

L'état de l'art en illumination pour la microscopie de fluorescence

Yann JOLY
OPTOPRIM

yjoly@optoprim.com

La lumière est devenue un outil puissant dans l'analyse pour les sciences de la vie. De nouvelles technologies apparaissent régulièrement sur le marché et visent à répondre à des exigences toujours plus poussées : produire une lumière peu coûteuse, de haute intensité, uniforme, et monochromatique à travers un large spectre dans l'ultraviolet, le visible et le proche infrarouge. Beaucoup de ces sources lumineuses commerciales ont des limitations significatives en termes de performances, comme une puissance insuffisante et instable, une dérive spectrale et/ou une durée de vie courte, limitations qui ne peuvent être surmontées qu'au moyen d'investissements prohibitifs. Les sources lumineuses disponibles aujourd'hui sont loin de satisfaire à toutes les exigences et le choix de l'une ou l'autre est souvent un compromis entre prix et performances. Un aperçu des technologies d'illumination employées dans les sciences du vivant permet de dresser leurs atouts et limitations respectifs.

Les lampes

À arc ou en tungstène halogène, elles offrent une lumière blanche à spectre très étendu pour un large éventail d'applications.

La lampe tungstène halogène a sans doute été la source lumineuse la plus utilisée en sciences du vivant. La technologie mature a été maintes fois optimisée pour des applications d'éclairage variées. Ainsi, il est peu probable que l'on puisse encore améliorer sa faible efficacité de collection de lumière ou atténuer les émissions thermiques élevées. Des problèmes de durée de vie et de stabilité sont également inhérents et difficiles à résoudre. Cette source de lumière blanche avec une largeur spectrale de plus de 1000 nm doit être fortement filtrée pour créer les bandes de 10 ou 20 nm nécessaires en microscopie de fluorescence. Le rendement lumineux est alors très faible, de l'ordre de quelque milliwatts, et parfois trop peu suffisant pour des applications d'imagerie.

Les lampes à arc (au xénon ou aux halogénures métalliques tel que metal-halide par exemple) permettent de contourner cette limitation. Ces lampes de puissance

élevée engendrent des niveaux d'éclairage bien plus importants, mais génèrent également une lumière blanche à spectre très large qui doit être fortement filtrée, surtout dans l'ultraviolet et l'infrarouge. En outre, elles créent des charges thermiques élevées qui doivent être soigneusement gérées pour éviter de compromettre les performances du système d'illumination ou l'environnement biologique de l'échantillon. L'instabilité de puissance due à l'instabilité de l'arc dans le temps est un problème notoire. La lampe à arc a été considérablement améliorée grâce à sa prolifération dans les vidéoprojecteurs, cependant, l'arrivée des diodes électroluminescentes (LED) bas coût et les questions soulevées par de nombreux pays sur le risque d'utilisation du mercure, ralentissent les progrès techniques.

Les lasers à gaz

Les lasers sont des sources de lumière brillantes, les plus pures d'un point de vue spectral.

Le laser à argon fut le laser le plus utilisé en sciences du vivant. Toutefois, son nom-

bre limité de raies, son prix, son entretien, sa consommation électrique élevée et son lourd système de refroidissement l'ont fait disparaître au profit des nouvelles technologies lasers. Actuellement, le remplacement des lasers à argon par des lasers émettant dans la même gamme de longueurs d'onde, mais plus compacts et plus économiques commence à être proposé.

Les lasers DPSS

Les lasers DPSS (*diode pumped solid state*) sont des lasers à semi-conducteurs dans lesquels un milieu à gain solide, par exemple un rubis ou un cristal Nd:YAG, est pompé à l'aide d'une diode laser. Un doublet et/ou une conversion de la fréquence principale est ensuite réalisé intra ou extra cavité pour obtenir différentes fréquences dans le spectre visible, utiles pour la plupart des applications en imagerie biologique. Les lasers DPSS sont plus compacts et plus faciles d'utilisation que leurs prédécesseurs, mais ont surtout l'avantage de produire une lumière puissante, brillante, stable et spectralement pure. Ils nécessitent cependant pour

la plupart, des éléments optiques extérieurs (comme des modulateurs acousto-optiques) pour pouvoir être modulés à fréquence élevée. Par ailleurs, bien qu'ils répondent à de nombreuses applications, ces lasers ne couvrent qu'une partie du spectre visible et leur prix est de loin l'inconvénient le plus important.

Les diodes lasers

Longtemps utilisées pour des applications en télécommunications ou pour le pompage d'autres lasers, les diodes lasers apparaissent de plus en plus dans les applications de sciences du vivant. Elles couvrent, elles aussi, une partie limitée du spectre visible, mais complètent les lasers DPSS (voir tableau 1) : les deux technologies permettent d'imager les fluorophores les plus communément utilisés en microscopie de fluorescence. Leur qualité de faisceau et leurs puissances sont souvent inférieures à celles des lasers DPSS, mais elles ont l'avantage de pouvoir être modulées à vitesse élevée très facilement. Bien que moins chers que les lasers DPSS, les diodes laser présentent des tarifs élevés, surtout pour des applications nécessitant de couvrir un large spectre.

Les lasers blancs ou super-continuum

Ce sont les dernières technologies lasers arrivées sur le marché de la biologie. Les lasers super-continuum sont formés à partir d'un laser à impulsions très brèves,

Tableau 1

Liste non exhaustive des lasers compacts les plus communément utilisés en imagerie de fluorescence.

Longueur d'onde (en nm)	Type de laser
355	DPSS
375	Diode
405	Diode
445	Diode
457	DPSS
473	DPSS ou diode
488	Diode
491	DPSS
515	DPSS ou diode
532	DPSS
553	DPSS
561	DPSS
594	DPSS
637	Diode
642	Diode
660	DPSS ou diode
705	Diode
730	Diode
785	Diode

injecté dans une fibre micro-structurée, à cristal photonique. Cette dernière produit un effet d'optique non linéaire conduisant à l'émission d'un laser blanc, à spectre large, couvrant la gamme de longueurs d'onde allant d'environ 400 à 2500 nm (figure 1). Bien que son manque d'émission de lumière dans le proche ultraviolet puisse être une limitation pour certaines applications, les lasers super-continuum blancs réunissent les principaux avantages des lampes blanches et des lasers DPSS ou diodes : le faisceau délivre un spectre large, puissant, brillant, stable et spatialement uniforme. Ici encore, l'inconvénient majeur provient du prix très élevé.

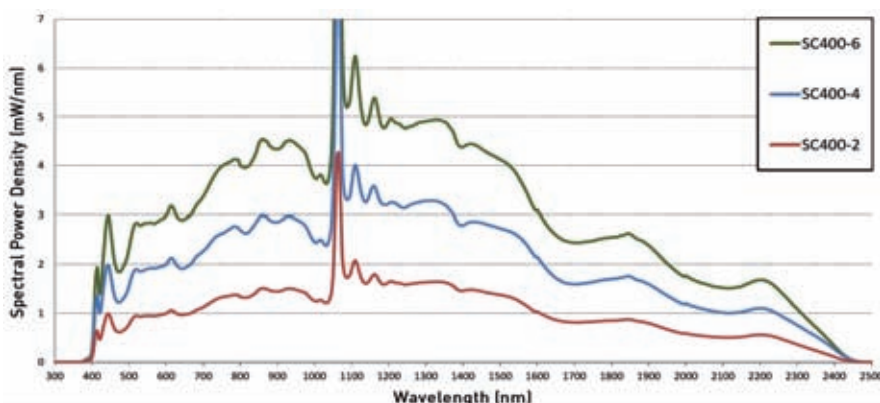


Figure 1. Exemple de spectres de lasers super-continuum blancs (Fianium).

Welcome to the World of




DILASE 250
DILASE 650
DILASE 750

UV-KUB 1
UV-KUB 2

K-ILU 1
K-ILU 2



KLOE

Discover Versatility
through Dilase Technology !

www.kloe.fr

Les diodes électroluminescentes

Elles offrent de loin la meilleure option de source lumineuse à moindre coût. Elles sont désormais disponibles dans une gamme de longueurs d'onde relativement étendue et permettent des vitesses de commutation on/off appréciables dans beaucoup d'applications. Cependant, elles émettent une lumière dont le spectre reste large (40 à 50 nm) et nécessitent donc d'être filtrées. En outre, de par leur technologie, leur émission est particulièrement réduite dans le vert et le jaune, ce qui peut être une limitation pour certaines applications en sciences du vivant. Parce que l'intensité lumineuse suffisante ne peut être obtenue à partir d'unités individuelles, des matrices de LED sont souvent employées, conduisant à des problèmes d'uniformité et de stabilité. Leur principal avantage, un coût unitaire faible, est souvent annulé par le coût et la complexité des composants supplémentaires nécessaires pour la mise en forme du faisceau.

Les tubes luminescents

Développée par la société Lumencor, c'est probablement l'une des dernières technologies ayant fait ses preuves dans l'excitation lumineuse pour les sciences du vivant (figure 2). La lumière est générée par un tube luminescent excité par un faisceau d'électrons, des LED ou des lampes UV. Le tube constitué de matériaux luminescents (du verre dopé aux

terres rares) émet une lumière intense uniquement dans les parties vertes et jaunes du spectre électromagnétique. Il n'y a pas de production de rayonnement ultraviolet, ni de rayonnement infrarouge, capables d'engendrer des problèmes de toxicité dans certains milieux biologiques. Toute lumière parasite est éliminée par un simple filtre passe-bande étroit. La fluorescence émise est alors collectée et injectée dans un guide de lumière. Le déclin rapide

de luminescence et le temps de préchauffage du tube quasi nul offrent la possibilité de commutations on/off rapides.

La géométrie de ce type de tube permet des rendements lumineux importants, comparables à ceux des lasers DPSS visibles les plus puissants disponibles sur le marché. Par ailleurs, le prix étant bien inférieur à celui des lasers, un système hybride composé de tubes luminescents et de LED filtrées se présente comme un très bon compétiteur sur le marché des systèmes d'illumination pour les sciences de la vie (figure 3).

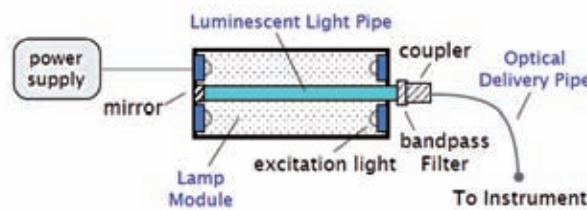


Figure 2. Schéma d'un tube luminescent (module Light Pipe de Lumencor).

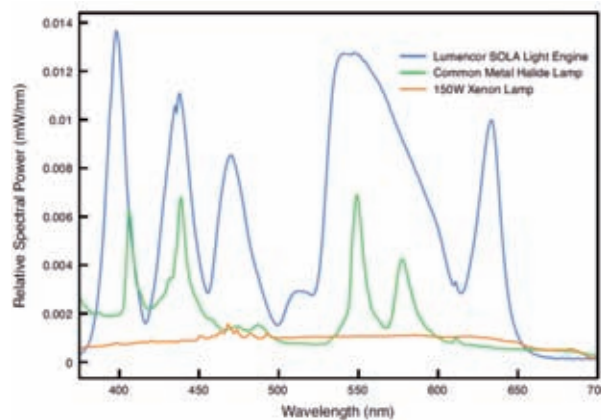


Figure 3. Comparaison des puissances spectrales relatives des sources à arc et des systèmes hybrides comportant un tube luminescent et des LED filtrées (Lumencor).

Comparaison des différents systèmes

La microscopie de fluorescence devient de plus en plus exigeante quant aux sources d'excitation qui doivent contribuer à améliorer le rapport signal sur bruit, diminuer la photo-toxicité et le blanchissement, augmenter la vitesse d'acquisition et allonger la durée de vie de ses équipements tout en diminuant leur coût. Certaines technologies ne semblent alors plus être tout à fait adaptées.

En effet, les sources tungstène ou à arc dont l'émission de chaleur et de lumière dans l'ultraviolet et l'infrarouge pose des questions de photo-toxicité, pourraient ne plus satisfaire les exigences actuelles de l'imagerie de fluorescence. Les

autres sources, LEDs, lasers, tubes luminescents, se disputent la course au meilleur candidat : dans le cas des LEDs, la puissance est encore parfois trop faible ; le coût des lasers, surtout pour des applications multi-longueurs d'onde, est parfois exorbitant. Cependant ces trois technologies présentent un avantage crucial face aux lampes plus classiques : la possibilité d'ajuster finement la puissance émise et de créer des impulsions de lumière très courtes, voire même synchronisées avec le dispositif de détection, permet de trouver le compromis idéal entre illumination, photo-toxicité et blanchissement. Le tableau 2 dresse le bilan des atouts et limitations de chaque technologie.

Tableau 2 Comparaison des différentes technologies d'illumination en imagerie de fluorescence.

Technologies	Spectre utile	Puissance	Uniformité	Réponse temporelle	Émission de chaleur	Temps de vie	Prix
Tungstène	Élevé	Faible	Faible	Faible	Moyenne	Faible	Faible
Lampe à arc	Élevé	Moyenne	Faible	Faible	Élevée	Faible	Moyen
Laser DPSS	Moyen	Élevée	Élevée	Faible	Faible	Moyen	Élevé
Diode laser	Moyen	Moyenne	Élevée	Élevée	Faible	Moyen	Élevé
Laser blanc	Élevé	Élevée	Élevée	Élevée	Faible	Moyen	Élevé
LED	Élevé	Moyenne	Moyenne	Élevée	Faible	Élevé	Faible
Tube luminescent	Élevé	Élevée	Élevée	Élevée	Faible	Élevé	Moyen