

# IMAGERIE MULTIPHOTONIQUE DE TISSUS MUSCULAIRES PAR SOURCE ULTRALARGE SPECTRE

Claire Lefort<sup>\*,1</sup>, Rodney P. O' Connor<sup>1</sup>, Sylvia M. Bardet<sup>1</sup>, Véronique Blanquet<sup>2</sup>, Laetitia Magnol<sup>2</sup>, Fabienne Baraige<sup>2</sup>, Hideaki Kano<sup>3</sup>, Vincent Tombelaine<sup>4</sup>, Philippe Lévêque<sup>1</sup>, Vincent Couderc<sup>1</sup>, Philippe Leproux<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut Xlim, UMR CNRS 7252, Université de Limoges, 87 060 Limoges, France

<sup>2</sup> UGMA, UMR INRA 1061, Université de Limoges, 87 000 Limoges, France

<sup>3</sup> Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8573, Japan

<sup>4</sup> LEUKOS Innovative Optical Systems, 37 rue Henri Giffard, Z.I. Nord, 87280 Limoges, France

[claire.lefort@xlim.fr](mailto:claire.lefort@xlim.fr)

## RÉSUMÉ

Nous montrons l'intérêt des sources pulsées nanosecondes à très large spectre dites « supercontinuum » (nsSC) pour l'imagerie multiphotonique des structures biologiques de muscles à l'échelle du micron. Grâce à leur spectre très large, plusieurs substances biologiques constituant les tissus biologiques peuvent être imagés simultanément, notamment les substances fluorescentes endogènes ou bien celles marquées avec des fluorophores exogènes ou encore celles à structure sujette à la génération d'harmoniques. Ainsi, quels que soient les spectres d'absorption biphotoniques mis en jeu et leur étalement spectral, leur imagerie simultanée est possible. D'autre part, l'intérêt de ces sources nsSC pour la microscopie multiphotonique réside aussi dans leur coût beaucoup plus faible que celui des sources titane-saphir usuellement mises en œuvre.

**MOTS-CLEFS :** *imagerie multiphotonique ; tissu musculaire ; source ultralarge spectre; multimodalité*

## 1. INTRODUCTION

La microscopie multiphotonique (MMP) est une technique de plus en plus utilisée dans les laboratoires de biologie qui ont recours à une analyse *in vitro* ou *in vivo* d'échantillons, à l'échelle du micron [1]. Les différents processus non linéaires utilisés, telle que la fluorescence à deux photons (two-photon fluorescence en anglais, 2PF) ou la génération de seconde harmonique (second harmonic generation, SHG) remplace peu à peu les techniques plus standard de microscopie de fluorescence linéaire. La MMP présente de nombreux avantages tels que l'imagerie en profondeur, la limitation du photoblanchiment, l'amélioration du rapport signal sur bruit ...

Aujourd'hui, la source laser d'excitation utilisée en routine en MMP est un laser titane saphir (Ti : Sa). Il présente de nombreuses caractéristiques compatibles avec la MMP : longueur d'onde dans le proche infrarouge (700 – 1000 nm), taux de répétition de l'ordre d'une centaine de MHz, largeur spectrale de 10 nm accordable, puissance moyenne de quelques watts. Mais cette technologie complexe est particulièrement chère (~100 k€) et son spectre de 10 nm ne laisse pas beaucoup de latitude quant au nombre de substances que l'on peut imager, en particulier celles susceptibles de générer des phénomènes de fluorescence multiphotonique.

Dans ce contexte, l'intérêt et l'utilisation de sources à spectre ultralarge a commencé à apparaître depuis une dizaine d'années pour la MMP [2]. Un spectre très large permet l'imagerie de plusieurs substances biologiques constituant les tissus vivants alors visualisables simultanément. Cela concerne notamment les substances fluorescentes endogènes (élastine, flavines, collagène...) ou bien celles marquées avec des fluorophores exogènes ou encore celles présentant une

structuration sujette à la génération d'harmoniques (collagène, myosine...). Mais les méthodes mises en œuvre font appel très souvent à des étapes d'élargissement de spectres issus de sources Ti : Sa injectés dans une fibre optique à cristaux photoniques [3]. Pour que la méthode soit compatible avec l'absorption biphotonique, elle doit être associée à une méthode de compensation de la dispersion chromatique qui élargit temporellement l'impulsion. Cela a permis la démonstration de l'intérêt de ces méthodes à très large spectre, sans résoudre ni le problème du coût ni celui de la complexité du montage expérimental associée.

Depuis 2007, les sources laser à très large spectre, basées sur des technologies lasers alternatives ont été démontrées pour la MMP [4]. Ce sont souvent des sources lasers dont les paramètres physiques sont très différents des sources Ti : Sa : durée d'impulsion plus longues (ps) et/ou taux de répétition plus faible (MHz). Pour autant, les puissances crête délivrées sont compatibles avec l'obtention d'images des cibles biologiques par MMP.

Nous présentons ici l'intérêt des sources pulsées nanoseconde à très large spectre dites « supercontinuum » (nsSC) pour la MMP de structures biologiques à l'échelle du micron reposant sur l'élargissement du spectre d'une diode laser dans une fibre optique [5]. Nous illustrons ces travaux par l'imagerie de structures musculaires de souris dont des échantillons ont été prélevés et fixés sur lame histologique.

## 2. MONTAGE EXPERIMENTAL

La figure 1a présente le montage expérimental réalisé. La source nsSC préalablement filtrée entre 650 et 900 nm a été couplée dans un microscope biphotonique (Bergamo II, Thorlabs Inc.) muni d'un système de balayage laser par miroirs galvanométriques. Deux photomultiplicateurs sont associés avec des filtres de détection et deux dichroïques permettent de séparer le signal d'excitation de celui d'émission d'une part, puis de séparer les diverses contributions spectrales émises par différents constituants de la cible imagée à travers un objectif de microscope (Olympus, 25X, ON=1.00).

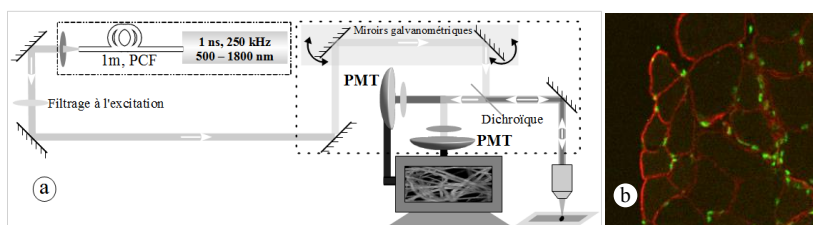


Fig. 1. a. Montage expérimental de MMP par source nsSC. b. Image de  $81 \mu\text{m} \times 81 \mu\text{m}$  de coupe de muscle de souris dont la laminine est marquée avec l'AF 546 et les noyaux sont marqués au DAPI.

Les images ont été réalisées sur un tissu musculaire de souris en coupe fixée sur lame de verre par un procédé d'histologie classique. Sur cet échantillon (Fig. 1b), la laminine a été marquée avec un fluorophore de la gamme des Alexa Fluor® (AF546) en rouge sur la Fig. 1b. Cette protéine est un constituant protéique majeur de la lame basale, son marquage souligne le pourtour des cellules. Le noyau des cellules a été marqué au DAPI, en vert sur la Fig. 1b. Le signal émis par ces deux substances est détecté respectivement entre 604 nm et 678 nm (PMT A) et entre 500 nm et 550 nm (PMT B). Le spectre cumulé d'absorption biphotonique de ces fluorophores couvre la plage comprise entre 650 nm et 1100 nm.

## 3. EXPLOITATION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

Une source ultralarge spectre comme la nsSC utilisée ici, et filtrée entre 650 et 900 nm, permet de couvrir toute la gamme d'absorption biphotonique des deux fluorophores exogènes mis en jeu (AF546 et DAPI). Dans ce cas, le spectre d'excitation est optimal à la fois pour le DAPI et pour l'AF546. Cette source, beaucoup moins chère que les sources Ti : Sa standard utilisées en MMP présente aussi deux différences notables. Son taux de répétition de l'ordre de 250 kHz est

beaucoup plus faible que celui des Ti : Sa (~80 MHz) et la distribution énergétique dans le temps est fortement remodelée par les effets non linéaires à l'origine des conversions en longueurs d'onde.

Dans notre expérience, la longueur d'onde de dispersion nulle de la fibre non linéaire est située à 1400 nm. Au-dessus de cette limite, les impulsions subissent une instabilité de modulation donnant naissance à un amas d'impulsions solitoniques. Un autodécage en longueur d'onde alimente alors le spectre jusqu'à 2.4 µm. Dans la gamme spectrale qui nous intéresse (650 et 900 nm), les longueurs d'onde sont créées par des mélanges paramétriques eux-mêmes influencés par le changement de structure temporelle initié par les différentes conversions non linéaires. L'enveloppe initiale de l'impulsion est alors fortement réduite en durée mais aussi fortement modulée. La puissance crête accessible reste ponctuellement limitée mais est maintenue sur un grand nombre de sous-impulsions ce qui représente une quantité de photons importante rendant possible l'obtention d'une image par processus multiphotonique.

En se basant sur les travaux de Chris Xu parus en 1996 [6], il est possible de définir un « score »  $F$  pour les sources dédiées à l'imagerie multiphotonique Eq (1) :

$$F \approx k \frac{\xi}{f\tau} P_0^2 \approx kS . \quad (1)$$

Le score d'une source Ti : Sa (1 W, 80 MHz, 150 fs) est alors de  $83.10^3$  u.a. tandis que celui de notre source nsSC est de l'ordre de  $10.10^3$  u.a.

### CONCLUSION

Les sources à spectre ultralarge commencent à devenir incontournables en microscopie multiphotonique même si elles souffrent encore beaucoup de leurs caractéristiques spectro temporelles chahutées ne permettant pas de connaître parfaitement leur puissance crête instantanée. Le travail présenté ici montre une illustration de l'utilisation de ces sources en microscopie multiphotonique, mettant en œuvre des échantillons biologiques de tissus musculaires marqués.

### RÉFÉRENCES

- [1] T. Vo-Dinh "Biomedical Photonics Handbook," CRC Press, 2003.
- [2] J. A. Palero, V. O. Boer, J. C. Vijverberg, and H. C. Gerritsen, "Short-wavelength two-photon excitation fluorescence microscopy of tryptophan with a photonic crystal fiber based light source," Opt. Exp. 13, 14, 2005.
- [3] B. von Vacano, T. Buckup, M. Motzkus, In situ broadband pulse compression for multiphoton microscopy using a shaper-assisted collinear SPIDER, Optics Letters, 31, 1154 – 1156, 2006.
- [4] Masanari Okuno and Hideaki Kano, Philippe Leproux and Vincent Couderc H. Hamaguchi; « Ultrabroadband (>2000 cm<sup>-1</sup>) Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Spectroscopy Using a Sub-Nanosecond Supercontinuum Light Source"; Optics Letters, vol. 32, n° 20, p. 3050-3052 (2007).
- [5] C. Lefort, R. P. O'Connor, V. Blanquet, L. Magnol, H. Kano, V. Tombelaine, P. Lévêque, V. Couderc, P. Leproux, Multicolor multiphoton microscopy based on a nanosecond supercontinuum laser source, Journal of Biophotonics, 1 – 6, 2016.
- [6] C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, W. W. Webb, Multiphoton fluorescence excitation : new spectral windows for biological nonlinear microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 10763–10768, 1996.