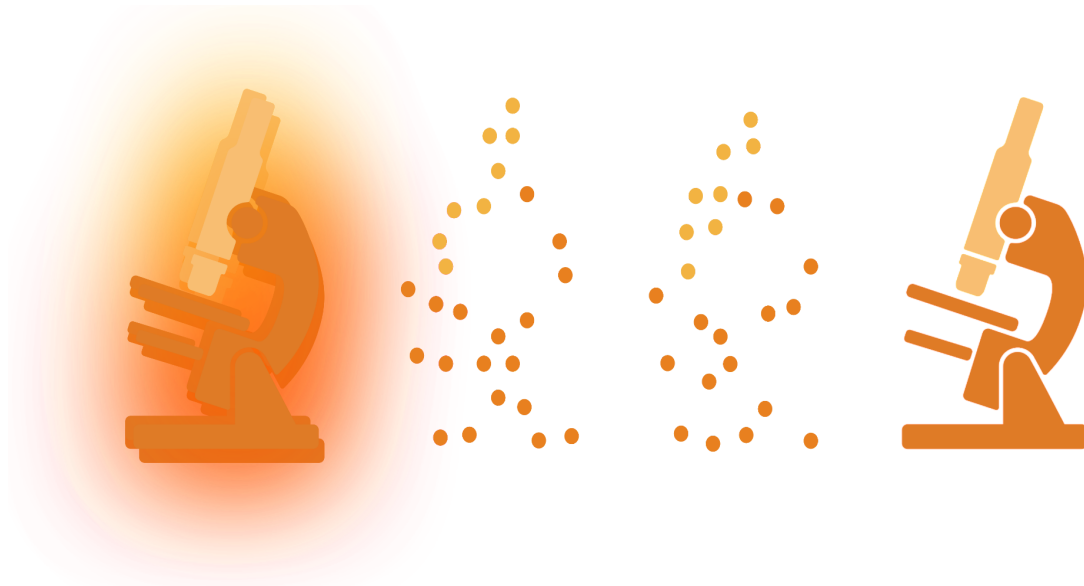


Compte-rendu d'expériences menées par le GT Pointillisme



Test d'outils pour le dSTORM:

**Performances des Janelia Fluor 646 et 549, et
comparaison de marqueurs fiduciaires pour la
correction de drift.**



Introduction

Avec l'émergence de la microscopie de super-résolution, nous avons assisté à l'amélioration des microscopes, des techniques et conditions d'imagerie et depuis quelques années un travail très important est en cours pour améliorer les sondes fluorescentes pour la super-résolution.

En microscopie dSTORM la qualité des images obtenues repose sur la combinaison de sondes fluorescentes avec un milieu d'imagerie permettant le clignotement des fluorophores. Beaucoup d'études donnent ainsi des conseils sur la composition du milieu à utiliser ou sur quel fluorophore utiliser, ces études concernent en général une application ou un modèle en particulier. Il peut donc sembler difficile pour un utilisateur qui débute en dSTORM de choisir quelle combinaison fluorophore/milieu choisir pour son application.

De plus, la résolution spatiale sera affectée par la photophysique du fluorophore utilisé. Un fluorophore émettant beaucoup de photons sera mieux localisé que celui qui en émet moins. Ce n'est pas la seule propriété, le temps passé par la molécule fluorescente sur son état brillant ou sombre est aussi une variable importante : un état noir long assure d'être en régime de molécule unique et ainsi d'avoir la meilleure précision de localisation. Bien entendu dans un contexte biologique, il n'est pas toujours évident d'obtenir ce régime de molécule unique surtout lorsque la densité de protéine biologique est extrêmement dense comme les tubulines, actines, etc. Le choix d'un algorithme de localisation haute ou basse densité est donc tout aussi important. La résolution spatiale en régime de densité haute sera toujours meilleure avec un algorithme de localisation à haute densité qu'avec un algorithme non adapté de localisation à faible densité. Mais dans un contexte d'une étude biologique où la résolution spatiale est la donnée importante, l'optimisation des conditions expérimentales pour obtenir un régime de molécule unique reste et restera la priorité.

Depuis 2 ans, le groupe de travail "pointillisme" s'est régulièrement réuni pour tester plusieurs de ces paramètres afin d'aider les utilisateurs à choisir des sondes ou des outils pour leurs expériences de SMLM. Nous avons notamment comparé en STORM des fluorophores récents - les Janelia Fluor 646 (JF646) et 549 (JF549) - à ceux habituellement utilisés, les Alexa Fluor 647 (AF647) et 532 (AF532) ainsi qu'au CF568. Nous avons testé différents algorithmes de détection et localisation en fonction de la densité des molécules. Enfin, nous avons aussi évalué l'utilisation de différents marqueurs fiduciaires pour le recalage des données après l'acquisition. Nous présentons ici les conclusions générales de nos observations. Si vous souhaitez plus de détails sur les tests réalisés, n'hésitez pas à nous contacter, nous serons ravis d'en discuter avec vous!



I - Comparaison des fluorophores

A - Comparaison des propriétés photophysiques

Avant de choisir un fluorophore à des fins d'imagerie en super-résolution de structures biologiques dans le cadre d'un projet de recherche, il est préférable d'avoir une idée hors contexte biologique du fluorophore qui pourra nous apporter la meilleure précision de localisation possible. Bien sûr, le contexte biologique est important mais il apportera son lot d'effets positifs et négatifs sur la photophysique du fluorophore dégradant éventuellement l'image super résolue de la structure étudiée. Autant commencer avec le fluorophore qui possède les meilleures propriétés photophysiques.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à étudier la photophysique de plusieurs fluorophores couramment utilisés en imagerie de super-résolution dSTORM notamment et d'autres plus récemment développés : AF647 et JF646; AF532, CF568 et JF549.

Pour être en régime de molécule unique, des anticorps secondaires conjugués aux différents fluorophores ont été fortement dilués et adsorbés sur des lamelles de verre assurant la visualisation d'événements isolés spatialement. Chaque condition est ensuite observée dans un milieu enzymatique permettant d'assurer le clignotement des fluorophores¹, pour enregistrer les signaux des anticorps isolés pendant une minute avec une fréquence d'acquisition de 100Hz. Après détection et localisation des événements individuels par image, toutes les localisations dans un rayon de 50 nm sur des images consécutives sont regroupées comme faisant partie de la même trace issue d'un seul anticorps^{1,2}. A partir des traces groupées, les comportements de clignotement entre états ON et OFF peuvent alors être analysés pour chaque anticorps, et les statistiques de photophysique comme le duty cycle, l'intensité des événements ou la précision de localisation peuvent être extraites (Fig1).

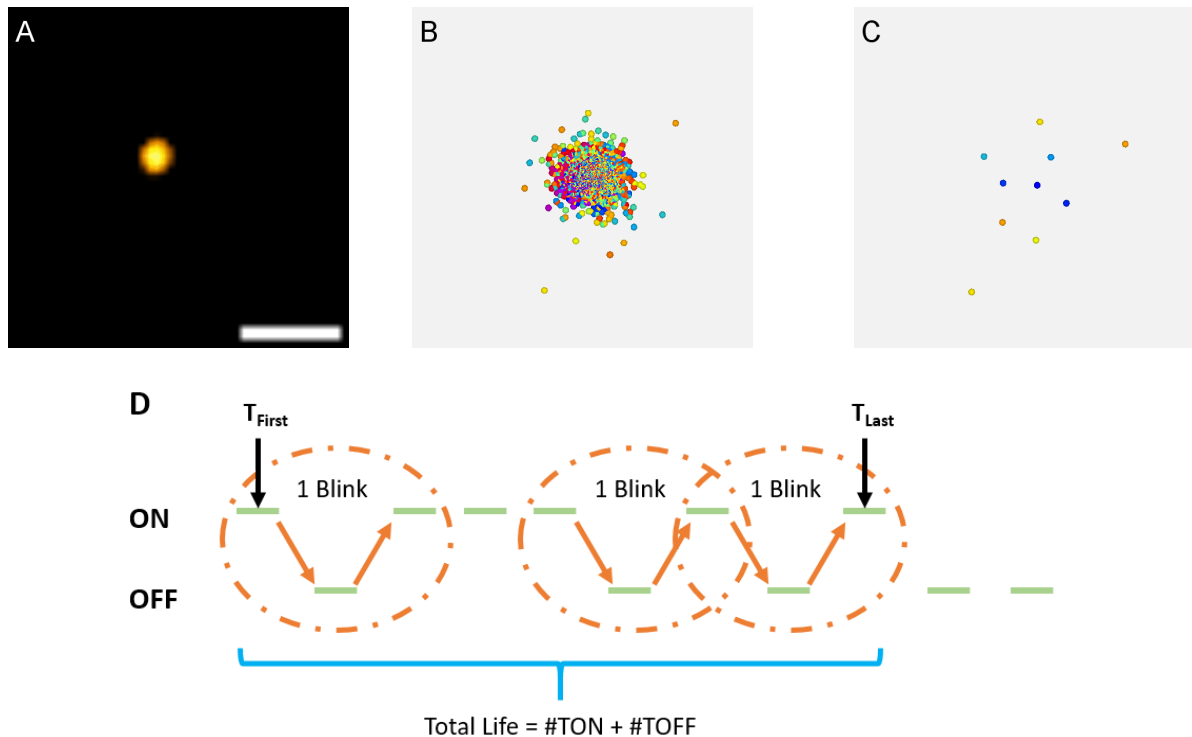


Fig 1: Procédure pour l'extraction des données de photophysique: A- Illustration de l'acquisition de quelques anticorps en conditions STORM (200 plans extraits d'une acquisition de 6000 plans, échelle= 1 μ m). B- Représentation de toutes les localisations extraites pour cette sous-région. Pour chaque localisation sont extraites les données d'intensité et de précision de localisation. C- Pour chaque localisation, une analyse des détections consécutives dans un rayon de 50 nm est faite afin de regrouper les localisations issues du même anticorps et reconstituer la trace de chaque anticorps. Après le regroupement des localisations chaque point représente la nouvelle localisation obtenue pour la trace (barycentre de toutes les localisations incluses dans la trace). D- Définition d'une trace et du calcul des différents paramètres photophysique.

De cette analyse, nous pouvons conclure que dans la majorité des applications, l'AF647 reste le fluorophore le plus simple et efficace à utiliser en termes de brillance et de cinétiques de photoswitching. Il est à noter tout de même que dans ces conditions particulières, le JF646 semble présenter des états noirs plus stables, ce qui pourrait être un avantage pour faciliter le contrôle du régime de molécule unique dans ces conditions. Cependant, il faut garder en mémoire que les conditions utilisées ici sont très différentes d'une structure biologique. Sur une structure structure très dense, il faudrait considérer la possibilité d'un FRET comme décrit dans l'étude de Helmerich *et al.* dans Nature Methods en 2022³. Cette étude démontre que dans des structures synthétiques dont la distance entre les fluorophores (dans ce cas Cy5) est inférieures à 10nm, les cinétiques de photoswitching entre états ON et OFF sont accélérées par rapport à des conditions où la distance entre fluorophores est supérieure à 10nm. Ce phénomène serait lié à un transfert d'énergie de type FRET entre les états ON fluorescents et les états OFF de plus faible énergie, favorisant un retour plus rapide à l'état fondamental de ces derniers et perturbant donc le contrôle du régime single molecule. Ce phénomène sera re-discuté dans la partie I-C de ce document, car il ne peut être évalué dans les conditions de l'expérience décrite ici.



Concernant les fluorophores orange, l'AF532 et le CF568 restent plus performants dans ces conditions en termes d'intensité de détection et de précision de localisation en condition de base que le JF549.

B - Comparaison des fluorophores en dSTORM sur échantillon biologique

Afin de comparer les Alexa Fluor et les Janelia Fluor, nous avons réalisé des immunomarquages sur cellules épithéliales, marquées avec un anticorps de souris dirigé contre l' α -tubuline. Les cellules sont fixées en 4%-paraformaldéhyde 0,2%-Glutaraldehyde 0,5%-Triton afin d'optimiser le marquage des microtubules. Les secondaires Alexa Fluor 647 et les Janelia Fluor 646, dilués au 300^e sont ensuite ajoutés sur des lames réalisées en miroir. Les lames sont ensuite imagées avec les mêmes paramètres d'acquisition pour les deux types de fluorophores. Les lames sont étudiées sur trois types de machines (Zeiss TIRF Elyra PS1, Nikon Eclipse TiE TIRF "home made" et Bruker Vutara 350) avec un temps d'exposition de 20 ms dans un tampon enzymatique classique (100 mM MEA GLOX) et le tampon commercial Eternity.

D'après nos différents tests (réalisés en illumination plein champ ou TIRF), il semble que pour une même intensité laser, les AF647 partent en état de triplet plus facilement que les JF646 qui nécessitent une puissance laser plus soutenue. Toutefois, les JF646 sont particulièrement activés après une illumination au laser 561nm (lors de doubles marquages notamment). La durée pendant laquelle le clignotement des JF646 peut être observé est plus longue (>50 000 frames) que celle des Alexa647 permettant d'envisager des acquisitions sur des temps plus longs, ce qui peut être notamment un avantage pour le vivant. Toutefois, la précision radiale de localisation des Alexa Fluor semble être supérieure (pic entre 10-20nm vs 20-25 nm pour les JF), octroyant ainsi un meilleur rendu sur cellules fixées. Il est à noter que ces résultats valent pour une certaine densité de marquage (ici très dense pour la tubuline) et avec une exposition de 20 ms. Il n'est pas exclu que des marquages moins denses ou des variations du temps d'exposition puissent donner des conclusions différentes. Il serait intéressant de caractériser cela plus en détail.

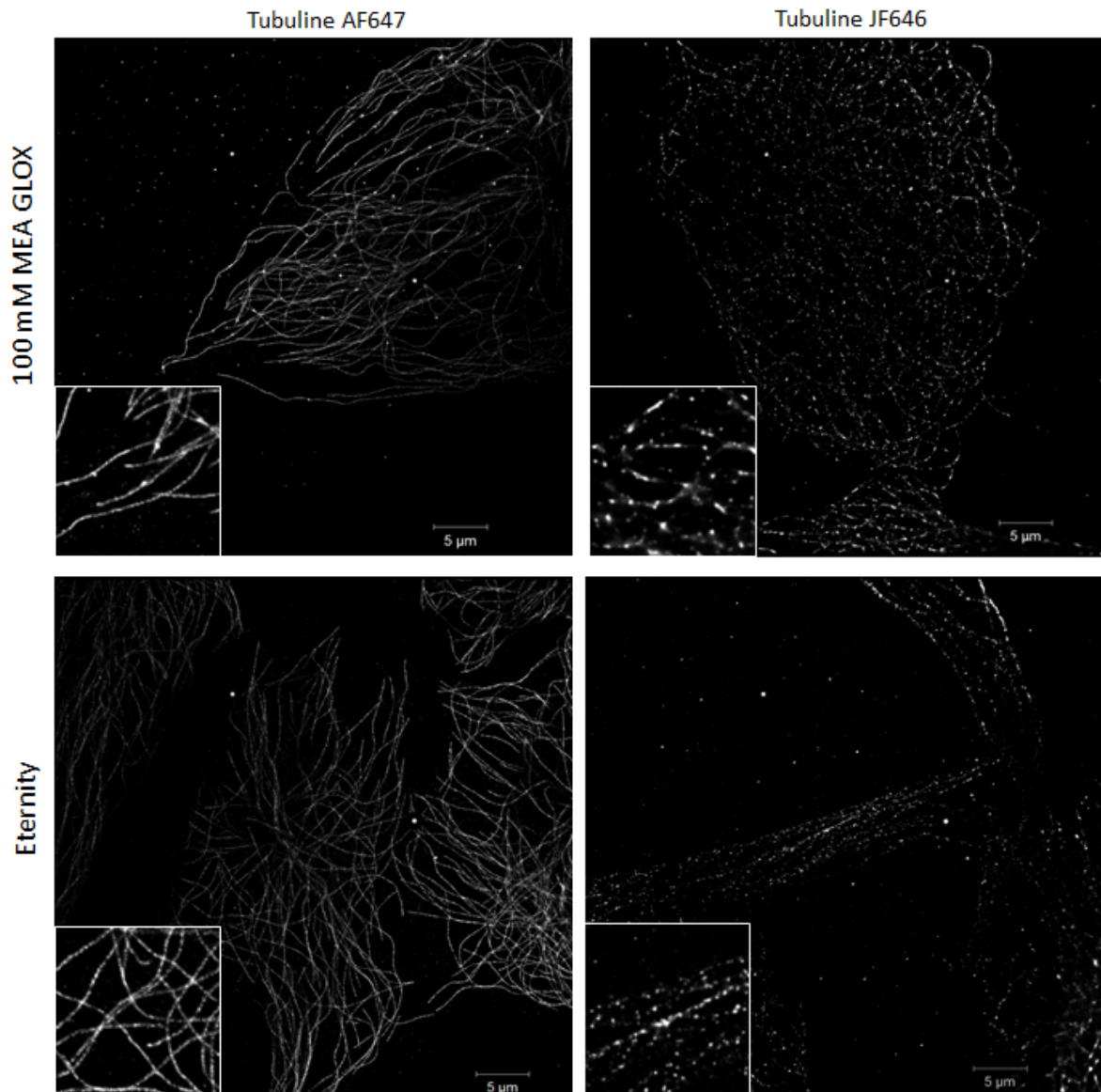


Fig 2: Comparaison des sondes fluorescentes AF647 et JF646 sur un marquage alpha tubulin dans deux tampons différents : Tampon classique 100 mM MEA GLOX et tampon Eternity. Images réalisées sur un Zeiss TIRF Elyra PS1.



Dans le canal orange, nous avons également comparé les CF568 et les JF549 sur des lames miroirs immunomarquées avec un anti-Tom20 en tampon GLOX toujours avec une exposition de 20 ms. Le clignotement des CF568 semble moins fréquent que celui des AF647 et JF646 (10 localisation/images vs 40) mais il perdure sur plus de 30 000 frames permettant une analyse très convenable. La précision de localisation est très bonne avec un pic entre 7 et 20 nm tandis que le JF549 donne une précision de localisation équivalente au JF646.

C - Comparaison des fluorophores en dSTORM sur échantillon biologique très dense

Nous avons comparé la reconstruction dSTORM d'une même structure marquée avec soit l'Alexa Fluor 647, soit le Janelia Fluor 646, deux fluorochromes aux longueurs d'onde similaires. Ici le centrosome est marqué avec un anticorps primaire puis avec un anticorps secondaire couplé à l'un ou l'autre des fluorochromes testés (Fig3). La lame est ensuite montée en tampon STORM ([Eternity](#)) et scellée puis observée sur un microscope Elyra 7 (PLATIM, Lyon).

Les résultats montrent que l'AF647 est plus adapté aux structures denses (comme le centrosome) avec un temps de passage dans l'état noir rapide (phase de pompage) et nécessitant une puissance laser moindre. Le JF646 n'est pas optimal dans nos conditions puisqu'il nécessite une puissance laser plus élevée pour passer en dark state, et ce pendant plus longtemps (impactant possiblement les autres fluorochromes pour les acquisitions en multi-couleur). Ce résultat est contradictoire avec le résultat obtenu sur la caractérisation de la photophysique des fluorophores (Cf §I-A). Un paramètre non étudié en régime de molécule unique est l'effet de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes proches (<10nm) qui pourrait dans le cas de densité forte avoir un rôle non négligeable notamment dans cette étape préliminaire à l'obtention du régime de molécule unique. Le JF646 pourrait être plus sensible à cet effet. Une étude complémentaire pourrait être faite en changeant la concentration d'anticorps secondaire dans l'expérience précédente et voir l'impact de ce changement sur la photophysique de ces 2 fluorophores.

La reconstruction est également impactée puisqu'on observe plusieurs émetteurs sur la même image de manière régulière (rare avec l'AF647) favorisant les erreurs de localisation. Pour les fluorochromes émettant dans le rouge lointain, l'Alexa Fluor 647 reste le fluorochrome le plus adapté au dSTORM dans nos conditions.

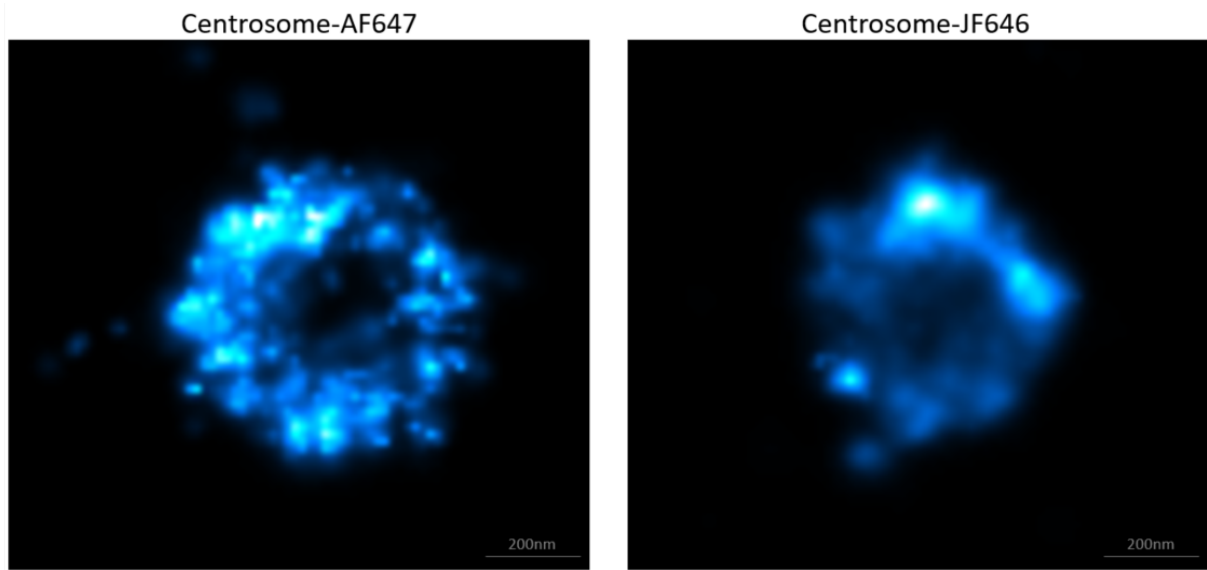


Fig 3: Comparaison des sondes fluorescentes AF647 et JF646 sur un marquage du centrosome dans le tampon Eternity
 Reconstruction issu d'une acquisition de 15000 images avec le tampon Eternity. Images réalisées sur un Zeiss Elyra 7.



II - Comparaison d'algorithmes de reconstruction en fonction de la densité de la structure

Le but ici est de comparer différents algorithmes de reconstruction SMLM payant (Zeiss) ou open source (UNLOC) sur un objet calibré et de structure connue et dense en signal⁴ ([Fluoref](#), développé en collaboration avec la Société Idylle et Arnaud Favier/ Christophe Place / Karine Monier). Ici les sphères de 1 μm , recouvertes de fluorochromes 647, ont été adsorbées dans une boîte Wilco contenant une lamelle calibrée. Elle est ensuite montée dans un tampon STORM ([Eternity](#)), scellée puis observée sur un microscope Elyra 7 (PLATIM, Lyon).

L'objet à reconstruire est :

- En 2D un cercle d'un diamètre d'1 μm ,
- En 3D une sphère de 1 μm .

A - Analyses préliminaires de la qualité des données

Avant de lancer une analyse en SMLM, il convient de s'assurer que les données à analyser satisfont certains critères à savoir que le rapport signal sur bruit (signal to noise ratio, SNR) est élevé et la densité (est-on en régime de molécules uniques ou non) est faible. Pour avoir un ordre de grandeur de la résolution associée à ce couple SNR / densité, on peut se référer à la figure suivante⁵:

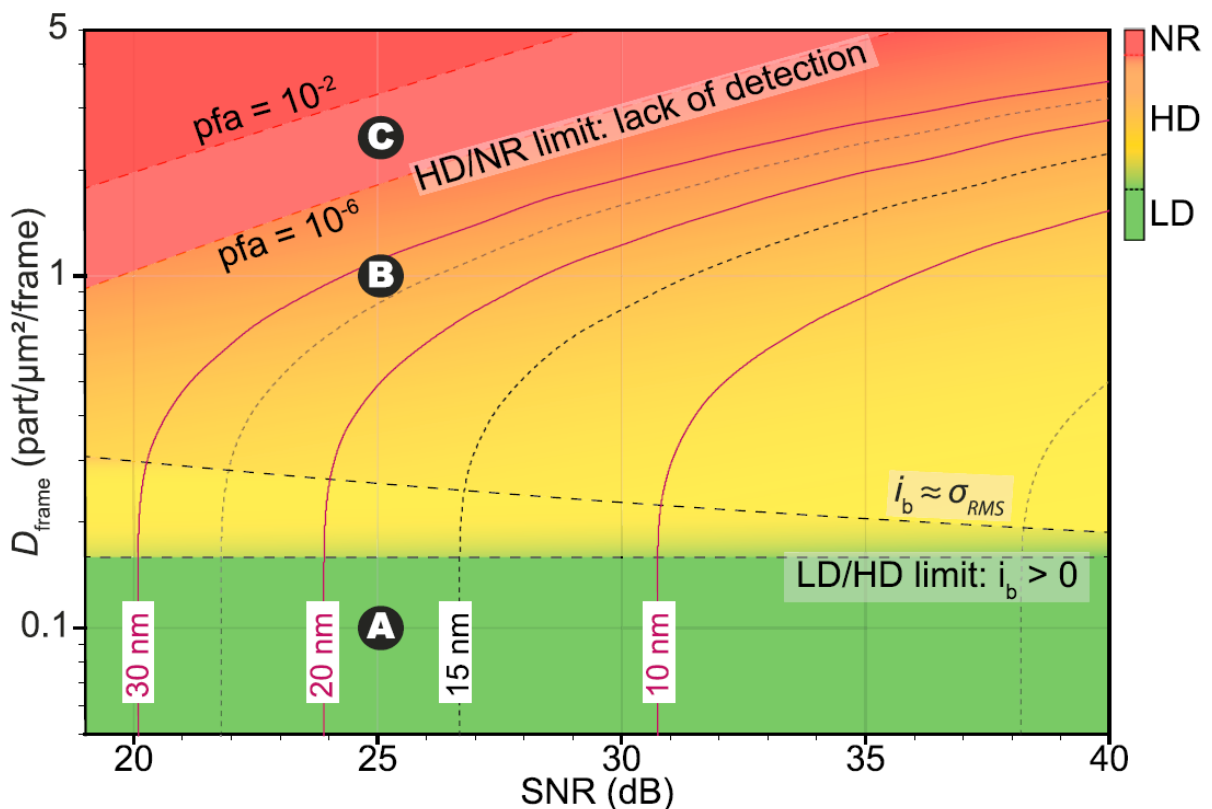




Fig 4: Diagramme Densité - SNR. Cet abaque met en évidence le caractère indissociable entre densité et SNR. Plus le SNR est important, plus la précision de localisation est améliorée. Si la densité augmente, pour un même SNR, la précision de localisation diminue. En basse densité (molécules dans un régime purement individuel, appelé ici LD pour low density), seul le SNR influe sur la précision de localisation. En mode HD (molécules ne pouvant être analysées de manières individuelles (HD pour high density), il faut absolument utiliser un algorithme prenant en compte les molécules de façon globale. Dans la région NR (non résoluble), AUCUN algorithme n'est capable de détecter, dénombrer et localiser les molécules lorsqu'elles sont trop proches.

En mode Low density (LD), l'algorithme ne cherche que des PSF isolées ce qui pose un problème d'énumération et de biais car les évènements sont ici très proches. Il a été démontré que la distance minimale entre particules doit être de plusieurs centaines de nm pour qu'on puisse les considérer comme individuelles⁵.

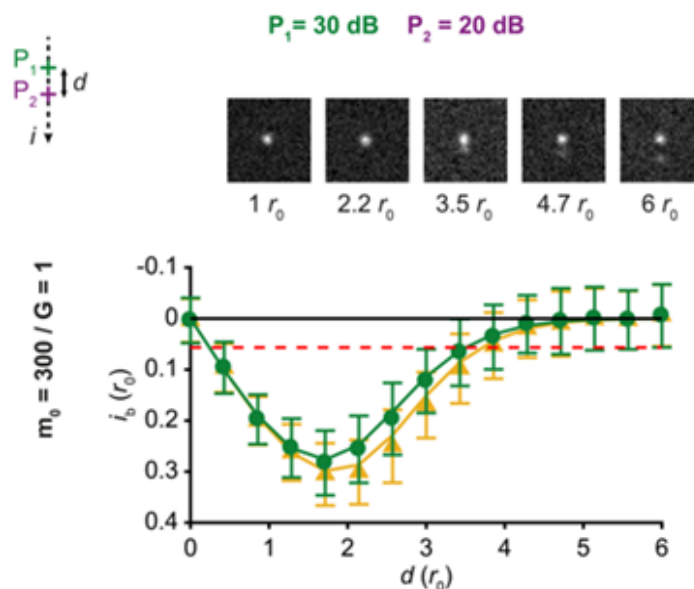


Fig 5: Biais de localisation dans une scène à deux particules plus ou moins proches analysées par un algorithme LD. On cherche ici à localiser une particule (P1) avec un fort SNR (30 dB) en présence d'une particule (P2) de plus faible SNR (20 dB). L'omission de P2 dans la localisation de P1 entraîne un biais sur la localisation de P1 supérieur à la précision de localisation attendue qui se manifeste très tôt (~ 500 nm). Ici, r_0 est la taille de la PSF et est égale à 134 nm. Les courbes vertes correspondent à un estimateur de type MMSE (Minimum Mean Square Error Estimator) et en orange à un estimateur de type MLE (Maximum Likelihood Estimator). Les traits pleins sont les calculs théoriques et les points sont les résultats des algorithmes associés. Comparé à un MLE, l'estimateur MMSE est plus robuste et plus simple à calculer sur des données à haute densité locale avec un fond complexe⁵.

Sur les images brutes prises au hasard dans la pile, on voit que les PSFs sur les billes ne sont pas individuelles (voir Figure 6, à gauche). Ainsi, pour ces données, UNLOC a été utilisé en mode HD non-TIRF et avec correction de drift pour permettre une détection exhaustive et non biaisée des particules. L'analyse de taille des PSF montre que les PSF détectées ont plusieurs tailles (voir Figure 6, à droite), ce qui sous-entend qu'il y a des PSF correspondant à des molécules individuelles et des PSF proches dont la taille apparente est plus large que la taille réelle. Ceci peut être lié soit au fait que les



PSF ne sont pas dans le même plan focal et donc plus étalées, soit que 2 évènements proches n'ont pas pu être discriminés malgré l'utilisation du mode HD et apparaissent donc avec une largeur de PSF plus importante.

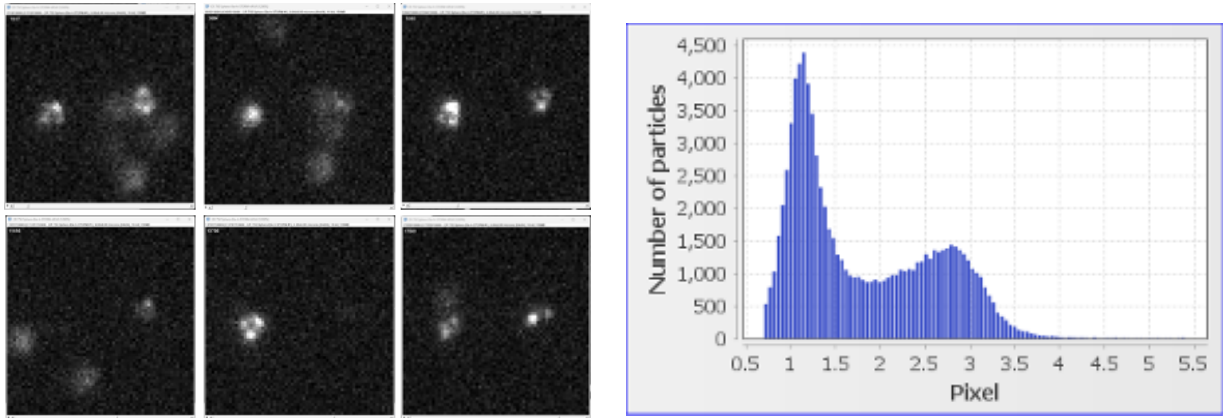


Figure 6: Exemples d'images brutes des Fluoref en tampon Eternity (à gauche) et histogramme des tailles de PSF obtenues par UNLOC en mode HD (à droite). A gauche, on peut voir que plusieurs PSF peuvent être collectées pour une même sphère de 1 micron sur une seule image. Cela justifie d'utiliser le mode high density (HD) sur UNLOC pour détecter des particules individuelles. A droite l'histogramme des tailles de PSFs montre l'existence de 2 populations de PSF, la plus fine étant centrée sur 1,15 pixel et correspondant très certainement à des particules individuelles. La population avec une taille de PSF plus étalée correspondant soit à des PSF hors focus soit à des PSF de double évènements proches.

Les résultats indiquent que les algorithmes dit « multi-emitter / high density » sont beaucoup plus adaptés que ceux dits « single emitter / low density » pour les structures denses telles que Fluoref. Néanmoins, il est quand même nécessaire avec ces algorithmes multi-emitter, de filtrer les données sur le critère de taille de la PSF pour éliminer les évènements hors-focus ou double emitters proches (Figure 7, bas).

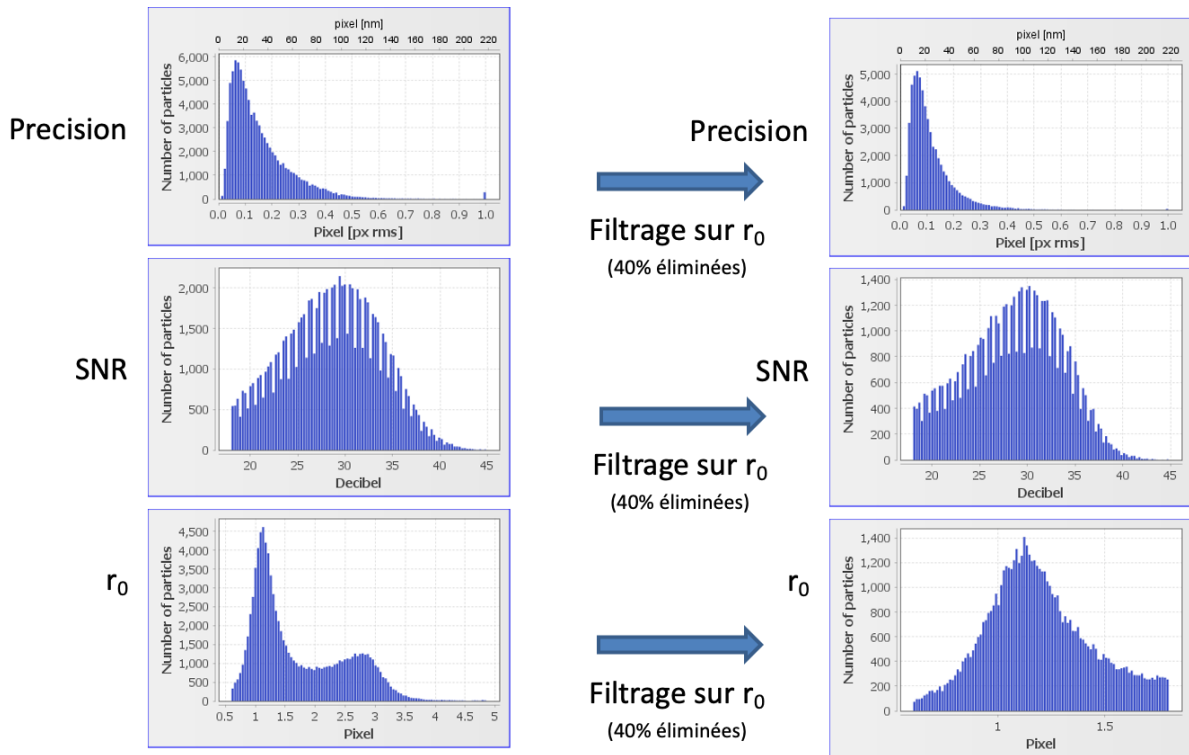


Figure 7: Analyse des données sur FluoRef par UNLOC en mode HD associé à du filtrage sur r_0 . Les profils montrent les statistiques obtenues pour la précision, le SNR et le r_0 , avant filtrage (à gauche) et après filtration (à droite) sur les valeurs basses de la PSF.

L'étape de filtration sur la taille de la PSF (1,8 pixel max, soit 277nm), qui élimine 40% des événements, change les données sur la précision de localisation qui s'affine après filtration (Figure 7, haut). La répartition du SNR montre une légère augmentation pour les données filtrées (Figure 7, milieu à droite).

La reconstruction obtenue après filtrage est plus fidèle avec l'étape de filtrage car la couronne périphérique devient visible (Figure 8 droite). Le diamètre du cercle apparent est de 0,9 μm (Figure 9), donc très proche de la taille théorique.

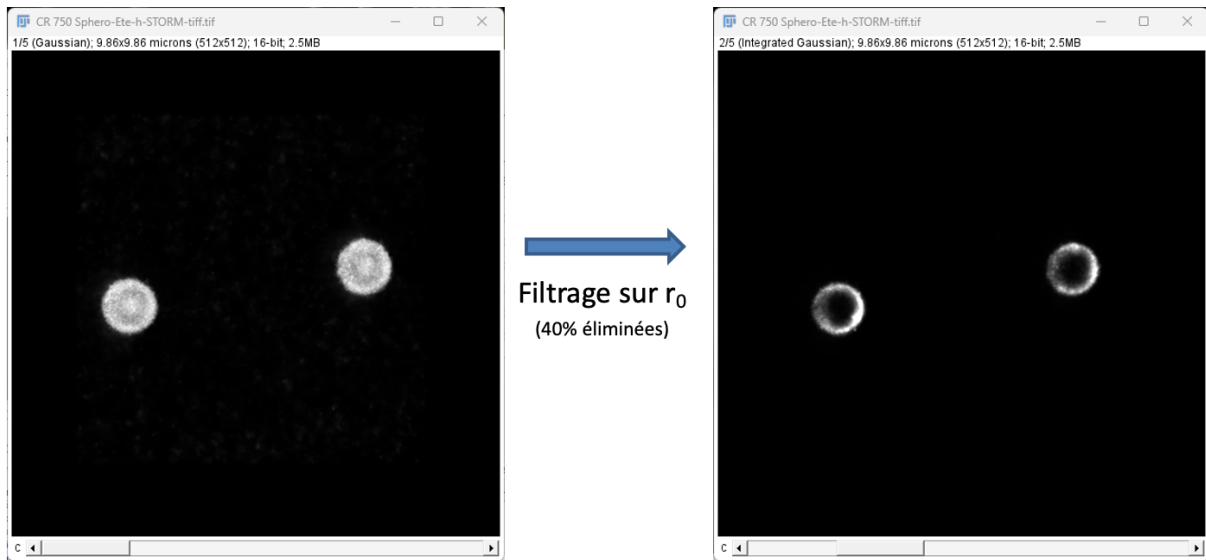


Figure 8: Images dSTORM reconstruites des FluoRefs à partir d'une analyse UNLOC en mode HD, avant filtrage (à gauche) et après filtrage sur la taille de la PSF (à droite).

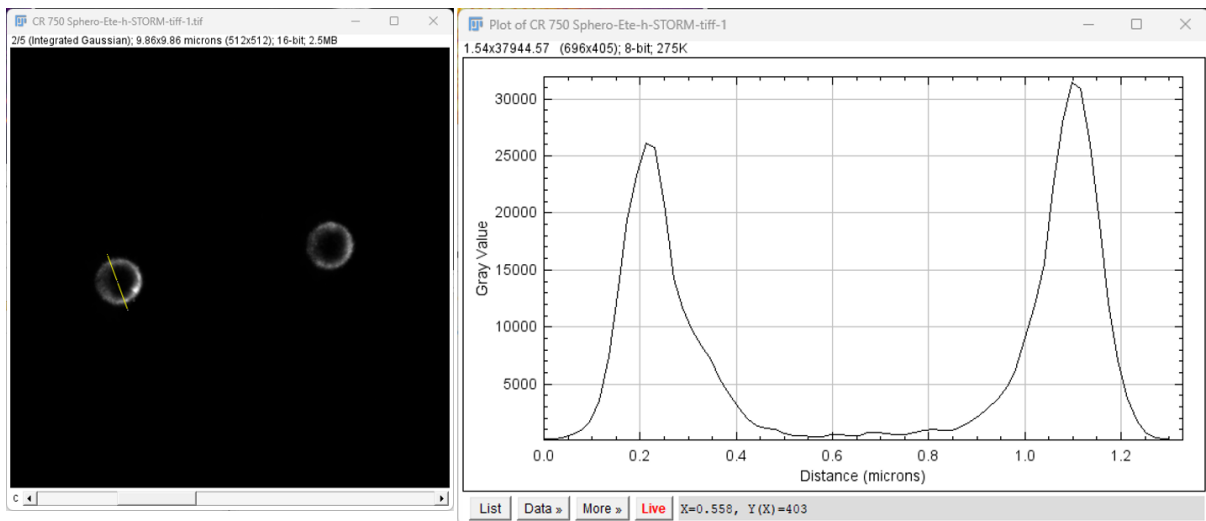


Figure 9: Profil d'intensité (à droite) de l'image dSTORM reconstruite des FluoRefs (à gauche) à partir d'une analyse UNLOC en mode HD, filtrée sur le pic des plus petites tailles de PSF. Le diamètre apparent est d'environ 0,9 μm .

Le même jeu de données a été analysé avec le logiciel propriétaire Zen (de Zeiss) en utilisant différents algorithmes dits « single emitter / low density » ou « multi-emitter / high density » avec ou sans filtration sur la taille de la PSF (Fig.10). Les algorithmes qui donnent la reconstruction la plus fidèle sont le single emitter (Discard overlap) avec l'étape de filtration de la PSF (250 nm max) et le multi-emitter (Account for overlap) sans filtration.

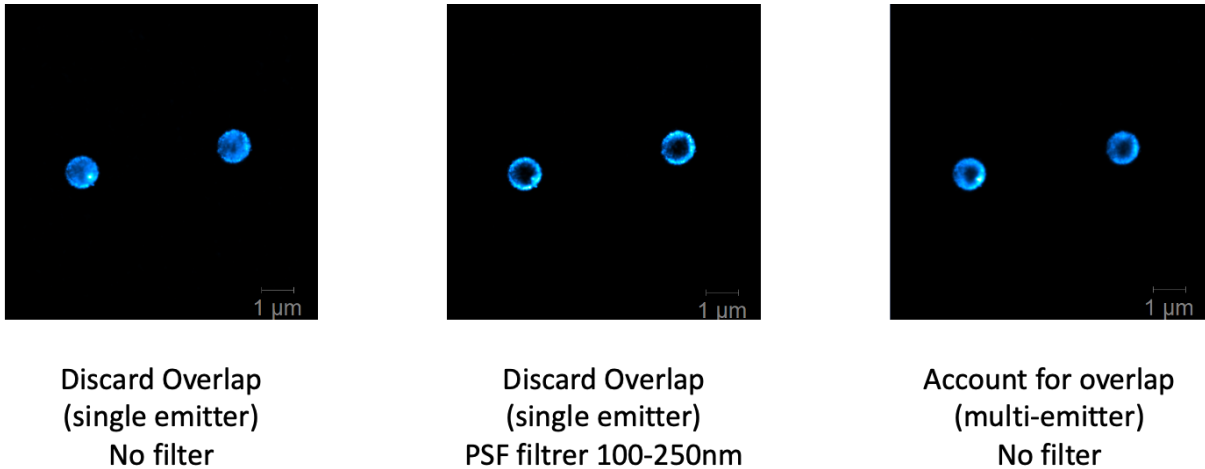


Figure10 : Reconstruction avec le logiciel ZEN en utilisant 3 algorithmes différents. Les algorithmes qui donnent la reconstruction la plus fidèle des Fluoref de 1 µm sont le single emitter, Discard overlap avec l'étape de filtration de la PSF et le multi-emitter, Account for overlap sans filtration.

C - Conclusions

Les analyses avec UNLOC montrent:

- Qu'il faut toujours essayer de se placer dans un régime de molécules individuelles dans toutes les expériences de SMLM
- Qu'il faut absolument utiliser un algorithme d'analyse à haute densité sur des structures aussi compactes ainsi qu'un filtrage de la PSF pour éviter les fausses localisations
- Que le rapport signal sur bruit mériterait d'être amélioré en modulant le temps d'exposition, la puissance laser, et/ou la composition du tampon des scintillement
- Que la densité est forte intrinsèquement (les sphères sont petites) ce qui rajoute de la complexité à l'analyse
- La résultante est que la précision de localisation pourrait être améliorée si le SNR était augmenté et la densité baissée.



III - Comparaison de marqueurs fiduciaires

Les acquisitions en SMLM sont généralement assez longues (plusieurs minutes, dizaines de minutes) afin de permettre de collecter une densité de détections suffisante pour reconstruire la structure d'intérêt. Au cours de cette acquisition un phénomène de drift mécanique a donc souvent lieu. S'il n'est pas corrigé la résolution finale de l'image en sera dégradée. Un des moyens le plus utilisé afin de corriger ce drift est l'utilisation de marqueurs fiduciaires (billes) qui sont fixés dans l'échantillon et qui seront détectés tout au long de l'acquisition. En étudiant ensuite le déplacement de ces marqueurs, on peut corriger l'ensemble des détections et améliorer la résolution de l'image finale. Il existe plusieurs types de marqueurs comme des billes de polystyrène recouvertes de fluorophores organiques, ou des nanomatériaux qui ont des propriétés de fluorescence différentes. Pour être efficace, les marqueurs fiduciaires doivent:

- être résistant au photoblanchiment pour être détectable sur l'ensemble de l'acquisition
- ne pas clignoter, pour être détectable sur chaque image de l'acquisition
- brillants mais pas trop pour ne pas écraser la dynamique des événements de molécules individuelles
- détectables dans plusieurs canaux pour être utilisés lors d'expériences de multi-couleur

Nous avons choisi ici de comparer 4 marqueurs fiduciaires différents afin d'évaluer leur utilisation dans deux types d'expériences différents, le dSTORM et le PALM (Fig11): des billes tetraspecks de 100 nm, des nanodiamants de 140 nm, des nanorods de 25nm et des nanogolds de 90 nm.

Nous avons observé et mesuré l'intensité des signaux obtenus, la stabilité des signaux au cours du temps et la possibilité de les utiliser pour la correction du drift (blinking, précision de localisation Vs. niveau de drift)

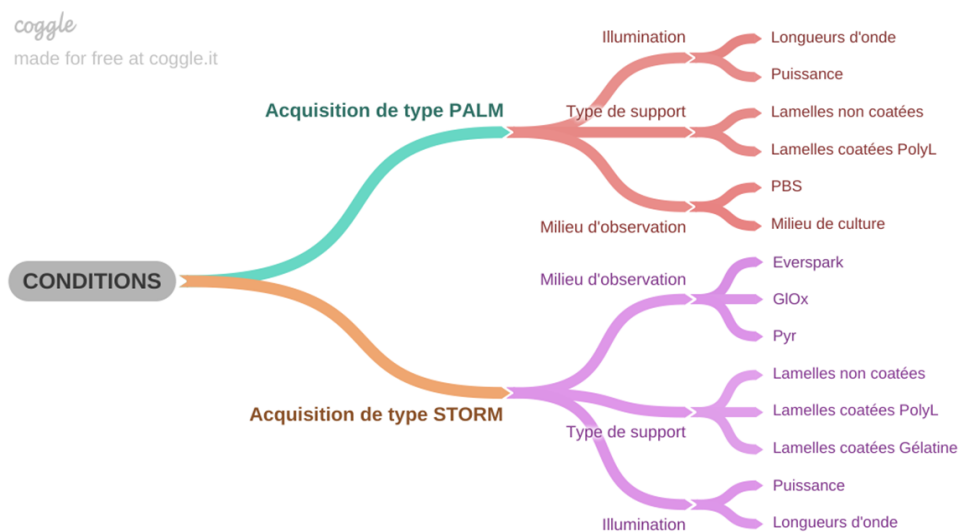
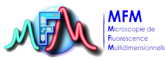


Fig 11: Arbre représentant les différentes conditions observées avec les marqueurs fiduciaires



Il est apparu dans nos conditions que:

- En termes d'intensité, les billes tetraspeck et les nanodiamants semblent plus adaptés que les nanogolds et nanorods, que ce soit en PALM ou en STORM.
- Les tetraspecks photo-blanchissent au cours du temps et risquent donc de disparaître avant la fin de l'acquisition ce qui peut être problématique pour les expériences longues à forte intensité d'illumination (dSTORM)
- L'intensité des nanodiamants, particulièrement en illumination à 532 ou 561 nm peut être très forte par rapport à la dynamique globale du signal des événements à détecter. Cela sera encore plus problématique en PALM par exemple.
- Sur lamelles non coatées, l'adsorption des nanodiamants, nanogolds et nanorods semble plus faible.
- Les nanogolds et les nanorods présentent des intensité de signal assez faible, et une adsorption peu efficace dans nos conditions. Il serait intéressant d'essayer d'optimiser cela afin de mieux utiliser ces outils par exemple en testant:
 - Un coating des lamelles à la Polylysine ou autre protéine selon le modèle cellulaire utilisé
 - En augmentant fortement la concentration de particules et le temps d'adsorption
 - En faisant une pré-adsorption des particules sur les lamelles avant la culture cellulaire

IV - Conclusion générale

Pour un utilisateur débutant, suite à ces expériences nous conseillons:

- D'utiliser l'Alexa 647 en première intention, que ce soit en milieu enzymatique ou en milieu d'observation commercial
- Pour un second canal selon la source d'illumination de privilégier l' Alexa 532 ou le CF568
- Pour la détection et la localisation de prêter une attention toute particulière à la densité de molécules par plan afin de choisir un algorithme adapté. Si l'algorithme utilisé est un algorithme propriétaire se renseigner sur la méthode de détection utilisée afin de savoir si elle est adaptée à l'échantillon.
- Pour les marqueurs fiduciaires, les billes tetraspecks sont pratiques pour les expériences multi-couleur et les expériences de type PALM ou PAINT où l'intensité d'illumination est plus faible et donc le photo-blanchiment moins important. Les nanodiamants seront plus adaptés pour les expériences de dSTORM car ils ne seront pas sensibles à la forte illumination, ils seront aussi détectables dans plusieurs canaux, permettant le recalage lors d'expériences en multi-couleur.



Références bibliographiques

- 1- Beghin, A., Kechkar, A., Butler, C., Levet, F., Cabillic, M., Rossier, O., Giannone, G., Galland, R., Choquet, D., & Sibarita, J. B. (2017). Localization-based super-resolution imaging meets high-content screening_Supp data. *Nature Methods*, 14(12), 1184–1190. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4486>
- 2- Levet, F., Hosity, E., Kechkar, A., Butler, C., Beghin, A., Choquet, D., & Sibarita, J. B. (2015). SR-Tesseler: A method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nature Methods*, 12(11), 1065–1071. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3579>
- 3- Helmerich, D. A., Beliu, G., Taban, D., Meub, M., Streit, M., Kuhlemann, A., Doose, S., & Sauer, M. (2022). Photoswitching fingerprint analysis bypasses the 10-nm resolution barrier. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01548-6>
- 4- Provost, A., Rousset, C., Bourdon, L., Mezhoud, S., Reungoat, E., Fourneaux, C., Bresson, T., Pauly, M., Béard, N., Possi-Tchouanlong, L., Grigorov, B., Bouvet, P., Diaz, J. J., Chamot, C., Pécheur, E. I., Ladavière, C., Charreyre, M. T., Favier, A., Place, C., & Monier, K. (2019). Innovative particle standards and long-lived imaging for 2D and 3D dSTORM. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53528-0>
- 5- Mailfert, S., Touvier, J., Benyoussef, L., Fabre, R., Rabaoui, A., Blache, M. C., Hamon, Y., Brustlein, S., Monneret, S., Marguet, D., & Bertaux, N. (2018). A Theoretical High-Density Nanoscopy Study Leads to the Design of UNLOC, a Parameter-free Algorithm. *Biophysical Journal*, 115(3), 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.06.024>

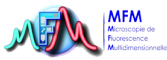
Références matériels

1- Anticorps secondaires couplés au Janelia Fluor de Biotechne:

- Goat anti-Mouse IgG F(ab)₂ Secondary Antibody [Janelia Fluor 549] (Preadsorbed)
Ref NB7588JF549
- Goat anti-Mouse IgG F(ab)₂ Secondary Antibody [Janelia Fluor 646] (Preadsorbed)
Ref NB7588JF646
- Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody [Janelia Fluor 646] (Preadsorbed)
Ref NBP1-75286JF646
- Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody [Janelia Fluor 549] (Preadsorbed)
Ref NBP1-75286JF549

2- Marqueurs fiduciaires:

- Billes tetraspecks 100 nm : ThermoFischer T7279
- Nanodiamants 140 nm : Adamas nano NDNV 140nm Md10ml
- Nanorods 25nm: NanoPartz A12-25-650-CTAB-DIH-1-25
- Nanogolds 90 nm: Euromedex CD-CG-90-20



3- Le milieu d'imagerie STORM Eternity: <https://www.idylle-labs.com/everspark-by-eternity>

4- Les billes de calibration FluoRef: <https://www.idylle-labs.com/spheroruler-by-fluoref>