

## LASER SOURCES IN MULTIPHOTON MICROSCOPY

Claire Lefort<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS, UMR 7252, Institut de Recherche XLIM, Université de Limoges, France

**Abstract:** During the sixties, the discovery of laser systems has revolutionized several scientific fields. Today, new laser technologies have appeared. Multiphoton microscopy (MPM) for biological imaging have been identified as a main application of these sources. However, these sources do not answer to all the needs in MPM. Here, a stat of the art in laser sources especially developed for MPM is proposed. This demonstrates that the ideal laser source does not yet exist.

**Mots-clés:** Multiphoton microscopy, laser sources, new technologies, state of the art.

### 1. CONTEXTE DE LA MICROSCOPIE MULTIPHOTONIQUE

Dans l'univers infini des découvertes biomédicales, le développement de microscopes hautement performants est crucial. Le besoin en caractérisations microscopiques de spécimens biologiques est devenu de plus en plus précis, profond, divers et rapide. Parmi toutes les méthodes de caractérisation, la microscopie optique est celle qui est compatible avec les échantillons vivants ou avec les études *in vivo* sans avoir recours à la destruction de la cible (prélèvement, marquage) ou à son endommagement. Plusieurs sortes d'interactions lumière-tissus peuvent se produire et constituent un champ immense de connaissances scientifiques et de recherche. La lumière sonde le milieu d'une façon minimalement invasive avec la mise en jeu de photons incidents sur l'échantillon biologique qui peuvent être absorbés, diffusés ou transmis [1]. Différentes informations concernant la physiologie des tissus ou des pathologies peuvent être déduites en fonction des caractéristiques de l'image obtenue. Dans ce contexte, la microscopie multiphotonique (MMP) a été le sujet d'efforts considérables depuis à peu près 25 ans. Elle est devenue petit à petit un outil essentiel capable par exemple de générer des biopsies optiques, compensant ainsi certaines limites des méthodes de microscopie optique plus conventionnelles qui se sont révélées avec le temps. Par exemple, dans la microscopie confocale, une limitation due au spectre d'excitation a été largement identifiée. En effet, une ou plusieurs sources monochromatiques sont nécessaires. Cette méthode est basée sur la génération de fluorescence linéaire dont l'émission se fait à des longueurs d'onde souvent très proches voir largement superposées avec celles d'absorption. Il y a donc un fort risque de confusion spectrale entre les photons d'émission et ceux d'excitation. De plus cette excitation se fait dans les gammes de longueur d'onde UV-visible qui sont fortement énergétiques, très absorbées par les tissus biologiques rendant ce rayonnement dangereux pour l'intégrité de l'échantillon et l'imagerie tridimensionnelle particulièrement délicate. C'est ainsi que la MMP est apparue comme une méthode de microscopie alternative élégante avec des avantages techniques inégalés : une plus grande pénétration du faisceau optique dans les tissus due aux longueurs d'onde dans le proche infrarouge (IR), une capacité d'imaginer les cibles en trois dimensions, un plus faible bruit et un plus faible photoendommagement en dehors du point focal et enfin un montage optique un peu plus simple qui n'a pas besoin d'avoir recours à une iris pour sélectionner le signal provenant du plan focal [2]. En 1999, deux équipes avaient déjà identifié l'intérêt grandissant de la MMP et perçu que le coût exorbitant et la complexité des sources laser requises pouvaient représenter un obstacle majeur au développement de cette méthode [3, 4]. 20 ans après ce constat, force est de constater qu'il n'y a pas eu d'évolution notable à propos du coût et de la complexité des sources mises en jeu en MMP. La source laser dans un système de MMP commercial, dont la complexité peut être discutée, représente toujours le premier poste de dépense. Depuis 1995, plusieurs articles ont proposé de passer en revue les sources laser actuellement démontrées pour la MMP, les plus récentes ayant été proposées par le laboratoire XLIM [5, 6].

---

\* Corresponding author, [claire.lefort@xlim.fr](mailto:claire.lefort@xlim.fr)

Pour bien comprendre le besoin en sources laser pour la MMP, il est tout d'abord indispensable de comprendre les paramètres théoriques et techniques requis en MMP. C'est l'objet de la partie suivante du présent exposé. Ensuite, un extrait illustrant la très grande quantité des sources laser fabriquées spécialement pour la MMP est proposé. Enfin, le portrait-robot de la source laser idéale pour cette application conclut cette présentation.

## 2. PROCESSUS MULTIPHOTONIQUES IMPLIQUES EN MMP

Les processus multiphotoniques impliqués dans la MMP dédiée à l'imagerie d'échantillons biologiques sont basés sur des interactions lumière-matière non linéaires d'ordre supérieur à 1. Dans ce cas, plusieurs photons doivent interagir simultanément pour générer le contraste de l'image. La MMP est caractérisée par une émission optique qui présente une dépendance au minimum quadratique (processus non linéaire d'ordre 2) avec la puissance d'excitation. C'est pourquoi la MMP est communément appelée « microscopie non linéaire ». Les phénomènes mis en jeu sont principalement la fluorescence à deux photons (F2P) et la génération de seconde harmonique (G2H). On recense de façon plus marginale la génération de 3<sup>ème</sup> harmonique (G3H), la fluorescence à trois photons (F3P) ou la diffusion Raman stimulée (CARS, SRS...). Dans tous les cas, il s'agit d'une interaction entre le milieu sondé et le champ électrique  $E$  provenant d'un faisceau laser. Cette interaction lumière-matière provoque une polarisation macroscopique  $P$  de la matière qui est décrite par l'équation (1) :

$$P = P_0 + \epsilon_0(\chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots) \quad (1)$$

Où  $P_0$  représente la polarisation permanente macroscopique milieu,  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide, et  $\chi^{(i)}$  est un tenseur d'ordre  $i$  décrivant la susceptibilité du milieu.  $\chi^{(1)}$  désigne l'indice de réfraction du milieu et contribue au processus de fluorescence.  $\chi^{(2)}$  et  $\chi^{(3)}$  sont les tenseurs non linéaires respectivement d'ordre deux et trois responsables de plusieurs effets non linéaire. La fluorescence à deux photons résulte de la susceptibilité d'ordre trois  $\chi^{(3)}$  du fluorophore sondé. La génération de seconde harmonique se produit quand le milieu a une susceptibilité ordre 2 non nulle ( $\chi^{(2)} \neq 0$ ). Cela se produit exclusivement dans un milieu non centrosymétrique.

## 3. CARACTERISTIQUES TECHNIQUES REQUISES EN MMP BIOMEDICALE

### 3.1. Spectres d'excitation : ordres de grandeur et largeur de bande

En microscopie multiphotonique, le spectre d'excitation adapté dépend de la cible imagée et du processus multiphotonique mis en enjeux. Le diagramme de Jablonski donne une première idée des ordres de grandeur. La figure 1 présente un exemple schématique de diagramme de Jablonski réunissant les processus de fluorescence à 1, 2 et 3 photons (respectivement F1P, F2P, F3P), ainsi que les processus de génération de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> harmoniques (G2H, G3H).

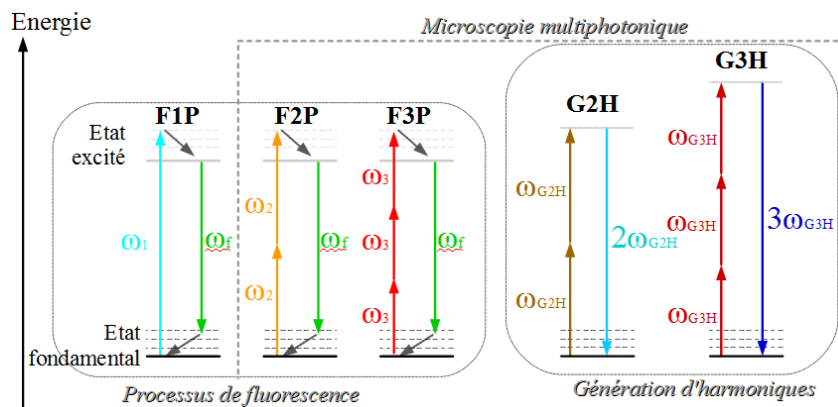


Fig. 1. Diagramme de Jablonski représentant du processus non linéaire mise en jeu en MMP. Les gammes de longueurs d'ondes utilisées en MMP son résumées dans le tableau 1.

Tableau 1. Ordres de grandeur des longueurs d'ondes d'excitation usuelles pour générer les processus multiphotoniques résultant en l'émission de photons dans la gamme du visible.

Processus multiphotonique	Longueur d'onde excitation ( $\mu\text{m}$ )	Longueur d'onde d'émission
SHG	0.8 $\rightarrow$ 1.6	0,4 $\rightarrow$ 0,55
TPF	0.6 $\rightarrow$ 1.2	0,3 $\rightarrow$ 0,8
ThPF	0.7 $\rightarrow$ 1.6	0,3 $\rightarrow$ 0,8
THG	1.2 $\rightarrow$ 2.4	0,4 $\rightarrow$ 0,6

Une bande d'excitations couvrant l'intégralité de la gamme présentée dans le tableau 1, c'est-à-dire entre 0,7  $\mu\text{m}$  et 2,4  $\mu\text{m}$ , permettrait donc d'accéder simultanément à l'intégralité des processus multiphotoniques impliqués en MMP sans avoir besoin de modifier le spectre incident. Cela fait l'objet d'une autre présentation avec la proposition d'une solution instrumentale originale et inédite tendant à répondre à cette problématique.

### 3.2. Contraintes techniques en MMP : confinement spatio-temporel, balayage laser et détection

La MMP nécessite l'interaction simultanée de plusieurs photons. Ce phénomène existe donc en permanence quelle que soit la source de lumière utilisée, cohérente ou non, mais avec des niveaux de probabilité la plupart du temps très proches de zéro. Pour optimiser les chances d'interaction de plusieurs photons, c'est-à-dire avoir une présence au même moment et au même endroit, on utilise deux moyens : un objectif de microscope (confinement spatial) et des impulsions laser ultracourtes à fort taux de répétition (confinement temporel).

Ces deux contraintes sont associées à un champ de vue très restreint dont la taille peut être augmentée par le moyen d'un balayage laser qui peut se faire de plusieurs façons différentes : deux miroirs galvanométriques ou résonnants, un miroir monté sur un système micro-électromécanique (MEMS) ou bien un tube piézo-électrique dans le cas de sources laser fibrées. Réaliser une image en profondeur est quasiment systématiquement géré par la mobilité verticale de l'objectif de microscope. Dans tous les cas, la nécessité d'un système de scan laser engendre des contraintes sur le taux de répétition du laser d'excitation. Un minimum de deux impulsions par pixel semble une limite raisonnable afin d'éviter les « pixels fantômes » où l'absence de signal d'excitation se traduit par l'absence d'émission de fluorescence, détériorant alors la qualité de l'image obtenue. En ce qui concerne la détection, elle peut être réalisée par un tube photomultiplicateur, un système de comptage de photons, une CCD ou bien un spectromètre.

## 4. LES SOURCES LASER DEVELOPPEES DANS LA LITERATURE POUR LA MMP

Aujourd'hui la source laser standard commerciale usuellement implémentée sur les MMP est une source solide à base de cristal de saphir dopé au titane (Ti : Sa). Elle délivre des impulsions femtosecondes avec un taux de répétition de l'ordre de 80 MHz avec une longueur d'onde centrale accordable entre 680 nm et 1100 nm, avec une largeur spectrale de 10 nm à mi-hauteur. Couplée avec un oscillateur paramétrique optique, cette gamme peut être étendue entre 500 nm et 2,5  $\mu\text{m}$ . Cette source fait donc office de référence à laquelle il semble indispensable de se référer lors de la fabrication de nouvelles sources lasers pour la MMP.

Par ailleurs, de nombreuses sources laser alternatives ont été fabriquées dans le monde pour la MMP appliquée pour l'imagerie biomédicale. Elles peuvent différer drastiquement dans leurs paramètres physiques : gamme et largeur spectrales, durée d'impulsion, taux de répétition et puissance moyenne. On note ici que des sources laser continues ont aussi été démontrées en MMP [7-11]. D'autres sources à cristaux ont été démontrées. Elles sont principalement basées sur des ions néodyme qui dopent des structures cristallines de YAG, YFP ou YVO<sub>4</sub> [12] ou des ions ytterbium dopant une fibre microstructurée [13].

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION

On dénombre une centaine de sources laser différentes, basées sur des technologies parfois à la pointe de l'innovation dans ce domaine et qui ont été spécialement développées pour la MMP. Cependant, ces sources sont très souvent monochromatiques. Elles ne permettent donc pas l'imagerie simultanée d'une infinité de fluorophores et ne répondent donc pas totalement à l'enjeu majeur du besoin en technologie laser innovante en MMP, qui réside dans la largeur du spectre disponible. Un début de réponse se trouve malgré tout dans la littérature avec des sources à spectres larges qui ont été initialement générées à partir d'une source standard Ti : Sa dont le spectre est élargi dans une fibre microstructurée [14-16]. Cependant, cette solution n'est pas clé en

main, elle est relativement complexe techniquement et est très loin d'une solution pouvant être implémentée en routine sur un système ouvert tels que ceux qu'on peut trouver sur les plateformes d'imagerie biologique.

Pourtant, la source idéale pour la MMP se trouve probablement bien dans les technologies laser générant un spectre large dans le proche infrarouge. Mais les technologies les plus accessibles en termes de simplicité de technologie et donc de coût sont basées sur des méthodes générant des impulsions relativement longues, au mieux de quelques picosecondes. Ces durées sont donc beaucoup plus longues que celles qui sont utilisées classiquement pour la génération des processus multiphotoniques de l'ordre de 150 fs. Or, il n'est pas encore bien admis par la communauté scientifique travaillant sur la MMP que des impulsions aussi longues soit en mesure de générer des processus multiphotoniques. C'est pourtant ce qui a été démontré à de nombreuses reprises théoriquement et expérimentalement dans la littérature comme l'illustre la liste des références ci-dessous. Les travaux les plus marquants allant dans ce sens-là sont ceux qui concernent l'utilisation de sources laser continues pour générer des processus et des images multiphotoniques.

Ainsi, il semble que la source laser idéale pour générer des processus multiphotoniques impliqués en MMP présente avant tout un spectre très large quelle que soit la durée d'impulsion. Pour optimiser le nombre d'interactions multiphotoniques (présence simultanée et colocalisée de deux photons au minimum) les sources laser pulsées avec des durées d'impulsion les plus courtes possibles et les taux de répétition les plus lents semblent les mieux adaptées, en gardant à l'esprit une limite basse liée au système de scan (deux impulsions pixel au minimum). Afin de compléter au mieux l'optimisation de la génération d'images multiphotonique, une solution de sélection spectrale peut être envisagée et pourrait justifier des développements technologiques et des efforts spécifiques.

## RÉFÉRENCES

- [1] Vo-Dinh T, Biomedical Photonics Handbook, Boca Raton, FL: CRC Press, 2003.
- [2] Diaspro A, Cpnfocal and Two-Photon microscopy, Wiley-Liss, Inc., 2002.
- [3] Piston D W, Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy, *Cell Biol.*, 9 66–69, 1999.
- [4] Masters B R, So P T C, Kim K H, Buehler C, Gratton E, Multiphoton excitation microscopy, confocal microscopy, and spectroscopy of living cells and tissues; functional metabolic imaging of human skin in vivo, *Multiphoton Excitation Microscopy*, New York: Academic, ch 29, 513–36, 1999.
- [5] Lefort C, A review of biomedical multiphoton microscopy and its laser sources, *Journal of Physics D : Applied Physics*, 50, 423001, 2017.
- [6] Lefort C, Laser sources in multiphoton microscopy: overview and optimization, *Unconventional Optical Imaging*, 10677, 2018.
- [7] Florin E L, Horber J K H and Stelzer E H K High resolution axial and lateral position sensing using two photon excitation of fluorophores by a continuous-wave Nd:YAG laser, *Appl. Phys. Lett.* **69** 446–8, 1996.
- [8] Hell S H, Booth M, Wilms S, Schnetter C M, Kirsch A K, Arndt-Jovin D J, Jovin T M, Two-photon near and far-field fluorescence microscopy with continuous wave excitation, *Opt. Lett.* **23** 1238–40, 1998.
- [9] Hou X, Cheng W, Single-molecule detection using continuous wave excitation of two-photon fluorescence, *Opt. Lett.* **36** 3185–7, 2011.
- [10] Uzunbajakava N, Otto C, Combined Raman and continuous-wave-excited two-photon fluorescence cell Imaging, *Opt. Lett.* **28** 2073–5, 2003.
- [11] Zhang Z X, Sonek G J, Wei X B, Sun C, Berns M W, Tromberg B J, Cell viability and DNA denaturation measurements by two-photon fluorescence excitation in CX Al:GaAs diode laser optical traps, *J. Biomed. Opt.* **4** 256–9, 1999.
- [12] Wokosiny L D, Centonze V E, Crittenden S, White J, Three-photon excitation fluorescence imaging of biological specimens using an all-solid-state laser, *Bioimaging* 4 208–14 ; 1996.
- [13] Tang S, Liu J, Krasieva T B, Chen Z, Tromberg B J, Developing compact multiphoton systems using femtosecond fiber lasers *J. Biomed. Opt. Lett.*, 14 030508, 2009.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Liu Y, Tu H, Benalcazar W A, Chaney E J and 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.