

De la microscopie à la nanoscopie de fluorescence

Nicolas Bourg, Siddharth Sivankutty, Guillaume Dupuis et Sandrine Lévêque-Fort

Résumé L'alliance de la spécificité offerte par la fluorescence et du suivi en milieu vivant possible en microscopie optique a permis à l'imagerie de fluorescence de devenir un outil de référence dans l'étude des systèmes biologiques. La limite de diffraction empêchant de résoudre des objets plus petits que la moitié de la longueur d'onde a longtemps restreint les champs d'investigation. Les premiers développements impliquant uniquement de nouvelles stratégies optiques ont conduit à une amélioration limitée de la résolution. C'est en alliant à la fois de nouvelles approches optiques et une ingénierie des transitions moléculaires (STED, (F)PALM, (d)STORM) que la limite de diffraction a pu être complètement dépassée, offrant ainsi accès au milieu biologique à l'échelle nanoscopique. Cet article décrit ces différentes approches et présente les développements actuels et leurs applications.

Mots-clés Fluorescence, microscopie, super-résolution.

Abstract **From microscopy to fluorescence nanoscopy** Fluorescence microscopy offers a unique combination of molecular specificity and a non-invasive observation of life at a cellular level. This has empowered light microscopy as the preferred tool for investigating biological systems. The diffraction of light precludes the resolution of finer details of the cell, limiting our ability to investigate the role played by several subcellular components. While earlier developments involving purely optical techniques have resulted in a limited improvement of resolution, engineering the molecular transitions of fluorophores (STED, (F)PALM and (d)STORM) has enabled imaging well beyond the diffraction limit, offering an unparalleled access to fully functional biological environments at a nanometric scale. In addition to a description of these approaches, the latest developments in super-resolution fluorescence imaging and its applications are discussed.

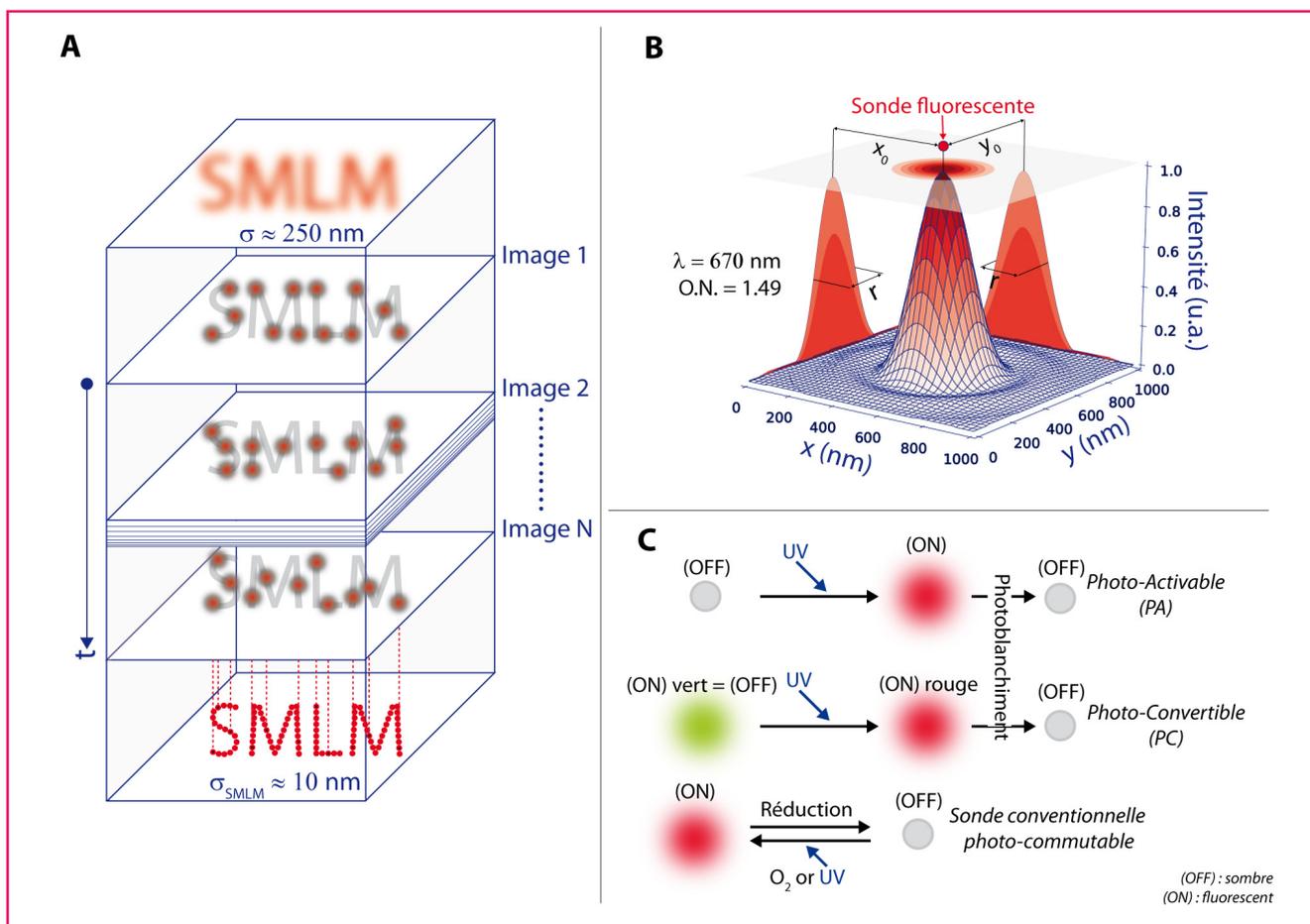
Keywords Fluorescence, microscopy, super-resolution.

La microscopie de fluorescence est un outil de prédilection en biologie car elle permet à la fois un suivi spécifique et dynamique des entités cellulaires (voir l'article de F. Mérola *et coll.* dans ce numéro [1]), tout en autorisant l'imagerie en trois dimensions de l'intérieur des cellules dans des conditions compatibles avec le vivant. Le principal défaut des microscopes optiques reste la limite de la diffraction, établie par les travaux de l'opticien allemand Ernst Abbe (1840-1905), qui les empêche de séparer des détails dont la distance est inférieure à ~ 220 nm transversalement ou ~ 600 nm axialement. Le prix Nobel de chimie 2014 a récompensé les travaux qui ont permis de dépasser la limite de diffraction *via* l'observation de molécules uniques isolées spatialement et temporellement (W.E. Moener et E. Betzig [2-3]), ou en confinant l'émission de fluorescence grâce à la microscopie STED (S.W. Hell [4]). Cette limite de résolution fondamentale correspond à la réponse du microscope à un émetteur ponctuel, qu'on appelle aussi fonction d'étalement du point (ou PSF pour « point spread function »). Plus le volume de la PSF est petit, meilleure est la résolution.

En microscopie optique de fluorescence, les images sont typiquement acquises selon deux modalités distinctes : en balayage point par point ou en plein champ. Pour ces deux modalités, il existe des méthodes d'acquisition qui améliorent

légèrement la résolution des images : c'est le cas de la microscopie confocale à balayage laser (amélioration d'un facteur $\sqrt{2}$ dans les trois directions [5]) et, en plein-champ, des techniques utilisant le confinement spatial des ondes évanescentes (sectionnement axial d'environ 150 nm : microscopies TIRF, pour « total internal reflection fluorescence » [6], et SAF, pour « super-critical angle fluorescence » [7]) et des techniques d'illumination structurée (SIM, pour « structured illumination microscopy » : amélioration d'un facteur 2 dans les trois directions [8]). Ces approches purement optiques ne permettent qu'une amélioration modérée de la résolution spatiale. Afin d'atteindre des résolutions spatiales significativement meilleures, bien au-delà de la limite de diffraction, il faut mettre en œuvre des stratégies qui s'appuient également sur les propriétés photophysiques des fluorophores, qui ne sont plus seulement de simples rapporteurs de position des entités cellulaires mais également la clé du gain en résolution [9]. Plus précisément, ces stratégies reposent sur le contrôle – déterministe ou stochastique – du nombre de fluorophores émettant simultanément de la lumière dans le volume focal à un instant donné.

Les techniques déterministes comme la microscopie STED (« stimulated emission depletion ») consistent à exercer ce contrôle de manière spatiale : au sein du volume focal,



seuls les fluorophores centraux peuvent émettre de la fluorescence (état ON), et tous les autres sont forcés dans un état sombre (état OFF). Le volume occupé par les fluorophores autorisés à émettre est donc plus petit que le volume focal limité par la diffraction : l'image obtenue est super-résolue. Les techniques stochastiques de super-localisation (SMLM pour « single molecule localization microscopy ») réalisent quant à elles ce contrôle de manière temporelle : à un instant donné, seul un fluorophore positionné aléatoirement dans le volume focal est dans l'état ON, tous les autres sont dans l'état OFF. Ainsi l'ensemble des photons mesurés dans le volume focal ne correspondent qu'à une molécule individuelle qui peut être localisée (figure 1A-B) par analyse d'image avec une précision bien supérieure à celle de la taille du volume focal : typiquement inversement proportionnelle à \sqrt{N} , où N est le nombre de photons émis par la molécule. L'image super-résolue est obtenue en effectuant cette mesure séquentiellement dans le temps, l'ensemble des fluorophores de l'échantillon étant en effet successivement localisés lors de leur retour successif aléatoire depuis leur état OFF vers un état ON (encadré 1).

Approche stochastique par super-localisation de molécules uniques

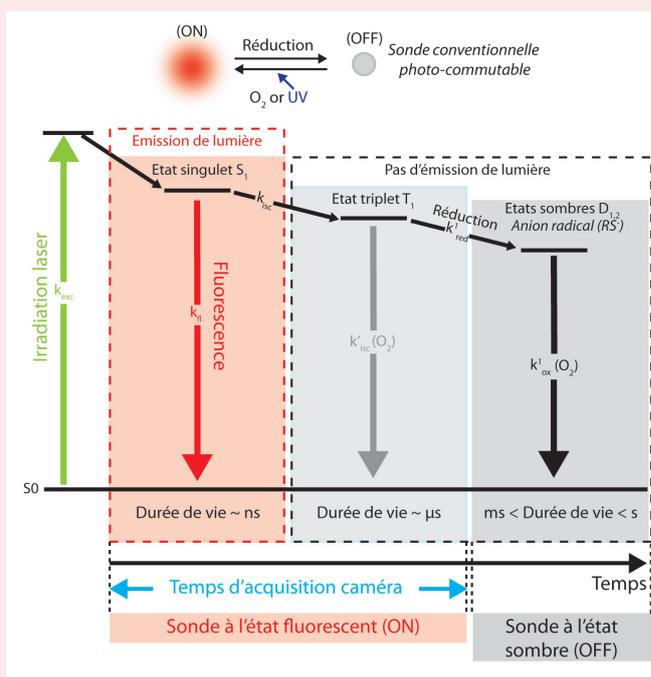
Le principe des techniques de SMLM consiste à faire émettre aléatoirement, détecter et super-localiser numériquement une sous-population des fluorophores ($\sim 0,1\%$) pendant le temps d'intégration de la caméra et de répéter ce procédé environ dix mille fois, jusqu'à reconstruire intégralement l'image avec une résolution spatiale de l'ordre de la dizaine de nanomètres (figure 2A). Parmi les techniques existantes de SMLM, on distingue les méthodes (F)PALM (« fluorescence photo-activated light microscopy ») [9] et (d)STORM (« direct stochastic optical reconstruction microscopy ») [10-11].

Ces techniques se différencient seulement par le type de sondes fluorescentes employées et la manière dont elles peuvent commuter entre l'état ON et l'état OFF. La méthode (F)PALM utilise des protéines photo-activables (PA) ou photo-convertibles (PC) (figure 1C) dont chaque sous-population doit être photo-blanchie avant toute réactivation/reconversion de la sous-population suivante. En revanche, la

Encadré 1

Principe du cycle ON-OFF de sondes fluorescentes immergées dans une solution tampon ((d)STORM)

Lorsqu'un fluorophore est irradié, il peut être excité et atteindre, avec une probabilité k_{exc} , son premier niveau d'énergie singulet S_1 . Il peut ensuite se désexciter de manière radiative (k_f , fluorescence) ou non radiative avec une probabilité k_{isc} vers l'état triplet non fluorescent T_1 . L'oxygène moléculaire présent dans l'échantillon force le retour (k'_{isc}) du fluorophore de l'état triplet T_1 à son niveau fondamental limitant ainsi la durée de vie de ce dernier τ_1 à quelques microsecondes. Cette durée τ_1 , bien inférieure au temps d'acquisition (1-100 ms) de la caméra enregistrant les images, limite l'utilisation de l'état triplet T_1 (en présence d'oxygène) pour faire commuter les fluorophores d'un état ON à l'état OFF. L'ajout d'absorbeur d'oxygène (« oxygen scavenger ») dans une solution tampon dans laquelle est plongé l'échantillon permet de réduire la probabilité de désexcitation (retour au niveau fondamental) de l'état T_1 (k'_{isc}) et ainsi d'augmenter la durée de vie τ_1 à plusieurs dizaines ou centaines de microsecondes. Par ailleurs, la désexcitation de l'état T_1 forme une espèce hautement réactive d'oxygène singulet pouvant photo-endommager les cellules et/ou photo-blanchir le fluorophore. Par conséquent, le retour à l'état fondamental d'une molécule dans un niveau d'énergie triplet est à proscrire. Un thiol est généralement ajouté à la solution tampon afin de réduire, avec une probabilité k_{red} , le fluorophore dans l'état T_1 et ainsi produire un anion radical. Ce dernier présente un niveau d'énergie sombre D_1 (non fluorescent) et très stable pendant quelques centaines de millisecondes. Le retour à l'état fondamental de cet anion radical peut s'effectuer par oxydation (k_{ox}) ou par irradiation UV. Le fluorophore pourra finalement être ré-excité et émettre à nouveau sa fluorescence. Les réducteurs de type thiol couramment employés sont le β -mercaptoéthanol et β -mercaptoéthylamine. L'absorbeur d'oxygène souvent utilisé est un mélange de glucose oxydase,



technique (d)STORM emploie des fluorophores organiques couramment utilisés en microscopie de fluorescence conventionnelle (par exemple des molécules dérivées des rhodamines : Alexa Fluor, Atto, Cy3/5...), immergés dans une solution tampon d'oxydoréduction (capteur d'oxygène + réducteur de type thiol). Grâce à cette solution, les fluorophores cyclent continuellement entre un état singulet S_1 fluorescent (ON) et des états sombres métastables D_1 ou D_2 (OFF), permettant une localisation successive (encadré 1). Deux

exemples d'images (d)STORM super-résolues du réseau d'actine de cellules COS-7 et de neurones de souris fixés sont présentés sur les figures 2A-B.

Si ces protocoles sont bien maîtrisés pour une sonde donnée, ils se compliquent dans le cas des marquages multicolores au cœur des problématiques de co-localisation cruciales en biologie. En (F)PALM, cela implique de détecter simultanément l'émission issue de deux protéines PC ou PA de longueurs d'onde complémentaires. En (d)STORM, cela

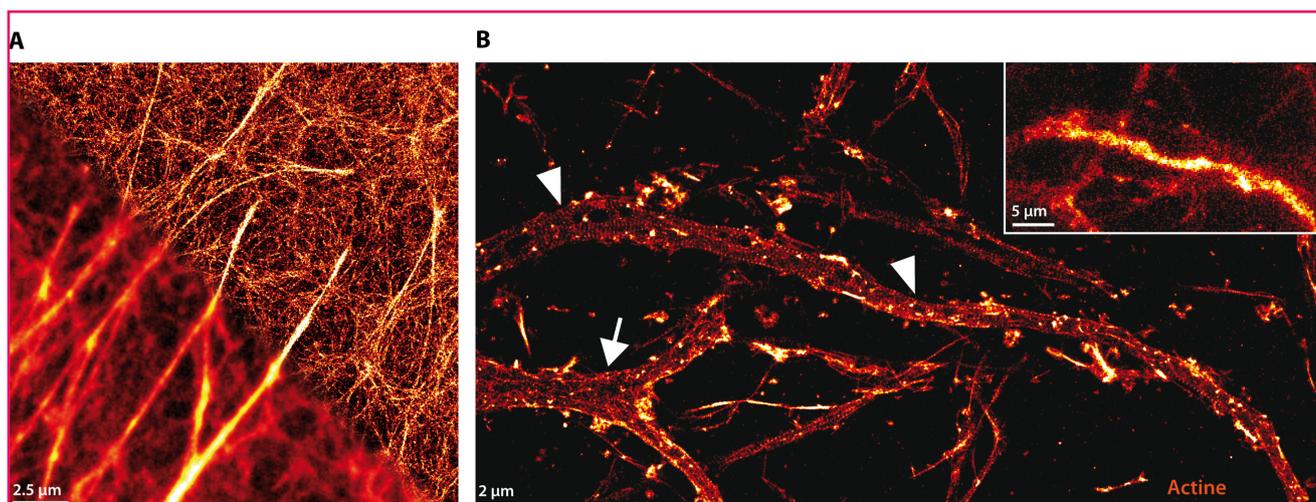


Figure 2 - (A) Comparaison entre une image limitée par la diffraction (coin bas gauche) et une image (d)STORM super-résolue (coin haut droite) du réseau d'actine d'une cellule COS-7 marquée avec des molécules Alexa Fluor 488. Image réalisée à partir de 20 000 images et plus d'un million de localisations individuelles (images par Nicolas Bourg). (B) Neurones en culture pendant 16 jours fixés et marqués pour l'actine à l'aide de phalloïdine-Alexa Fluor 647. On distingue le segment initial de l'axone et sa structure d'actine périodique (têtes de flèches) qui est absente des dendrites (flèche). Image STORM réalisée à partir de 60 000 images et plus de 1,5 million de localisations individuelles. En haut à droite : image d'épifluorescence correspondante (limitée par la diffraction) (images fournies gracieusement par Christophe Leterrier et Bénédicte Dargent, CRN2M, Marseille, 2014).

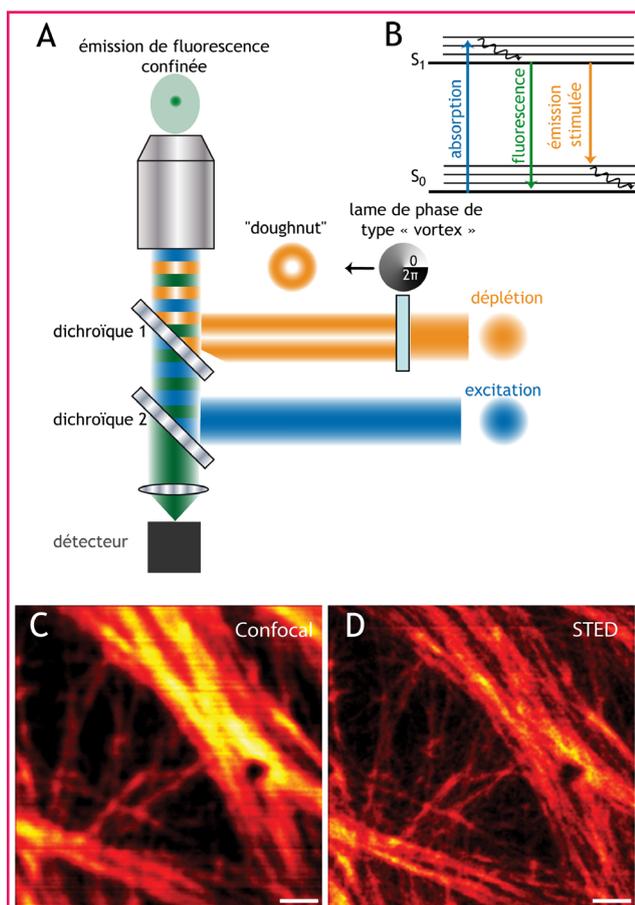


Figure 3 - Principe de la microscopie STED. (A) Un microscope STED est un microscope à balayage, donc de conception très proche d'un microscope confocal, auquel en plus du faisceau d'excitation, on superpose un faisceau de déplétion (STED) mis en forme afin de préserver une zone centrale capable d'émettre de la fluorescence. (B) Toutes les molécules présentes sous le faisceau STED typiquement mis en forme d'anneau (ou « doughnut ») sont contraintes à se désexciter via une émission stimulée... (C-D) L'observation du réseau d'actine de cellules CHO (marquée par de l'Alexa 488) en microscopie confocale et STED permet d'apprécier le gain en résolution latérale (typiquement de ~ 50 nm au lieu de 250 nm), et ainsi de pouvoir observer individuellement les différentes fibres d'actines (images acquises par Siddharth Sivankutty).

requiert de mettre au point une solution tampon d'oxydo-réduction commune permettant d'optimiser au mieux les cycles des différents marqueurs organiques. Enfin, les structures cellulaires sont intrinsèquement tridimensionnelles ; or les différentes techniques SMLM ne sont super-résolues que suivant les directions transverses de l'axe optique. Des méthodes d'ingénierie de la PSF plus ou moins complexes ont donc été élaborées pour super-localiser également les fluorophores suivant la direction axiale avec une précision de l'ordre de 20 nm [12]. Des approches alternatives, plus précises mais plus lourdes à mettre en œuvre, consistent à combiner la fluorescence reçue par deux objectifs tête-bêche, éventuellement de manière interférométrique.

Approche déterministe par ingénierie de la PSF

Le concept de la microscopie STED, proposé par l'équipe de S. Hell en 1994 [4], consiste à superposer au faisceau

d'excitation conventionnelle un deuxième faisceau laser permettant de dépeupler le niveau excité par émission stimulée (figure 3A). La longueur d'onde de ce faisceau STED est en règle générale décalée vers les longueurs d'onde les plus élevées du spectre d'émission du fluorophore (encadré 2). Le faisceau STED est mis en forme afin de présenter une intensité nulle au centre, de sorte que la désexcitation par émission stimulée ne se produit qu'en périphérie du volume d'excitation, empêchant ainsi la fluorescence de se produire dans cette zone. Si l'implémentation la plus courante consiste à n'imposer un confinement que dans le plan transversal à l'axe optique (forme d'anneau ou « doughnut » dans le plan transversal) (encadré 2), la superposition de plusieurs modes de déplétion permet un confinement dans les trois directions [13]. C'est l'augmentation de l'intensité du faisceau STED qui permet de réduire la zone centrale d'émission spontanée grâce à la saturation de la déplétion (encadré 2). Le gain en résolution est théoriquement sans limite.

En pratique, pour l'imagerie d'échantillons biologiques, l'intensité du faisceau STED ($0,1-0,5 \text{ GW cm}^{-2}$) ne peut pas être trop grande au risque d'une dégradation liée à des absorptions résiduelles d'autres entités cellulaires à la longueur d'onde de déplétion. D'autre part, les fluorophores étant soumis à un grand nombre de cycles, il est préférable de privilégier ceux qui présentent une meilleure résistance au photobleaching. Une résolution transversale autour de 40-70 nm peut ainsi être obtenue [14]. On voit ainsi sur la figure 3D le gain en résolution permettant d'isoler les fibres du réseau d'actine d'une cellule, indiscernables en microscopie confocale (figure 3C). Pour l'étude de matériaux non photodégradables, comme par exemple la localisation des centres NV (« nitrogen-vacancy », défauts ponctuels composés d'un atome d'azote et d'une lacune) dans les nanodiamants, la possibilité d'utiliser de fortes puissances pour le faisceau STED permet d'atteindre une résolution transversale ultime de 5,8 nm [15].

Grâce au confinement intrinsèque du volume d'observation, l'image est obtenue directement au cours du balayage des deux faisceaux, sans nécessité de post-traitement. En ce sens, un microscope STED est essentiellement un microscope confocal super-résolu, donc compatible avec les modalités d'analyse usuelles : spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) pour le suivi d'événements de diffusion dans des nanodomains [16], mesures résolues en temps (FLIM) pour sonder l'environnement de la sonde, etc. Comme en microscopie classique, la durée de vie peut permettre de discriminer deux populations de fluorophores aux propriétés spectrales identiques, et ainsi de réaliser des images STED de deux espèces sans modifier le dispositif [17]. Une autre approche de co-localisation consiste à choisir l'un des deux fluorophores pour son grand décalage de Stokes, ce qui permet de conserver un unique faisceau STED combiné à deux faisceaux d'excitation propres à chaque fluorophore [18].

La structuration du faisceau d'intensité centrale nulle peut également être utilisée pour induire la photoconversion réversible de protéine, nécessitant une puissance moindre ($\sim \text{kW cm}^{-2}$) et donc des temps d'observation *in vivo* accrus. Cette approche, appelée RESOLFT (« reversible saturable optical fluorescence transition ») [19], peut aussi se concevoir comme une généralisation d'une commutation entre un état ON et OFF, induite à une position connue imposée par la structuration du faisceau.

Afin d'accélérer l'acquisition des images STED et RESOLFT, notamment pour les applications sur le vivant, la parallélisation d'une multitude de faisceaux d'intensité centrale nulle de déplétion/désexcitation est tout à fait possible.

Encadré 2

Principe de la microscopie STED

(A) Un microscope STED est de conception très proche d'un microscope confocal, auquel on superpose, en plus du faisceau d'excitation, un faisceau de déplétion (STED) mis en forme afin de préserver une zone centrale capable d'émettre de la fluorescence. Toutes les molécules présentes sous le faisceau STED sont contraintes à se désexciter via une émission stimulée. La longueur d'onde à laquelle cette émission stimulée est induite est en général choisie vers les longueurs d'onde plus élevées du spectre d'émission. Typiquement pour la GFP, l'excitation se fait à 488 nm, la déplétion induit une émission stimulée à 575 nm, ce qui permet une détection de la fluorescence dans la gamme 500-570 nm.

(B) La mise en forme d'anneau permet d'améliorer la résolution latérale (X,Y). L'augmentation de la puissance du faisceau STED permet de saturer la transition et d'ajuster la zone centrale intérieure de laquelle on peut observer de l'émission de fluorescence. Les puissances en jeu ($\sim 0,1-0,5 \text{ GW cm}^{-2}$) restent cependant de plusieurs ordres de grandeurs inférieures aux puissances nécessaires en microscopie multiphotonique.

(C) La vision en coupe de la zone pouvant émettre la fluorescence et du faisceau STED illustre le confinement induit pour différentes puissances du faisceau STED.

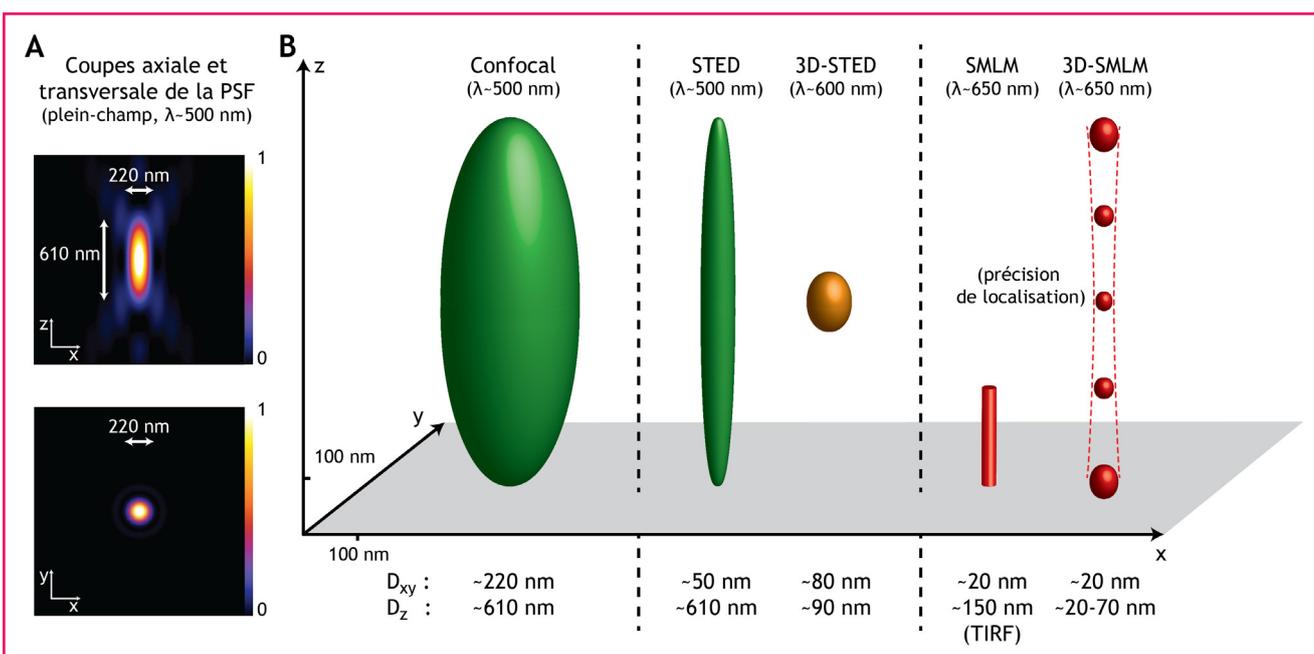
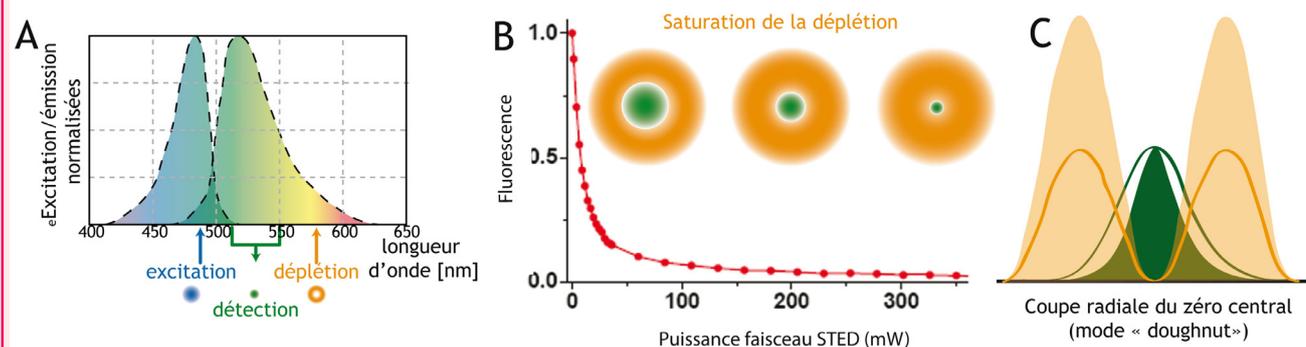


Figure 4 - (A) Simulation numérique de la répartition axiale et transversale de l'éclairage lumineux au sein du volume focal en configuration plein-champ ($\lambda = 500 \text{ nm}$; $\text{ON} = 1,4$; $n = 1,5$). (B) Résolutions spatiales typiquement accessibles grâce aux différentes approches de super-résolution, à comparer avec le volume focal en microscopie confocale. Les performances en SMLM sont des précisions de localisation. En particulier, pour l'approche 3D-SMLM, les précisions de localisation indiquées sont celles de la méthode de la lentille cylindrique [15].

Dans ce cadre, l'équipe de S. Hell a superposé deux figures d'interférences orthogonales formant ainsi une succession en deux dimensions de franges brillantes et sombres (zones d'intensité nulle). Ce principe a permis de paralléliser 100 000 faisceaux de désexcitation RESOLFT. Cette matrice de « doughnuts » permet d'imager l'évolution de filopodes de cellules neuronales vivantes avec une résolution spatiale de $\sim 70 \text{ nm}$ et à une cadence inférieure à la seconde [20].

Applications et développements actuels

Les performances typiques de ces différentes techniques sont résumées sur la figure 4. Le gain important en résolution offert par la nanoscopie a permis, entre autres, de scruter et imaginer à l'échelle moléculaire l'agencement et la diffusion de différentes protéines/molécules présentes notamment dans les bactéries et les neurones. Les protéines PA et PC

employées en (F)PALM ont révélé une organisation en plusieurs bandes de l'ARN polymérase des bactéries *Escherichia coli* [21]. Par ailleurs, la compatibilité avec le vivant des sondes PA et PC a permis de suivre la trajectoire et quantifier la diffusion (« single particle tracking PALM », SPT-PALM) des protéines Homer, PSD95, GluA1 et GluA2 au niveau des épines dendritiques de neurones de rat [22].

Cependant, du fait de la faible brillance des sondes PA et PC, la résolution de la technique (F)PALM est moins importante que la méthode (d)STORM. Cette dernière, bien que peu compatible avec le vivant, a permis d'observer en trois dimensions un agencement périodique et unique des protéines d'actine (figure 2B), de spectrine et d'adducine au niveau du segment initial des axones des neurones de l'hippocampe de rat [23]. Cette organisation périodique a également été observée en STED [24]. Alors que les profondeurs d'imagerie des stratégies SMLM sont pour l'instant limitées à ~ 3 µm, la technique STED a rendu possible l'observation à l'échelle moléculaire des épines dendritiques de neurones situés à ~ 40 µm de profondeur du cortex d'une souris vivante [25]. Les développements actuels consistent en particulier à repousser ces limites de profondeur, mais également à atteindre des cadences et résolutions ultimes pour les observations *in vivo*.

L'optimisation du marquage est également une part cruciale de ces développements. Il faut en effet réinventer les approches de marquage de sorte que la taille du rapporteur (et de son ligand) [26], sa brillance, sa densité, rapportent l'organisation cellulaire de façon optimale. Le développement de nouvelles générations de sondes organiques, de méthodes d'immunomarquage alternatives et de nouvelles générations de protéines PC ou PA ouvre plus que jamais la voie pour les applications *in vivo*.

Références

- [1] Mérola F., Pasquier H., Erard M., Lumières sur le vivant : protéines fluorescentes et senseurs optogénétiques, *L'Act. Chim.*, **2015**, 397-398, p. 23.
- [2] Dickson R.M., Cubitt A.B., Tsien R.Y., Moerner W.E., On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein, *Nature*, **1997**, 388, p. 355.
- [3] Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacio J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, *Science*, **2006**, 313, p. 1642.
- [4] Hell S.W., Wichmann J., Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy, *Optics Letters*, **1994**, 19, p. 780.
- [5] *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley (ed.), Springer, **2006**.
- [6] Axelrod D., Evanescent excitation and emission in fluorescence microscopy, *Biophysic. J.*, **2013**, 104, p. 1401.
- [7] Barroca T., Balaa K., Lévêque-Fort S., Fort E., Full-field near-field optical microscope for cell imaging, *Phys. Rev. Letters*, **2012**, 108, p. 218101.
- [8] Gustafsson M.G., Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy, *J. Microscopy*, **2000**, 198, p. 82.
- [9] Hell S.W., Far-field optical nanoscopy, *Science*, **2007**, 316, p. 1153.
- [10] Rust M.J., Bates M., Zhuang X., Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution, *Nature Methods*, **2006**, 3, p. 793.
- [11] Van de Linde S., Löschberger A., Klein T., Heidbreder M., Wolter S., Heilemann M., Sauer M., Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes, *Nature Protocols*, **2011**, 6, p. 991.
- [12] Hajj B., El Beheiry M., Izeddin I., Darzacq X., Dahan M., Accessing the third dimension in localization-based super-resolution microscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, 16, p. 16340.
- [13] Wildanger D., Medda R., Kastrop L., Hell S.W., A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution, *J. Microscopy*, **2009**, 236, p. 35.
- [14] Hein B., Willig K.I., Hell S.W., STED nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell, *PNAS*, **2008**, 105, p. 14271.
- [15] Rittweger E., Han K.Y., Irvine S.E., Eggeling C., Hell S.W., STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution, *Nature Photonics*, **2009**, 3, p. 144.
- [16] Leutenegger M., Ringemann C., Lasser T., Hell S.W., Eggeling C., Fluorescence correlation spectroscopy with a total internal reflection fluorescence STED microscope, *Optics Express*, **2012**, 20, p. 5243.
- [17] Moffitt J.R., Osseforth C., Michaelis J., Time-gating improves the spatial resolution of STED microscopy, *Optics Express*, **2011**, 19, p. 4242.
- [18] Bückers J., Wildanger D., Vicidomini G., Kastrop L., Hell S.W., Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses, *Optics Express*, **2011**, 19, p. 3130.
- [19] Hofmann M., Eggeling C., Jakobs S., Hell S.W., Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins, *PNAS*, **2005**, 102, p. 17565.
- [20] Chmyrov A., Keller J., Grotjohann T., Ratz M., D'Este E., Jakobs S., Eggeling C., Hell S.W., Nanoscopy with more than 100,000 doughnuts, *Nature Methods*, **2013**, 10, p. 737.
- [21] Endesfelder U., Finan K., Holden S.J., Cook P.R., Kapanidis A.N., Heilemann M., Multiscale spatial organization of RNA polymerase in *Escherichia coli*, *Biophysic. J.*, **2013**, 105, p. 172.
- [22] Nair D., Hosy E., Petersen J.D., Constals A., Giannone, G., Choquet D., Sibarita J.-B., Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95, *J. Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **2013**, 33, p. 13204.
- [23] Xu K., Zhong G., Zhuang X., Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons, *Science*, **2013**, 339, p. 452.
- [24] Lukinavičius G., Reymond L., D'Este E., Masharina A., Göttfert F., Ta H., Johnsson K., Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton, *Nature Methods*, **2014**, 11, p. 731.
- [25] Willig K.I., Steffens H., Gregor C., Herholt A., Rossner M.J., Hell S.W., Nanoscopy of filamentous actin in cortical dendrites of a living mouse, *Biophysic. J.*, **2013**, 106, p. L01.
- [26] Stagge F., Mitronova G.Y., Belov V.N., Wurm C.A., Jakobs S., Snap-CLIP- and halo-tag labelling of budding yeast cells, *PLOS ONE*, **2013**, 8, doi: 10.1371/journal.pone.0078745.



N. Bourg



S. Lévêque-Fort



S. Sivankutty

Nicolas Bourg est doctorant et **Sandrine Lévêque-Fort**, chargée de recherche du CNRS, à l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay et au Centre de Photonique Biomédicale, Université Paris-Sud¹.

Siddharth Sivankutty a réalisé sa thèse à l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay et au Centre de Photonique Biomédicale. Il est actuellement postdoctorant à l'Institut Fresnel, Marseille².

Guillaume Dupuis est maître de conférences à l'Université Paris-Sud, Centre de Photonique Biomédicale du Centre Laser de l'Université Paris-Sud (CLUPS)³.



G. Dupuis

¹ ISMO-CPBM, CNRS/Université Paris-Sud, bât. 210, F-91405 Orsay. Courriels : nicolas.bourg@u-psud.fr ; sandrine.leveque-fort@u-psud.fr

² Institut Fresnel, Université Aix-Marseille, F-13397 Marseille. Courriel : siddharth@gmail.com

³ CPBM/CLUPS, Université Paris-Sud., bât. 106 arrière, F-91405 Orsay Cedex. Courriel : guillaume.dupuis@u-psud.fr