

La fluorescence : un outil pour mettre en évidence la beauté architecturale invisible du vivant

Fluorescence: a tool for highlighting the invisible architectural beauty of life

Anaël Soubigou¹, Lucie Subirana¹, Stéphanie Bertrand^{1,2}

¹ Sorbonne Université, CNRS, Biologie Intégrative des Organismes Marins, BIOM, F-66650, Banyuls-sur-Mer, France.

² Institut Universitaire de France

RÉSUMÉ. La majeure partie de la biodiversité animale se trouve dans le milieu marin, et, plus particulièrement, dans la gamme des animaux de très petite taille, invisibles à l'œil nu. Ces petits animaux, ou les embryons et larves d'animaux plus grands, sont souvent transparents et l'observation en lumière blanche permet de définir leurs contours mais ne suffit généralement pas pour comprendre leur organisation. Ces organismes sont formés de tissus, eux-mêmes formés de cellules, agencés d'une manière bien particulière en fonction de l'espèce ou du stade de développement. Les cellules elles-mêmes présentent une architecture complexe associant différentes structures comme le noyau ou le cytosquelette. Pour comprendre l'agencement des cellules à l'intérieur de ces animaux marins, les marquages fluorescents sont devenus des outils puissants et indispensables. Le développement de microscopes spécifiques permettant d'imager la fluorescence et les outils numériques permettant l'analyse des images obtenues et la création de reconstructions tridimensionnelles des structures observées offre aujourd'hui une possibilité incroyable de décrire l'organisation fine des organismes marins. Ces approches génèrent des images d'un esthétisme certain, et mêlent ainsi l'apport d'informations d'intérêt scientifique à la poésie d'une imagerie naturaliste renouvelée.

ABSTRACT. Most animal biodiversity is found in the marine environment, and more particularly in the range of very small animals that are invisible to the human eye. These small animals, or the embryos and larvae of larger animals, are often transparent, and observation under white light illumination allows their outlines to be defined, but is generally not sufficient to understand their organisation. These organisms are made up of tissues, themselves made up of cells, arranged in a very specific way depending on the species or developmental stage. The cells themselves have a complex architecture combining different structures such as the nucleus and the cytoskeleton. Fluorescent labelling has become a powerful and essential tool for understanding how the cells inside these marine animals are arranged. The development of specific microscopes for imaging fluorescence and digital tools for analysing the images obtained and creating three-dimensional reconstructions of the structures observed now offer an incredible opportunity to describe the fine organisation of marine organisms. These approaches generate aesthetically pleasing images, combining information of scientific interest with the poetry of renewed naturalist imagery.

MOTS-CLÉS. fluorescence, cellule, microscopie, confocal, organismes marins.

KEYWORDS. fluorescence, cell, microscopy, confocal, marine organisms.

Qu'est-ce que la fluorescence ?

Les premières observations de la fluorescence remontent au XVI^{ème} siècle, mais c'est en 1852 que Georges Gabriel Stokes, professeur de mathématiques à l'Université de Cambridge, démontrera ce phénomène lumineux et le nommera "fluorescence", en référence aux cristaux de fluorite¹. En effet, Georges Stokes avait observé que lorsque ce minéral était exposé à un rayonnement ultraviolet, il émettait une lumière bleue.

Aujourd'hui, la définition de la fluorescence, selon le dictionnaire de l'Académie Française, est un mot emprunté de l'anglais qui décrit « la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière sous l'action d'un rayonnement ». Plus précisément, le phénomène de fluorescence apparaît lorsque les molécules d'un corps sont excitées à une longueur d'onde précise. Lorsque ces molécules reviennent à leur état initial, elles libèrent alors spontanément des photons et émettent de la lumière à une longueur d'onde souvent plus grande que celle ayant servi à l'excitation de départ. Cette capacité à émettre de la lumière est spécifique à certaines substances, appelées « fluorochromes » ou « fluorophores ».

Il existe d'autres phénomènes d'émission de lumière qui ne sont pas à confondre avec la fluorescence, comme la phosphorescence ou la bioluminescence par exemple. Ces trois réactions qui produisent de la lumière, sont différentes dans leur mécanisme. La phosphorescence est la propriété de certaines matières capables de capter et d'emmagasiner de l'énergie lumineuse et de la restituer progressivement sous forme de lumière dans l'obscurité. Le phénomène de phosphorescence est donc plus lent que celui de la fluorescence. La capacité phosphorescente de certains aluminates de terres rares est par exemple couramment utilisée pour la signalisation nocturne. La bioluminescence, quant à elle, est le résultat d'une réaction biochimique : un organisme vivant, à travers l'expression de gènes spécifiques, produit des protéines capables d'émettre de la lumière lorsqu'elles sont oxydées par l'intervention d'une enzyme. C'est le cas par exemple du ver luisant qui produit une protéine appelée luciférine et une enzyme, la luciférase, qui est capable d'oxyder la luciférine. Au cours de cette réaction, de l'énergie sous forme de lumière est libérée. Il existe un grand nombre d'espèces capables de bioluminescence, notamment dans le milieu marin. Le rôle de la bioluminescence varie selon les organismes (capture de proie, camouflage, communication, protection anti-UV...) et reste souvent encore mal compris.

Dans la nature, on retrouve de nombreuses molécules fluorescentes, comme des pigments (caroténoïdes) ou des alcaloïdes (la quinine). La molécule la plus connue et la plus utilisée en biologie est la protéine fluorescente verte GFP (Green Fluorescent Protein). Cette protéine émet une fluorescence de couleur verte lorsqu'elle est soumise à un rayonnement ultraviolet. Elle fût découverte pour la première fois chez la méduse *Aequorea victoria* en 1961 par le biochimiste Osamu Shimomura² (**Figure 1**). Ses travaux sur cette protéine fluorescente, ainsi que ceux de deux américains, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien, seront récompensés par le Prix Nobel de Chimie en 2008. Cette découverte va révolutionner la biologie à travers l'utilisation de la GFP dans de nombreux champs d'application³. En effet, cette GFP peut être associée à d'autres molécules, et être utilisée comme marqueur, ce qui permet de suivre la localisation de ces molécules au sein d'un organisme ou d'une cellule. De nouvelles molécules fluorescentes ont par la suite été découvertes. Ainsi, par exemple, en 1999 l'équipe de Serguey Lukyanov découvre une protéine fluorescente rouge (DsRed) chez le corail *Discosoma sp.*⁴. Les technologies permettant la détection et l'acquisition d'images résolutive ont aussi permis d'utiliser ces fluorochromes dans diverses applications. Aujourd'hui, il existe une large panoplie de molécules fluorescentes dans le commerce permettant de marquer les structures biologiques ou des mécanismes cellulaires avec précision. L'avantage de ces différents fluorochromes avec leurs propriétés et leur émission de lumière à différentes longueurs d'ondes (et donc de différentes « couleurs »), est qu'ils offrent la possibilité de les combiner et de détecter différentes molécules d'intérêt dans un même échantillon.

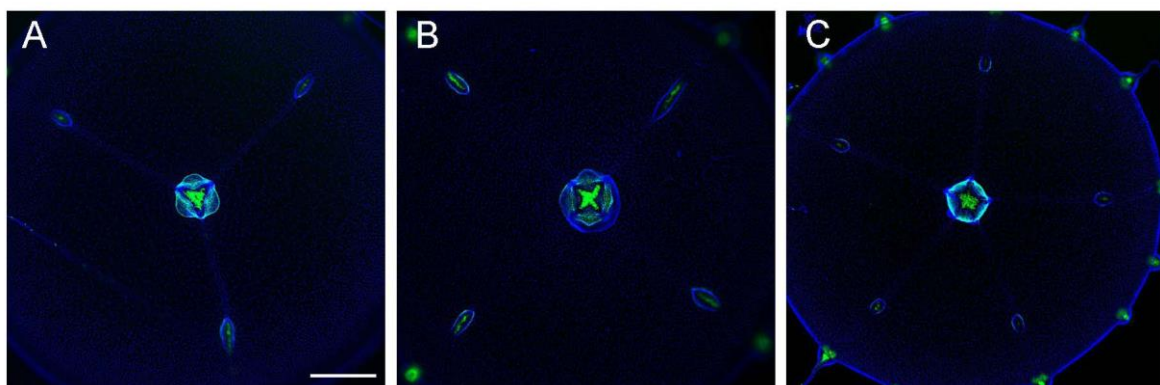


Figure 1. Observation de GFP naturelle chez une espèce de méduse : *Clytia hemisphaerica*. Marquage fluorescent des noyaux (en bleu), et fluorescence naturelle de la GFP (vert) de méduses âgées de sept jours. Les méduses sont normalement tétraradiées (**B**), et possèdent quatre "rayons". Des défauts de développement peuvent mener à des méduses pentaradiées (**C**, cinq rayons), ou triradiées (**A**, trois rayons). Barre d'échelle : 500 μ m. ©Florian Pontheaux/Cnidevolab.

Marquage des cellules et de leur architecture

Les organes et tissus des animaux sont formés de cellules qui sont organisées de manière très spécifique et qui présentent des formes et des caractéristiques particulières en lien avec leur fonction. Par exemple, les neurones possèdent des prolongements très longs, les axones, qui permettent la transmission de l'influx nerveux sur de grandes distances, alors que les cellules musculaires possèdent des fibres protéiques intracellulaires permettant la contraction. Les cellules des animaux ont un noyau, ou plusieurs (c'est le cas par exemple des cellules musculaires des vertébrés comme nous), qui se trouve dans le cytoplasme bordé par la membrane plasmique. Dans le cytoplasme se trouvent les « organes » de la cellule, appelés organelles, comme les mitochondries qui produisent l'énergie cellulaire, et le « squelette » de la cellule appelé cytosquelette, formé de différentes protéines qui donnent à la cellule sa forme et permettent de la maintenir ou au contraire de la modifier. Finalement, au sein des organes, les cellules sont entourées de matrice extracellulaire, produite par les cellules elles-mêmes, et faite de nombreux composés qui sont spécifiques des différents tissus (par exemple une matrice extracellulaire minéralisée dans le cas du tissu osseux). Pour observer dans un animal l'agencement des cellules et leur organisation, les scientifiques peuvent utiliser des marquages par coloration histologique ou la microscopie électronique à transmission, mais ces techniques nécessitent que l'échantillon soit préalablement coupé en tranche qui doivent être extrêmement fines dans le cadre de cette dernière technique (quelques nanomètres). La fluorescence permet par contre l'observation des cellules et des différentes structures dans l'organisme entier si celui-ci est suffisamment transparent grâce à l'utilisation de molécules particulières.

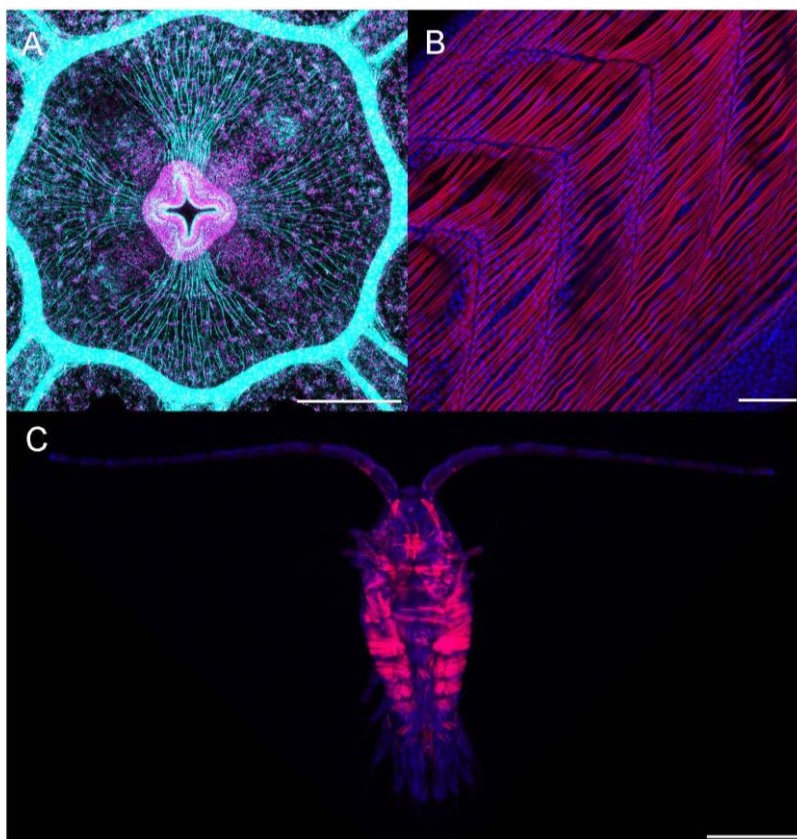


Figure 2. Observation des fibres musculaires chez différents organismes marins grâce à un marquage à la phalloïdine. (A) Marquage des noyaux au DAPI (magenta) et des fibres musculaires grâce à la phalloïdine (cyan) autour de la bouche d'une jeune méduse de l'espèce *Pelagia noctiluca*. Barre d'échelle : 200 μm . ©Bastien Salmon/Cnidevolab. (B) Marquage des noyaux (bleu) et des fibres musculaires (rouge) chez une larve d'amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* observée au niveau du tronc, et chez un copépode (C). Barre d'échelle : 25 μm (B) et 200 μm (C).

Le noyau peut être observé à travers un marquage de l'ADN double brin (acide désoxyribonucléique) qu'il renferme grâce à des composés fluorescents ayant une forte affinité pour

cette molécule. Il existe des composés qui fluorescent dans différentes longueurs d'ondes, les plus connus et utilisés depuis longtemps étant le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)⁵ et les colorants Hoechst qui interagissent avec les petits sillons de la double hélice d'ADN, et l'iodure de propidium qui lui s'intercale entre les deux brins, mais de nouvelles molécules ont été développées et commercialisées ces dernières années (**Figure 1 et 2**).

En ce qui concerne le cytosquelette, celui-ci est composé de microtubules (arrangements de plusieurs molécules de la protéine tubuline), de filaments de la protéine actine, et de protéines formant des filaments dits intermédiaires, comme les kératines par exemple. Pour pouvoir marquer de manière fluorescente ces molécules, il existe plusieurs outils. Concernant l'actine, l'outil le plus couramment utilisé est une toxine produite par un champignon vénéneux, l'amanite phalloïde (*Amanita phalloides*), appelée phalloïdine, que l'on peut coupler à un fluorochrome⁶. Cette dernière a une très forte affinité pour l'actine sous sa forme fibreuse et se lie à celle-ci en bloquant totalement les réarrangements de ces composés du cytosquelette, c'est d'ailleurs la propriété qui donne à cette molécule son caractère toxique. L'actine forme différentes structures dans les cellules et notamment un réseau de filaments positionnés juste sous la membrane plasmique, sa détection permet donc de visualiser le contour des cellules. L'actine est aussi l'un des composés principaux des filaments que l'on trouve dans les myofibrilles des cellules musculaires et le marquage de cette protéine permet d'observer l'organisation des muscles au sein d'un organisme (**Figure 2**). D'autres molécules permettent de détecter l'actine, comme par exemple une autre toxine, le jasplakinolide, produit par une éponge du genre *Jaspis*, et que l'on peut aussi associer à un fluorochrome⁷. Les microtubules, des tubes creux formés par les molécules de tubuline, sont aussi des composés majeurs du cytosquelette cellulaire. Ceux-ci sont des acteurs très importants de la division cellulaire et jouent un rôle structurel essentiel. En effet, ce sont ces microtubules qui forment l'ossature interne des cils, flagelles et axones, et détecter la tubuline permet de visualiser ses composés présents dans certaines cellules. Il existe certaines toxines qui peuvent se lier à la tubuline, mais le moyen le plus courant de la détecter est d'utiliser des anticorps. Ces anticorps peuvent être soit couplés à un fluorochrome, soit être utilisés avec des anticorps dits secondaires couplés à un fluorochrome. Les anticorps secondaires sont des anticorps qui se lient aux anticorps appelés primaires, ici les anticorps reconnaissant la tubuline. Cette technique, appelée immunomarquage car les anticorps sont des molécules produites par le système immunitaire, est très utilisée, et ceci non seulement pour détecter la tubuline, mais aussi pour détecter toutes sortes de protéines, dont celles qui forment le cytosquelette, celles que l'on trouve dans différentes organelles, ou encore les molécules qui forment la matrice extracellulaire comme la laminine par exemple.

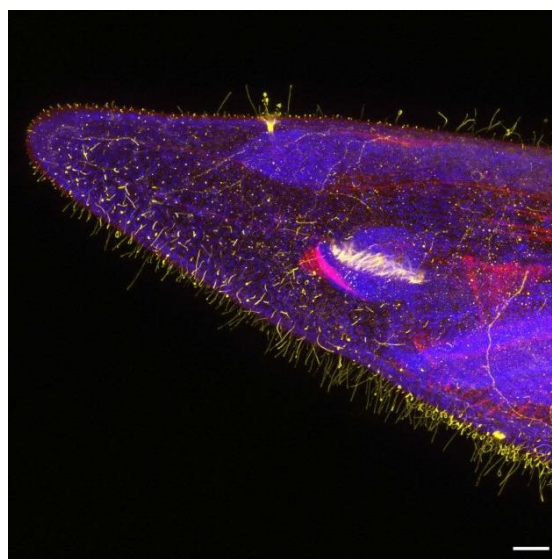


Figure 3. Triple marquage d'une larve d'amphioxus. Une larve d'amphioxus a été marquée à l'aide de DAPI (bleu) pour révéler les noyaux, à l'aide de phalloïdine permettant de visualiser l'actine des fibres musculaires (rouge) et à l'aide d'un immunomarquage permettant d'observer la tubuline des cils (jaune). La partie antérieure de l'animal est visualisée sur cette image. Barre d'échelle : 25 μ m

Finalement, la combinaison de marquages utilisant des fluorochromes différents permet de visualiser différents composés cellulaires en même temps dans le même échantillon. On peut ainsi par exemple observer les noyaux, les fibres musculaires, et les cils des cellules (**Figure 3**).

Visualiser et imager la fluorescence

Bien que très performant et complexe, l'organe nous servant de système optique appelé œil ne nous permet pas d'observer certaines structures ou organismes en raison de leur très petite taille. D'abord utilisées pour corriger la vision il y a bien longtemps (système de loupe par exemple), les lentilles ont ensuite été exploitées pour créer un outil devenu maintenant indispensable pour de nombreux scientifiques: le microscope. La microscopie, issue étymologiquement du grec ancien « mikros » (petit) et « skopein » (examiner), est une technologie utilisée depuis le XVII^e siècle. L'identité de l'inventeur du premier microscope et la date précise de son invention restent cependant encore confuses car il a probablement été fabriqué indépendamment par différents scientifiques dont Zacharias Janssen et Galilée. Les premières observations décrites d'organismes et structures réalisées à l'aide de ce nouvel outil sont faites vers 1660 par Robert Hooke et Antoni Van Leeuwenhoek qui s'intéressaient alors au liège et à certains microorganismes, et le mot « cellule » est utilisé pour la première fois suite à l'observation au microscope de liège végétal. Par la suite, les nouvelles découvertes et observations dans le domaine de la biologie vont s'intensifier grâce à ce nouvel outil⁸.

Le principe de la microscopie optique repose sur l'utilisation d'un « tube » contenant aux extrémités des lentilles. Les lentilles constituant l'objectif sont dirigées vers l'échantillon et vont permettre d'obtenir une image inversée et agrandie. Les lentilles constituant l'oculaire contribuent quant à elles à l'obtention de l'image définitive (c'est-à-dire perçue par nos yeux), en agissant comme loupe grossissante et en renversant l'image inversée. Le plan focal est l'endroit où se forme une image nette. Si l'échantillon est épais, l'image ne sera nette qu'à l'endroit où se trouve le plan focal. Les autres couches de l'échantillon paraîtront donc floues. Enfin, l'utilisation de la lumière est indispensable pour la visualisation de l'échantillon c'est pour cela qu'une source de lumière est utilisée: soit directe (en utilisant un miroir qui renvoie la lumière du jour vers l'échantillon) soit à l'aide d'un éclairage⁹.

Comme précisé dans la première partie, la fluorescence a été découverte au XIX^e siècle mais ce n'est qu'au début du XX^e siècle qu'elle est utilisée à des fins scientifiques pour observer des tissus et bactéries. Pour observer le phénomène de fluorescence et en tirer profit afin d'examiner des structures bien précises et très petites, les pouvoirs grossissants de la microscopie optique ont ainsi été associés à l'observation de la fluorescence. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser une source de lumière spécifique (lampe à vapeur de mercure, arc au xénon, LED, laser) couplée à un certain nombre de filtres permettant de sélectionner les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Il existe plusieurs types de microscopes permettant d'observer la fluorescence, les plus répandus étant le microscope à épifluorescence et le microscope confocal.

Le microscope à épifluorescence est composé de filtres de différentes couleurs, un pour la lumière d'excitation de l'échantillon, et un pour la lumière émise afin de sélectionner les longueurs d'ondes voulues. On l'appelle à « épi » (en grec « même ») fluorescence car la lumière entrante et sortante passe par le même objectif. Ce type de microscopie est dite à « champ large » car ici la totalité de l'échantillon est éclairé et donc la fluorescence émise dans le plan focal, comme la fluorescence émise hors du plan focal, sont détectées. Ceci contribue à créer un flou dans l'image, empêchant la bonne visualisation des structures, notamment lorsque l'échantillon est très épais (**Figure 4**). Le microscope confocal est quant à lui un peu plus complexe. En effet, il fonctionne à peu près de la même manière qu'un microscope à épifluorescence, cependant la source de lumière est un laser qui produit une lumière de longueur d'onde spécifique ce qui permet de ne pas utiliser de filtre pour exciter l'échantillon. Une autre différence importante est que la détection de la lumière émise par l'échantillon ne se fait pas par les yeux de l'expérimentateur ou grâce à une caméra à travers les oculaires mais par des détecteurs appelés tubes photomultiplicateurs (PMT). Les PMT transforment les photons (la lumière émise par l'échantillon lorsqu'il fluoresce) en électrons permettant ainsi la création d'un

courant électrique qui est ensuite transformé en image sur un ordinateur associé au microscope. Ceci permet de détecter une fluorescence de très faible intensité, invisible à l'œil humain. Mais l'un des avantages majeurs de ce microscope est qu'il est composé d'un dispositif, appelé filtre à trou d'épingle (pinhole), permettant de réaliser une filtration spatiale de la lumière. Les « pinholes » permettent de laisser passer les faisceaux lumineux d'excitation à un point précis de l'échantillon, mais également de bloquer les photons émis par l'échantillon ne venant pas du point focal de l'objectif. Ainsi, seul le signal fluorescent venant du plan focal est récupéré et l'image obtenue est totalement nette et correspond à une « coupe optique » de l'échantillon au niveau de ce plan¹⁰ (**Figure 4**).

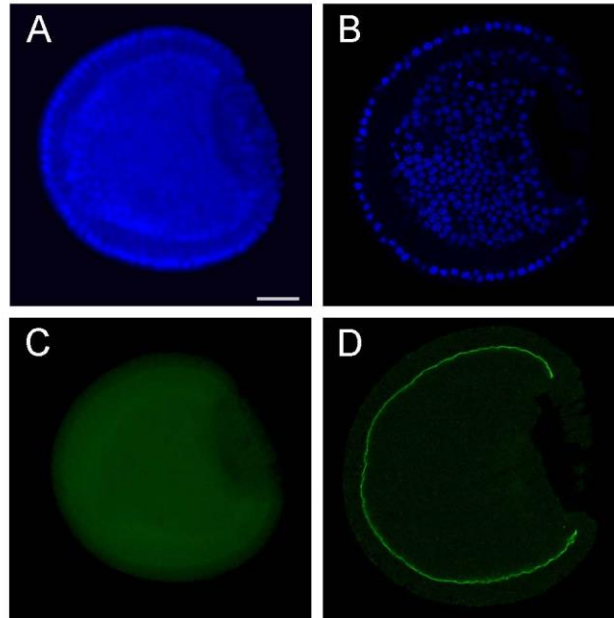


Figure 4. *Distinction entre une image acquise au microscope à épifluorescence et au microscope confocal. Marquages fluorescents sur un embryon d'amphioxus au stade gastrula en vue latérale : marquage au DAPI (pour révéler les noyaux des cellules, A et B) en bleu et immunomarquage pour la laminine (protéine de la matrice extracellulaire, C et D) en vert. Le même embryon a été observé au microscope à épifluorescence (A, C) et au microscope confocal (B, D). Barre d'échelle : 25 μ m.*

L'acquisition d'images numériques est généralement suivie d'une analyse faisant appel à différents logiciels. Ceux-ci permettent la visualisation de l'image, et sa correction éventuelle, ainsi que la réalisation de différentes mesures comme des mesures de taille, de volume ou d'intensité du signal lumineux acquis. Ils permettent aussi de superposer des images prises pour différents fluorochromes sur un même échantillon suite à des marquages multiples (**Figure 5**), de modifier les couleurs (**Figures 6 et 7**), ou de reconstruire une image tridimensionnelle en assemblant toutes les « coupes optiques » (**Figure 8**). Ces outils offrent aussi la possibilité de transformer les marquages en objets dont on peut modifier la couleur ou la texture à volonté. Finalement, les possibilités multiples de traitement de ces images deviennent aussi des outils créatifs, permettant l'élaboration d'images du vivant d'un esthétisme fascinant (**Figure 9**).

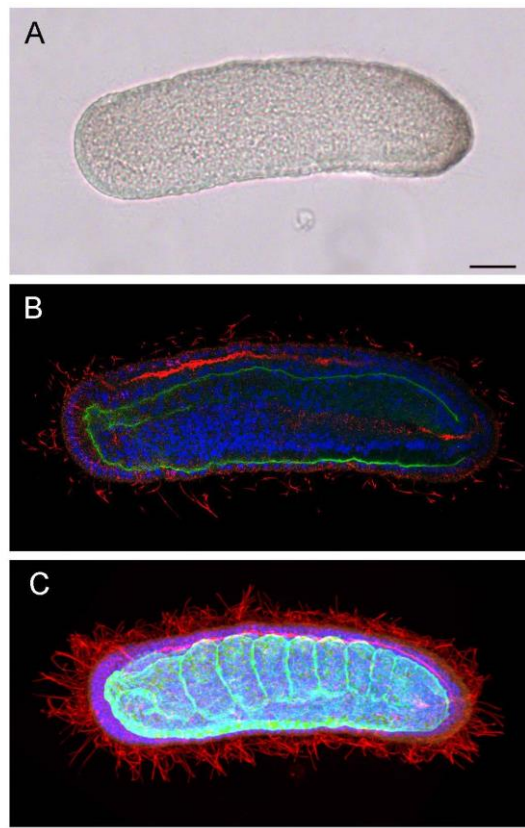


Figure 5. Superposition de marquages fluorescents sur un embryon d'amphioxus au stade neurula. (A) Observation de l'embryon, en vue latérale avec la partie antérieure à gauche et la partie dorsale en haut, au microscope sous lumière blanche sans révélation de la fluorescence. **(B)** Observation de l'embryon au microscope confocal après marquage des noyaux au DAPI (bleu) et immunomarquages révélant la laminine (vert) et la tubuline (rouge) qui permet de mettre en évidence les cils de l'embryon. **(C)** Superposition de toutes les coupes optiques acquises afin d'obtenir une vue en trois dimensions de l'embryon. Barre d'échelle : 25 μm .

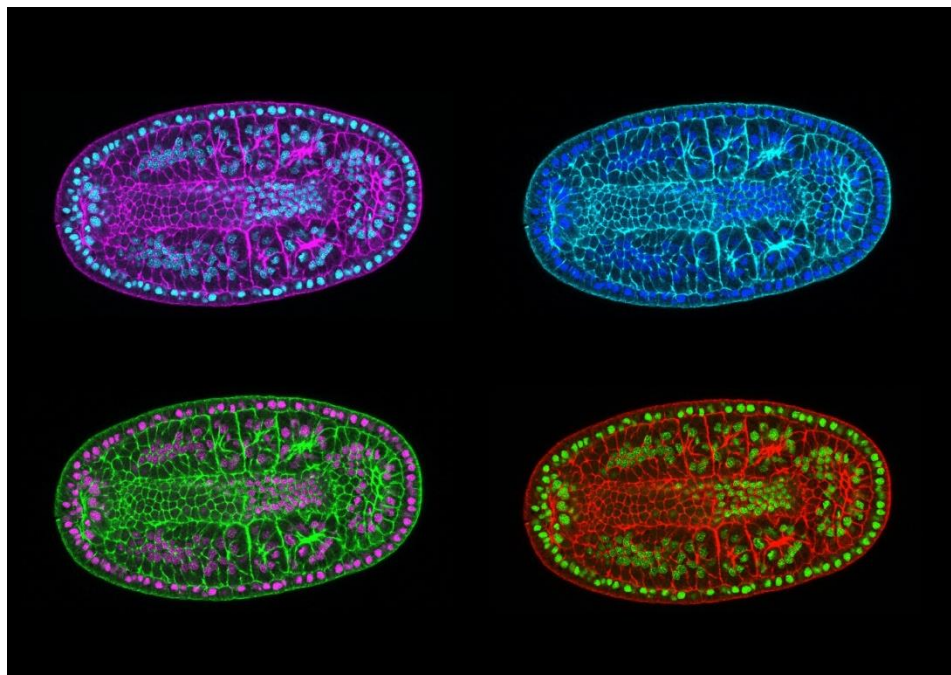


Figure 6. Modification des couleurs après marquage sur un embryon d'amphioxus au stade neurula. Le DAPI, pour marquer les noyaux, et la phalloïdine, pour visualiser les contours des cellules, ont été utilisés. Les embryons ont été imagés au microscope confocal en vue dorsale avec la partie antérieure à droite. Sur la première image en haut à gauche, le marquage des noyaux est en cyan et celui des contours cellulaires en magenta. Les autres images sont identiques à la première mais les couleurs ont été modifiées.

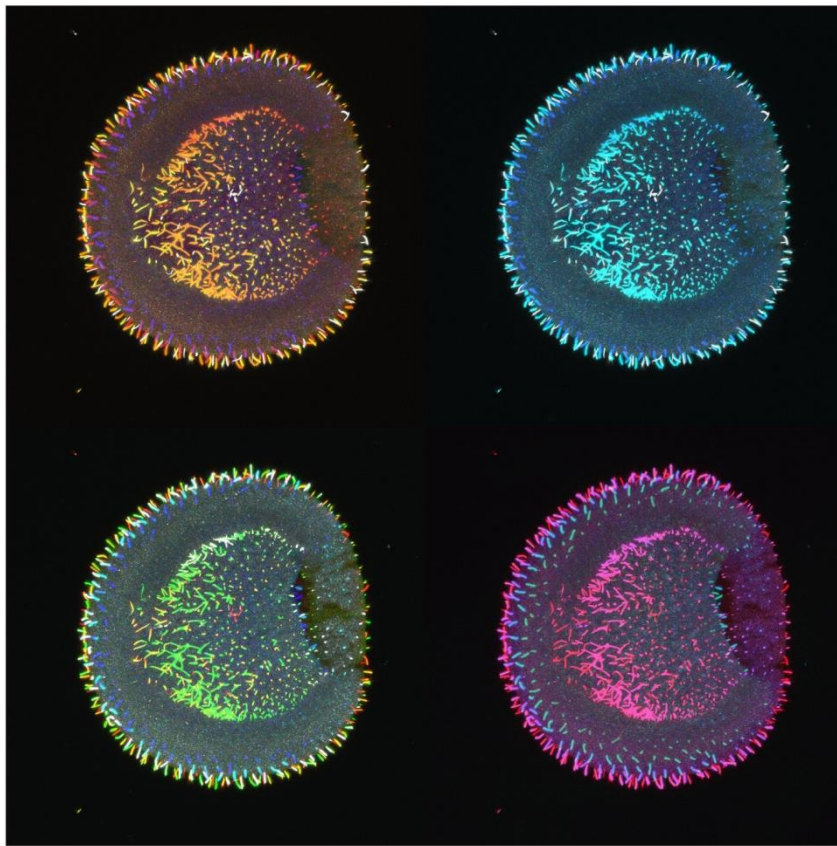


Figure 7. Modification des couleurs après marquage sur un embryon d'amphioxus au stade gastrula.

Un immunomarquage permettant de visualiser la tubuline des cils d'un embryon au stade gastrula a été réalisé. L'embryon a été imagé au microscope confocal en vue latérale et plusieurs coupes optiques ont été superposées. Les quatre images correspondent à une image unique dont les couleurs ont été modifiées. Pour chaque image, un gradient de couleur différent, qui indique la profondeur du marquage dans l'embryon, c'est-à-dire le niveau de la coupe optique où le marquage est observé, a été utilisé.

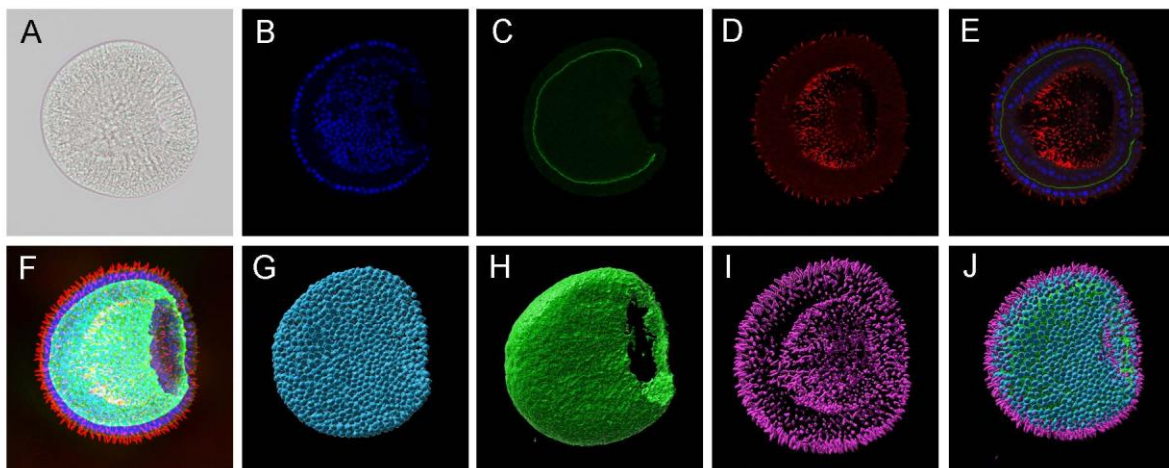


Figure 8. Reconstruction tridimensionnelle d'un embryon d'amphioxus à l'aide de marquages

fluorescents. (A) Observation de l'embryon en vue latérale au microscope sous lumière blanche sans révélation de la fluorescence. Images prises au microscope confocal d'une coupe optique après marquages fluorescents révélant les noyaux en bleu (B), la laminine en vert (C) et la tubuline en rouge (D). (E) Image de la superposition de tous ces marquages. (F) Vue en trois dimensions de l'embryon après superposition de toutes les coupes optiques. Les différents marquages ont été utilisés pour créer des objets graphiques tridimensionnels qui correspondent à chaque noyau (G), à la lame basale qui délimite les deux couches de cellules de l'embryon (H) et aux cils (I). (J) La dernière image correspond à la visualisation superposée de tous ces objets.



Figure 9. Kaléidoscope planctonique. Un copépode et une larve de ver marin ont été marqués à l'aide de phalloïdine pour révéler les fibres musculaires. Les animaux ont ensuite été imagés à l'aide d'un microscope confocal. Toutes les coupes optiques ont été superposées et les couleurs ont été modifiées pour créer plusieurs images différentes qui ont ensuite été assemblées pour créer ce montage.

Conclusion

La représentation en image du monde qui nous entoure est une activité menée par l'Homme depuis bien longtemps pour différentes raisons, religieuses, artistiques ou scientifiques. En sciences biologiques, pouvoir transmettre les observations faites à la communauté scientifique et aux générations suivantes a toujours été essentiel. Le dessin ou la peinture, puis la photographie argentique, ont été les premiers outils permettant de garder une trace de ces observations. Si l'objectif premier est la description du monde vivant et la réponse à des questionnements scientifiques, la beauté de la Nature ne peut qu'émerveiller celui qui l'étudie, et l'imagerie scientifique a très souvent éveillé l'âme d'artiste des chercheurs. Le développement de l'acquisition numérique d'images, qui peuvent être retravaillées à façon, et le développement des marquages fluorescents, nous donnent l'occasion d'observer l'invisible et de transformer ces observations en créations artistiques d'un nouveau genre.

Bibliographie

- 1 Stokes, G. G. On the change of refrangibility of light. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 463-562 (1852).
- 2 Shimomura, O. Discovery of green fluorescent protein, gfp. *Nobel lecture* (2008).
- 3 Zimmer, M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical reviews* **102**, 759-782 (2002).
- 4 Matz, M. V. *et al.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology* **17**, 969-973, doi:10.1038/13657 (1999).
- 5 Schnedl, W., Mikelsaar, A. V., Breitenbach, M. & Dann, O. DIPI and DAPI: fluorescence banding with only negligible fading. *Human genetics* **36**, 167-172 (1977).
- 6 Wulf, E., Deboen, A., Bautz, F. A., Faulstich, H. & Wieland, T. Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proceedings of the national academy of sciences* **76**, 4498-4502 (1979).
- 7 Milroy, L.-G. *et al.* Selective chemical imaging of static actin in live cells. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 8480-8486 (2012).

- 8 Bruch, J.-F., Sizaret, D., Brault, A., Tabareau-Delalande, F. & Maître, F. Étude historique du microscope optique: Des premières lentilles du XVI^e siècle aux techniques de super-résolution et de lecture automatisée. *Revue francophone des laboratoires* **2015**, 67-79 (2015).
- 9 Sauer, H. & Surrel, J. Microscopie optique-Principes et utilisations de base du microscope. (2007).
- 10 Renz, M. Fluorescence microscopy—A historical and technical perspective. *Cytometry Part A* **83**, 767-779 (2013).