

MULTIPHOTON MICROSCOPY WITH A WIDEBAND SPECTRAL EXCITATION

Thomas Hortholary^{1,2}, Claire Carrion^{3,4}, Claire Lefort^{1*}

¹ CNRS, UMR 7252, Institut de Recherche XLIM, Université de Limoges, France

² Ecole Nationale Supérieure de Cachan, France

³ CNRS UMR 7276, CRIBL, Université de Limoges, France

⁴ BISCEm, pôle imagerie, Université de Limoges, France

Abstract: The interest of multiphoton microscopy (MPM) is now well established in life sciences, especially thanks to its multispectral aspect. However, this property is limited by commercial laser systems currently involved in MPM, presenting a short spectral bandwidth. At best, four constituents can be imaged simultaneously. Here, we present an original spectral filtering system coupled with a large bandwidth laser system. The adaptation of this system to MPM in life sciences is demonstrated of target samples from plant or animal origin.

Mots-clés: Optical instrumentation, life sciences, multiphoton microscopy, wideband spectrum

1. INTRODUCTION : INTERET DE LA MICROSCOPIE MULTIPHOTONIQUE A SPECTRE LARGE DANS LES SCIENCES DE LA VIE

L'invention du microscope au XVII^e siècle a joué un rôle clé dans de nombreux domaines des sciences de la vie depuis les études concernant la biologie végétale jusqu'aux découvertes médicales, en passant par les recherches en biologie fondamentale. À partir de la moitié du XX^e siècle, l'utilisation de la microscopie de fluorescence plein champ associée à des marqueurs spécifiques des compartiments cellulaires ou de composants moléculaires a permis une meilleure compréhension de la composition et du fonctionnement de la cellule [1-3]. De nombreux mécanismes de biologie cellulaire ont alors été découverts.

L'utilisation du microscope confocal depuis les années 90 a permis d'avancer encore plus loin en imagerie du vivant grâce à l'amélioration de la résolution et à la possibilité de réaliser des observations en trois dimensions. De plus, si la microscopie de fluorescence a essentiellement utilisé des fluorophore exogènes, plusieurs domaines des sciences de la vie explorent la fluorescence endogène des cellules et des tissus dans le but d'essayer de trouver une signature spécifique correspondant à un état cellulaire particulier (division cellulaire, prolifération, remaniement tissulaire, etc). Cet outil est ainsi devenu la référence en imagerie optique pour les sciences de la vie. Il présente cependant des limites non négligeables. D'une part, la profondeur d'imagerie est limitée à une centaine de micromètres au mieux. D'autre part, le processus d'excitation linéaire de fluorescence est associé à une proximité spectrale entre le signal provenant de la cible et celui provenant de la source d'excitation. Les images ainsi obtenues peuvent présenter un niveau de bruit anormal si le filtrage de l'excitation n'est pas correctement réalisé ou bien si le choix de la longueur d'onde d'excitation n'est pas parfaitement adapté à la cible. Enfin, les images obtenues peuvent ainsi être confuse, voire faussée si la problématique n'a pas été préalablement identifiée.

La problématique liée à la confusion spectrale entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission en microscopie confocale est donc majeure. C'est dans ce contexte que la microscopie multiphotonique (MMP), par sa spécificité spectrale, a apporté de nouvelles opportunités en imagerie microscopique pour les sciences de la

* Corresponding author, claire.lefort@xlim.fr

vie [3-7]. En effet, la MMP a rendu possible l'imagerie de l'intérieur d'un organe explanté, voire même *in vivo*, grâce à une profondeur de pénétration de plusieurs centaines de micromètres et une gamme de longueur d'onde dans le proche infrarouge (IR) faiblement absorbé. Mais les sources d'excitation actuellement implémentées sur les MMP sont des sources très chères (environ 150k€), basées sur un cristal de saphir dopé au titane (Ti : Sa) et limitées en largeur spectrale à environ 10 nm à mi-hauteur. Cela réduit le nombre de cibles biologiques pouvant être imagées simultanément à deux, voire quatre dans des conditions optimales. Depuis une quinzaine d'années, une solution basée sur l'élargissement spectrale de la source Ti : Sa dans une fibre micro structurée a été proposée [8]. Ce résultat a ensuite été démontré plusieurs fois, confirmant l'intérêt de l'excitation à spectre large pour la MMP [9-11]. Mais ce système est encore plus complexe, cher et inadapté à une utilisation en routine. Une solution plus proche d'un système clé en main doit donc être développée pour la MMP.

En 2016 au laboratoire XLIM, nous avons initié l'utilisation d'une source commerciale nanoseconde à spectre large, couplée avec de simples filtres optiques. L'utilisation de cette source, avec des paramètres temporels de l'ordre de la nanoseconde avec un taux de répétition de 250 kHz, est inédite en MMP. Avec des durées d'impulsion aussi longues, nous avons pourtant mis en évidence l'obtention d'images de microscopie multiphotonique sur des cibles biologiques de qualité très similaire à celles obtenues avec le laser standard Ti : Sa. L'explication d'un tel résultat peut être trouvée dans la référence [7] où il est montré que la génération des processus multiphotoniques dépend de plusieurs paramètres physiques du laser d'excitation. Par exemple, la durée d'impulsion et le taux de répétition sont aussi importants l'un que l'autre pour la génération de photons de fluorescence par un processus à deux photons. Cependant, il est apparu que le contraste obtenu avec une telle source restait moins bon avec notre solution originale [12, 13] à cause notamment d'aberrations chromatiques liées au spectre beaucoup plus large qu'avec la source Ti : Sa. Ainsi, nous avons choisi de mettre en place deux stratégies distinctes pour optimiser ces images. D'une part, nous développons une stratégie d'optimisation computationnelle basée sur des algorithmes reposant sur les méthodes les plus robustes de résolution de problèmes inverses, couplée à des outils de majoration-minimisation de problèmes mathématiques [14]. Cette stratégie fait l'objet d'une autre présentation à part entière. D'autre part, nous avons choisi une stratégie d'optimisation optique du spectre d'excitation. C'est l'objet de la présentation actuelle. Ainsi, nous allons tout d'abord présenter le montage instrumental. Son originalité est basée sur un filtrage spectral réalisé par une ligne à prismes permettant ainsi de ne sélectionner que la partie utile du spectre pour l'excitation par un processus à deux photons. Ensuite, l'intérêt de cette méthode de filtrage et son adaptation pour la MMP seront illustrés par des images de cibles provenant des sciences de la vie : le pin de Douglas et le rein de souris.

2. MONTAGE EXPERIMENTAL ET CARACTERISTIQUES SPECTRALES

2.1. La ligne à prismes et le microscope multiphotonique

Le montage expérimental est basé sur une configuration standard de statif droit d'un microscope (Thorlabs Inc., Bergamo® II Series). Le système de scan, constitué de deux miroirs galvanométriques et le couple de photomultiplicateurs (PMT) sont connectés à un ordinateur pour afficher les images. La figure 1 schématise cet assemblage optique. L'originalité de cet instrument optique réside dans sa source laser à large spectre (SLLS). Elle est constituée d'une source initiale à spectre large dont l'assemblage est constitué d'un laser à blocage de mode monochromatique à 1064 nm, 40 MHz, 5 ps, injecté dans une fibre microstructurée à l'intérieur de laquelle le spectre s'élargit par des processus d'optique non linéaire entre 410 nm et 2,4 μ m. Dans le système de filtrage, la première étape consiste à collimater la source à l'aide d'un miroir parabolique métallique. Ensuite, le module de filtrage spectral constitué d'une ligne à prismes est positionné. Les deux prismes sont constitués d'un verre flint dispersif de SF57 de SCHOTT Advanced Optics. L'angle au sommet est de 30°. Le premier prisme a une hauteur de 25 mm et le second, de 100 mm. Les deux prismes ont une épaisseur de 29 mm et sont traités anti-reflet sur les deux faces à 900 nm, délivrant ainsi une efficacité anti-reflet entre 600 et 1800 nm.

Le rôle du premier prisme est de séparer spatialement les longueurs d'onde ; le second les collimate. Le faisceau collimaté est ensuite réfléchi sur un miroir dont la planéité régit la qualité de superposition des longueurs d'onde sélectionnées sur le chemin de retour, et conditionne ainsi la qualité des images obtenues. Devant ce miroir, on positionne des caches qui vont couper une partie du spectre afin de ne conserver que la zone utile pour imager des cibles biologiques issues des sciences de la vie. La verticalité des caches, leur parallélisme avec le miroir et la finesse de leurs bords impactent la résolution de ce système de filtrage. La résolution se définit ici comme la capacité de ce système de filtrage à sélectionner plus ou moins finement une ou plusieurs zones du spectre initial. Naturellement, plus l'étalement du faisceau sur le miroir de repli est grand, plus la résolution sera optimale. En

fonction du système de repli choisi, ici un simple miroir, la distance entre les prismes ainsi que l'angle d'incidence du faisceau sur le premier prisme pourront être utilisés pour ajuster la résolution. La méthode de la lame de couteau est utilisée pour évaluer cette résolution qui est alors estimée à 16 nm. Le motif élémentaire à la sortie de ce système de filtrage fera donc au minimum 16 nm, ce qui est du même ordre de grandeur que la largeur du spectre délivré par la source standard Ti : Sa en MMP.

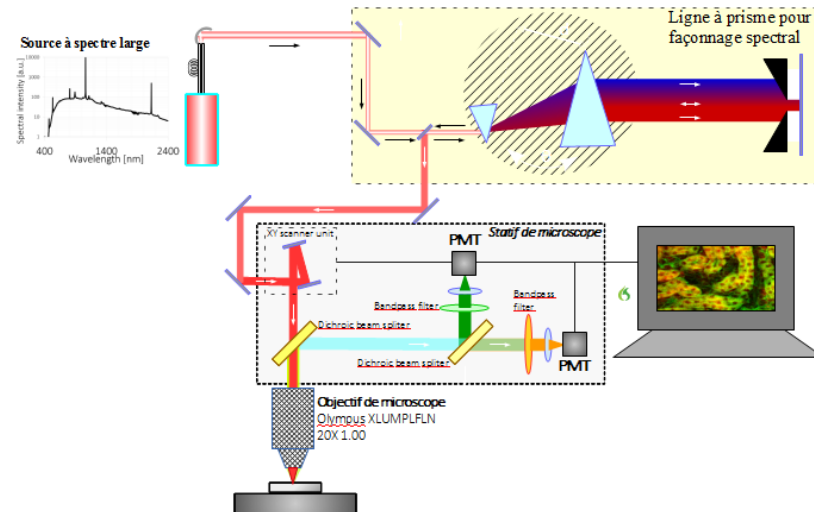


Fig. 1. Montage expérimental du MMP et une SLLS filtrée spectralement par une ligne à prismes.

2.2. Caractérisation spectrale du faisceau issu du système de filtrage

L'objectif de cette partie est de caractériser spectralement le faisceau généré à la sortie du système de filtrage. Pour cela, nous utilisons un spectromètre (Ocean Optics, USB 2000+) positionné directement à la sortie de la ligne prismes. La figure 2a représente l'allure des spectres obtenus pour un spectre ayant une largeur minimum de 60 nm jusqu'à un étalement spectral de 150 nm centré à 900 nm.

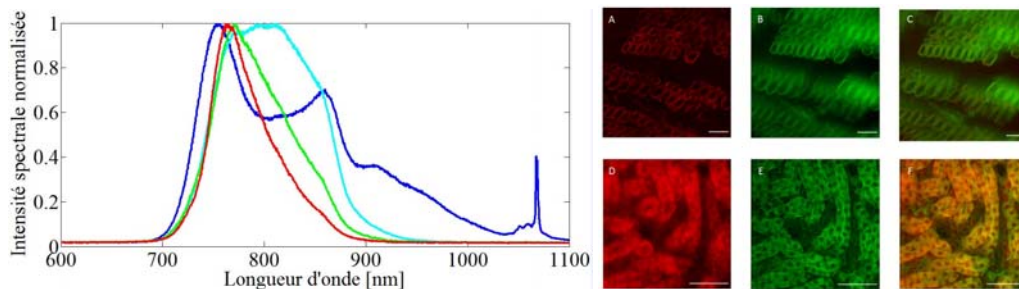


Fig. 2. Gauche : Spectres mesurés à la sortie du système de filtrage constitué de la ligne à prismes et de la SLLS. Droite : images multiphotoniques de cibles biologiques ; haut : pin de Douglas autofluorescent. Détection de la fluorescence de dérivés de la lignine entre 420 et 500 nm (rouge) et entre 604 et 678 nm ; bas : rein de souris avec les glomérules et les tubulines marquées à l'Alexa Fluor 568 (rouge) et les filaments d'actine marqués à l'Alexa Fluor 488 (vert). Echelle : 50 μ m.

3. IMAGERIE DE CIBLES BIOLOGIQUES A PARTIR DU SYSTEME ORIGINAL D'EXCITATION PAR MMP

Il s'agit maintenant de démontrer la capacité de ce système original de filtrage spectral d'un SLLS à générer des images de cibles biologiques par un processus de fluorescence à deux photons. Pour cela, nous utilisons un échantillon de pin de Douglas, ainsi qu'un échantillon de rein de souris. Le spectre, centré à 900 nm a une largeur à mi-hauteur de 150 nm. Le pin de Douglas (Figure 2 droite, haut) est autofluorescent, il n'a donc pas besoin d'être marqué. Les substances responsables de cette autofluorescence sont de la cellulose et de la lignine. L'image du rein de souris (Figure 2 droite, bas) met en évidence les glomérules et les tubulines. Dans les illustrations présentées à la Figure 2 (droite), la capacité de la SLLS couplée avec son système de filtrage spectral basé sur une ligne à prismes est ainsi démontrée. Les images obtenues présentent un niveau de contraste

et de résolution tout à fait corrects. Imager ces échantillons biologiques ne nécessite donc aucun ajustement des longueurs d'onde d'excitation et donc aucune manipulation laser. Ce point constitue une avancée majeure pour rendre la MMP accessible au plus grand nombre de scientifiques ayant besoin de caractériser des échantillons venant des sciences de la vie, quel que soit le domaine et quel que soit le niveau de qualification de l'utilisateur.

4. CONCLUSIONS

Actuellement, les nouveautés technologiques dans l'imagerie des sciences de la vie à l'échelle microscopique n'ont pas encore répondu à tous les besoins. En particulier, l'imagerie instantanée n'est aujourd'hui possible qu'avec un nombre de canaux limité à quatre dans le meilleur des cas. Cela est lié à un spectre d'excitation de quelques nanomètres de largeur. Dans ce contexte, les sources laser à large spectre ont un rôle à jouer encore peu connu en microscopie multiphotonique. En effet, les sources commerciales à spectre large ont des durées d'impulsions qui semblent, en première approche, incompatibles avec la génération des processus multiphotoniques. Cependant, dans une publication précédente, nous avons démontré qu'ils étaient en réalité compatibles à condition d'être couplé à un taux de répétition adapté de quelques centaines de kilohertz. Dans le présent article, nous avons utilisé ces résultats initiaux afin d'aller plus loin dans la démarche scientifique en fabriquant un instrument permettant de sélectionner une large bande spectrale d'intérêt pour de nombreux échantillons. Injecté dans un système classique de microscope multiphotonique, le spectre large généré par ce système et basé sur des durées d'impulsions initiales relativement longues (quelques picosecondes), permet d'obtenir des images microscopie multiphotoniques de très bonne qualité. Ces travaux ouvrent donc pour la première fois une capacité d'imagerie instantanée d'une quantité de substances biologiques en théorie infinie, encore non réalisé en microscopie multiphotonique et nécessitant d'être couplée à une détection spectrale.

RÉFÉRENCES

- [1] Vo-Dinh T, Biomedical Photonics Handbook, Boca Raton, FL: CRC Press, 2003.
- [2] Pawel J, Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd edn (Berlin: Springer) pp 1–985, 2006.
- [3] Masters B R, So P T C, Confocal microscopy and multi-photon excitation of human skin in vivo, Optics Express, 8, 2–10, 2001.
- [4] Denk W, Strickler J H, Webb W W, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, Science, 248, 73–6, 1990
- [5] Masters B R, So P T, Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy, Oxford University Press, 896 pages. ISBN 978-0-1951-6260-9, 2008.
- [6] Lefort C, A review of biomedical multiphoton microscopy and its laser sources, Journal of Physics D: Applied Physics, 50, 423001, 2017.
- [7] Lefort C, Laser sources in multiphoton microscopy: overview and optimization, Unconventional Optical Imaging, 10677, 2018.
- [8] Palero J A, Boer V O, Vijverberg J C and Gerritsen H C, Short-wavelength two-photon excitation fluorescence microscopy of tryptophan with a photonic crystal fiber based light source, Optics Express, 13, 5363–8, 2005.
- [9] Isobe K, Watanabe W, Matsunaga S, Higashi T, Fukui K, Itoh K, Multi-spectral two-photon excited fluorescence microscopy using supercontinuum light source, Japan. J. Appl. Phys., 44, 167–9, 2005.
- [10] Mc Connell G, Sequential confocal and multiphoton laser scanning microscopy using a single photonic crystal fibre based light source, Appl. Phys. B, 81, 783–6, 2005.
- [11] Liu Y, Tu H, Benalcazar W A, Chaney E J, Boppart S A, Multimodal nonlinear microscopy by shaping a fiber supercontinuum from 900 to 1160 nm, IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron., 18, 1209–14, 2012.
- [12] Lefort C, O'Connor R P, Blanquet V, Magnol L, Kano H, Tombelaine V, Lévêque P, Couderc V, Leproux P, Multicolor multiphoton microscopy based on a nanosecond supercontinuum laser source J. Biophotonics, 9, 709–14, 2016.
- [13] Lefort C, O'Connor R P, Bardet S, Blanquet V, Magnol L, Kano H, Tombelaine V, Lévêque P, Couderc V, Leproux P, Imagerie multiphotonique des tissus musculaires par source ultralarge spectre, JNOG, 2017.
- [14] Chouzenoux E, Lau T K, Lefort C, Pesquet JC, Optimal multivariate Gaussian Fitting for PSF modeling in two-photon microscopy, Proceeding of the IEEE ISBI, 2018.