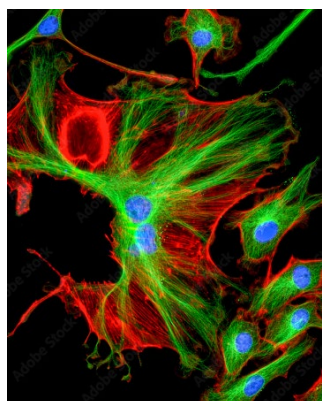


Lasers ultrarapides pour la microscopie multiphotonique

Note d'application



La microscopie multiphotonique est une technique d'imagerie puissante largement utilisée dans la recherche biologique et biomédicale. Les puissances crêtes élevées, nécessaire à ces processus physiques, sont atteintes grâce à l'utilisation de lasers fs à verrouillage de modes. Dans cette note d'application, nous passerons en revue les paramètres importants à prendre en compte lors de la sélection d'un laser ultrarapide pour la microscopie multiphotonique.



Les avantages de VINCI

- Très abordable
- Design simple de l'oscillateur
- Puissance crête très élevée
- Compact et robuste
- Design sans SESAM
- Pré-compensation de la dispersion chromatique

Introduction

Les lasers femtosecondes permettent de nombreuses avancées dans les domaines scientifique, médical et industriel. Actuellement, un large éventail de produits laser ultrarapides est disponible, émettant à différentes longueurs d'onde dans les domaines du proche infrarouge et du visible. Ces dernières années, nous avons assisté à l'émergence de plusieurs alternatives aux lasers ultrarapides vieillissants, complexes, coûteux et souvent peu fiables des acteurs établis. Dans cette note d'application, nous expliquons comment choisir une source laser qui réponde mieux aux besoins et aux exigences des applications de microscopie multiphotonique.

Microscopie multiphotonique

La microscopie multiphotonique est une technique d'imagerie puissante largement utilisée dans la recherche biologique et biomédicale. Contrairement à la microscopie à fluorescence traditionnelle, qui utilise l'excitation par un seul photon, la MPM emploie plusieurs photons pour exciter une molécule fluorescente. Cette approche présente plusieurs avantages, notamment une pénétration plus profonde des tissus, une réduction des dommages photo-induits et une amélioration de la résolution spatiale. Bien que la microscopie à trois photons présente de nombreux avantages, la microscopie à deux photons est actuellement plus populaire en raison de la disponibilité des sources laser appropriées dans la gamme de longueurs d'onde souhaitée.

Pour la microscopie à deux ou trois photons, des densités de photons élevées sont cruciales pour obtenir une excitation suffisante des fluorophores. La concentration de photons doit être supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle requise pour la microscopie confocale ou à photon unique. Pour atteindre de telles densités de photons, il faut des sources laser ayant une puissance crête très élevée dans le régime ultrarapide.

Source laser pour la MPM

L'un des plus grands défis pour l'adoption généralisée de la microscopie multiphotonique est de trouver une source de lumière appropriée permettant une excitation efficace des fluorophores. Afin d'atteindre la puissance crête élevée nécessaire aux processus optiques non linéaires, les scientifiques utilisent des lasers femtosecondes à verrouillage de modes. Ces lasers ultrarapides peuvent fournir une quantité d'énergie très élevée pendant des durées d'impulsion très courtes tout en maintenant une faible puissance moyenne, évitant ainsi d'endommager l'échantillon. Jusqu'à récemment, les meilleurs lasers pour la microscopie à deux photons étaient des lasers accordables à titane-saphir (Ti-Sa). Bien que les lasers Ti-Sa modernes offrent une qualité et une stabilité de faisceau excellentes, ils sont extrêmement coûteux pour de nombreux laboratoires. Ils occupent une place importante sur la table et au sol, et nécessitent une maintenance régulière de leurs systèmes de refroidissement liquide, qui génèrent un bruit important.

Au cours des dernières années, ceci a motivé les fabricants de lasers à introduire des lasers à fibre et à l'état solide refroidis à l'air pour la microscopie à deux photons, qui sont moins coûteux et beaucoup plus compacts. Contrairement aux lasers Ti-Sa, ces nouveaux produits émettent une émission laser à une seule longueur d'onde fixe notamment 900 nm

et 1000 nm. Leur durée est quant à elle de l'ordre de 150 fs ou moins.

Dans la section suivante, nous passerons en revue les paramètres importants à prendre en compte lors de la sélection d'un laser ultrarapide pour la microscopie multiphotonique.

Choisir un laser fs pour la MPM

Pour sélectionner le meilleur laser, il faut tenir compte de l'interrelation entre la puissance moyenne, la puissance de crête, la durée de l'impulsion, le taux de répétition du laser et la qualité de l'impulsion. Ces paramètres peuvent prêter à confusion, c'est pourquoi nous allons revoir les plus importants d'entre eux et la manière dont ils interagissent.

Puissance moyenne et puissance de crête

Il est communément admis que l'intensité de fluorescence générée par un échantillon dans le cadre d'un processus à deux photons est proportionnelle au carré de la puissance du laser. Bien que cela soit exact, l'intensité réelle de la fluorescence est proportionnelle au carré de la puissance crête du laser (P_{pk}), du taux de répétition (R) et de la durée de l'impulsion (τ) :

$$F \propto P_{pk}^2 \cdot R \cdot \tau$$

Équation 1: Intensité de la fluorescence

La figure 1 ci-dessous compare la fluorescence générée avec deux lasers ayant la même durée d'impulsion et la même puissance moyenne. L'un des lasers a un taux de répétition de 40 MHz tandis que l'autre a un taux de répétition de 80 MHz. Selon l'équation 1 ci-dessus, le nouveau laser fs VINCI-1064 de TeraXion avec un taux de répétition de 40 MHz présente une puissance crête deux fois plus élevée, multipliant ainsi par deux l'intensité de la fluorescence, comme l'illustre la figure 1 ci-dessous.

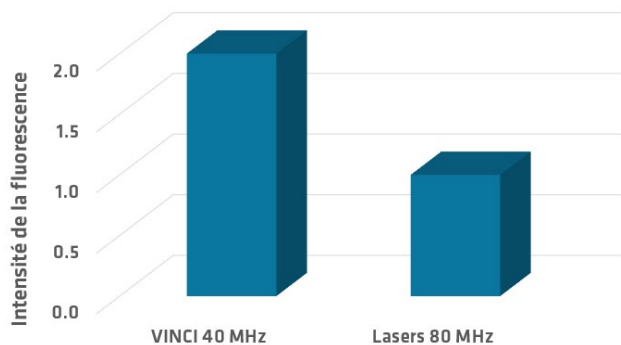


Figure 1: Intensité de la fluorescence à deux photons en fonction du taux de répétition du laser

Une puissance crête élevée est nécessaire dans le processus d'excitation multiphotonique, où deux photons ou plus sont absorbés simultanément par un fluorophore, ce qui entraîne l'émission à une longueur d'onde plus courte que la lumière d'excitation. Si une puissance crête élevée est nécessaire, il reste crucial de maintenir la puissance moyenne à un niveau acceptable afin d'éviter les dommages causés à l'échantillon par les photons. Il est donc essentiel de trouver le meilleur compromis entre la puissance crête, la puissance moyenne et le taux de répétition.

Durée de l'impulsion

Les lasers femtosecondes ont généralement des durées d'impulsion comprises entre 80 et 200 femtosecondes. Comme indiqué plus haut, à puissance moyenne égale, des impulsions plus courtes conduisent à une puissance crête plus élevée, ce qui augmente l'efficacité de la fluorescence. VINCI-1064 se caractérise par une durée d'impulsion inférieure à 60 femtosecondes (typiquement 50 fs) avec une puissance crête proche de 1 MW, idéale pour une excitation efficace des fluorophores.

Bien que des durées d'impulsion plus courtes soient avantageuses pour améliorer l'intensité de la fluorescence, cela requiert aussi de compenser correctement la dispersion chromatique des composants optiques du microscope afin d'éviter

l'élargissement de l'impulsion au plan de l'échantillon. C'est pourquoi VINCI-1064 offre une plage accordable de pré-compensation de la dispersion de haute précision allant jusqu'à 25 000 fs².

Spectre d'émission

La microscopie à deux photons à une longueur d'onde de 1064 nm permet d'exciter des protéines fluorescentes rouges. La figure 2 ci-dessous montre la section efficace d'absorption à deux photons de quelques-uns de ces fluorophores superposée au spectre d'émission de VINCI-1064. Comme on peut le voir, le spectre d'émission de VINCI-1064 chevauche adéquatement le spectre d'absorption de la plupart des protéines fluorescentes rouges couramment utilisées.

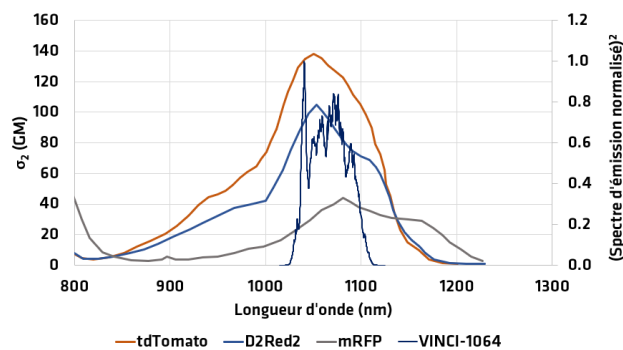


Figure 2: Chevauchement du spectre d'émission au carré du VINCI avec les sections efficaces d'absorption deux photons de protéines fluorescentes rouges

Coût

Malgré leur coût réduit, les lasers à longueur d'onde unique rendus disponibles ces dernières années restent chers par rapport aux lasers accordables. Ce coût élevé est inhérent à l'architecture laser complexe couramment utilisée dans ces lasers à fibre compacts et ultrarapides. Les lasers à fibre femtosecondes de la série VINCI sont basés sur une architecture optique ultra-simple et constituent une solution très abordable pour la microscopie à deux photons. Le coût de VINCI se compare souvent

favorablement au coût typique d'une réparation d'un laser d'un fabricant établi.

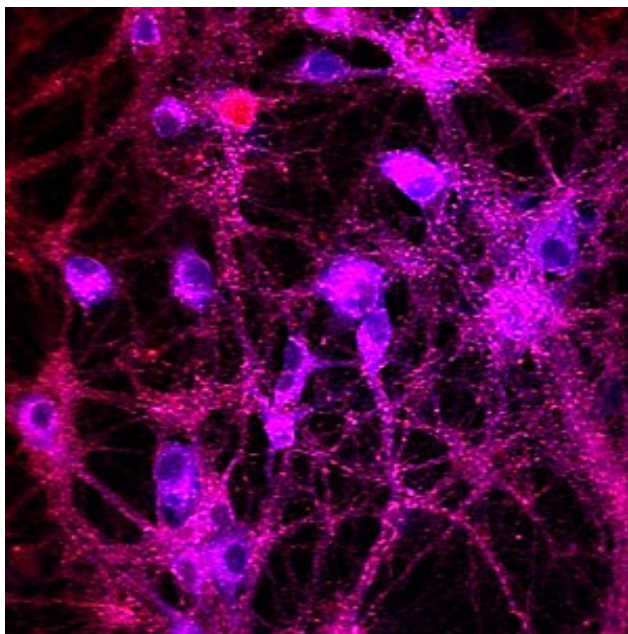
Un résumé des performances lasers par type d'architecture est présenté dans le tableau 1 ci-dessous.

Critère de performance	VINCI-1064	Autres lasers à fibre	Ti-Sa
Puissance moyenne	Bonne	Bonne	Moyenne à bonne
Intensité de fluorescence	Très élevée	Moyenne à élevée	Moyenne
Durée d'impulsion	< 60 fs	< 100 fs	< 150 fs
Coût	\$	\$\$	\$\$\$\$

Tableau 1 : Résumé de la revue des performances des lasers

Résultats expérimentaux

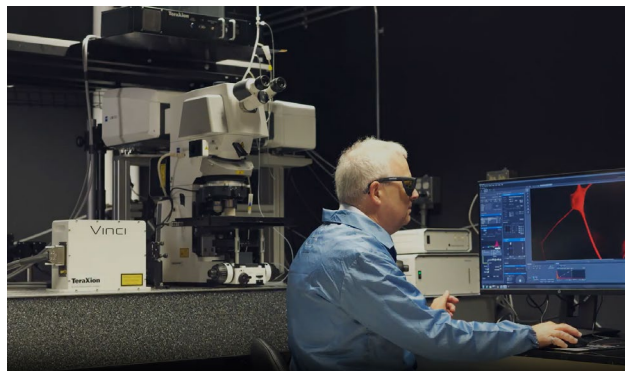
La figure 4 présente les résultats d'une mesure faite sur des neurones hippocampiques de rats en culture qui font ressortir la protéine fluorescente mCherry et l'indicateur d'ions chlorure MQAE (bleu), imagés avec le laser TeraXion à 1064nm sur le microscope à deux photons.



Avec la contribution du Centre de recherche CERVO, Ville de Québec, Canada

Figure 4: Imagerie de neurones hippocampiques de rat en culture

VINCI-1064 a été installé sur un microscope à deux photons, comme illustré dans la figure 3 ci-dessous.



Avec la contribution du Centre de recherche CERVO, Ville de Québec, Canada

Figure 3: VINCI-1064 installé sur un microscope MPM

Comme le montre la figure 4, VINCI-1064 permet une imagerie de haute qualité des neurones hippocampiques avec un rapport signal/bruit élevé.

Conclusion

La microscopie multiphotonique est une technique d'imagerie puissante largement utilisée dans la recherche biologique et biomédicale. Pour atteindre la puissance de crête élevée nécessaire, on utilise des lasers femtosecondes à verrouillage de modes. Pour choisir le laser femtoseconde optimal, il est important de prendre en compte des facteurs tels que la puissance moyenne, la puissance crête, la durée de l'impulsion, le taux de répétition du laser et la qualité de l'impulsion. Les lasers à fibre femtosecondes de la nouvelle série VINCI de TeraXion présentent des puissances crête très élevées et sont basés sur une architecture optique ultra-simple qui en fait sans doute la solution la plus abordable pour la microscopie à deux photons.