

Dimensionnement radiométrique

(version anglaise sur la page suivante)

Les composants les plus onéreux du montage MesoSPIM sont les lasers (typiquement 4 lasers de puissance 50 à 150 mW, combinés dans un fibre monomode). On peut donc se demander pourquoi une telle puissance d'illumination est nécessaire pour obtenir un signal de fluorescence mesurable.

Une façon de faire cela est d'estimer le flux de fluorescence rayonné par une molécule fluorescente unique, située dans la nappe d'excitation, en fonction de la puissance du laser d'excitation (*renseignez-vous sur les valeurs des coefficients d'extinction molaire et de rendement quantique des molécules de fluorescence utilisées dans l'article*). Ensuite, en tenant compte des temps d'acquisition typiques de la caméra, on peut calculer le flux collecté par un pixel de la caméra observant cette molécule fluorescente. Bien que les microscopes à feuille de lumière ne soient pas destinés à observer des molécules uniques, ce calcul permet d'avoir une idée du nombre minimum de molécule fluorescente dans la PSF pour une puissance laser donnée.

On pourra faire ce calcul d'abord en considérant l'échantillon parfaitement transparent, puis, numériquement, en tenant compte de la diffusion. Il faudrait essayer de trouver dans la littérature le coefficient d'extinction d'un tissu biologique après clearing.

On pourrait aussi essayer de voir ce qui se passerait d'un point de vue radiométrique si on remplaçait le laser d'excitation par une LED (un bandeau de LED ?) dans le but de faire drastiquement diminuer les coûts.

Radiometric dimensioning

The most expensive components of the MesoSPIM setup are the lasers (typically four lasers with a power of 50 to 150 mW, combined in a single-mode fiber). We might wonder why such high illumination power is necessary to obtain a measurable fluorescence signal.

One way to answer this question is to estimate the fluorescence flux radiated by a single fluorescent molecule located in the light sheet, as a function of the excitation laser power (you will need to look about the molar extinction coefficients and quantum yields of fluorescent molecules used in the article). Then, considering the typical acquisition times of the camera, we can calculate the flux collected by a pixel of the camera observing this fluorescent molecule. Although light sheet microscopes are not designed to observe single molecules, this calculation gives an idea of the minimum number of fluorescent molecules in the PSF for a given laser power.

This calculation can be done first by considering the sample to be perfectly transparent, then numerically, taking scattering into account. You will have to find the typical extinction coefficient of biological tissue after clearing in the literature.

We could also try to see what would happen from a radiometric point of view if we replaced the excitation laser with an LED (an LED strip?).