto BS, Kensel-Hammes P, Schiro PG, Bajjalieh SM, Chiu DT (2011) Determining the number of specific proteins in cellular compartments by quantitative microscopy. Nature protocols 6:1953-1968.

Nair D, Hosy E, Petersen JD, Constals A, Giannone G, Choquet D, Sibarita JB (2013) Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 33:13204-13224.

Ober RJ, Ram S, Ward ES (2004) Localization accuracy in single-molecule microscopy. Biophysical journal 86:1185-1200.

Olivier N, Keller D, Rajan VS, Gonczy P, Manley S (2013) Simple buffers for 3D STORM microscopy. Biomed Opt Express 4:885-899.

Parthasarathy R (2012) Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers. Nat Methods 9:724-U291.

Patterson GH, Lippincott-Schwartz J (2002) A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. Science (New York, NY) 297:1873-1877.

Pavani SR, Thompson MA, Biteen JS, Lord SJ, Liu N, Twieg RJ, Piestun R, Moerner WE (2009) Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:2995-2999.

Pawley J (2006) Handbook of biological confocal microscopy: Springer.

Pertsinidis A, Mukherjee K, Sharma M, Pang ZP, Park SR, Zhang Y, Brunger AT, Sudhof TC, Chu S (2013) Ultrahigh-resolution imaging reveals formation of neuronal SNARE/Munc18 complexes in situ. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:E2812-2820.

Racine V (2006) Quantification des dynamiques cellulaires par analyse de données de vidéo-microscopie 3D+t. Université Pierre et Marie Curie - Paris 6.

Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. Science (New York, NY) 280:1596-1599.

Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat Methods 3:793-795.

Selvin PR, Lougheed T, Tonks Hoffman M, Park H, Balci H, Blehm BH, Toprak E (2007) Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy (FIONA). Cold Spring Harbor Protocols 2007:pdb.top27.

Serge A, Bertaux N, Rigneault H, Marguet D (2008) Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. Nat Methods 5:687-694.

Shannon CE (1949) COMMUNICATION IN THE PRESENCE OF NOISE. Proceedings of the Institute of Radio Engineers 37:10-21.

Shensa M (1992) The discrete wavelet transform: wedding the a trous and Mallat algorithms. Signal Processing, IEEE Transactions on 40:2464-2482.

Shepherd JD, Huganir RL (2007) The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. Annual review of cell and developmental biology 23:613-643.

Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, Betzig E (2008) Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. Nat Methods 5:417-423.

Shtengel G, Galbraith JA, Galbraith CG, Lippincott-Schwartz J, Gillette JM, Manley S, Sougrat R, Waterman CM, Kanchanawong P, Davidson MW, Fetter RD, Hess HF (2009) Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:3125-3130.

Sibarita JB (2005) Deconvolution microscopy. Advances in biochemical engineering/biotechnology 95:201-243.

Smith CS, Joseph N, Rieger B, Lidke KA (2010) Fast, single-molecule localization that achieves theoretically minimum uncertainty. Nat Methods 7:373-375.

Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. Nature 462:745-756.

Sprawls P (1995) Physical Principles of Medical Imaging: Medical Physics Publishing Corporation.

Starck J, Murtagh F, Bijaoui A (1998) Image Processing and Data Analysis: The Multiscale Approach: Cambridge University Press.

Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D (2003) Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. The EMBO journal 22:4656-4665.

Thompson RE, Larson DR, Webb WW (2002) Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. Biophysical journal 82:2775-2783.

Vincent L, Soille P (1991) Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on 13:583-598.

Wallace W, Schaefer LH, Swedlow JR (2001) A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy. BioTechniques 31:1076-1078, 1080, 1082 passim.

Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 16:1982-1989.

Wolter S, Loschberger A, Holm T, Aufmkolk S, Dabauvalle MC, van de Linde S, Sauer M (2012) rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. Nat Methods 9:1040-1041.

Wolter S, Schuttpelz M, Tscherepanow M, S VDL, Heilemann M, Sauer M (2010) Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. Journal of microscopy 237:12-22.

Xu K, Zhong G, Zhuang X (2013) Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. Science (New York, NY) 339:452-456.

Zheng J, Trudeau MC, Zagotta WN (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. Neuron 36:891-896.

Zhong H, Molday LL, Molday RS, Yau KW (2002) The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry. Nature 420:193-198.

Zhu L, Zhang W, Elnatan D, Huang B (2012) Faster STORM using compressed sensing. Nat Methods 9:721-723.

Zipfel WR, Williams RM, Webb WW (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. Nature biotechnology 21:1369-1377.

Annexe 1 : Protocoles biologiques et montage optique

Marquage par l'immunocytochimie

Marquage de microtubules

Les cellules COS7 ont été plaquées sur des lamelles de diamètre de 18mm déposées dans une plaque de 12 puits remplie avec 1ml de la solution DMEM afin de promouvoir la croissance des cellules. Les cellules ont été laissées se développer pendant plusieurs jours pour atteindre la maturité et la densité cellulaire nécessaire pour un marquage optimal. Elles ont été fixées avec 4% paraformaldehyde (PFA) et 4% sucrose et lavées par du PBS et du PBS-BSA1%. Les groupes réactifs sont inactivés pendant 5 minutes avec 50mM du NH_4Cl, puis les cellules ont été perméabilisées avec 0.1% du Triton X-100 et incubées avec du PBS-BSA1% pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires de souris-anti-bêta-tubuline (T4026, Clone2.1, Sigma) pendant 30 minutes et lavées plusieurs fois avec du PBS-BSA1%. Enfin, les anticorps primaires ont été révélés par l'incubation des cellules avec des anticorps secondaires anti-souris IgG couplés aux fluorophores AlexaFluor 647 (A21245, Invitrogen) pendant 30 minutes à température ambiante.

Marquage des sous-unités GluA1 et de la protéine PSD95 pour l'imagerie dSTORM en 3 dimensions

Les neurones en culture ont été incubés avec des anticorps primaires de lapin-anti-GluA1 (ciblant la région extracellulaire RTSDSRDHTRVDWKRC, Agro-Bio) pendant 20-30 minutes. Ils ont ensuite été fixés et perméabilisés comme décrit précédemment avec les cellules COS7. Puis, ils ont été incubés avec des anticorps primaires de souris-anti-PSD95 (MA1-046, Thermo Fisher Scientific) pendant 30 minutes et lavés plusieurs fois avec du PBS-BSA1%. Les anticorps primaires ont ensuite été révélés par l'incubation d'anticorps secondaires anti-lapin IgG couplés aux fluorophores AlexaFluor 647 (A21245, Invitrogen) et anti-souris couplés aux fluorophores RhodamineRed (715-295-151, Jackson Laboratories ImmunoResearch) pendant 30 minutes à température ambiante.

Pour les expériences dSTORM mono-couleur, les anticorps primaires de souris-anti-GluA2 (Giannone et al., 2010) ont été utilisés et révélés par des anticorps secondaires anti-souris IgG couplés aux fluorophores AlexaFluor 647 (A21245, Invitrogen).

Préparation du milieu de montage de l'échantillon pour la microscopie dSTORM

Le milieu de montage pour la microscopie dSTORM est constitué de trois milieux :

1. Solution enzymatique (50 mL) composée de :
    a. 100 µL de catalase (Sigma: C100)
    b. 200 µL de TCEP (1 mol/L) (Sigma: C4706)
    c. 25 mL de glycérine (Sigma)
    d. 22,5 mL d'eau distillée
    e. 1,25 mL de KCl (1 M)
    f. 1 mL de Tris-HCl avec un pH de 7,5 (1 mol/L)
    g. 50 mg de glucose oxydase (Sigma)
2. Solution de glucose (50 mL) composée de :
    a. 5 g de glucose
    b. 45 mL de l'eau distillée
    c. 5 mL de glycérine
3. Solution de mercaptoethylamine (MEA) (10 mL) : 1,136 g de MEA-HCl (Sigma: M6500) dissous dans 10 mL d'eau distillée afin d'obtenir une centration finale de 1 mol/L.

Le pH final du milieu de montage doit être compris entre 7,2 et 7,5. Une correction du pH est possible avec l'utilisation de KOH ou de NaOH.

Imagerie en microscopie dSTORM

Les lamelles contenant les cellules marquées ont été imagées le jour suivant à température ambiante dans une chambre fermée (Ludin Chamber, Life Imaging Services) montée sur un microscope inversé motorisé équipé avec un objectif PL-APO à immersion à huile de grossissement 100x et d'ouverture numérique 1,49. L'utilisation d'un système de mise au point automatique (Perfect Focus System de Nikon) permet des acquisitions longues sans perdre la mise au point. L'imagerie a été effectuée en utilisant un milieu de montage extracellulaire de l'échantillon préparé comme décrit précédemment.

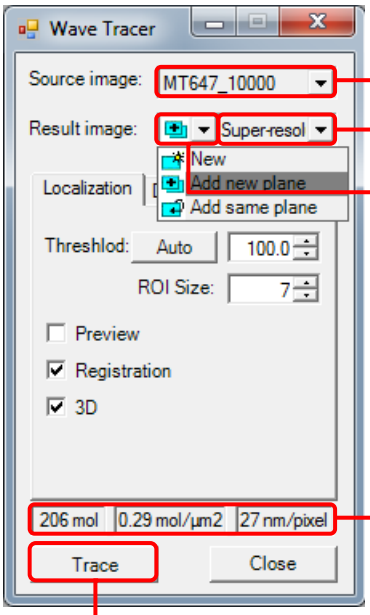
Pour le dSTORM, la majorité des fluorophores Rhodamine Red et Alexa-647 ont été photoconvertis dans un premier temps dans l'état noir en utilisant deux lasers à 561 nm et 640 nm (Coherent) d'une intensité de 30–50 KW/cm^2. Une fois la densité de fluorophores fluorescents désirée atteinte, pour être en conditions de molécules individuelles, les intensités

des lasers ont été diminuées à 7–15 kw/cm^2. L'acquisition dSTORM a été effectuée à une fréquence de 50 à 80 images par seconde en collectant 20000 images 256x256 par cellule avec une caméra EMCCD (Evolve, Photometric) et le logiciel d'acquisition MetaMorph (Molecular Devices) en mode streaming. Le nombre de molécules individuelles dans l'état fluorescent a été contrôlé par l'utilisation d'un laser de 405 nm (Omicron). Pour l'imagerie à deux couleurs, les fluorophores ont été imagés séquentiellement : l'Alexa-647 en premier suivit de la RhodamineRed. Les puissances de lasers ont été ajustées afin de conserver un nombre optimal de molécules activées stochastiquement pendant l'acquisition. Le signal de fluorescence issu des molécules individuelles a été collecté en combinant un filtre dichroïque et un filtre d'émission (respectivement D101-R561 et F39-617, Chroma) et un filtre dichroïque quatre-bandes (Di01-R405/488/561/635, Semrock). Nous avons utilisé des microbilles fluorescentes multi-couleurs (Tetraspeck, Invitrogen) comme marqueurs fiduciaires afin de corriger d'éventuelles dérives latérales et chromatiques pendant les acquisitions. Une résolution latérale expérimentale de 14 nm a été mesurée à partir de bille Tetraspeck de 100 nm observées avec un SNR similaire à celui des images de molécules individuelles en dSTORM. La localisation de molécules individuelles ainsi que la reconstruction de l'image de super-résolution ont été effectuées en temps réel grâce à notre module WaveTracer, accompagnées d'un control automatique des puissances lasers pendant l'acquisition, permettant de conserver une densité optimale de détection.

Annexe 2 : Interface graphique du logiciel WaveTracer

L'ensemble des méthodes de localisation (en 2 et 3 dimensions) et de reconstruction présentées a été implémenté au sein du module WaveTracer, développé comme un plugin du logiciel d'imagerie MetaMorph (Molecular Devices). L'interface graphique de WaveTracer est composée de quatre onglets : localisation, affichage, avancé et laser.

Principal interface



Name of the source image for the offline processing

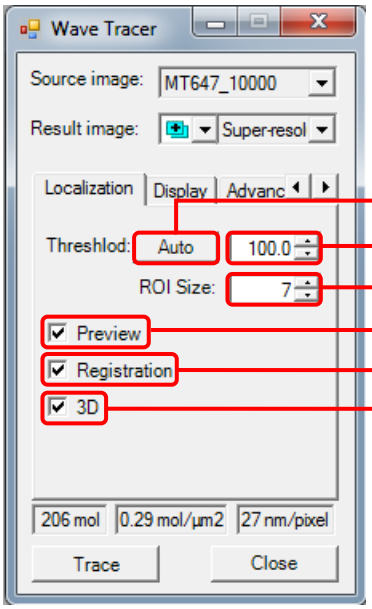
Name of the destination super-resolution image

How to store the result image of super-resolution:
- Create new image
- Add new plane for each new image
- Write images on the same plane

Number of detected spots on the current image, maximum density of molecules in 64x64 regions of the current image and pixel size in the super-resolution image

Launch the offline computing of the Source image

Localization tab



Computes the automatic threshold from the Source image

Threshold for the segmentation

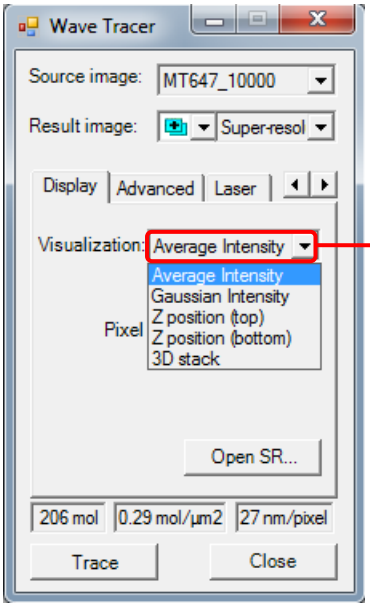
ROI size

Display a ROI around detected spots on the Source image

Apply the registration to correct for the lateral drift

Apply the anisotropic Gaussian fitting on ROIs for all detected spots in order to compute the axial coordinate

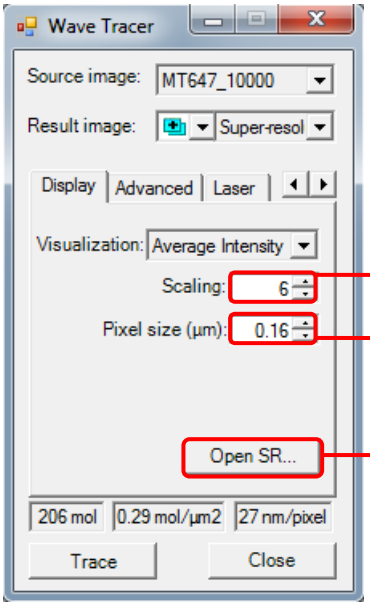
Display tab



Choose the visualization mode:

2D
- Average Intensity: add '1' grey value on corresponding pixel in the super-resolution image for each detected spot
- Gaussian Intensity: draw a Gaussian profile ($\sigma = \sigma_{precision}$ and a constant maximum intensity) in the super-resolution image for each detected spot

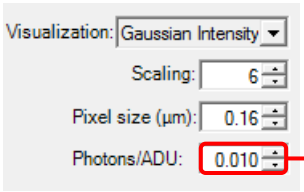
3D
- Z position (top/bottom): represent the detected spots by a color corresponding to the Z coordinate
- 3D stack: create a super-resolution image Z-stack



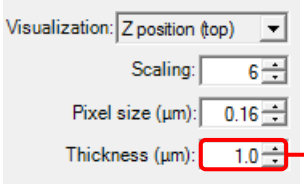
Scaling ratio between the low resolution and the super-resolution images

Pixel size (in µm) of the Source image (low resolution)

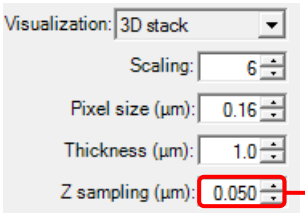
Reconstruct the super-resolution image from the statistics file (if already previously analyzed)



Photons/ADU conversion ratio (for Gaussian visualization)

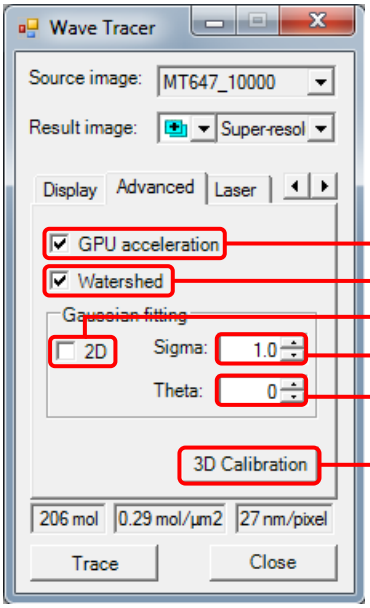


Thickness (in µm) of the 3D reconstruction in the super-resolution image



Sampling step (in µm) for the 3D

Avanced tab



Use the graphics card (GPU) to speed-up the computing

Apply the watershed algorithm to separate close spots

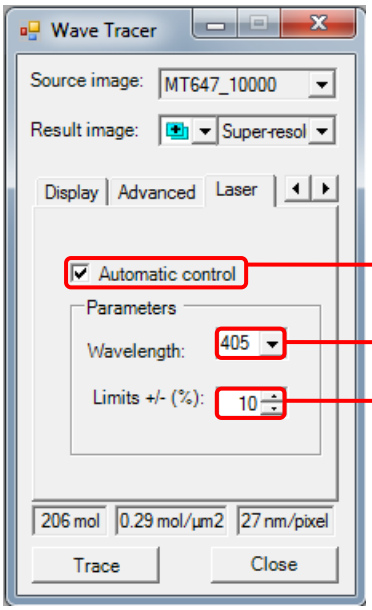
Perform the isotropic Gaussian fitting (2D localization)

Initial value of σ for Gaussian fitting

Value of the angle for anisotropic Gaussian fitting used in 3D localization

Computes the 3D calibration (PSF shape as a function of Z) from a 3D stack of single point emitter

Laser tab



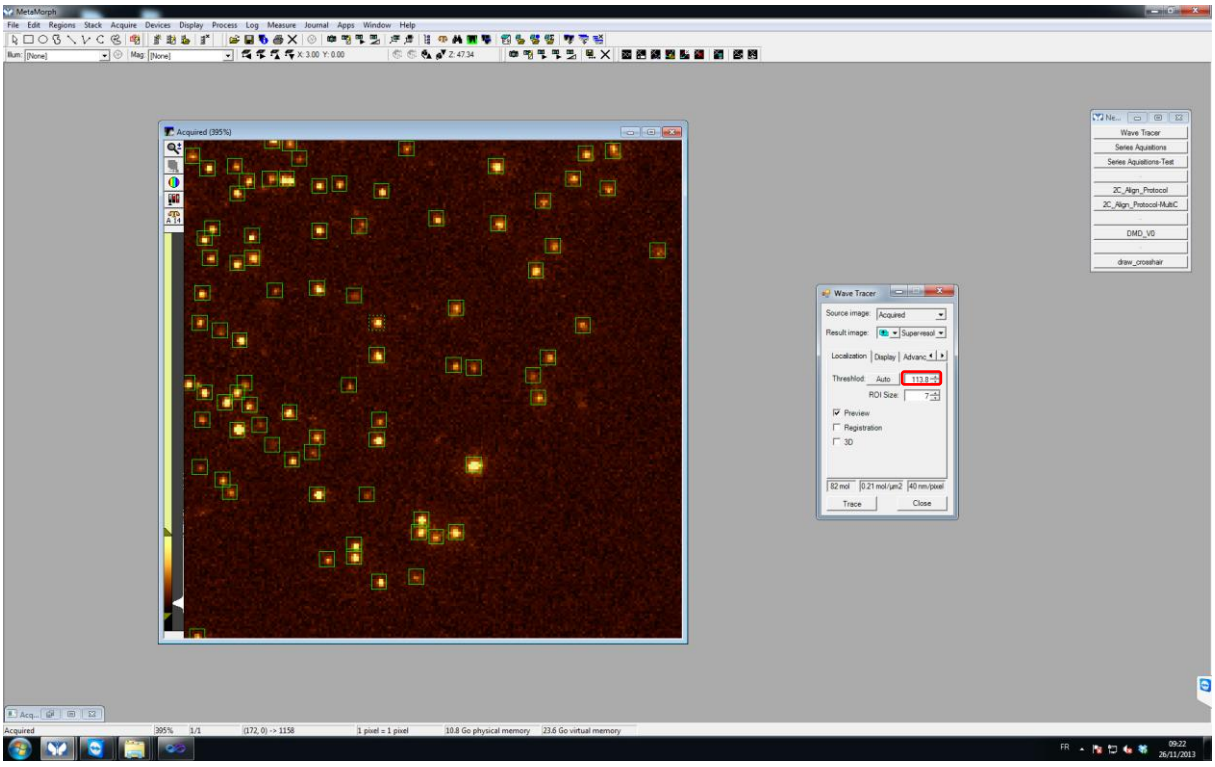
Automatic control of the laser intensities in order to keep the number of molecules constant throughout the acquisition

Wavelength of laser to tune

Set the desired interval for the number of molecules

Real-time mode (Online)

Step 1: Choose the threshold



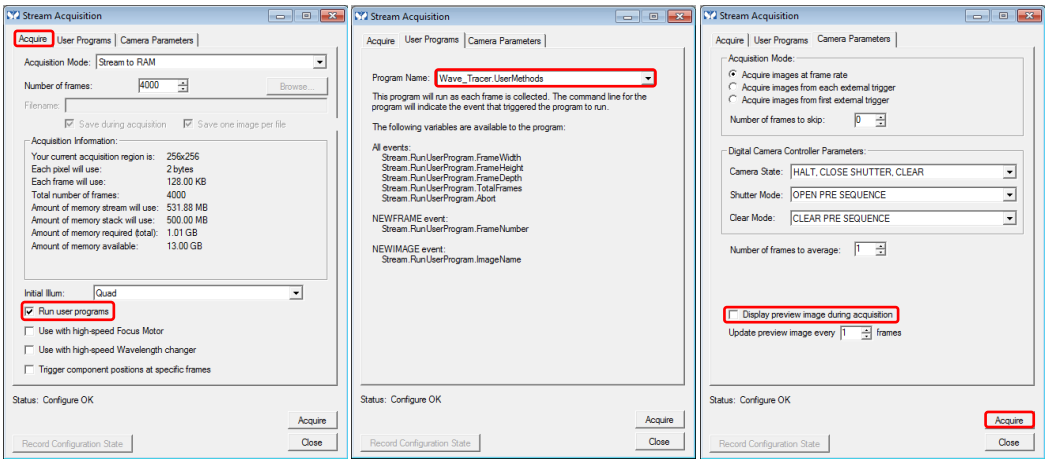
The green rectangles show the detected spots using the selected threshold

Step 2: Parameters for streaming mode

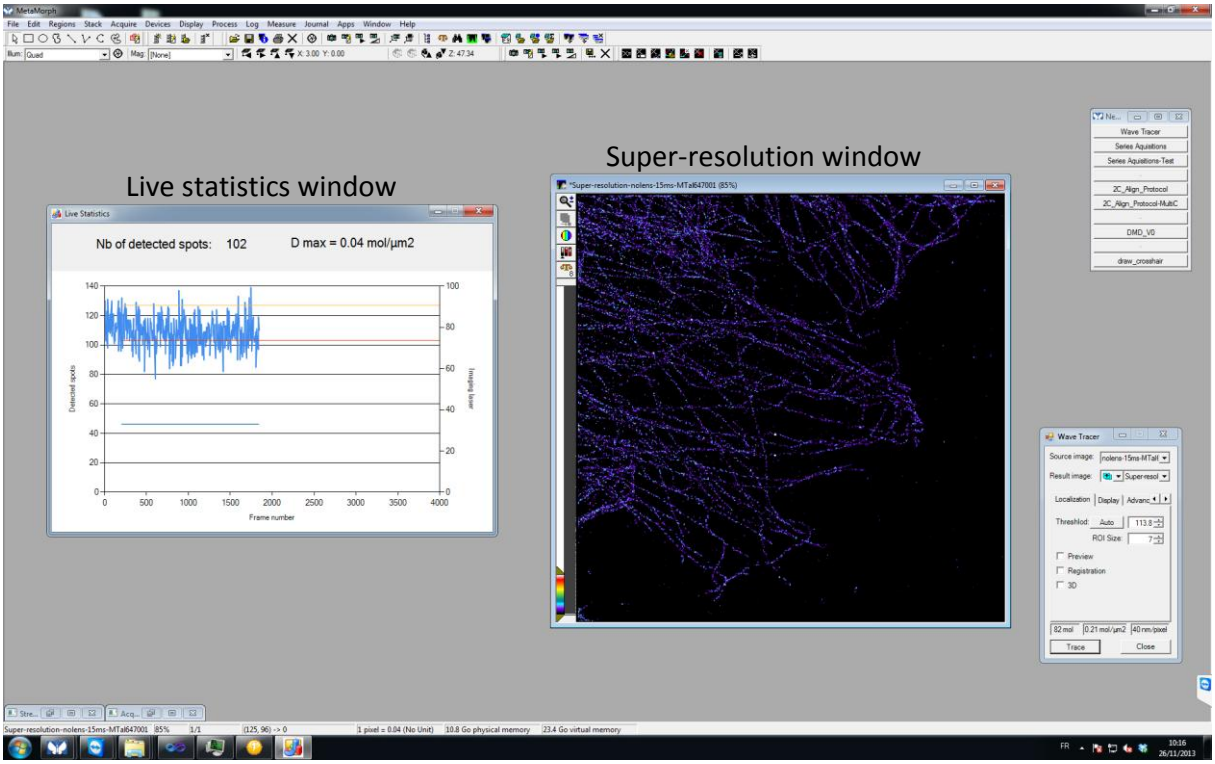
- Check the option 'Run user program' in the 'Stream Acquisition' window

- Choose the WaveTracer module in 'Program Name'

- Uncheck the option 'Display preview image during acquisition' (for improved localization speed)



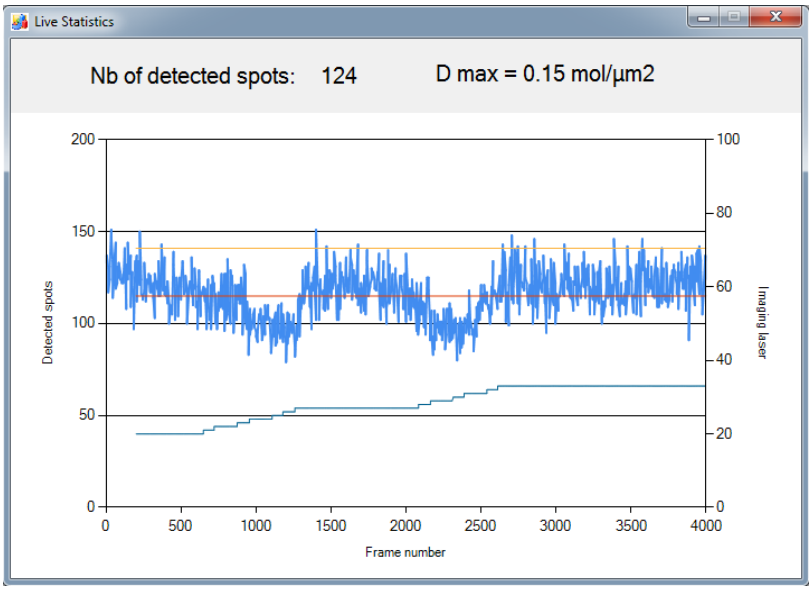
Step 3: Run acquisition and real-time localization/reconstruction of the super-resolution image



- Click on ‘Acquire’ button in ‘Stream Acquisition’ window

The graph ‘Live Statistics’ displays in real-time the evolution of the number of detected molecules per frame over the acquisition process. The number of localization (blue line) fluctuates between a maximum (orange line) and a minimum (red line) threshold. The activation wavelength (405 nm laser) intensity level (in %) is displayed by the green line. When the ‘Automatic control’ option is checked and the number of localized molecules falls outside the minimum and maximum thresholds during a certain number of frames, the laser power is automatically adjusted to keep the density of single molecules optimal.

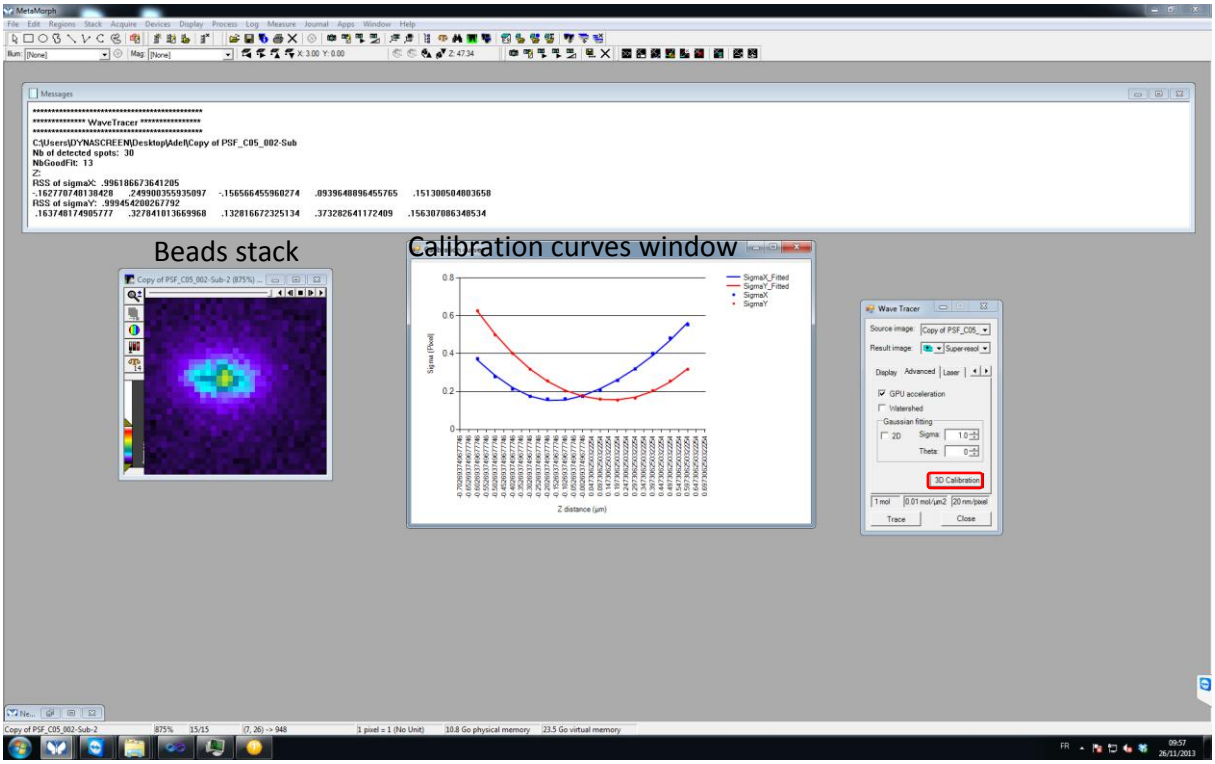
Adel Kechkar



Post-acquisition treatment Mode (Offline)

3D calibration

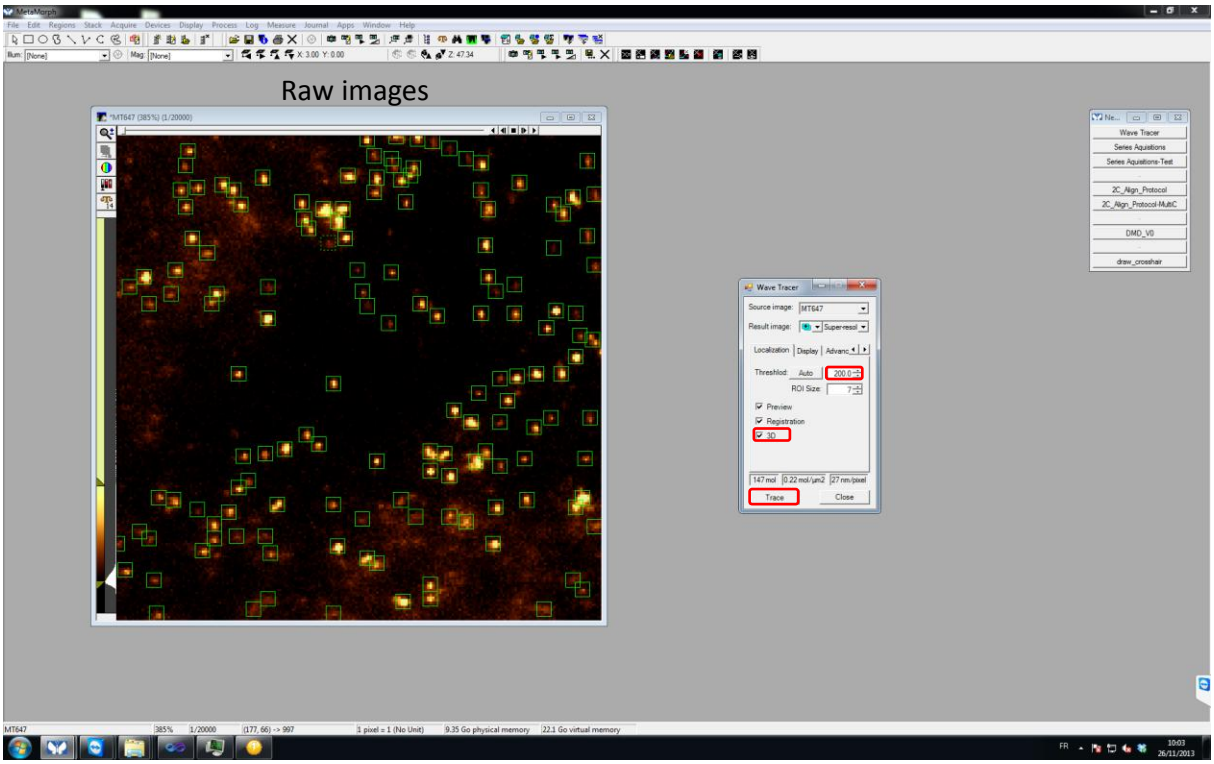
Select the threshold and click the '3D Calibration' button in advanced tab to launch the 3D calibration process

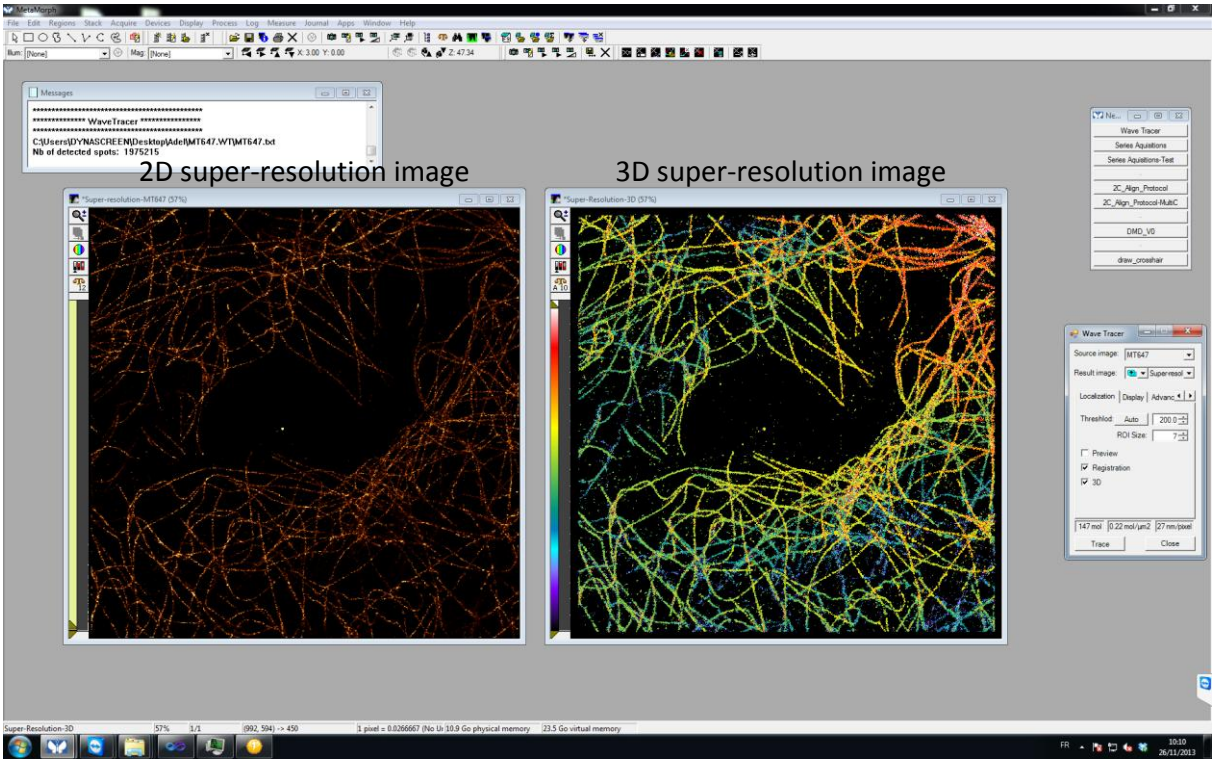


2D and 3D localization

Select the threshold, check '3D' option in localization tab and click the 'Trace' button in WaveTracer interface to launch the 2D and 3D localization process

Adel Kechkar


Raw images


2D super-resolution image
3D super-resolution image