

n° d'ordre : 3031

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE
ET DES SCIENCES DE L'INGENIEUR

par Arnaud BROCAS

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR

SPECIALITE : LASERS ET MATIERE DENSE

Microscopies non linéaires : Analyses et Instrumentations.

Soutenue le : mercredi 28 Septembre 2005

Après avis de :

François AMBLARD
Hervé RIGNEAULT

Chargé de Recherche, Institut Curie Paris
Chargé de Recherche, Institut Fresnel Marseille

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Evelyne FARGIN
Laurent SARGER
Jeff SQUIER
Lionel CANIONI

Professeur, Université de Bordeaux I
Professeur, Université de Bordeaux I
Professeur, Colorado School of Mines (USA)
Maître de Conférence, Université de Bordeaux I

Président
Directeur de thèse
Examinateur
Rapporteur

-- 2005 --

Remerciements

Cette thèse a été menée au Centre de Physique Moléculaire Optique et Hertzienne à l'Université de Bordeaux I. Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Fabrice Vallée et Monsieur Jean Marie Turllet, directeurs du laboratoire, pour leur accueil.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait les membres du jury en acceptant de juger ce travail. Je remercie François Amblard et Hervé Rigneault d'avoir assuré la charge de rapporter ce travail. Je remercie également Evelyne Fargin pour avoir présidé le jury de ma thèse. Enfin j'adresse ma plus grande gratitude à Jeff Squier d'avoir accepté de juger un travail en français, d'être spécialement venu du Colorado pour assister à ma soutenance et d'avoir porté un grand intérêt aux expériences développées.

Je remercie Laurent Sarger de m'avoir accueilli dans son groupe de recherche et pour la confiance qu'il m'a apporté durant ma thèse. Je salue sa grande culture scientifique et sa disponibilité malgré un emploi du temps surchargé. Je salue également ses grandes qualités humaines qui font de ce groupe de recherche sans doute l'un des plus agréables du laboratoire où on peut travailler sérieusement sans pour autant se prendre au sérieux.

Je tiens à remercier vivement Lionel Canioni qui m'a guidé et aidé tout le long de ce travail. Je salue son dynamisme, ses compétences, sa sympathie et sa simplicité. Je tiens aussi à le remercier particulièrement pour son soutien durant une épreuve délicate n'hésitant pas à me porter secours à une heure très tardive de la nuit.

Mes remerciements vont à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré. Pierre Vacher de l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB) qui m'a fourni toutes les cellules dont j'avais besoin et pour avoir pris le temps de m'aider à comprendre les images réalisées, Evelyne Fargin, Thierry Cardinal et Marc Dussauze de l'Institut de Chimie de la Matière Condensée (ICMCB) ainsi qu'Arnaud Zoubir, Clara Rivero et Leonid Glebov du CREOL (Orlando, Floride) pour les différents travaux sur les verres. Je remercie enfin Philippe Jatteau du CEMAGREF de Cestas pour m'avoir fourni les mysidacés.

J'adresse ma plus profonde sympathie à tous les membres actuels et anciens (thésards, post doc, permanents, contractuels...) de l'équipe Femto : Bruno, Stéphane, Patrick, Jean-Baptiste (JB), Arnaud (Junior), Sylvain, Philippe et Miguel (El mexicano).

Je remercie les électroniciens Joël Plantard, Max Winckert, William Benharbone, Sébastien Cassagnère et Philippe Maire, les mécaniciens Touati Douar, Eddie Maillard, Claude Lalaude, Jacky Geneste et Richard Perrier ainsi que tout le personnel administratif pour leur patience et leur disponibilité qui ont grandement contribué à la réussite de ce travail.

J'associe aussi dans ces remerciements l'ensemble des personnes du laboratoire qui m'ont témoigné de la sympathie pendant ces années.

Je tiens à saluer tous mes amis de Caupenne pour notre amitié datant pour la plupart de l'enfance : Seb, Caro, Pat, Marie, David, Marlène, Franck, Cathy, Stéphane, Corinne, Tit, Gilou, Zaza, Philippe, Sylvie, Michou, ...

Je tiens aussi à témoigner toute mon affection à l'Harmonie et à la banda Los Copleros de Montfort en Chalosse où j'ai passé des moments inoubliables. Je salue particulièrement les membres de la « Peña 76 » Les Yeux, Marcel, Yaya, Xunik, Titou ainsi que ceux qui se sont déplacés spécialement pour assister à ma soutenance : Nicolas, Karine, Augustin et Nathalie.

Je remercie très chaleureusement mes parents, ma famille pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout le long de ma scolarité.

Enfin, je dédie ce manuscrit à Hugo et Alexis qui ont ponctué par leur naissance le début et la fin de ces années de thèse.

Avant-propos

Cette thèse fait suite aux travaux effectués au CPMOH en 2000 et 2001 par Régis Barille et Lionel Canioni qui ont montré la faisabilité d'une microscopie par génération de tierce harmonique dans différents articles.^{1, 2} Elle a été cofinancée par le Conseil Régional d'Aquitaine, par l'Université Bordeaux I (BQR pluriannuel) et par le CNRS (ACI photonique).

Au cours de mes années de thèse, différentes collaborations ont été entreprises. Des travaux sur les matériaux vitreux ont pu être entrepris grâce à des collaborations avec l'ICMCB et avec le CREOL (Orlando, Floride). Concernant l'imagerie d'éléments biologiques, Pierre Vacher du Laboratoire de Physiologie et Physiopathologie de la Signalisation Cellulaire à l'IECB a pu me fournir différents types de cellules et a grandement contribué à la compréhension et à l'interprétation des images réalisées. Une collaboration avec le CEMAGREF de Cestas m'a permis d'expérimenter l'imagerie par génération de tierce harmonique sur des objets biologiques massifs bien qu'il soit dommage a posteriori d'avoir eu de mauvais résultats sur les otolithes.

¹ L. Canioni, « Imagerie 3D pour tissus biologiques et matériaux. La microscopie à balayage laser par génération de troisième harmonique », CNRSinfo, N°390 (Février 2001)

² L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, R. Barille, P. Vacher, P. Voisin, « Imaging of Ca²⁺ intracellular dynamics with a third-harmonic generation microscope », Optics Letters, Vol. 26, Issue 8, p. 515 (2001)

SOMMAIRE

<i>Introduction</i>	11
---------------------------	-----------

CHAPITRE I	15
-------------------------	-----------

Microscopies linéaires et non linéaires : définitions générales

INTRODUCTION	15
---------------------------	-----------

I- PRINCIPES ET CARACTERISTIQUES DE L'EMISSION DE

FLUORESCENCE	17
---------------------------	-----------

I.1- Le processus de photoluminescence	17
I.2- Caractéristiques des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule	18
I.3- Rendement quantique et temps de déclin de la fluorescence	19
I.4- Polarisation de la fluorescence.....	20
I.5- Effets de l'environnement local sur la fluorescence	21
I.6- Problèmes liés à l'excitation d'une molécule : photo-blanchiment, photo-dégradation, saturation, effets thermiques	22

II- MICROSCOPIE CONFOCALE DE FLUORESCENCE	24
--	-----------

II.1- Principe.....	25
II.2- Performances : résolutions spatiales.....	26
II.3- Limitations.....	27

III- MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE PAR EXCITATION DEUX

PHOTONS	28
----------------------	-----------

III.1- Emission de fluorescence sous excitation à deux photons	28
III.2- Le microscope de fluorescence par excitation à deux photons.....	32
III.2.1- Principe.....	33
III.2.2- Résolutions spatiales	34
III.2.3- Avantages du microscope EDP par rapport au microscope confocal	35

IV- MICROSCOPIE PAR GENERATION DE SECONDE

HARMONIQUE	41
-------------------------	-----------

IV.1- Génération de seconde harmonique au niveau moléculaire : diffusion Hyper-Rayleigh	42
IV.2- Génération de seconde harmonique pour un ensemble de molécules	44
IV.3- Radiation GSH en microscopie.....	46
IV.4 - Conception d'un microscope par GSH.....	47

V- TECHNIQUES D'IMAGERIE EN MICROSCOPIE	50
V.1- Utilisation d'une platine de translation.....	50
V.2- Imagerie par balayage laser.....	51
V.3- Dernières innovations en imagerie	51
CONCLUSION	53
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54
CHAPITRE II.....	59
<i>Propagation d'une impulsion lumineuse dans un milieu matériel</i>	
INTRODUCTION.....	59
I- FORMALISME DE L'OPTIQUE NON LINEAIRE.....	61
I.1- Relations entre le champ électrique et la polarisation.....	61
I.2- Les équations de Maxwell	63
I.3- Equation de propagation de l'impulsion lumineuse.....	65
I.4- La dispersion du second ordre	67
II- PROCESSUS NON LINEAIRES RELATIFS A LA MICROSCOPIE	
NON LINEAIRE.....	71
II.1- Génération de seconde harmonique.....	72
II.2- Absorption deux photons.....	72
II.3- Mélange à quatre ondes	73
II.3.1- Génération de tierce harmonique	75
II.3.2- CARS.....	75
III- LIMITATIONS DANS LA MICROSCOPIE NON LINEAIRE	
COHERENTE	77
III.1- Diffusion de Rayleigh, diffusion de Mie.....	77
III.2- Diffraction et interférence	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82
CHAPITRE III	85
<i>Microscopie par génération de tierce harmonique</i>	
INTRODUCTION.....	85
I- PRINCIPES DE LA MICROSCOPIE GTH.....	87

I.1- Expression de l'onde de tierce harmonique	87
I.2- Conditions de génération de l'onde de tierce harmonique	90
I.2.1- Résolution de J_{30} suivant l'accord de phase Δk	90
I.2.2- Génération de tierce harmonique à l'interface de deux milieux	93
I.3- Effet de la polarisation du faisceau fondamental sur la GTH	97
I.4- Performances : résolutions spatiales	98

II- MISE EN ŒUVRE D'UN PROTOTYPE DE MICROSCOPIE PAR

GTH..... 102

II.1- Réalisation et choix des éléments du prototype	102
II.1.1- La source laser	103
II.1.2- Choix des miroirs GTI	112
II.1.3- Système scanner	112
II.1.4- Châssis du microscope et objectifs utilisés	119
II.1.5- Système de détection - Acquisition	123
II.1.6- Réalisation d'un logiciel pilotant le scanner, l'acquisition et l'enregistrement d'images	128
II.2- Validation du prototype	131
II.3- Application : technique d'analyse GTH du système de focalisation	133
II.3.1- Modèle théorique	133
II.3.2- Mise en place de l'expérience	137
II.3.3- Analyse des données	138

CONCLUSION 143

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 144

CHAPITRE IV..... 147

Applications : imageries en microscopie par génération de tierce harmonique

INTRODUCTION..... 147

I- CARACTERISATION NON LINEAIRE DE MATERIAUX VIA LA MICROSCOPIE PAR GTH 150

I.1- Homogénéité d'un verre	150
I.2- Analyse du signal de tierce harmonique pour un verre « polé »	152
I.2.1- Définition du « poling »	153
I.2.2- Techniques de « poling »	155
I.2.3- Expérience de microscopie par GTH sur un verre « polé »	155
I.3- Analyse des propriétés non linéaires d'un guide d'onde	157

II- IMAGERIE PAR GTH D'ELEMENTS BIOLOGIQUES 160

II.1- Apprentissage de l'interprétation	160
II.2- Analyse par GTH de la mort cellulaire programmée	173
II.2.1- Définition de l'apoptose	174
II.2.2- Analyse du signal GTH lors de l'apoptose de cellules Cos	177
II.3- Effets de la polarisation	182

II.4- D'autres expériences de microscopie par GTH	183
II.4.1- Etude des effets de la polarisation en microscopie par GTH sur des larves d'oursin	183
II.4.2- Etude par microscopie par GTH/GSH du développement d'un embryon de Zebrafish.....	185
II.4.3- Description à l'échelle micrométrique des mouvements morphogénétiques dans des embryons sains de Drosophile.....	187
CONCLUSION	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	190
<i>CHAPITRE V</i>	<i>193</i>
<i>Perspectives : vers une microscopie CARS</i>	
INTRODUCTION.....	193
I- PRINCIPES DE LA MICROSCOPIE CARS.....	195
I.1- Le processus CARS	195
I.2- Formalisme du processus CARS.....	198
I.3- Quelques techniques pour optimiser le signal CARS	200
II- REALISATION D'UN MICROSCOPE CARS RESOLU EN TEMPS	
.....	202
III- PERSPECTIVES	206
CONCLUSION	209
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	210
<i>Conclusion</i>	<i>213</i>

Introduction

Depuis plus d'un siècle, la microscopie de fluorescence est un outil largement utilisé par les biologistes en raison de ses possibilités de détection *in-vivo* d'objets et de structures qui ne peuvent être visualisées en microscopie optique conventionnelle. En l'espace de quelques décennies, ce domaine de la microscopie s'est considérablement développé en raison de l'apparition de nouvelles technologies optiques. En particulier le microscope confocal de fluorescence, caractérisé par des capacités de résolutions spatiales tridimensionnelles de l'ordre du micromètre, est à l'origine de progrès considérables dans le domaine biomédical et en biologie en permettant l'imagerie détaillée d'échantillons.

Suite au développement des sources laser impulsives femtosecondes, une nouvelle technique de microscopie de fluorescence non linéaire est apparue en 1990 : la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons ou microscope biphotonique. Caractérisé par une résolution spatiale tridimensionnelle comparable à celle du microscope confocal, le microscope de fluorescence sous excitation à deux photons offre par ailleurs toute une série d'avantages supplémentaires pour l'étude d'échantillons biologiques, notamment en terme de limitation de photo-dégradations. Ainsi, la microscopie biphotonique est devenue une technique alternative à la microscopie confocale de fluorescence pour une imagerie moins destructrice à une résolution submicronique d'échantillons biologiques vivants.

Ces techniques nécessitent l'introduction dans les échantillons de substances chimiques qui servent d'agent de contraste. Or, ces substances présentent une certaine toxicité et au-delà de 100 μm à l'intérieur de tissus vivants il est difficile de charger localement de colorants ces tissus. Par ailleurs la diffusion multiple de lumière rend parfois l'imagerie confocale inopérante. La microscopie cohérente par mélange d'ondes, du fait de son caractère non linéaire de l'excitation permet, comme la microscopie biphotonique, une imagerie localisée au voxel représenté par la tache focale de l'onde laser focalisée. De plus, en utilisant comme agent de contraste une propriété physique intrinsèque du matériau, la susceptibilité non linéaire, il est maintenant possible de réaliser des images en microscopie sans préparation particulière des échantillons.

Le travail présenté dans cette thèse consiste en l'étude et à la réalisation de microscopes non linéaires dérivant du mélange à quatre ondes et est organisé autour de cinq chapitres. Le premier chapitre est un rappel des techniques de microscopie de fluorescence

confocale et sous excitation deux photons. Ces deux microscopies sont très connues puisque toutes les sociétés de microscopie proposent aujourd'hui des outils commerciaux dérivant de ces deux techniques. En outre, nous décrivons les performances ainsi que les avantages et inconvénients de chaque technique. Par ailleurs, nous décrivons le principe de la microscopie par génération de seconde harmonique, technique encore confidentielle mais qui connaît un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique à cause de sa facile mise en place sur un microscope biphotonique.

Le second chapitre donne une vision des différents aspects de la propagation non linéaire d'une impulsion courte dans un milieu matériel avec les approximations usuelles utilisées dans le cadre d'usage d'un oscillateur laser avec une puissance crête adaptée. L'équation de propagation d'une impulsion courte en est déduite ainsi que les différents processus non linéaires mis en jeu dans les microscopies non linéaires cohérentes. Par ailleurs, les limitations de la propagation en microscopie sont abordées.

Les deux chapitres suivants présentent le cœur du travail de ce mémoire. Le troisième chapitre propose tout d'abord une étude exhaustive de la microscopie par génération de tierce harmonique puis décrit le développement d'un prototype autour de cette technique mais également avec la possibilité d'effectuer une microscopie par génération de seconde harmonique et/ou une microscopie biphotonique. Les choix technologiques sont explicités et les performances obtenues sont commentées. Pour valider complètement le prototype réalisé, nous proposons une technique d'analyse du système optique de focalisation. Cette technique permet de caractériser l'optique de focalisation en déterminant complètement les aberrations optiques, la résolution, la potentialité de transmission et l'élargissement des impulsions du faisceau laser fondamental. Le quatrième chapitre illustre les différentes expériences effectuées à l'aide du prototype. Nous montrons qu'un microscope par génération de tierce harmonique est un outil très intéressant pour la science des matériaux car il permet de cartographier à l'échelle micrométrique les éventuels défauts, l'homogénéité en terme de susceptibilité non linéaire d'ordre trois ou encore de valider des techniques de traitement particulier des matériaux. Par ailleurs des expériences sur des échantillons biologiques sont effectuées. Nous montrons que la microscopie par génération de tierce harmonique apporte des informations structurales des objets ainsi qu'une certaine sensibilité fonctionnelle.

Enfin, le dernier chapitre propose une perspective vers une microscopie CARS. Elle utilise comme moyen de contraste les modes de vibration des molécules qui représentent une véritable empreinte et propose ainsi une meilleure qualification des échantillons. Après avoir décrit brièvement le processus CARS en microscopie, ainsi qu'avoir commenté de techniques

existantes pour permettre un meilleur signal CARS, nous décrivons l'expérience que nous avons mis en place. Un nouveau modèle pour obtenir un meilleur signal CARS est ensuite proposé. Le dispositif expérimental pour la mise en œuvre de cette nouvelle technique est en cours de réalisation et n'a malheureusement pas pu être testé dans cadre de ce travail.

CHAPITRE I

Microscopies linéaires et non linéaires : définitions générales

INTRODUCTION

Depuis ces cinquante dernières années les techniques de microscopie optique linéaire et non linéaire se sont considérablement développées en raison de nouvelles technologies optiques. En particulier le microscope confocal de fluorescence, caractérisé par des performances en terme de résolutions spatiales tridimensionnelles de l'ordre du micromètre, est à l'origine de progrès considérables dans le domaine biomédical en permettant une imagerie détaillée d'échantillons.

Suite au développement de sources laser impulsives femtosecondes, une nouvelle technologie de microscopie de fluorescence non linéaire est apparue en 1990 : la microscopie de fluorescence sous excitation deux photons ou microscopie biphotonique. Cette nouvelle technique de microscopie non linéaire de fluorescence, caractérisée par des capacités d'analyse moins destructives et d'imagerie tridimensionnelles à haute résolution spatiale devint alors une technique supplantant la microscopie confocale de fluorescence en raison de ces avantages pour l'étude de milieux biologiques.

Par ailleurs, alternativement aux progrès effectués dans la microscopie de fluorescence, d'autres techniques de microscopie non linéaires sont étudiées. Par exemple la microscopie par génération de seconde harmonique, bien que connue avant la microscopie biphotonique connaît une résurgence grâce à la découverte de marqueurs exogènes pouvant révéler des niveaux importants de signal. En effet, des marqueurs bien conçus et organisés peuvent produire des niveaux de signal comparables à ceux produits via une microscopie biphotonique. D'ailleurs, les résolutions spatiales fournies par la microscopie de fluorescence sous excitation deux photons et par la microscopie par génération de seconde harmonique sont comparables, les deux modes de contraste pouvant être dérivés du même instrument.

Nous décrirons dans ce chapitre les principes des techniques de microscopie confocale de fluorescence et de microscopie de fluorescence sous excitation deux photons après avoir rappelé les bases physiques et les caractéristiques générales de l'émission de fluorescence. Nous discuterons par ailleurs des divers avantages de la technique biphotonique par rapport au microscope confocal de fluorescence.

Nous décrirons ensuite le principe de la microscopie par génération de seconde harmonique que nous comparerons à la microscopie biphotonique.

Enfin un bref rappel concernant les techniques d'imagerie en microscopie sera abordé.

I- PRINCIPES ET CARACTERISTIQUES DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE

I.1- Le processus de photoluminescence

La photoluminescence est un phénomène qui se traduit par l'émission de photons par une molécule qui a été irradié par un faisceau lumineux. La photoluminescence englobe deux processus : la fluorescence et la phosphorescence, qui dépendent de la nature des états fondamentaux et excités de la molécule considérée. Le diagramme de Jablonski [1], représenté sur la figure 1, illustre l'absorption et l'émission de photons par une molécule.

Généralement, l'excitation de la plupart des molécules en solution s'effectue par absorption de photons dans une gamme de longueur d'onde s'échelonnant du visible à l'ultraviolet. La fluorescence est alors l'émission de photons qui se traduit lors de la transition de la molécule de l'état excité singulet S_1 vers l'état fondamental S_0 . Dans une telle variation, le spin électronique des molécules ne change pas d'orientation. La durée de vie de l'état excité S_1 d'une molécule fluorescente autrement appelée fluorophore, varie typiquement de quelques dizaines de picosecondes à quelques nanosecondes. Dans le cas de la phosphorescence, la transition s'effectue entre deux états d'énergie de multiplicité de spin différente. Les durées de vie de la phosphorescence s'échelonnent typiquement d'une centaine de microsecondes à quelques secondes.

Plus précisément, le processus d'absorption d'un photon par une molécule amène un électron sur un niveau singulet S_1 ou S_2 . A température ambiante, la molécule retombe vers l'état de vibration le plus bas de S_1 : ce processus est appelé conversion interne.

Plusieurs évolutions sont alors possibles :

- la molécule retombe vers l'état fondamental S_0 et émet un photon de fluorescence
- la molécule passe vers l'état triplet T_1 par une transition non radiative. Le retour de T_1 vers S_0 peut s'accompagner de l'émission d'un photon de phosphorescence. Signalons que la probabilité de passage de S_1 vers T_1 est nettement plus faible que la désexcitation radiative S_1 vers S_0
- la molécule revient dans son état fondamental sans émission de photons. Ces transitions non radiatives sont plus ou moins fréquentes en fonction de divers paramètres liés à l'environnement de la molécule.

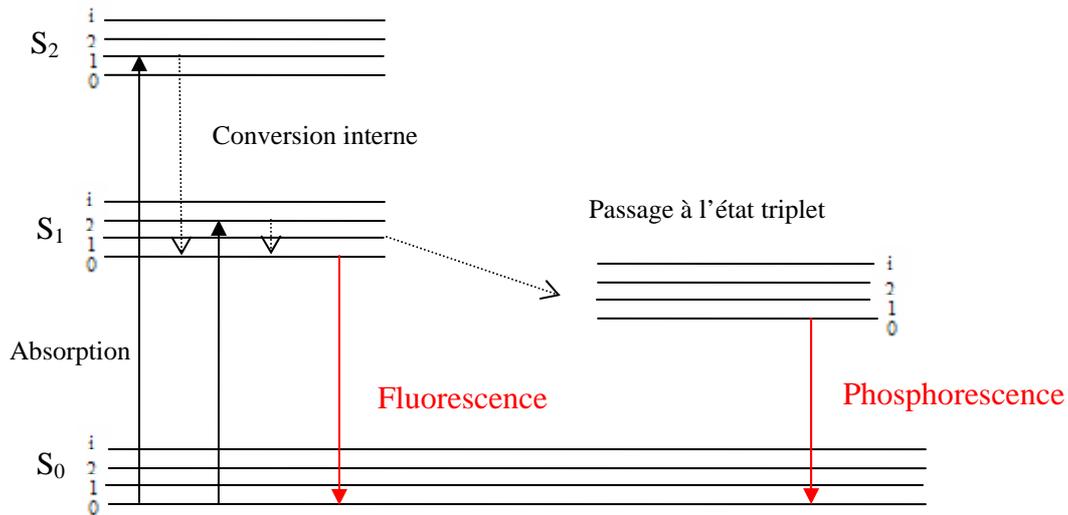


Figure 1 : Diagramme de Jablonski. S_0 , S_1 et S_2 désignent respectivement l'état fondamental singulet, le premier et le deuxième état excité. T_1 est le premier état excité triplet. Pour chacun de ces états d'énergie, plusieurs états vibrationnels 0, 1, 2, $i...$ peuvent exister.

I.2- Caractéristiques des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule

Les conversions internes qui se produisent lors de la désexcitation d'une molécule sont à l'origine de pertes d'énergies entre les photons d'excitations et les photons d'émission. Ainsi, on remarque que la longueur d'onde centrale d'émission λ_E est toujours supérieure à la longueur d'onde centrale d'absorption λ_A . Ce phénomène est appelé déplacement de Stokes [1]. Généralement le spectre d'émission de fluorescence est une image inversée du spectre d'absorption. Ces spectres doivent être considérés en terme de distribution de probabilités de transition et sont caractéristiques de la structure énergétique des molécules. Chaque molécule peut être définie par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres et qui reflètent les transitions énergétiques autorisées par le principe de Pauli.

Le déplacement de Stokes est une caractéristique importante. En effet, si ce déplacement est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres. La détection efficace du signal de fluorescence sans bruit parasite sera alors compromise. De plus, si le recouvrement entre les deux spectres est important, une réabsorption des photons de fluorescence émis peut produire et provoquer des distorsions dans le spectre d'émission.

L'effet « miroir » entre spectres d'absorption et d'émission n'est pas toujours observé : des différences entre les deux spectres peuvent révéler l'existence de plusieurs

formes de la molécule considérée, caractérisées par des longueurs d'onde d'absorption et/ou d'émission différentes.

I.3- Rendement quantique et temps de déclin de la fluorescence

Deux autres caractéristiques importantes de l'émission de fluorescence sont le rendement quantique et le temps de déclin de fluorescence. Le rendement quantique Q est défini comme le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Le temps de déclin, ou durée de vie de fluorescence, correspond à la durée de vie de l'état excité.

Suite à l'absorption d'un photon, le retour d'une molécule excitée vers son état fondamental s'effectue par une voie radiative (fluorescence) ou/et par divers processus de désexcitation non radiatifs. Ces deux types de processus sont caractérisés par une probabilité $k_0 = \tau_0^{-1}$ pour le processus d'émission de fluorescence et par une probabilité notée k_{nr} pour les processus non radiatifs.

Nous considérerons dans la suite que k_{nr} englobe les probabilités de tous les processus non radiatifs, donc prend également en compte les processus de conversion interne et de passage vers l'état triplet.

Suivant le schéma de la figure 1, suite à l'excitation au temps $t = 0$ d'une molécule par une impulsion, la fraction f^* du fluorophore qui est encore dans l'état excité au temps t est [2]

$$\frac{df^*}{dt} = -(k_0 + k_{nr})f^* \quad (I-1)$$

Cette équation conduit à une décroissance exponentielle de f^* et par conséquent à une décroissance exponentielle du nombre de photons émis.

L'intensité de fluorescence émise varie donc suivant la loi :

$$I_F(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right) \quad (I-2)$$

où $\tau_F = \frac{1}{k_0 + k_{nr}}$ est le temps de déclin ou temps de vie de fluorescence.

Le nombre de photons émis est alors :

$$N_{\text{émis}} = \int_0^{\infty} I_F(t) dt = \tau_F I_0 \quad (\text{I-3})$$

A l'instant $t = 0$, le nombre de molécules excitées est égal au nombre N_{abs} de photons absorbés. L'intensité de fluorescence est dans ce cas :

$$I_0 = k_0 N_{\text{abs}} \quad (\text{I-4})$$

Le rendement quantique est alors :

$$Q = \frac{N_{\text{émis}}}{N_{\text{abs}}} = \frac{\tau_F}{\tau_0} \quad (\text{I-5})$$

On peut constater que le rendement quantique est proche de l'unité si les processus de désexcitation non radiatifs sont lents par rapport au processus d'émission de fluorescence, soit si $k_{nr} \ll k_0$. Dans ce cas, le temps de déclin de la fluorescence est proche de la durée de vie radiative τ_0 . Tout processus qui accélère la désexcitation non radiative a pour effet de diminuer à la fois le temps de déclin de fluorescence et le rendement quantique.

Il faut par ailleurs préciser que souvent le déclin de fluorescence d'une molécule ne peut pas être décrit par le modèle simple d'exponentielle décroissante présenté ci-dessus. En effet, s'il existe plusieurs espèces moléculaires dans l'échantillon étudié, le déclin de fluorescence devient multi-exponentiel.

Nous pouvons citer que d'un point de vue expérimental, la mesure des durées de vie de fluorescence est possible par l'intermédiaire de deux méthodes d'analyse résolue en temps :

- par analyse du déclin de la fluorescence en fonction du temps suite à une excitation par une impulsion ultra brève [3]
- par analyse du déphasage entre le signal de fluorescence et l'onde lumineuse excitatrice dont l'intensité est modulée sinusoïdalement. [4]

I.4- Polarisation de la fluorescence

Les fluorophores absorbent préférentiellement les ondes lumineuses dont le champ électromagnétique est parallèle à leur dipôle d'interaction. Si les molécules étaient immobiles, leur excitation par une lumière polarisée rectilignement donnerait naissance à une radiation polarisée dans la direction du dipôle d'émission de la molécule. Cependant, étant donné le

phénomène de diffusion, et plus particulièrement la rotation des molécules, la fluorescence émise va se dépolariiser. Pour la plupart des molécules en solution, la rotation est beaucoup plus rapide (de l'ordre de la picoseconde) que le temps de déclin de fluorescence et la fluorescence émise (quelques nanosecondes) dans ce cas est totalement dépolariisée. Par contre, pour les macromolécules, comme par exemple les protéines, la rotation est plus lente et le temps de diffusion rotationnelle peut être déterminé par son degré de polarisation P ou par son anisotropie de fluorescence définis comme :

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}} \quad (I-6)$$

$$\text{et } a = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad (I-7)$$

où $I_{//}$ et I_{\perp} sont respectivement les intensités de fluorescence mesurées en sélectionnant par polariseur, la composante de polarisation parallèle ou perpendiculaire au champ électrique incident.

En effet, suite à une excitation de la fluorescence par une impulsion brève, l'anisotropie de fluorescence décline généralement de a_0 à 0 (a_0 est l'anisotropie au temps $t = 0$ soit l'anisotropie en l'absence de cause de dépolariisation). Il a été démontré que, dans le cas d'une rotation isotrope, le déclin d'anisotropie en fonction du temps s'écrit [5] :

$$a(t) = a_0 \exp(-6D_r t) \quad (I-8)$$

où D_r est la constante de diffusion rotationnelle.

I.5- Effets de l'environnement local sur la fluorescence

Les différentes caractéristiques de l'émission de fluorescence (spectre, polarisation, rendement quantique et durée de vie de fluorescence) ne constituent la signature d'une molécule que sous certaines conditions. En effet, ces paramètres dépendent fortement de l'environnement local de la molécule. Des changements plus ou moins importants peuvent se manifester sous l'effet de différents facteurs. Les plus courants d'entre eux sont le pH, la viscosité, la température, le potentiel électrique, la présence d'ions, d'oxygène ou les interactions possibles avec d'autres molécules [5]. Certaines molécules appelées sondes ou marqueurs fluorescents sont connues pour leurs affinités spécifiques pour un type de composants ou pour leur réaction à un état physico-chimique de leur environnement. Ces molécules sont grandement utilisées en biologie pour l'étude des structures et la

compréhension des métabolismes cellulaires. Les applications liées à l'analyse de la fluorescence en biologie sont extrêmement nombreuses, par exemple : mesure de pH ou de viscosité intracellulaire, localisation de canaux calciques ou potassiques, localisation des membranes et étude du potentiel électrique, état d'oxygénation...

I.6- Problèmes liés à l'excitation d'une molécule : photo-blanchiment, photo-dégradation, saturation, effets thermiques

Suite à son irradiation, une molécule à l'état excité a tendance à être plus réactive d'un point de vue chimique que dans son état fondamental [6]. Des réactions irréversibles (polymérisations, oxydations, dissociations, isomérisations, liaisons avec d'autres molécules) peuvent se produire et donner naissance à des photo-produits. Ces nouvelles espèces créées sont souvent non fluorescentes ou caractérisées par des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence différents de ceux de la molécule initiale. Ces réactions photo-chimiques se traduisent par une perte progressive de l'intensité de fluorescence émise par un échantillon. Cet effet est appelé photo-blanchiment.

Certaines espèces peuvent par ailleurs avoir une influence néfaste sur un milieu biologique vivant. C'est la photo-toxicité.

Un autre problème rencontré lors de l'excitation d'une molécule par un rayonnement intense est la saturation de l'état excité. Ce processus n'est pas nécessairement destructif pour la molécule considérée. La variation de l'intensité de fluorescence émise dans des conditions ne varie pas linéairement avec l'énergie incidente et peut ainsi conduire à des erreurs d'interprétations des résultats obtenus.

D'autre part, les effets de photo-blanchiment et de photo-dégradation sont d'autant plus importants que l'intensité incidente est élevée.

Finalement, l'excitation d'une molécule par un rayonnement intense est à l'origine d'effets thermiques. Ces échauffements sont dépendants des capacités d'absorption des molécules et sont générées lors des différents processus de conversion interne. Ils ont un effet destructif sur la molécule et son environnement. Ces effets ne peuvent être limités que par diminution de l'intensité incidente.

L'excitation de la fluorescence d'une molécule par une radiation lumineuse peut donc conduire à une dégradation progressive plus ou moins rapide des molécules absorbantes et de leur environnement local. Ces processus de photo-dégradation dépendent des densités

d'énergie incidente mais aussi des fluorophores utilisés et de la durée de l'irradiation. Les conditions d'excitation de la fluorescence sont donc à déterminer précisément de manière à s'affranchir au mieux de ces effets.

II- MICROSCOPIE CONFOCALE DE FLUORESCENCE

Au cours du siècle dernier, les méthodes d'analyse de fluorescence, alliées aux techniques de microscopie, sont devenues un moyen d'étude très puissant en biologie. La microscopie de fluorescence permet en effet la détection *in-vivo* de particules et de structures qui ne peuvent être visualisées en microscopie optique conventionnelle et révèle les processus métaboliques au sein de la cellule. Plusieurs techniques de microscopie de fluorescence, basées sur l'excitation monophotonique (dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet), ont été développées dans ce but d'exploration d'entités biologiques :

- *la microscopie de fluorescence classique par transmission :*

L'échantillon est entièrement illuminé par le faisceau excitateur. Le signal de fluorescence émis et transmis par l'échantillon est collecté par l'objectif de microscope. Cette méthode est peu utilisée en raison d'inconvénients majeurs.

Comme on collecte le signal de fluorescence transmis à travers l'échantillon, on est ici limité à l'étude d'échantillons extrêmement fins. De plus, cette technique est caractérisée par une mauvaise résolution axiale. En effet, bien que la mise au point se fasse sur un plan focal précis, l'enregistrement de l'information est entaché d'un bruit de fond considérable qui se superpose à l'image du plan observé. Ce bruit résulte entre autre de l'excitation, par la source lumineuse, de tous les fluorophores situés sur le trajet du faisceau.

- *la microscopie à épi-fluorescence :*

Dans ce type de technique, la lumière excitatrice, arrive au travers de l'objectif de microscope qui sert aussi à la collection de la fluorescence émise. Comme le mode de fonctionnement de ce type de microscope n'est plus en transmission, il est permis d'utiliser des échantillons biologiques plus épais. Néanmoins, en raison des coefficients d'absorption élevés des échantillons biologiques dans les gammes de longueurs d'onde utilisées, il n'est possible d'étudier qu'une surface d'épaisseur limitée des échantillons et les problèmes de résolution axiale, identiques à ceux de la microscopie de fluorescence classique par transmission, subsistent.

- *la microscopie confocale de fluorescence :*

Cette technique est basée sur le microscope à épi-fluorescence sur lequel est rajouté un simple trou de filtrage dans le plan conjugué du plan focal servant à bloquer tout signal ne provenant pas du plan focal. Le faisceau excitateur étant focalisé dans ce plan, seule la réponse de la tache focale n'est pas bloquée par le trou de filtrage. En raison de ses capacités de résolution

tridimensionnelle, la microscopie confocale fut à l'origine d'améliorations considérables en microscopie de fluorescence. Nous décrivons ici en détail le principe, les performances et les limitations de cette technique.

II.1- Principe

Le principe du microscope confocal a été proposé en 1957 par Minsky [7, 8], puis utilisé expérimentalement à partir de 1980 suite au développement de sources laser adaptées et aux progrès en instrumentation électronique et informatique [9-11]. Avec l'apparition des premiers modèles commerciaux en 1987, la technique s'est très vite imposée comme l'outil indispensable en biologie en permettant l'observation de structures microscopiques dans les échantillons biologiques transparents épais tels que des cultures cellulaires ou des tranches de tissus [12].

Le principe du microscope confocal est schématisé sur la figure 2.

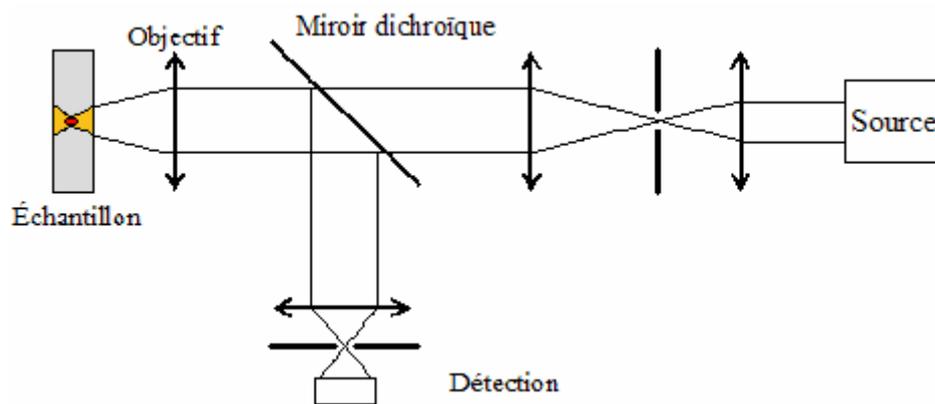


Figure 2 : Principe du microscope confocal.

Dans ce schéma, le faisceau de la source de lumière collimatée (un laser ou une lampe monochromatique par exemple) émettant généralement dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet est focalisé à travers un iris qui agit comme un filtre spatial. Le faisceau passe à travers l'iris vers l'objectif et focalise à la limite de diffraction dans l'échantillon. La fluorescence est excitée sur la quasi-totalité du trajet du faisceau dans l'échantillon. Ainsi, la fluorescence émise par les plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation constitue un signal indésirable. Afin d'éliminer la majorité de cette fluorescence parasite, un trou de filtrage est placé avant le détecteur dans le plan focal image de l'objectif de microscope. Ce trou permet ainsi d'obtenir une très bonne résolution axiale mais aussi d'améliorer les résolutions latérales. Le microscope confocal de fluorescence est ainsi caractérisé par des

capacités de résolutions tridimensionnelles qui autorisent l'imagerie détaillée d'échantillons biologiques fluorescents avec peu de bruit de fond.

II.2- Performances : résolutions spatiales

Les limites de résolutions spatiales du microscope confocal sont directement liées à la taille du trou de filtrage. Néanmoins, il sera nécessaire de trouver un bon compromis entre la résolution que l'on souhaite obtenir et la quantité de lumière atteignant le détecteur. Le diamètre optimal Φ_{\max} de ce filtre spatial est égal à la taille de l'image donnée par l'objectif du point de focalisation dans l'échantillon, soit :

$$\Phi_{\max} = \Phi_{\text{Airy}} \gamma \quad (I-9)$$

avec γ le grandissement du système optique de focalisation et Φ_{Airy} le diamètre de la tache d'Airy au foyer de l'objectif.

Dans ce cas, la limite de résolution radiale est égale à $\Phi_{\text{Airy}}/2$. Par ailleurs, cette configuration permet la détection de la totalité de l'intensité de fluorescence qui provient du point de focalisation. A titre indicatif, des valeurs limites de résolutions en microscopie confocale sont présentées dans le tableau de la figure 3.

ON	γ	Résolution radiale (μm)	Résolution axiale (μm)	Φ_{\max} (μm)
1,4	100x	0,15	0,58	43,6
1,4	63x	0,15	0,58	27,5
1,3	100x	0,16	0,67	46,9
0,75	40x	0,40	1,77	32,5

Figure 3 : Limites de résolution spatiale du microscope confocal et diamètre maximal du trou de filtrage en fonction de l'ouverture numérique ON et du grandissement γ de l'objectif utilisé. Ces valeurs ont été obtenues pour une longueur d'onde excitatrice égale à 500 nm [13].

Considérant ces propriétés, des images en deux dimensions avec de très bonnes résolutions peuvent être reconstruites point par point en translatant l'échantillon grâce à une platine de micro-déplacements ou par balayage laser. Des images en trois dimensions peuvent ensuite être générées en acquérant une série d'images dans des plans de focalisation successifs.

II.3- Limitations

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étant très proches, il est difficile de trouver un miroir dichroïque ayant une transmission maximale pour la longueur d'onde d'excitation et une réflectivité optimale pour la longueur d'onde de fluorescence, ce qui induit des pertes considérables de l'intensité de fluorescence détectée.

Des pertes supplémentaires sont dues à l'utilisation du trou de filtrage. La taille du trou doit être judicieusement choisie (diamètre proche de Φ_{\max}) et l'alignement du montage doit être parfaitement réalisé afin de minimiser ces pertes.

Le microscope confocal nécessite l'emploi d'éléments optiques spécialement conçus pour l'ultraviolet permettant à la fois une transmission optimale de la lumière excitatrice avec une limitation des aberrations et une collecte efficace de la lumière de fluorescence. Ce type d'optiques est relativement coûteux.

La fluorescence « parasite » émise par les plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation constitue une source de bruit importante malgré l'utilisation du trou de filtrage, due à la diffusion multiple.

L'intensité d'une onde électromagnétique se propageant dans un milieu absorbant décroît exponentiellement suivant la loi de Beer-Lambert : $I = I_0 \exp(-\varepsilon z)$, où I_0 est l'intensité initiale, ε le coefficient d'extinction molaire et z la distance parcourue dans le milieu. La plupart des échantillons biologiques ont des coefficients d'absorption élevés dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, ainsi la profondeur de pénétration dans des échantillons biologiques est très limitée ($< 50 \mu\text{m}$).

Le problème majeur lié à cette configuration est la dégradation très rapide des échantillons biologiques vivants sous un mode d'excitation monophotonique (photo-toxicité, phot-blanchiment, saturation, échauffement...). En effet, en raison des forts coefficients d'absorption des constituants biologiques dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, l'absorption et donc les photo-dommages ont lieu sur tout le trajet du faisceau, donc même en dehors de la zone d'étude.

III- MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE PAR EXCITATION DEUX PHOTONS

L'absorption à deux photons a été démontrée théoriquement en 1931 [14] et a été vérifié expérimentalement pour la première fois en 1961, suite à l'invention des premières sources laser impulsionnelles. L'excitation à deux photons de la fluorescence d'un cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{3+}$ [15] confirma alors le fait que différentes règles de sélection pour l'absorption à deux photons permettent d'accéder à des transitions électroniques interdites lors des processus monophotoniques [16].

Cette découverte suscita alors de nouveaux intérêts en spectroscopie notamment pour l'étude de la structure électronique des états excités des molécules et en microscopie de fluorescence.

Nous étudierons ci-après les propriétés de la fluorescence excitée grâce à ce processus. Dans ce but, nous effectuerons une comparaison entre le processus d'émission de fluorescence issue d'une excitation monophotonique et celui provoqué par une excitation à deux photons.

Dans un second temps nous verrons les caractéristiques de ce type de microscope. Enfin nous verrons les avantages de cette microscopie par rapport à la microscopie confocale de fluorescence monophotonique.

III.1- Emission de fluorescence sous excitation à deux photons

Dans le cas d'une absorption monophotonique et en absence de saturation et de photoblanchiment, le nombre de photons absorbés par unité de temps et de volume est :

$$N_{\text{abs1}} = \sigma C F \quad (\text{I-10})$$

où C est la concentration des fluorophores (en molécules/cm³), σ est la section efficace d'absorption à un photon (en cm²/molécule) et F est le flux de photons incident (photons/cm²/s).

Le flux de photons de fluorescence détectés Fl_1 (photons/cm²/s) est alors donné par [17] :

$$Fl_1 = KC \sigma QdF \quad (\text{I-11})$$

où K est une constante dépendant des conditions expérimentales (incluant l'efficacité de détection, la sensibilité du détecteur en fonction de la longueur d'onde, etc.) d est la distance sur laquelle l'échantillon absorbe (en cm) et Q est le rendement quantique de fluorescence. L'intensité de fluorescence émise varie donc ici linéairement avec l'intensité incidente.

La section efficace d'absorption à un photon est relativement élevée pour la plupart des molécules fluorescentes (de l'ordre de 10^{-17} cm²/molécule) [18]. L'excitation des molécules par un processus d'absorption monophotonique s'effectue aisément grâce à des sources continues de lumière visibles ou UV, par exemple des lasers à Argon ou des lampes à vapeur de Mercure. Des sources impulsionnelles sont aussi utilisées pour des études de fluorescence résolues en temps.

Notons qu'une molécule est plus généralement caractérisée par son coefficient d'extinction molaire ε (mole⁻¹cm⁻¹) que par sa section efficace d'absorption, les deux paramètres étant reliés par la relation suivante :

$$\sigma = 2,3\varepsilon \frac{M}{C} \quad (\text{I-12})$$

où M est le nombre total de moles contenues dans la solution étudiée.

Dans le cas d'une excitation à deux photons (EDP), il a été démontré que le nombre de photons absorbés par unité de temps et de volume variait de manière quadratique avec l'intensité incidente [17], donc :

$$N_{\text{abs2}} = \delta C F^2 \quad (\text{I-13})$$

où δ est la section efficace d'absorption à deux photons (en cm⁴.s/molécule/photon). Ce facteur est souvent exprimé en Göppert-Mayer (1GM= 10^{-50} cm⁴.s/molécule/photon). En règle générale, les colorants organiques les plus souvent utilisés se situent entre 1 et 100 GM, les protéines fluorescentes de type GFP par exemple vers 10 GM et les nano-cristaux vers 10^4 GM [18].

Le flux de photons de fluorescence détecté, Fl_2 est dans ce cas :

$$Fl_2 = KC \frac{Q}{2} \delta d F^2 \quad (\text{I-14})$$

Le rendement quantique de fluorescence est ici divisé par 2 étant donné que deux photons sont absorbés pour chaque photon émis.

Prenons par exemple les spectres d'absorption à un et à deux photons de la fluorescéine (figure 4). On constate que dans le cas de l'absorption à deux photons, le spectre est beaucoup plus étendu que dans le cas d'une absorption monophotonique, caractéristique généralement observée sur toutes les molécules étudiées jusqu'à présent [17, 19-21].

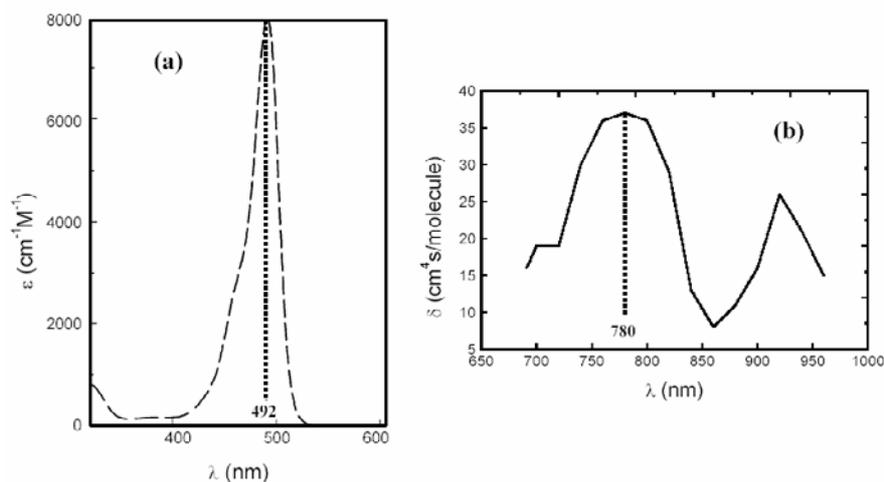


Figure 4 : a) Coefficient d'absorption monophotonique [22] ; b) Section efficace d'absorption à deux photons [20] en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour la fluorescéine dans l'eau (pH=12).

Les deux spectres révèlent par ailleurs des propriétés d'absorption de la molécule très différentes suivant le mode d'excitation, et attestent des différences existant entre les règles de sélections pour les deux types de transitions énergétiques. En particulier, la longueur d'onde correspondant à une absorption biphotonique optimale n'est pas le double de la longueur d'onde d'absorption monophotonique maximale.

A titre indicatif, les longueurs d'onde λ_{abs1} et λ_{abs2} d'absorption maximale pour les processus monophotonique et biphotonique sont présentées pour quelques molécules courantes dans le tableau de la figure 5.

	λ_{abs1} (nm)	λ_{abs2} (nm)
Cascade Blue	400	750
DAPI	350	700
Fluorescéine	492	780
Indo-1	350	700
Lucifer Yellow	430	860
Rhodamine B	545	840
Rhodamine 6G	526	795

Figure 5 : Longueurs d'onde λ_{abs1} et λ_{abs2} d'absorption maximale de fluorophores courants pour un processus monophotonique et biphotonique.

Nous n'indiquons pas dans ce tableau les valeurs des sections efficaces d'absorption biphotonique mesurées, les résultats publiés n'étant pas toujours concordants entre eux [18, 20]. Les sections efficaces d'absorption à deux photons sont généralement estimées

expérimentalement en mesurant le flux de photons de fluorescence émis en fonction du flux de photons incidents et de la longueur d'onde d'excitation. Ces mesures sont dépendantes du système expérimental et les valeurs trouvées peuvent varier en fonction de la configuration du montage (changement de sensibilité du détecteur et variation de la puissance moyenne incidente et de la durée des impulsions en fonction de la longueur d'onde, ...).

Notons que les données concernant les sections efficaces d'absorption à deux photons sont relativement rares et que la majorité des études ont été menées sur des molécules de type xanthènes (fluorescéine, rhodamine, etc.) ou coumarines.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons étant relativement faibles, certaines conditions sont à respecter afin d'obtenir une excitation optimale de la fluorescence. Considérant la relation (II-14), le flux de photons incidents doit être très élevé afin d'obtenir une bonne efficacité d'excitation de la fluorescence. L'utilisation de sources laser continues est alors possible mais il a été démontré que dans ce cas, les puissances moyennes incidentes mises en jeu devaient être très élevées (supérieures d'au moins un facteur 100 à 1000 par rapport aux puissances émises par un laser impulsif femtoseconde). L'utilisation de sources continues est donc totalement inadaptée à l'étude d'échantillons biologiques et l'excitation à deux photons de la fluorescence s'effectue généralement grâce à des sources lasers impulsives ultracourtes.

Pour des impulsions de profils temporel et spatial gaussiens, l'intensité en un point de coordonnées (x, y, z) et au temps t est donnée par la relation suivante :

$$I(x, y, z, t) = I_0 \exp\left[-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_0^2}\right] \exp\left[-\frac{2z^2}{z_0^2}\right] \exp\left[-\left(\frac{t}{\Delta\tau}\right)^2\right] \quad (\text{I-15})$$

avec w_0 le rayon du col du faisceau et $\Delta\tau$ la durée des impulsions.

Nous nous placerons pour la suite du calcul dans le plan d'intensité maximale, soit pour $z = 0$.

L'énergie par impulsion peut être exprimée de la manière suivante :

$$E = \frac{P}{f} = \iint I dS dt, \text{ avec } dS = dx dy \quad (\text{I-16})$$

où P est la puissance moyenne et f la fréquence des impulsions.

Après calcul, on a :

$$E = \pi\sqrt{\pi} I_0 \frac{w_0^2}{2} \Delta\tau \quad (\text{I-17})$$

d'où :

$$I_0 = \frac{2}{\pi\sqrt{\pi}} \frac{P}{f} \frac{1}{\Delta\tau w_0^2} \quad (\text{I-18})$$

Le flux maximal de photons incident correspond alors à :

$$F_{\max} = \frac{I_0 \lambda}{hc} = \frac{2}{\pi\sqrt{\pi}} \frac{P}{f} \frac{\lambda}{hc} \frac{1}{\Delta\tau w_0^2} \quad (\text{I-19})$$

Cette équation montre clairement que le flux de photons incidents est d'autant plus élevé que la durée des impulsions et le rayon du col du faisceau sont faibles. On utilisera donc des sources laser impulsionnelles ultracourtes dont on focalisera le rayonnement grâce à des objectifs de microscope de grande ouverture numérique. En effet, lorsqu'un faisceau laser est focalisé par une lentille, la taille minimale du point de focalisation est le diamètre ϕ_{Airy} de la tache d'Airy (limite de diffraction) :

$$\phi_{\text{Airy}} = 1,22 \frac{\lambda}{\text{ON}} \approx 2w_0 \quad (\text{I-20})$$

ON étant l'ouverture numérique.

Nous pouvons conclure que la durée des impulsions ainsi que le rayon du col du faisceau au point focal sont deux paramètres très importants pour obtenir une émission de fluorescence deux photons. En effet, d'après les équations (I-19), (I-13) et (I-14), le nombre de photons absorbés et donc le flux de fluorescence émise sont inversement proportionnels à $\Delta\tau^2$ et w_0^4 .

Il est aussi important de tenir compte que les équations (I-15), (I-16), (I-17), (I-18) et (I-20) sont valables pour toutes les techniques de microscopie non linéaire lorsqu'un faisceau laser gaussien est focalisé via un objectif de microscope.

III.2- Le microscope de fluorescence par excitation à deux photons

La microscopie de fluorescence par EDP est une technique récente. En effet, les possibilités d'imagerie de la fluorescence par excitation à deux photons ont été démontrées pour la première fois en 1990 [23] avec un laser rouge ($\lambda = 630 \text{ nm}$) impulsionnel femtoseconde à colorant fonctionnant sur le régime de blocage de modes passif. La technique s'est ensuite développée rapidement grâce à l'apparition de sources laser femtosecondes à cristaux solides, plus stables et mieux adaptées. Aujourd'hui, ces sources, couramment

commercialisées, sont compactes et simples d'utilisation d'où un développement considérable de la microscopie de fluorescence par EDP pour des applications biologiques. En effet, le microscope biphotonique, mais aussi tous les microscopes présentant des techniques non linéaires comme le microscope par génération de seconde harmonique et le microscope à génération de tierce harmonique, est caractérisé par des résolutions spatiales tridimensionnelles comparable à celle du microscope confocal mais présente des avantages que nous présenterons ci-dessous.

III.2.1- Principe

Globalement, le principe du microscope de fluorescence par EDP est similaire à celui du microscope confocal (figure 6).

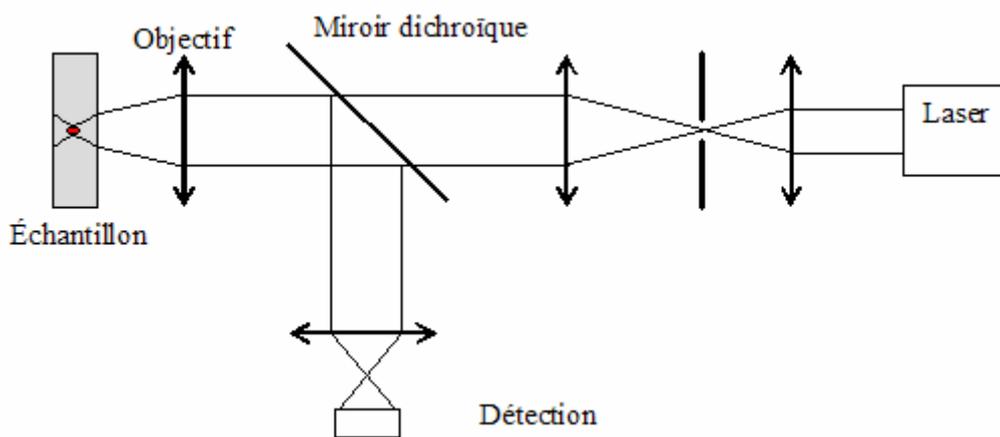


Figure 6 : Schéma de principe du microscope de fluorescence par excitation biphotonique.

Il « suffit » de remplacer le laser d'excitation visible ou UV par un laser impulsionnel femtoseconde émettant dans l'infrarouge. Étant données les faibles probabilités de transitions à deux photons et conformément à l'équation (I-11), l'émission de fluorescence n'a lieu qu'au point focal où la densité de photons est la plus élevée autrement dit, la fluorescence n'est excitée qu'au voisinage immédiat du point focal de l'objectif de microscope. Ce point est illustré sur la figure 7 : si l'excitation est linéaire (absorption monophotonique), la fluorescence est excitée sur la totalité du faisceau alors que dans le cas d'une EDP, la fluorescence est confinée en un point. Le trou de filtrage peut être ainsi supprimé. La génération du signal étant confinée au point focal, il suffit de collecter à chaque instant la totalité de la fluorescence émergeant de l'échantillon.

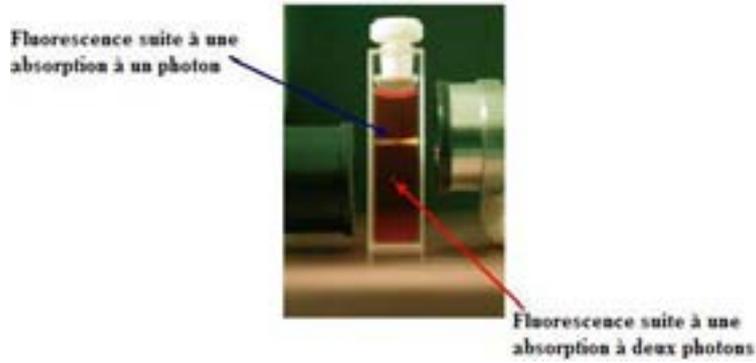


Figure 7 : Illustration du confinement de fluorescence par EDP. L'échantillon fluorescent utilisé est une solution de fluorescéine excitée à un photon par une lampe à vapeur de mercure et à deux photons par un laser Ti:Sa [24]

III.2.2- Résolutions spatiales

La propriété fondamentale du microscope de fluorescence par EDP, cette propriété qui se retrouve d'ailleurs dans toute technique de microscopie non linéaire, est sa très grande résolution spatiale dans les trois dimensions. En effet, le confinement de l'excitation au point de focalisation de l'objectif de microscope définit intrinsèquement un volume d'excitation très petit appelé voxel.

Nous rappellerons ici le résultat pour une répartition spatiale de l'intensité gaussienne au foyer d'un objectif de grande ouverture numérique ($ON > 0,8$) [25, 26]. Il a en effet été montré que, pour un faisceau couvrant entièrement la pupille d'entrée de l'objectif, l'approximation gaussienne était la plus appropriée.

Si on exprime le profil d'intensité de la manière suivante :

$$I(x, y, z) = I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_0^2}\right) \exp\left(-\frac{2z^2}{w_z^2}\right) \quad (\text{I} - 21)$$

Le volume d'excitation est alors :

$$V = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} w_0^2 w_z \quad (\text{I} - 22)$$

avec

$$\begin{cases} w_0 \approx 0,518\lambda [n \sin\alpha] \\ w_z \approx 0,76\lambda [n(1 - \cos\alpha)] \end{cases} \quad (\text{I} - 23)$$

où λ est la longueur d'onde d'excitation, n l'indice de réfraction du milieu focalisé et α le demi angle d'ouverture de l'objectif (On rappelle que $ON = n \sin\alpha$).

Pour un objectif d'ouverture numérique 1,4, les résolutions radiale et axiale seront respectivement de 0,4 μm (valeur proche de la limite de diffraction égale à 0,35 μm) et de 0,9 μm , valeurs calculées pour une longueur d'onde de 800 nm. La résolution est donc ici légèrement moins bonne que dans le cas du microscope confocal (voir tableau figure 4), en raison principalement des longueurs d'onde utilisées qui sont deux fois plus grandes qu'en excitation à un photon.

Notons que les résolutions pourraient être améliorées grâce à l'utilisation, comme dans le cas du microscope confocal, d'un trou de filtrage. En raison de problèmes d'alignement et de pertes de flux collecté, cette solution n'est que très rarement utilisée. D'autres méthodes existent dans le but d'améliorer les résolutions spatiales et plus particulièrement la résolution axiale, comme la technique 4Pi [27]. Le principe de cette technique consiste à utiliser pour l'excitation et pour la détection deux objectifs disposés de part et d'autre de l'échantillon de manière à ce que les points focaux soient parfaitement superposés. Les ondes lumineuses interfèrent donc dans la région focale donnant naissance à une modulation d'intensité. Le volume d'excitation est alors délimité par la figure d'interférences. Considérant le premier maximum de cette figure, la résolution axiale obtenue est améliorée d'un facteur quatre à cinq, cependant des maxima secondaires sont présents le long de l'axe optique définissant un volume d'excitation de géométrie complexe. De plus cette configuration nécessite des alignements très précis et contraignants et est limitée à l'étude d'échantillons fins.

Ainsi, dans la plupart des applications, on utilise la configuration simple du microscope à deux photons comme décrit dans la figure 7, les résolutions spatiales obtenues étant satisfaisantes.

III.2.3- Avantages du microscope EDP par rapport au microscope confocal

Considérant le principe de fonctionnement du microscope de fluorescence par EDP, il apparaît que la configuration et donc la mise en œuvre du système sont relativement simples étant donnée l'absence du trou de filtrage requis dans la configuration confocale. Le microscope de fluorescence biphotonique étant caractérisé par de très bonnes résolutions spatiales dans les trois dimensions, il devient une technique alternative à la microscopie confocale et offre par ailleurs des avantages supplémentaires que nous décrivons ci-dessous.

- Peu de bruit de fond : la génération de la fluorescence ne se produisant qu'au point focal puisque l'intensité par unité de surface est très forte, aucun parasite ne provient des plans inférieurs et supérieurs au plan focal. Cette propriété du microscope biphotonique autorise, grâce à l'absence de trou de filtrage, une détection de la fluorescence avec très peu de bruit de fond. Il faut cependant noter qu'à partir d'une certaine épaisseur dans l'échantillon, du bruit de fond correspondant à de la fluorescence parasite peut survenir. En effet pour pouvoir générer de la fluorescence dans de grandes profondeurs (soit au-delà de 200 μ m), il est nécessaire d'augmenter la puissance du laser afin d'avoir une intensité par unité de surface suffisante au point focal car une partie du faisceau est rétro-diffusée durant le trajet dans l'échantillon [28]. Or en augmentant trop la puissance du laser on peut, outre détériorer l'échantillon, avoir une intensité par unité de surface au cours du trajet du faisceau dans l'échantillon suffisante pour générer de la fluorescence.
- Longueurs d'onde d'excitation et d'émission bien séparées : la longueur d'onde d'émission de fluorescence suite à un processus d'excitation biphotonique est quasiment la moitié de la longueur d'onde d'excitation. Il est donc très facile, à la détection, de séparer efficacement le signal de fluorescence émis du rayonnement exciteur incident au moyen de filtres appropriés. D'autre part cette configuration permet de s'affranchir du bruit qui provient de la lumière diffusée par l'échantillon (dont la longueur d'onde est proche de celle de l'excitation). Ceci est un avantage considérable lors d'études à travers des milieux diffusants tels que des tissus.
- Amélioration de la profondeur de pénétration : les coefficients d'absorption et de diffusion de la plupart des composants biologiques sont plus faibles dans l'infrarouge que dans l'ultraviolet. Il en résulte une meilleure profondeur de pénétration du faisceau laser dans les échantillons (au moins double de celle obtenue en microscopie confocale). Cet avantage majeur a déjà été vérifié expérimentalement et exploité pour l'étude de divers échantillons épais [29,30].
- Dégradation des échantillons réduite : le principal avantage du microscope de fluorescence par EDP est la restriction des éventuels dommages au point de focalisation, due à la localisation de l'excitation. Les divers problèmes exposés au paragraphe I.6 rencontrés lors de l'excitation d'une molécule : effets thermiques, photo-blanchiment, création de photo-produits, photo-dégradation seront ainsi

limités au voxel de focalisation. Ceci constitue déjà un avantage non négligeable en comparaison de la microscopie confocale.

Cependant il reste à étudier dans quelles mesures l'EDP n'est pas localement plus destructrice en raison des très fortes densités de puissance utilisées en régime femtoseconde à haute cadence (puissance crête de l'ordre du TW/cm²). Les dommages causés suite à une EDP sont difficiles à estimer, ceux-ci dépendant de nombreux paramètres tels que la concentration et le type de fluorophore utilisé, la longueur d'onde et la densité de puissance incidente, et bien sûr le type d'échantillon étudié. Peu d'études systématiques ont été publiées dans ce contexte. Il existe tout de même quelques études quantitatives complètes des dommages induits par une excitation multiphotonique définissant les paramètres à contrôler pour des applications particulières telles que l'imagerie de fluorescence de l'activité calcique en milieu cellulaire (neurones) [31] ou les effets de l'excitation de molécules photosensibles utilisées en thérapie photodynamique sur l'ADN [32]. Afin de tenter de préciser ces effets de dommages, nous effectuerons ici une synthèse de divers résultats publiés analysant les problèmes et dégradations causées par une EDP.

Effets de saturation :

Les effets de saturation de l'état excité dépendent bien sûr de la section efficace d'absorption du fluorophore et du flux de photons incident. La première étude de microscopie de fluorescence effectuée par Denk et al. en 1990 révéla que le seuil de puissance moyenne avant saturation était d'environ 50 mW pour une molécule dont la section efficace d'absorption à deux photons était de 10⁻⁵⁰ cm⁴.s/photon/molécule (impulsions de 100 fs de durée à la cadence de 80 MHz focalisées par un objectif d'ouverture numérique 1,4). En comparaison, l'effet de saturation, suite à une excitation monophotonique, apparaît pour des puissances moyennes de même ordre de grandeur. La fréquence des impulsions est par ailleurs un paramètre important. En effet, le nombre de photons absorbés par unité de temps peut être amélioré en augmentant la fréquence mais celle-ci doit être suffisamment faible pour permettre aux molécules excitées de se relaxer entre deux impulsions consécutives. Une fréquence de 80 MHz, correspondant à un intervalle de 12,5 ns entre deux impulsions, semble bien appropriée à la plupart des molécules en solution dont la durée de vie de fluorescence est généralement inférieure à quelques nanosecondes.

La valeur du seuil de puissance moyenne avant saturation, d'environ 50 mW (flux de photons incident de 10³⁰-10³¹ photons cm².s⁻¹), a été confirmée pour une large gamme de

fluorophores lors d'études ultérieures [18-20]. Notons que les puissances employées expérimentalement pour la plupart des applications biologiques sont en général largement inférieures à ce seuil.

Effets thermiques :

Il a été démontré que pour des impulsions peu énergétiques à haute cadence (impulsions de 100 fs, 80 MHz, puissance moyenne 100 mW. ~ 1 nJ/impulsions) comparées à une excitation continue avec la même puissance moyenne, les effets thermiques générés sont généralement négligeables [33]. Nous rappelons que l'excitation biphotonique de la fluorescence peut s'effectuer en régime continu. Les puissances moyennes mises en jeu sont alors supérieures à celles utilisées en régime femtoseconde d'un facteur 10^2 à 10^3 , et sont donc inadaptées pour la plupart des applications. On constate donc ici l'importance de l'utilisation de lasers à impulsions femtosecondes pour la survie du matériel biologique.

Photo-blanchiment :

Comme dans le cas des effets de saturation, les effets de photo-blanchiment dépendent des sections efficaces d'absorption, de la densité de puissance incidente mais aussi des affinités réactionnelles des fluorophores avec les molécules environnantes. Ces effets sont donc difficiles à quantifier. Il apparaît qu'à faible intensité d'excitation, les taux de photo-blanchiment, suite à une excitation monophotonique et biphotonique, sont comparables mais ce taux peut être considérablement augmenté dans le cas biphotonique lors de l'utilisation de puissances élevées [34]. Néanmoins, considérant que les densités de puissances employées lors des études en milieu biologique vivant sont extrêmement faibles, les effets de photo-blanchiment sont généralement minimisés. Nous insisterons aussi sur le fait que le microscope confocal de fluorescence induit des effets de photo-blanchiment sur la quasi-totalité du trajet du faisceau. Une dégradation progressive de l'échantillon lors d'acquisitions dans des plans focaux successifs est ainsi induite pouvant dégrader la qualité et la fiabilité des informations obtenues. Dans le cas du microscope biphotonique, cet effet est restreint au voxel de focalisation. Il a été estimé que, pour des conditions d'excitation comparables, le nombre moyen de fluorophores dégradés dans un échantillon lors d'une série d'acquisition d'images de 10 sections en profondeur par microscopie confocale était environ égal au nombre total de fluorophores dégradés pour 100 sections en microscopie biphotonique. Ceci aura évidemment un impact considérable pour la survie des échantillons biologiques.

Viabilité des échantillons biologiques sous excitation à deux photons :

La viabilité des échantillons biologiques est la contrainte la plus importante en microscopie de fluorescence. Bien que dans le cas de la microscopie biphotonique, une réduction importante des dommages induits soit attendue, il faut garder à l'esprit que les effets engendrés dans le plan focal, sous certaines conditions, sont comparables à ceux consécutifs à une excitation monophotonique. En particulier, les effets dus à des réactions à l'état excité du fluorophore, avec la possibilité de génération de photo-produits toxiques, persistent. De plus, étant donné le manque de données concernant le processus d'absorption à deux photons, la possibilité de sections efficaces d'absorption à deux photons importantes pour certains fluorophores endogènes ne peut être exclue. Ces composants cellulaires seraient alors particulièrement susceptibles d'être endommagés.

Les photo-dommages générés en milieu cellulaires par une EDP sont difficiles à prévoir. Bien que certaines publications montrent que la viabilité des cellules peut être significativement compromise dans le cas d'une EDP [35, 36], la plupart des études révèle un avantage certain pour ce mode d'excitation. Nous citerons ici quelques exemples :

- Denk *et al.*, lors de la première expérience de microscopie par EDP en cellules vivantes (1990) constatèrent que l'exposition des cellules, contenant de l'ADN marqué, pendant quelques minutes à une radiation UV (excitation monophotonique) provenant d'une lampe à vapeur de mercure, produisait des changements morphologiques sévères. À l'inverse, suite à une EDP dans des conditions de puissances similaires, aucun changement morphologique n'était visible.
- l'étude de myocytes cardiaques marqués à l'Indo1 (marqueur du calcium) pour une application d'imagerie de l'activité calcique [37], montra que les cellules survivaient plus longtemps dans le cas d'une excitation biphotonique produisant le même taux de fluorescence au plan focal que celui généré lors d'une excitation monophotonique.

Dans tous les cas, les dommages induits par une excitation biphotonique sont proportionnels au nombre de photons absorbés donc ils dépendent du carré du flux de photons incidents sur l'échantillon. Les puissances moyennes doivent ainsi être suffisamment faibles pour minimiser les éventuelles dégradations.

Toutes ces constatations réunies, la microscopie de fluorescence par EDP est une technique particulièrement bien appropriée et peu destructive pour les études *in-vivo*. En

résumé, comparé au microscope confocal, la technique est caractérisée par une très grande simplicité de mise en œuvre, des possibilités de pénétration en profondeur dans des échantillons épais et diffusants et, sous certaines conditions d'excitation, une minimisation des photo-dommages. Depuis quelques années, cette technique est fréquemment utilisée dans les expériences d'imagerie de fluorescence en milieu biologique vivant et des systèmes commerciaux sont maintenant utilisés.

IV- MICROSCOPIE PAR GENERATION DE SECONDE HARMONIQUE

Une technique moins répandue que la fluorescence sous EDP dans la microscopie a été employée bien avant celle-ci, basée sur la génération de seconde harmonique (GSH) sur des surfaces [38, 39] ou sur des structures de tissus endogènes [40]. En raison des difficultés d'interprétation du signal, la microscopie par GSH est passée relativement inaperçue jusqu'à ces dernières années [41-43]. La découverte de marqueurs exogènes [44-46] pouvant révéler des niveaux importants de signal a permis la résurgence de la microscopie par GSH. En effet, des marqueurs bien conçus et organisés peuvent produire des niveaux de signal comparables à ceux produits via une microscopie de fluorescence sous EDP standard [47]. D'ailleurs, les résolutions spatiales fournies par la microscopie de fluorescence sous EDP et par la microscopie par GSH sont comparables, les deux modes de contraste pouvant être dérivés du même instrument.

Malgré leur similitude la GSH et la fluorescence à deux photons sont basées sur des phénomènes fondamentalement différents [48-50]. La première est reliée à une diffusion non linéaire alors que la seconde est basée sur une absorption non linéaire suivie d'une émission de fluorescence. La première technique est donc cohérente alors que la seconde ne l'est pas. Les conséquences de cette différence seront développées ci-dessous.

Nous verrons dans un premier temps le principe de la GSH au niveau moléculaire d'un point de vue classique et semi classique. A ce niveau la GSH est habituellement désignée sous le nom de diffusion Hyper-Rayleigh (DHR). Dans un second temps, la GSH pour un ensemble de molécules sera examinée. Ce cas sera traité en détail. Enfin nous décrirons la conception d'un microscope par GSH et nous verrons que sa réalisation est très simple puisqu'il suffit d'ajouter sur un microscope par fluorescence sous EDP une partie de détection adéquate sur les faisceaux transmis par l'échantillon étudié.

Cette section traitant de cette microscopie par GSH reprend les travaux réalisés par Jérôme Mertz au Laboratoire de Neurophysiologie et Nouvelles Microscopies (INSERM) à Paris.

IV.1- Génération de seconde harmonique au niveau moléculaire : diffusion Hyper-Rayleigh

Considérons la diffusion radiative d'une molécule simple isolée. Au premier ordre, la molécule peut être considérée comme un dipôle électrique simple. Son moment dipolaire peut être défini comme :

$$\boldsymbol{\mu} = q \mathbf{r} \quad (\text{I} - 24)$$

où q est la charge effective du dipôle moléculaire, et \mathbf{r} leur déplacement relatif.

Les changements dans $\boldsymbol{\mu}$ sont occasionnés par les forces appliquées aux électrons de la molécule. Nous ne considérerons ici seulement que les forces électriques du dipôle, c'est-à-dire les forces dont les énergies d'interaction sont données par :

$$W = \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E} \quad (\text{I} - 25)$$

où \mathbf{E} est le champ électrique appliqué.

Dans cette forme simpliste, la molécule doit être considérée comme une tige unidimensionnelle dans laquelle son nuage d'électrons peut se décaler vers le haut ou vers le bas.

Prenons dans un premier temps le cas où la molécule est parfaitement symétrique, c'est-à-dire que le moment dipolaire est nul au repos. Lors de l'illumination, le nuage d'électrons, représenté dans la figure 8 par un point, est sujet à une force sinusoïdale de pulsation ω suivant l'axe de la molécule. Puisque la molécule est symétrique, l'oscillation résultante du nuage d'électrons est aussi symétrique et génère une radiation à la même pulsation ω . Une telle radiation est appelée diffusion Rayleigh [51]. Elle est linéaire dans le sens où la fréquence diffusée est exactement la même que celle du faisceau de lumière incident. Dans cet exemple de molécule symétrique aucune lumière de seconde harmonique ne peut être générée.

L'asymétrie de charge peut être transmise sur une molécule en greffant les parties d'électron donneur D et accepteur A à ses extrémités, produisant un chromophore push-pull [52] puisque ces deux parties agissent en tandem pour favoriser un mouvement électronique dans la direction $D \rightarrow A$. Quand un chromophore push-pull est soumis au même champ sinusoïdal d'excitation, le mouvement électronique résultant, bien qu'encore périodique, n'est plus symétrique, comme illustré en Fig. 8b. Le mouvement électronique (ou plus précisément son accélération) contient des composantes fréquentielles supplémentaires. En plus de la composante linéaire de fréquence ω , la radiation diffusée contient aussi des composantes non linéaires aux fréquences 0 et 2ω . La composante fréquentielle 0 est appelée redressement

optique [49] et ne peut être techniquement référencée comme une radiation puisque elle représente un champ électrique statique. La composante fréquentielle 2ω est appelée diffusion hyper-Rayleigh (DHR). En règle générale, la génération de la seconde harmonique de la lumière exige une source non symétrique.

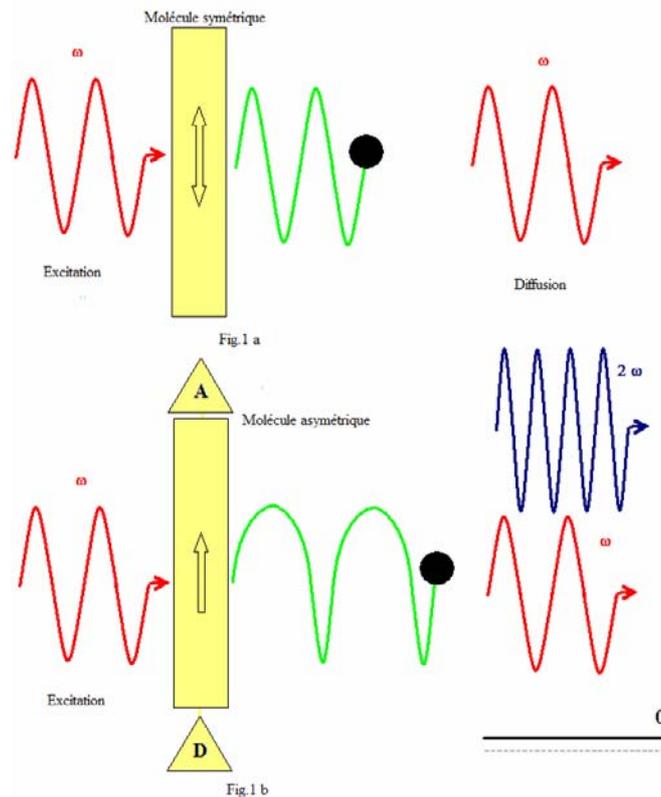


Figure 8 : a) Lorsqu'il est conduit par une lumière de fréquence ω , le mouvement électronique dans une molécule uniaxe symétrique produit une diffusion Rayleigh à la même fréquence ω b) Le mouvement électronique induit dans une molécule asymétrique produit une lumière diffusée de fréquence ω et 2ω . Cette fréquence 2ω est appelée diffusion hyper-Rayleigh (DHR).

Considérons à présent quelques aspects importants de la diffusion hyper-Rayleigh qui la distinguent de la diffusion Rayleigh ou de la fluorescence.

Prenons pour illustration deux molécules asymétriques très proches l'une de l'autre, séparées d'une distance plus petite qu'une longueur d'onde optique et orientées dans des directions parallèles (nous négligeons toute possibilité d'interactions chimiques). Quand ces molécules sont illuminées par un champ exciteur, leurs mouvements électroniques respectifs seront identiques et la DHR résultante de ces deux molécules sera en phase (voir fig.9a). En d'autres termes, l'amplitude de la DHR totale sera doublée, et la puissance de la DHR totale sera quadruplée par rapport à la puissance de la DHR pour une seule molécule.

Si les deux molécules sont orientées en sens opposé, le résultat sera très différent. Les composantes asymétriques des mouvements électroniques sont maintenant inversées l'une par

rapport à l'autre, et leurs amplitudes DHR respectives sont déphasées et s'annulent (voir fig.9b). La puissance de la DHR résultante produite pour des molécules opposées est nulle. Nous pouvons noter par ailleurs que la dépendance de la phase radiative sur l'orientation moléculaire est une propriété caractéristique de la DHR ce qui n'a pas lieu ni dans la diffusion Rayleigh ni dans la fluorescence. En effet les composantes de la diffusion Rayleigh pour deux molécules demeurent en phase qu'elles soient parallèles ou antiparallèles. De même, si les molécules sont fluorescentes alors les phases de leurs émissions de fluorescence sont aléatoires indépendamment de l'orientation moléculaire.

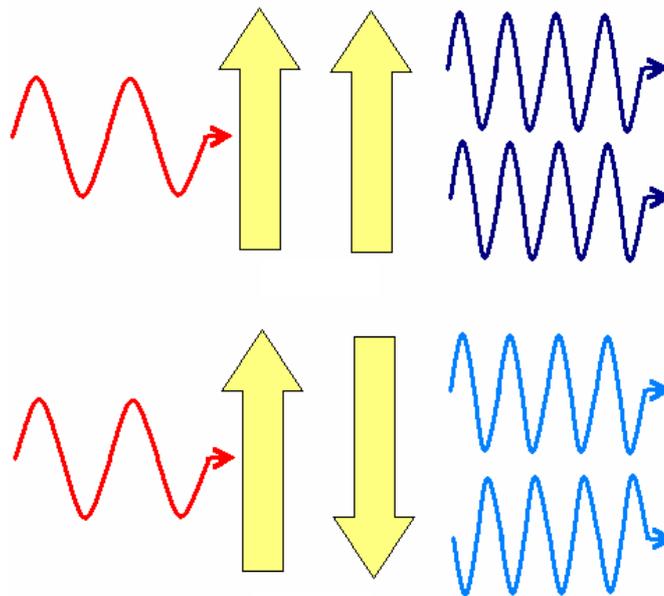


Figure 9 : Diffusion hyper-Rayleigh pour deux molécules proches. a) Si les molécules sont parallèles, leur DHR est en phase et interfère constructivement. b) Si les molécules sont antiparallèles, leurs DHRs sont en déphasage et s'annule.

IV.2- Génération de seconde harmonique pour un ensemble de molécules

En pratique, pour des applications d'imagerie, on ne s'intéresse pas à la DHR pour une ou deux molécules mais pour une population entière de molécules.

Considérons d'abord une configuration où N molécules sont en solution (figure 10a) : les orientations de ces molécules sont aléatoires et donc les contributions individuelles de DHR ont des phases indépendantes. Ces molécules produisent alors une DHR incohérente et la puissance totale de DHR générée est proportionnelle au nombre de molécules :

$$P_{\text{DHR}} \propto N \quad (\text{I} - 26)$$

Cette même loi de proportionnalité s'applique également à la fluorescence.

Nous pouvons autrement envisager une configuration où les molécules sont globalement alignées suivant la même direction, comme par exemple un cristal liquide (figure 10b). Les phases des contributions individuelles de DHR pour chaque molécule ne sont alors plus aléatoires mais sont imposées par la phase du champ d'excitation. La DHR est donc cohérente, c'est-à-dire que l'interférence joue un rôle majeur en déterminant ses propriétés globales. Quand la DHR est produite avec cohérence par un ensemble organisé de molécules, elle est appelée génération de seconde harmonique (GSH) [48], alors que le terme DHR est réservé pour la cas où les molécules ne sont pas organisées. La distinction entre la GSH et la DHR est notable. Puisque la GSH est cohérente, sa puissance totale est proportionnelle au carré du nombre de molécules radiatives :

$$P_{\text{GSH}} \propto N^2 \quad (\text{I} - 27)$$

De plus, comme la GSH est cohérente, sa distribution angulaire est fortement structurée. En général, la GSH est contrainte de se propager suivant la même direction du champ d'excitation comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.

Pour les applications en imagerie, il est donc préférable que les molécules radiatives soient organisées plutôt que désorganisées car :

- le signal généré sera beaucoup plus important pour un même nombre de molécules
- le signal peut être collecté beaucoup plus efficacement puisqu'il est unidirectionnel

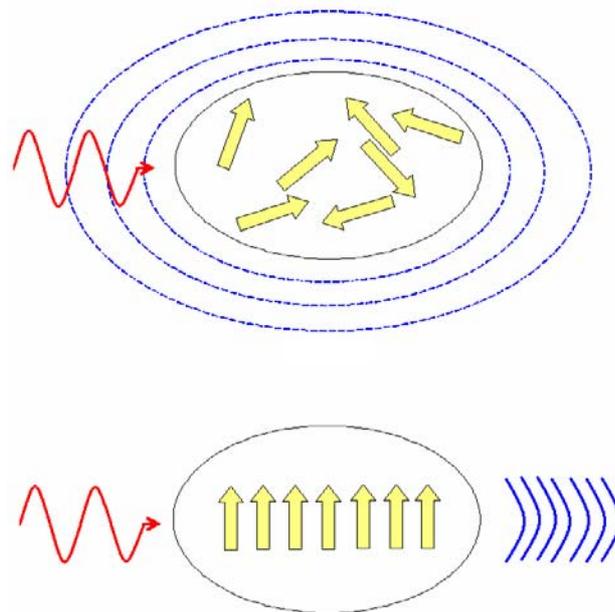


Figure 10 : Diffusion hyper-Rayleigh pour une population de N molécules. a) Les molécules orientées aléatoirement diffusent de façon incohérente et la puissance de DHR totale est proportionnelle à N . b) Les molécules alignées diffusent de façon cohérente produisant une génération de seconde harmonique dont la puissance est bien collimatée et proportionnelle à N^2 .

IV.3- Radiation GSH en microscopie

En microscopie, le faisceau laser fondamental est focalisé dans l'échantillon en un micro-volume ou voxel. Un faisceau focalisé diffère d'un faisceau collimaté en deux aspects : l'intensité du faisceau est significativement plus forte au niveau du voxel. De plus la phase n'est plus distribuée de façon homogène le long de l'axe de propagation.

Comme montré dans le paragraphe III.2 concernant le microscope de fluorescence sous EDP, le faisceau laser est focalisé dans l'échantillon, la fluorescence est produite dans un voxel de focalisation bien défini. Le confinement rigoureux de la fluorescence sous EDP dans un petit volume provient de la dépendance quadratique de l'intensité d'excitation. Puisque la GSH dépend également de cette dépendance quadratique, nous pouvons nous attendre à un volume de GSH, et par conséquent à une résolution effective permise par la microscopie GSH, comparable à celle générée dans la microscopie de fluorescence sous EDP. Cela s'avère vrai pour la quasi-totalité des cas, les voxels GSH et de fluorescence deux photons peuvent être définis identiquement [53]. Il faut cependant se rappeler dans la microscopie de fluorescence sous EDP que les échantillons ont une distribution volumique alors que dans la microscopie GSH les échantillons ont une distribution surfacique.

Spécifiquement, nous considérons une géométrie où le faisceau excitateur est focalisé avec un objectif d'ouverture numérique grande ($ON > 0,8$). Le profil d'intensité d'un tel faisceau excitateur au niveau du point focal ne peut pas être exprimé analytiquement. Il peut être approximé comme étant gaussien le long des coordonnées radiales et axiales. La surface GSH active peut alors être définie comme $(\pi/2)w_r w_z$ [25]. Cette surface active est centrée au niveau du faisceau focalisé, et chaque signal de seconde harmonique généré en dehors de cette surface peut être négligé.

Dans la GSH, la phase joue un rôle crucial et ne peut pas être négligée. Une différence fondamentale entre un faisceau collimaté et un faisceau focalisé est que la phase d'un faisceau focalisé n'est pas forcément distribuée le long de l'axe de propagation : les fronts de phase ne semblent pas se propager aussi rapidement que dans un faisceau collimaté. Intuitivement, ceci provient du fait qu'un faisceau focalisé comprend un cône d'illumination, nombre de ces fronts sont hors axe et ralentissent donc la phase axiale globale. En raison de ce retard de phase, un faisceau focalisé encourt nécessairement un net décalage de phase axial de π pendant qu'il se propage par son centre focal, par rapport à la phase correspondant à un faisceau non focalisé. Ce décalage de phase est appelé déphasage de Gouy [51]. Il est localisé près du centre focal, mais il n'est pas brusque. A l'échelle de la surface GSH active, il peut

être approximé comme variant linéairement de $\pi/2$ de son point médian. Les conséquences de ce déphasage de Gouy sont problématiques, la GSH produite par un faisceau focalisé se propage hors axe en deux lobes symétriques [53]. Ceci peut être aussi expliqué par la conservation des moments (ou accord de phase) : puisque la phase du faisceau exciteur est effectivement retardée près du point focal, alors le moment axial effectif est en conséquence diminué et s'exprime comme $k_\omega - k_{\text{Gouy}}$, où k_ω est le moment du faisceau s'il n'est pas focalisé et où k_{Gouy} est le moment induit par le déphasage de Gouy. La propagation du moment de la GSH est $k_{2\omega}$. La conservation des moments le long de la direction axiale force alors la GSH de se propager avec un angle θ comme l'illustre la figure 11 suivante.

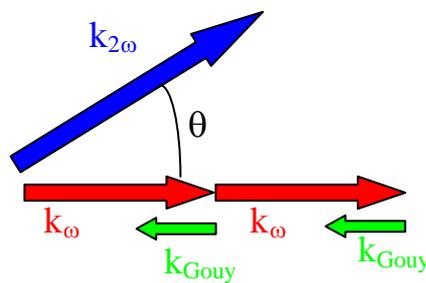


Figure 11 : Propagation du moment de la GSH pour un faisceau focalisé.

Cet angle peut être vérifié expérimentalement en plaçant une caméra en aval de l'émission de seconde harmonique et en observant les deux lobes symétriques.

IV.4 - Conception d'un microscope par GSH

L'efficacité avec laquelle une molécule peut produire de la DHR dépend de la longueur d'onde du faisceau d'excitation. Plus l'excitation est proche de la résonance, c'est-à-dire, plus l'énergie des deux photons d'excitation correspond à l'énergie de la différence entre les états fondamental et excité de la molécule, plus forte sera la probabilité de DHR. Néanmoins, une excitation proche de la résonance augmente la probabilité de fluorescence sous EDP, en supposant que la molécule soit fluorescente. En général, un signal de GSH et de fluorescence sous EDP efficace sont associés (les chromophores sont par définition fluorescents), et un microscope peut en principe bénéficier de ces deux mécanismes de contraste simultanément. Pour garantir une discrimination propre de la GSH et de fluorescence sous EDP, deux techniques peuvent être employées.

Une technique temporelle utilise le fait que la diffusion non linéaire de la lumière est essentiellement un phénomène instantané, se produisant dans le temps dans l'ordre de la

fréquence de résonance inverse soit de l'ordre de quelques femtosecondes. En revanche les durées de vie de fluorescence des molécules sont de l'ordre de quelques nanosecondes soit un millions de fois plus longues. Une porte temporelle peut alors distinguer efficacement la GSH de la fluorescence.

Une technique spectrale est beaucoup plus simple. La longueur d'onde de la GSH est rigoureusement la moitié de celle du faisceau fondamental, et la forme du signal correspond à $1/\sqrt{2}$ fois celle du faisceau fondamental. Pour la fluorescence sous EDP, la longueur d'onde et la forme du signal ne dépendent pas du faisceau d'excitation mais des molécules de colorant. Par exemple, la figure 12 ci-après représente le spectre d'émission produit par une vésicule uni-lamellaire géante uniformément marquée par le chromophore push-pull Di-6-ASPBS. Deux signaux identifiables sont apparents. Le pic le plus à gauche du spectre est le signal de GSH, centré exactement à la moitié de la longueur d'onde d'excitation (qui est de 880 nm). Le lobe de droite est signal de fluorescence sous EDP généré simultanément, centré à la longueur d'onde de l'émission de fluorescence du Di-6-ASPBS (autour de 560 nm). Si le faisceau fondamental est accordé sur une nouvelle longueur d'onde, le pic de GSH sera dépendant de cette nouvelle longueur d'onde alors que le lobe de fluorescence ne se déplacera pas.

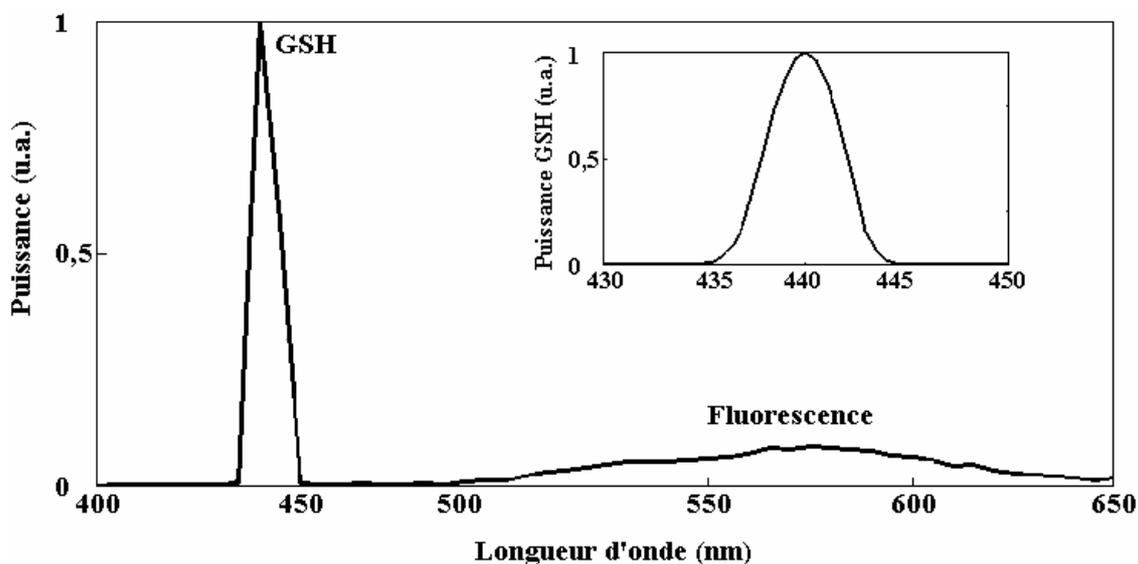


Figure 12 : Spectre d'émission obtenu pour une vésicule uni-lamellaire géante marquée par du Di-6-ASPBS excitée pour un faisceau laser à une longueur d'onde à 880 nm [47].

En essence, il y a quelques différences entre une imagerie par GSH et une imagerie de fluorescence sous EDP, et il peut apparaître intéressant de combiner ces deux techniques sur un même instrument. Comme la GSH et la fluorescence sous EDP dépendent tout les deux quadratiquement de l'intensité de l'excitation, leurs signaux résultent de leurs voxels qui ont

les mêmes dimensions. Ceci est particulièrement commode car cela signifie que les microscopies de GSH et de fluorescence sous EDP proviennent intrinsèquement des mêmes résolutions spatiales.

La figure 13 représente le principe d'un microscope combiné GSH-fluorescence sous EDP.

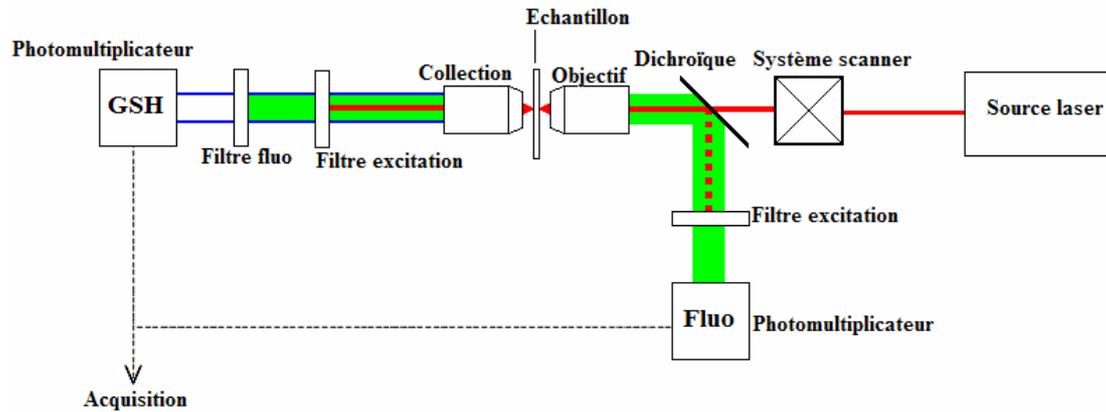


Figure 13 : principe d'un microscope combinant les techniques par GSH et de fluorescence sous EDP.

La partie GSH de ce microscope consiste au rajout à un microscope biphotonique standard d'un détecteur au niveau de la lumière transmise. Ceci apparaît simple mais quelques précautions doivent être prises. Tout d'abord, puisque le faisceau est focalisé, la GSH est principalement émise hors axe, ce qui entraîne que les optiques de collecte doivent avoir une ouverture numérique suffisamment grande pour recueillir entièrement le signal. De plus il faut disposer sur le trajet de collecte deux filtres pour bloquer le faisceau fondamental transmis ainsi que la fluorescence générée simultanément que la GSH afin de détecter uniquement la GSH.

Comme pour la microscopie biphotonique, le signal de seconde harmonique est généré dans un volume intrinsèquement confiné, qui est totalement défini par sa résolution dans les trois dimensions de l'espace.

Enfin, l'ajout d'une imagerie par GSH sur un microscope standard de fluorescence sous EDP ne limite pas l'imagerie par cette dernière. Les deux mécanismes de contraste ont les mêmes résolutions spatiales et des niveaux de signal comparables et peuvent donc fonctionner avec une taille d'image et un temps d'acquisition identiques.

V- TECHNIQUES D'IMAGERIE EN MICROSCOPIE

Nous effectuons ici une comparaison des différentes techniques d'imagerie existantes adaptées à la microscopie confocale ou à la microscopie non linéaire en terme de rapidité d'acquisition des images. La vitesse d'acquisition d'images est un paramètre important pour l'étude d'échantillons biologiques vivants : en effet, beaucoup de paramètres internes de la cellule tels que le potentiel membranaire, les concentrations calciques, etc., varient dans des échelles de temps allant de la milliseconde à la seconde. L'étude de ces signaux nécessite donc des acquisitions les plus rapides possibles. Par ailleurs, la limitation des effets de dégradation implique un temps d'irradiation des échantillons le plus court possible. En ce sens, les techniques d'acquisition d'images en microscopie tentent de se développer de plus en plus afin d'atteindre des vitesses proches de la cadence vidéo voire encore plus rapide. Nous évoquerons ici les techniques les plus courantes ainsi que les dernières innovations.

V.1- Utilisation d'une platine de translation

La première possibilité d'imagerie est l'utilisation de platines de translation à micro-déplacements utilisant des moteurs pas à pas. Le système optique d'excitation est alors fixe, et pour chaque déplacement de l'échantillon par la platine, le signal généré (fluorescence, seconde ou tierce harmonique, etc.) est collecté généralement par un photomultiplicateur. L'image est ensuite reconstruite point par point. Cette technique a l'avantage d'être très facile à mettre en œuvre. De plus, les platines de translation offrent des possibilités de déplacements fins et précis (incrément de 100 nm environ). Cependant, certains problèmes peuvent se poser comme le mouvement des échantillons suite aux déplacements de la platine.

Par ailleurs, cette méthode d'imagerie, bien que très précise, est relativement lente et le temps d'acquisition d'une image en deux dimensions (évidemment en fonction de la taille de l'image voulue, les incréments utilisés et l'efficacité de détection) varie typiquement de quelques dizaines de secondes à plusieurs minutes.

V.2- Imagerie par balayage laser

La technique la plus couramment utilisée pour l'acquisition d'images est le balayage laser de l'échantillon point à point au moyen de miroirs galvanométriques. Le système est basé sur l'utilisation d'un système optique télécentrique et de deux miroirs perpendiculaires entre eux dont la rotation induit une déviation dans le trajet du faisceau laser incident. En contrôlant l'angle de déflexion de ces deux miroirs, l'angle d'incidence sur l'objectif de microscope varie et le point de focalisation dans l'échantillon se déplace progressivement, permettant un balayage de la zone d'intérêt. Ces systèmes sont caractérisés par des possibilités de rotations rapides (de 500 Hz à plusieurs kHz) et des angles de déflexion minimaux très faibles (quelques μrad), permettant l'acquisition rapide d'images sans pertes de résolution spatiale. La taille des images et la durée des acquisitions sont par ailleurs définies par l'utilisateur par le contrôle de l'angle de déflexion maximal à appliquer et de la vitesse de balayage. Finalement, la durée d'acquisition d'une image par balayage laser est typiquement de l'ordre de la seconde pour une taille d'image de 512 x 512 pixels [54].

Notons que le microscope confocal de fluorescence à balayage laser requiert une configuration optique spécifique et un alignement précis en raison de l'utilisation du trou de filtrage à la détection. Ces difficultés sont partiellement éliminées dans le cas des microscopes non linéaires biphotonique, de génération de seconde et tierce harmonique.

V.3- Dernières innovations en imagerie

De nouvelles techniques de balayage permettant des temps d'acquisition plus rapides ont fait leur apparition récemment. Nous pouvons citer par exemple le système « TriM Scope » développé par la société LaVision BioTec GmbH [55]. Ce système est basé sur un multiplexeur du faisceau fondamental pour former jusqu'à 64 faisceaux sur une même ligne au niveau des miroirs galvanométriques. Ainsi la déflexion des miroirs ne se fait plus sur un mais sur 64 faisceaux. En conséquence le temps d'acquisition est jusqu'à 64 fois plus rapide qu'avec un système galvanométrique point par point.

Une autre technique développée est le balayage d'une ligne du faisceau fondamental. Cette technique est proposée par la société Zeiss dans le système LSM 5 LIVE [56]. Pour illustrer cette technique, prenons l'exemple d'une image de 512 x 512 pixels à réaliser. Le système configure le faisceau fondamental en amont du système de balayage de sorte que ce

faisceau devienne cylindrique suivant l'axe horizontal et que sa taille corresponde sur l'échantillon à une taille de 512 pixels. Le système de balayage, constitué uniquement d'un miroir galvanométrique ultrarapide, défléchit cette ligne suivant l'axe vertical en 512 pixels. On peut ainsi comprendre que le temps d'acquisition sera extrêmement rapide puisque pour une telle taille de 512 x 512 pixels, la vitesse de balayage serait, d'après la documentation proposée, supérieure à 120 images par seconde. La limitation d'une telle technique est une moins bonne résolution que par le balayage point par point puisque la focalisation d'un faisceau cylindrique est moins bonne qu'avec un faisceau parfaitement rond [57].

CONCLUSION

Les techniques de microscopie optique présentées dans ce chapitre sont la microscopie confocale de fluorescence, la microscopie de fluorescence sous excitation deux photons (EDP) et la microscopie par génération de seconde harmonique (GSH). Les deux premières techniques de microscopie sont à ce jour utilisées de façon routinière dans les laboratoires et nombre d'appareils découlant de ces techniques sont commercialisées.

Si nous récapitulons les performances de chaque technique, nous avons pu voir que la microscopie confocale présente une meilleure résolution optique que les deux autres techniques. Néanmoins, elle est limitée par un bruit de fond supérieur, des longueurs d'onde d'excitation et d'émission très, voire trop, proches pour une séparation efficace de l'excitation et de l'émission, une moins bonne profondeur de pénétration et un plus grand risque de dégradation des échantillons par rapport aux techniques de fluorescence sous excitation deux photons et par génération de seconde harmonique.

D'un point de vue acquisition d'images, il est possible maintenant d'effectuer jusqu'à 100 images de 512 x 512 pixels par seconde. Pour réaliser cela, la technique de balayage pixel par pixel est délaissée pour des techniques de balayage par ligne ou en utilisant des systèmes de réseaux. Elles permettent de visualiser des processus biologiques rapides mais au détriment de la résolution.

En complémentarité à ces techniques de microscopies linéaires et non linéaires, de nouvelles techniques de microscopie non linéaires sont développées. Elles présentent les mêmes propriétés que la microscopie de fluorescence sous EDP et la microscopie par GSH c'est-à-dire linéaires. Leurs mécanismes de contraste sont basés sur les propriétés non linéaires de l'échantillon et non plus sur un agent extérieur comme les fluorophores et les chromophores. Ces microscopies seront étudiées dans les chapitres suivants.

L'émergence de ces nouvelles microscopies non linéaires permet d'avoir une nouvelle vision et une nouvelle compréhension de phénomènes biologiques et une nouvelle compréhension des propriétés non linéaires dans la science des matériaux.

Il faut cependant dire que la microscopie confocale, qui est de loin la technique de microscopie optique la plus utilisée aujourd'hui, est suffisante pour certaines applications biologiques qui ne nécessitent pas une acquisition d'images rapide ni une grande profondeur de pénétration.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J.R. Lakowicz, « Introduction to Fluorescence », *Principle of Fluorescence*, *Plenum Press*, New-York, Chap.1, pp.3-15 (1983)
- [2] J. Janin, « Déclin de fluorescence », *Méthodes biophysiques pour l'étude de macromolécules*, *Hermann*, pp. 169-170 (1985)
- [3] T. French, « The development of fluorescence lifetime imaging and an application in immunology », *Thesis University of Illinois at Urbana-Champaign* (1996)
- [4] A. Draajer, R. Sanders and H.C. Gerritsen, « Fluorescence lifetime imaging, a next tool in confocal microscopy », *Handbook of biological confocal microscopy*, Ed. *Plenum Press*, New-York and London, pp. 491-505 (1995)
- [5] B. Valeur, « Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters », *Molecular Luminescence Spectroscopy Part 3, Chemical Analysis Series Vol.77*, *John Wileys & Sons*, chap.2, pp.25-84 (1993)
- [6] F.W.D. Rost, « Fluorescence: physics and chemistry », *Fluorescence microscopy Vol.1*, *Cambridge University Press*, pp.11-35 (1992)
- [7] M. Minsky, « Microscopy apparatus », U.S. Patent 3013467 (1957)
- [8] M. Minsky, « Memoir on inventing the confocal scanning microscope », *Scanning*, vol.10, pp. 128-138 (1988)
- [9] P. Davidovits and M.D. Egger, « Scanning laser microscope », *Nature* **223**, 831 (1969)
- [10] G.J. Brakenhoff, P. Blom and P. Barends, « Confocal scanning light microscope with high aperture immersion lenses », *Jorn. Micro.***117**, Pt.2, pp.219-232 (1979)
- [11] T. Wilson and C.J.R. Sheppard, « Scanning Optical Microscopy », *Academic Press* (1984)
- [12] M. Terasaky and M.E. Dailey, « Confocal microscopy in living cells », *Handbook of biological confocal microscopy*, Ed. *Plenum Press*, New-York and London, pp.327-346 (1995)
- [13] H.E.K. Stelzer, « The intermediate optical system of laser-scanning confocal microscopy », *Handbook of biological confocal microscopy*, Ed. *Plenum Press*, New York and London, pp.139-154 (1995)
- [14] M. Göpper-Mayer, « Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen », *Ann. Phys.*9, pp.273-295 (1931)

- [15] W. Kaiser and C.G.B. Garrett, « Two-photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ », *Phys. Rev. Letters* **7**, pp.229-231 (1961)
- [16] W.M. McClain and R.A. Harris, « Two-photon molecular spectroscopy in liquids and gases», *Excited States, Academic Press, New-York*, pp.1-56 (1977)
- [17] A. Fischer, C. Cremer and E.H.K. Stelzer, « Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a titanium-sapphire laser », *Applied Optics* **34**, n°12, pp.1989-2003 (1995)
- [18] C. Xu and W.W. Webb, « Measurement of two-photon excitation cross-sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm », *JOSA B* **13**, n°3, pp.481-491 (1996)
- [19] C. Xu, W. Zipfel, J.B. Shear, R.M. Williams and W.W. Webb, « Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear spectroscopy », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10763-10768 (1996)
- [20] M.A. Albota, C. Xu and W.W. Webb, « Two-photon fluorescence excitation cross-section of biomolecular probes from 690 to 960 nm», *Applied Optics* **37**, n°31, pp.7352-7356 (1998)
- [21] M.A. Albota, D. Beljonne, J. Bredas, J. E. Ehrlich, J. Fu, A.A. Heikal, S.E. Hess, T. Kogej, M.D. Levin, S.R Marder, D. McCord-Maughon, J.W. Perry, Y. Röckel, M. Rumi, G. Subramaniam, W.W. Webb, X. Wu and C. Xu, « Design of organic molecules with large two-photon absorption cross section », *Science* **281**, pp. 1653-1656 (1998)
- [22] M.M. Martin and L. Lindquist, « the pH dependence of fluorescein fluorescence », *Journal of Luminescence* **10**, pp. 381-390 (1975)
- [23] W. Denk, J.H. Strickler and W.W. Webb, « Two-photon laser scanning fluorescence microscopy », *Science* **248**, pp.73-76 (1990)
- [25] J. Mertz, « Molecular photodynamics involved in multiphoton excitation fluorescence microscopy », *European Physical Journal D* **3**, pp. 53-66 (1998)
- [26] J. Squier and M. Müller, « High resolution non linear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging », *Rev. Sci. Instrum.*, vol **72**, n° 7 (2001)
- [27] S. Lindek, E.H.K. Stelzer and S.W. Hell, « Two-new high resolution confocal fluorescence microscopies (4Pi, Theta) with one and two-photon excitation », *Handbook of biological confocal microscopy, Ed. Plenum Press, New York and London*, pp.417-430 (1995)
- [28] V.R. Daria, C. Saloma and S. Kawata, « Excitation with a focused, pulsed optical beam in scattering media:diffraction effects », *Applied Optics*, vol. **39**, n°28, pp. 5244-5255 (2000)

- [29] V.E. Centonze and J.G. White, « Multiphoton excitation provides optical sections from deeper scattering specimens than confocal imaging », *Biophysical Journal* **75**, pp. 2015-2024 (1998)
- [30] J.M. Vroom, K.J. De Grauw, H.C. Gerritsen, D.J. Bradshaw, P.D. Marsch G.K. Watson, J.J Birmingham and C. Allison, « Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy », *Applied and Environmental Microbiology* **65**, pp. 3502-3511 (1999)
- [31] H.J. Koester, D. Baur, R. Uhl and S.W. Hell, « Ca²⁺ fluorescence imaging with pico and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage », *Biophysical Journal* **77**, pp. 2226-2236 (1999)
- [32] V. Shafirovich, A. Dourandin, N.P. Luneva, C. Singh, F. Kirigin and N.E. Geacintov, « Multiphoton near-infrared femtosecond laser pulse induced DNA damage with and without the photosensitizer proflavine », *Photochemistry and Photobiology* **69**, pp. 265-274 (1999)
- [33] W. Denk, D.W. Piston and W.W. Webb, « Two-photon molecular excitation in laser scanning microscopy », *Handbook of biological confocal microscopy*, Ed. *Plenum Press*, New York and London, pp.445-458 (1995)
- [34] G.H. Patterson and D.W. Piston, « Photobleaching in two-photon excitation microscopy », *Biophysical Journal* **78**, pp.2159-2162 (2000)
- [35] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti and W.W. Webb, « Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one and two-photon excitation », *Biophysical Journal* **77**, pp. 2251-2265 (1999)
- [36] J.A. Risdale and W.W. Webb, « The viability of culture cells under two-photon laser scanning microscopy », *Biophysical Journal* **63**, pp. 109-112 (1993)
- [37] D.W. Piston, M.S. Kirby, H. Cheng, W.J. Lederer and W.W. Webb, « Two-photon excitation of fluorescence imaging of three-dimensional calcium-ion activity », *Applied Optics* **33**, pp. 662-669 (1994)
- [38] R. Hellwarth and P. Christensen, « Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe », *Opt. Commun.*, vol. 12, pp. 328-322 (1974)
- [39] C.J.R. Sheppard, R. Kompfer, J. Gannaway and D. Walsh, « Second harmonic optical microscope», *IEEE J. Quantum Electron.*, vol.13E, pp. 100D (1977)
- [40] S. Roth and I. Freund, « Second harmonic generation in collagen », *J. Chem. Phys.*, vol. 70, pp. 1637-1643 (1979)

- [41] Y. Guo, P.P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin and R.R. Alfano, « Second-harmonic tomography of tissues», *Optics Letters*, vol. 22, Issue 17, p. 1323 (1997)
- [42] P.J. Campagnola, M. Wei, A. Lewis and L.M. Loew, « High-Resolution Nonlinear Optical Imaging of Live Cells by Second Harmonic Generation », *Biophys. J.*, vol. 77, pp. 3341-3349 (1999)
- [43] L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M. Blanchard-Desce and J. Mertz, « Coherent Scattering in Multi-Harmonic Light Microscopy », *Biophys. J.*, vol. 80, pp. 1568-1574 (2001)
- [44] D.S. Chemla and J. Zyss, « Nonlinear Optical Properties of Organic Molecules and Crystals », *Academic Press*, Vol.1, New-York (1984)
- [45] P.N. Prasad and D.J. Williams, « Introduction to nonlinear optical effects in molecules and polymers », *Wiley*, New-York (1991)
- [46] S. R. Marder, B. Kippelen, A.K.Y. Jen and N. Peyghambarian, « Design and synthesis of chromophores and polymers for electro-optic and photorefractive applications », *Science* **388**, pp. 845-851 (1997)
- [47] L. Moreaux, O. Sandre, M. Blanchard-Desce and J. Mertz, « Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy», *Optics Letters*, vol. 25, Issue 5, p. 320 (2000)
- [48] N. Bloembergen, « Nonlinear Optics », *Advanced Book Classics*
- [49] P.N. Butcher, D. Cotter, « The elements of Nonlinear Optics », *Cambridge University Press* (1990)
- [50] R.W. Boyd, « Nonlinear Optics », *Academic Press* (1992)
- [51] Born and Wolf, « Principles of Optics », *Pergamon Press*
- [52] W. Liptay, « Excited States », vol.1, *Academic Press*, New-York (1974)
- [53] L. Moreaux, O. Sandre and J. Mertz, « Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy », *JOSA B* **17**, pp. 1685-1694 (2000)
- [54] A.C. Bliton and J.D. Lechleiter, « Features of commercial UV-confocal microscope », *Handbook of biological confocal microscopy*, *Ed. Plenum Press*, New York and London, pp.438-442 (1995)
- [55] D. Oron and Y. Silberberg, « Third-harmonic generation with cylindrical Gaussian beams », *JOSA B* **21**, pp.1964-1968 (2004)

Liens Internet :

[24] Laboratory of Molecular Biology in Medical Research Council, University of Cambridge, U.K.: http://www2.mrc-lmb.ac.uk/SS/Amos_B

[55] Société LaVision Biotec GmbH : www.LaVisionBioTec.com

[56] Société Zeiss : www.zeiss.com

CHAPITRE II

Propagation d'une impulsion lumineuse dans un milieu matériel

INTRODUCTION

Nous allons nous intéresser dans ce chapitre à l'interaction d'un champ électrique avec la matière. Cette interaction est due à la force de Lorentz : les charges positives (ions, noyaux) constituant la matière se déplacent sous l'action de cette force dans le sens du champ électrique appliqué alors que les charges négatives (électrons) se déplacent dans le sens inverse. Dans les diélectriques, les charges qui les constituent ne sont pas libres mais liées. Ces liaisons possèdent une certaine élasticité, et ainsi l'application d'un champ électrique crée des dipôles dans le matériau. Le champ \mathbf{E} induit donc des dipôles et polarise la lumière. La relation reliant la polarisation au champ s'écrit dans l'espace des fréquences:

$$\mathbf{P}(\omega) = \chi(\omega)\mathbf{E}(\omega) \quad (\text{II}-1)$$

où $\chi(\omega)$ représente la susceptibilité électrique du milieu. Ces dipôles vont se mettre à osciller à la fréquence d'excitation, dans le cas des ondes lumineuses entre 10^{14} et 10^{17} Hz, ainsi qu'émettre un champ électrique de même fréquence.

Si nous supposons maintenant que l'onde lumineuse est assez intense pour avoir un champ électrique non négligeable face au champ atomique, alors les charges du milieu vont avoir tendance à s'écarter de plus en plus de leur position d'équilibre. On peut décrire simplement ce phénomène par un modèle où l'électron est relié à une masse fixe par l'intermédiaire d'un ressort [1]. Quand on tire modérément et périodiquement sur ce ressort (on applique un champ électrique), l'allongement de ce dernier est proportionnel à la force appliquée (le moment dipolaire est proportionnel au champ électrique) : la réponse du milieu est linéaire. Mais si on tire trop fort sur le ressort, la relation reliant l'allongement de celui-ci

avec la force appliquée devient non linéaire. Dans ces conditions, la relation reliant l'allongement à la force peut être développée en puissances de la force. De la même façon la polarisation peut être développée en puissances du champ électrique :

$$P_i = \epsilon_0 \left[\chi_{ij}^{(1)} E_j + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l + \dots \right] \quad (\text{II} - 2)$$

Au cours de ce chapitre, nous allons étudier tout d'abord la polarisation non linéaire d'un milieu et en particulier sa relation avec le champ électrique. La propagation des impulsions lumineuses dans un milieu est ensuite décrite à partir des équations de Maxwell dans lesquelles le terme source est la polarisation non linéaire. Les principaux effets non linéaires relatifs à nos expériences sont exposés dans paragraphe II. [2-5]. Enfin les phénomènes entraînant des limitations dans la microscopie cohérente non linéaire sont présentés.

I- FORMALISME DE L'OPTIQUE NON LINEAIRE

I.1- Relations entre le champ électrique et la polarisation

La polarisation non linéaire peut s'écrire dans deux espaces, l'espace temporel qui est plus aisé à appréhender physiquement et l'espace des fréquences. La transformée de Fourier permet de passer de l'un à l'autre des espaces :

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt \quad (\text{II} - 3)$$

$$f(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} F(\omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (\text{II} - 4)$$

Dans l'espace temporel, la polarisation s'écrit sous la forme :

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{P}_{\text{linéaire}}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{P}_{\text{non linéaire}}(\mathbf{r}, t) \quad (\text{II} - 5)$$

La polarisation linéaire la plus générale est décrite par la relation suivante :

$$\mathbf{P}_{\text{linéaire}}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 \int_{\mathbb{R}^3} \int_{-\infty}^{+\infty} \overline{\mathbf{R}^{(1)}}(\mathbf{r}_1, t_1) \mathbf{E}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_1, t - t_1) dt_1 d\mathbf{r}_1 \quad (\text{II} - 6)$$

où ϵ_0 est la permittivité diélectrique du vide et $\overline{\mathbf{R}^{(1)}}(\mathbf{r}, t)$, tenseur d'ordre deux, est la fonction réponse linéaire du matériau. Cette relation, assez complexe, exprime que le milieu peut avoir un certain temps de réponse au champ appliqué et que cette réponse dépend non seulement du champ local mais également des entités alentours [6]. En général la non localité spatiale est négligée et l'on admet que la polarisation en un point ne dépend que du champ électrique en ce point. Ainsi si on tient compte de cette approximation, le premier terme de la polarisation non linéaire d'ordre deux s'écrit :

$$\mathbf{P}_{\text{NL}}^{(2)}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \overline{\mathbf{R}^{(2)}}(t_1, t_2) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t - t_2) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t - t_2 - t_1) dt_1 dt_2 \quad (\text{II} - 7)$$

De même pour les ordres suivants :

$$\mathbf{P}_{\text{NL}}^{(3)}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \overline{\mathbf{R}^{(3)}}(t_1, t_2, t_3) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t - t_3) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t - t_3 - t_2) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t - t_3 - t_2 - t_1) dt_1 dt_2 dt_3 \quad (\text{II} - 8)$$

$$\mathbf{P}_{\text{NL}}^{(n)}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \overline{\mathbf{K}} \int_{-\infty}^{+\infty} \mathbf{R}^{(n)}(t_1, t_2, \dots, t_n) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t - t_n) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t - t_n - t_{n-1}) \dots \mathbf{E}(\mathbf{r}, t - t_n - t_{n-1} - t_{n-2} - \dots - t_1) dt_1 dt_2 \dots dt_n \quad (\text{II} - 9)$$

Nous ne développerons pas la polarisation non linéaire au-delà de l'ordre trois, les ordres suivants pouvant être négligés avec les puissances crêtes des lasers utilisés. Les écritures générales des polarisations non linéaires précédentes ne sont pas limitées par l'approximation dipolaire et sont valables pour des réponses résonantes et non résonantes de la matière. L'interaction de la matière avec le champ électrique est gouvernée par les absorptions successives des photons qui peuvent avoir lieu à des temps différents. Les temps t_i dans les expressions précédentes représentent les intervalles de temps séparant des processus d'absorption. C'est pourquoi la fonction réponse du milieu s'exprime en fonction de ces intervalles de temps t_i alors que les champs électriques s'expriment en des temps donnés, c'est-à-dire des différences d'intervalles $t - t_i$.

Le calcul théorique de la polarisation non linéaire peut faire l'objet d'un traitement numérique [7], mais l'expression est trop difficile à manier analytiquement en particulier à cause de l'impossibilité d'obtenir une relation de convolution dans l'espace de Fourier. Une première simplification est réalisable à l'aide de l'écriture locale spatialement suivante :

$$\mathbf{P}_{\text{NL}}^{(3)}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \overline{\mathbf{R}}^{(3)}(t - \tau_1, t - \tau_2, t - \tau_3) \mathbf{E}(\mathbf{r}, \tau_1) \mathbf{E}(\mathbf{r}, \tau_2) \mathbf{E}(\mathbf{r}, \tau_3) d\tau_1 d\tau_2 d\tau_3 \quad (\text{II} - 10)$$

Cette relation présente une commutation sur les différents instants où est effectuée l'interaction entre le milieu et le champ, ce qui limite une écriture plus rigoureuse dans laquelle les temps sont ordonnés. Elle paraît donc intuitivement moins sensible à l'historique des absorptions, ce qui traduit davantage une situation hors résonance.

Cette relation est encore trop difficile pour une utilisation pratique, et il est courant d'utiliser une expression correspondant au cas particulier d'un processus stationnaire par rapport à la durée de l'excitation. En effet, lorsque les processus en jeu sont exclusivement électroniques, les temps de réponse sont considérés trop brefs par rapport aux durées des impulsions, même dans le domaine femtoseconde, et l'on utilise dans l'expression de la fonction réponse un triple produit de distribution de Dirac, ce qui conduit à :

$$\mathbf{P}_{\text{NL}}^{(3)}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \overline{\chi}^{(3)} \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \quad (\text{II} - 11)$$

Cette approximation est assez bien vérifiée dans la plupart des matériaux loin des résonances et l'essentiel des processus non linéaires d'ordre trois est étudié dans ce cadre. En

présence d'effets non linéaires plus lents, associés à l'organisation structurale des atomes d'une molécule sous un champ électrique, on utilise l'approximation de Born-Oppenheimer. Celle-ci consiste à découpler l'effet du champ sur la matière en deux processus [8] dont les temps de réponse sont distincts :

- Les processus électroniques très rapides évoqués précédemment. Ils sont dus à la distorsion du nuage électronique sous l'effet du champ électrique et du potentiel créé par le squelette moléculaire figé.
- Les processus nucléaires (Raman) sont dus aux vibrations et aux rotations des molécules. Leurs lentes mobilités par rapport aux mouvements électroniques induisent des temps de réponse qui peuvent être beaucoup plus longs (entre 100 fs et quelques nanosecondes)
- Les processus électrostrictifs (Brillouin) sont dus aux propagations d'ondes acoustiques induites par le faisceau laser dans le matériau. Les temps de réponses de ces effets sont typiques du temps de parcours d'une onde acoustique dans un matériau, c'est-à-dire de l'ordre de la nanoseconde.

Dans ces conditions, l'expression de la polarisation non linéaire à l'ordre trois donnée par R. W. Hellwarth [8]:

$$\mathbf{P}_{NL}^{(3)}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \int_{-\infty}^{+\infty} d^{(3)}(t-t_1) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_1) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_1) dt_1 \quad (\text{II-12})$$

I.2- Les équations de Maxwell

Les équations de Maxwell [9] s'écrivent dans un milieu matériel :

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad \nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} \quad (\text{II-13})$$

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho \quad \nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (\text{II-14})$$

avec

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad \mathbf{H} = \frac{1}{\mu_0} \mathbf{B} - \mathbf{M} \quad \mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} \quad (\text{II-15})$$

Les différents vecteurs sont connus sous les noms de déplacement électrique \mathbf{D} , champ magnétique \mathbf{B} , densité de moment magnétique ou aimantation \mathbf{M} , densité de moment électrique ou polarisation \mathbf{P} . Pour un milieu sans charge ni courant, et des tailles de faisceaux

plus importantes que la longueur d'onde il est possible d'obtenir l'équation de propagation du champ électrique dans l'espace de Fourier :

$$\Delta \tilde{\mathbf{E}}(\mathbf{r}, \omega) + \varepsilon(\omega) \frac{\omega^2}{c^2} \tilde{\mathbf{E}}(\mathbf{r}, \omega) = -\mu_0 \omega^2 \tilde{\mathbf{P}}_{\text{NL}}^{(3)}(\mathbf{r}, \omega) \quad (\text{II-16})$$

La constante diélectrique est définie par $\varepsilon(\omega) = 1 + \chi^{(1)}(\omega)$, $\chi^{(1)}(\omega)$ est la transformée de Fourier de la fonction réponse, que l'on appelle susceptibilité électrique (linéaire) et qui est généralement complexe. Elle permet de définir la relation de dispersion à partir de la constante de propagation :

$$k^2(\omega) = \varepsilon(\omega) \frac{\omega^2}{c^2} \quad (\text{II-17})$$

Les parties réelle et imaginaire de la constante diélectrique peuvent être reliées à l'indice de réfraction $n_0(\omega)$ et coefficient d'absorption $\alpha_0(\omega)$ par la définition :

$$\varepsilon(\omega) = \left(n_0(\omega) + i \frac{\alpha_0(\omega)c}{2\omega} \right)^2 \quad (\text{II-18})$$

La présence du terme supplémentaire de polarisation non linéaire d'ordre trois dans l'équation de propagation (II-16) ne permet pas un traitement simple, même dans le cas d'une polarisation instantanée. L'expression dans le domaine temporel permet tout de même de dégager une relation importante entre la susceptibilité d'ordre trois et le coefficient n_2 , appelé indice non linéaire, présent dans la relation phénoménologique de l'effet Kerr :

$$n = n_0 + n_2 I \quad (\text{II-19})$$

où n_0 est l'indice linéaire du milieu et I l'intensité du champ appliqué. Cette expression traduit la variation d'indice proportionnelle à l'intensité du faisceau. En utilisant une vision instantanée, à la fois pour la polarisation linéaire et non linéaire, on peut exprimer le vecteur \mathbf{D} en introduisant une constante diélectrique plus générale dépendant de l'intensité [10].

La susceptibilité d'ordre trois est issue d'un développement perturbatif mais possède tout de même plus de signification que le n_2 .

Comme dans le domaine linéaire, il est possible, en utilisant une susceptibilité du troisième ordre complexe, d'introduire un coefficient d'absorption non linéaire afin de traduire l'absorption à deux photons. Ce coefficient est aussi introduit de manière phénoménologique afin de produire une atténuation linéaire avec la propagation. C'est encore une fois une limitation à de très faibles effets, dans le cadre d'une approche onde plane. En utilisant une relation généralisée sur l'indice en fonction des coefficients d'absorption :

$$n = \left(n_0(\omega) + i \frac{\alpha_0(\omega)c}{2\omega} \right) + \left(n_2 + i \frac{\alpha_2(\omega)c}{2\omega} \right) \mathbf{I} \quad (\text{II} - 20)$$

alors

$$\alpha_2(\omega) = \frac{3}{4} \frac{2\omega \operatorname{Im}[\chi_{xxxx}^{(3)}]}{c^2 \epsilon_0 n_0^2} \quad (\text{II} - 21)$$

I.3- Equation de propagation de l'impulsion lumineuse

L'écriture de l'équation dans le domaine temporel donne :

$$\Delta \mathbf{E} - \mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{D}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{P}_{NL}^{(3)}}{\partial t^2} \quad (\text{II} - 22)$$

où le vecteur déplacement électrique \mathbf{D} s'écrit :

$$\mathbf{D}(z, t) = \epsilon_0 \mathbf{E}(z, t) + \epsilon_0 \int \mathbf{R}^{(1)}(t - t') \mathbf{E}(z, t') dt' \quad (\text{II} - 23)$$

ou dans le domaine fréquentiel :

$$\tilde{\mathbf{D}}(z, \omega) = \epsilon_0 [1 + \chi^{(1)}(\omega)] \tilde{\mathbf{E}}(z, \omega) = \epsilon(\omega) \tilde{\mathbf{E}}(z, \omega) \quad (\text{II} - 24)$$

Connaissant l'équation (II-17), la dérivée seconde du déplacement électrique s'exprime de la manière suivante :

$$\frac{\partial^2 \mathbf{D}(z, t)}{\partial t^2} = -\frac{\epsilon_0 c^2}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} k^2(\omega) \tilde{\mathbf{E}}(z, \omega) e^{-i\omega t} d\omega \quad (\text{II} - 25)$$

où le vecteur d'onde $k(\omega)$ peut se développer en série de Taylor sous la forme générale :

$$k(\omega) = \sum_{p=0}^n \frac{(\omega - \omega_0)^p}{p!} \left. \frac{d^p k(\omega)}{d\omega^p} \right|_{\omega_0} \quad (\text{II} - 26)$$

Pour la résolution de l'équation de propagation, on développe en se plaçant dans l'hypothèse paraxiale le champ électrique et la polarisation non linéaire sur une base d'ondes planes définie comme l'onde porteuse de l'onde électrique.

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2} \left(\mathbf{A}(\mathbf{r}, t) e^{i(\omega_0 t - k(\omega_0)z)} + \overline{\mathbf{A}}(\mathbf{r}, t) e^{-i(\omega_0 t - k(\omega_0)z)} \right) \quad (\text{II} - 27)$$

$$\mathbf{P}_{NL}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2} \left(\mathbf{p}_{nl}(\mathbf{r}, t) e^{i(\omega_0 t - k(\omega_0)z)} + \overline{\mathbf{p}}_{nl}(\mathbf{r}, t) e^{-i(\omega_0 t - k(\omega_0)z)} \right) \quad (\text{II} - 28)$$

L'écriture de l'équation de propagation offre ici deux alternatives, écrire l'équation en fonction de l'amplitude complexe $\mathbf{A}(\mathbf{r}, t)$ ou de son complexe conjugué $\bar{\mathbf{A}}(\mathbf{r}, t)$. La première donne la forme la plus compacte. En faisant l'approximation de l'enveloppe lentement variable sur le champ en z et sur la polarisation non linéaire en t et d'une faible déplétion de la pompe, l'équation de propagation devient alors :

$$\begin{aligned} \Delta_{\perp} \mathbf{A}(\mathbf{r}, t) - 2ik(\omega_0) \left(\frac{\partial \mathbf{A}(\mathbf{r}, t)}{\partial z} \right) - k^2(\omega_0) \mathbf{A}(\mathbf{r}, t) + \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \left[\sum_{p=0}^n \frac{\Omega^p}{p!} \frac{d^p k}{d\omega^p} \Big|_{\omega_0} \right]^2 \tilde{\mathbf{E}}(\mathbf{r}, \omega_0 + \Omega) e^{i(\omega_0 + \Omega)t} d\Omega \\ = \mu_0 \left(\frac{\partial^2 \mathbf{p}_{nl}(\mathbf{r}, t)}{\partial t^2} - 2i\omega_0 \frac{\partial \mathbf{p}_{nl}}{\partial t} - \omega_0^2 \mathbf{p}_{nl}(\mathbf{r}, t) \right) \end{aligned} \quad (\text{II} - 29)$$

Un développement jusqu'à l'ordre trois du vecteur d'onde donne finalement pour une fréquence ω_0 de l'onde signal :

$$\begin{aligned} \Delta_{\perp} \mathbf{A}(\mathbf{r}, t) - 2ik(\omega_0) \left(\frac{\partial \mathbf{A}(\mathbf{r}, t)}{\partial z} + \left(\frac{dk}{d\omega} \right)_{\omega_0} \frac{\partial \mathbf{A}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \right) - \left(k(\omega_0) \left(\frac{d^2 k}{d\omega^2} \right)_{\omega_0} + \left(\frac{dk}{d\omega} \right)_{\omega_0}^2 \right) \frac{\partial^2 \mathbf{A}(\mathbf{r}, t)}{\partial t^2} \\ - i \left(\frac{k(\omega_0)}{3} \left(\frac{d^3 k}{d\omega^3} \right)_{\omega_0} + \left(\frac{dk}{d\omega} \right)_{\omega_0} \left(\frac{d^2 k}{d\omega^2} \right)_{\omega_0} \right) \frac{\partial^3 \mathbf{A}(\mathbf{r}, t)}{\partial t^3} + K = \mu_0 \left(2i\omega_0 \frac{\partial \mathbf{p}_{nl}}{\partial t} - \omega_0^2 \mathbf{p}_{nl}(\mathbf{r}, t) \right) \end{aligned} \quad (\text{II} - 30)$$

Voilà l'équation la plus complète que nous aurons à résoudre la plupart du temps pour étudier la génération et la propagation d'une impulsion lumineuse dans un matériau hors résonance. Cette équation se décompose en plusieurs termes :

- Le premier terme est le Laplacien transverse agissant sur les variables x et y de l'amplitude complexe du champ. Ce terme est responsable des phénomènes de diffraction sur les faisceaux.
- Le second terme assure la propagation d'un paquet d'onde dans la direction z avec une vitesse de groupe v_g . On effectue toujours le changement de variable $t-z/v_g$ qui permet de se déplacer dans le repère de groupe (ou repère de l'impulsion), ce qui réduit avantageusement à une seule dérivation sur z , sans affecter les autres termes.

$$v_g = \left(\frac{dk}{d\omega} \right)_{\omega_0}^{-1} \quad (\text{II} - 31)$$

- Le troisième terme agit sur la variable temporelle de l'amplitude complexe. Il est responsable de l'élargissement ou de la compression de l'impulsion, tout en conservant la nature de son profil initial.
- Le quatrième terme et les suivants sont des corrections à tous les ordres sur l'enveloppe temporelle du champ, amenant des modifications en phase et en amplitude du profil temporel.
- Enfin, le membre de droite contient la polarisation non linéaire, terme source susceptible d'apporter des modifications sur le profil spatial mais aussi temporel du champ.

Dans les paragraphes qui suivent, nous allons nous intéresser aux solutions à cette équation. Il est bien clair qu'il n'y a pas de solution analytique générale, mais sous certaines conditions expérimentales, il est possible d'observer différents phénomènes propres à chaque terme de cette équation. Ainsi le premier effet important est un effet linéaire que nous allons brièvement expliquer dans le paragraphe suivant. Les autres paragraphes seront dédiés aux phénomènes non linéaires présents dans les techniques de microscopie non linéaire.

I.4- La dispersion du second ordre

La dispersion est un effet linéaire classique qui exprime le fait que les ondes de fréquences différentes ne se propagent pas à la même vitesse dans un milieu totalement transparent. Ainsi, dans la plupart des matériaux, la fréquence rouge se déplace plus vite que la fréquence bleue. De manière plus formelle, cela signifie que l'indice de réfraction linéaire dépend de la longueur d'onde. La simplification de l'équation de propagation écrite dans l'espace des fréquences dans laquelle les variables transverses et les effets non linéaires sont supprimés donne :

$$\frac{\partial^2 E(z, \omega)}{\partial z^2} + k^2(\omega)E(z, \omega) = 0 \quad (\text{II} - 32)$$

dont la solution s'écrit :

$$E(z, \omega) = E(0, \omega)e^{-ik(\omega)z} \quad (\text{II} - 33)$$

Cette solution triviale indique que le spectre de l'impulsion est inchangé tandis que les composantes spectrales acquièrent une phase dépendant de leurs fréquences et de la distance parcourue. De manière à mieux comprendre physiquement ce qu'il arrive à l'impulsion, il est

préférable de repasser dans l'espace temporel qui nous est plus familier. Pour cela, comme on l'a déjà vu précédemment, le vecteur d'onde doit être développé en série de Taylor, ainsi on obtient après passage dans le référentiel de l'impulsion :

$$E(z, t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} E(0, \omega) e^{-ik(\omega)z} e^{i\omega t} d\omega = F\left(z, t - \left(\frac{dk}{d\omega}\right)_{\omega_0} z\right) e^{i(\omega_0 t - k(\omega_0)z)} \quad (\text{II} - 34)$$

avec [1]

$$F(z, t) = \frac{\tau_0 \sqrt{\pi}}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left[-\frac{\omega^2 \tau_0^2}{4}\right] \exp\left[-i\left(\frac{\omega^2}{2} \left(\frac{d^2k}{d\omega^2}\right)_{\omega_0} + \frac{\omega^3}{6} \left(\frac{d^3k}{d\omega^3}\right)_{\omega_0} + K\right) z\right] \exp[i\omega t] d\omega \quad (\text{II} - 35)$$

En développant le vecteur d'onde jusqu'au second ordre on obtient alors l'expression de la forme temporelle de l'impulsion suivante :

$$F(z, t) = \frac{\tau_0}{(\tau_0^4 + 4k''^2 z^2)^{1/4}} \exp\left[-\frac{t^2}{\tau_0^4 + 4k''^2 z^2/\tau_0^2}\right] \exp\left[\frac{2ik'' z t^2}{\tau_0^4 + 4k''^2 z^2}\right] \exp\left[\frac{i}{2} \arctan\left(\frac{2k'' z}{\tau_0^2}\right)\right] \quad (\text{II} - 36)$$

où k'' est la dérivée seconde de $k(\omega)$ en ω_0 , appelée (coefficient de) dispersion du second ordre. La représentation du champ électrique temporelle ainsi que la dérivée de la phase donnant la fréquence instantanée dans l'impulsion sont représentées sur la figure 1.

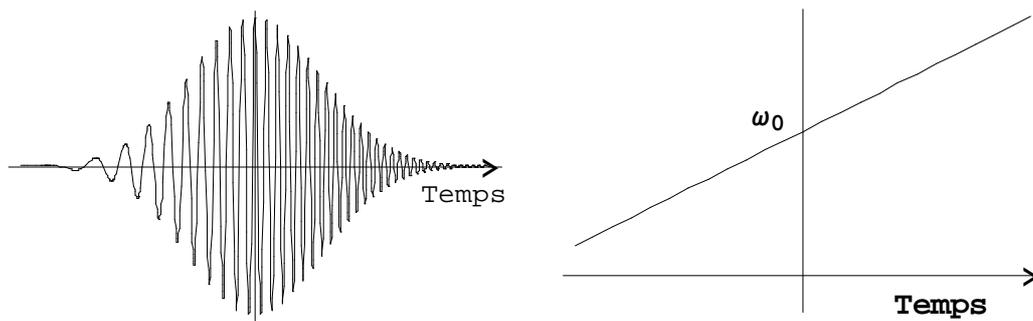


Figure 1 : Représentation temporelle de l'impulsion en dispersion normale et dérivée de la phase donnant la fréquence instantanée dans l'impulsion. Il est important de noter que la représentation est à temps croissants vers la droite. En conséquence, le front avant de l'impulsion est à gauche et correspond aux temps négatifs. On peut donc observer que le front avant se charge des basses fréquences, ce qui correspond bien à la dispersion loin des absorptions (dispersion normale) dans laquelle les basses fréquences voyagent plus vite (Le rouge en avant).

La loi d'évolution de l'enveloppe peut faire l'objet de nombreux commentaires :

- La durée de l'impulsion, dans le cas d'une forme initiale sans dérivée de fréquence, ne peut que croître, et cela de manière d'autant plus importante que l'impulsion est initialement brève et k'' important.
- Il existe un phase temporelle quadratique, ce qui traduit une modulation de la fréquence porteuse. On parle de glissement, de dérive ou de modulation de fréquence linéaire, qui peut être positif ou négatif suivant le signe de k'' . Pour une dispersion du second ordre positive, les basses fréquences sont sur le front avant de l'impulsion.
- Si l'impulsion possède un glissement de fréquence linéaire initial opposé à celui qui est fourni par la propagation dans le matériau, il est possible de comprimer temporellement l'impulsion pour une distance de propagation déterminée correspondant à la compensation exacte du glissement initial. L'impulsion est alors dite limitée par transformée de Fourier, et cela correspond à l'impulsion la plus brève réalisable avec les fréquences dont on dispose.
- L'amplitude de l'impulsion, initialement égale à l'unité, subit un aplatissement au cours de la propagation, ce qui donne l'image d'une dilution de l'impulsion dans le milieu dispersif.
- L'impulsion acquiert un phase indépendante du temps, qui atteint sur une distance de quelques longueurs d'onde la valeur limite de $\pi/4$

Pour caractériser l'échelle de distance sur laquelle le processus de dispersion est important, nous introduisons la longueur L_d , représentant un élargissement temporel d'un facteur $\sqrt{2}$ par rapport à la durée initiale :

$$L_d = \frac{\tau_0^2}{2|k''|} \quad (\text{II} - 37)$$

Nous pouvons noter dans cette relation l'importance de la durée de l'impulsion qui affecte quadratiquement la variation de L_d . Pour garder quelques ordres de grandeur en tête, dans le verre SF59 pour une impulsion de 120 femtosecondes à mi-hauteur en intensité, L_d est de l'ordre de 17 mm à 800 nm. Dans le BK7, connu pour être très peu dispersif, nous avons 112 mm.

La dispersion est un phénomène qui est des plus important si on travaille avec des impulsions ultra-courtes. Si on considère une impulsion limitée par transformée de Fourier (soit la plus courte possible avec le spectre dont on dispose) à la sortie d'un laser, après traversée de quelques optiques, celle-ci s'élargit temporellement par glissement des

fréquences dans l'enveloppe de l'impulsion. La solution est alors de disposer des miroirs à dispersions négatives [11,12] (des miroirs GTI par exemple) ou une ligne de prismes, ce qui permet de compenser en amont la dispersion des différentes optiques de l'expérience. Le bon fonctionnement d'un laser impulsionnel repose d'ailleurs sur la compensation de la dispersion des optiques et en particulier du cristal par une ligne de prismes, de réseaux ou de miroirs à dispersions négatives.

Cet effet doit être pris en compte dans tout montage expérimental impliquant des impulsions ultracourtes, et tout spécialement dans le cas de la microscopie où les éléments optiques traversés sont nombreux (les objectifs par exemple).

II- PROCESSUS NON LINEAIRES RELATIFS A LA MICROSCOPIE NON LINEAIRE

Plusieurs processus non linéaires peuvent être déterminés à partir des susceptibilités non linéaires du second et troisième ordre. Voici dans la figure 2 ci-après une liste non exhaustive de ces processus pouvant avoir lieu en microscopie non linéaire.

Ordre	Champs en interaction	Fréquence de la polarisation non linéaire induite	Processus
$\chi^{(2)}$	E_0, E_ω	ω	Effet électro-optique : changement de l'indice de réfraction par rapport au champ électrique appliqué E_ω
	$E_{\omega_1}, E_{\omega_2}$	$\omega_1 + \omega_2$	Sommation de fréquences. Cas particulier : GSH avec $\omega_1 = \omega_2 = \omega$, champ rayonné à 2ω
$\chi^{(3)}$	E_0, E_0, E_ω	ω	Effet Kerr statique : changement de l'indice de réfraction par rapport au carré du champ électrique statique E_0
	E_0, E_ω, E_ω	2ω	GSH induite par le champ électrique statique E_0
	$E_{\omega_1}, E_{\omega_2}, E_{\omega_3}$	$\omega_1 + \omega_2 + \omega_3$	Mélange à quatre ondes : rayonnement d'un champ à la fréquence somme. Cas particulier : GTH avec $\omega_1 = \omega_2 = \omega_3 = \omega$, champ rayonné à la fréquence triple
	$E_\omega, E_\omega, E_\omega$	ω	Changement de la partie réelle ou imaginaire de l'indice de réfraction par rapport à l'intensité de l'onde optique. - partie réelle : effet Kerr optique - partie imaginaire : absorption à deux photons

Figure 2 : liste non exhaustive de processus non linéaire du second et troisième ordre.

Dans ce chapitre nous présenterons les processus non linéaires ayant lieu respectivement dans la microscopie par génération de seconde harmonique, dans la microscopie à deux photons, puis deux processus de mélange à quatre ondes : la génération de tierce harmonique puis le processus CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering). Ces différents processus jouent le rôle d'agent de contraste dans leur technique respective de microscopie non linéaire cohérente.

II.1- Génération de seconde harmonique

Nous avons expliqué dans le chapitre I la génération de seconde harmonique (GSH) dans l'application de la microscopie. Nous ne rappellerons ici qu'une propriété générale de la GSH.

Le phénomène de GSH fut mis en évidence pour la première fois en 1961 par Franken [13]. Dans ce processus, deux photons de même pulsation, incidents sur un matériau peuvent se mélanger pour donner un photon de pulsation double. Ce phénomène a été obtenu dans un morceau de quartz cristallin en focalisant une impulsion (1ms) monochromatique (694,3 nm) issue d'un laser à rubis. En remplaçant le quartz cristallin par un morceau de verre le phénomène disparaissait, prouvant ainsi que la GSH n'est possible que dans les milieux non centrosymétriques. En effet si nous reprenons le terme de polarisation non linéaire du second ordre, nous avons :

$$\mathbf{P}_{\text{NL}}^{(2)}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \overline{\chi^{(2)}} \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \quad (\text{II} - 38)$$

Si le matériau possède des propriétés de centrosymétrie, on a :

$$\begin{aligned} -\mathbf{P}_{\text{NL}}^{(2)}(\mathbf{r}, t) &= \varepsilon_0 \overline{\chi^{(2)}} (-\mathbf{E}(\mathbf{r}, t))(-\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)) = \mathbf{P}_{\text{NL}}^{(2)}(\mathbf{r}, t) \\ \mathbf{P}_{\text{NL}}^{(2)}(\mathbf{r}, t) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{II} - 39)$$

On peut donc conclure qu'il n'y a pas de génération de seconde harmonique dans le volume de milieux centrosymétriques. Ceci est vrai pour la plupart des matériaux ou les objets vivant en microscopie. Cependant des objets peuvent présenter des ruptures de symétrie en surface et ainsi la génération de seconde harmonique pourra avoir lieu [14].

II.2- Absorption deux photons

L'absorption à deux photons, illustrée en figure 3, est un processus résonant où un atome fait une transition de son niveau fondamental à un niveau excité par une absorption simultanée de deux photons du laser.

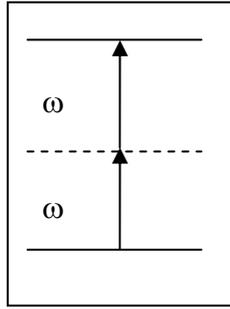


Figure 3 : Absorption à deux photons

Ce processus est modélisé en mécanique quantique (voir par exemple Y.R. Shen [4, p.202-210] par une variation de l'intensité du faisceau sous la forme :

$$I(z) = \frac{I_0}{1 + I_0 \gamma z}$$

ou pour de faibles variations :

$$I(z) = I_0 (1 - I_0 \gamma z) \quad (\text{II} - 40)$$

où γ comprend la partie imaginaire de la susceptibilité du troisième ordre. Insistons sur un détail important, la mécanique quantique fournit le cadre rigoureux de ce processus, et permet l'écriture de la susceptibilité complexe dans le domaine fréquentiel. Mais cette écriture est de peu d'intérêt car il n'est pas possible de passer dans l'espace conjugué pour connaître l'expression temporelle de la polarisation. En conséquence, l'absorption à deux photons est souvent simplement modélisée par un coefficient phénoménologique qui provoque une atténuation linéaire du faisceau avec l'éclairement incident et la distance parcourue.

En microscopie à deux photons, l'agent de contraste utilisé est la fluorescence incohérente de l'état excité comme nous avons pu le voir dans le chapitre I.

II.3- Mélange à quatre ondes

Les différents processus de mélange à quatre ondes reposent tous sur la polarisation non linéaire d'ordre trois. En effet si nous regardons l'équation (II-10) nous pouvons constater que la polarisation non linéaire d'ordre trois combine trois champs électriques pour rayonner une quatrième onde [15]. Ceci est bien un mélange à quatre ondes (figure 4).

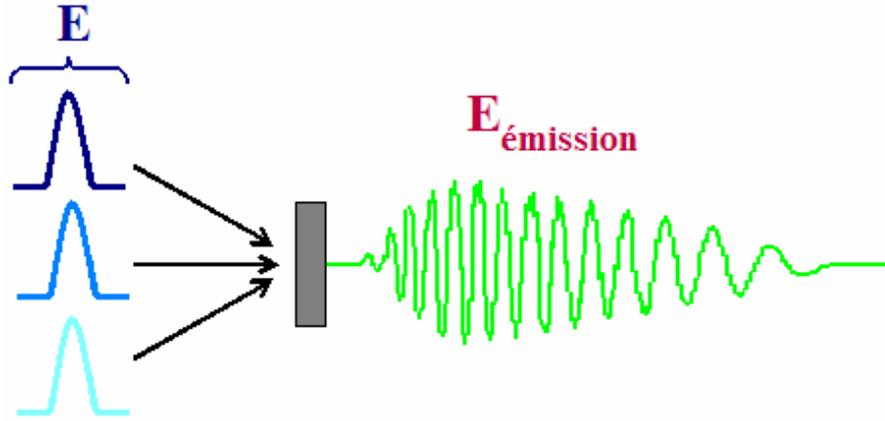


Figure 4 : Mélange à quatre ondes

L'équation (II-31) est l'équation de propagation d'ondes la plus complète. Dans le cadre des processus de mélange à quatre ondes nous pouvons la réduire facilement à une dimension si nous nous mettons dans le cas de faible perturbation car la diffraction peut être négligée. Nous pouvons donc écrire :

$$\frac{\partial A(z, \omega)}{\partial z} = \frac{i\omega}{2n(\omega)\epsilon_0 c} P_{NL}(z, \omega) \exp(-ik(\omega)z) \quad (\text{II} - 41)$$

Compte tenu du fait que nous avons quatre ondes se mélangeant, il faut donc résoudre quatre équations couplées. En utilisant l'expression de la polarisation non linéaire de l'équation (II - 29), on obtient l'ensemble suivant :

$$\frac{\partial A_j}{\partial z} = \frac{i\omega_j}{2n(\omega_j) c} \chi^3 A_1^{(*)} A_2^{(*)} A_3^{(*)} \exp\left(\sum_{i=1,2,3} \exp(\pm i k_i(\omega_i)z)\right) \exp(-i k(\omega_j)z) \quad (\text{II} - 42)$$

Cet ensemble d'équations génériques représente respectivement les trois faisceaux entrants ($j = 1, 2, 3$) ou le champ rayonné 4 à ω . L'algèbre utilisé dans cette équation associe à chaque champ conjugué (*) le nombre d'onde $-(-k)$. La variation d'amplitude du champ j de fréquence ω_j est due au couplage des trois autres champs dans l'échantillon. Le champ accumulé est néanmoins toujours fortement dépendant du terme de phase et disparaîtra à moins que ce terme de phase soit nul : c'est la condition d'accord de phase et cette condition doit être remplie pour assurer une conversion d'énergie efficace [16].

De par l'équation générique (II-42), un grand nombre de processus peuvent être décrits. Nous traiterons deux processus nous intéressant : le processus de génération de troisième harmonique et le mélange à quatre ondes non dégénéré dont un des plus usités est le processus de diffusion Raman Anti-Stokes Cohérente ou CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering).

II.3.1- Génération de tierce harmonique

La génération de tierce harmonique (GTH) dans un matériau est un processus non linéaire d'ordre trois dans lequel la fréquence de l'onde générée est trois fois la fréquence ω de l'onde incidente. Dans ce cas seulement deux ondes sont présentes dans l'échantillon (de fréquences ω et 3ω). L'équation de propagation de l'onde non linéaire s'écrit alors :

$$\frac{\partial A_{3\omega}}{\partial z} = \frac{3i\omega}{8n(3\omega)c} \chi^3 A_\omega^3 \exp[(3ik(\omega) - ik(3\omega))z] \quad (\text{II} - 43)$$

avec $A_{3\omega}$ l'amplitude du champ suivant z de l'onde harmonique et A_ω l'amplitude du champ fondamental.

Les effets de propagation doivent être soigneusement considérés puisque ces ondes se propagent à des vitesses différentes et peuvent éventuellement ne pas être en phase. Evidemment, les anomalies de vitesses de phase excluent la co-propagation et affectent donc fortement l'efficacité globale. Le seul moyen d'assurer une génération cohérente de l'onde harmonique le long du matériau est de vérifier cette relation :

$$k(3\omega) = 3k(\omega) \quad (\text{II} - 44)$$

Cette relation est appelée condition d'accord de phase.

L'intensité cohérente du faisceau à 3ω est utilisée comme agent de contraste dans la microscopie par génération de tierce harmonique. Mais nous verrons plus amplement dans le chapitre III les propriétés de ce processus appliquées à la microscopie.

II.3.2- CARS

Lorsque les fréquences des champs entrants dans l'échantillon présentent un battement à une fréquence proche d'une fréquence de vibration moléculaire de l'échantillon, la susceptibilité non linéaire augmente énormément. L'amplitude du champ rayonné change d'ordre de grandeur et permet une étude spectroscopique de l'échantillon. Le processus le plus connu pour exécuter la spectroscopie de gaz est le processus CARS, ou « Coherent Anti-Stokes Raman Scattering ». Dans ce cas, les trois faisceaux ont des fréquences différentes et la condition d'accord de phase est ensuite remplie dans l'espace en 3D. Habituellement, deux faisceaux de même fréquence ω_p (dits faisceaux pompes) sont mélangés avec un troisième faisceau de fréquence variable ω_s , comme décrit dans la figure 5 ci dessous.

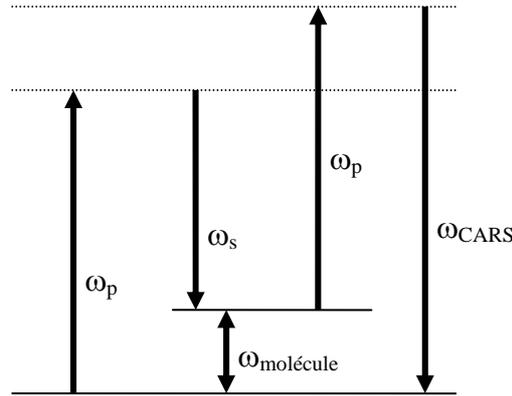


Figure 5 : Diagramme énergétique du processus CARS

Lorsque $\omega_p - \omega_s = \omega_{\text{molécule}}$ alors une augmentation de plusieurs ordres de grandeur de l'intensité CARS est observée. Par conséquent un spectre Raman peut être obtenu en changeant sans interruption l'onde laser Stokes et en enregistrant simultanément l'intensité du faisceau CARS. Cette procédure est appelée balayage CARS. C'est une technique intéressante car elle permet d'obtenir des spectres avec une grande résolution, et de plus d'accéder à la température de l'échantillon tout en balayant la distribution de Boltzmann de l'état fondamental électronique.

La figure 6 représente l'arrangement géométrique classique où la condition d'accord de phase détermine complètement la direction du champ rayonné à ω_{CARS} .

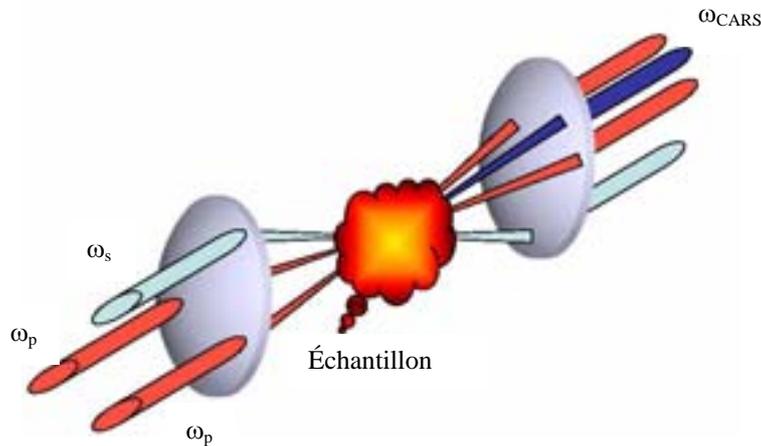


Figure 6 : Schéma d'une expérience CARS sur un échantillon

La forme cohérente de l'onde résultant de ce processus de mélange à quatre ondes, sous condition d'accord de phase, est un énorme avantage sur des techniques classiques telles que la Fluorescence Induite par Laser (LIF) ou la spectroscopie Raman.

III- LIMITATIONS DANS LA MICROSCOPIE NON LINEAIRE COHERENTE

Quelques phénomènes peuvent engendrer des limitations aux techniques de microscopie non linéaire que nous utilisons. Nous verrons tout d'abord que la diffusion joue un rôle important dans l'intensité d'excitation en fonction de l'épaisseur du milieu traversé. Ensuite nous verrons deux problèmes majeurs de la microscopie cohérente qui sont la diffraction et l'interférence.

III.1- Diffusion de Rayleigh, diffusion de Mie

En microscopie non linéaire, on pense souvent à l'avantage d'une excitation dans l'infrarouge multiphotonique comparé à une excitation à un photon dans le visible. On raisonne dans l'hypothèse d'un régime de diffusion de Rayleigh (particule de taille inférieure à $\lambda/10$) avec une diffusion isotrope et une efficacité de diffusion qui varie comme $1/\lambda^4$. En microscopie du vivant les objets diffusants sont souvent plus gros et la théorie de diffusion de Mie doit être utilisée. On rappelle que la diffusion de Mie désigne la diffusion par des particules dont le rayon oscille entre 0,1 et 10 fois la longueur d'onde du faisceau excitateur. Cette théorie est beaucoup plus complexe et des résultats quantitatifs ne sont obtenus qu'avec des particules sphériques. On note que la puissance diffusée est maximale lorsque la longueur d'onde est proche du rayon de l'objet de la particule. De plus, contrairement à la théorie de Rayleigh, la puissance rétro-diffusée est plus grande que la puissance diffusée dans la direction de l'onde incidente. Enfin la diffusion de Mie est une diffusion anisotrope alors que la diffusion Rayleigh est isotrope. La valeur d'anisotropie de la diffusion de Mie est définie par le facteur g . Ce facteur dépend de la fonction de diffusion de l'objet et traduit une direction privilégiée de la diffusion.

Si nous observons la figure 7, nous avons en fonction de la taille relative A de la particule (A étant le rapport entre la taille réelle a de la particule diffusée et la longueur d'onde du faisceau incident λ) un caractère anisotrope de la diffusion plus ou moins marqué g . Ce paramètre est défini comme la valeur moyenne du carré du cosinus de l'angle directeur de la lumière diffusée par la particule. L'efficacité de la diffusion Q , définie comme le rapport entre la section efficace de diffusion σ_s et la section géométrique σ_g (cette dernière est la surface éclairée de la particule par le faisceau incident), dépend également de la taille de la

particule. On remarque sur la figure que les petites particules donnent lieu à moins de diffusion donc sensiblement plus de signal, mais le paramètre g diminuant également, la résolution peut être affectée car il n'y a plus de directivité dans la lumière diffusée. Par ailleurs, l'excitation à un, deux, trois photons correspond un système de diffusion différent du fait de la différence de fréquence mais aussi des processus linéaires ou non linéaires [17].

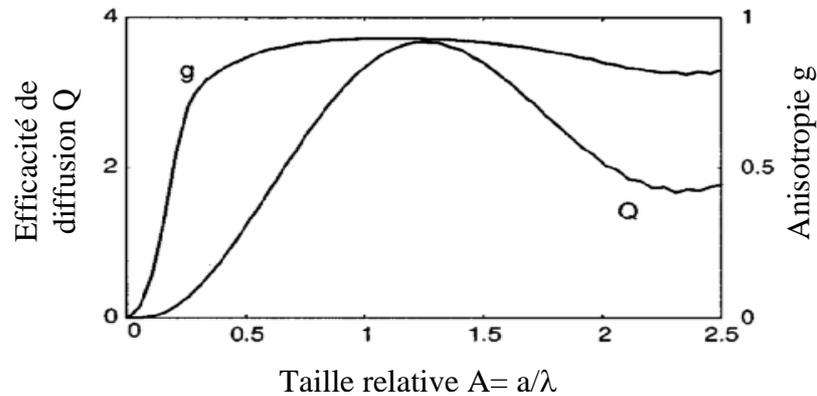


Figure 7 : Efficacité de diffusion Q et anisotropie g en fonction de la taille relative A . Les indices de réfraction des particules diffusantes et du milieu d'immersion (eau) sont respectivement 1,59 et 1,33.

Intéressons nous à présent à l'intensité de fluorescence sous excitation un ou deux photons en fonction de l'épaisseur dans un milieu turbide. Ce milieu est constitué de particules diffusantes (de $0,202 \mu\text{m}$ de diamètre) suspendues dans de l'eau. Ces particules peuvent fluorescer sous excitation un photon à 488 nm ou sous deux photons à 800 nm, le pic de fluorescence étant approximativement à 520 nm. Pour ces trois longueurs d'onde correspondant à l'excitation (à un photons, à deux photons ou à la fluorescence) la section efficace de diffusion σ_s , le libre parcours moyen l_s (nous rappelons que l_s correspond à la distance pour laquelle un photon du faisceau de l'excitation se propage librement dans le matériau sans être diffusé) ainsi que l'anisotropie g peuvent être calculés en utilisant la théorie de diffusion de Mie [18] (voir tableau figure 8).

Longueur d'onde (nm)	Taille relative des particules, A (a/λ)	Efficacité de diffusion $Q=\sigma_s/\sigma_g$	Section efficace de diffusion σ_s (μm^2)	Libre parcours moyen l_s (μm)	Anisotropie g
488	0,2069	0,1586	$5,07 \cdot 10^{-3}$	35,7	0,54
520	0,1942	0,1356	$4,34 \cdot 10^{-3}$	41,8	0,482
800	0,1263	0,0389	$1,24 \cdot 10^{-3}$	145,38	0,20

Figure 8 : simulations numériques de σ_s , l_s et de g pour des billes de polystyrène de $0,202 \mu\text{m}$ de diamètre sous trois faisceaux de longueur d'onde différente [17].

La figure 9 ci après représente les signaux (théoriques et mesurés) de fluorescence sous excitation un ou deux photons en fonction de l'épaisseur d du milieu traversé.

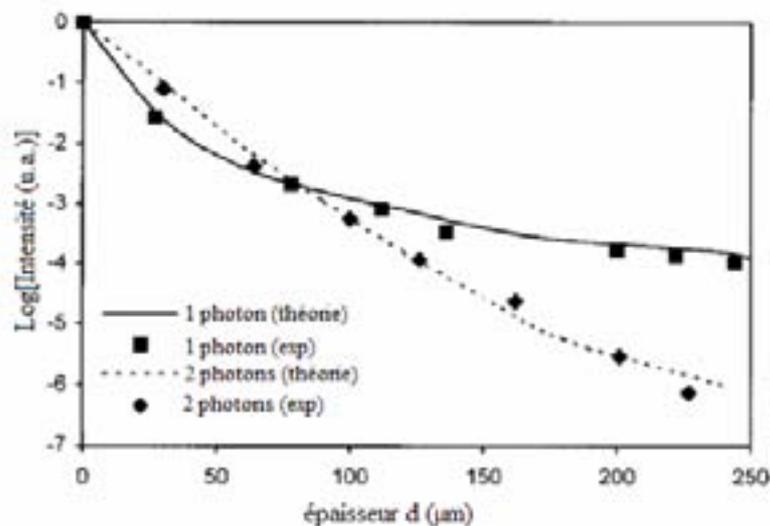


Figure 9 : Intensités de fluorescence (théoriques et expérimentales) sous excitation un et deux photons en fonction de l'épaisseur d du milieu [17].

Nous remarquons à travers ces deux figures que l'intensité à un photon excède celle à deux photons lorsque l'épaisseur d du milieu excède $2 l_s$ à 520 nm, soit pour $d > 83,6 \mu\text{m}$.

En effet, à un photon pour $d < 83,6 \mu\text{m}$, la probabilité de diffusion multiple est réduite et seuls les photons non diffusés contribuent au signal. Comme l'intensité du faisceau varie comme $\exp(-d/l_s)$, on a une perte exponentielle du signal. Pour $d > 83,6 \mu\text{m}$, les photons diffusés peuvent contribuer à l'excitation et à la formation de l'image, donc une décroissance de l'intensité moins prononcée.

A deux photons, la décroissance de l'intensité varie comme $\exp(-2d/l_s)$, mais avec un libre parcours moyen 4 fois plus grand, donc un signal plus important. Lorsque $d > 83,6 \mu\text{m}$,

nous n'avons pas comme dans le cas de l'excitation monophotonique de contribution des photons diffusés sur le signal à cause du caractère non linéaire et cohérent de l'interaction.

On peut donc en conclure que le signal à un photon est plus important qu'à deux et trois photons.

Cependant si on s'intéresse à la résolution α de l'image réalisée, définie comme la distance entre les points correspondant à 10 % et 90 % de l'intensité du signal détecté, en fonction de l'épaisseur d nous pouvons voir sur la figure 10 ci-après que l'imagerie par excitation non linéaire est nettement supérieure à l'excitation monophotonique puisque dans le cas de l'excitation non linéaire, les photons diffusés ne contribuent pas à la formation de l'image.

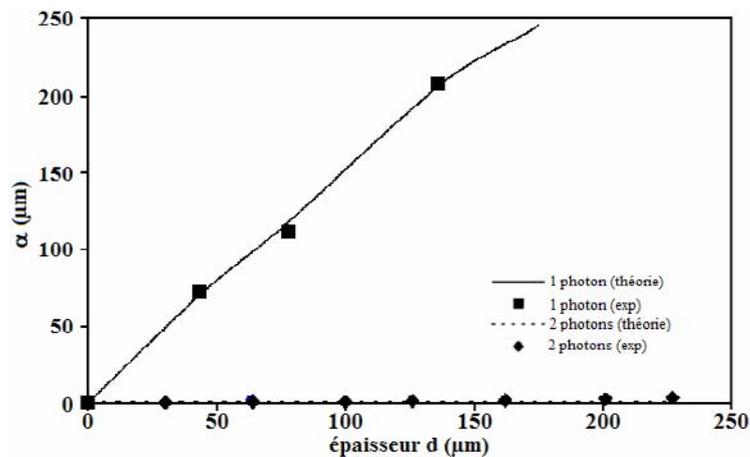


Figure 10 : Résolution α de l'image réalisée sous excitation un et deux photons en fonction de l'épaisseur d du milieu [17].

III.2- Diffraction et interférence

Un autre problème important de la microscopie cohérente par mélange à quatre ondes provient de deux phénomènes physiques : la diffraction et l'interférence [19]. En effet, le processus de génération cohérente se construit par interférence entre les différentes ondelettes émises en différents plans. La diffraction intervient en chaque plan. En effet, la structure de la polarisation non linéaire induite donne lieu à un champ diffracté qui n'est pas forcément Gaussien. Une façon d'aborder le problème global est de résoudre de façon exacte l'équation de l'onde cohérente. Pour cela on écrit l'équation d'onde dans l'espace des fréquences spatiales ρ :

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} - 4\pi\rho^2 + k_c^2 \right) A_c(\rho, z) = -\frac{4\pi\omega^2}{c^2} P(\rho, z) \quad (\text{II} - 45)$$

avec P et A_c transformées de Hankel de la polarisation non linéaire et du champ cohérent. On rappelle la forme des transformées de Hankel [20]:

$$A(r) = 2\pi \int_0^\infty A(\rho) J_0(2\pi r) \rho d\rho$$

où J_0 est la fonction de Bessel d'ordre 0.

P peut être calculé en utilisant un formalisme rigoureux pour décrire le champ excitateur après l'objectif. Une solution de cette équation est :

$$A_c(\rho, z) = \exp\left(\frac{-2i\pi^2\rho^2z}{k_c}\right) 2i\pi k_c \int_{-\infty}^z P(\rho, u) \exp(i\Delta ku) \exp\left(\frac{2i\pi^2\rho^2u}{k_c}\right) du \quad (\text{II} - 46)$$

On peut calculer le signal simplement par:

$$S(z) = 2\pi \int_0^a |A_c(\rho, z)|^2 \rho d\rho \quad (\text{II} - 47)$$

où a est la fréquence de coupure spatiale du système optique de collection pour l'onde cohérente.

Ce formalisme rigoureux ne peut être évalué qu'au cas par cas par un calcul numérique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. Santran, Thèse d'université de Bordeaux 1, «Caractérisation non linéaire de composants optiques d'une chaîne laser de forte puissance», p. 34-37, soutenue le 18 décembre 2000, n° d'ordre 2342
- [2] N. Bloembergen, « Nonlinear Optics », *Advanced Book Classics*
- [3] P.N. Butcher, D. Cotter, « The elements of Nonlinear Optics », *Cambridge University Press* (1990)
- [4] Y.R. Shen, « The principles of Nonlinear Optics », *Wiley Interscience Publication* (1984)
- [5] R.W. Boyd, « Nonlinear Optics », *Academic Press* (1992)
- [6] J.D. Jackson, « Classical Electrodynamics », Second Edition, page 308 : effets non locaux dans les matériaux
- [7] B. Bousquet, Thèse d'université de Bordeaux 1, « Spectroscopie résonante en milieu dense. Exploitation de la phase du signal dans une expérience pompe sonde », soutenue le 11 décembre 1997, n° d'ordre 1836.
- [8] R.W. Hellwarth, « Third order optical susceptibilities of liquids and solids », *Prog. Quantum Electro. Vol 5, N°1, 1-68* (1977)
- [9] Born and Wolf, « Principles of Optics », *Pergamon Press*
- [10] Agrawal, « Nonlinear fiber optics », *Optics and Photonics, Academic Press, San Diego*
- [11] R. Szipöcs, K. Ferencz, C.H. Spielmann and F. Krausz, « Chirped multilayer coatings for broadband dispersion control in femtosecond lasers », *Optics Letters, Vol. 19, Issue 3, p. 201* (1994)
- [12] N. Matuschek, F.X. Kartner and U. Keller, « Theory of double chirped Mirrors », *IEEE J. Quant. Elect., Vol. 4, N°2* (1998)
- [13] P.A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters and G. Weinreich, « Generation of optical harmonics », *Phys. Rev. Lett. 7, 118-119* (1961)
- [14] L. Moreaux, O. Sandre and J. Mertz, « Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy », *JOSA B 17, 1685-1694* (2000)
- [15] L. Canioni, L. Sarger, « Four Waves Mixing », *Book Chapter Encyclopedia of Modern Optics, Elsevier* (2004)
- [16] C. Flytzanis, « Theory of nonlinear susceptibilities », *Quantum Electronic, volume 1, p. 9-207* (1975)

- [17] M. Gu, X. Gan, A. Kisterman and M. G. Xu, « Comparison of penetration depth between two-photon excitation and single-photon excitation in imaging through turbid tissue media », *Applied Physics Letters*, Vol **77**, p. 1551-1553 (2000)
- [18] C. F. Bohern and D. R. Huffman, « Absorption and scattering of light by small particles », *J. Wiley*, New York (1983)
- [19] E. O. Potma, W. P. De Boeij and D. A. Wiersma, « Nonlinear coherent four-wave mixing in optical microscopy », *JOSA B* **17**, 1678-1684 (2000)
- [20] R. N. Bracewell, « The Fourier transform and its applications », McGraw-Hill, New York, p. 244-250 (1986)

CHAPITRE III

Microscopie par génération de tierce harmonique

INTRODUCTION

Parallèlement au progrès de la chimie et du génie génétique qui permettent une microscopie fonctionnelle et quantitative des tissus et cellules vivantes, des problèmes restent ouverts dans lesquels une microscopie cohérente non linéaire peut apporter des solutions. En effet, les problèmes d'imagerie à travers des milieux diffusants que constituent quelques 100 microns de tissus vivants mais également la difficulté de doper avec un fluorophore ces tissus sont autant de difficultés que la microscopie non linéaire peut circonscrire. La toxicité des substances chimiques qui servent d'agent de contraste et la diffusion multiple de la lumière rendent parfois l'imagerie confocale inopérante. La microscopie cohérente par mélange d'ondes, du fait de son caractère non linéaire de l'excitation permet, comme la microscopie à deux photons, une imagerie localisée au voxel représenté par la tache focale de l'onde laser focalisée. Par ailleurs en utilisant comme agent de contraste une propriété physique intrinsèque du matériau, la susceptibilité non linéaire, il est maintenant possible de réaliser des images en microscopie sans préparation particulière des échantillons. C'est le cas de la microscopie par génération de tierce harmonique (GTH) qui sera étudiée dans ce chapitre.

Dans ce type de microscopie de mélange à quatre ondes, la polarisation non linéaire est donc le mécanisme de contraste de cette microscopie. Le premier terme de cette polarisation toujours présent dans tous les matériaux indépendamment de leur symétrie est celui du troisième ordre $\chi^{(3)}$. Celui-ci mélange trois champs excitateurs par le biais de la susceptibilité non linéaire pour générer une polarisation qui oscille à la fréquence composite des champs excitateurs.

$$P_{nl}(\omega) = \overline{\chi^{(3)}} E_1 \cdot E_2 \cdot E_3 \quad (\text{III-1})$$

Des mesures de susceptibilité non linéaire ont montré que même sur des matériaux transparents de même indice de réfraction (la silice fondue) de faibles impuretés conduisaient

à plus de 30% de variation de la susceptibilité non linéaire $\chi^{(3)}$ [1]. Ces grandes différences permettent une exaltation du contraste qu'il faudra sans doute intégrer comme une nouvelle dimension dans l'interprétation des images. Du fait de la forte focalisation, le régime non linéaire de l'interaction est facilement atteint avec un laser impulsif femtoseconde délivrant de faibles puissances moyennes compatibles avec les applications en science du vivant.

Nous allons décrire dans la première partie de ce chapitre comment la polarisation non linéaire en tant qu'agent de contraste nous permet d'obtenir l'image d'un objet via la microscopie par génération de tierce harmonique (GTH) : à partir de l'équation de propagation d'une impulsion lumineuse dans un milieu non linéaire (II-31), nous allons déterminer dans un premier temps l'expression de l'onde de tierce harmonique (TH) générée lorsque le faisceau excitateur est fortement focalisé. Nous verrons ensuite dans quelles conditions peut on avoir un signal de TH selon que l'on souhaite effectuer une microscopie en champ proche ou en champ lointain. Nous montrerons que pour la microscopie en champ lointain, le signal de TH ne pourra être généré que si le faisceau laser excitateur est focalisé autour d'interfaces entre deux milieux différents. La GTH sera ensuite étudiée selon la polarisation de l'onde excitatrice. Enfin pour conclure cette partie théorique sur la microscopie par GTH, nous décrirons ses performances en terme de résolutions spatiales.

La deuxième partie de ce chapitre concerne le prototype de microscope par GTH que nous avons développé et finalisé. Nous décrirons tout d'abord les différents éléments le composant en expliquant nos choix, puis après avoir validé la configuration définitive, nous donnerons ses performances en terme de résolution et de vitesse d'acquisition d'images. Enfin nous illustrerons la potentialité du prototype de microscope par GTH par une application consistant à caractériser complètement le système de focalisation du faisceau fondamental sur l'échantillon à étudier [2].

I- PRINCIPES DE LA MICROSCOPIE GTH

La GTH est un processus de mélange à quatre ondes qui induit une polarisation à la fréquence triple du champ fondamental. Comme tout système de mélange d'onde, l'intensité de la TH dépend de façon critique de l'accord de phase. En microscopie avec un seul faisceau excitateur, nous sommes réduits à analyser l'accord ou désaccord de phase colinéaire qui s'écrit:

$$\Delta k = k(3\omega) - 3k(\omega) \quad (\text{III} - 2)$$

avec k vecteur d'onde.

Cette expression traduit la différence de vitesse de phase de l'onde harmonique générée par rapport à l'onde fondamentale. On comprend que l'accord de phase est la clef des processus de génération de mélange d'onde car il assure efficacement la construction par interférences constructives du champ harmonique. Dans la plupart des matériaux, cet accord de phase n'est pas réalisé et il est donc impossible d'avoir une intensité de troisième harmonique conséquente.

I.1- Expression de l'onde de tierce harmonique

Pour comprendre la microscopie de troisième harmonique, il faut tenir compte de la forte focalisation du faisceau. Ainsi en reprenant l'équation (II-31) en se plaçant dans l'hypothèse paraxiale et en supposant aucune déplétion de l'onde fondamentale, en négligeant les ordres supérieurs de la dispersion (propagation dans un milieu fin) nous pouvons écrire l'équation de propagation dans le cas de l'enveloppe lentement variable pour l'onde harmonique:

$$2ik_{3\omega} \frac{\partial \zeta_{3\omega}}{\partial z} + \frac{\partial^2 \zeta_{3\omega}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \zeta_{3\omega}}{\partial y^2} = -\frac{4\pi(3\omega)^2}{c^2} \chi^{(3)} \zeta_{\omega}^3 \exp(i \Delta k z) \quad (\text{III} - 3)$$

avec ζ solution de l'équation de propagation. Cette équation présente des champs scalaires. Nous sommes dans le cas où les faisceaux laser sont polarisés rectilignement. Nous considérerons cette polarisation rectiligne dans ce qui suit.

Nous considérons que le faisceau du champ fondamental a un profil transverse gaussien. Le champ de l'onde fondamentale s'exprime suivant [3] :

$$\xi_{\omega}(x, y, z) = \frac{A_{\omega}}{w_{0f} \left(1 + i \frac{2z}{b_f}\right)} \exp \left[-\frac{x^2 + y^2}{w_{0f}^2 \left(1 + i \frac{2z}{b_f}\right)} \right] \quad (\text{III-4})$$

avec

$$b_f = \frac{2\pi w_{0f}^2}{\lambda_f} = k_f w_{0f}^2 \quad (\text{III-5})$$

A_{ω} est l'amplitude de l'onde fondamentale (qui s'exprime en volts), b_f est le paramètre confocal, w_{0f} le rayon du col du faisceau focalisé pour une position en $z = 0$ dans tout ce qui suit, k_f le vecteur d'onde et λ_f la longueur d'onde de l'onde fondamentale. La figure 1 ci-dessous représente ces caractéristiques du faisceau gaussien.

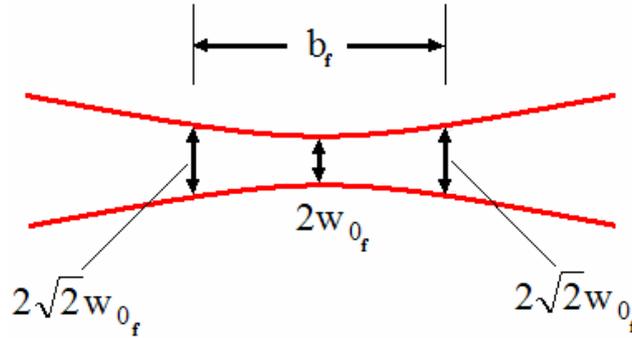


Figure 1 : Relation entre le rayon du col du faisceau w_{0f} et le paramètre confocal b_f pour un faisceau laser gaussien se focalisant.

On suppose classiquement pour l'amplitude du champ de TH la solution gaussienne suivante :

$$\zeta_{3\omega}(x, y, z) = \frac{A_{3\omega}(z)}{w_{0h} \left(1 + i \frac{2z}{b_h}\right)} \exp \left[-\frac{x^2 + y^2}{w_{0h}^2 \left(1 + i \frac{2z}{b_h}\right)} \right] \quad (\text{III-6})$$

où $A_{3\omega}(z)$ est une fonction selon z , b_h et w_{0h} étant respectivement le paramètre confocal et le rayon du col du faisceau de l'onde de tierce harmonique de longueur d'onde $\lambda_h = \lambda_f / 3$.

Résolvons l'équation (III-3) en y insérant les solutions A_{ω} et $A_{3\omega}$. Comme il apparaît que la dépendance radiale est identique de part et d'autre de l'équation, on obtient :

$$\exp\left[-\frac{x^2 + y^2}{w_{0h}^2 \left(1 + i \frac{2z}{b_h}\right)}\right] \equiv \exp\left[-\frac{3(x^2 + y^2)}{w_{0f}^2 \left(1 + i \frac{2z}{b_f}\right)}\right] \quad (\text{III-7})$$

Cela entraîne :

$$w_{0f} = \sqrt{3} w_{0h} \quad (\text{III-8})$$

et $b_f = b_h = b$

Cette solution correspond à un faisceau de tierce harmonique avec le même paramètre confocal que l'onde fondamentale. Ceci paraît logique dans le sens où l'onde harmonique est générée de façon cohérente sur une région dont le volume est égal à celui de l'onde fondamentale. Le rayon du col du faisceau de tierce harmonique est donc $\sqrt{3}$ fois plus étroit que celui de l'onde fondamentale, sa longueur d'onde étant trois fois plus courte. La divergence angulaire θ_f pour l'onde fondamentale est donnée par la relation $\theta_f = \frac{\lambda_f}{\pi w_{0f}}$. La

divergence de la TH θ_h est donc $\sqrt{3}$ fois plus faible que celle de l'onde fondamentale. Si on représente les intensités de ces deux ondes on obtient la figure 2 suivante.

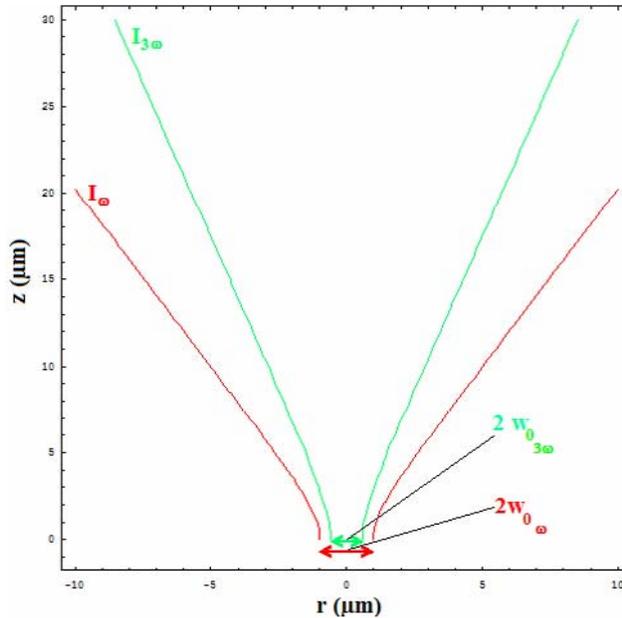


Figure 2 : Propagation des faisceaux fondamental et de tierce harmonique I_ω et $I_{3\omega}$

On obtient finalement comme solution de l'équation (III-3) la relation suivante :

$$\frac{d}{dz} A_{3\omega}(z) = \frac{2i\pi(3\omega)}{nc} \chi^{(3)} \frac{w_{0h}}{w_{0f}^3} A_\omega^3 \frac{e^{i\Delta k z}}{(1 + 2iz/b)^2} \quad (\text{III-9})$$

Cette équation peut être intégrée pour obtenir directement :

$$A_{3\omega}(z) = \frac{2i\pi(3\omega)}{nc} \chi^{(3)} \frac{w_{0h}}{w_{0f}^3} A_{\omega}^3 J_{3\omega}(\Delta k, z_0, z) \quad (\text{III-10})$$

avec n l'indice de réfraction du milieu et $J_{3\omega}$ que l'on peut associer physiquement à la longueur d'interaction effective en TH :

$$J_{3\omega}(\Delta k, z_0, z) = \int_{z_0}^z \frac{e^{i\Delta k z'} dz'}{(1 + 2iz'/b)^2} \quad (\text{III-11})$$

où z_0 est la position du début du milieu non linéaire.

I.2- Conditions de génération de l'onde de tierce harmonique

Nous avons déterminé l'expression de l'onde de tierce harmonique. Pour connaître les conditions de sa génération, il faut résoudre l'intégrale d'interaction effective $J_{3\omega}$. Nous allons voir que cette intégrale dépend de l'accord de phase Δk . Comme la plupart des matériaux présente un Δk négatif, nous décrirons qu'une GTH par un faisceau fondamental focalisé à l'intérieur d'un matériau n'est possible qu'en champ proche. Néanmoins nous démontrerons qu'en champ lointain, type de microscopie par GTH que nous souhaitons développer, l'onde de TH peut être générée si le faisceau fondamental est localisé autour d'une interface entre deux milieux.

I.2.1- Résolution de $J_{3\omega}$ suivant l'accord de phase Δk

L'intégrale $J_{3\omega}$ a comme solution générale la relation suivante :

$$J_{3\omega}(\Delta k, z_0, z) = \frac{1}{4(b + 2iz)} \left(e^{-\frac{b\Delta k}{2}} \left(\begin{array}{l} \left(\begin{array}{l} 2ib^2 e^{\frac{b\Delta k}{2} + i\Delta k z} - ib^3 \Delta k f(z) + 2b^2 \Delta k z f(z) \\ \frac{1}{b + 2iz_0} \left(ib^3 \left(-2e^{\frac{1}{2}\Delta k(b+2iz_0)} + \Delta k (b + 2iz_0) f(z_0) \right) \right) \right) \\ - \frac{1}{b + 2iz_0} \left(2b^2 z \left(-2e^{\frac{1}{2}\Delta k(b+2iz_0)} + \Delta k (b + 2iz_0) f(z_0) \right) \right) \right) \end{array} \right) \right) \quad (\text{III-12})$$

avec

$$\begin{aligned} f(u) &= E_i \left[\frac{b \Delta k}{2} + i \Delta k u \right] \text{ pour } u < 0 \\ f(u) &= E_i \left[\frac{b \Delta k}{2} + i \Delta k u \right] + 2i\pi \text{ pour } u \geq 0 \end{aligned} \quad (\text{III-13})$$

E_i est une fonction exponentielle intégrale donnée par :

$$E_i(z) = \int_{-z}^{+\infty} \frac{e^{-z'}}{z'} dz' \quad (\text{III-14})$$

Si le rayon du col du faisceau de l'onde fondamentale est à la position $z_0 = 0$ du milieu non linéaire, la longueur d'interaction effective s'écrit alors :

$$J_{3\omega}(\Delta k, z) = \frac{1}{4(b + 2iz)} \left(e^{-\frac{b\Delta k}{2}} \left(2ib^2 e^{\frac{b\Delta k}{2} + i\Delta k z} - ib^2 e^{-\frac{b\Delta k}{2}} \left(2 - b\Delta k e^{-\frac{b\Delta k}{2}} E_i \left[\frac{b\Delta k}{2} \right] \right) \right) + 2be^{\frac{b\Delta k}{2}} z \left(2 - b\Delta k e^{-\frac{b\Delta k}{2}} E_i \left[\frac{b\Delta k}{2} \right] \right) - ib^3 \Delta k e^{-\frac{b\Delta k}{2}} E_i \left[\frac{b\Delta k}{2} + i\Delta k z \right] + 2b^2 \Delta k z E_i \left[\frac{b\Delta k}{2} + i\Delta k z \right] \right) \quad (\text{III-15})$$

L'intégrale $J_{3\omega}$ a une solution assez complexe mais peut être simplifiée plus facilement pour certains cas particuliers.

- Si $b \gg |z|, |z_0|$, la solution pour une onde plane doit être retenue :

$$J_{3\omega}(\Delta k, z_0, z) = \int_{z_0}^z e^{i\Delta k z'} dz' = \frac{e^{i\Delta k z} - e^{i\Delta k z_0}}{i\Delta k} \quad (\text{III-16})$$

ce qui implique que :

$$|J_{3\omega}(\Delta k, z_0, z)|^2 = L^2 \text{sinc}^2 \left(\frac{\Delta k L}{2} \right) \quad (\text{III-17})$$

avec $L = z - z_0$, la longueur de la région d'interaction.

- Si $b \ll |z|, |z_0|$, c'est-à-dire lorsque l'onde fondamentale est focalisée dans le milieu non linéaire, l'intégrale $J_{3\omega}$ peut se rapprocher à :

$$J_{3\omega}(\Delta k, z_0, z) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{e^{i\Delta k z'}}{(1 + 2iz'/b)^2} dz' \quad (\text{III-18})$$

Cette intégrale (III-18) peut être évaluée via son contour d'intégration (relation de Cauchy) [4]. On obtient :

$$J_{3\omega}(\Delta k) = \begin{cases} 0 & \text{si } \Delta k \leq 0 \\ 2\pi \frac{b}{2} \left(\frac{b\Delta k}{2} \right) e^{-b\Delta k/2} & \text{si } \Delta k > 0 \end{cases} \quad (\text{III-19})$$

La forme de cette fonction $J_{3\omega}$ (III-19) est illustrée sur la figure 3 pour différentes focalisations. On observe que $J_{3\omega}$ est maximale pour un désaccord de phase positif et nulle pour un désaccord de phase négatif (cas d'une dispersion normale du matériau). Ce comportement particulier provient de la phase de Gouy du faisceau laser focalisé qui correspond au changement de courbure du front d'onde lorsque l'on se place de part et d'autre du col du faisceau.

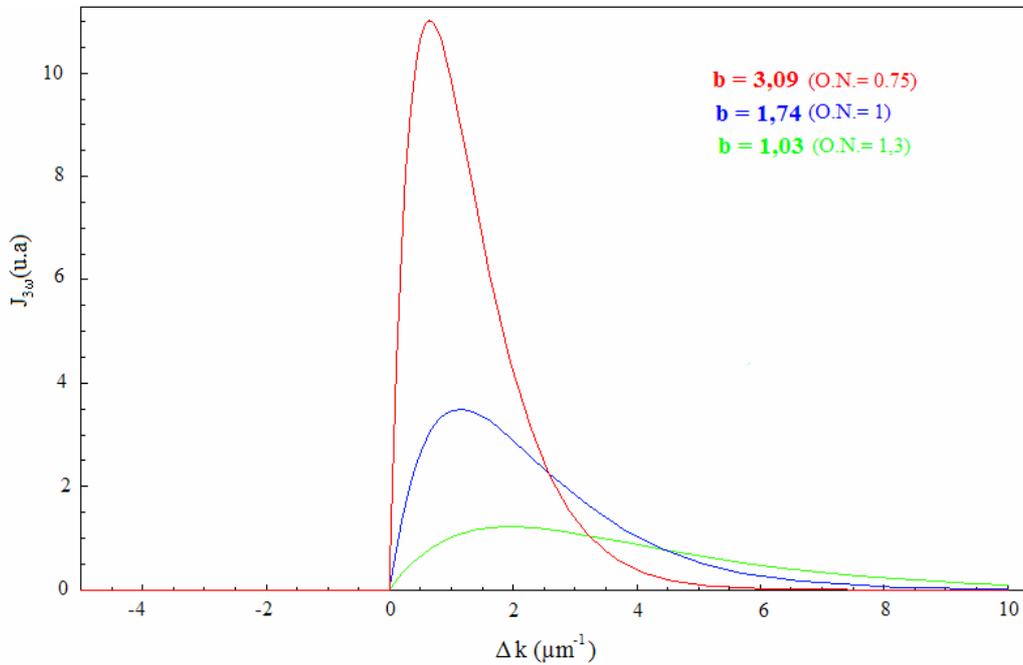


Figure 3 : Dépendance de la longueur d'interaction effective en tierce harmonique $J_{3\omega}$ par rapport au désaccord de phase Δk pour différents paramètres confocaux b de l'onde incidente.

En champ lointain, l'amplitude de l'onde de TH pour un faisceau focalisé à l'intérieur d'un matériau ayant un Δk négatif est donc nulle. Il faut noter que la plupart des matériaux présente un Δk négatif. Mais si on représente cette onde en champ proche, soit pour $b \gg |z|$, on obtient le diagramme d'émission de l'intensité de TH en fonction de $r = (x^2 + y^2)^{1/2}$ et de z dans un milieu non linéaire où $\Delta k < 0$ (voir figure 4).

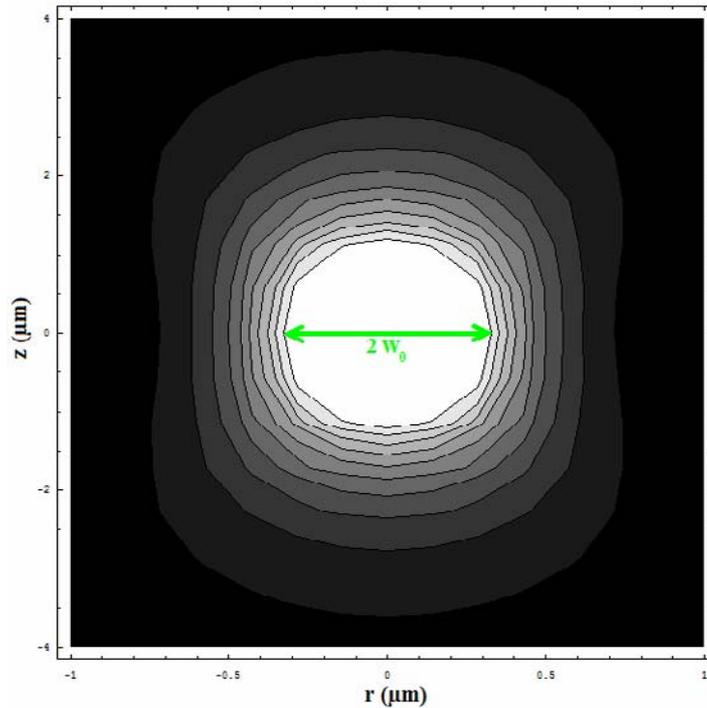


Figure 4 : Diagramme d'émission $I_{3\omega}$ en fonction de r et de z dans un milieu non linéaire où $\Delta k < 0$.

En champ proche, on observe une intensité maximale du signal puis une diminution de part et d'autre du col du faisceau par interférences destructives entre ces deux zones.

Une possibilité d'utiliser le processus de GTH comme moyen d'imagerie serait donc de faire de la microscopie en champ proche puisque les matériaux présentent des désaccords de phase négatifs.

Cette technique a été réalisée pour la première fois par R.D. Schaller, J.C. Johnson et R.J. Saykally [5] en 2000 où ils ont effectué une imagerie par GTH des globules rouges humains en utilisant la technique de microscopie en champ proche par balayage optique (ou NSOM pour « *Near-field Scanning Optical Microscopy* »). Cette technique apparaît efficace mais le protocole expérimental apparaît complexe.

I.2.2- Génération de tierce harmonique à l'interface de deux milieux

En champ lointain, nous avons vu que la GTH à l'intérieur d'un matériau à dispersion normale est nulle par interférences destructives. Par contre, nous allons voir que lorsque le matériau présente une interface entre deux milieux différents - soit par leurs propriétés linéaires et/ou non linéaires, soit pour des indices de réfraction n différents ou encore pour des susceptibilités non linéaires d'ordre 3 différentes-, l'intensité de TH n'est pas nulle, même

avec un $\Delta k < 0$ (figure 5). En effet le phénomène d'interférences de part et d'autre du col du faisceau n'est plus complètement destructif.

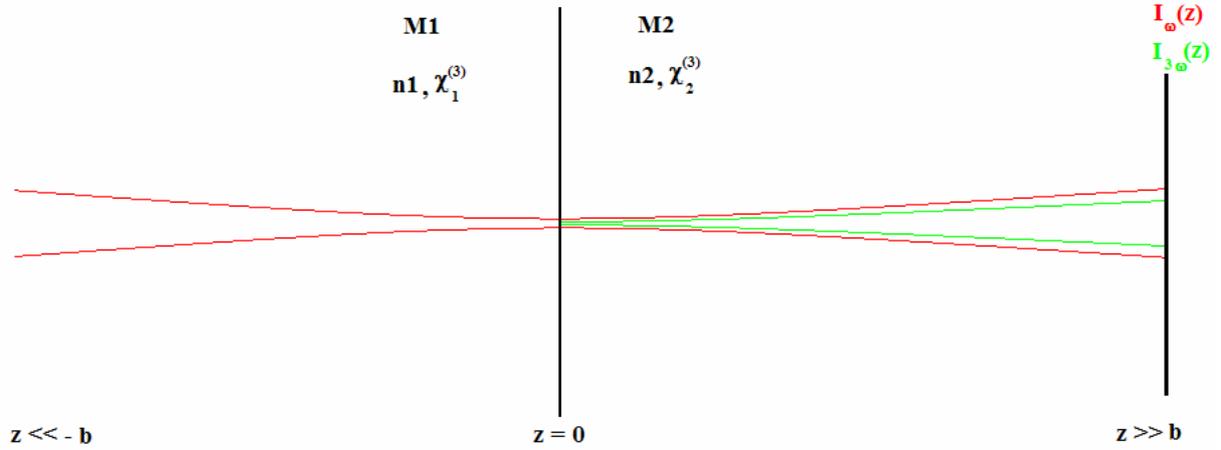


Figure 5 : Propagation de l'onde de tierce harmonique lorsque le rayon de col du faisceau fondamental w_{0f} est localisé à l'interface de deux milieux différents ayant tous deux un désaccord de phase négatif.

Considérons à la position d'observation $z \gg b$, les contributions des milieux M1 et M2 à l'onde de TH.

$$\begin{aligned} E_{M1} &= \zeta_{3\omega}^{(1)}(x, y, z) e^{i(\omega t - k_{3\omega}^{(1)} z)} \\ E_{M2} &= \zeta_{3\omega}^{(2)}(x, y, z) e^{i(\omega t - k_{3\omega}^{(2)} z)} \end{aligned} \quad (\text{III} - 20)$$

avec $\zeta_{3\omega}^{(i)}$ l'amplitude des champs générés autour de $z = 0$ dans les deux milieux et observé en z , définie ci-dessous.

$$\zeta_{3\omega}^{(1)}(x, y, z) = g(x, y, z) \frac{\chi_1^{(3)}}{n_1} A_\omega^3 \int_{-\infty}^0 \frac{e^{i\Delta k_1 z'} dz'}{(1 + 2iz'/b)^2} = g(x, y, z) \frac{\chi_1^{(3)}}{n_1} A_\omega^3 J_{3\omega}^{(1)} \quad (\text{III} - 21)$$

et

$$\zeta_{3\omega}^{(2)}(x, y, z) = g(x, y, z) \frac{\chi_2^{(3)}}{n_2} A_\omega^3 \int_0^{+\infty} \frac{e^{i\Delta k_2 z'} dz'}{(1 + 2iz'/b)^2} = g(x, y, z) \frac{\chi_2^{(3)}}{n_2} A_\omega^3 J_{3\omega}^{(2)} \quad (\text{III} - 22)$$

où $g(x, y, z)$ représente la distribution gaussienne de l'onde :

$$g(x, y, z) = \frac{2i\pi(3\omega)}{c} \frac{1}{w_{0f}^3 \left(1 + i \frac{2z}{b}\right)} \exp \left[-\frac{x^2 + y^2}{w_{0h}^2 \left(1 + i \frac{2z}{b}\right)} \right] \quad (\text{III} - 23)$$

On obtient finalement en $z \gg b$ le champ de TH suivant :

$$E_{3\omega} = E_{M1} + E_{M2} = g(x, y, z) A_{\omega}^3 \left(\frac{\chi_1^{(3)}}{n_1} J_{3\omega}^{(1)} + \frac{\chi_2^{(3)}}{n_2} J_{3\omega}^{(2)} \right) e^{i(\omega t - k_{3\omega} z)} \quad (\text{III} - 24)$$

Ainsi puisqu'on mesure l'intensité de TH, on obtient :

$$I_{3\omega} = \frac{1}{2} c \varepsilon_0 |E_{3\omega}|^2 = \frac{1}{2} c \varepsilon_0 |E_{M1} + E_{M2}|^2$$

$$I_{3\omega} = \frac{1}{2} c \varepsilon_0 |g(x, y, z)|^2 A_{\omega}^6 \left| \frac{\chi_1^{(3)}}{n_1} J_{3\omega}^{(1)} + \frac{\chi_2^{(3)}}{n_2} J_{3\omega}^{(2)} \right|^2 \quad (\text{III} - 25)$$

On peut donc voir que dans le cas général où l'onde du faisceau fondamental est focalisée au niveau d'une interface entre deux milieux différents avec chacun un désaccord de phase négatif, l'intensité de TH n'est pas nulle lorsqu'on se place en champ lointain. Il est à noter que l'intégrale d'interaction effective $J_{3\omega}$ est un nombre complexe et ne présente pas de simplifications dans l'équation (III-25). Tous les schémas d'interférences constructives ou destructives sont possibles du fait de la nature complexe de $J_{3\omega}$.

Cette équation (III-25) peut être cependant simplifiée pour deux cas particuliers :

- interface air - matériau semi-infini : dans le cas où le premier milieu traversé est de l'air on peut considérer que la susceptibilité non linéaire d'ordre 3 est nulle. L'équation précédente est alors réduite à l'expression suivante :

$$I_{3\omega} = \frac{1}{2} c \varepsilon_0 |g(x, y, z)|^2 A_{\omega}^6 \left| \frac{\chi_2^{(3)}}{n_2} J_{3\omega}^{(2)} \right|^2 \quad (\text{III} - 26)$$

La figure 6 représente le diagramme d'émission de l'onde de TH dans le cas d'une interface air – silice. On peut bien y voir que le phénomène d'interférences de part et d'autre du col du faisceau n'est plus destructif et on peut également noter l'aspect cohérent de la propagation avec une divergence de la TH inférieure à celle de l'onde fondamentale. La conséquence expérimentale est que le système de collection du signal harmonique pourra avoir une ouverture numérique $\sqrt{3}$ fois plus faible que celle de l'excitation.

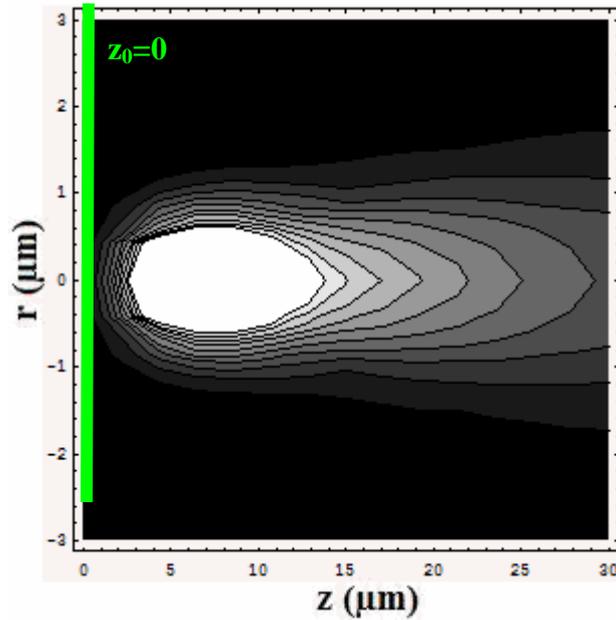


Figure 6 : Diagramme d'émission $I_{3\omega}$ en fonction de r et de z lorsque le faisceau fondamental est focalisé au niveau d'une interface air-silice, en $z=0$.

- interface entre deux milieux d'indice de réfraction identiques mais avec des $\chi^{(3)}$ différents : ce cas est typiquement le cas dans la plupart des tissus biologiques notamment dans les cellules. On peut donc simplifier la relation (III-25) puisqu'on a alors $n_1 = n_2 = n$ et $J_{3\omega}^{(1)} = -J_{3\omega}^{(2)}$. L'intensité de TH s'exprime donc :

$$I_{3\omega} = \frac{1}{2} c \epsilon_0 |g(x, y, z)|^2 I_{\omega}^3 \frac{1}{n^2} |J_{3\omega}^{(1)}|^2 |\chi_1^{(3)} - \chi_2^{(3)}|^2 \quad (\text{III} - 27)$$

Intéressons nous à présent à la dépendance du signal suivant la position de l'interface. Si on déplace l'interface z_0 autour du rayon du col du faisceau exciteur w_{0f} , voir figure 7, on voit sur la figure 8 que l'intensité $I_{3\omega}$ est maximale lorsque l'interface z_0 est placée à la même position que w_{0f} soit en $z = 0$.

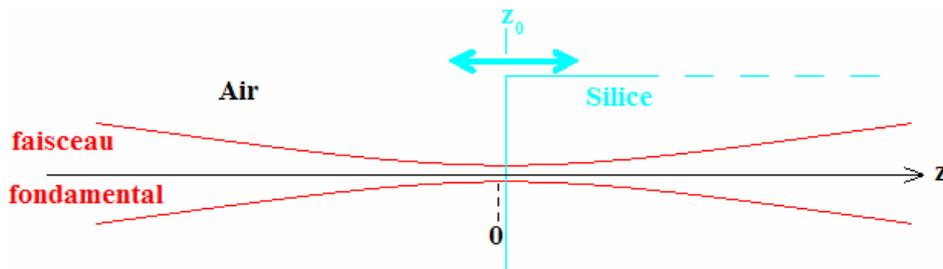


Figure 7 : Déplacement de l'interface air – silice autour du rayon du col du faisceau fondamental en $z=0$.

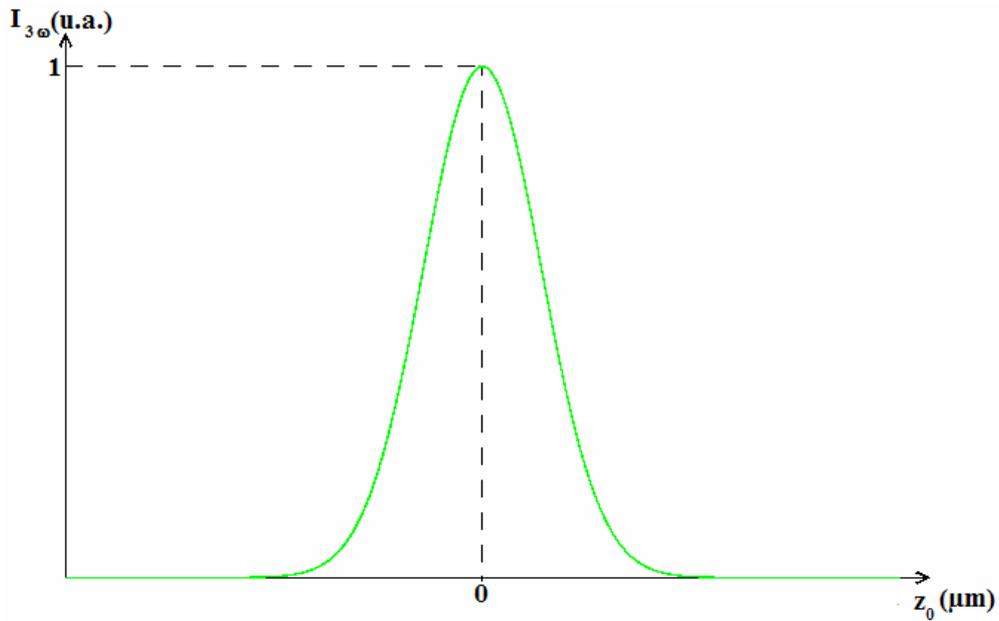


Figure 8 : Intensité de la tierce harmonique générée lorsqu'on déplace l'interface z_0 autour du rayon du col du faisceau w_{0f} .

Toute la dépendance axiale du signal est comprise dans la fonction $J_{3\omega}$.

I.3- Effet de la polarisation du faisceau fondamental sur la GTH

Dans les paragraphes précédents nous avons étudié la GTH pour un faisceau polarisé rectilignement. Que se passe t'il si le faisceau fondamental est polarisé circulairement ?

Le champ du faisceau fondamental \mathbf{E}_ω polarisé circulairement a la forme suivante :

$$\mathbf{E}_\omega = \begin{pmatrix} E_0 \\ i E_0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{III} - 28)$$

avec E_0 l'amplitude du champ.

Les matériaux sont pour la plupart isotropes. Le tenseur de susceptibilité non linéaire d'ordre trois $\chi^{(3)}$ a d'après les conditions de symétries de Kleinman [3] 21 éléments non nuls dont seulement trois éléments indépendants :

$$\begin{aligned}
yyzz = zzyy = zzxx = xxzz = xxyy = yyxx &= \frac{\sigma}{3} \\
yzyz = zyzy = zxzx = xzxx = xyxy = yxyx &= \frac{\sigma}{3} \\
yzzz = zyyz = zxxx = xzzx = xyyx = yxxy &= \frac{\sigma}{3}
\end{aligned} \tag{III-29}$$

et

$$xxx = yyy = zzz = xxyy + xyxy + xyxx = \sigma \tag{III-30}$$

La polarisation non linéaire P_{nl} induite par le matériau est alors égale à :

$$\begin{aligned}
P_{nl} &= \chi^{(3)} \cdot E_{\omega} \cdot E_{\omega} \cdot E_{\omega} \\
P_{nl} &= \begin{pmatrix} -\frac{2}{3}E_0^3\sigma + E_0 \left(E_0^2\sigma - \frac{E_0^2\sigma}{3} \right) \\ \frac{2}{3}iE_0^3\sigma + iE_0 \left(\frac{E_0^2\sigma}{3} - E_0^2\sigma \right) \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}
\end{aligned} \tag{III-31}$$

La polarisation non linéaire induite par le matériau est donc nulle si le faisceau fondamental est polarisé circulairement. Il ne pourra pas donc y avoir de génération de tierce harmonique.

Si le matériau présente une structure cristalline, la polarisation non linéaire n'est plus nulle car les termes diagonaux du tenseur ne sont plus égaux au triple des termes non diagonaux. La GTH peut avoir lieu si le faisceau fondamental est focalisé sur une interface du matériau. On peut donc en jouant sur la polarisation du faisceau laser fondamental obtenir des informations structurelles sur le matériau étudié [6,7].

I.4- Performances : résolutions spatiales

La propriété fondamentale d'une microscopie non linéaire telle que la microscopie par GTH est une très grande résolution spatiale dans les trois dimensions comme nous l'avons par ailleurs décrit dans le chapitre 2, paragraphe III.2.2. Ainsi nous pouvons rappeler les valeurs dans l'approximation gaussienne de w_{zf} et de w_{of} , ainsi que le voxel d'excitation V_{ϕ} de l'onde fondamentale focalisée dépendant de ces deux paramètres :

$$\begin{cases} w_{0f} \approx 0,518\lambda_f/n \sin\alpha \\ w_{zf} \approx 0,76\lambda_f/n(1 - \cos\alpha) \end{cases} \quad (\text{III} - 32)$$

et

$$V_\phi = \left(\frac{\pi}{3}\right)^{3/2} w_{0f}^2 w_z \quad (\text{III} - 33)$$

avec λ_f la longueur d'onde du faisceau fondamental, n l'indice de réfraction du milieu focalisé et α le demi angle d'ouverture de l'objectif. (On rappelle que $ON = n \sin\alpha$).

Intéressons nous à la distribution du champ de TH suivant la taille de l'objet à analyser.

Dans le cas général où l'objet est beaucoup plus grand que le col du faisceau fondamental, la résolution optique de l'image de GTH obtenue sera suivant les paramètres du faisceau de TH qui est supposé gaussien (III-6) La résolution correspond au volume d'émission de tierce harmonique. Pour la résolution transverse (largeur à mi-hauteur de l'intensité TH), on a:

$$\Delta r = \frac{1,06 \lambda_h}{ON} \quad (\text{III} - 34)$$

Pour calculer la résolution axiale, c'est la longueur d'interaction effective $J_{3\omega}$ (expression (III-15)) que l'on doit considérer. Pour une interface air-silice la résolution est donnée par un développement limité de l'expression J et nous obtenons une résolution à mi-hauteur :

$$\Delta z = \frac{1,34 \lambda_h}{ON^2} \quad (\text{II} - 35)$$

La résolution dans ce cas est similaire a celle obtenue en imagerie de fluorescence par sa dépendance suivant l'ouverture numérique.

Si l'objet est beaucoup plus petit que le volume d'émission, il n'y a plus de phénomène d'interférences dans la zone d'émission. Seule l'intensité de la TH de l'objet contribue au signal. L'objet étant supposé quasi ponctuel, il émet en champ lointain une onde sphérique. Dans ce cas la résolution attendue est la même que celle obtenue en imagerie incohérente de fluorescence. C'est le volume d'excitation qui compte. Soit pour la résolution transverse :

$$\Delta r = \frac{1,49 \lambda_h}{ON} \quad (\text{III} - 36)$$

Pour la résolution axiale, on obtient :

$$\Delta z = \frac{2,53 \lambda_h}{ON^2} \quad (\text{III} - 37)$$

La résolution est moins bonne suivant z car le phénomène d'interférence destructive qui réduit artificiellement la zone d'émission n'a plus lieu d'être dans ce cas.

Considérons à présent un objet de taille comparable au col du faisceau fondamental focalisé, comme schématisé sur la figure 9.

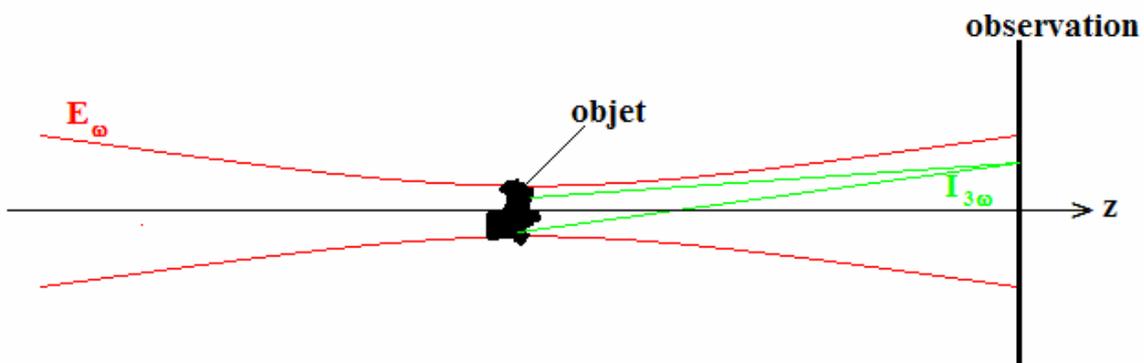


Figure 9 : Distribution du signal de tierce harmonique pour un objet de taille comparable au col du faisceau fondamental focalisé.

Dans ce cas la résolution est intermédiaire entre ces deux cas extrêmes et un calcul exact est nécessaire. On remarque dans cette hypothèse que les diverses contributions de l'objet à la GTH doivent être prise en compte en tenant compte du déphasage lié à la propagation des ondes fondamentale et harmonique jusqu'au plan d'observation pour tout les points de l'objet. De grandes variations sur l'intensité de GTH peuvent être observées en modifiant très légèrement la topologie de l'objet ou sa taille car les interférences modulent fortement le signal. [8]

Notre modèle pour décrire ici le principe de la microscopie par génération de tierce harmonique est basé sur le modèle gaussien. Bien que ce modèle ne soit vrai que pour une faible focalisation du faisceau fondamental (soit pour un objectif ayant une ouverture numérique inférieure à 0,7), pour de plus fortes focalisations, il faudrait en fait se baser sur la théorie de la diffraction totale [9,10]. Le modèle gaussien nous donne cependant une valeur

correspondant approximativement à 85 % de la résolution réelle donnée par la théorie de diffraction totale [11]. Il est donc suffisant pour illustrer et comprendre le principe physique utilisé en microscopie de génération de tierce harmonique.

II- MISE EN ŒUVRE D'UN PROTOTYPE DE MICROSCOPE PAR GTH

Nous souhaitons réaliser un microscope par GTH ayant comme caractéristiques sa fiabilité, sa simplicité d'utilisation, et avec un temps d'acquisition rapide.

Nous verrons ci-après la description expérimentale d'un tel microscope où les différents éléments composant ce prototype seront décrits et leurs caractéristiques explicitées.

Dans un second temps nous validerons notre microscope par génération de tierce harmonique en donnant ses différentes performances. Nous proposerons enfin en guise d'application une technique d'analyse par GTH permettant de choisir efficacement les optiques de focalisation dans un microscope dont le mécanisme de contraste repose sur l'optique non linéaire.

II.1- Réalisation et choix des éléments du prototype

La microscopie par GTH est une technique non linéaire cohérente. Le signal TH se propage dans la même direction que le faisceau excitateur contrairement aux techniques de microscopies de fluorescence un ou deux photons où l'émission incohérente est isotrope. Ceci implique que la détection s'effectue en général par transmission pour une détection maximale. Le principe de la microscopie GTH est illustré sur la figure 10 suivante :

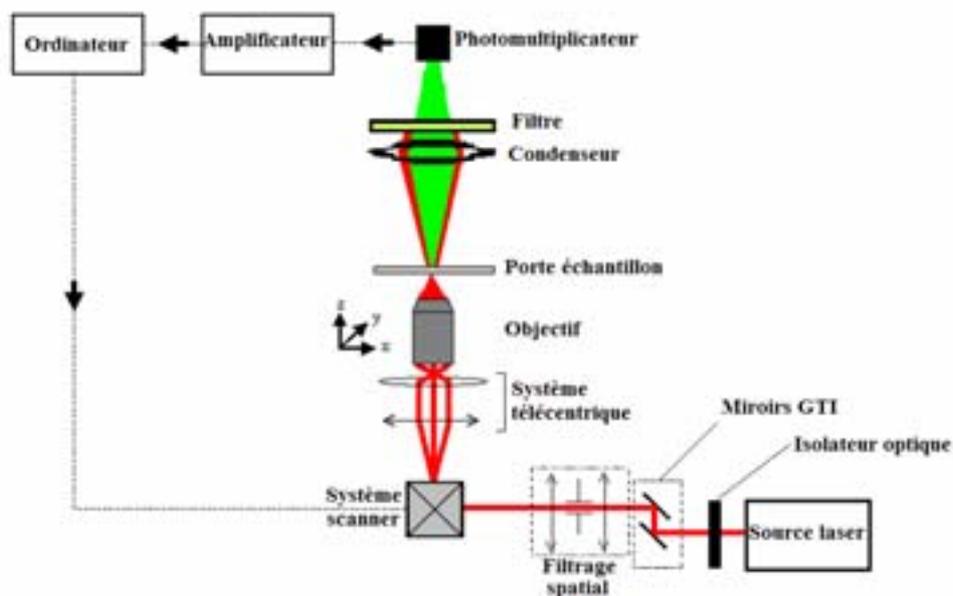


Figure 10 : Principe du microscope par génération de tierce harmonique.

Une source laser femtoseconde (qui sera décrite dans le paragraphe II.1.1) émet un faisceau, que nous avons précédemment appelé onde fondamentale, qui traverse dans un premier temps un isolateur optique. Ceci empêche qu'une partie même infime du faisceau ne puisse se réfléchir vers la cavité laser. Ce dispositif est très important car si le faisceau revient dans l'oscillateur celui-ci déstabilise le régime impulsif. En conséquence, les régimes de fonctionnement du laser n'étant plus contrôlés, la GTH peut ne pas avoir lieu et en outre l'échantillon peut être endommagé.

Le faisceau se réfléchit ensuite sur deux miroirs GTI (GTI : « *Gires Tournois Interferometer* ») qui vont compenser l'élargissement des impulsions qu'induisent la traversée des différentes optiques. Nous expliquerons le choix de tels miroirs GTI dans le paragraphe II.1.2.

Après la traversée d'un système de filtrage spatial qui permet d'obtenir une forme de faisceau optimale pour la focalisation, l'onde va se réfléchir sur une paire de miroirs galvanométriques qui constituent la partie optique du système scanner que nous avons développé. Ce système sera décrit dans le paragraphe II.1.3.

Le faisceau défléchi suivant les coordonnées (x, y) pénètre dans le châssis du microscope puis se focalise sur l'échantillon via un objectif. Le faisceau fondamental et le faisceau de tierce harmonique généré et transmis par l'échantillon sont ensuite collectés puis filtrés. Le faisceau de TH est transmis jusqu'au système de détection alors que le faisceau fondamental est totalement absorbé. Les différents éléments du microscope seront vus dans le paragraphe II.1.4. Le système de détection ainsi que la méthode de détection utilisée pour notre prototype seront étudiés dans le paragraphe II.1.5.

Les données expérimentales en chaque point de l'échantillon nous permettent de reconstruire une image en TH. L'ordinateur nous permet d'enregistrer et d'afficher ces images ainsi que de piloter le système scanner et de contrôler les paramètres du microscope. Ceci sera montré dans le paragraphe II.1.6.

II.1.1- La source laser

La microscopie non linéaire (microscopies de fluorescence multiphotonique, microscopies de fluorescence résolues temporellement, microscopies par mélange à quatre ondes par exemple) nécessite en général l'utilisation de sources laser intenses impulsives de faible puissance moyenne et de haute récurrence pour pouvoir acquérir des images

rapidement. Ces critères ont poussé la communauté vers l'utilisation d'oscillateurs femtosecondes.

Quelles sont les caractéristiques essentielles que doivent avoir ces sources ?

- une grande fiabilité et compacité : il faut de faibles fluctuations entre deux impulsions et une stabilité de pointage et de puissance moyenne sur le long terme pour une acquisition d'images
- Une accordabilité : celle-ci est souvent nécessaire pour adapter la longueur d'onde lors d'utilisation de divers fluorophores ou pour obtenir des mélanges de fréquence.
- Une adaptation de la récurrence de la source à la durée de vie du processus étudié qui est parfois souhaitée.
- Une modification de la durée de l'impulsion parfois nécessaire pour certaines applications.

Une source répondant à tous ces critères en conservant une simplicité d'utilisation n'est pour l'instant pas disponible. Néanmoins de nouveaux oscillateurs répondant à quelques uns de ces critères ont vu le jour récemment. Nous vous présentons ci-après une source que nous avons intégrée dans notre prototype de microscopie par GTH.

L'oscillateur T-pulse développé par la société Amplitude Systèmes est une source laser compacte et fiable, particulièrement bien adaptée à la microscopie multiphotonique.

Cette source est construite autour d'un milieu amplificateur cristallin Yb :KGW. Ce matériau dopé Ytterbium (Yb) est utilisé en raison de ses prédispositions au blocage de mode passif. Les matériaux dopés à l'Ytterbium présentent en effet une faible charge thermique et leur large bande d'émission et d'absorption en font des bons candidats respectivement pour la génération d'impulsions femtosecondes et le pompage par diodes. Il faut cependant noter que les matériaux dopés Yb (modèle quasi trois niveaux [12]) présentent une population thermique importante dans le niveau laser bas ayant pour conséquences des seuils laser élevés.

Nous rappelons ici brièvement les caractéristiques de cet oscillateur. Les détails de cette source sont exposés dans la thèse d'Antoine Courjaud « Réalisation de sources lasers femtosecondes pompées par diode basées sur l'ion Ytterbium » [13, 14]. Nous décrirons ici la configuration optique de cet oscillateur femtoseconde, son principe de fonctionnement et ses éléments importants.

a) Configuration optique

L'oscillateur T-pulse peut être schématisé comme sur la figure 11 suivante :

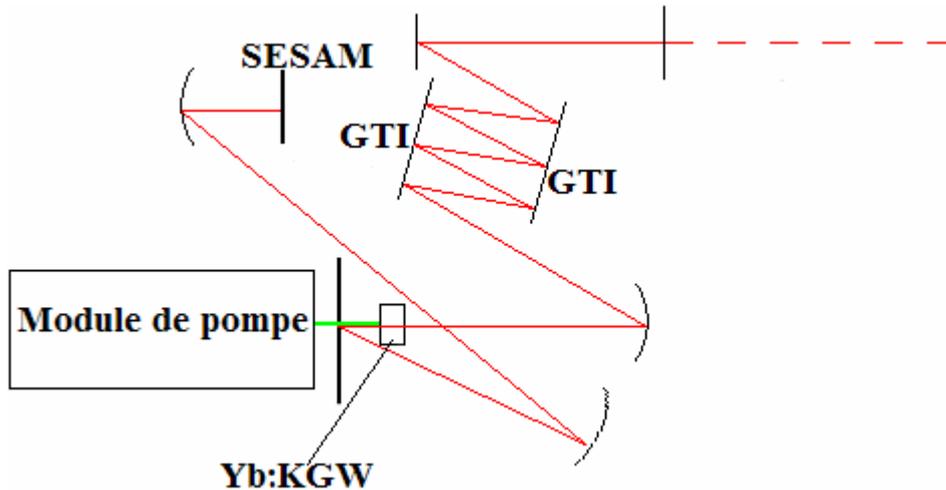


Figure 11 : Configuration optique de la cavité Yb:KGW de l'oscillateur T-pulse.

Le module de pompe est une diode fibrée de puissance maximale 15W émettant un faisceau continu à une longueur d'onde de 980 nanomètres. Celui-ci est focalisé à travers un miroir dichroïque et absorbé par le cristal Yb:KGW. Ce cristal fluoresce à la longueur d'onde de 1030 nanomètres et l'effet laser est obtenu dans au sein d'une cavité linéaire à compensation d'astigmatisme.. Le mode de fonctionnement impulsionnel du laser est obtenu grâce à un un miroir non linéaire agissant comme un absorbant saturable placé en fond de cavité (*SESAM* : « *SEmiconductor Saturable Absorber Mirror* », soit absorbant semi conducteur saturable) [15]. Cette cavité laser comporte également un ensemble de miroir GTI (*GTI* : « *Gires Tournois Interferometer* »)[16] qui permettent de compenser au mieux la dispersion globale de la cavité, assurant ainsi une compression optimale des impulsions générées. La sortie de l'oscillateur se situe au niveau du coupleur de sortie qui transmet 8% de l'énergie intra cavité.

b) Caractéristiques de l'ion Ytterbium Yb^{3+} dans la matrice KGW

L'ion Ytterbium Yb^{3+} possède une structure électronique de type quasi-trois niveaux ce qui signifie que l'on pompe le sous niveau fondamental du niveau excité (Un modèle quasi-quatre niveau classique, Ti:Sa par exemple, correspond à un pompage d'un sous niveau

supérieur). La population thermique du niveau bas de la transition laser est suffisamment importante à cause du faible écart énergétique pour qu'il se produise une réabsorption à la longueur d'onde de pompe (voir la figure 12). Ceci implique pratiquement un pompage fort.

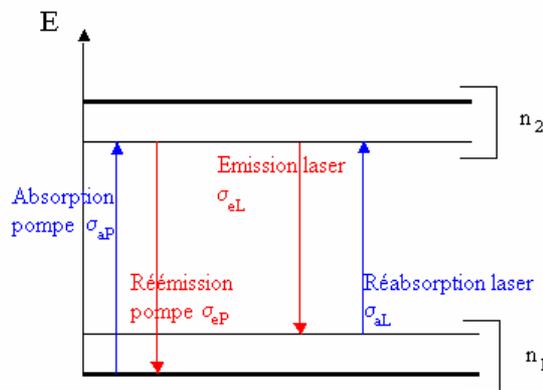
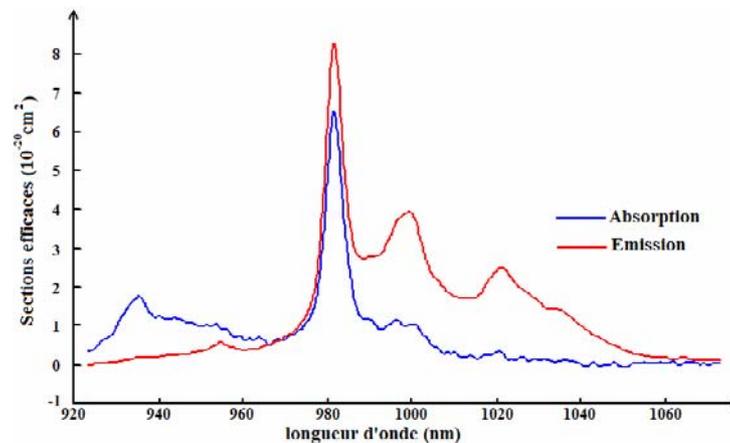


Figure 12 : Spectres d'absorption et d'émission du Yb:KGW. b) niveaux d'énergie d'un matériau dopé Ytterbium, modèle électronique quasi-trois niveaux.

c) Principe de fonctionnement de l'oscillateur

L'oscillateur repose sur le principe du blocage de modes. Il est intéressant de rappeler les généralités le concernant : dans son fonctionnement le plus commun, un laser oscille simultanément sur toutes les fréquences de résonance de la cavité ($\nu_q \approx q.c/2L$ où q est un entier, c la vitesse de la lumière et L la longueur de la cavité) pour lesquelles le gain non saturé est supérieur aux pertes de la cavité : ces fréquences constituent les modes longitudinaux du laser. Dans le fonctionnement multimode libre du laser (modes longitudinaux qui satisfont la condition gain non saturé supérieur aux pertes de cavité), les différents modes longitudinaux sont généralement en compétition pour extraire l'énergie des

atomes ou molécules du milieu amplificateur par émission stimulée. Cette compétition est responsable de grandes fluctuations de l'intensité instantanée du laser (voir la figure 13.a). Le but du blocage de modes est d'organiser des compétitions de sorte que les phases relatives des modes restent fixes, ou, ce qui est équivalent par transformée de Fourier, de sorte que l'intensité du laser soit constituée d'une série périodique d'impulsions résultant d'allers-retours d'une impulsion dans la cavité. Une idée qui peut être exploitée pour réaliser cette condition est aisément comprise dans le domaine temporel : puisqu'il existe en fonctionnement libre des pics d'intensité dans la cavité du laser, surintensités qui correspondent au battements intermodes de la cavité libre. Naturellement, la période de ces battement est un multiple du temps d'aller retour, (soit $2L/c$). Il est possible de concentrer temporellement l'énergie du laser en introduisant dans la cavité un milieu non linéaire ou un autre système favorisant les intensités les plus fortes. Dans les allers-retours de l'onde dans la cavité, les pics initiaux se renforcent au détriment des pics les plus faibles valeurs en raison des compétitions dans le milieu amplificateur. Si les conditions sont suffisamment bien choisies -et contrôlées-, on peut aboutir à une situation où une seule impulsion concentre toute l'énergie de l'onde dans la cavité (figure 13.b). On est en situation de blocage de modes : la sélection dans le domaine temporel d'un pic d'intensité dans la cavité est strictement équivalente à l'établissement dans le domaine fréquentiel de relations entre les phases des modes longitudinaux.

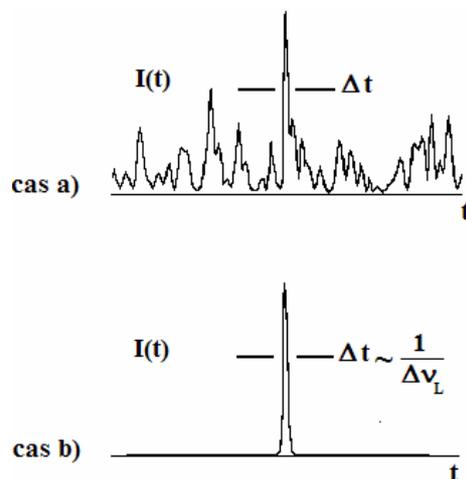


Figure 13 : Représentation de l'intensité instantanée d'un laser fonctionnant a) à un régime à modes libres, b) à un régime à modes bloqués.

Les méthodes de blocage de modes sont soit passives (dans lesquelles un absorbant saturable est introduit dans la cavité pour sélectionner une seule impulsion dans la cavité), soit actives (dans lesquelles on module à une fréquence Ω les pertes de la cavité ou le gain du milieu amplificateur).

L'oscillateur T-pulse fonctionne en régime impulsif par la méthode de blocage de modes passif. L'absorbant saturable choisi pour générer les impulsions est un absorbant semi-conducteur : le SESAM. En modes bloqués, la forte intensité donne lieu à une automodulation de phase (due à l'effet Kerr) génère de nouvelles composantes spectrales. La dispersion négative introduite dans la cavité par les miroirs GTI compense davantage le déphasage de toutes ces composantes que la dispersion positive imposée majoritairement par le cristal Yb:KGW. La durée réelle de l'impulsion vient de l'équilibre intra cavité et est donnée par le régime soliton. [12].

d) SESAM : *SE*miconductor *S*aturable *A*bsorber *M*irror

Le SESAM est l'élément qui génère et stabilise les impulsions dans la cavité: c'est un miroir à coefficient de réflexion non linéaire.

Cet élément est assemblé à partir de matériaux semi-conducteurs. Il est composé d'un miroir de Bragg large bande hautement réfléchissant sur lequel est déposée une (ou plusieurs) fine couche de matériau absorbant autour de $1\mu\text{m}$ comme l'illustre schématiquement la figure 14 suivante.

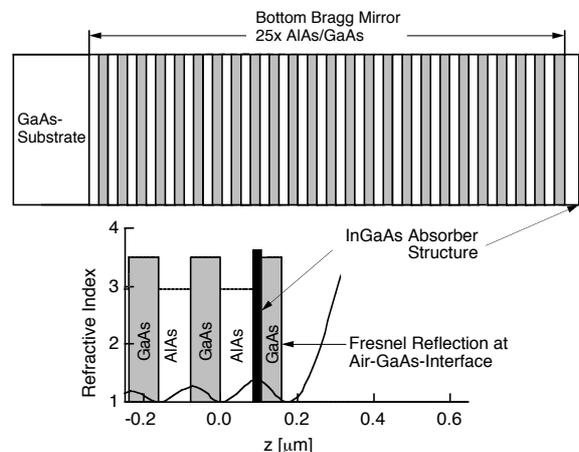


Figure 14 : Principe schématique d'un SESAM.

Pour comprendre le fonctionnement du blocage de modes passif plaçons nous dans le domaine temporel. D'après les caractéristiques de la transmission d'un absorbant saturable (tel le SESAM) et du gain du milieu amplificateur (le cristal) présentées dans la figure 15 suivante, nous pouvons étudier comment se forme une impulsion dans la cavité.

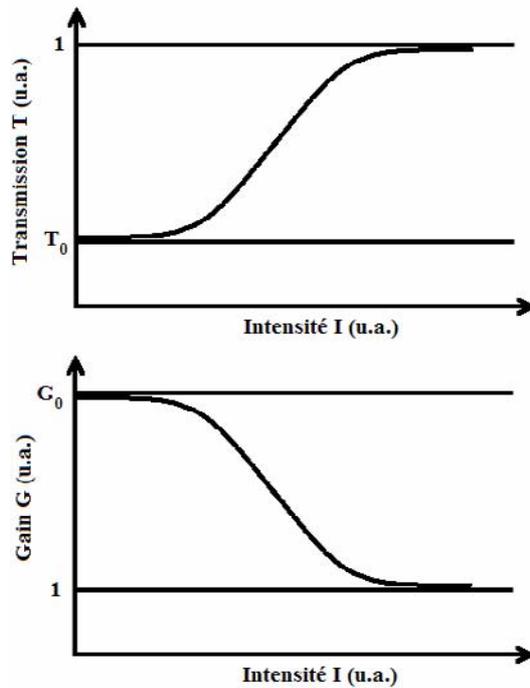


Figure 15 : transmission d'un absorbant saturable (haut) et gain d'un milieu amplificateur (bas) en fonction de l'intensité incidente

Lorsqu'on applique le pompage au milieu amplificateur ($t=0$), la puissance intracavité est initialement nulle et le gain G_0 non saturé est plus grand que la somme de toutes les pertes de la cavité. Une oscillation naît, caractérisée par un champ électromagnétique dans la cavité présentant de très fortes fluctuations de puissance. Quand la puissance augmente, les pics d'intensité les plus importants commencent à saturer l'absorbant. Ils subissent alors de plus faibles pertes que les fluctuations de plus faible amplitude. Dans la compétition pour le gain du milieu amplificateur, c'est donc le pic le plus important qui va l'emporter. C'est lui qui va croître le plus vite et il va avoir tendance à extraire l'énergie du milieu. Si les bonnes conditions sont réunies, il va rester seul dans la cavité et collecter toute l'énergie du milieu amplificateur.

e) Propriétés des miroirs GTI

Les miroirs GTI ont pour rôle d'introduire dans la cavité une dispersion négative et ainsi de compenser le déphasage de toutes les composantes dues à l'automodulation de phase et la dispersion positive imposée par le cristal Yb:KGW.

Les six passages effectués sur le miroir GTI (voir la figure 11) sont nécessaires pour obtenir une compensation quasi parfaite de la dispersion négative (voir paragraphe 1.4 du chapitre II) sur le déphasage et la dispersion positive.

Un miroir GTI est typiquement un étalon de type Fabry-Perot (F.P) ayant pour caractéristique une réflexion totale sur sa face arrière associée à une faible réflexion sur sa face avant. Un miroir GTI peut être fabriqué en ajoutant une faible cavité sur la face avant d'un miroir dichroïque HR construit selon des empilements quart d'onde de matériaux de différents indices de réfraction, comme il est montré schématiquement sur la figure 16. Cette cavité de faible surtension ne change pas significativement la réflectivité globale du miroir mais cause un changement très rapide de la phase sur la réflexion ce qui conduit à une modification significative de l'impulsion.

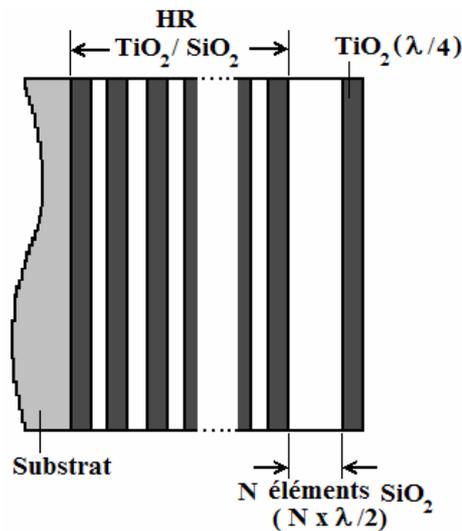


Figure 16 : Représentation schématique d'un miroir GTI.

La dispersion du GTI est déterminée comme tout étalon de F.P par l'épaisseur de l'étalon et par la réflectivité de ses miroirs. L'épaisseur de l'étalon est conçue en insérant une couche large d'empilements demi onde d'indice de réfraction faible suivie d'une couche quart d'onde d'indice de réfraction élevé. Naturellement encore, la dispersion induite par le GTI peut être ajustée en changeant l'angle d'incidence.

f) Caractéristiques du laser pompé diode T-pulse

Le laser T-pulse que nous utilisons présente les caractéristiques suivantes :

- une puissance moyenne P_{ω} maximale égale à 1,1 W en sortie de la cavité. Ceci nous permet d'avoir dans les applications en microscopie d'avoir une énergie

largement suffisante pour générer des processus non linéaires dans les échantillons observés. Bien évidemment, il faut utiliser ce laser en le réglant avec une puissance largement inférieure car une trop forte puissance moyenne risque d'endommager le milieu étudié. Néanmoins le laser T-pulse présente une réserve de puissance intéressante lors d'applications d'imagerie en profondeur. En effet plus on pénètre dans un échantillon, plus celui-ci rétro diffusera le faisceau excitateur ce qui peut impliquer une puissance insuffisante au niveau du voxel de focalisation. Le processus non linéaire ne pourra alors pas être efficace.

- Une fréquence F égale à 50 MHz. Cette cadence permet de concevoir par exemple une microscopie de fluorescence résolue en temps.
- Une longueur d'onde λ_f égale à 1030 nm. Pour les applications en microscopie non linéaire d'échantillons biologiques, cette longueur d'onde est idéale. En effet, comme les échantillons biologiques sont essentiellement composés d'eau, ils n'absorbent pas cette longueur d'onde ni la SH 2ω , ni la TH 3ω . Le T-pulse est un laser quasi monochromatique centré autour de 1,03 μm avec une largeur d'émission de 8 nm. L'accord en longueur d'onde n'est possible que extra cavité, par exemple en injectant l'onde dans une fibre à cristal photonique. Des expériences ont démontré la possibilité d'élargissement du spectre [17], et, après filtrage, une accordabilité sur environ 200 nm.
- Une durée d'impulsion τ égale à 180 fs. Dans ce régime impulsionnel ultracourt mais non extrême, les processus non linéaires sont très probables alors que les problèmes de dispersion sont eux minimisés.

Le laser T-pulse présente comme autres caractéristiques une bonne fiabilité ainsi qu'une bonne compacité. En effet cette source peut être facilement transportée puisque son système de refroidissement est composé de modules Peltier sur le cristal et, dans le module de pompe, d'une circulation fermée d'eau refroidie par un cryothermostat. Enfin, les servitudes électriques sont modestes (1kW sous 220 Volts sont suffisants).

Le T-pulse présente tout de même des inconvénients pour des applications en microscopie non linéaire, principalement la non accordabilité. Ceci limite son utilisation notamment en microscopie de fluorescence par EDP car le nombre de fluorophores actuellement disponibles absorbant à la fréquence double du faisceau excitateur est très faible.

Enfin, la fréquence et la durée des impulsions fixes limite la mesure des durées de vie de fluorescence sur une large gamme.

Malgré ces problèmes, le laser T-pulse nous apparaît être un bon outil pour la réalisation d'un microscope par GTH.

II.1.2-Choix des miroirs GTI

Avant l'arrivée sur l'échantillon, le faisceau laser fondamental doit traverser un grand nombre d'éléments optiques. Sur ce trajet, le faisceau fondamental traverse donc un peu plus de dix centimètres de verre en BK7, principalement dans les optiques de transport et de focalisation. Comme le BK7 induit une dispersion positive de $0,02509 \text{ fs}^2/\mu\text{m}$, soit une dispersion positive totale de 2509 fs^2 , il est nécessaire de compenser cette dispersion car cela engendre autrement un élargissement non négligeable de la forme des impulsions et donc de leur durée, ce qui provoque une diminution du signal non linéaire. En conséquence, pour un même signal, une puissance moyenne plus élevée pourra éventuellement dégrader l'échantillon étudié.

Ainsi comme dans la cavité de l'oscillateur T-pulse, voir le paragraphe précédent, nous plaçons sur le trajet du faisceau fondamental deux miroirs GTI qui induisent sur celui-ci une dispersion négative totale de 2600 fs^2 , ce qui permet de conserver parfaitement la durée des impulsions lorsqu'on les mesure en sortie de l'oscillateur.

II.1.3- Système scanner

Pour assurer le balayage du faisceau fondamental sur l'échantillon nous faisons le choix d'un système scanner basé sur des miroirs galvanométriques. Comme énoncé précédemment dans le paragraphe V du chapitre I, l'utilisation d'un tel système permet une acquisition très rapide d'image, but que nous nous fixons pour la réalisation du prototype de microscope GTH. Nous allons décrire ci-après la configuration optique que nous réalisons dans notre microscope puis nous expliquerons le principe de fonctionnement électronique du système que nous avons réalisé. Enfin nous verrons le mode de fonctionnement général pour l'acquisition d'une image.

a) Configuration optique

Pour comprendre la configuration optique, considérons la propagation du faisceau fondamental à travers le système scanner sur un axe, voir la figure 17.

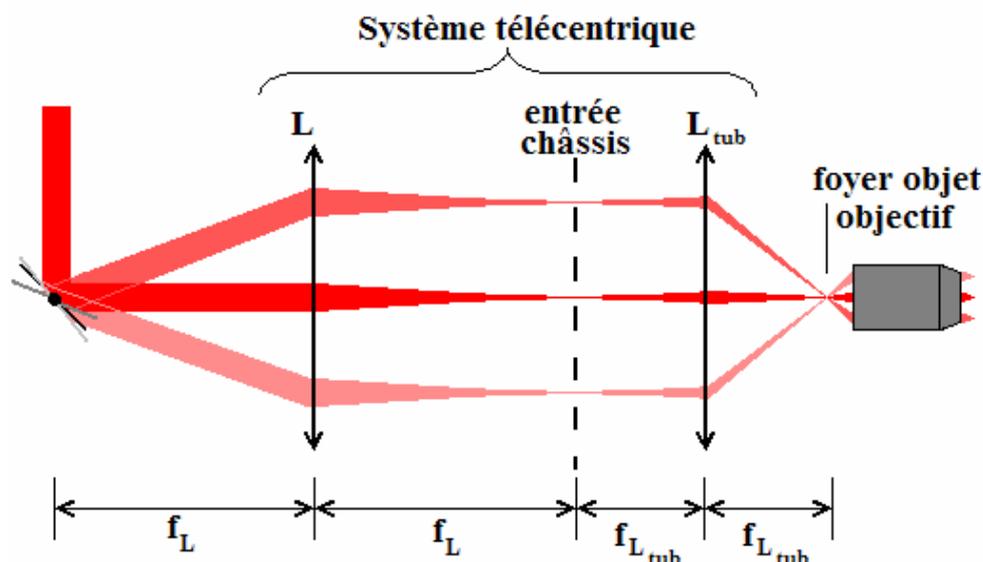


Figure 17 : Propagation du faisceau fondamental entre les miroirs galvanométriques et l'objectif du microscope.

L'onde excitatrice est déviée par le miroir galvanométrique. Le faisceau traverse ensuite un système télécentrique. Ce système télécentrique composé de deux lentilles : une première lentille L d'une distance focale f_L et d'une lentille de tube L_{tub} intégrée dans le microscope d'une distance focale $f_{L_{tub}}$. Le faisceau est donc défléchi d'un certain angle α pour une rotation donnée du miroir galvanométrique. Pour pouvoir faire correspondre une position dans le plan à cet angle donné par la rotation du miroir la première lentille du système télécentrique à la distance f_L par rapport au miroir. Au niveau de l'entrée du châssis du microscope, soit à la distance focale de la première lentille du système télécentrique, se situe la position (x, y) correspondant à l'angle α donné par les rotations des deux miroirs. Nous avons converti un déplacement angulaire en déplacement latéral dans un plan. Ce plan est alors imagé sur l'échantillon en plaçant aux distances focales adéquates (voir la figure 17 précédente) la lentille de tube et l'objectif de microscope.

Pour la réalisation de notre prototype, la première lentille a une focale de 50 mm et la lentille de tube une focale de 100 mm. La lentille de tube est celle d'origine dans le microscope. Nous avons choisi une telle lentille car ainsi le diamètre du faisceau fondamental

recouvre la pupille d'entrée de l'objectif, condition nécessaire pour que l'approximation gaussienne de notre modèle théorique soit valable.

b) Configuration électronique

Les miroirs galvanométriques ainsi que les modules MiniSAX permettant de piloter ces miroirs sont produits par la société GSI Lumonics.

Les miroirs galvanomètres référencés VM500, et peuvent balayer chacuns 4096 pas ou pixels, la valeur de ce pas étant modifiable suivant la valeur que nous donnons à l'angle de déviation limite.

Pour notre configuration, nous désirons avoir un plan au niveau de l'entrée du châssis de 20mm de taille suivant x et y. Cela correspond à un angle de déviation maximale de 22 degrés pour les deux miroirs. Cette variable angulaire est définie en positionnant correctement le bouton « Angle Sel » sur le module MiniSAX. Sur la figure 18 ci-après est représentée schématiquement les éléments du module MiniSAX.

Pour commander les modules MiniSAX et pour avoir une communication par protocole RS 232 avec un ordinateur, nous avons dû concevoir avec la collaboration du groupe d'électronique du laboratoire une interface de commande.

Nous verrons ci-après un bref commentaire sur les modules MiniSAX, mais nous invitons le lecteur à consulter le site Internet de la société GSI Lumonics [18] où le manuel d'utilisation des MiniSAX est disponible en format pdf. Puis nous décrirons le fonctionnement de l'interface de commande ainsi que ses différents composants.

Modules MiniSAX :

Un module MiniSAX peut être représenté par la figure 18 suivante. Cette figure est tirée du manuel d'utilisation [18].

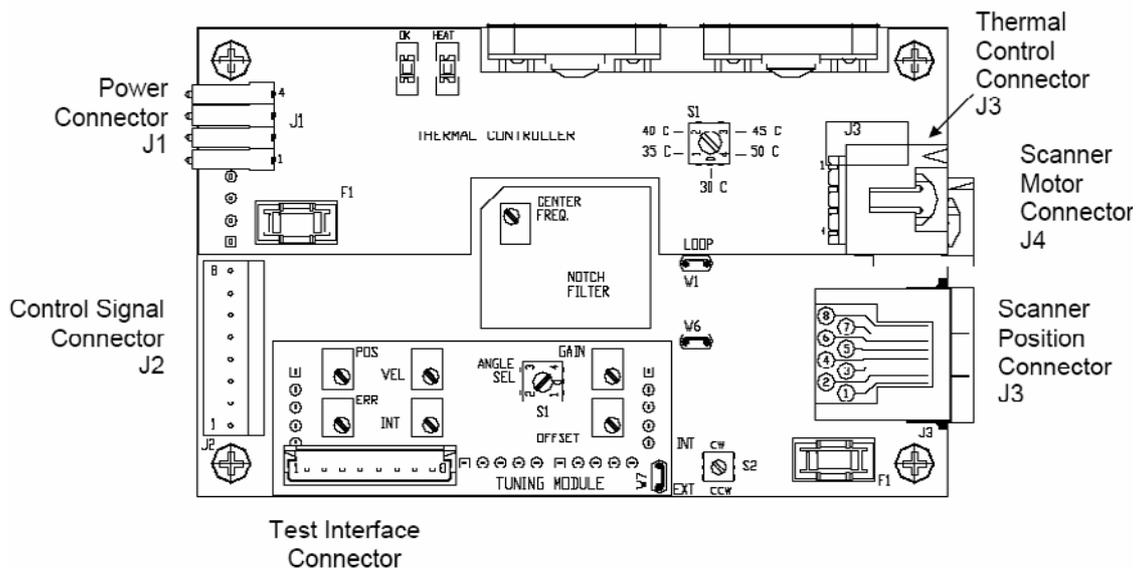


Figure 18 : Représentation schématique d'un module MiniSAX.

Le module interface MiniSAX (Axe Seul Miniature) est une technique développée récemment par la société GSI Lumonics pour le contrôle galvanométrique. En prenant avantage de la nouvelle technologie de composants montés en surface, le module MiniSAX assure toute la fonction de balayage électronique. Les asservissements évolués qui utilisent des techniques avec une conception de filtrage à bas-couplage fournissent des bandes passantes étendues et un temps de réponse amélioré.

Le MiniSAX utilise une conception modulaire, permettant une adaptabilité à des applications spécifiques. Un module de contrôle thermique supporte des scanners thermiquement régulés, ce qui permet l'usage de galvanomètres avec une faible dérive mécanique.

En simplifiant le mode opératoire du module MiniSAX sur un miroir galvanométrique, pour qu'un miroir soit dévié de 0 à 4095 pas, le module transmet au miroir galvanométrique une tension comprise entre -3 et +3 Volts. De plus grâce à ces systèmes de contrôle intégrés il assure une très grande stabilité pour une position fixée du miroir.

Interface de commande :

L'interface de commande, réalisée au laboratoire par William Benharbone - permet de piloter les modules MiniSAX de chaque miroir du scanner, en reliant les différents paramètres du balayage désiré (voir paragraphe réalisation logiciel A6). Elle permet également de recevoir les informations données par les modules MiniSAX et de renvoyer des informations

sur le début et la fin du balayage effectif, de donner les temps de début et de fin de balayage d'une ligne ainsi que le temps de l'incrément d'un pas.

Cette interface est composée :

- d'un microcontrôleur pour la gestion générale (68HC11E9)
- d'un composant pour la gestion du sens du balayage, des horloges X et Y, du Start/Stop (ISPLSI 1016) appelé aussi composant pour la gestion de la Tempo. Une liaison à une horloge externe est disponible pour que l'utilisateur puisse faire varier la vitesse de balayage.
- d'un composant pour la gestion de la rampe à fournir pour le balayage de l'axe X (ISPLSI 1032)
- d'un composant pour la gestion de la rampe à fournir pour le balayage de l'axe Y (ISPLSI 1032)
- de deux convertisseurs numérique-analogique 12 bits (AD8562)
- d'alimentations pour ces différents éléments et pour les MiniSAX

La figure 19 suivante représente la configuration électronique du système scanner.

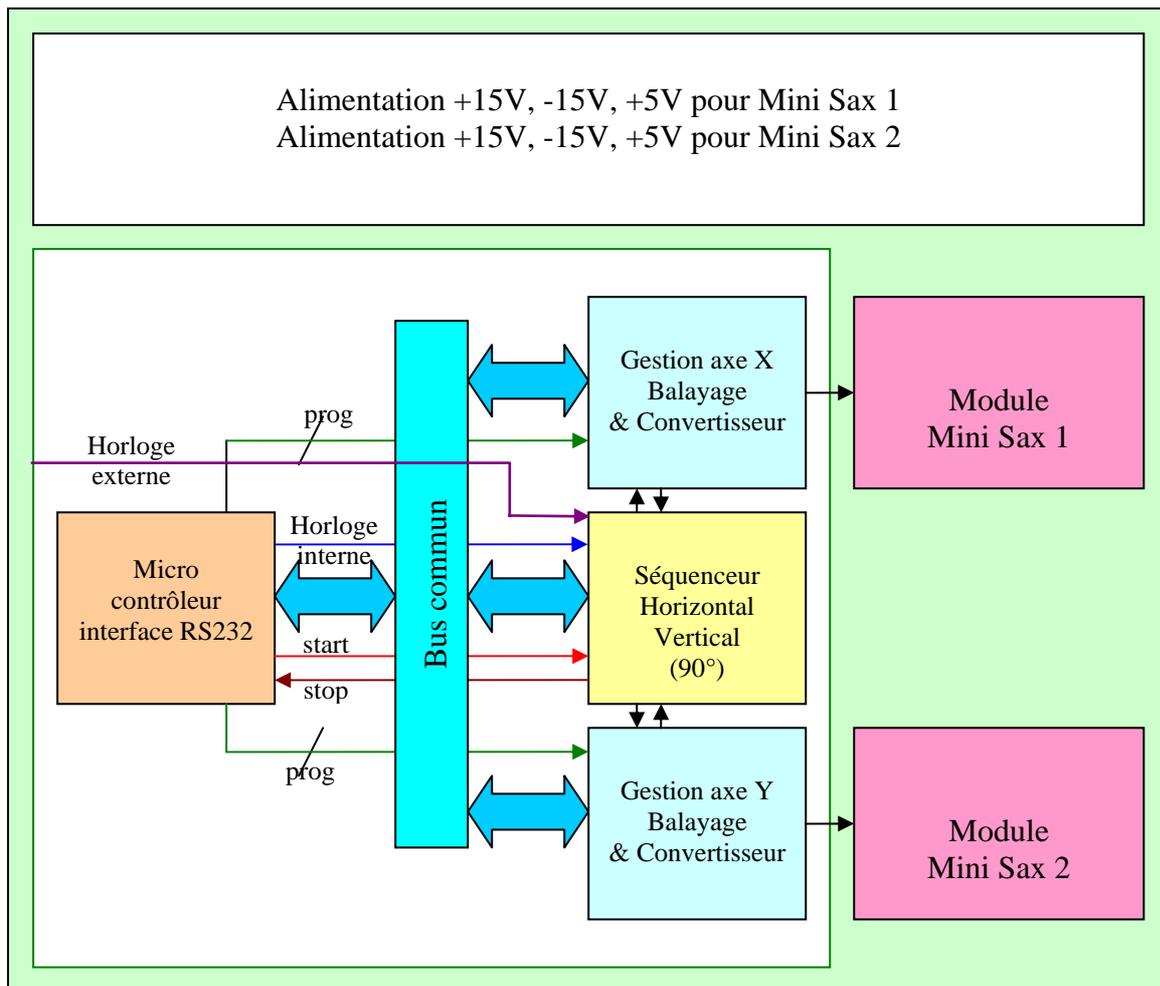


Figure 19 : Configuration électronique du système scanner.

Décrivons les différents éléments de l'interface de commande :

- Le microcontrôleur :

Le microcontrôleur est l'élément central de cette interface. En effet celui-ci gère la communication via la RS232 avec l'ordinateur, programme le composant de la gestion de l'axe X, programme le composant de la gestion de l'axe Y. Il programme également le composant de gestion du sens du balayage, des horloges et ordonne le début (START) et la fin (STOP) du balayage.

Lors de l'allumage du système, il initialise le système dans la position de départ. Enfin si une mauvaise utilisation a lieu, il retourne vers l'ordinateur les codes d'erreurs.

- Les contrôleurs de rampe en X et Y :

Chaque composant gère une seule voie soit en X, soit en Y mais ces deux contrôleurs sont gérés de façon identique. Chacun mémorise la valeur minimale et la valeur maximale de

la zone de balayage qui lui est transmise par le microcontrôleur. Il gère la valeur numérique de la rampe de tension et son excursion minimale et maximale (compteur 12 bits), il retourne au microcontrôleur une information STOP en fin de rampe et incrémente ou décrémente le compteur 12 bits.

- Les convertisseurs :

Le convertisseur 12 bits permet d'avoir un signal analogique compatible avec le module MiniSAX compris entre ± 3 Volts différentiels pour avoir une pleine échelle de la déviation d'un miroir.

Cette plage de tension de sortie peut être ajustée en fonction des besoins de l'expérience en cours sans changer la résolution de la rampe soit 4096 pixels pour une pleine échelle.

c) Fonctionnement général lors de l'acquisition d'une image

Le système scanner est configuré pour pouvoir effectuer différents types de balayage. Le nombre de points balayés par ligne (balayage en X) reste fixe : 512 points par ligne. Nous pouvons avoir ces 512 points espacés suivant un incrément allant de 1 à 8. Par exemple si on choisit un incrément de 8 les points balayés sont les suivants : 0, 7, 15, 23..., 4079, 4087, 4095. Si on choisit un incrément de 1 et que le point de départ du balayage est 500 alors le balayage est le suivant : 500, 501, 502..., 1009, 1010, 1011.

Par contre le nombre de lignes (balayage en Y) peut être variable : il peut être de 128, de 256, de 512 ou de 1024 lignes. Suivant le nombre de lignes sélectionné, l'incrément entre chaque ligne et lui-même variable. Par exemple pour un balayage de 1024 lignes, l'incrément est compris entre 1 et 4 puisque le nombre de pixels maximal est de 4096. Si un nombre plus important de pixels est sollicité par l'utilisateur, le microcontrôleur renverra un message d'erreur et annulera le balayage.

La vitesse du balayage est régie par l'horloge. Afin de pouvoir jouer sur cette vitesse, il nous est apparu préférable d'utiliser une horloge externe pour le développement du prototype. Ainsi nous pouvons fonctionner avec une horloge comprise entre 0 et 400 kHz. Par exemple, si nous fonctionnons avec une horloge externe de 200 kHz alors la vitesse de balayage sera de 5microsecondes par pixel. Une ligne de 512 pixels sera balayée en 2,56 millisecondes et si le balayage est effectué sur 512 lignes alors le temps total du balayage sera de 1,31 secondes. Pour que le temps de balayage soit le plus court possible, nous avons

configuré et fixé le sens du balayage. La figure 20 illustre le sens du balayage du système scanner.

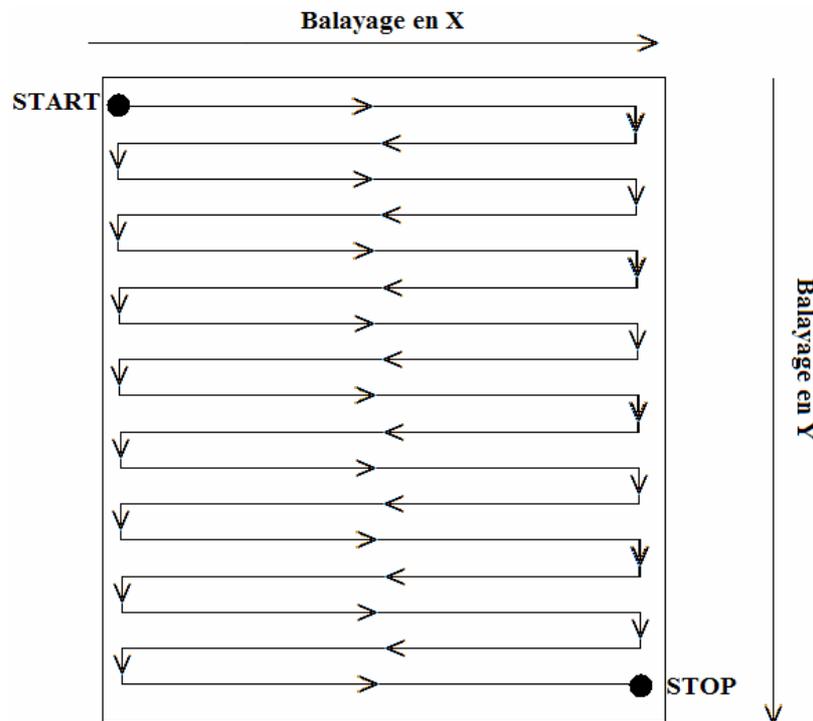


Figure 20 : Sens du balayage du système scanner.

Comme on peut le voir sur cette figure le balayage s'effectue comme suit : le scanner débute de sa position de départ START puis la position en X du miroir est incrémentée jusqu'à sa valeur finale et son arrivée en fin de ligne. La position en Y est alors incrémentée du pas prédéfini puis la position du miroir en X est décrémentée jusqu'à sa valeur initiale et ainsi de suite jusqu'à ce que le balayage suivant l'axe Y arrive à sa position finale STOP.

II.1.4- Châssis du microscope et objectifs utilisés

Notre microscope est modifié à partir d'un système commercial Axiovert 200M de la société Zeiss [19]. Ce microscope inversé est utilisé par transmission ou en épi-fluorescence de la source lumineuse, comme illustré sur le schéma de cet appareil sur la figure 21 ci après. C'est un outil de base pour effectuer de la microscopie de fluorescence avec une utilisation de sources lumineuses incohérentes. La détection peut s'effectuer suivant trois positions : directement par la lunette binoculaire, ou par deux emplacements (positions 1 et 2 sur le schéma de la figure 21) prévus pour fixer un système de détection tels des caméras CCD. Au

niveau de ces emplacements se situe le plan image de l'échantillon par l'optique de focalisation du microscope (objectif et lentille de tube).

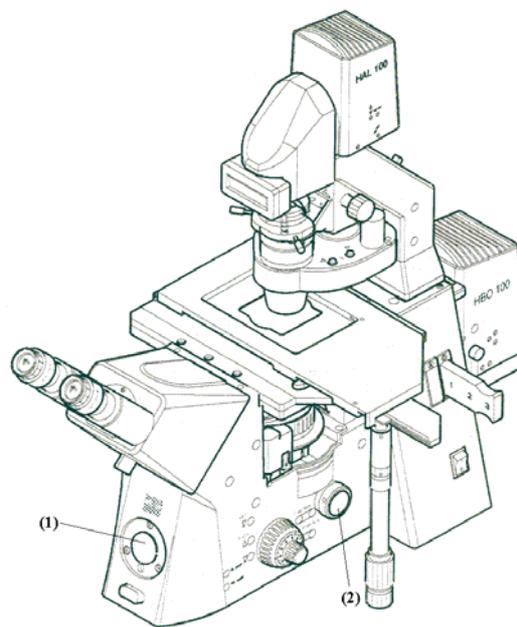


Figure 21 : Microscope Axiovert 200M dans sa configuration originelle.

Prenons pour comprendre le fonctionnement de cet appareil, prenons comme exemple le cas où la source lumineuse, transmise, filtrée et focalisée par l'objectif, excite la fluorescence d'un échantillon (sur la figure 21 la source lumineuse est une source halogène HAL100). La lumière de fluorescence émise par l'échantillon est collectée par un objectif puis traverse une lentille de tube afin d'imager l'échantillon au niveau de l'emplacement de la détection. Un cube séparateur permet de diriger cette lumière de fluorescence vers le système de détection comme l'illustre le montre la figure 22 suivante.

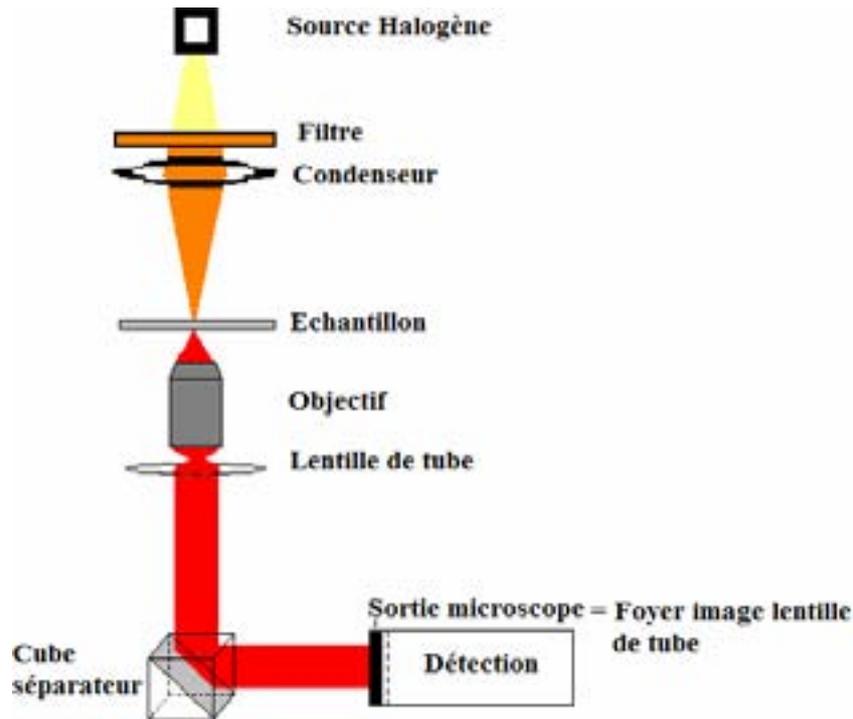


Figure 22 : Fonctionnement du microscope Axiovert 200M en mode transmission.

Par ailleurs cet appareil est asservi électroniquement et peut être piloté par ordinateur via RS 232, ce qui permet entre autres un contrôle des paramètres comme la position suivant z de la focalisation dans l'échantillon observé, de la position de la détection ainsi que l'intensité de la source lumineuse incidente.

Pour réaliser notre prototype de microscopie par GTH, il est nécessaire d'effectuer des modifications sur cet appareil optimisé pour des longueurs d'onde se situant dans le visible. En effet pour notre prototype de microscopie par GTH, comme illustrée sur la figure 10, l'injection du faisceau laser de longueur d'onde à 1030 nm se fait par le côté (position (2) dans la figure 21) du châssis du microscope en direction du cube séparateur afin que celui-ci oriente l'onde fondamentale vers la lentille de tube et l'objectif. Nous vérifions que le cube séparateur ainsi que la lentille de tube aient un pourcentage de transmission correct pour cette longueur d'onde. Les objectifs que nous utilisons sont les suivants :

- Un objectif Apochromat 20x/ O.N.= 0,75 de Zeiss. Les caractéristiques de cet objectif sont une compensation de l'épaisseur de la lamelle où est déposé l'échantillon soit $D = 170$ microns et une distance maximale de pénétration dans l'échantillon $a = 610$ microns.
- Un objectif plan NeoFluar 40x/O.N.=0,75 de Zeiss. Les caractéristiques de cet objectif sont une compensation de l'épaisseur de la lamelle où est déposé

l'échantillon soit $D = 170$ microns, distance maximale de pénétration dans l'échantillon $a = 500$ microns.

Ces deux objectifs composés en verre sont usuellement utilisés en microscopie de fluorescence et sont traités optiquement pour transmettre des faisceaux dans le domaine du visible. Nous observons sur la figure 23 suivante les pourcentages de transmission de ces objectifs pour différentes longueurs d'onde dans l'infrarouge. Les longueurs d'onde 1,5 et 1,76 microns sont les longueurs que peut émettre un système OPO et la longueur d'onde 0,81 microns est la longueur d'un oscillateur Titane/Saphir (ces systèmes seront décrits dans le chapitre V), 1,03 microns étant la longueur d'onde de l'oscillateur T-pulse.

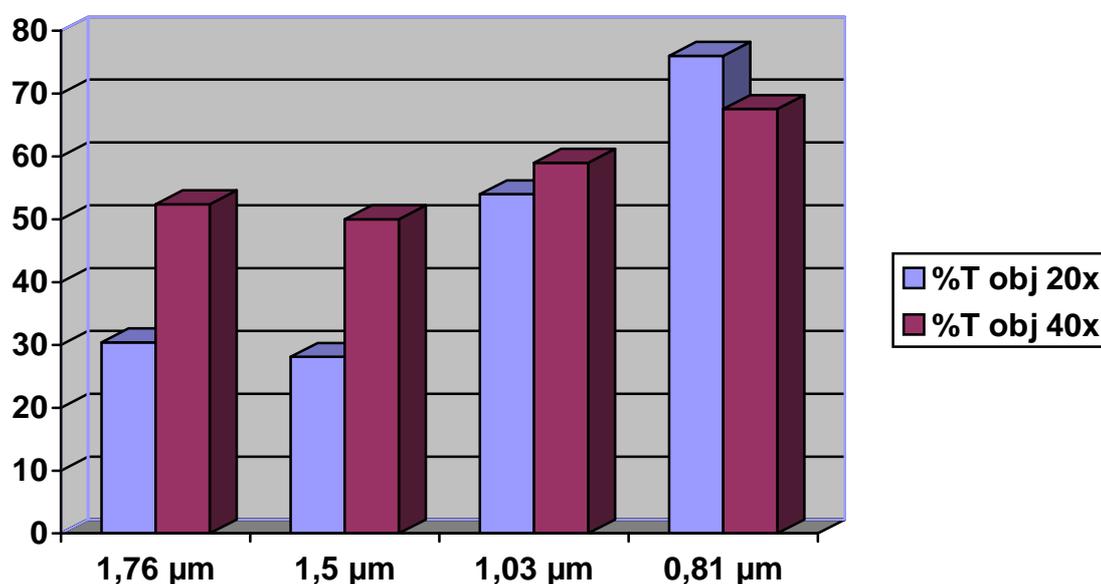


Figure 23 : Pourcentage de transmission des objectifs 20x et 40x pour différentes longueurs d'onde dans l'infrarouge.

Nous pouvons observer que la transmission de deux objectifs à 1,03 microns est supérieure à 55%. Étant donnée la puissance moyenne maximale délivrée par le T-pulse (supérieure à 1,1W) ces deux objectifs sont satisfaisants pour être utilisés dans notre prototype de microscope par GTH.

La TH générée par le faisceau à 1,03 microns est à une longueur d'onde de 343 nanomètres. Pour récupérer la GTH, nous utilisons un condenseur qui focalise ce signal vers le système de détection, après passage à travers un filtre permettant de transmettre parfaitement l'onde TH et de rejeter le faisceau fondamental, qui est situé en lieu en place de la source lumineuse halogène représentée sur les figures 21 et 22 ci-dessus. Le condenseur d'origine du microscope Axiovert 200M est en verre BK7. Or il apparaît que la limite de

transmission pour ce type de verre est située à 340 nm. Nous adaptons donc sur le châssis du microscope un nouveau condenseur composé en silice fondue, puisque la limite de transmission de ce type de verre est à 260 nanomètres. Ce condenseur provenant de la société Melles Griot a une ouverture numérique de 0,55. L'ouverture numérique des objectifs utilisés est de 0,75 mais puisque la divergence du si GTH est $\sqrt{3}$ fois plus faible que celle du faisceau fondamental comme nous l'avons illustré sur la figure 2 de ce chapitre III, ce condenseur est suffisant pour récolter convenablement le signal GTH.

II.1.5- Système de détection - Acquisition

a) Système de détection

Quel est le meilleur système de détection pour notre application ?

Deux modes de détection sont possibles pour sa mise en place de notre prototype : détection par comptage de photons ou alors mesure directe de la tension générée sur le détecteur si le signal est suffisant. Dans ce dernier mode, nous pouvons soit mesurer cette tension par détection synchrone avec la cadence de la source laser, soit par amplification directe. Déterminons ci-après le meilleur système à adapter sur notre prototype en fonction de la source laser T-pulse.

La figure 24 suivante représente le nombre de photons de tierce harmonique générés par impulsion du faisceau excitateur en fonction de la puissance moyenne du laser T-pulse. L'expérience consiste à focaliser par un objectif le faisceau excitateur sur un échantillon référence (une lamelle de silice), la puissance moyenne du faisceau excitateur étant prise au niveau de l'échantillon. Le signal de TH généré par l'échantillon est récolté sur un photomultiplicateur qui délivre un courant A_{photons} . Connaissant la sensibilité de l'anode du photomultiplicateur Y, on obtient l'énergie par seconde pour n photons qui s'exprime en Joules.

$$E_n = \frac{A_{\text{photons}}}{Y} \quad (\text{III} - 38)$$

L'énergie par seconde E_0 s'exprime :

$$E_0 = \frac{hc}{\lambda_h} \quad (\text{III} - 39)$$

où h est la constante de Planck, c la célérité de la lumière et λ_h la longueur d'onde de l'onde de TH. Un photon de TH a donc une énergie par seconde égale à :

$$E_0 \approx 5,79 \cdot 10^{-19} \text{ J} \quad (\text{III} - 40)$$

Connaissant la cadence F de la source laser, on peut ainsi obtenir le nombre moyen n de photons détectés par impulsion :

$$n = \frac{1}{F} \frac{E_n}{E_0} \quad (\text{III} - 41)$$

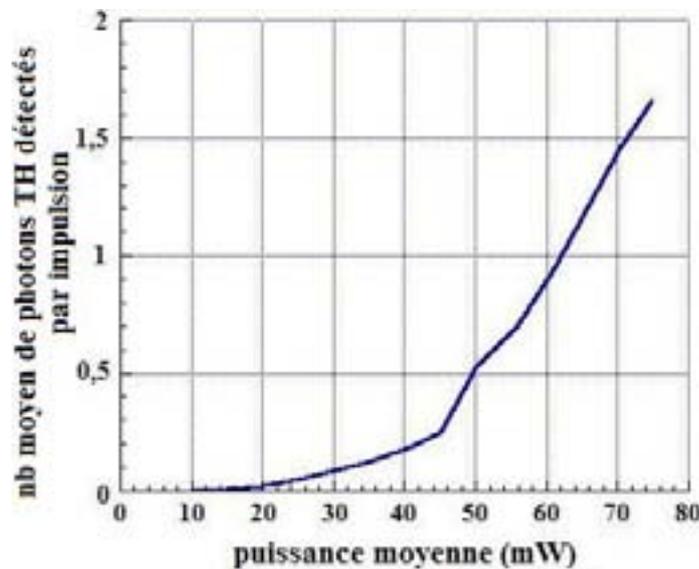


Figure 24 : Efficacité du processus de TH (résultat expérimental)

Détection par comptage de photons :

La caractéristique du comptage de photons est que le bruit induit par ce mode de détection est très faible et il est utile si nous avons uniquement moins d'un photon détecté par impulsion. Par rapport à notre configuration, cela s'avère vrai pour une puissance moyenne inférieure à 60 mW.

Pour illustrer ce mode, prenons par exemple le cas où nous avons 0,5 photons détectés par impulsion et avec un rapport signal sur bruit que nous désirons de 1000 (on considère le bruit du détecteur est négligeable dans cette démonstration). Il faut donc pour chaque position du système scanner 2000 impulsions du faisceau fondamental ce qui correspond à un temps

sur chaque pixel de 40 microsecondes. Pour réaliser une image de 512 x 512 pixels, le temps nécessaire est d'environ 10,5 secondes et correspond sur le détecteur à 524 288 000 coups détectés en 10 secondes ce qui correspond à plus de 52 millions de coups par seconde.

Cependant aucun détecteur ne peut compter autant de coups par seconde. Le taux maximal de coups par seconde détectable est typiquement compris entre 5 et 10 millions de coups par seconde. Le temps de réalisation d'une image de 512 x 512 pixels ne peut donc être comprise qu'entre 52 secondes (pour une détection limitée par 10 millions de coups par seconde) et 104 secondes (pour une détection limitée par 5 millions de coups par seconde). Dans ce cas, l'énergie déposée par pixel est d'environ 8 μ J.

Ces temps d'acquisition sont bien évidemment trop longs pour qu'on insère une telle détection sur notre prototype. Ce temps d'acquisition peut être plus rapide si nous diminuons le rapport signal sur bruit mais la qualité de l'image est alors médiocre.

Détection synchrone à la cadence de la source laser :

Le mode de détection synchrone présente un très faible bruit puisque la détection n'est effective que pour chaque impulsion du faisceau fondamental. Néanmoins celle-ci ne fonctionne que si au moins un photon de TH est détecté par impulsion. En reprenant la figure 24 précédente, la détection synchrone ne marchera que pour une puissance moyenne supérieure à 60 mW.

Les meilleures détections synchrones ont actuellement un temps de réponse de 12 microsecondes [20]. Le temps d'acquisition d'une image de 512 x 512 pixels est donc de 3,15 secondes, temps d'acquisition relativement court. Dans le cas d'une détection d'un photon par impulsion, la tension mesurée sur la détection synchrone est d'environ 1 mV avec un bruit supérieur à 2 μ V.

Néanmoins si nous souhaitons comme dans le cas précédent du comptage de photons avoir un rapport signal sur bruit de 1000, il faut que le faisceau fondamental ait au niveau de l'échantillon une puissance moyenne proche de 100 mW. Cette puissance moyenne est encore forte sur des échantillons biologiques car l'énergie déposée par pixel est alors de l'ordre de 1,2 μ J.

Détection par amplification directe :

Par cette méthode, on utilise un détecteur classique puis un amplificateur courant/tension qui donne directement la mesure recherchée.

Ce mode présente un plus grand bruit que les autres modes de détection mais le temps d'acquisition est le même que la vitesse que le système scanner. Le temps sur chaque pixel est donc de 2,5 microsecondes et le temps d'acquisition d'une image de 512 x 512 pixels est de 0,656 secondes. Ce temps d'acquisition est, comparé aux autres, le mode le plus rapide. De plus, la plage de fonctionnement pour une détection par amplification directe est comprise entre 0 et n photons générés. On peut donc l'utiliser aussi bien pour de faibles ou de fortes puissances moyennes du faisceau fondamental au niveau de l'échantillon.

Le système de détection que nous mettons en place est une détection par amplification directe. Il est composé d'un photomultiplicateur Hamamatsu H7732-01 [21] et d'un amplificateur de courant/tension Femto LCA-400K-10M [22].

Le photomultiplicateur H7732-01 a une gamme de fonctionnement pour une longueur d'onde comprise entre 185 et 680 nm avec une sensibilité maximale égale à $S = 4 \cdot 10^5$ A/W pour une longueur d'onde de 343 nm. Le bruit de ce détecteur est au maximum égal à $I_{\text{bruit}} = 2 \text{ nA}$.

L'amplificateur de courant/tension a un gain $G = 10^7$ V/A, une bande de fonctionnement en fréquence de 400kHz (identique à la fréquence du scanner), un bruit très faible de l'ordre de la femtoampère, bruit négligeable par rapport au bruit du photomultiplicateur.

Déterminons le rapport signal sur bruit pour pouvoir conclure sur la qualité des signaux observés. Prenons par exemple le cas où un photon de TH est généré pour dix impulsions de la source laser. Nous avons ainsi 5 millions de photons de TH par seconde. Puisque l'énergie par seconde d'un photon est égale à $E_0 = 5,79 \cdot 10^{-19}$ J, l'énergie par seconde pour 5 millions de photons est alors égale à $E_{5000000} = 2,895 \text{ pW}$. Le courant I délivré par le photomultiplicateur est alors égal à $I = S \times E_{5000000} = 1,158 \cdot 10^{-6}$ A. Après l'amplificateur de courant/tension, la tension correspondant au signal de TH généré est ainsi égale à $U = G \times I = 11,58 \text{ V}$.

La tension correspondant au bruit du système de détection est égale à $U_{\text{bruit}} = G \times I_{\text{bruit}} = 20 \text{ mV}$.

Ainsi le rapport signal sur bruit est supérieur à 500 (579) si on a un photon généré toutes les dix impulsions de la source laser. Ce rapport signal sur bruit est comparable au rapport du comptage de photons. L'énergie déposée par pixel est ici inférieure à 10 nJ. Nous avons ainsi une détection très rapide, avec une qualité de signal mesuré très bonne et avec une dégradation des échantillons réduite. Le mode détection par amplification directe est donc le meilleur choix technique pour la microscopie par GTH.

Pour le prototype, outre le système de détection pour le signal de TH généré nous avons mis en place un autre système de détection comprenant une ligne de détection identique (même photomultiplicateur et même amplificateur) mais dédié à deux autres techniques de microscopie non linéaires possibles: la technique par génération de seconde harmonique et la technique de fluorescence par excitation deux photons. La disposition de ces deux systèmes est illustrée sur la figure 25 suivante.

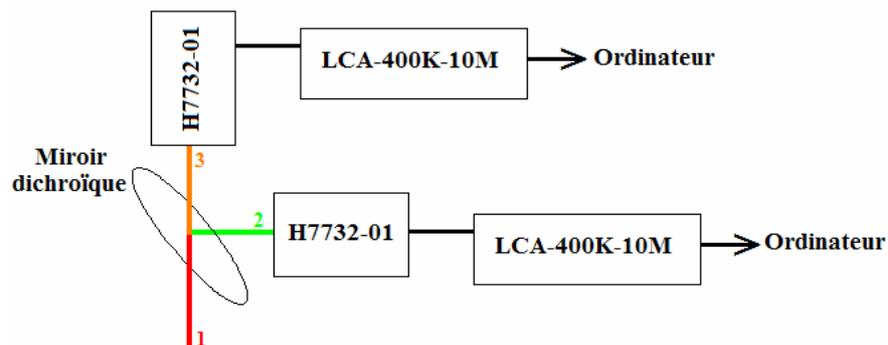


Figure 25 : Disposition des systèmes de détection dans le prototype de microscope GTH.

Le faisceau (1) sur cette figure regroupe les faisceaux de tierce harmonique et de seconde harmonique (ou le signal de fluorescence), le faisceau fondamental ayant été rejeté auparavant par un filtre infrarouge. Un miroir dichroïque, ayant comme caractéristiques une réflexion maximale pour des faisceaux ayant une longueur d'onde comprise entre 200 et 400 nm et une transmission maximale pour des faisceaux ayant une longueur d'onde supérieure à 500 nm, sépare les deux signaux. Ainsi le signal de TH (2) est récolté par le détecteur à droite et le signal de SH (ou de fluorescence) (2) est récolté par le détecteur situé en haut de la figure.

Bien que le système de détection soit optimisé pour la GTH, le fonctionnement pour la GSH ou la fluorescence demeure bon avec un rapport signal sur bruit tout à fait correct.

La facilité d'intégration de ces deux systèmes dans l'architecture du châssis du microscope permet de plus de les isoler parfaitement des lumières ambiantes pouvant parasiter les signaux que nous souhaitons récolter.

b) Acquisition des données

Afin d'enregistrer les mesures des signaux et de relier chaque tension du signal à sa position (x, y) du scanner, une carte d'acquisition rapide Imtec T114 [23] est intégrée dans un ordinateur qui pourra ensuite traiter ces données. La carte T114 est reliée aux deux canaux de mesures qui va enregistrer et stocker les résultats le temps de l'acquisition. Pour stocker les données dans un tableau correspondant aux positions du scanner, la carte est également reliée à l'horloge externe ainsi qu'au signal de départ (TRIGGER) des lignes du scanner.

II.1.6- Réalisation d'un logiciel pilotant le scanner, l'acquisition et l'enregistrement d'images

Pour piloter à tous les systèmes électroniques compris dans le prototype de microscopie par GTH, il a été nécessaire de concevoir un logiciel permettant de lancer les acquisitions. Ce logiciel est un programme en C, qui gère la position et les paramètres de l'image à scanner, et propose différents modes d'acquisition.

Sur la figure 26 ci-après, est représentée les interfaces du logiciel qui permettent de définir les paramètres du balayage du faisceau fondamental et de contrôler différents éléments mis en jeu dans la focalisation du faisceau fondamental.

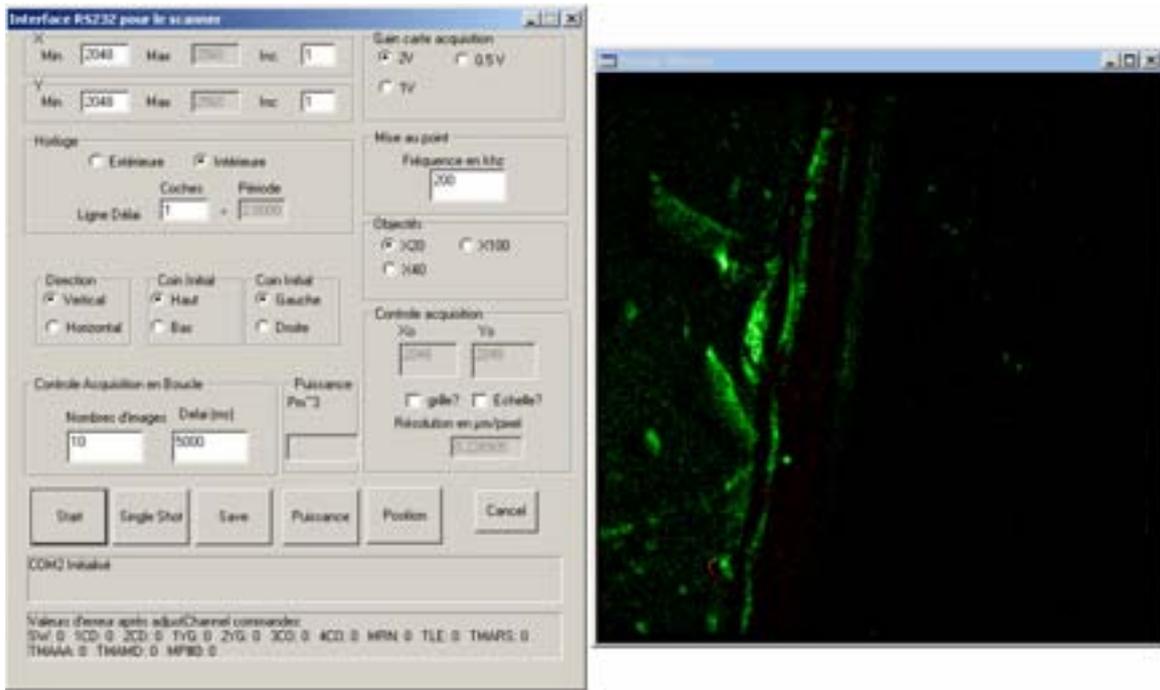


Figure 26 : Interfaces du logiciel pilotant l'acquisition.

L'interface du logiciel est décomposée en deux fenêtres : une fenêtre de commande et une fenêtre de visualisation de l'image obtenue. La fenêtre de commande schématisée sur la figure 27 ci-après, comprend neuf sous fenêtres de paramétrage (A-1 à A-9) dans la partie supérieure de la fenêtre de commande, six boutons de commande (B) puis deux sous fenêtres de communication (C-1 et C-2) dans la partie inférieure de la fenêtre de commande.

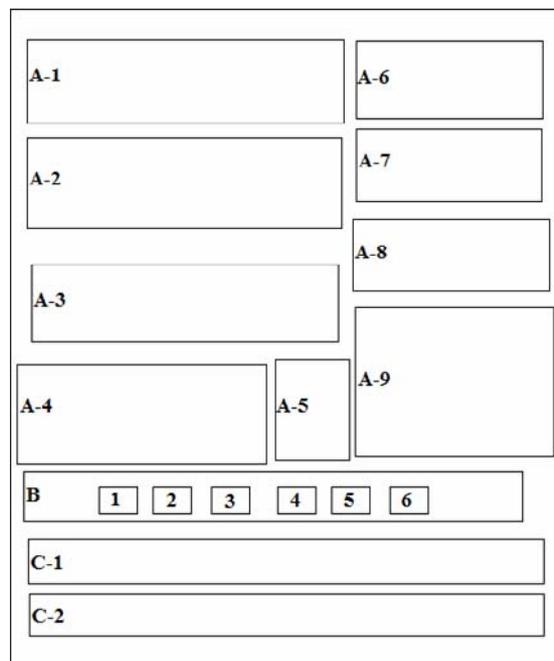


Figure 27 : Interface de commande schématisée.

La sous fenêtre A-1 détermine les positions de départ en X et en Y, le pas et les positions finales du balayage que nous souhaitons effectuer. La sous fenêtre A-2 permet de choisir si nous voulons être en horloge externe ou en horloge interne pour le balayage. La partie « Ligne Délai », permet de modifier le temps d'attente en fin de chaque ligne du balayage. Cela permet de tenir compte de la phase d'accélération et de décélération du miroir galvanométrique. La sous fenêtre A-3 permet de définir le sens du balayage. Ces trois sous fenêtres permettent de paramétrer le système scanner et les informations lui sont transmises par une liaison RS 232.

La sous fenêtre A-4 gère l'acquisition de plusieurs images dans le temps. Ainsi nous pouvons choisir le nombre d'images à enregistrer ainsi que le temps d'attente entre deux balayages. Cette sous fenêtre envoie à la fois des informations à la carte d'acquisition T114 mais aussi au système scanner.

La sous fenêtre A-5 affiche la puissance du signal que reçoit la carte d'acquisition T114 quand on clique sur le bouton B-4 « Puissance ». Cela nous permet de vérifier la non saturation de la détection par le signal. La sous fenêtre A-6 permet de définir le gain de la carte d'acquisition. En fonction du signal TH détecté nous pouvons choisir parmi trois gains de la carte T114 pour avoir le meilleur contraste sur les images THG réalisées. La sous fenêtre A-7 est une sous fenêtre d'information importante pour la carte d'acquisition. Nous devons indiquer à celle-ci la fréquence de l'horloge du scanner afin de pouvoir ranger convenablement les données enregistrées en fonction du balayage effectué. Les quatre sous fenêtres précédentes sont reliées à la carte d'acquisition et lui sont communiquées via le bus PCI de l'ordinateur.

Les deux dernières sous fenêtres de la partie A sont liées à la fenêtre de visualisation de l'image réalisée et permet de relier la taille des pixels sur l'image à la taille réelle obtenue optiquement. Suivant l'objectif utilisé (sous fenêtre A-8), il s'affiche dans la sous fenêtre A-9 la correspondance en μm d'un pixel. Dans cette même sous fenêtre, nous pouvons faire apparaître dans l'image obtenue une grille et une valeur d'échelle (un trait correspondant à 10 μm). Enfin lorsqu'on se déplace dans la fenêtre de visualisation, nous pouvons cliquer n'importe quel point où seront affichées ses coordonnées en pixels. Lorsqu'on clique sur le bouton « Position » (bouton B-5), s'affiche alors dans la sous fenêtre A-9, la position réelle des miroirs galvanométriques.

Les boutons de commande B servent à commander le départ du scanner ainsi que l'acquisition. Le bouton « Start » (bouton B-1) lance l'acquisition qui a été définie dans la sous fenêtre A-4, le bouton « Single Shot » lance l'enregistrement d'une seule image, le

bouton « Save » (B-3) permet d'enregistrer sur l'ordinateur l'image réalisée en mode « Single Shot » ; lorsque nous sommes en mode acquisition de plusieurs images, les images réalisées sont automatiquement sauvegardées dans l'ordinateur. Enfin le bouton « Cancel » (B-6) permet l'annulation de toute acquisition.

La sous fenêtre C-1 est une sous fenêtre d'informations données par le système scanner et transmises par la liaison RS 232. La sous fenêtre C-2 est un renvoi d'informations données par la carte T114 et nous permet de vérifier que l'enregistrement s'effectue normalement ou non.

II.2- Validation du prototype

La réalisation du prototype de microscope par GTH nécessite une connaissance parfaite des différents éléments, cités dans le paragraphe précédent. Ils doivent être d'une grande fiabilité à la fois au cours d'une même expérience mais aussi dans le temps.

Nous ne décrivons pas les différentes phases de réalisation du prototype mais expliciterons ses performances.

Les images réalisées peuvent être de taille variable. En effet suivant l'incrément choisi dans la zone de balayage, incrément variable de 1 à 7, la taille effective du pixel affiché dans l'image est différente. La figure 28 ci-après représente la taille réelle d'un pixel suivant l'incrément choisi pour les deux objectifs utilisés.

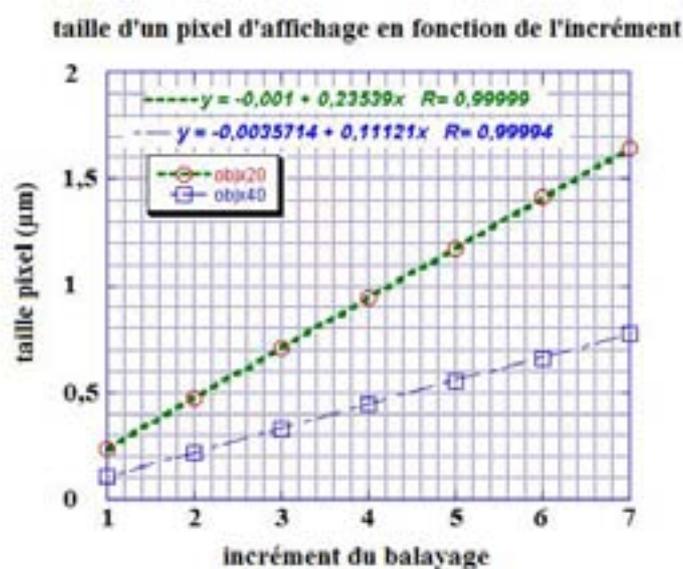


Figure 28 : taille d'un pixel d'affichage en fonction de l'incrément de balayage.

Nous pouvons voir sur la figure précédente que pour chaque objectif, la taille du pixel varie selon une droite affine en fonction de l'incrément du balayage. Ainsi pour l'objectif x20, la taille Y_{20} d'un pixel vaut par rapport à l'incrément de balayage X_{20} , la relation suivante :

$$Y_{20} \approx 0,23539 X_{20} \quad (\text{III} - 42)$$

De même, pour l'objectif x40, la taille Y_{40} d'un pixel suit la relation suivante par rapport à X_{40} :

$$Y_{40} \approx 0,11121 X_{40} \quad (\text{III} - 43)$$

Par ailleurs, au cours de la validation du prototype, nous avons progressivement augmenté la fréquence de balayage du scanner pour pouvoir à terme l'utiliser en routine à 400 kHz, mais nous pouvons également l'utiliser pour une fréquence de balayage inférieure. Pour chaque fréquence de balayage, les miroirs du scanner ont une accélération et une décélération propre en début et fin de ligne balayée. Il faut donc connaître ces deux paramètres suivant la fréquence de balayage pour pouvoir en tenir compte dans la reconstruction de l'image. Cette phase de développement se situe dans le programme commandant le logiciel de pilotage présenté dans le paragraphe II.1.6 précédent.

Nous avons ainsi selon la zone de balayage choisie et selon l'objectif utilisé, les performances suivantes :

Zone de balayage (en pixels)	Taille réelle image (μm) objectif x20 pas de 1 / pas de 7	Taille réelle image (μm) objectif x40 pas de 1 / pas de 7	Temps d'acquisition pour une horloge à 400 kHz
128 x 512	30 x 120 / 211 x 844	14 x 57 / 99 x 398	0,164 s
256 x 512	60 x 120 / 422 x 844	28 x 57 / 199 x 398	0,328 s
512 x 512	120 x 120 / 844 x 844	57 x 57 / 398 x 398	0,656 s
1024 x 512	240 x 120 / 1686 x 844	114 x 57 / 796 x 398	1,312 s

Figure 29 : Performances du prototype GTH.

La taille théorique (voir paragraphe I.4 de ce chapitre) du voxel générant la TH est, pour des objectifs ayant une ouverture numérique de 0,75, comprise entre 0,485 et 0,682 μm pour sa résolution radiale et comprise entre 0,817 et 1,543 μm pour sa résolution axiale. Nous pouvons voir que les performances de ce prototype sont comparables à la microscopie confocale (voir la figure 3 du chapitre I).

Pour une qualité d'image optimale, un déplacement par pixel de la demi résolution radiale est suffisant. Ainsi avec l'objectif x20, une image balayée avec un pas de 1 a une

qualité optimale. En prenant un pas supérieur, l'image est alors sous échantillonnée. De même avec l'objectif x 40, une image balayée avec un pas de 2 a une qualité optimale. Avec un pas de balayage supérieur l'image est sous échantillonnée et avec un pas inférieur, soit un pas de balayage de 1, l'image est sur échantillonnée.

Ceci est également vrai pour le balayage en z : si les sections dans le spécimen étudié sont espacées d'un pas en z égal à la demi résolution axiale pour chaque objectif, soit pour un pas en z égal à 0,5 μm .

II.3- Application : technique d'analyse GTH du système de focalisation

Un aspect critique de la microscopie multiphotonique est la caractérisation des paramètres spatial et temporel du champ de l'onde laser fondamentale au point focal d'un objectif de microscope. Une connaissance de ces paramètres garantit une résolution optimale avec une grande efficacité. Par ailleurs des mesures quantitatives de l'intensité sont nécessaires pour connaître avec exactitude les limites d'exposition sur des spécimens vivants sans endommagements. Des méthodes existent pour caractériser les performances d'un système de focalisation, mais soit pour la résolution spatiale (par exemple via une auto convolution sous une illumination un et deux photons [24]), soit pour la caractérisation temporelle (en effectuant des autocorrélations au point focal [10]). Mais aucune méthode n'apporte une vue complète.

Nous allons présenter ci-après une technique *in situ* par laquelle les caractéristiques spatiotemporelles de l'impulsion de l'onde fondamentale peuvent être mesurées à chaque point du champ de vue. Nous proposons simplement d'exploiter le signal de TH généré lors du balayage 3D autour d'une simple interface silice/air de lamelle. Cette technique peut être implémentée même avec des objectifs ayant de fortes ouvertures numériques. Avec des changements mineurs le système de collecte du signal transmis, notre méthode basée sur la GTH peut être appliquée pour caractériser n'importe quel microscope non linéaire.

II.3.1- Modèle théorique

Comme dans le paragraphe I de ce chapitre III, nous sommes toujours dans l'approximation gaussienne.

Considérons une onde laser se propageant suivant la direction z qui se focalise dans un milieu. On rappelle que l'amplitude du champ du faisceau fondamental A_ω est défini suivant [25] :

$$A_\omega = \sqrt{\frac{2 P_\omega T}{\pi c \epsilon_0 \tau K}} \quad (\text{III} - 44)$$

avec P_ω la puissance moyenne du champ fondamental, T le taux de répétition de la source laser, c la célérité de la lumière et τ la durée d'impulsion de l'onde fondamentale. K est un coefficient qui dépend de la forme de l'impulsion. Par exemple pour une de forme gaussienne

$$K = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \text{ et pour une forme sécante hyperbolique } K=1,48.$$

Le champ de tierce harmonique peut être exprimé de la façon suivante [3]:

$$E_{3\omega} \propto E_\omega^3 J_{3\omega} \quad (\text{III} - 45)$$

La longueur d'interaction $J_{3\omega}$, décrite précisément dans le paragraphe I.2 de ce chapitre, est comprise entre z_0 et z_1 , les coordonnées de début et de fin du matériau servant de référence pour effectuer notre étude : ce matériau est une lamelle de silice optiquement plane (voir figure 30).

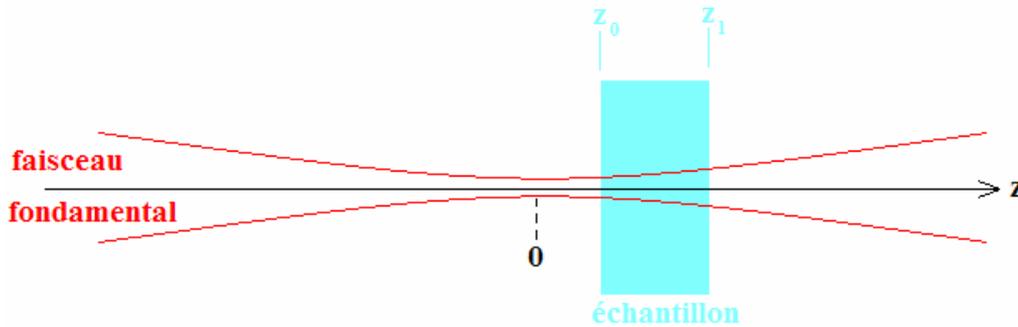


Figure 30 : Propagation du faisceau fondamental dans l'échantillon.

Par les équations (III-44) et (III-45), nous pouvons obtenir la forme des intensités de l'onde fondamentale et de l'onde TH :

$$I_{3\omega} \propto E_{3\omega} E_{3\omega}^* \propto I_\omega^3 |J_{3\omega}|^2 \quad (\text{III} - 46)$$

et

$$I_\omega \propto E_\omega E_\omega^* \propto \frac{P_\omega}{w(z)^2 \tau} \quad (\text{III} - 47)$$

Si on remplace I_ω par son expression dans l'équation (III-46), on obtient finalement la puissance moyenne de TH mesuré sur notre détecteur :

$$P_{3\omega} \propto \frac{1}{w_{0f}^4} \frac{P_{\omega}^3}{\tau_p^3} |J_{3\omega}|^2 \quad (\text{III} - 48)$$

Comme démontré dans le paragraphe I.2.2 de ce chapitre III, le signal de TH est localisé autour d'une interface entre deux milieux. Comme le faisceau fondamental explore un plan de l'échantillon à une profondeur z_0 avec le système scanner, des données en trois dimensions peuvent être enregistrées pour effectuer une description totale des propriétés de la source laser femtoseconde dans le plan focal.

Si on représente le signal de chaque point (x, y) en fonction de z (voir la figure 31 suivante) celui-ci peut être défini suivant trois paramètres qui permettent une caractérisation complète de l'optique de focalisation en chaque point (x, y) : le décalage du maximum du signal par rapport à une position référence (par exemple le centre de l'image réalisée), la largeur à mi-hauteur et l'amplitude.

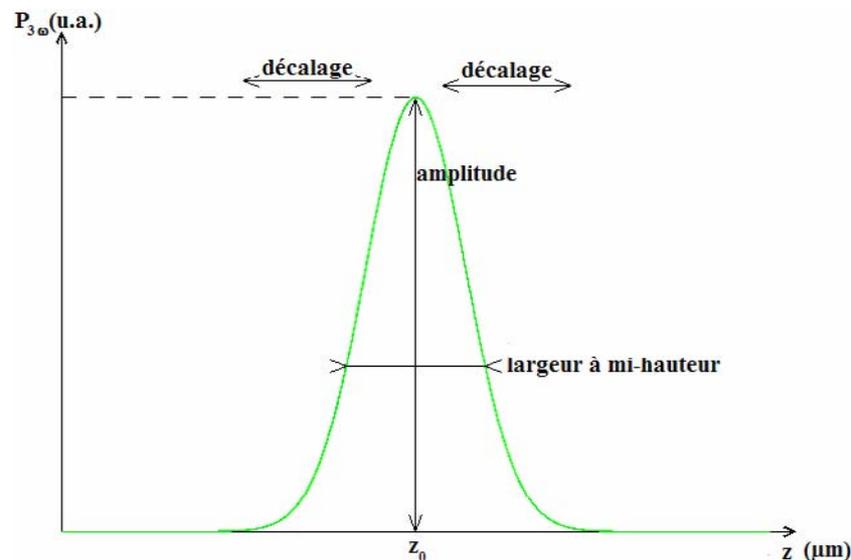


Figure 31 : Puissance de tierce harmonique théorique suivant l'axe z pour chaque point (x, y) .

Décrivons ci après ces trois paramètres :

- *Décalage par rapport à la position de référence*

D'après le principe de la GTH, le signal maximum de TH est lorsque le faisceau fondamental est focalisé à l'interface de deux milieux. Dans notre expérience, cette condition est atteinte lorsque le plan optique de la lamelle de silice a sa position z_0 placée sur le col du faisceau du laser fondamental (soit $z_0 = 0$). Comme nous enregistrons le profil de la puissance moyenne de TH pour chaque position (x, y) du faisceau, nous pouvons analyser la qualité de l'objectif de microscope. L'évolution de ce décalage dans la région scannée peut être directement comprise comme une

déviations de l'objectif des conditions de champ plan et être reliée aux aberrations sphériques.

- *Largeur à mi-hauteur*

En regardant l'expression (III-48), on peut identifier la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la puissance moyenne de TH autour de la position z_0 . L'origine de cette largeur est simplement guidée par le paramètre confocal b à travers la largeur à hauteur de la longueur d'interaction effective $|J_{3\omega}|^2$ en z_0 . En effet, une estimation numérique de la FWHM de $|J_{3\omega}|^2$ nous donne la relation en fonction de b suivante:

$$\text{FWHM}\left(|J_{3\omega}(z_0)|^2\right) = 0,7927 b \quad (\text{III} - 49)$$

Comme le paramètre confocal b est le même que celui de l'onde fondamentale b_f et de l'onde harmonique b_h , et qu'il est donné par la relation $b_f = 2\pi w_{0f}^2 / \lambda_f$, on obtient l'expression de la FWHM du signal de TH suivante :

$$\text{FWHM}(P_{3\omega}) = \Delta z = \frac{1,5854\pi}{\lambda_f} w_{0f}^2 \quad (\text{III} - 50)$$

La mesure expérimentale de Δz à chaque position (x, y) du faisceau focalisé nous donne une information sur le paramètre confocal et ainsi sur le rayon du col du faisceau pour une position donnée w_L . Puisque le plan focal est entièrement scanné, les performances de l'objectif peuvent être extraites.

- *Amplitude*

Lorsque le col du faisceau fondamental est localisé à l'interface z_0 de la lamelle, l'amplitude du signal de TH est aussi guidé par le paramètre confocal b à travers la longueur d'interaction effective pour une puissance donnée. On obtient la relation suivante :

$$|J_{3\omega}|^2 = 426,929 - 451,397 b + 162,216 b^2 - 24,3781 b^3 + 1,40895 b^4 \quad (\text{III} - 51)$$

Cette approximation numérique est dérivée de l'expression complète de la longueur d'interaction effective (expression III-15) et est vérifiée pour le modèle gaussien.

En reprenant l'équation (III-48) on peut normaliser la puissance moyenne de TH par son signal maximum, le signal expérimental étant multiplié par les valeurs locales w_L et J_L :

$$P_{3\omega_{\text{norm}}} = P_{3\omega} \frac{w_L^4}{|J_L|^2} \propto \frac{P_\omega^3}{\tau_p^3} \quad (\text{III} - 52)$$

Afin de mettre en évidence les éventuelles distorsions, passons en échelle logarithmique pour observer le rapport entre la puissance moyenne de TH en une position (x, y) donnée à une puissance moyenne de TH de référence, au centre de l'image :

$$\ln\left(\frac{P_{3\omega_{\text{norm}}}}{P_{3\omega_{\text{norm-centre}}}}\right) = \ln\left(\frac{\left(\frac{P_{\omega}}{\tau_p}\right)^3}{\left(\frac{P_{\omega}}{\tau_p}\right)^3_{\text{centre}}}\right) \quad (\text{III-53})$$

Nous pouvons développer le rapport (P_{ω}/τ_p) par la relation suivante :

$$\frac{P_{\omega}}{\tau_p} = \left(\frac{P_{\omega}}{\tau_p}\right)_{\text{centre}} + \Delta\left(\frac{P_{\omega}}{\tau_p}\right) \quad (\text{III-54})$$

On obtient finalement :

$$\frac{1}{3} \ln\left(\frac{P_{3\omega_{\text{norm}}}}{P_{3\omega_{\text{norm-centre}}}}\right) = \frac{\Delta\left(\frac{P_{\omega}}{\tau_p}\right)}{\left(\frac{P_{\omega}}{\tau_p}\right)_{\text{centre}}} \quad (\text{III-55})$$

Cette expression représente les variations l'onde harmonique pour chaque position (x, y) de la région scannée comme fonction du rapport de P_{ω} par τ_p . Cependant dans notre expérience la durée des impulsions dans l'infrarouge est suffisamment large pour négliger l'élargissement des impulsions dans l'objectif, ce qui entraîne que l'expression (III-55) varie suivant la puissance moyenne de l'onde fondamentale déposée localement.

II.3.2- Mise en place de l'expérience

Afin de valider ce modèle théorique, nous décidons à partir du prototype réalisé tester l'objectif de microscope Zeiss Plan-NeoFluar x40 d'ouverture numérique 0,75. De plus nous utilisons deux sources laser avec deux longueurs d'onde différentes pour obtenir les performances de cet objectif suivant la longueur d'onde du faisceau excitateur : le laser T-

pulse (dont nous rappelons les paramètres : longueur d'onde de 1,03 microns, durée des impulsions de 180 femtosecondes, puissance moyenne en sortie 1,1 Watts et taux de répétition 50 MHz) et un OPO pompé de façon synchrone par un laser Titane :Saphir Tsunami (Système Tsunami – Opal de Spectra-Physics) dont les paramètres sont pour notre expérience : longueur d'onde de 1,5 microns, durée des impulsions 150 femtosecondes, puissance moyenne en sortie de la source 350 mW, taux de répétition 80 Mhz. Ce système laser sera plus amplement décrit dans la dernière partie de cet ouvrage mais nous invitons le lecteur à consulter la thèse de Marc Olivier Martin [26] qui analyse cette source très précisément.

L'échantillon, une lamelle en silice optiquement plane, est explorée sur une région de 450 par 450 microns en 30 coupes différentes sur 15 microns d'épaisseur. Chaque source laser est atténuée de sorte qu'après l'objectif on ait 5 mW de puissance moyenne. Chaque coupe de 450 x 450 microns correspond à une image de 512 x 512 pixels. Il est à noter que la taille des images réalisées est différente de celle présentée dans la figure 20 car cette application a été réalisée au cours du développement du prototype et les performances notamment au niveau du système scanner n'avaient pas été maximisées.

II.3.3- Analyse des données

Par traitement des images réalisées nous obtenons pour chaque position (x, y) du système scanner le signal de TH suivant l'axe z. Nous pouvons ainsi à partir des trois paramètres caractérisant la forme du signal, c'est-à-dire le décalage, la largeur à mi-hauteur et l'amplitude, déterminer les paramètres du système de focalisation.

a) Décalage

La figure 32 suivante représente le plan focal en tout point de l'objectif.

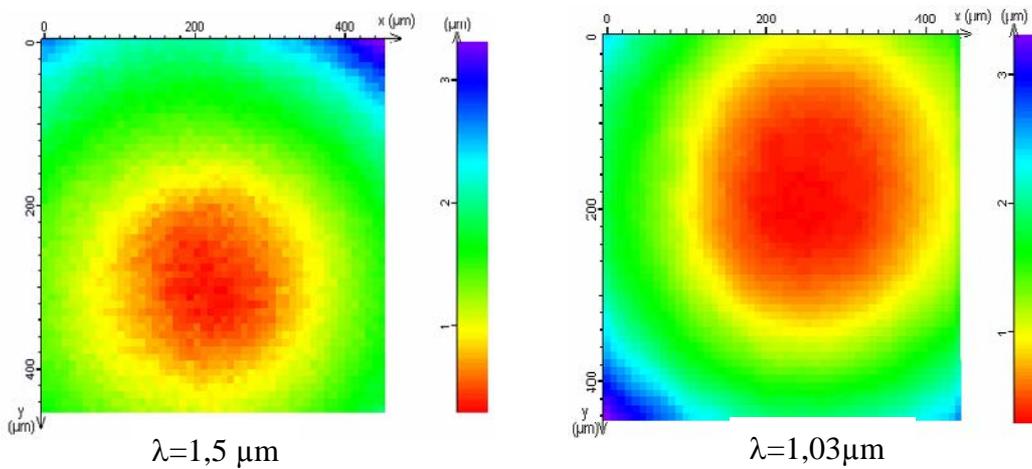


Figure 32 : Décalage de la position de l'intensité de TH par rapport à sa position au centre suivant les deux sources laser excitatrices.

A la longueur d'onde de 1,5 microns, la condition de champ plan est effective sur une aire de seulement 200 microns de diamètre. Au-delà de 200 microns par rapport au centre de l'image, le décalage de la position par rapport à la référence, la position au centre, atteint jusqu'à 3 microns.

A la longueur d'onde de 1,03 microns, nous pouvons constater que la condition de champ plan est effective pour une aire supérieure à 250 microns de diamètre. Au-delà de ce cercle, le décalage atteint jusqu'à 2 microns.

Nous pouvons conclure que cet objectif est mieux corrigé en champ plan pour une longueur d'onde à 1,03 microns plutôt qu'à 1,5 microns. De plus nous pouvons penser que la condition de champ pour cet objectif est optimale si on utilise une source laser dans le visible. En effet cet objectif est usuellement utilisé lors de la microscopie confocale de fluorescence.

b) Largeur à mi-hauteur de la puissance moyenne de TH

La largeur à mi-hauteur de l'onde de TH nous permet d'obtenir le paramètre confocal ainsi que le rayon du col du faisceau de l'onde fondamentale à chaque position (x, y). La figure 33 suivante décrit cette largeur à mi-hauteur de la puissance moyenne de TH détectée en chaque point de la région scannée :

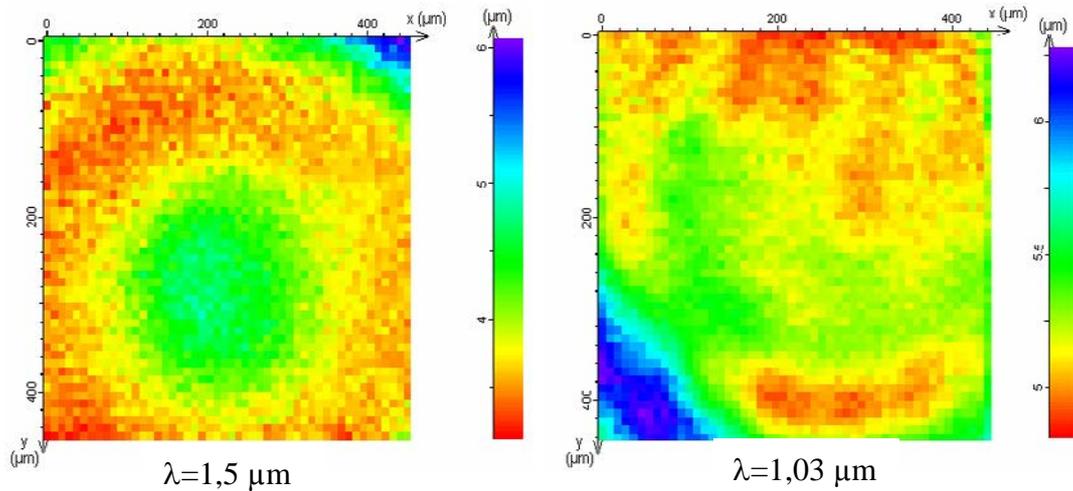


Figure 33 : Largeur à mi-hauteur de la puissance moyenne de TH détectée à chaque position(x, y) pour les deux sources laser excitatrices.

Comme mesuré dans le cas où la longueur d'onde est de 1,5 microns, la résolution transverse n'est pas optimale au centre mais sur un anneau de 200 microns de diamètre alors que dans le cas où la longueur d'onde est de 1,03 microns, la résolution transverse est homogène sur tout le champ de vue de l'objectif.

Par l'équation (III-50), nous pouvons déterminer le rayon du col du faisceau fondamental en chaque position (x, y) w_{Lf} et cela pour chaque cas :

- pour $\lambda = 1,5\mu\text{m}$, on mesure

$$3,5\mu\text{m} \leq \text{FWHM}(P_{3\omega}) \leq 5\mu\text{m} \quad (\text{III} - 56)$$

On obtient alors :

$$0,95\mu\text{m} \leq w_{Lf} \leq 1,44\mu\text{m} \quad (\text{III} - 57)$$

- pour $\lambda = 1,03\mu\text{m}$, on mesure

$$3,5\mu\text{m} \leq \text{FWHM}(P_{3\omega}) \leq 5\mu\text{m} \quad (\text{III} - 58)$$

On obtient alors :

$$0,97\mu\text{m} \leq w_{Lf} \leq 1,03\mu\text{m} \quad (\text{III} - 59)$$

Comparons ces valeurs par rapport aux valeurs théoriques (expression du rayon du col du faisceau fondamental : voir équation III-32). Nous obtenons :

- $w_{of} = 1,036\mu\text{m}$ pour $\lambda = 1,5\mu\text{m}$
- $w_{of} = 0,711\mu\text{m}$ pour $\lambda = 1,03\mu\text{m}$

Les valeurs théoriques et expérimentales du rayon du col pour une longueur d'onde de 1,5 μm sont sensiblement égales. Nous pouvons donc en déduire le faisceau laser avait un bon diamètre en entrée de l'objectif Plan-NeoFluar x 40.

Nous pouvons cependant voir qu'à $1,03 \mu\text{m}$, la valeur expérimentale du rayon du col du faisceau est plus grande que la valeur théorique. L'ouverture numérique expérimentale de l'objectif est plus petite que celle théorique (O.N.= 0,75) car à cette longueur d'onde, le diamètre du faisceau laser est plus petit que l'entrée de l'objectif.

c) Amplitude

La figure 34 suivante représente en échelle logarithmique les variations la puissance moyenne normalisée de TH détectée en chaque position (x, y) de la région scannée par rapport à sa puissance moyenne détectée au centre soit le rapport le rapport logarithmique de la puissance moyenne par la durée de l'impulsion de l'onde fondamentale (expression (III-55)).

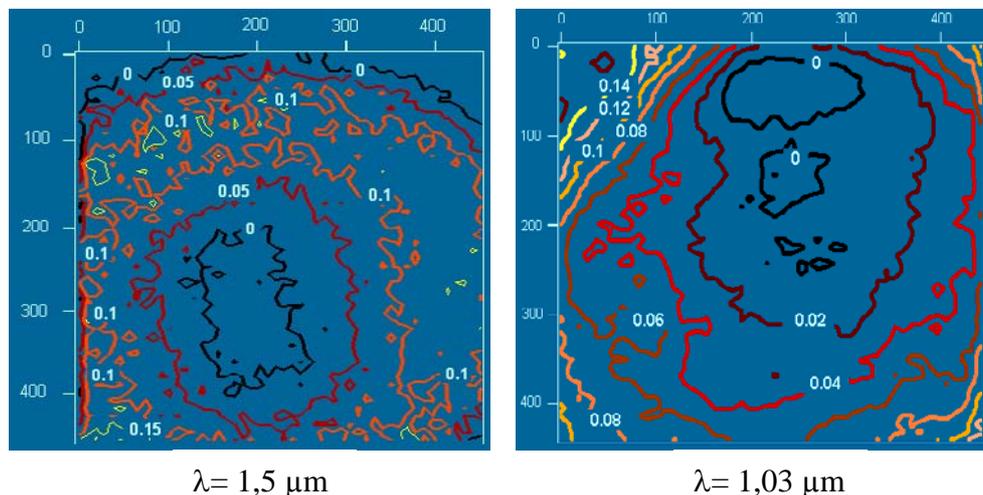


Figure 34 : Rapport logarithmique (P_{ω} / τ_p) en chaque position (x, y) pour les deux sources laser excitatrices.

Etant donné que les sources laser utilisées délivrent des impulsions relativement longues ($150 \text{ fs @ } 1,5 \mu\text{m}$ et $180 \text{ fs @ } 1,03 \mu\text{m}$), toutes les fluctuations sur le pic du signal de TH détecté doivent être dues à la puissance que peut transmettre l'objectif.

Pour la longueur d'onde de 1,5 microns, une bonne transmission autour d'un anneau peut être détecté (ceci peut se corrélérer à la résolution du paragraphe précédent), alors qu'à 1,03 microns, nous pouvons constater que la puissance transmise par l'objectif est homogène sur tout le champ de vue.

Si on utilise une autre source laser fournissant des impulsions plus courtes, il serait possible de déterminer parfaitement l'élargissement temporel en chaque position (x, y) de l'objectif.

Par cette méthode de GTH sur une simple interface, nous pouvons donc effectuer un contrôle du faisceau laser fondamental après un système de focalisation tel qu'un objectif. En effet les aberrations optiques, la résolution, la potentialité de transmission et l'élargissement des impulsions du faisceau laser fondamental peuvent être complètement déterminés. Ceci permet de choisir judicieusement le système optique pour réaliser n'importe quelle expérience de microscopie non linéaire.

CONCLUSION

Le prototype de microscope par génération de tierce harmonique (GTH) réalisé présente comme performances une résolution optique et une vitesse de balayage du faisceau fondamental qui sont comparables aux microscopes commerciaux basés sur la technique de fluorescence confocale monophotonique. De plus il présente une grande profondeur de pénétration dans les échantillons qui n'est limitée que par la distance de travail de l'objectif utilisé.

Le prototype peut être utilisé de façon routinière, sa mise en route et son mode de fonctionnement ont été conçus de sorte qu'un utilisateur non initié puisse en un temps très court réaliser des images.

L'avantage majeur de la microscopie par GTH est que l'agent de contraste est l'échantillon lui-même via ses propriétés non linéaires intrinsèques. Ainsi il n'est plus nécessaire d'introduire dans le milieu étudié d'éléments extérieurs comme des fluorophores ou des chromophores. Cependant comme cette technique a peu de recul, il apparaît nécessaire pour les biologistes de faire un long apprentissage sur la compréhension et sur l'interprétation des images GTH réalisées.

Le fait que l'agent de contraste soit l'échantillon ouvre une voie pour la caractérisation des propriétés non linéaires de composés chimiques. Cette voie semble particulièrement intéresser les chimistes qui peuvent grâce à la GTH caractériser optiquement leurs matériaux d'un point de vue microscopique.

Dans le chapitre IV ci-après, nous allons présenter les expériences que nous avons réalisées durant notre travail de thèse. Ces expériences ont été conduites en partenariat avec des chimistes de l'ICMCB de Bordeaux et du CREOL (Floride) pour la caractérisation non linéaire de matériaux et avec des biologistes de l'IECB de Bordeaux pour la visualisation de plusieurs types de cellules. Nous verrons que le microscope par GTH est un outil très intéressant pour donner des informations structurales sur les objets visualisés et il offre aussi une grande potentialité d'imagerie fonctionnelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M.O. Martin, L. Canioni and L. Sarger, « Measurements of the complex third order optical susceptibility in a collinear pump probe experiment », *Optics Letters*, Vol. 23, Issue 24, p. 1874 (1998)
- [2] A. Brocas, L. Canioni and L. Sarger, « Efficient selection of focusing optics in nonlinear microscopy design through THG analysis », *Optics Express* Vol. 12, Issue 10, p. 2317 (2004)
- [3] R.W. Boyd, « *Nonlinear Optics* », *Academic Press* (1992)
- [4] L.A. Pipes and R. Harvill, « *Applied Mathematics for Engineers and Physicists* », *McGraw Hill*, New-York (1987)
- [5] R.D. Schaller, J.C. Johnson and R.J. Saykally, « Nonlinear chemical imaging microscopy : near-field third harmonic generation imaging of human red blood cells », *Analytical Chemistry* Vol.72, N°21, pp. 5361–5364 (2000)
- [6] D. Oron, E. Tal and Y. Silberberg, « Depth-resolved multiphoton polarization microscopy by third-harmonic generation », *Optics Letters*, Vol. 28, Issue 23, p. 2321 (2003)
- [7] D. Oron, D. Yelin, E. Tal, S. Raz, R. Fachima and Y. Silberberg, « Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy », *Journal of Structural Biology*, Volume 147, Issue 1, pp. 3-11 (2004)
- [8] J.X. Cheng and X.S. Xie, « Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy », *JOSA B* **19**, N°17 (2002)
- [9] J.J. Stamnes, « *Waves in Focal Regions* », *IOP*, Bristol (1986)
- [10] F. Cannone, G. Chirico, G. Baldini and A. Diaspro, « Measurement of the laser pulse width on the microscope objective plane by modulated autocorrelation method », *Journal of Microscopy* Vol. 210, Issue 2 (2003)
- [11] J. Squier and M. Müller, « High resolution non linear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging », *Rev. Sci. Instrum.*, vol **72**, n° 7 (2001)
- [12] C. Hönniger, « *Ultrafast Ytterbium-Doped Bulk Laser Amplifiers* », *Hartung-Gorre Verlag Konstanz* (1999)
- [13] A. Courjaud, Thèse d'université de Bordeaux 1, « Sources lasers femtosecondes pompées par diode basées sur l'ion Ytterbium », soutenue le 11 décembre 2001, n° d'ordre 2392
- [15] U. Keller, K.J. Weingarten, F.X. Kärtner, D. Kopf, B. Braun, I.D. Jung, R. Fluck, C. Hönniger, N. Matushek and J. Aus der Au, « Semiconductor saturable absorber mirrors (SESAMs) for femtosecond to nanosecond pulse generation in solid-state lasers », *Special*

Issue on Ultrafast Electronics, Photonics and Optoelectronics, IEEE J. Selected Topics in Quantum Electronics, vol.2, pp.435-453 (1996)

[16] F. Gires, P. Tournois, « Interféromètre utilisable pour la compression d'impulsions lumineuses modulées en fréquence », *C.R. Acad Paris*, vol.258, pp. 6112-6115 (1964)

[17] N. Deguil, E. Mottay, F. Salin, P. Legros and D. Choquet, « Novel diode-pumped infrared tunable laser system for multi-photon microscopy », *Microscopy Research and Technique*, 63:23-26 (2004)

[24] E.O. Potma, « Intracellular Molecular Diffusion Probed with Nonlinear Optical Microscopy », *thesis University of Groningen* (2001)

[25] S. Santran, Thèse d'université de Bordeaux 1, « Caractérisation non linéaire de composants optiques d'une chaîne laser de forte puissance », soutenue le 18 décembre 2000, n° d'ordre 2342

[26] M.O. Martin, Thèse d'université de Bordeaux 1, « Détermination des propriétés non linéaires des matériaux optiques à 1,5 μm par interférométrie et absorption en configuration pompe sonde colinéaire. Prise en compte de la forme spatio-temporelle du champ », soutenue le 15 décembre 1998, n° d'ordre 2010

Liens Internet :

[14] Société Amplitude Systèmes : <http://www.amplitude-systemes.com>

[18] Société GSI Lumonics : <http://www.gsilumonics.com>

[19] Société Zeiss : <http://www.zeiss.fr>

[20] Documentation sur la détection synchrone SR844 disponible sur le site suivant : <http://www.thinksrs.com/downloads/PDFs/Catalog/SR844c.pdf>

[21] Société Hamamatsu : <http://www.hamamatsu.com>

[22] Société Femto : <http://www.femto.de>

[23] Documentation de la carte d'acquisition T114 disponible sur le site suivant : http://www.ganil.fr/exogam/infoutilsateurs/LabAcq/w32_Manual.pdf

CHAPITRE IV

Applications : imageries en microscopie par génération de tierce harmonique

INTRODUCTION

Afin d'évaluer les performances de notre appareil, nous nous proposons d'effectuer différentes expériences. Dans un premier temps nous désirons vérifier les propriétés que présente une telle imagerie en microscopie non linéaire cohérente, soit une bonne résolution en grande profondeur.

Pour cela nous prélevons grossièrement une tranche d'environ un millimètre d'épaisseur et localisée au niveau du cerveau d'un mysidacé fixé, un organisme à l'allure de crevette représenté dans la figure 1 ci-après.



Figure 1 : Exemple de mysidacé dont on a prélevé une tranche de tissu autour du cerveau.

L'objectif utilisé pour cette expérience est l'objectif x20/0,75 puisqu'il nous permet de pouvoir travailler en grande profondeur grâce à sa grande distance de travail (jusqu'à 610 microns). Nous sondons avec un balayage laser recouvrant le champ de l'objectif (résolution du pixel de 1,648 μm) la tranche en profondeur jusqu'à l'apparition de structures soit pour $z = 300$ microns à l'intérieur de la tranche, le zéro étant la surface externe du mysidacé. A partir

de là nous positionnons le balayage sur cette zone avec un pas de 1 (résolution du pixel de $0,235 \mu\text{m}$) et suivant la position suivant z nous pouvons visualiser une structure, probablement un canal nerveux, sur près de 45 microns d'épaisseur [1, 2]. La puissance moyenne du faisceau excitateur en sortie d'objectif est de 120 mW.

La figure 2 ci-dessous représente la visualisation de ce canal pour quatre positions en z de l'objectif.

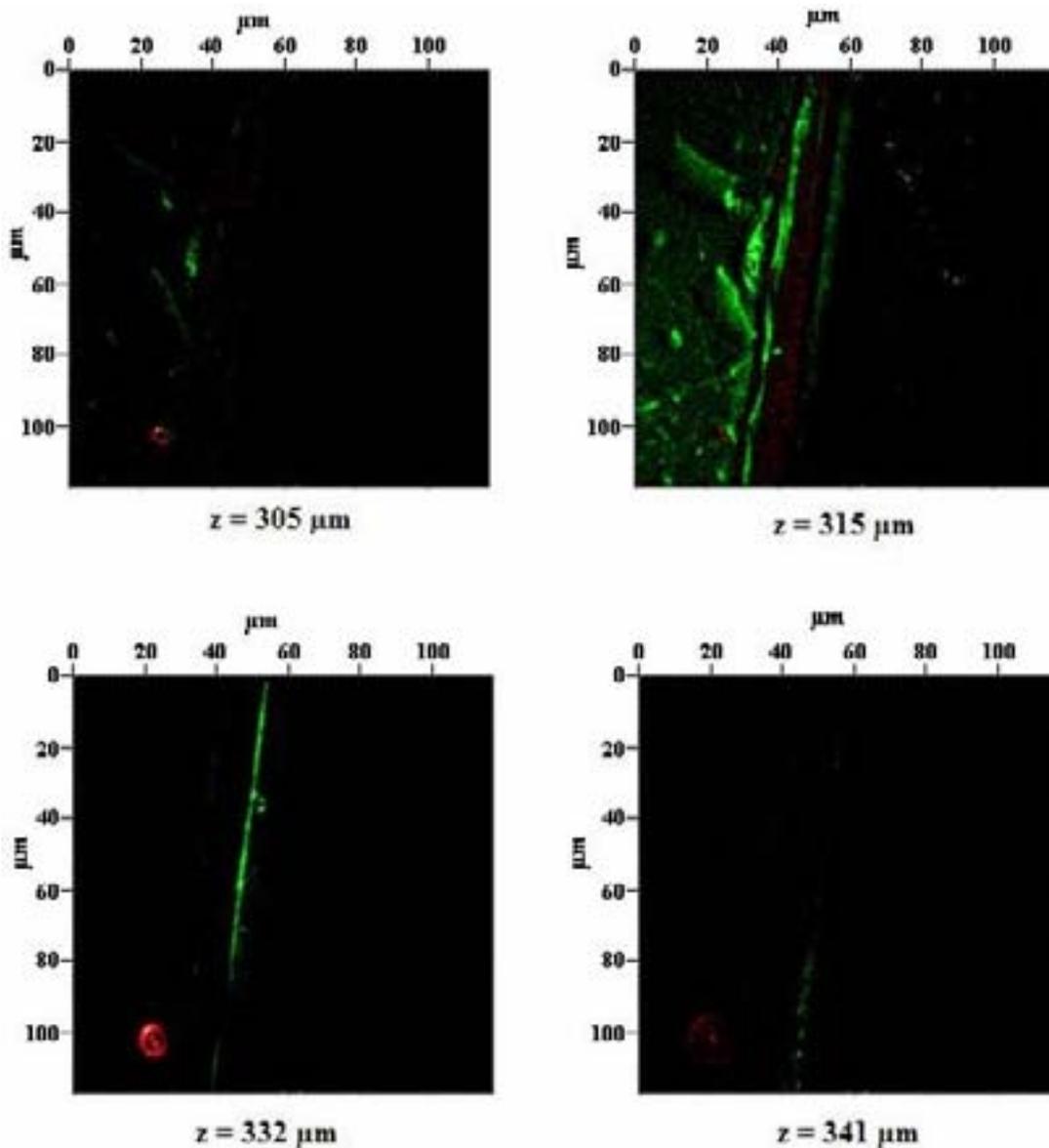


Figure 2 : Images d'une structure tubulaire à différentes profondeurs suivant z dans un mysidacé.

Sur ces images, la coloration verte correspond à la GTH et la coloration rouge à la GSH. Nous pouvons noter que la seconde harmonique est générée de façon endogène pour des éléments du mysidacé. Nous pouvons voir d'ailleurs que cette GSH est présente dans le canal dont nous voyons la structure en troisième harmonique. Nous savons que les

microtubules génèrent de la seconde harmonique du fait de leur structures ordonnées, nous pensons donc que l'endroit visualisé présente ces micro-objets.

Nous pouvons valider par cette expérience la potentialité de reconstruction en trois dimensions d'objets, propriété de toute technique de microscopie non linéaire comme la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons, mais nous pouvons noter que les distances de travail en z sont notablement plus élevées avec une meilleure résolution. L'imagerie en profondeur n'est finalement limitée que par la distance de travail de l'objectif utilisé.

Nous allons décrire dans ce chapitre différentes expériences effectuées lors de notre travail de thèse.

Dans un premier temps, nous allons effectuer des caractérisations non linéaires de matériaux, thématique principale de notre groupe de recherche, via le prototype de microscope par GTH. Dans cette partie nous évaluerons l'homogénéité d'un verre suivant sa susceptibilité non linéaire d'ordre trois, puis nous observerons les variations de $\chi^{(3)}$ sur un autre matériau vitreux présentant une partie « polée » et une autre partie non « polée ». Enfin une dernière application de la microscopie par GTH nous montrera l'étude de la variation de $\chi^{(3)}$ ainsi que la qualité de guide d'onde [3].

Dans un second temps, nous traiterons des applications effectuées sur des objets biologiques. Nous visualiserons tout d'abord des cellules HeLa suivant différentes coupes en profondeur. Nous verrons que comme pour toutes techniques innovantes il apparaît nécessaire de faire un long apprentissage afin d'interpréter les images obtenues. Nous analyserons dans un second temps le phénomène de l'apoptose provoquée sur des différentes cellules Cos. Nous essayerons de comprendre les variations de signal de TH en fonction des mécanismes intracellulaires induits par l'apoptose. Nous validerons ensuite l'effet de la polarisation du faisceau fondamental sur la GTH, phénomène que nous avons défini dans le chapitre III paragraphe I.3 à travers des expériences effectuées sur les cellules à notre disposition. Enfin nous évoquerons quelques expériences de microscopies par GTH réalisées par d'autres équipes de recherche en Israël, en France et à Taiwan.

I- CARACTERISATION NON LINEAIRE DE MATERIAUX VIA LA MICROSCOPIE PAR GTH

La caractérisation non linéaire de matériaux est la thématique principale de notre groupe de recherche. Différentes techniques d'évaluation et de détermination de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois ont été mises au point au cours de ces dernières années dans notre équipe et notre nouvel outil réalisé ici apparaît être très utile pour évaluer concrètement les variations de $\chi^{(3)}$ d'un point de vue microscopique sur un même objet. En effet nous allons voir dans le paragraphe I.1 que l'analyse d'images GTH réalisées sur un matériau vitreux permet de vérifier l'homogénéité d'un verre en termes de non linéarité.

Dans le paragraphe I.2, après avoir décrit brièvement ce qu'est la technique de « poling » ainsi que l'utilité de celle-ci, nous analyserons les variations de $\chi^{(3)}$ entre une partie « polée » et une autre non « polée » d'un verre. Nous concluons alors par ce qu'engendre de telles variations.

Enfin le paragraphe I.3 décrira une expérience via le microscope par GTH réalisée sur des guides d'onde écrits par un laser ultracourt intense. Après avoir commenter brièvement le principe de réalisation de tels guides d'onde, nous verrons que l'imagerie par GTH permet de vérifier la qualité des guides d'onde écrits sous différentes énergies de l'impulsion du laser intense. Par ailleurs nous verrons que la variation de $\chi^{(3)}$ sur ces guides d'onde est dépendante de l'énergie des impulsions du laser intense.

I.1- Homogénéité d'un verre

Nous souhaitons connaître à l'échelle microscopique l'homogénéité d'un matériau vitreux, c'est-à-dire les éventuelles variations de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois. Cette analyse dérive de la technique d'analyse GTH du système de focalisation développé dans le paragraphe II.3 chapitre III, elle reprend notamment le travail sur l'amplitude du champ de TH. Pour l'expérience nous utilisons l'objectif Apochromat x20/0,75 et la zone de balayage réalisée est de 117 x 117 microns autour du centre du champ de vue de l'objectif. Après une analyse préliminaire du système de focalisation (technique identique à celle effectuée sur l'objectif Plan-NeoFluar x40/0,75 effectuée dans le paragraphe II.3 du chapitre précédent), nous constatons que sur la zone balayée ne présente pas d'aberrations, ni de

fluctuations significatives sur la transmission du faisceau fondamental par l'objectif. De plus sur cette zone de 117 x 117 microns la résolution est homogène.

En reprenant le modèle théorique exposé dans le paragraphe II.3 du chapitre III, ainsi que l'expression de l'intensité du champ de tierce harmonique (expression (III-27)), nous obtenons pour cette analyse que la puissance moyenne de l'onde TH normalisée se comporte suivant l'expression suivante :

$$P_{3\omega_{\text{norm}}} \propto |\chi^{(3)}|^2 \quad (\text{IV} - 1)$$

En passant en échelle logarithmique pour observer le rapport entre la valeur de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois en une position (x, y) donnée à la valeur de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois d'une position référence, au centre de l'image, et au premier ordre, on obtient finalement :

$$\frac{1}{2} \ln \left(\frac{P_{3\omega_{\text{norm}}}}{P_{3\omega_{\text{norm-centre}}}} \right) = \frac{\Delta \chi^{(3)}}{\chi_{\text{centre}}^{(3)}} \quad (\text{IV} - 2)$$

L'échantillon à étudier est un verre exploré sur une région de 117 x 117 microns en 185 sections espacées de 200 nanomètres soit un zone balayée de 37 μm suivant z comme représenté sur la figure 3 ci-dessous.

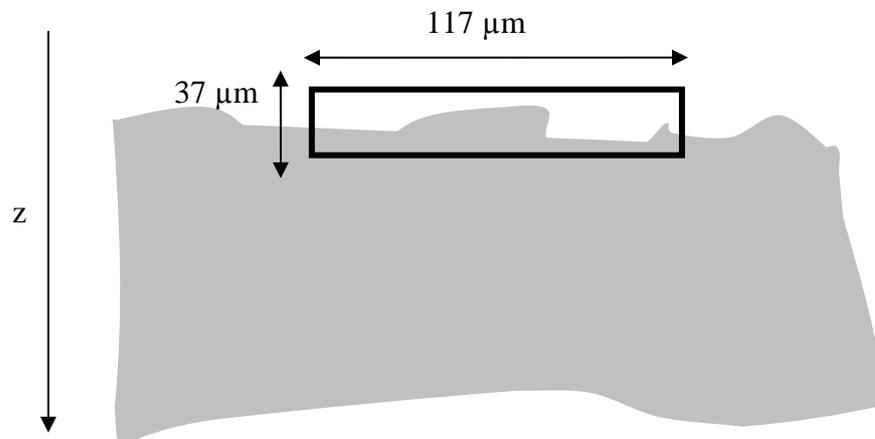


Figure 3 : Protocole expérimental : schéma de principe.

Le verre étudié a une qualité de surface moyenne. Pour chaque position (x, y) de la région scannée, nous avons donc exploré sur 37 μm la zone autour de l'interface de façon à mesurer le maximum de signal TH. Après un traitement des images réalisées, renormalisation sur un même plan des maxima de signal TH, nous pouvons cartographier les variations susceptibilité non linéaire d'ordre trois par rapport à sa valeur au centre de l'image. Nous obtenons ainsi la figure 4 ci-dessous.

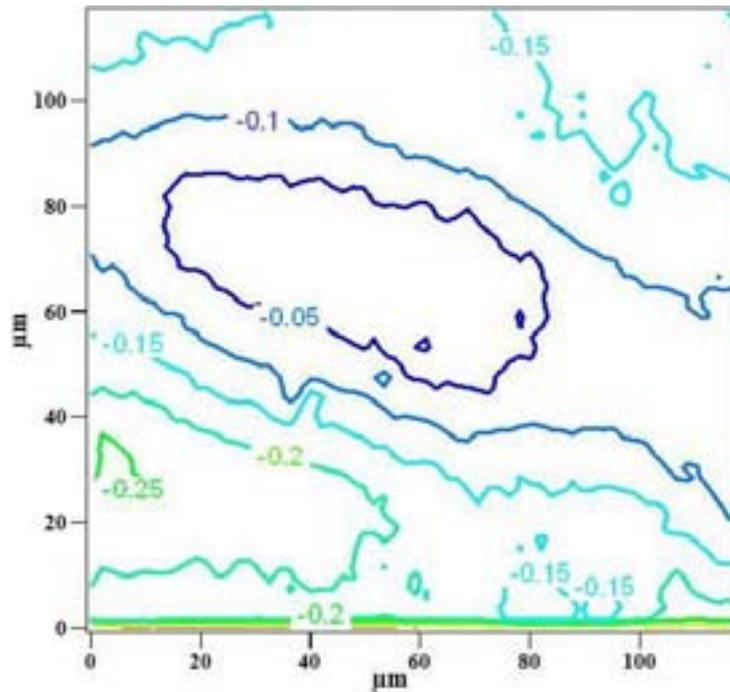


Figure 4 : Variations $\Delta\chi^{(3)}$ par rapport à un $\chi^{(3)}$ de référence, ici au centre de l'image sur une région de 117 x 117 microns.

Nous pouvons voir sur la figure 4 que la susceptibilité non linéaire d'ordre trois varie jusqu'à 25% de sa valeur de référence sur une région relativement petite.

Nous pouvons ainsi conclure que l'échantillon vitreux testé ici présente des hétérogénéités en terme de non linéarités d'ordre trois. Ce verre n'est pas de bonne qualité optique et son utilisation pour diverses expériences optiques est fortement à déconseiller.

I.2- Analyse du signal de tierce harmonique pour un verre « polé »

L'essor des télécommunications depuis ces quinze dernières années est considérable et il se traduit à la fois par le développement des outils d'information (Internet, téléphonie mobile) et par le développement des vecteurs de l'information (réseaux de télécommunications). L'optique avec le photon en lieu et place de l'électron s'impose progressivement comme une des techniques principales pour le transport de l'information puisque la lumière présente l'intérêt d'offrir des temps de propagation et de commutation extrêmement courts. Le passage à des systèmes de transport de l'information tout optique semble inéluctable. Dans cette perspective, il est nécessaire d'inventer les équivalents optiques des systèmes électroniques pour les réseaux et les systèmes tout optique. Depuis les années 90, plusieurs éléments optoélectroniques ont vu le jour (amplificateur, routeur, coupleur, modulateur, commutateur). Cependant des problèmes subsistent et des

améliorations, à la fois en recherche fondamentale et en recherche appliquée, sont à apporter. C'est dans ce sens que plusieurs équipes de L'ICMCB de Bordeaux travaillent pour réaliser de nouveaux systèmes électro-optiques, notamment des commutateurs électro-optique basé sur l'effet Pockels linéaire. Ces commutateurs existent déjà mais ils sont issus d'une technologie coûteuse basée sur des matériaux cristallins. Dans un souci de standardisation, les matériaux vitreux, et la silice vitreuse plus particulièrement, sont des candidats potentiellement intéressants. En effet les verres inorganiques disposent de qualités essentielles pour le développement de ce dispositif telles leur mise en forme aisée, leur faible coût et surtout leur grande diversité de composition. Néanmoins, afin d'être exploités, ces matériaux vitreux doivent être actifs en optique non linéaire et posséder une susceptibilité d'ordre deux. Or en raison de leur isotropie optique et plus particulièrement de leur centro-symétrie, ces matériaux vitreux jusqu'à récemment, ne présentaient pas de susceptibilité d'ordre deux. Le fait que l'application du traitement de « poling », c'est-à-dire une polarisation thermique sous champ électrique, rompt l'isotropie optique du verre et confère des propriétés optiques non linéaires d'ordre deux à certains matériaux vitreux ouvre la mise au point de tels dispositifs.

Nous verrons ci-après quelques brefs rappels sur ce qu'est le « poling », sa technique d'application ainsi que le mécanisme induisant la GSH. Enfin nous exposerons l'expérience réalisée grâce au prototype où nous verrons que la microscopie par GTH apparaît être un outil intéressant pour faire un premier diagnostic sur la qualité du « poling » réalisé. Plusieurs ouvrages traitant du « poling » sont disponibles et nous invitons le lecteur à consulter par exemple l'ouvrage de thèse de Brito Ferreira pour de plus amples renseignements [4].

I.2.1- Définition du « poling »

En raison de la nature des verres, la génération de second harmonique dans les verres n'est pas possible. Seul un traitement de « poling », appliqué à certains types de verres, permet d'observer le phénomène. Par abus de langage, nous conservons le terme anglais « poling » (et les mots dérivés) qui correspond en français au vocable polarisation.

Les modèles proposés pour expliquer la GSH ont été élaborés à partir d'expériences menées sur la silice. Ainsi un modèle général basé à la fois sur la migration de charges et sur la réorientation d'entités polaires a été proposé [5, 6] et se traduit par l'équation suivante :

$$\chi^{(2)}(2\omega) \propto \chi^{(3)}(2\omega; -\omega, -\omega, 0) E_{dc} + \frac{N\beta^* \mu^* E_1}{5\epsilon_0 kT} \quad (IV-3)$$

avec E_1 le champ électrique local, β^* l'hyperpolarisabilité effective corrigée du champ local, μ^* le moment dipolaire permanent effectif, k la constante de Boltzmann, T la température et N la densité volumique de dipôles.

La présence du champ statique figé E_{dc} dans le matériau est à l'origine d'une partie de la susceptibilité d'ordre deux. Ce champ statique provient de la migration de charges (impuretés cationiques : Na^+ , H^+) lors du traitement de « poling » sous champ électrique.

Ainsi, ce champ statique, introduit dans le terme du troisième ordre, conduit à la création d'un pseudo $\chi^{(2)}$ effectif. Dans le cas de la silice, le champ électrique est estimé à 10^6 $V.mm^{-1}$ et $\chi^{(3)}=11.10^{-23} m^2/V^2$, nous obtenons $\chi^{(2)} \approx 0,1 pm/V$.

Dans le cas de matériau possédant des entités hyperpolarisables à fort moment dipolaire (matériau polymère organique par exemple), la réorientation de ces dipôles sous l'action du champ statique peut également contribuer à la susceptibilité d'ordre deux. Ces modèles prédisent tous l'existence d'une zone « polée » au niveau de l'anode de quelques micromètres d'épaisseur.

Le « poling » correspond au traitement thermique sous champ électrique d'un verre (organique et/ou minéral) comme le présente schématiquement la figure 5 suivante.

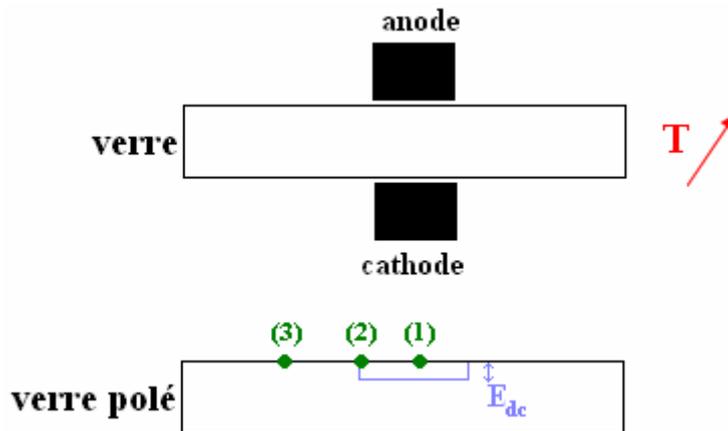


Figure 5 : Principe schématique du « poling ». Suite au traitement, le verre présente une zone « polée » autour de l'anode de quelques micromètres d'épaisseur. Les points (1), (2) et (3) sont respectivement les points de mesure suivant z en zone « polée », à proximité de la zone « polée » et hors de la zone « polée ».

Techniquement, il s'effectue à une température inférieure à la température de transition vitreuse du verre et pour des champs électriques de quelques dizaines de kV par cm. Par exemple pour la silice fondue (prise comme référence, $T_g \approx 1730^\circ C$), nous avons, pour la

température $T=250 - 350^{\circ}\text{C}$, et pour le champ $E=30 - 50\text{kV}$ par cm. Il existe d'autres méthodes de « poling » apparues avec l'évolution des techniques.

I.2.2- Techniques de « poling »

Les techniques de « poling » sont empruntées à l'étude des matériaux ferroélectriques pour lesquelles reposent sur l'obtention de monodomains ferroélectriques [7]. Elles ont été adaptées et développées aux échantillons vitreux. Les techniques sont :

- Le « poling » électrique qui est la technique de base avec l'application d'un champ électrique de quelques kV par mm sur un échantillon vitreux.
- Le « poling » thermique où l'échantillon est chauffé au préalable [8] puis application de la haute tension, méthode qui a été utilisée.
- Le « poling » optique qui est à l'origine la première technique de « poling » [9]. L'échantillon est irradié par un faisceau laser polarisé. La combinaison des différentes techniques est possible et nous parlons alors de « poling » thermique assisté par irradiation.

I.2.3- Expérience de microscopie par GTH sur un verre « polé »

Comme l'indique la relation (IV-3), une composante du tenseur de susceptibilité non linéaire d'ordre trois participe à la génération de seconde harmonique. La microscopie par GTH apparaît être alors un outil qualitatif pour vérifier la zone « polée » d'un verre. Nous nous proposons de visualiser le signal de GTH sur deux points du verre, l'un sur une zone non « polée », l'autre sur une zone « polée », en balayant en z autour de l'interface verre – air (points (1) et (3) sur la figure 5). Nous obtenons ainsi le résultat suivant (figure 6) :

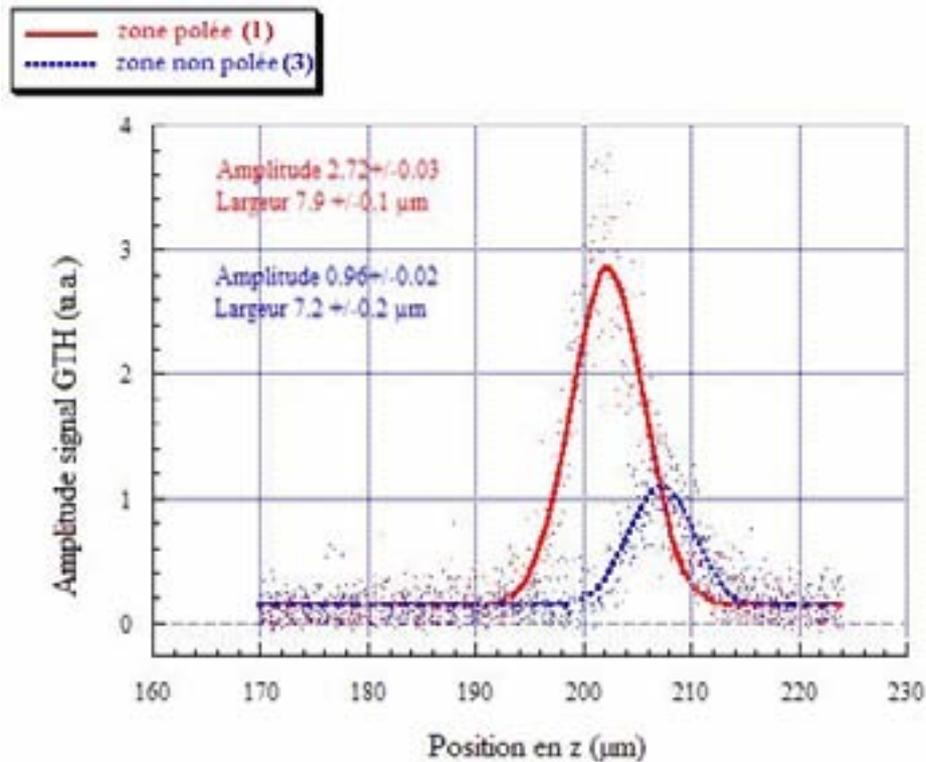


Figure 6 : Amplitude du signal GTH autour de l'interface verre – air pour deux points du verre, un dans la zone « polée », l'autre dans la zone non « polée » (points (1) et (3) sur la figure 5) .

Nous observons un signal GTH trois fois plus important sur la zone « polée » que sur la zone « non polée ». Nous pouvons en déduire que le $\chi^{(3)}$ a augmenté dans la zone « polée » par rapport à la zone non « polée ». D'après le processus de « poling » (équation IV-3), le couplage de la susceptibilité d'ordre trois $\chi^{(3)}$ au champ statique E_{dc} conduit à la création d'un $\chi^{(2)}$ effectif. Or ce phénomène d'augmentation de $\chi^{(3)}$ n'est pas pris en compte dans les modèles. On peut imaginer que les éléments hyperpolarisables en présence d'un champ électrique ont leurs nuages d'électrons plus facilement polarisés.

Par ailleurs la microscopie par GTH permet de mesurer l'épaisseur de la zone « polée ». En effet, en se propageant suivant z , nous devons avoir un pic du signal GTH lorsque le faisceau fondamental est focalisé au niveau de l'interface air - verre « polé » puis un autre pic lorsque le faisceau fondamental est focalisé au niveau de l'interface zone « polée » - zone non « polée ». La différence en z entre ces deux pics permet alors de déterminer l'épaisseur du traitement de « poling ». L'expérience est réalisée en deux points du verre : le premier point est localisé en plein centre de la zone polée et le second en extrême limite (points (1) et (2) sur la figure 5). Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 7 ci-dessous :

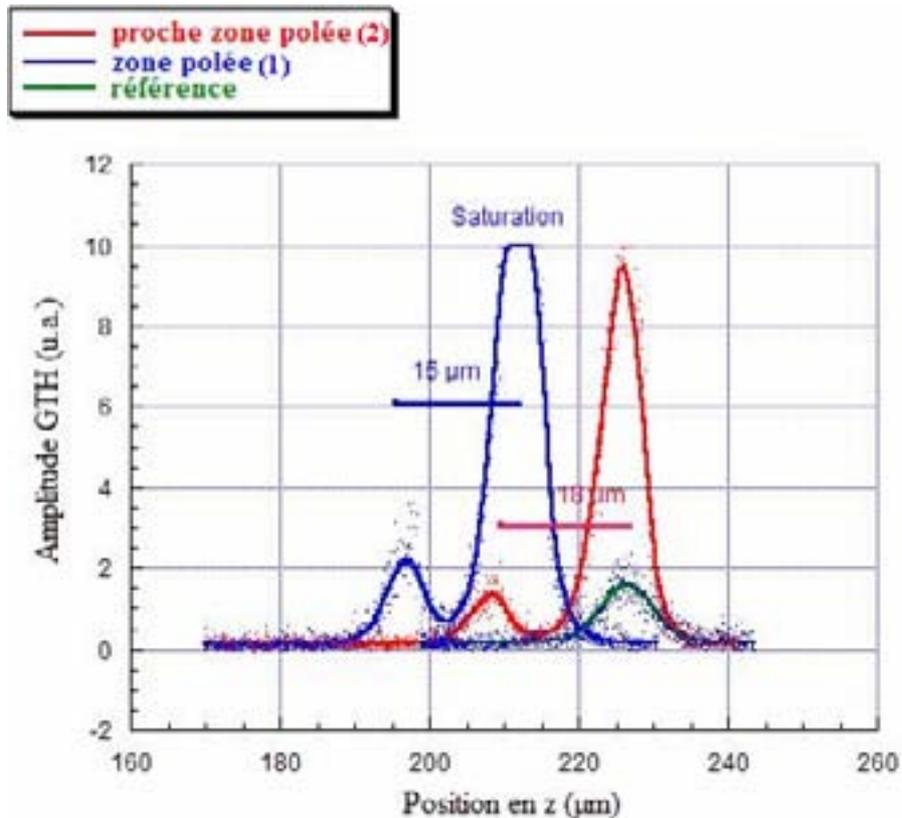


Figure 7 : Détermination de l'épaisseur du traitement de « poling » en deux points du verre : le premier au centre de la zone polée (courbe bleue), le second en limite de la zone (courbe rouge).

Malgré une saturation du système de détection due à une GTH trop forte, nous pouvons estimer l'épaisseur de la zone « polée » entre 15 et 18 μm . Cette mesure corrobore parfaitement les modèles actuels.

Le prototype de microscopie par GTH apparaît être donc un outil intéressant pour permettre un premier examen qualitatif sur des verres « polés » et ainsi valider ou non la poursuite d'expérimentations validant le matériau vitreux réalisé pour le type d'application souhaité.

I.3- Analyse des propriétés non linéaires d'un guide d'onde

L'écriture laser directe (au sens de la modification des propriétés physiques d'un matériau) utilisant des sources laser infrarouges ultrarapides devient un mode de fabrication de guide d'onde dans des matériaux optiques très prometteur. Cette technique permet en effet une fiabilité, un faible coût et une simplicité d'utilisation, sans besoin de fabrication de masque, contrairement aux techniques de fabrication standard. Plusieurs dispositifs ont été réalisés en utilisant cette technique tels des couplages en Y [10], des couplages directionnels [11,12], des guides d'onde tubulaires [13] et des guides d'onde actifs [14]. De plus, les lasers

ultracourts utilisés pour l'écriture opèrent à des énergies bien en dessous des bandes d'énergies du matériau. Le matériau est transparent à la longueur d'onde d'écriture, permettant un traitement en 3 dimensions limité seulement par la distance de travail des optiques de focalisation. Ainsi, des guides d'onde en trois dimensions peuvent être produits [15] comme l'illustre la figure 8 ci-après.

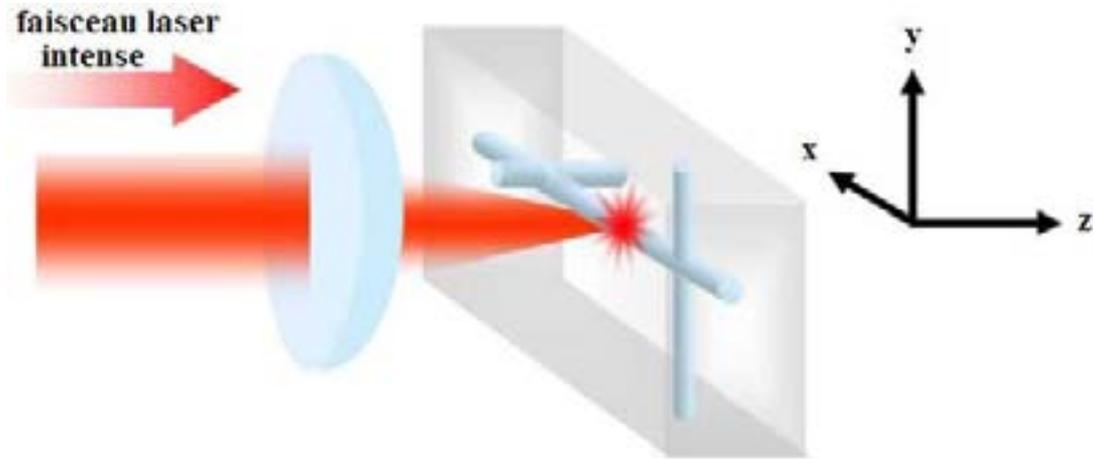


Figure 8 : Principe d'écriture de guide d'onde.

Les mécanismes d'écriture dans les matériaux vitreux transparents peuvent être regardés comme une transition de phase induite par le laser dans le matériau, au delà d'un certain seuil. La structure est généralement fortement modifiée et les propriétés optiques le sont également. Parfois la zone irradiée comme par exemple dans la silice présente un indice de réfraction plus faible permettant de créer des guides d'onde. De nombreuses études Raman, IR, rayons X ont montré la structuration du matériau avec une augmentation des défauts [16-18]. Les propriétés non linéaires des guides d'onde créées sont peu étudiées. Nous avons grâce à la microscopie par GTH étudié les variations de $\chi^{(3)}$ en fonction de l'énergie déposée. Nous supposons que la variation de $\chi^{(3)}$ est donnée par la relation suivante :

$$\frac{\Delta\chi^{(3)}}{\chi^{(3)}} = \sqrt{\frac{P_{3\omega}^{irr}}{P_{3\omega}^{non\ irr}}} - 1 \quad (IV - 4)$$

où $P_{3\omega}^{non\ irr}$ et $P_{3\omega}^{irr}$ sont les puissances moyenne de l'onde TH détectées respectivement sur la zone non irradiée et la zone irradiée. Cette relation signifie que la dispersion des phases irradiées et non irradiées est peu modifiée (on suppose que les deux zones irradiées et non irradiées ont la même longueur d'interaction J).

La figure 9 suivante présente la variation des propriétés non linéaires en fonction de l'énergie par impulsion. Nous remarquons, que la non linéarité diminue et sature pour des énergies supérieures à 2 μ J ce qui est en accord avec les autres mesures optique Raman, indices de

réfraction. Seule la taille de la zone modifiée augmente pour des énergies supérieures à 2 μJ [16-18].

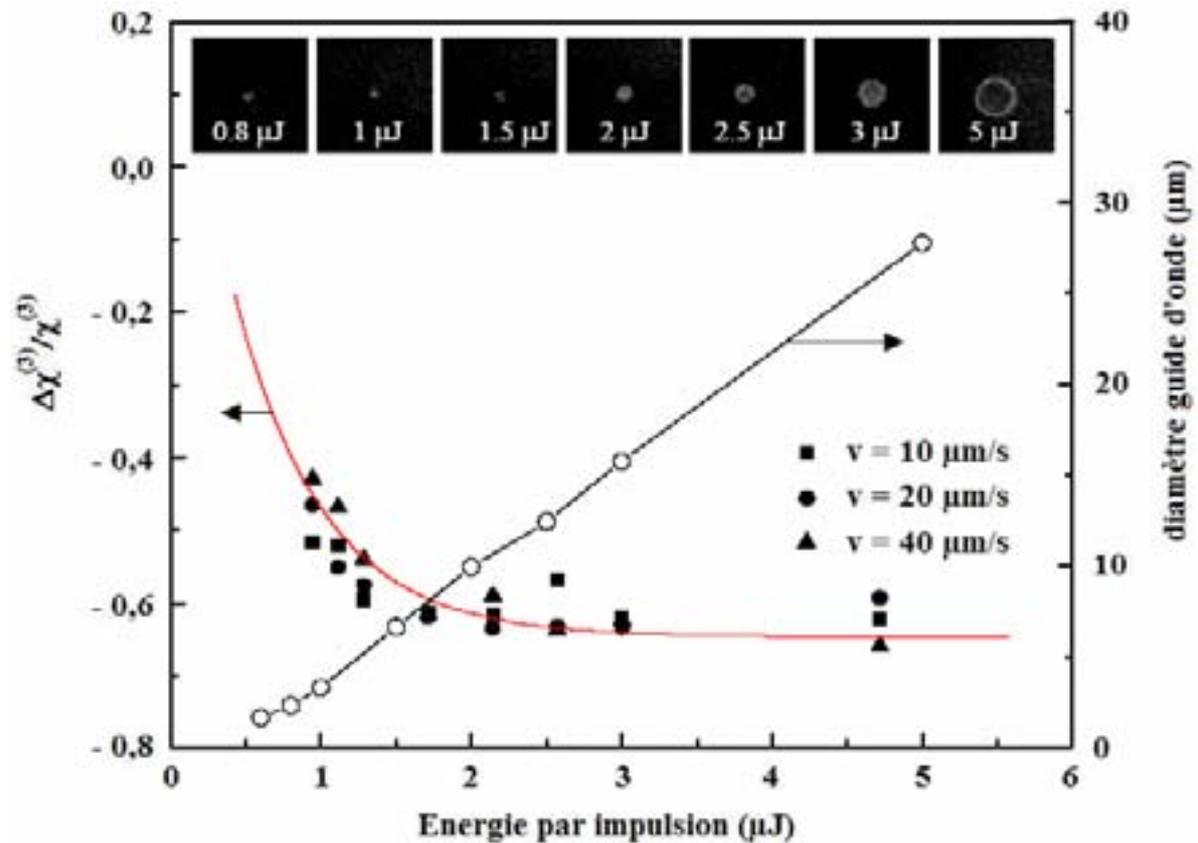


Figure 9 : Diamètre des guides d'onde et variations de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre en fonction de l'énergie de l'impulsion déposée sur le matériau. Les images en haut de la figure sont les images obtenues par GTH des guides d'onde pour différentes énergies d'impulsion.

Nous pouvons conclure que la microscopie par GTH apparaît être un bon outil pour le contrôle des guides d'onde car elle permet de caractériser les changements des propriétés non linéaires du matériau après l'écriture laser. En outre elle permet de visualiser de façon non invasive les éventuels défauts créés lors de l'écriture laser.

II- IMAGERIE PAR GTH D'ELEMENTS BIOLOGIQUES

La microscopie par GTH apporte un intérêt certain pour l'imagerie d'objets massifs (dans la limite de pénétration des rayons lumineux) comme nous l'avons illustré en introduction de ce chapitre. En effet, les images de TH réalisées ont toutes une bonne résolution même sur une grande profondeur. La limite n'est en fait due qu'à la distance de travail de l'objectif utilisé. De plus comme la microscopie par GTH repose sur les propriétés intrinsèques de l'échantillon, il n'est pas nécessaire, contrairement aux microscopies de fluorescence, d'introduire un agent de contraste extérieur comme des fluorophores (ou des chromophores pour la microscopie par GSH). Néanmoins, la localisation des colorants dans les constituants cellulaires permet une reconnaissance aisée en fluorescence. En microscopie par GTH, le signal est généré lorsque l'échantillon étudié présente des interfaces entre deux milieux d'indices différents. Dans le cas d'imagerie cellulaire, le caractère cohérent de la réponse GTH conduit à un signal global ce qui conduit à une difficulté d'interprétation des images obtenues. Ainsi, nous verrons tout d'abord comment comprendre les images par GTH de cellules HeLa en s'appuyant sur un modèle connu. Nous verrons à travers cet exemple que la microscopie par GTH donne une nouvelle information structurelle mais l'interprétation des images TH réalisées nécessite un long apprentissage.

Nous verrons dans un second temps que la microscopie par GTH est potentiellement utile en microscopie fonctionnelle lors d'expériences de morts cellulaires programmées.

Par ailleurs, nous vérifierons expérimentalement que la variation de la polarisation du faisceau fondamental permet de localiser les régions anisotropiques d'échantillons biologiques.

Enfin nous commenterons deux expériences réalisées par d'autres équipes de recherche qui démontrent bien l'utilité du microscope par GTH.

II.1- Apprentissage de l'interprétation

Comme pour toute nouvelle technique d'imagerie cellulaire, la microscopie par GTH nécessite un long apprentissage pour l'interprétation des images. En effet, les régions intracellulaires visualisées diffèrent des régions visualisées en imagerie de fluorescence puisque dans ce cas le fluorophore est localisé sur une région bien précise de la cellule. Dans le cas de la microscopie par GTH, la cellule émet un signal dans sa globalité et la visualisation des images réalisées entraîne une interprétation relativement complexe.

Dans ce paragraphe nous réalisons l'imagerie par GTH et en trois dimensions d'une cellule HeLa. Les cellules HeLa proviennent d'une lignée dérivée d'une tumeur du col et sont le modèle cellulaire le plus répandu pour différentes études biologiques.

L'expérience réalisée consiste à visualiser une cellule HeLa en différentes coupes suivant z. L'objectif de microscope utilisé est l'Apochromat x20/0,75, la taille des images est de 117 x 117 microns avec une résolution du pixel d'affichage de 0,235 μm (pas de 1 pour le balayage du scanner). Les coupes sont réalisées tous les 200 nanomètres sur une distance totale de 38 microns soit 190 images. Pendant l'expérience les cellules sont maintenues en vie dans un milieu HBSS de pH 7,3 à 25 °C. Nous avons choisi un objectif x20 grand champ de façon à pouvoir visualiser jusqu'à une centaine de cellules simultanément. L'inconvénient de cet objectif est sa faible ouverture numérique qui limite sa résolution axiale (environ 8 μm comme le montre la figure 7 précédente). Les images des objets biologiques vont donc être artificiellement étirée à cause de cette résolution. En reconstruction en trois dimensions les objets auront une apparence tubulaire. Nous n'avons pas effectué de déconvolution dans les résultats suivants car la déconvolution est une technique difficile à réaliser avec des signaux cohérents.

Nous allons ici montrer sur les figures 10, 11, 12, 13 et 14, les images réalisées tous les deux microns soit 20 images. L'image réalisée en $z = 0$ est la référence suivant z qui correspond au premier plan de la cellule visualisé.

Le code de couleurs choisi pour la représentation de ces cellules est tel que le mauve signifie un signe de TH faible et les couleurs de plus en plus vives caractérisent un signal TH plus fort.

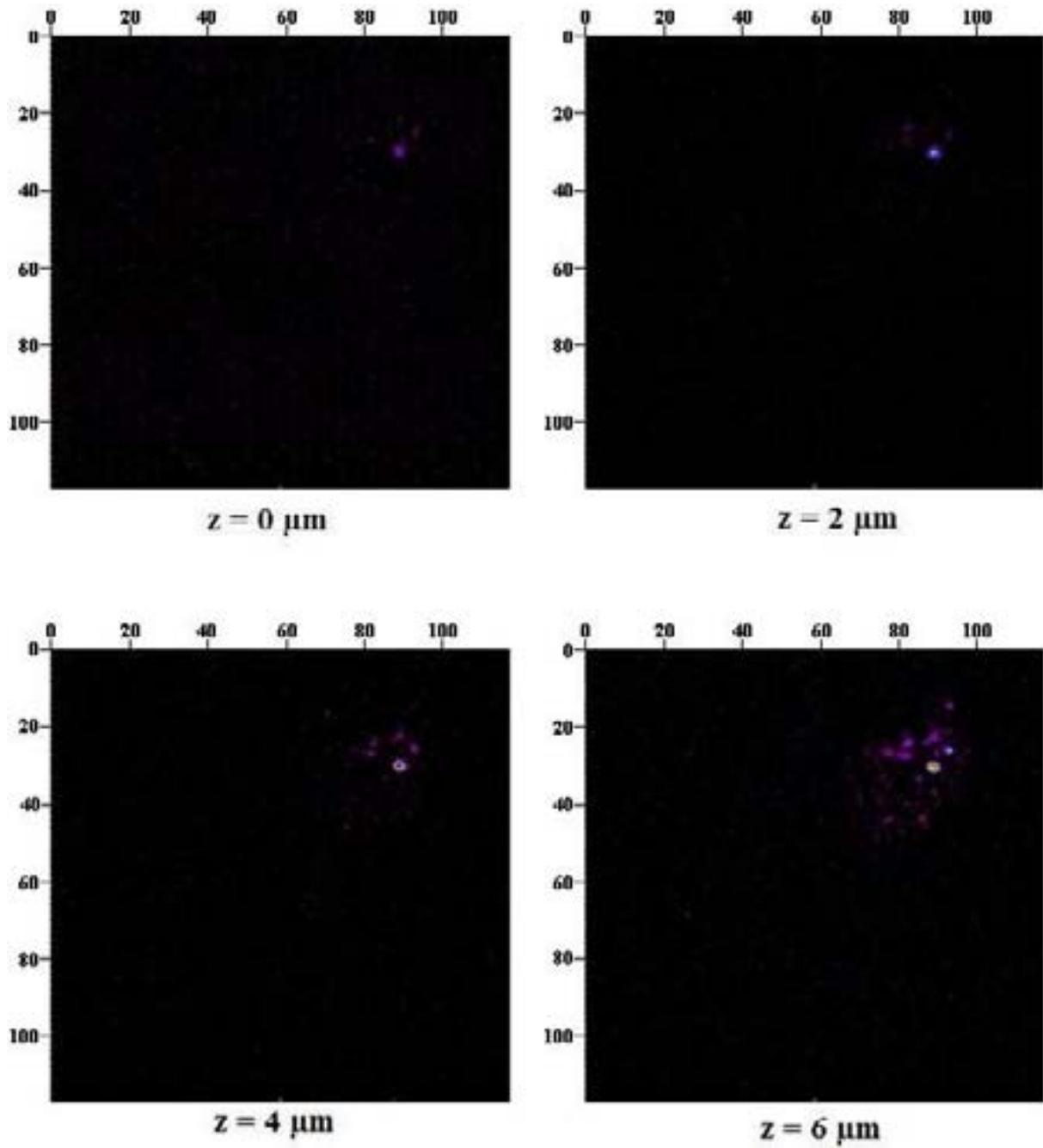


Figure 10 : Images d'une cellule HeLa en microscopie par GTH suivant z à 0, 2, 4 et 6 microns de profondeur.

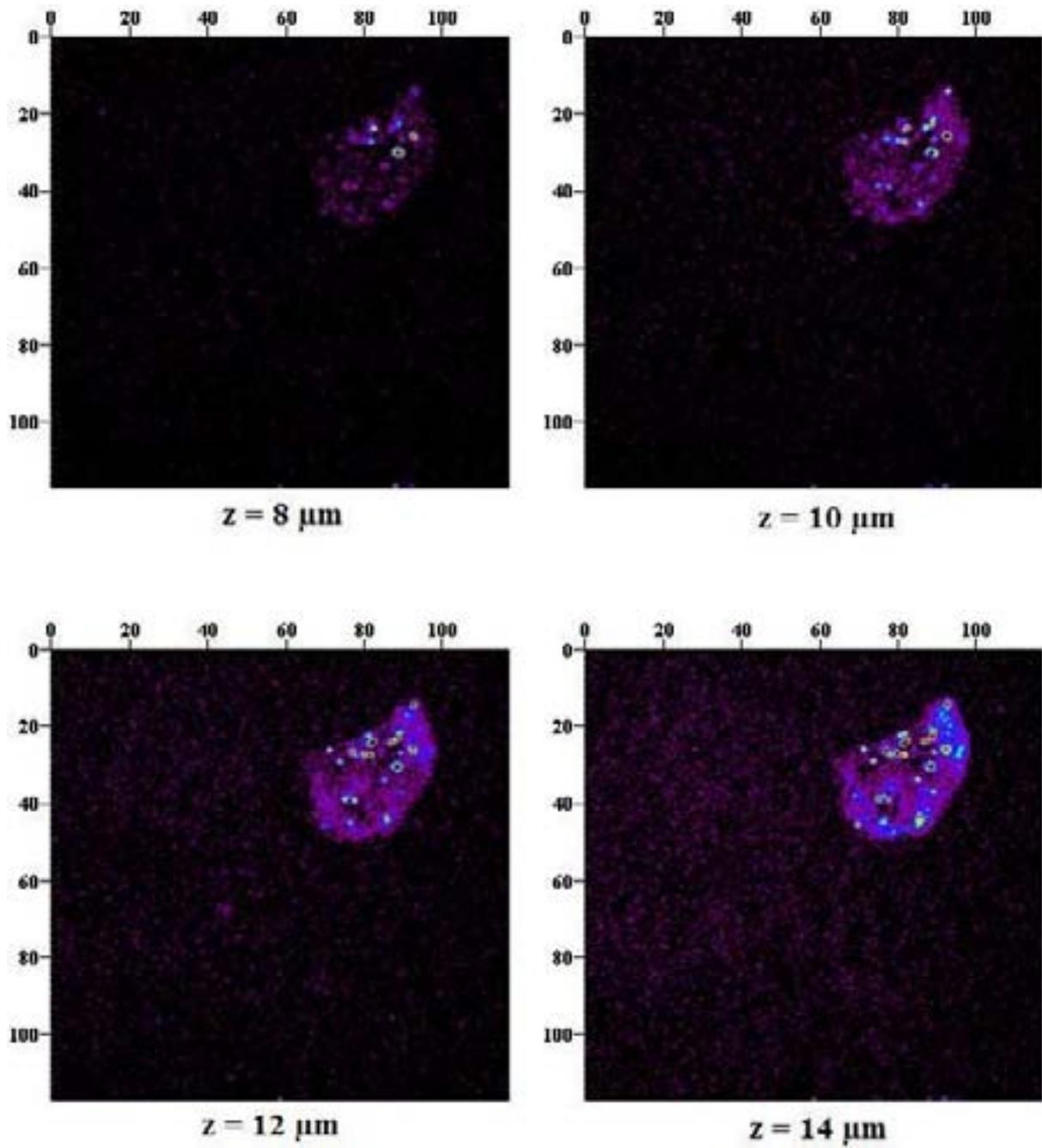


Figure 11 : Images d'une cellule HeLa en microscopie par GTH suivant z à 8, 10, 12 et 14 microns de profondeur.

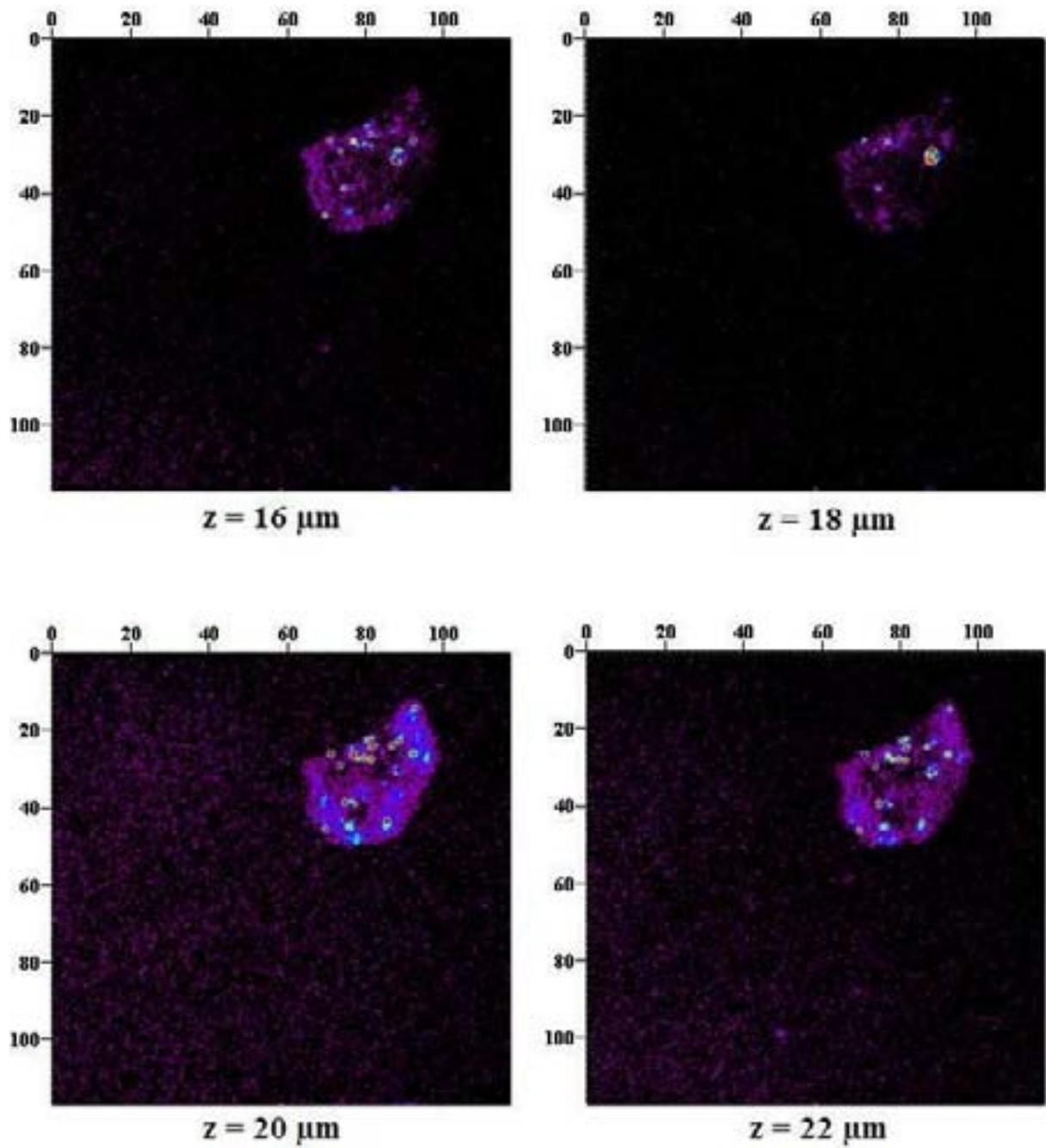


Figure 12 : Images d'une cellule HeLa en microscopie par GTH suivant z à 16, 18, 20 et 22 microns de profondeur.

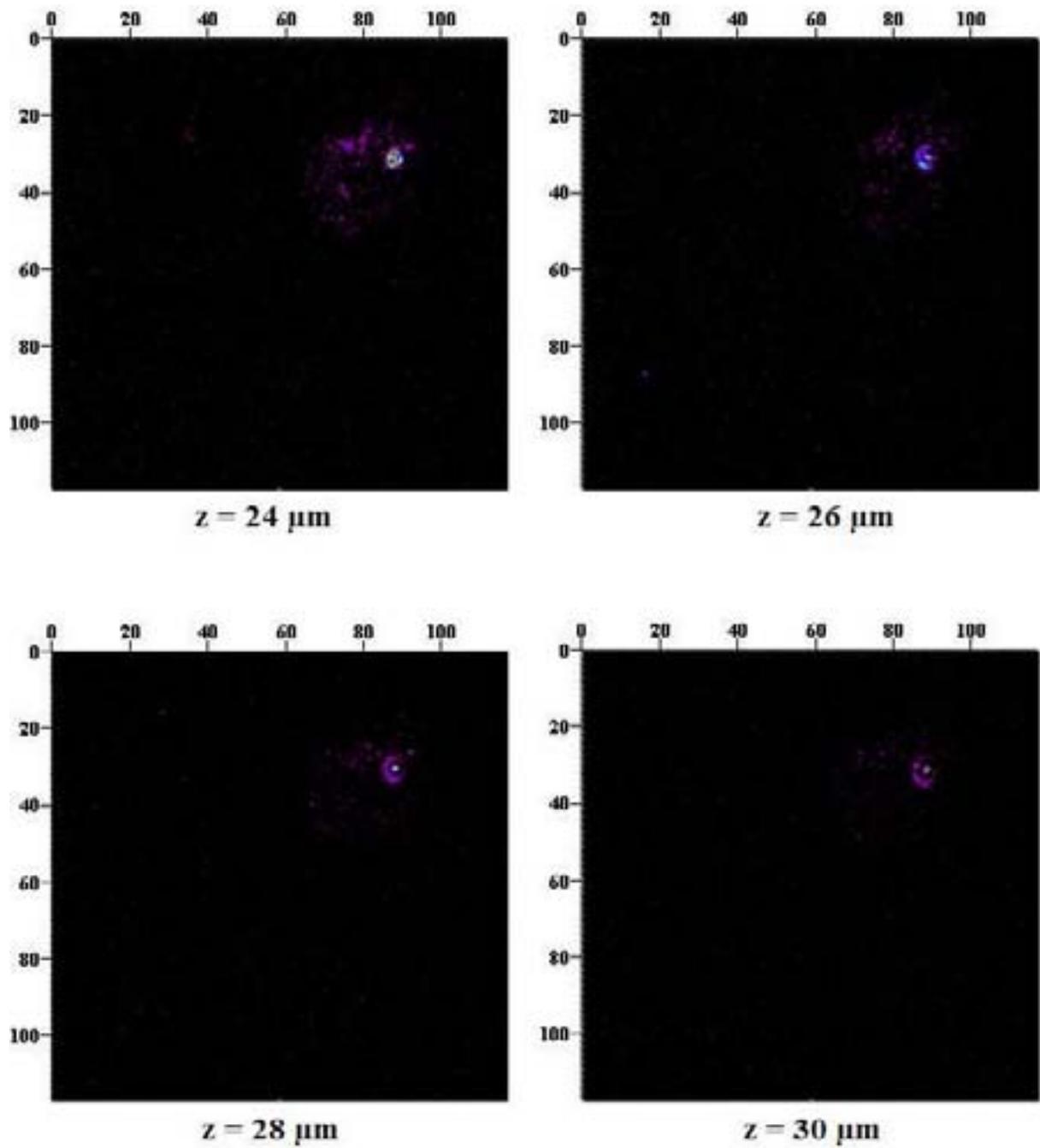


Figure 13 : Images d'une cellule HeLa en microscopie par GTH suivant z à 24, 26, 28 et 30 microns de profondeur.

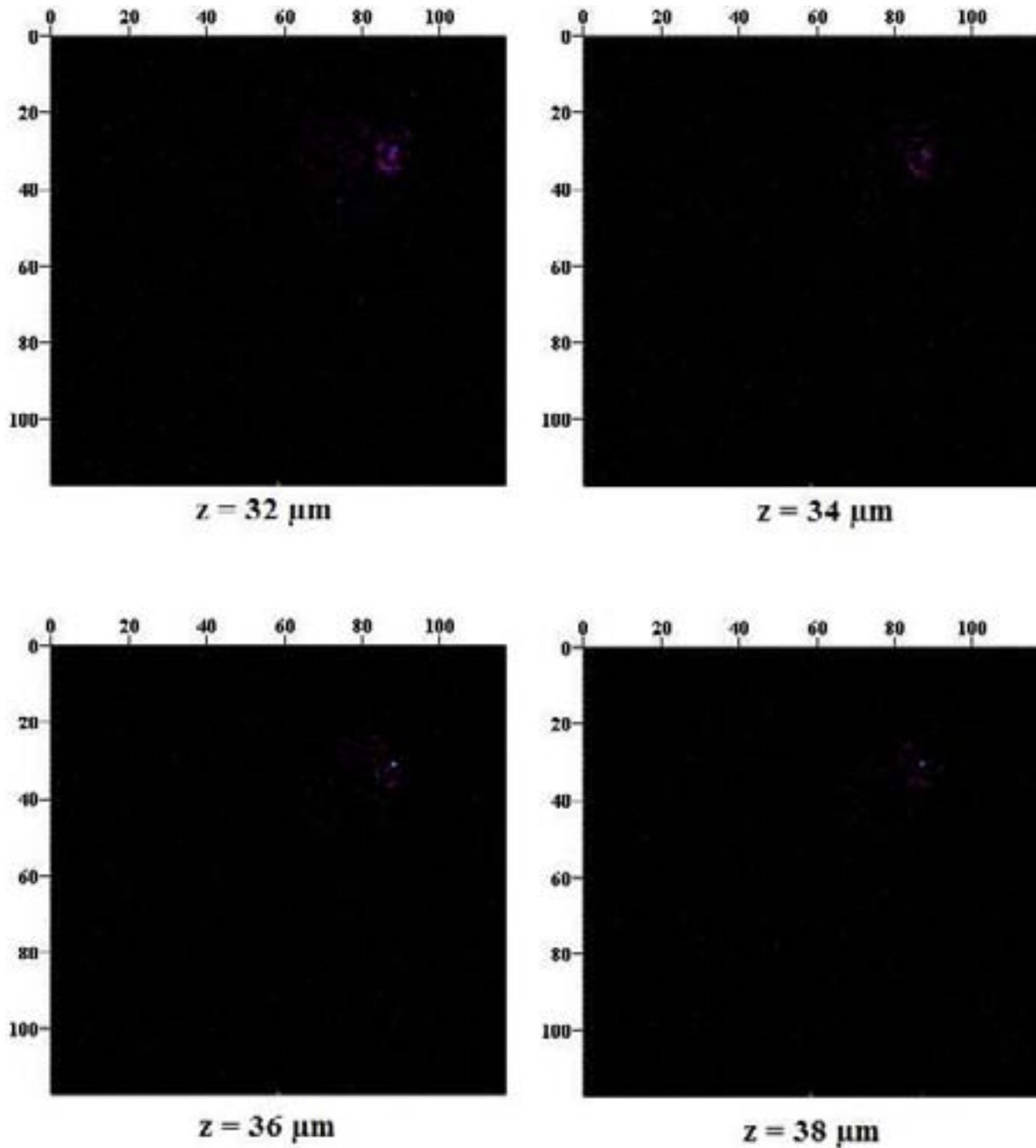


Figure 14 : Images d'une cellule HeLa en microscopie par GTH suivant z à 32, 34, 36 et 38 microns de profondeur.

Nous pouvons voir à travers les différentes images la structure tridimensionnelle de l'enveloppe de la cellule HeLa mais il n'est pas possible de visualiser des éléments tels le noyau ou les mitochondries à l'intérieur de celle-ci. Nous pouvons constater par contre suivant les coupes en z de la cellule que des formes cylindriques ou sphériques disséminées aléatoirement dans la cellule délivrent des signaux en tierce harmonique très forts quasiment en limite de saturation des détecteurs. Ces structures ont une taille moyenne de deux microns. Il semblerait que ces formes soient des vésicules lipidiques présentes dans toute cellule.

Afin de valider notre hypothèse sur l'identité de ces vésicules, nous effectuons une nouvelle expérience avec la même configuration pour le prototype de microscope par GTH et nous souhaitons visualiser une cellule cancéreuse du foie, une cellule Huh7, provenant d'une série de cellules qui ont été exagérément enrichies en lipides et préalablement visualisées en microscopie confocale en marquant ces lipides avec le colorant Oil Red O [19]. Nous obtenons alors 20 images réalisées par GTH séparées chacune de un micron suivant z, soit une profondeur explorée de 20 microns. Ces images sont représentées sur les figures 15, 16, 17, 18 et 19 ci-après.

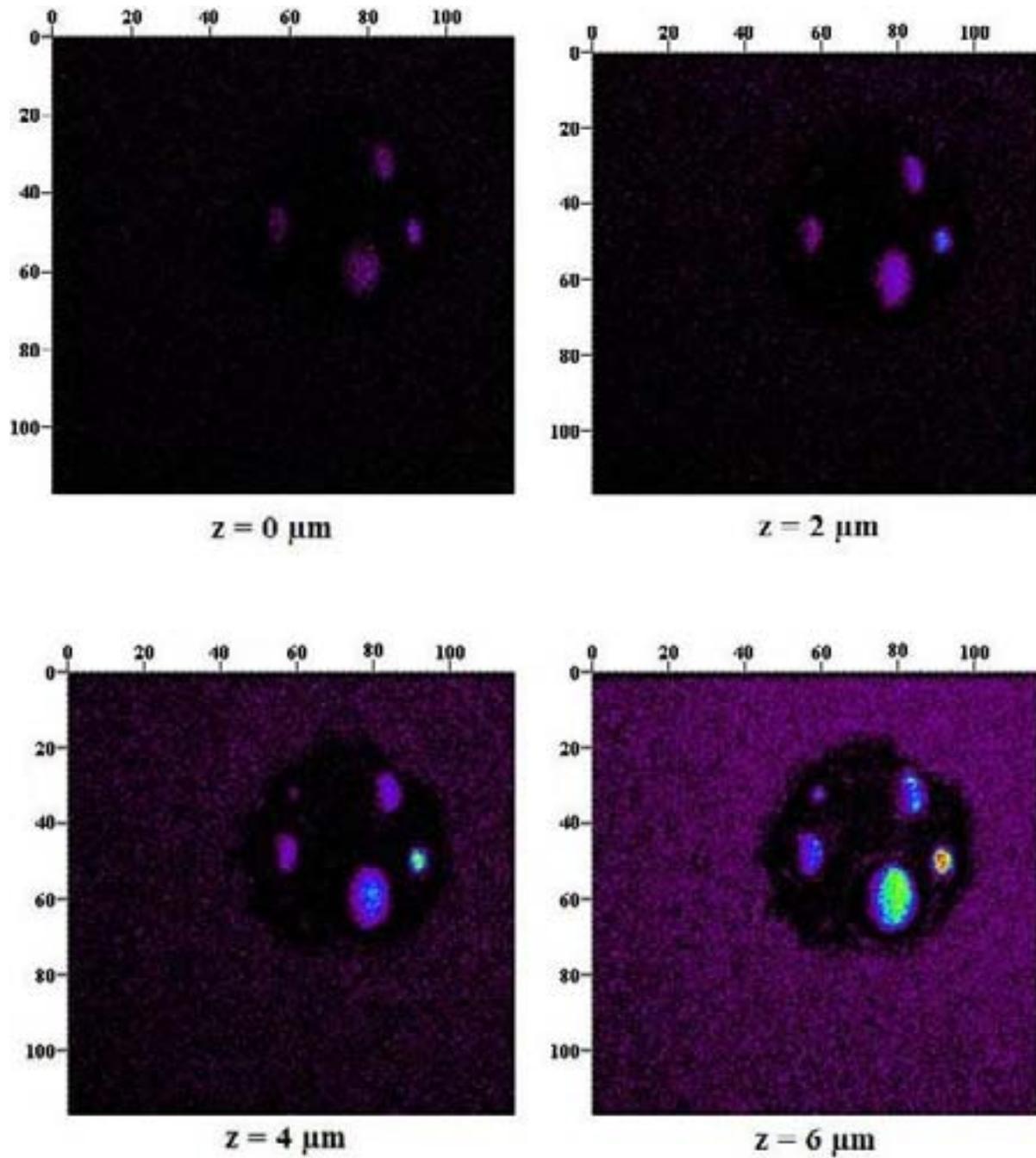


Figure 15 : Images d'une cellule Huh7 modifiée en microscopie par GTH suivant z à 0, 2, 4 et 6 microns de profondeur.

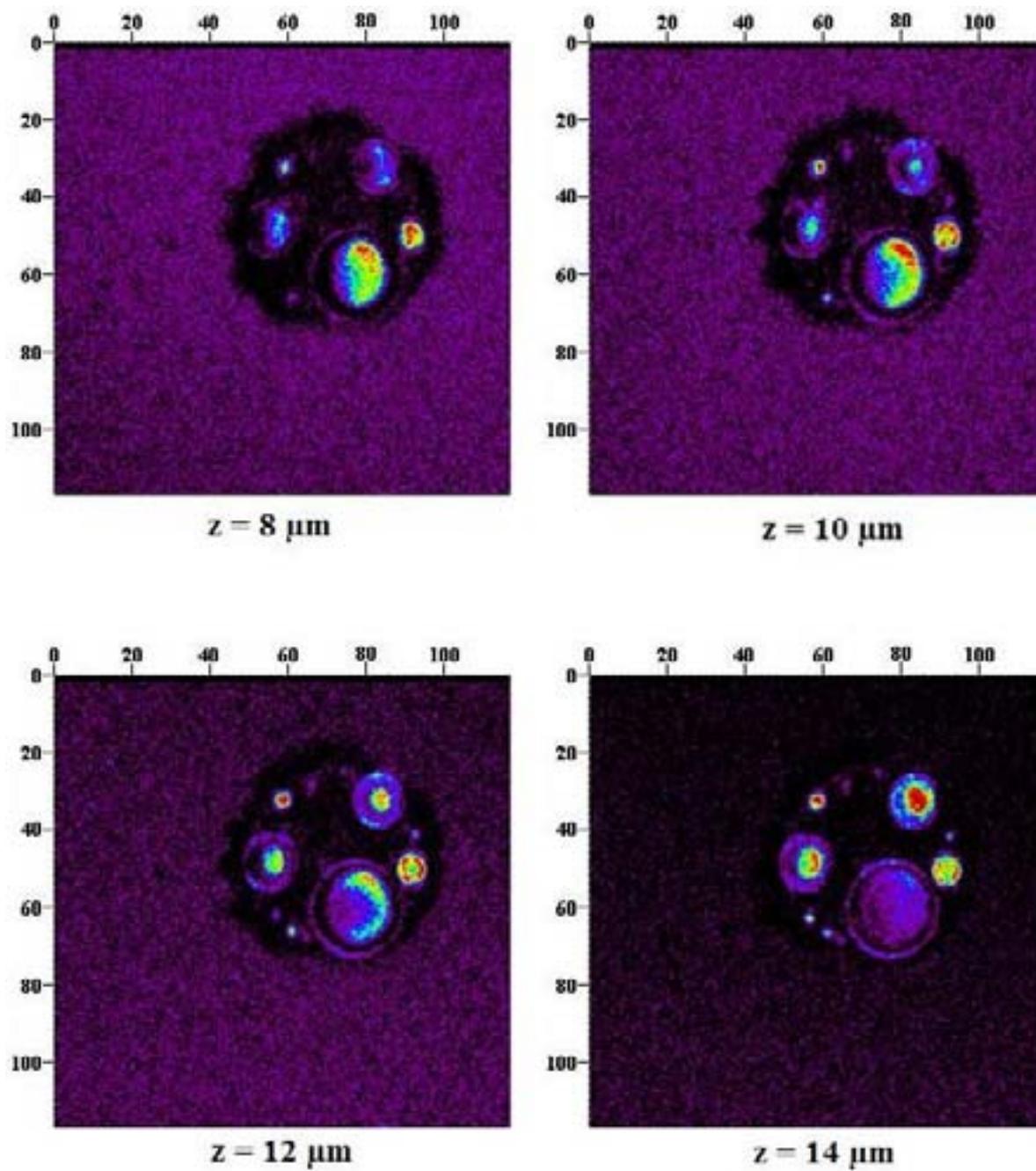


Figure 16 : Images d'une cellule Huh7 modifiée en microscopie par GTH suivant z à 8, 10, 12 et 14 microns de profondeur.

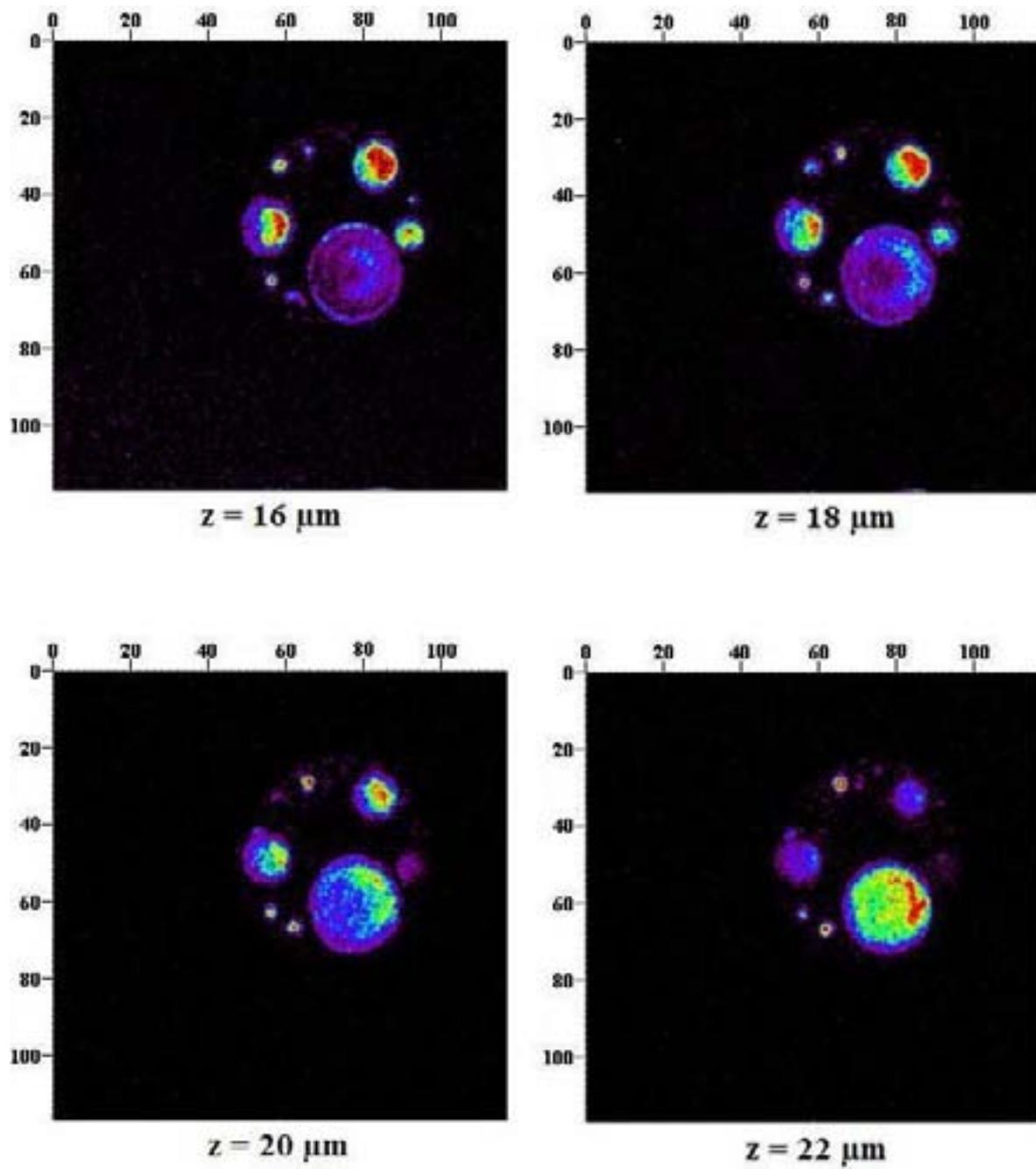


Figure 17 : Images d'une cellule Huh7 modifiée en microscopie par GTH suivant z à 16, 18, 20 et 22 microns de profondeur.

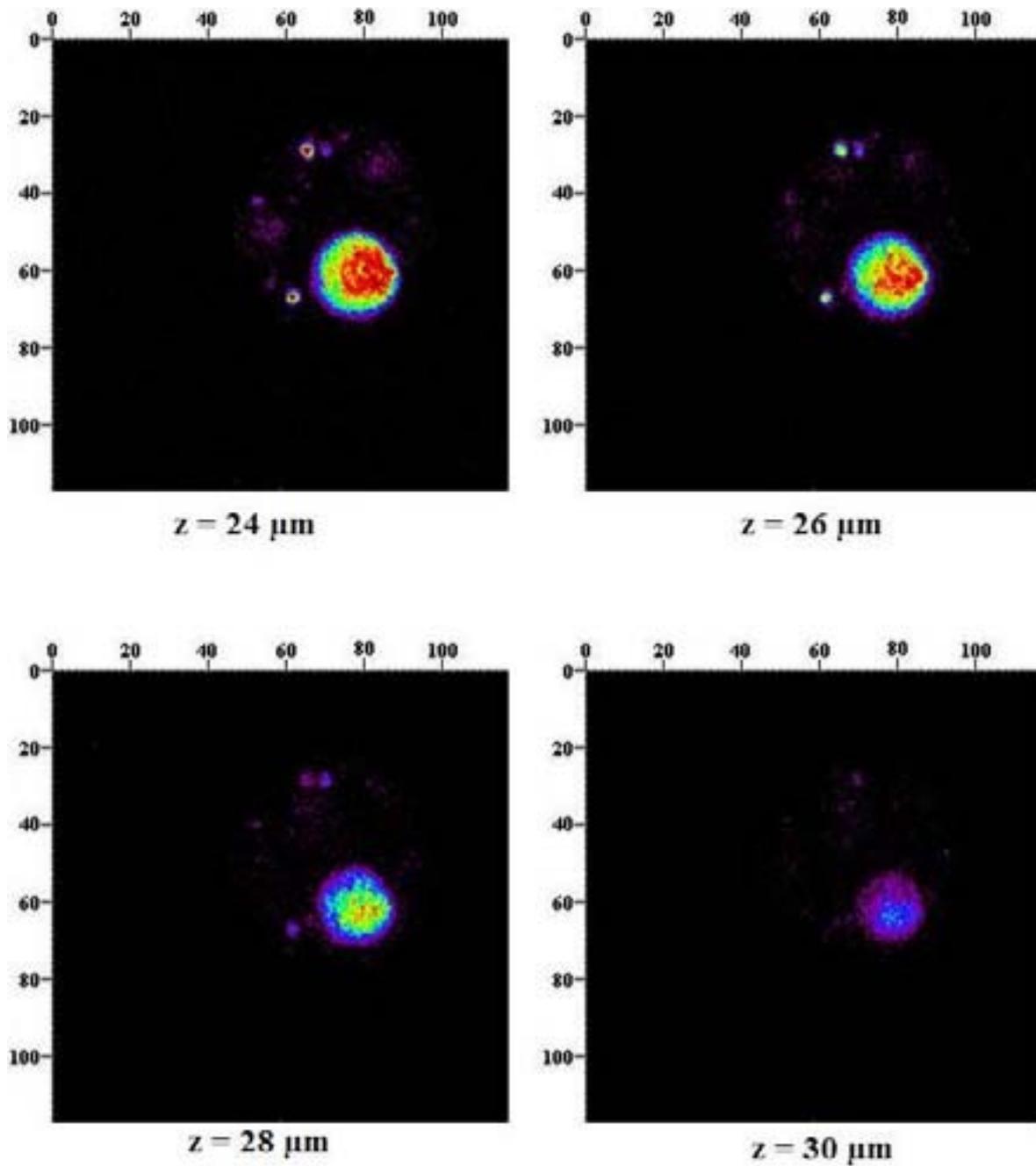


Figure 18 : Images d'une cellule Huh7 modifiée en microscopie par GTH suivant z à 24, 26, 28 et 30 microns de profondeur.

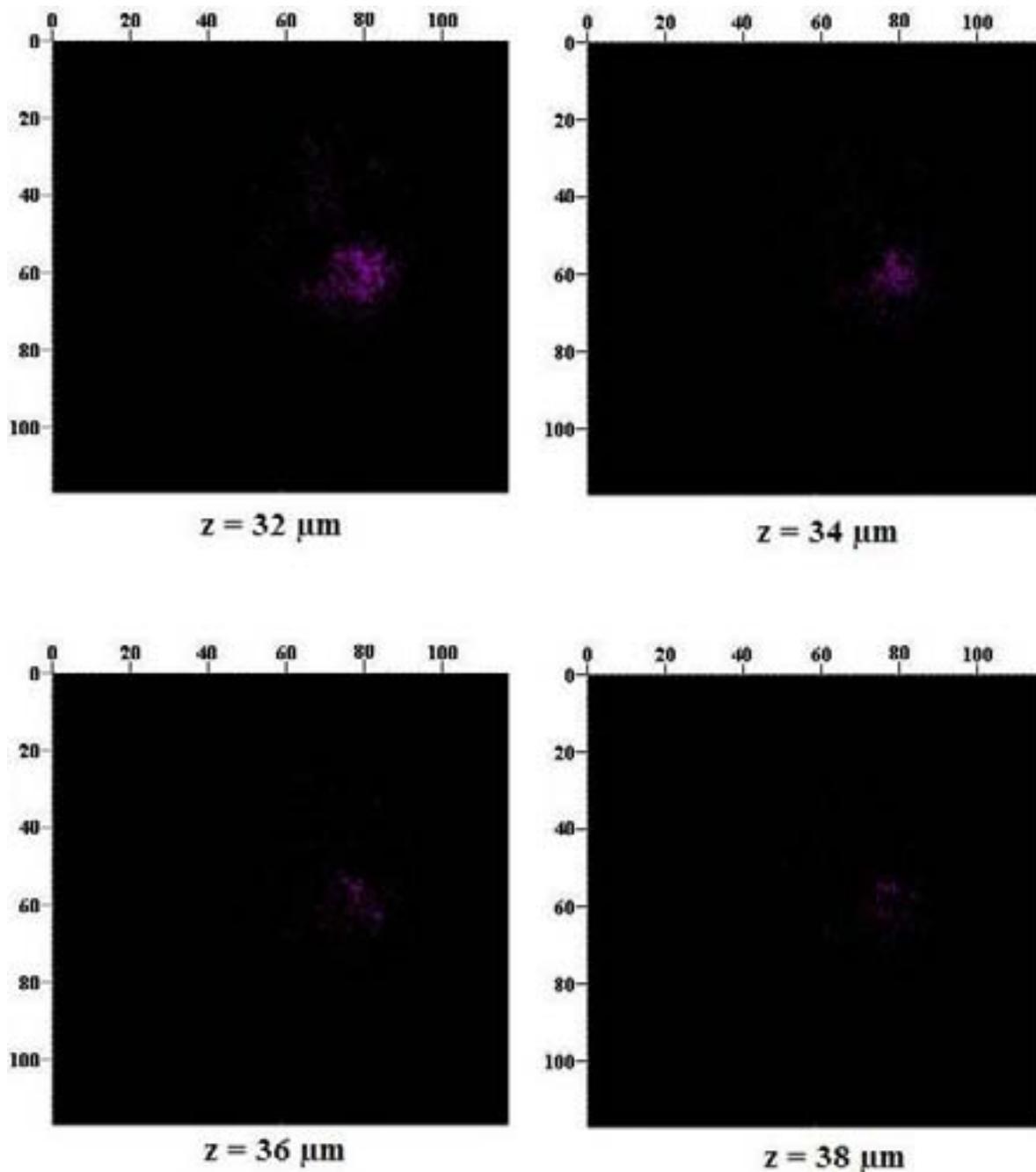


Figure 19 : Images d'une cellule Huh7 modifiée en microscopie par GTH suivant z à 32, 34, 36 et 38 microns de profondeur.

Nous pouvons visualiser dans la cellule Huh7 un très fort signal de tierce harmonique au localisé au niveau des vésicules lipidiques suivant la profondeur en z . Si nous comparons ce signal avec le signal correspondant aux vésicules localisées aléatoirement dans la cellule HeLa, nous pouvons noter une similitude attendue. Après un examen complet en collaboration avec de partenaires biologistes, nous pouvons en déduire que les formes visualisées dans les cellules HeLa sont des vésicules lipidiques. Cette visualisation directe sans traitements préliminaires de vésicules lipidiques dans des cellules pourrait avoir une

utilité directe d'un point de vue clinique à condition de vérifier que ce contraste important que nous avons attribué aux lipides reste valable pour l'ensemble des types de cellules qui intéressent le praticien. En effet, une analyse (relativement longue) de cellules du foie lors d'une biopsie est effectuée pour vérifier le taux de lipides intracellulaire. Si ce taux dépasse un certain seuil, le patient est susceptible de développer des maladies graves telles la lipidose.

Nous pensons que d'autres éléments intracellulaires sont possibles à analyser. La microscopie par GTH apparaît être un nouvel outil dans cette difficile compréhension des processus cellulaires. Bien entendu nombre de processus sont maintenant bien compris via la microscopie de fluorescence, mais la microscopie par GTH est un outil supplémentaire aux techniques existantes pour les biologistes. Les problèmes de déconvolution ne sont pas complètement résolus pour pouvoir reconstruire une image fidèle à l'objet.

II.2- Analyse par GTH de la mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée ou apoptose constitue un des domaines de recherche récent qui permet de mieux comprendre pourquoi il y a si peu de cancers, compte tenu du nombre incroyable de mitoses dans l'organisme et des mécanismes précis qui les contrôlent. (Le nom apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne : apo pour éloignement, ptose pour chute).

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire au cours duquel des mécanismes complexes sont activés pour aboutir à la destruction de la cellule. Ce « suicide cellulaire » est un événement clé en biologie car il permet l'équilibre entre prolifération et dégénérescence cellulaire dans les organismes pluricellulaires au cours du développement normal de l'organisme. De plus, l'apoptose est un mécanisme qui permet donc la régulation des populations cellulaires tout en respectant l'intégrité de l'organisme.

L'apoptose survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Cependant, elle peut également se produire dans diverses situations pathologiques. De plus, un dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose va donner lieu à de graves pathologies. Ainsi, un défaut d'apoptose va entraîner des syndromes prolifératifs associés à un processus de tumorigenèse. A l'inverse, une activation anormale va donner lieu à un phénomène de dégénérescence, comme cela est observé au

cours de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

Nous nous proposons ici d'étudier le signal de tierce harmonique généré par des cellules Cos au cours du temps lors de leur apoptose provoquée. Nous expliquerons brièvement tout d'abord le phénomène d'apoptose d'un point de vue morphologique ainsi que les mécanismes biochimiques mis en jeu. Dans un second temps, après avoir décrit le protocole expérimental réalisé, nous essayerons d'interpréter les résultats obtenus et de proposer une corrélation entre ces résultats et les mécanismes biochimiques de l'apoptose.

II.2.1- Définition de l'apoptose

a) Description morphologique de l'apoptose

A la différence de la nécrose, l'apoptose affecte en général des cellules isolées, aboutissant à un processus de condensation et de fragmentation. Les premières manifestations morphologiques (voir la figure 20 ci-après) se caractérisent par une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire. Le noyau se fragmente ensuite, chaque fragment entouré d'une double enveloppe. Des corps apoptotiques (éléments cytoplasmiques et nucléaires) sont ensuite relargués, et vont être phagocytés par les cellules voisines, sans aucune réaction inflammatoire. L'apoptose est phénomène relativement long, pouvant durer jusqu'à plus de 24 heures.

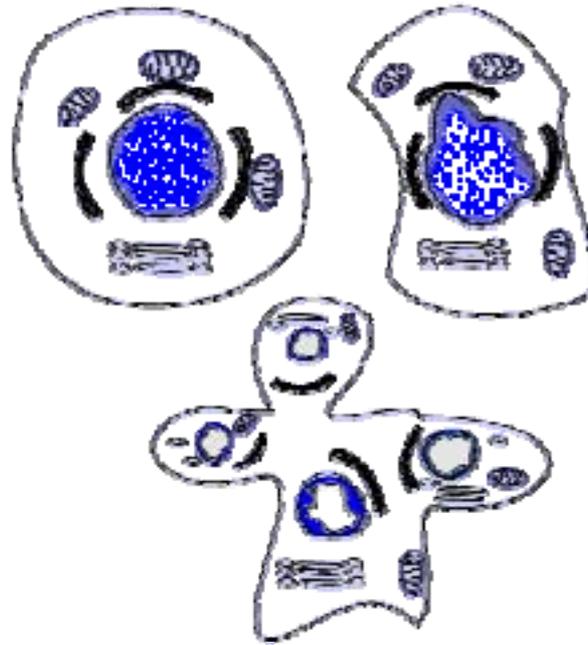


Figure 20 : Aspects morphologiques de l'apoptose (<http://www.baclessse.fr/cours/fondamentale>).

b) Mécanismes biochimiques

De nombreux facteurs interviennent pour déclencher l'apoptose, mais tous aboutissent à une voie commune passant par la mitochondrie, la protéine Bcl-2 et un effecteur commun tel la caspase ou un facteur d'induction d'apoptose (A.I.F. pour « apoptosis inducing factor »). La figure 21 ci-dessous illustre de façon simpliste ces mécanismes biochimiques.

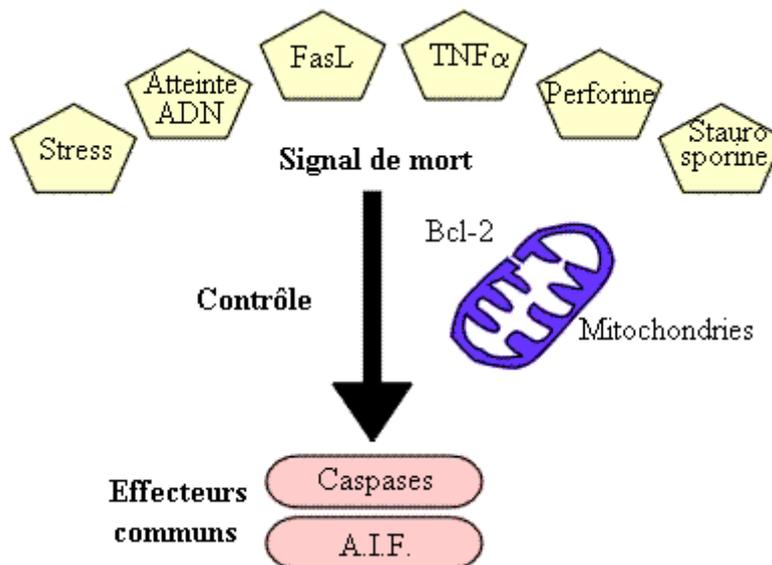


Figure 21 : Biochimie de l'apoptose (<http://www.baclessse.fr/cours/fondamentale>).

Les principaux mécanismes mettant en route le mécanisme de la mort cellulaire programmée sont :

- le stress : hypo-oxygénation, par exemple
- le traitement par des substances cytotoxiques ou des corticoïdes (perforine, staurosporine, ...)
- l'atteinte de l'ADN
- la transmission d'un signal de mort (récepteur Fas des lymphocytes cytotoxiques, des natural killer, du facteur de nécrose TNF α)
- la privation des facteurs de croissance

Toutes ces atteintes aboutissent au niveau de la mitochondrie à une stimulation de l'ouverture des mégapores des mitochondries, sous l'effet de la disparition de l'effet protecteur de la protéine Bcl-2. L'ensemble des protéines Bcl-2, Bax, Bad ont un effet régulateur permettant la fermeture ou l'ouverture de ces pores, et de libérer des substances (cytochrome C notamment) qui activent des enzymes ayant une activité de protéase à cystéine, qui atteint les protéines spécifiquement au niveau d'un aspartate (d'où le nom de caspase), comme représenté dans la figure 22.

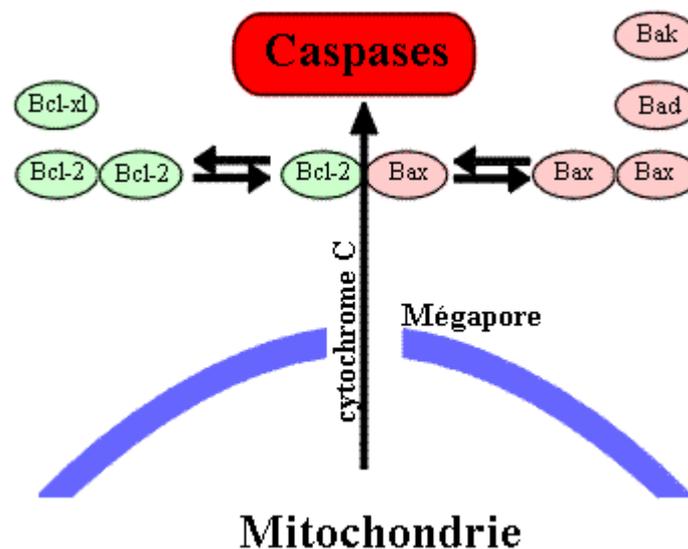


Figure 22 : Schéma simplifié des relations entre les protéines Bcl-2, les mitochondries et les caspases. Les protéines Bcl-2 sont en fait des dimères : soit Bcl-2 – Bcl-2 (inhibiteur de l'apoptose), soit Bcl-2 – Bax (promoteur de l'apoptose). D'autres protéines existent inhibitrices (Bcl-xl) ou promotrices (Bad, Bak) de l'apoptose. L'action de ces protéines se situe au niveau des mégapores des mitochondries, permettant ou non la sortie du cytochrome C qui active les caspases (<http://www.baclesses.fr/cours/fondamentale>).

De nombreuses protéases sont modifiées par les caspases : polymérase, topoisomérase I, protéine kinase dépendante de l'ADN, diverses autres protéases. Certaines

modifications aboutissent à l'activation d'enzymes promotrices de l'apoptose et notamment des endonucléases agissant sur des sites exposés entre les nucléosomes.

II.2.2- Analyse du signal GTH lors de l'apoptose de cellules Cos

Nous souhaitons analyser le signal de TH généré par des cellules au cours du temps après le déclenchement de l'apoptose. Les cellules étudiées sont des cellules Cos, cellules animales proches des cellules humaines HeLa.

Nous disposons de cinq séries de cellules Cos placées dans un milieu HBSS (pH =7,3 à 25 °C). Le microscope GTH est configuré pour une résolution de pixel d'affichage de 0,942 μm et l'objectif utilisé est le x40/0,75. Ce balayage est effectué autour de la position centrale du champ de vue. La taille des images observées est de 228 x 228 microns. Nous pouvons ainsi pour chaque série observer un vingtaine de cellules. L'observation des cellules est effectuée dans une coupe correspondant au plan médian des cellules comme illustré sur la figure 23 suivante.

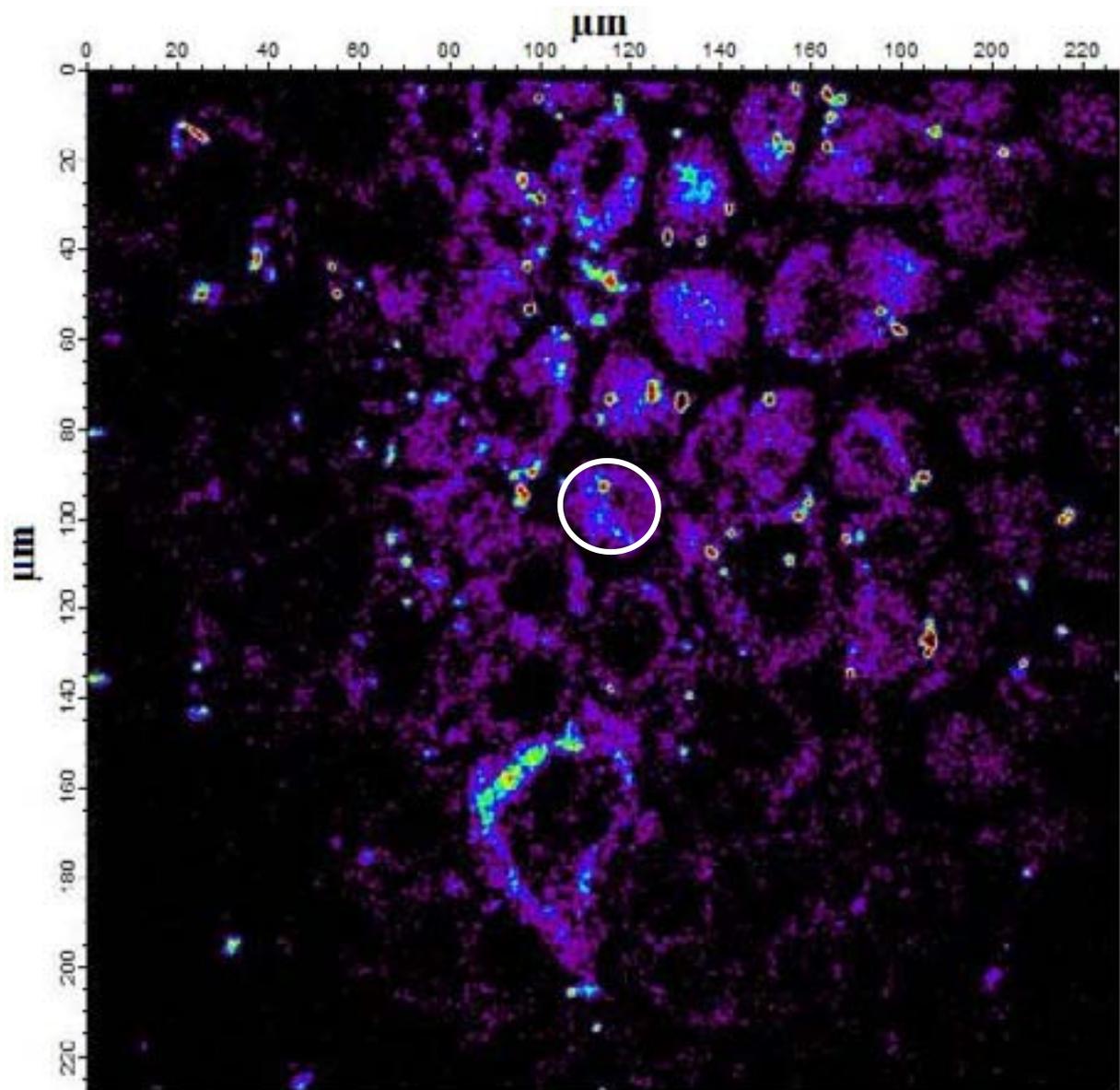


Figure 23 : Visualisation d'une population de cellules Cos pour une image réalisée sur 228 x 228 microns en un z fixé. La position z est choisie de sorte d'être centré sur un maximum de cellules, soit une vingtaine. Le cercle blanc représente un masque entourant une cellule Cos. Les signaux TH provenant de cette zone sont moyennés et les variations de cette moyenne au cours du temps seront observés.

Nous allons tout d'abord visualiser le plus longtemps possible deux séries où nous ne provoquons pas l'apoptose, nous les maintenons donc en culture, afin d'avoir un comportement témoin du signal TH généré par ces cellules. Dans un second temps, nous souhaitons visualiser sur les trois autres séries les variations de signal TH après avoir provoqué l'apoptose. Pour cela nous injectons dans le milieu de culture un produit qui induit l'apoptose et qui tue le cytolysate, de la staurosporine.

La durée de l'expérience est de 4h30 avec une image réalisée toutes les minutes. Il est à noter que des impondérables nous ont obligé de stopper l'expérience sur des cellules saines

après 2h45 d'analyse et de stopper également après 3h30 sur une série où l'apoptose a été provoquée.

Afin de comparer les signaux TH émis par chaque cellule nous les sélectionnons en créant un masque et nous faisons la moyenne des signaux TH générés dans la zone sélectionnée. Nous obtenons par exemple pour la série de cellules non traitées analysée pendant 4h30 les variations des signaux TH pour 27 cellules représentées sur la figure 24 suivante.

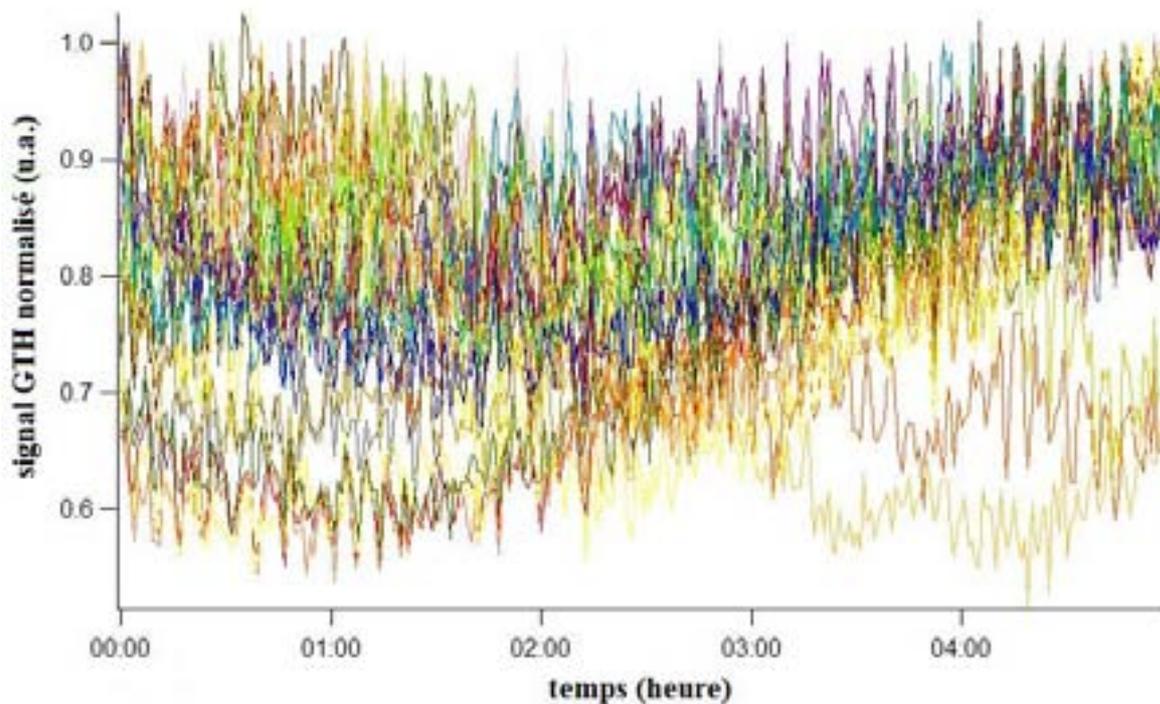


Figure 24 : Signaux TH relatifs au cours du temps générés par une vingtaine de cellules Cos où l'apoptose n'a pas été provoquée. On remarque des fluctuations rapides avec une valeur moyenne évoluant peu au cours du temps.

La figure 25 ci-après représente la transformée de Fourier de ces signaux TH en fonction de la fréquence en mHz.

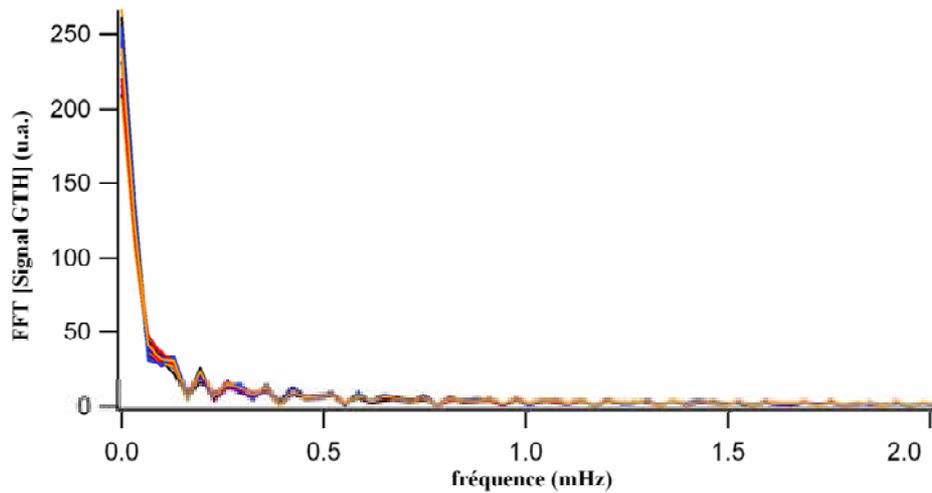


Figure 25 : Transformées de Fourier des signaux TH générés par une vingtaine de cellules Cos où l'apoptose n'a pas été provoquée.

Les transformées de Fourier de ces signaux TH montre que les fluctuations en haute fréquence observées sur la figure 24 sont en fait dans la gamme de 0,2 à 2 mHz. Les périodes propres des fluctuations semblent identiques comme le montre la figure 25 précédente. La seule différence entre les différentes cellules provient de l'évolution en basse fréquence (période de l'heure) des cellules.

Pour mieux évaluer la variation au cours du temps du signal TH généré par les cellules nous faisons la moyenne des signaux générés par les 27 cellules visualisées. Nous obtenons ainsi la figure 26 suivante.

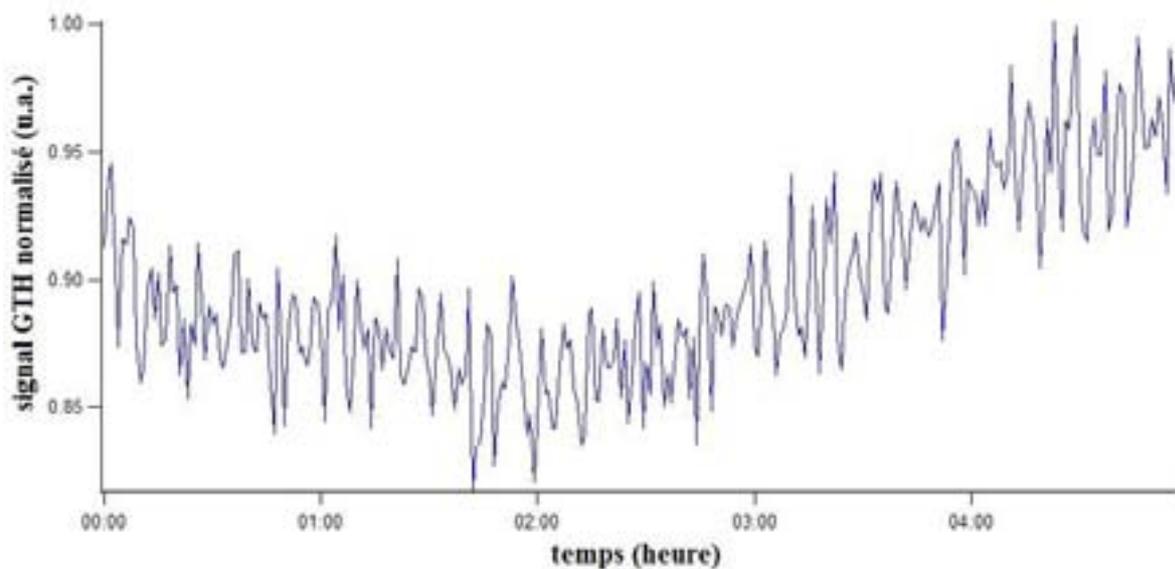


Figure 26 : Signal TH moyen normalisé au cours du temps de la population de cellules Cos où l'apoptose n'a pas été provoquée.

Nous pouvons noter que le signal TH moyen généré par les cellules saines reste relativement constant, les petites fluctuations de l'ordre de 15 % en haute fréquence ne sont pas encore bien interprétées actuellement.

Pour chaque série de cellules, nous appliquons la même méthode de traitement des données obtenues et nous pouvons visualiser sur la figure 27 ci-après les variations du signal TH moyen généré au cours du temps par des cellules traitées ou non pour l'apoptose. Les courbes représentées en bleu sont les séries où les cellules Cos sont saines et les courbes représentées en vert sont les séries où l'apoptose a été provoquée. La figure 27 est une synthèse de l'analyse de 300 images réalisées sur chaque série. Nous avons vérifié que les séries de cellules où l'apoptose a été provoquée ne présentaient aucune dislocation et l'aspect géométrique des cellules restait stable ce qui est une condition nécessaire pour faire une analyse quantitative du signal TH.

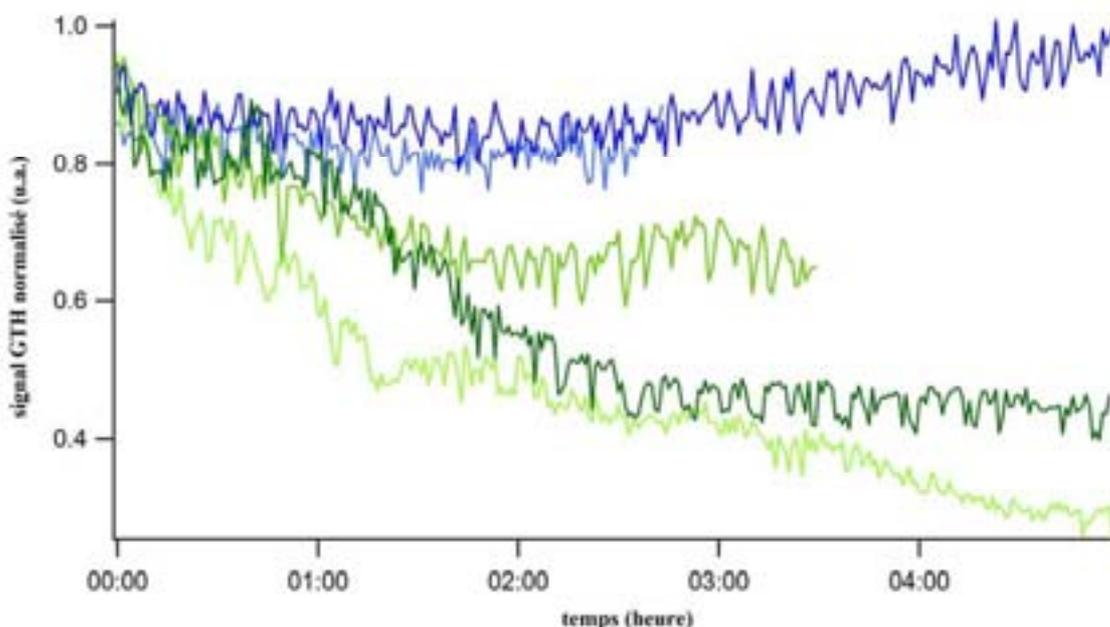


Figure 27 : Signal TH moyen normalisé au cours du temps des séries de cellules Cos. Les courbes en bleu représentent les cellules où l'apoptose n'a pas été provoquée, les courbes en vert représentent les cellules où l'apoptose a été provoquée.

Comme nous avons vu précédemment le signal TH moyen des cellules saines est stable au cours du temps alors que pour les cellules où l'apoptose a lieu, le signal TH connaît une décroissance significative les deux premières heures d'expérience. Au-delà, la chute du signal se poursuit mais celle-ci est moins importante.

L'apoptose est un évènement biologique relativement long et nous pouvons relier cette décroissance du signal de TH aux premiers processus biochimiques enclenchés lors de l'apoptose soit le signal de mort provoqué par l'introduction de la staurosporine dans le milieu cellulaire et par la migration de Bax, protéines pro-apoptotiques, vers les mitochondries.

L'utilité d'une telle application est de pouvoir d'un point de vue statistique voir le taux de cellules réagissant à la programmation de l'apoptose sur un même échantillon et éventuellement de poursuivre ou non l'expérience.

II.3- Effets de la polarisation

Nous avons défini dans le paragraphe I.3 du chapitre III l'effet de la polarisation du faisceau fondamental sur la GTH. Nous avons démontré que pour des matériaux isotropes la GTH est nulle pour une polarisation circulaire du faisceau fondamental et non nulle pour une polarisation rectiligne. Néanmoins pour des matériaux présentant des structures de type cristallin, en jouant sur la polarisation du faisceau fondamental on peut obtenir des informations structurelles sur le matériau.

Pour modifier la polarisation du faisceau fondamental, il suffit d'insérer sur le trajet de celui-ci une lame quart d'onde centrée à 1,03 microns (voir la figure 10 du chapitre III). La source laser T-pulse est naturellement polarisée p. Après avoir déterminé le « zéro de la lame » afin que la polarisation du faisceau fondamental demeure p, il suffit d'orienter celle-ci de 45 ° pour obtenir une polarisation circulaire.

Nous avons effectué des essais sur toutes les cellules à notre disposition, soit des cellules HeLa, des cellules Huh7 ainsi que des cellules Cos et nous avons pu obtenir le même type d'images que précédemment pour une polarisation p (voir figures 11, 12, 17, 18, 23 de ce chapitre). Par contre lorsque nous polarisons circulairement le faisceau fondamental, nous n'obtenons aucune image significative, les seuls points sur notre visualisation générant une faible TH ne proviennent que du bruit.

Les expériences que nous avons entrepris sur des échantillons biologiques démontrent les potentialités de la microscopie par GTH pour caractériser structurellement ces échantillons et pour donner des informations fonctionnelles. Dans le paragraphe II.4 suivant, nous nous proposons d'évoquer quelques expériences réalisées par d'autres groupes de recherche qui illustrent également ces potentialités sur des échantillons biologiques.

II.4- D'autres expériences de microscopie par GTH

Un nombre restreint d'équipes de recherche basées dans le monde entier traite du sujet de la microscopie par GTH à différents degrés d'avancement, suivant leurs applications de recherche. A titre d'exemple nous évoquons ici trois exemples d'applications en microscopie par GTH dans trois autres groupes de recherche.

La première expérience présentée est une étude de l'effet de la polarisation du faisceau fondamental en microscopie par GTH. Cette étude a été effectuée dans l'équipe de recherche de Yaron Silberberg au Weizmann Institute of Science en Israël. Deux articles sur ce travail ont été publiés à ce jour [20,21]. Nous nous proposons ici d'évoquer succinctement une de leurs expériences réalisées sur des épines de larves d'oursin. Par ailleurs, nous invitons le lecteur à consulter le site Internet de ce groupe de recherche qui a par ailleurs expérimenté d'autres sujets de recherche sur la microscopie par GTH [22].

La seconde expérience présentée est une étude *in vivo* par microscopie par GTH et GSH du développement d'un embryon de Zebrafish. Cette expérience a été réalisée par le groupe de recherche de Chi-Kuang Sun à l'Université Nationale de Taiwan [23].

Enfin, la dernière expérience présentée est une description des mouvements morphogénétiques dans des embryons de Drosophile. Cette étude a été réalisée par le groupe dirigé par Emmanuel Beaurepaire au L.O.B. à l'Ecole Polytechnique de Palaiseau [24].

II.4.1- Etude des effets de la polarisation en microscopie par GTH sur des larves d'oursin

La figure 28 ci-après représente sur la partie A l'image des épines d'oursin en lumière blanche standard et sur la partie B l'image en fausse couleur des épines suivant la polarisation de la GTH produite. Les épines d'oursin sont choisies car il est connu que ces épines contiennent des fragments de calcite. Pour réaliser l'image représentée sur la figure 28.B il faut effectuer quatre mesures en tournant la lame quart d'onde de 45° entre deux mesures consécutives. Les quatre images réalisées sont alors traitées par ordinateur pour générer une seule image suivant une carte en fausses couleurs montrant l'orientation de la polarisation du signal. La carte de couleur de l'état de la polarisation est insérée dans la figure 28.B.

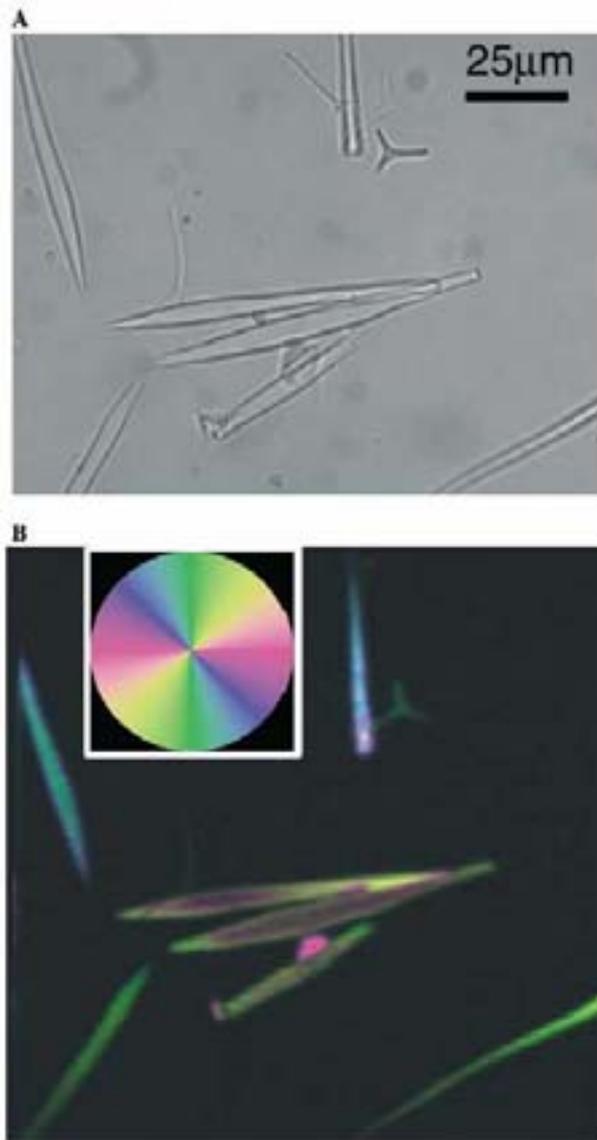


Figure 28 : Images d'épines de larves d'oursins par lumière blanche (A) et en fausses couleurs suivant la polarisation GTH. Dans l'image (B), la GTH polarisée est colorée suivant la carte de couleurs insérée en haut de cette image.

En examinant cette image de la figure 28.B on peut voir que dans plusieurs épines la couleur varie le long de celles-ci. Au centre d'une épine, par exemple celle représentée au centre de l'image où le spécimen est suffisamment épais pour que le faisceau incident soit focalisé entièrement à l'intérieur de celle-ci, la couleur suit l'orientation de l'axe rapide. Sur les côtés, où l'échantillon est plus fin que le volume de focalisation de l'objectif, le signal est polarisé à plus de 45° de l'axe rapide du cristal.

On peut conclure que grâce à la microscopie par GTH en jouant sur la polarisation, on peut déterminer et cartographier les régions anisotropes dans les échantillons biologiques.

II.4.2- Etude par microscopie par GTH/GSH du développement d'un embryon de Zebrafish

La microscopie non linéaire, et particulièrement dans le cas présenté ici la microscopie par GSH/GTH, a comme propriétés une grande distance de pénétration (supérieure à 1,5 mm) et un caractère non invasif avec une résolution transverse submicronique ce que nous avons déjà illustré précédemment. Ceci permet d'avoir une nouvelle approche dans les études morphologiques et de développement dans des tissus biologiques et dans des embryons sains [25-30]. En effet en microscopies de fluorescence multiphotoniques, l'étude *in vivo* de sujets humains ou animaliers nécessite l'incorporation de colorants qui sont pour la plupart invasifs et toxiques. Par ailleurs le processus de fluorescence stimulée peut causer des photodommages pour l'observation de spécimens vivants. En utilisant les générations d'harmoniques endogènes comme mécanisme de contraste, les problèmes de photodommages de photo-blanchiment sont éliminés.

L'équipe de Chi-Kuang Sun propose d'étudier avec leur microscope GSH/GTH la croissance d'un embryon Zebrafish vivant. Le processus de mitose sera observé ainsi que la formation des tissus au cours de la croissance. Nous décrirons brièvement ces deux phénomènes ci-dessous.

L'expérience de microscopie GSH/GTH sur l'embryon vivant de Zebrafish est d'une durée de 12 heures successives. La puissance moyenne après objectif est d'approximativement 100 mW. Malgré cette puissance moyenne conséquente durant une longue période d'observation par rapport aux techniques de microscopie de fluorescence [31,32] la viabilité d'observation des cellules n'est pas compromise. Ceci indique que non seulement l'absorption linéaire est négligeable avec une lumière infrarouge à 1230 nm mais les dommages induits par les processus multiphotoniques sont réduits.

Grâce aux caractéristiques de la microscopie non linéaire, il est possible d'observer suivant des coupes en trois dimensions le processus de mitose dans l'embryon de Zebrafish, comme le montre la figure 29 ci-après. La couleur bleue correspondant au signal GTH permet d'observer les structures des cellules et la distribution des organelles dans une cellule. Par ailleurs, un fort signal GSH, représenté en couleur verte, peut être observé dans les centrosomes qui sont construits de microtubules organisées, lorsque le phénomène de mitose a lieu (voir figure 29.A). Un zoom sur la cellule en mitose est effectué et représenté sur la figure

29.B. Nous invitons le lecteur à consulter la référence [23] sur le site Optics Express pour voir le déroulement de la mitose dans sa totalité.

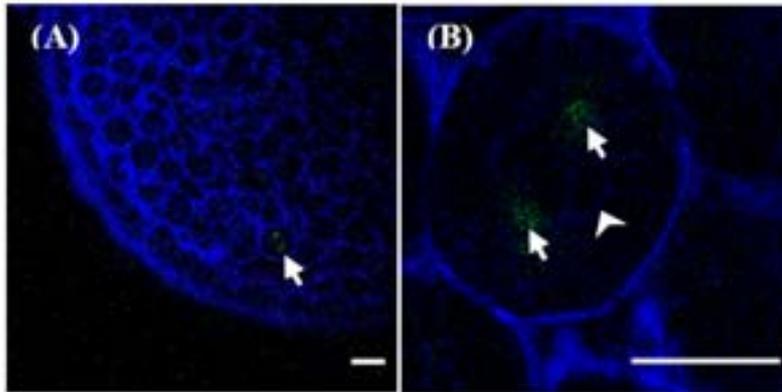


Figure 29 : Phénomène de mitose visualisé par GSH/GTH dans un embryon de Zebrafish vivant. A) Coupe de l'embryon à 400 μm de profondeur. B) Zoom sur la cellule en mitose : la membrane cellulaire représentée en couleur bleue est visualisée par GTH, les centrosomes en couleur verte sont visualisés par GSH. Barre d'échelle (en blanc) : 20 μm .

En plus de l'observation du développement embryonnaire, la microscopie par GSH/GTH peut être appliquée à l'examen des différentes structures du tissu d'une larve vivante. Ceci est représenté sur la figure 30 suivante.

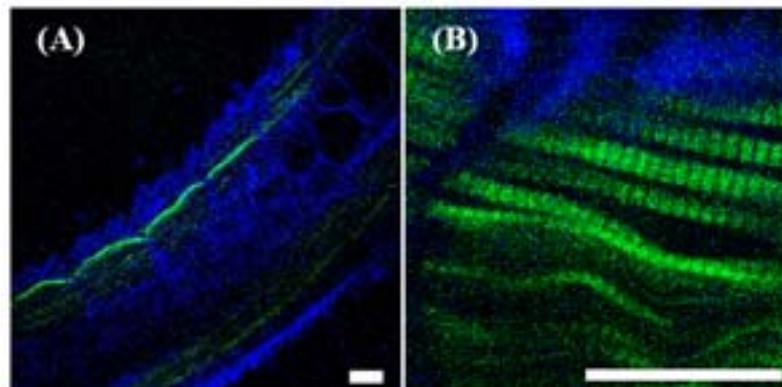


Figure 30 : Images par GSH/GTH de la structure d'une larve de Zebrafish vivante.. A) Coupe au centre de la larve montrant la peau de la larve, les segments à l'intérieur de la notochorde et la distribution des somites le long de la notochorde. B) Vue agrandie montrant les fibres musculaires par GSH dans des somites dont les interfaces sont visualisées par GTH. Barre d'échelle (en blanc) : 20 μm .

Les structures morphologiques de larve peuvent être révélées par les signaux GTH (figure 30.A). Nous pouvons y identifier la peau de la larve et la limite du somite et de la notochorde. Par ailleurs, les fibres musculaires, qui sont composées de filaments de myosine et d'actine, génèrent un fort signal SH dues à leur nanostructure cristalline [26, 33]. La distribution des fibres musculaires dans un somite peut être observée sur la figure 30.B.

L'équipe de Chi-Kuang Sun, qui a réalisé cette expérience, a démontré pour la première fois l'utilité de la microscopie par génération d'harmoniques dans l'étude du développement d'embryons vertébrés car elle offre une grande résolution et un bon contraste *in vivo* d'images des processus de développement sans avoir à marquer ou à manipuler l'embryon.

II.4.3- Description à l'échelle micrométrique des mouvements morphogénétiques dans des embryons sains de Drosophile

L'équipe d'Emmanuel Beaurepaire a associé la GTH et l'analyse PIV (PIV pour « Particle Image Velocimetry ») pour la caractérisation à l'échelle micrométrique des mouvements morphogénétiques lors de la croissance d'embryons. En utilisant un microscope combinant les techniques de fluorescence sous EDP et de GTH, Beaurepaire et al. ont de plus caractérisé les propriétés optiques d'embryons de Drosophile et ont démontré que l'imagerie GTH au cours du temps ne perturbe pas les développements dynamiques. Nous invitons le lecteur à consulter l'article sur ces expériences [24] et nous parlerons brièvement ici de la description des mouvements morphogénétiques lors du développement d'embryons de Drosophile.

Beaurepaire et al. ont réalisé dans un premier temps des séries d'images en différentes profondeurs et pendant le développement d'embryons de Drosophile. Grâce à leur microscope combinant la technique de microscopie sous EDP et la technique de microscopie par GTH, ils ont effectué des images par GTH d'un embryon non marqué et des images sous EDP d'un embryon génétiquement modifié exprimant la GFP au niveau des noyaux. Ces images réalisées ils ont été traitées par une analyse PIV [34], analyse qui permet d'extraire des données vélocimétriques avec une très bonne résolution même quand les structures en mouvement ne sont pas clairement définies dans les images. Comme la microscopie GTH est sensible aux inhomogénéités de taille micrométrique, elle fournit une information structurale riche dans tout l'embryon. Par conséquent, les séquences d'images GTH sont idéalement adaptées pour une analyse PIV.

La figure 31 ci-dessous présente le résultat de cette analyse sur les séquences d'images GTH (A) et d'images EDP (B).

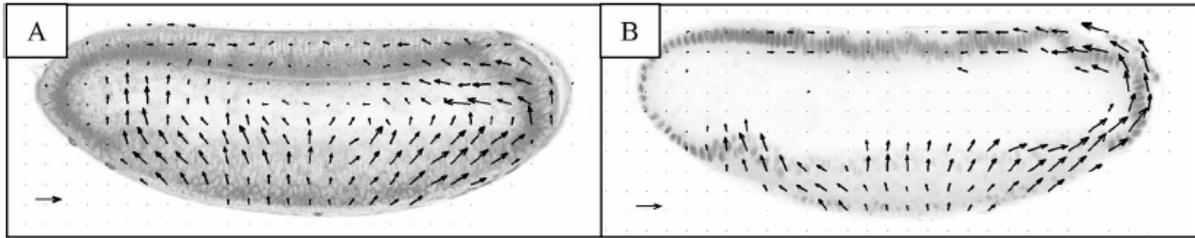


Figure 31 : A) Description à l'échelle micrométrique des mouvements morphogénétiques dans un embryon non marqué au cours de son développement grâce à une analyse PIV des images GTH. B) Analyse PIV des images EDP d'un embryon marqué au niveau de ses noyaux.

Comme montré dans la figure précédente, l'analyse vélocimétrique des données GTH donne une information des mouvements des tissus supérieure à celle obtenue sur les données EDP. En effet, la microscopie GTH permet de visualiser des structures dans une plus grande profondeur dans l'embryon sans que celles-ci aient le besoin d'être marquées comme dans le cas de la microscopie EDP.

Beaurepaire et al. ont montré que la combinaison de la microscopie GTH et de l'analyse PIV est pour le moment la meilleure technique d'imagerie fonctionnelle pour la caractérisation des mouvements morphogénétiques dans des embryons vivants non marqués.

CONCLUSION

Les expériences que nous avons effectuées grâce à notre prototype de microscopie par GTH/ GSH nous permettent de voir que cette technique d'imagerie est un outil prometteur pour une nouvelle interprétation à l'échelle microscopique des propriétés non linéaires de matériaux mais aussi des phénomènes intracellulaires au niveau biologique.

Pour les chimistes, la microscopie par GTH permet une analyse qualitative des verres : outre le fait qu'elle permet de vérifier que l'échantillon ne présente pas de défauts, elle permet par exemple de vérifier également son homogénéité en terme de susceptibilité non linéaire d'ordre trois ainsi que de vérifier les changements de ses propriétés optiques suite à un traitement particulier. Ceci est particulièrement novateur car les chimistes n'avaient pas jusqu'à présent d'instruments optiques pour cartographier à l'échelle micrométrique ces paramètres.

Pour les biologistes, nous avons vu que la microscopie par GTH peut apporter des informations structurelles sur les objets étudiés et quelques expériences valident la fonctionnalité de cette technique. Néanmoins, l'interprétation et la compréhension des images sont difficiles surtout concernant l'imagerie cellulaire et nous pensons qu'un long apprentissage consacré à cette interprétation est nécessaire, en combinant par exemple les microscopies de fluorescence et de contraste de phase à cette technique non linéaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P.J. Hayward, J.S. Ryland, « The Marine Fauna of the British Isles and North-West Europe », Vol. 1, *Clarendon Press Oxford*, p. 377 (1990)
- [2] J.H.S. Blaxter, F.S. Russel, M. Yonge, « Advances in Marine Biology », Vol.18, *Academic Press*, pp. 117-139 (1980)
- [3] A. Zoubir, Thesis at University of Central Florida Orlando, « Towards direct writing of 3D photonic circuits using ultrafast lasers », soutenue le 26 octobre 2004
- [4] B. Ferreira, Thèse d'université de Bordeaux 1, « Etude de la Génération de Second Harmonique dans les Verres Polarisés Thermiquement : - Etude du système $\text{Nb}_2\text{O}_5\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-B}_2\text{O}_3$ -Etude du verre $\text{TeO}_2\text{-Pb(PO}_3)_2\text{-Sb}_2\text{O}_3$ », soutenue le 08 janvier 2002, n° d'ordre 2459
- [5] R.H. Stolen, H.W.K. Tom, « Self-organised phase-matched harmonic generation in optical fibers », *Optics Letters*, Vol.12, Issue 8, p. 585 (1987)
- [6] N. Mukherjee, R.A. Myers, S.R.J. Brueck, « Dynamics of second-harmonic generation in fused silica », *JOSA B* **11**, pp. 665-669 (1994)
- [7] A. Maillard, Thèse d'université de Bourgogne, « Préparation après croissance d'échantillons monodomains de BaTiO_3 en vue d'utilisation optique », soutenue en 1989
- [8] R.A. Myers, N. Mukherjee, S.R.J. Brueck, « Large second-order nonlinearity in poled fused silica », *Optics Letters*, Vol.16, Issue 22, p. 1732 (1991)
- [9] Y. Sasaki, Y. Ohmori, « Phase-matched sum-frequency light generation in optical fibers », *Applied Physics Letters*, Vol.39, Issue 6, pp. 466-468 (1981)
- [10] A. Zoubir, M. Richardson, C. Rivero, A. Schulte, C. Lopez, K. Richardson, N. Hô, R. Vallée, « Direct femtosecond writing of waveguides in As_2S_3 thin films », *Optics Letters*, Vol.29, Issue 7, p. 748 (2004)
- [11] D. Homoelle, S. Wielandy, A. L. Gaeta, N. F. Borrelli, C. Smith, « Infrared photosensitivity in silica glasses exposed to femtosecond laser pulses », *Optics Letters*, Vol.24, Issue 18, p. 1311 (1999)
- [12] A. M. Streltsov, N. F. Borrelli, « Fabrication and analysis of a directional coupler written in glass by nanojoule femtosecond laser pulses », *Optics Letters*, Vol.26, Issue 1, p.42 (2001)
- [13] A. Zoubir, C. Lopez, M. Richardson, K. Richardson, « Femtosecond laser fabrication of tubular waveguides in poly(methyl methacrylate) », *Optics Letters*, Vol.29, Issue 16, p. 1840 (2004)

- [14] R. Osellame, S. Taccheo, M. Marangoni, R. Ramponi, P. Laporta, D. Polli, S. De Silvestri, G. Cerullo, « Femtosecond writing of active optical waveguides with astigmatically shaped beams », *JOSA B* **20**, pp. 1559-1567 (2003)
- [15] S. Nolte, M. Will, J. Burghoff, A. Tuennermann, « Femtosecond waveguide writing: a new avenue to three-dimensional integrated optics », *Applied Physics A* **77**, pp. 109-111 (2003)
- [16] B. Boizot, S. Agnello, B. Reynard, R. Boscaino, G. Petite, « Raman spectroscopy of β -irradiated silica glass », *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 325, Issue 1, p. 22 (2003)
- [17] S. Nagata, S. Yamamoto, K. Toh, B. Tsuchiya, N. Ohtsu, T. Shikama, H. Naramoto, « Luminescence in SiO_2 induced by MeV energy proton irradiation », *Journal of Nuclear Materials*, Vol. 329-333, Part 2, pp. 1507-1510 (2004)
- [18] Y. Ikuta, S. Kikugawa, M. Hirano, H. Hosono, « Defect formation and structural alternation in modified SiO_2 glasses by irradiation with F_2 laser or ArF excimer laser », *Journal of Vacuum Science and Technology B*, Vol. 18, Issue 6, p. 2891 (2000)
- [19] D. Oron, D. Yelin, E. Tal, S. Raz, R. Fachima, Y. Silberberg, « Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy », *Journal of Structural Biology*, Vol. 147, Issue 1, pp. 3-11 (2004)
- [20] D. Oron, D. Yelin, E. Tal, S. Raz, R. Fachima, Y. Silberberg, « Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy », *Journal of Structural Biology*, Vol. 147, Issue 1, pp. 3-11 (2004)
- [21] D. Oron, E. Tal, Y. Silberberg, « Depth-resolved multiphoton polarization microscopy by third-harmonic generation », *Optics Letters*, Vol. 28, Issue 23, p. 2315 (2003)
- [22] <http://www.weizmann.ac.il/~feyaron>
- [23] S.W. Chu, S.Y. Chen, T.H. Tsai, T.M. Liu, C.Y. Lin, H.J. Tsai, C.K. Sun, « *In vivo* developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy », *Optics Express*, Vol. 11, Issue 23, p. 3093 (2003)
- [24] D. Débarre, W. Supatto, E. Farge, B. Moullia, M.C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire, « Velocimetric third-harmonic generation microscopy: micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos », *Optics Letters*, Vol. 29, Issue 24, p. 2881 (2004)
- [25] G. Peleg, A. Lewis, M. Linial, L.M. Loew, « Nonlinear optical measurement of membrane potential around single molecules at selected cellular sites », *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, pp. 6700-6704 (1999)

- [26] S.W. Chu, I.S. Chen, T.M. Liu, C.K. Sun, S.P. Lee, B.L. Lin, P.C. Cheng, M.X. Kuo, D.J. Lin, H.L. Liu, « Nonlinear bio-photonic crystal effects revealed with multi-modal nonlinear microscopy », *Journal of Microscopy*, Vol. 208, Issue 3, p. 190 (2002)
- [27] P.J. Campagnola, A.C. Millard, M. Terasaki, P.E. Hoppe, C.J. Malone, W.A. Mohler, « Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues », *Biophysical Journal*, Vol. 82, Issue 1, p. 493 (2002)
- [28] M. Müller, J. Squier, K.R. Wilson, and G.J. Brakenhoff, « 3D microscopy of transparent objects using third-harmonic generation », *Journal of Microscopy*, Vol. 191, Issue 3, p. 266 (1998)
- [29] D. Yelin and Y. Silberberg, « Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology », *Optics Express*, Vol. 5, Issue 8, p.169 (1999)
- [30] L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, R. Barille, P. Vacher, P. Voisin, « Imaging of Ca^{2+} intracellular dynamics with a third-harmonic generation microscope », *Optics Letters*, Vol. 26, Issue 8, p. 515 (2001)
- [31] J.M. Squirrell, D.L. Wokosin, J.G. White, B.D. Bavister, « Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability », *Nature Biotechnology* **17**, pp. 763-767 (1999)
- [32] I.H. Chen, S.W. Chu, C.K. Sun, P.C. Cheng, B.L. Lin, « Wavelength dependent damage in biological multi-photon confocal microscopy: a micro-spectroscopic comparison between femtosecond Ti:sapphire and Cr:forsterite laser sources », *Optical and Quantum Electronics*, Vol. 34, N° 12, p. 1251 (2002)
- [33] S.W. Chu, T.M. Liu, C.K. Sun, C.Y. Lin, H.J. Tsai, « Real-time second-harmonic-generation microscopy based on a 2-GHz repetition rate Ti:sapphire laser », *Optics Express*, Vol. 11, Issue 8, p. 933 (2003)
- [34] M. Raffel, C. Willert, J. Kompenhans, « Particle Image Velocimetry: A practical Guide », *Springer-Verlag*, Berlin (1998)

CHAPITRE V

Perspectives : vers une microscopie CARS

INTRODUCTION

La microscopie par génération d'harmoniques est de plus en plus utilisée en biologie [1-3]. Le mécanisme de contraste apporte en général des informations structurelles des objets. Certains groupes de recherche ont montré une certaine fonctionnalité de cette technique bien que les mécanismes ne soient pas complètement élucidés. Les microscopies CARS permettent une certaine qualification des objets et représente une certaine avancée aux techniques non linéaires.

Les microscopies CARS utilisent comme moyen de contraste les modes de vibration des molécules qui représentent une véritable empreinte. Cette signature ne nécessite pas un marquage spécifique de l'objet et évite les limitations récurrentes de l'imagerie par fluorescence (photo-blanchiment par exemple). Par ailleurs, le signal CARS est cohérent donc relativement directif et plus intense (signal proportionnel au carré du nombre de sites) contrairement à la microscopie Raman incohérente qui demande de fortes intensités lumineuses pour pouvoir diffuser un signal. La microscopie CARS du fait de son signal intense permet donc avec de faibles puissances lumineuses excitatrices une visualisation des objets biologiques sans photo-dommages.

Du fait de son caractère non linéaire l'imagerie CARS permet une visualisation en trois dimensions des objets sans filtrage confocal. Une propriété fondamentale du CARS est que les photons émis ont une énergie plus grande que l'excitation cela permet de s'affranchir de l'autofluorescence endogène. Par ailleurs, les sources excitatrices peuvent être choisie dans l'infrarouge : une plus grande pénétration dans les tissus est observée car la diffusion et l'absorption sont réduites par rapport à des sources émettant dans le visible.

L'objectif de notre travail est de développer un microscope CARS résolu en temps basé sur une nouvelle technique présentant un rapport signal sur bruit amélioré et une

meilleure résolution spectrale. Avant cela, nous rappellerons brièvement dans ce chapitre les principes du processus CARS en microscopie ainsi que son formalisme. Nous établirons par ailleurs une liste non exhaustive de techniques existantes permettant d'obtenir un meilleur signal CARS. Nous décrirons ensuite le montage de microscopie CARS réalisé et en détaillant la source laser utilisée. Enfin, nous expliquerons notre technique que nous pensons innovante pour obtenir un meilleur rapport signal sur bruit et une meilleure résolution spectrale. Cette technique sera exposée par son modèle et des simulations.

I- PRINCIPES DE LA MICROSCOPIE CARS

Le processus CARS est, comme indiqué dans le chapitre II, un processus de mélange à quatre ondes et le signal généré par ce processus repose sur la polarisation non linéaire d'ordre trois et dépend également de l'accord de phase. Ce processus CARS lorsqu'il est mis en jeu en microscopie a un comportement particulier dû à la forte focalisation des faisceaux incidents. Nous décrirons ceci dans ce qui suit après avoir décrit d'un point de vue énergétique le processus CARS et nous verrons les processus qui contribuent au signal.

Nous verrons ensuite les expressions de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois et de la polarisation non linéaire. Le signal anti-Stokes sera évalué puisqu'il est dépendant de la polarisation non linéaire et nous le modéliserons à travers deux exemples.

Enfin nous rappellerons quelques techniques existantes permettant d'optimiser le signal CARS.

I.1- Le processus CARS

Le signal que nous voulons observer signe la présence ou l'absence d'espèce moléculaire présentant une transition vibrationnelle. Le processus d'excitation et de détection peut être séparé en deux étapes :

1. deux impulsions laser **p** et **s** accordables viennent exciter par battement de fréquence la vibration Ω
2. une impulsion **p'** diffracte de façon inélastique sur ce système moléculaire excité et nous récoltons l'intensité diffractée portée par l'onde anti-Stokes **as** de longueur d'onde plus courte que celle des faisceaux incidents.

Ce processus énergétique est décrit sur la figure 1.a ci-dessous.

Malheureusement d'autres processus peuvent également générer une onde **as** : des termes non résonants (voir la figure 1.b) contribuent au signal lorsque les trois impulsions sont ensembles temporellement et spatialement. Le processus décrit en figure 1.c représente une absorption de deux photons (**p**, **s**) suivie de l'émission d'un photon **as**. Ce processus est l'équivalent de la génération de la seconde harmonique (Up-conversion) décrit dans les chapitres précédents dans un cas non dégénéré (émission **p'** et **as**).

Un des problèmes majeur des expériences CARS est la discrimination du terme résonant par rapport au terme non résonant et au terme d'absorption à deux photons. Pour cela de nombreuses astuces expérimentales, que nous présenterons dans le paragraphe I.3, ont été développées. Une des astuces pour éliminer au mieux le terme non résonant est de jouer sur le retard temporel entre les impulsions p , s qui excitent la vibration de fréquence Ω et l'impulsion p' [4]. En effet dans le processus non résonant, l'état virtuel a une durée de vie quasi instantanée. Ainsi si nous décalons temporellement l'impulsion p' , l'effet non résonant peut être éteint. Cette configuration est celle que nous choisissons pour réaliser notre système appelé microscopie CARS résolue en temps.

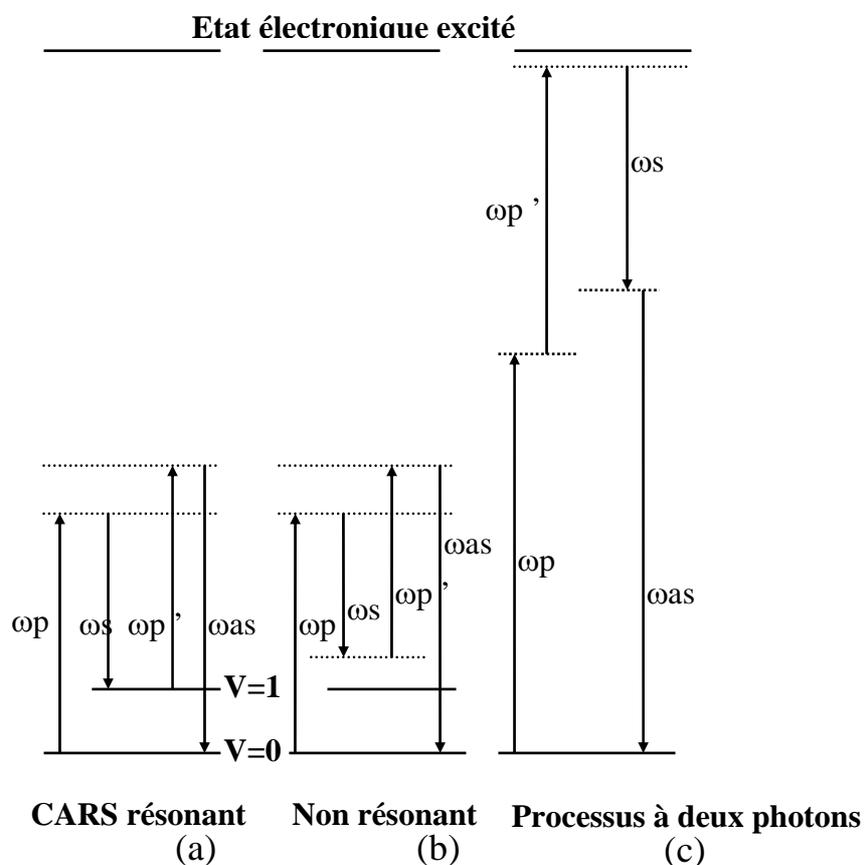


Figure 1 : Diagrammes énergétique des processus : a) CARS résonant, b) CARS non résonant, c) à deux photons.

Pour générer un signal intense en microscopie CARS, comme dans tout processus de mélange à quatre ondes, il est nécessaire de réaliser l'accord de phase. La figure 2 suivante représente une géométrie des faisceaux utilisés en spectroscopie CARS.

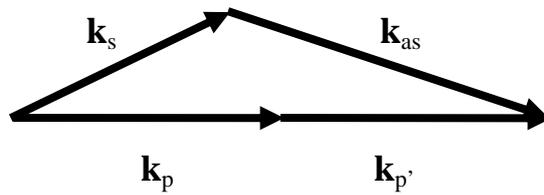


Figure 2 : Géométrie des faisceaux satisfaisant la condition d'accord de phase en microscopie CARS.

Dans le cas de la microscopie CARS, une géométrie colinéaire est possible car avec les grandes ouvertures numériques des objectifs le cône de focalisation est suffisant et la longueur d'interaction est micrométrique donc inférieure à la longueur de cohérence ce qui libère les conditions d'accord de phase. La figure 3 suivante présente la simulation du signal CARS normalisé généré en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif.

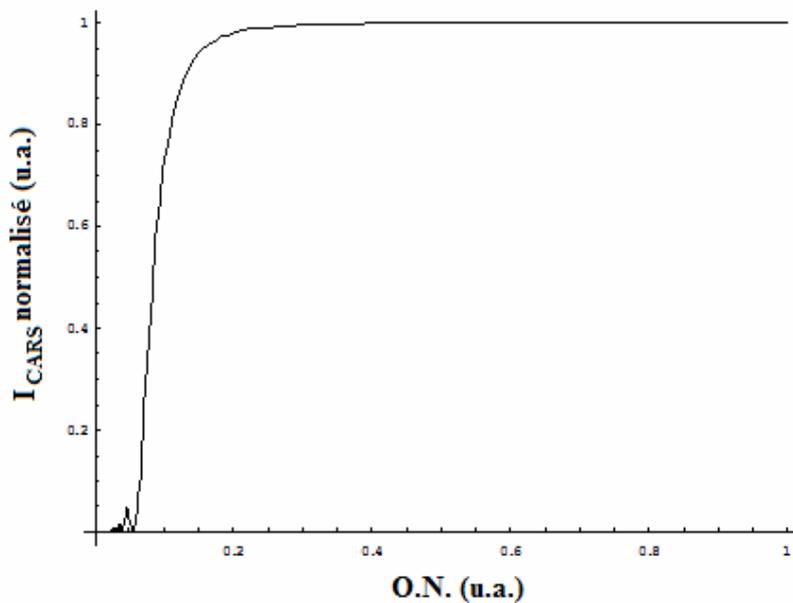


Figure 3 : Evolution du signal CARS en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope. La fluence d'excitation est normalisée en chaque ouverture numérique de sorte à n'observer que l'influence de l'accord de phase sur le signal.

On peut voir sur ce graphique que jusqu'à une ouverture numérique 0,4 le signal CARS généré ne peut pas être maximal. Cela veut donc dire que l'accord de phase n'est pas réalisé et que pour avoir un signal maximum il faudra introduire un angle entre les faisceaux. Par contre à partir de cette valeur d'ouverture numérique, le signal CARS est maximum et il n'est donc plus nécessaire d'introduire d'angle entre les faisceaux.

Pour la suite nous considèrerons la microscopie CARS dans le cas de focalisations suffisantes des faisceaux incidents soit pour une ouverture numérique supérieure à 0,4. Il n'y aura donc plus de problème avec la condition d'accord de phase.

I.2- Formalisme du processus CARS

Les différents processus décrits schématiquement ci-dessus peuvent être modélisés comme une susceptibilité non linéaire d'ordre résonante et non résonante par la relation suivante. Nous avons supposé une forme lorentzienne pour le mode Raman R de largeur Γ_r [5].

$$\chi^{(3)} = \frac{A_R}{\Omega - (\omega_p - \omega_s) - i\Gamma_R} + \chi_{NR}^{(3)} + \frac{A_t}{\omega_{p'} - (\omega_p + \omega_s) - i\Gamma_t} \quad (V-1)$$

où Ω la fréquence de vibration, Γ_R et Γ_t les largeurs du mode Raman et de la transition deux photons, $\chi_{NR}^{(3)}$ la susceptibilité non linéaire d'ordre de la contribution non résonante et ω_p , $\omega_{p'}$ et ω_s sont respectivement les fréquences des faisceaux \mathbf{p} , \mathbf{p}' et \mathbf{s} . Les termes A_R et A_t sont des constantes représentant les sections efficaces de diffusion Raman, et d'absorption à deux photons.

La polarisation non linéaire du troisième ordre s'écrit : [6]

$$P^{(3)}(\omega) = \int_0^\omega E_{p'}(\omega - u) \chi^{(3)}(u) \left(\int_0^u E_s(v - u) E_p(v) dv \right) du \quad (V-2)$$

avec $E_{p'}$, E_s et E_p les champs des faisceaux \mathbf{p}' , \mathbf{s} et \mathbf{p} .

L'intensité du signal CARS mesuré dans notre microscope peut être évalué comme étant proportionnel au module carré de la polarisation non linéaire du troisième ordre et peut ainsi être exprimé sous la relation suivante.

$$I_{CARS} \propto \int |P^{(3)}(\omega)|^2 d\omega \quad (V-3)$$

Des simulations permettent de voir comment peut se comporter le signal CARS dans la configuration que nous souhaitons réaliser c'est-à-dire en décalant temporellement l'impulsion \mathbf{p}' du couple \mathbf{p} , \mathbf{s} . Voici des exemples, sur la figure 4, de signaux CARS pour trois largeurs de vibration Raman Γ_R (5, 26 et 80 cm^{-1}) calculés en fonction du retard optique τ entre \mathbf{p}' , et le couple \mathbf{p} , \mathbf{s} lors d'une résonance dans un milieu.

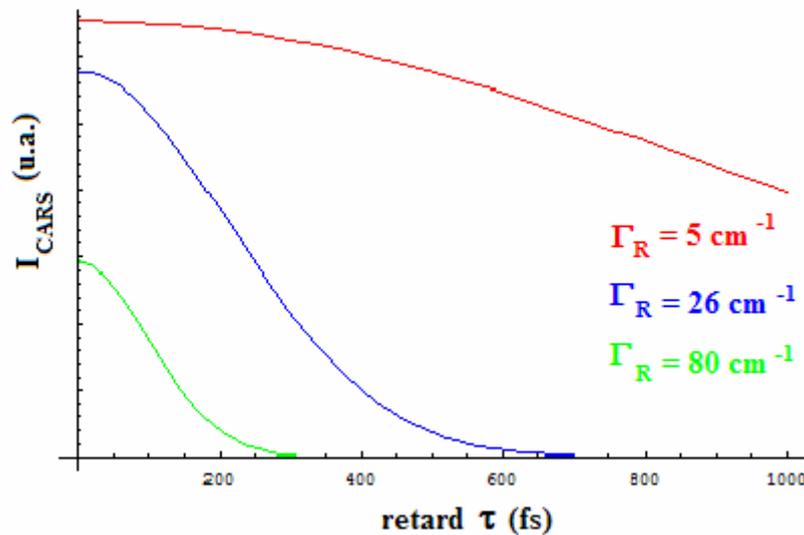


Figure 4 : Evolution du signal CARS en fonction du retard optique entre p' et le couple (p, s) pour trois largeurs de vibration Γ_R .

On remarque la portée du signal résonant pour les différentes largeurs de raie de 5, 26, et 80 cm^{-1} en fonction du retard en femtosecondes. Les termes non résonants ne sont ici pas pris en compte. Nous pouvons voir par rapport au processus non résonant qui a une durée de vie quasi instantanée que le signal CARS a une durée de vie beaucoup plus longue. En effet si nous considérons la raie où $\Gamma_R = 5 \text{ cm}^{-1}$, une largeur de raie commune dans les modes de vibration, le signal CARS est encore relativement fort après une picoseconde.

Prenons à présent un autre exemple de simulation pour caractériser le signal CARS toujours en fonction du retard τ lorsque le milieu étudié présente deux résonances proches. Cette simulation est représentée sur la figure 5. Le spectre Raman de ces deux transitions proches (différence de 100 cm^{-1}) est dans la largeur de bande du laser. Ce spectre est représenté en haut de la figure 5.

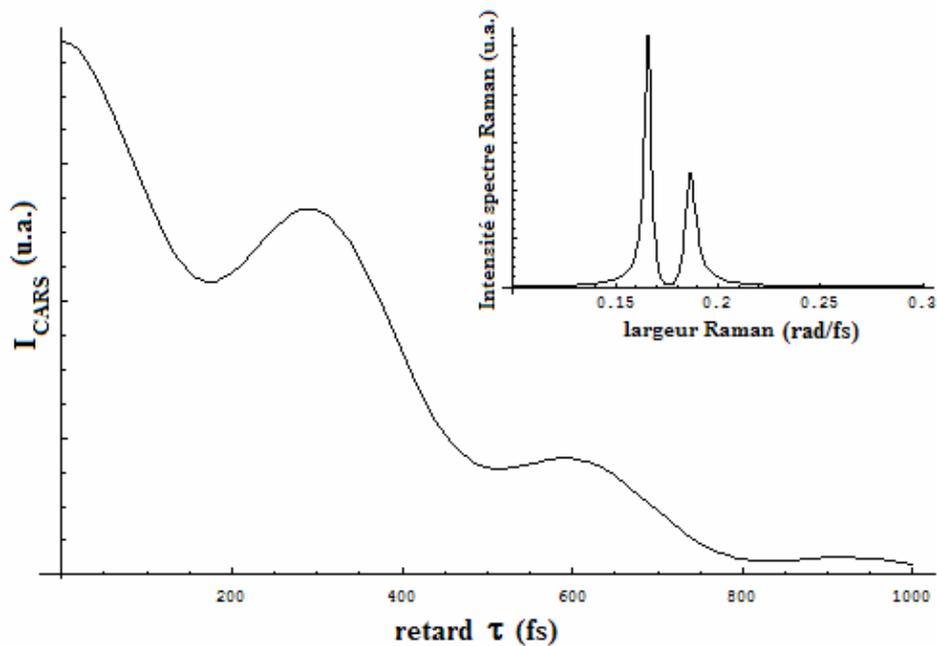


Figure 5 : Evolution du signal CARS en fonction du retard optique entre p' et le couple (p, s) lors de deux résonances proches.

On remarque un battement sur l'intensité du signal qui correspond aux situations de phase et d'opposition de phase des deux modes de vibrations excitée simultanément. L'utilisation de laser femtoseconde est souvent un inconvénient pour des expériences CARS. La bande spectrale de ces sources laser peut exciter simultanément une dizaine de modes. C'est pourquoi, de nombreuses équipes utilisent maintenant des impulsions plus longues (de l'ordre de la picoseconde) pour une meilleure spectroscopie.

I.3- Quelques techniques pour optimiser le signal CARS

Plusieurs techniques ont été mises au point pour s'affranchir au mieux du fond non résonant et ainsi pour optimiser le signal CARS à récolter. Une première technique, dont nous avons parlé est de jouer sur le retard entre l'impulsion p' et le couple d'impulsion p, s [4]. Voici ci-après une liste non exhaustive de techniques permettant d'optimiser la signal CARS en discriminant la contribution de la partie non résonante du signal.

- Détection en mode Epi :

Cette technique de détection du signal CARS n'est valable que pour une certaine taille d'échantillons. En effet bien que la microscopie CARS soit une microscopie cohérente,

lorsque la taille du milieu diffusant est plus petite que la longueur d'onde des faisceaux d'excitation, la condition d'accord de phase est relaxée et la radiation CARS se propage directement en avant mais également vers l'arrière symétriquement [7]. Par contre, en augmentant la taille de l'échantillon, la radiation CARS est confinée à un petit cône se propageant de façon cohérente dans la direction transmise et ainsi la détection du signal ne peut être effectuée qu'en transmission. La microscopie CARS via une détection par transmission est donc appropriée pour l'imagerie d'objets de taille supérieure aux longueurs d'onde d'excitation. Mais pour des objets plus petits, ce mode de détection est limité par une forte contribution du signal non résonant. La microscopie CARS en mode de détection Epi fournit un meilleur contraste sur des petits objets car le signal non résonant est diminué dans ces conditions [7-9].

- Détection en jouant sur la polarisation :

Cette méthode est basée sur les propriétés différentes de la polarisation non linéaire des contributions résonantes et non résonantes du signal. Avec une excitation polarisée, le signal CARS est dépolarisé car il comprend toutes les contributions des différents éléments du tenseur $\chi^{(3)}$ qui dépendent de la symétrie du milieu. Pour les termes non résonants la symétrie de Kleinman s'applique et la dépolarisation vaut un tiers. Pour les termes résonants le taux de dépolarisation Raman spontanée vaut entre 0 et 0,75. Un choix judicieux de la polarisation du faisceau incident et de la polarisation du signal détecté permet de minimiser la contribution non résonante (à 71,6°) [10]

- CARS par interférométrie :

A la résonance, le champ \mathbf{as} généré dans une expérience a une phase différente de celui qui est généré par les termes non résonants. Si nous écrivons la relation (V-1) à la résonance, on remarque que la phase de la partie résonante est exactement en quadrature avec le terme non résonant. La détection interférométrique permet de mesurer l'amplitude et la phase de champ anti-Stokes et donc d'extraire uniquement la partie imaginaire du champ propre à la contribution résonante. [11]

II- REALISATION D'UN MICROSCOPE CARS RESOLU EN TEMPS

Le microscope CARS résolu en temps peut être schématisé comme la figure 6 suivante :

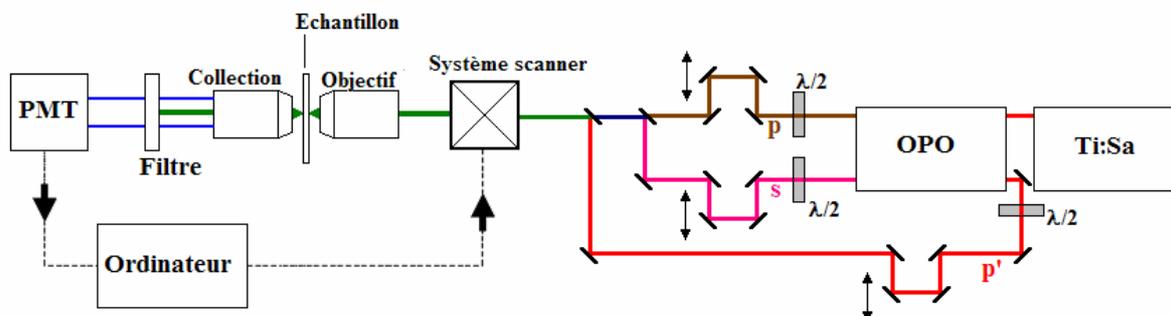


Figure 6 : Principe de montage du microscope CARS avec retards temporels.

Nous pouvons reconnaître sur ce schéma toute la partie de microscopie à partir du système scanner qui est semblable aux autres microscopes non linéaires. La différence, par rapport au microscope par GTH par exemple, est que nous devons conduire trois faisceaux **p**, **s** et **p'** jusqu'à au système scanner et pour que le processus CARS ait lieu il faut que ces trois faisceaux soient spatialement ensemble. Il faut aussi que les faisceaux **p** et **s** soient temporellement ensemble. Pour cela il convient de jouer sur le retard entre les deux impulsions afin de les synchroniser. Nous utilisons des diodes non linéaires et pour satisfaire ces deux conditions au niveau de l'échantillon, nous modifions convenablement les bras sur chaque faisceau.

La source laser utilisée est en fait un ensemble de sources composées d'un laser Titane:Saphir (Tsunami, Spectra-Physics) et d'un oscillateur paramétrique optique ou OPO synchrone (Opal, Spectra-Physics). Nous n'expliquons pas ici le principe de fonctionnement du laser Tsunami car ce laser est devenu courant dans les laboratoires et une abondante littérature sur ce sujet est disponible [12-14]. Le laser Tsunami a la configuration suivante pour notre expérience : ce laser fournit des impulsions d'une durée de 150 femtosecondes à une longueur d'onde de 810 nm, à un taux de répétition de 80 MHz et de puissance moyenne en sortie de la cavité de 2,1 W. Ce faisceau pompe un oscillateur paramétrique optique Opal et la partie rejetée par cette source, appelée faisceau **p'**, est utilisée pour l'expérience de microscopie CARS.

L'oscillateur paramétrique synchrone commercialisé par Spectra-Physics [15] est pompé par le laser Tsunami. Cet oscillateur a été développé par l'équipe de J.D. Kafka qui a

écrit un article de synthèse [16]. L'Opal est basé sur un cristal biaxe de LBO de 6 mm de long et utilise simultanément un accord de phase non critique en configuration colinéaire et une accordabilité en température. La génération paramétrique est une interaction d'ordre deux à trois ondes. Elle est réalisée dans le cristal non linéaire LBO dans lequel un faisceau pompe peut générer deux faisceaux de pulsations différentes, appelées Signal et Idler (ou complémentaire). Ce cristal agit en conséquence comme un milieu à gain, dont il est possible d'accentuer l'amplification par l'utilisation d'une cavité résonante. Les fréquences susceptibles d'être émises ne sont pas, comme dans le cas d'un laser, liées aux fréquences de transition du milieu amplificateur, mais doivent simplement satisfaire aux conditions de conservation d'énergie et du vecteur d'onde suivante :

$$\omega_{\text{pompe}} = \omega_{\text{Signal}} + \omega_{\text{Idler}} \quad (\text{V} - 4)$$

$$\mathbf{k}_{\text{pompe}} = \mathbf{k}_{\text{Signal}} + \mathbf{k}_{\text{Idler}} \quad (\text{V} - 5)$$

Pour comprendre le fonctionnement dans sa globalité de l'Opal, nous ne pouvons que vivement recommander au lecteur de consulter la thèse de Marc Olivier Martin qui a consacré une longue partie de son travail de thèse à l'étude et à la caractérisation complète de cette source [17].

Pour l'expérience CARS, nous utilisons à la fois la sortie Signal et la sortie Idler de l'Opal. Le faisceau laser issu de la sortie Signal, que nous appelons faisceau **s**, est accordable en longueur d'onde entre 1,3 et 1,6 microns à une puissance moyenne en sortie de l'Opal de 350 mW, et délivre des impulsions d'une durée de 150 femtosecondes à un taux de répétition de 80 MHz. Le faisceau laser issu de la sortie Idler, que nous appelons faisceau **p**, est accordable en longueur d'onde entre 1,6 et 2 microns et qui est d'après la relation (V-4) dépendante de la longueur d'onde du faisceau Signal **s** et du faisceau pompe **p'**. Le faisceau **p** en sortie de l'Opal a une puissance moyenne de 280 mW et les impulsions délivrées ont les mêmes caractéristiques que celles délivrées par le faisceau **s**.

Le système de détection est basé autour d'un tube photomultiplicateur (H7422-Hamamatsu) présentant des caractéristiques adéquates au signal CARS à détecter et avec un faible bruit de fond.

Pour connaître les fréquences de modes de vibration accessibles, il nous suffit de modéliser la différence de fréquences entre le faisceau **s** et le faisceau **p** en fonction par exemple de la longueur d'onde du faisceau **s**. Ces fréquences accessibles sont déterminées sur la figure 7 ci-dessous.

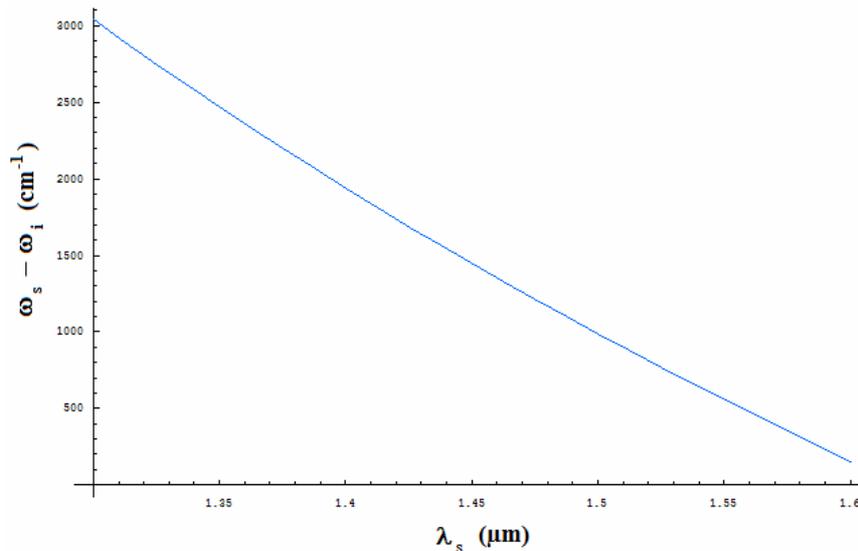


Figure 7 : Différence de fréquences accessibles (en cm^{-1}) en fonction de la longueur d'onde du faisceau s (en μm).

D'après la configuration pour notre expérience, nous voyons que nous pouvons atteindre de modes vibration Raman comprises entre 150 et 3000 cm^{-1} en fréquence suivant les longueurs d'onde choisies pour les faisceaux issus de l'Opal.

Par ailleurs pour connaître le signal CARS émis, il nous suffit également de le calculer en fonction de la longueur d'onde du faisceau s . La figure 8 nous donne ce résultat de la modélisation.

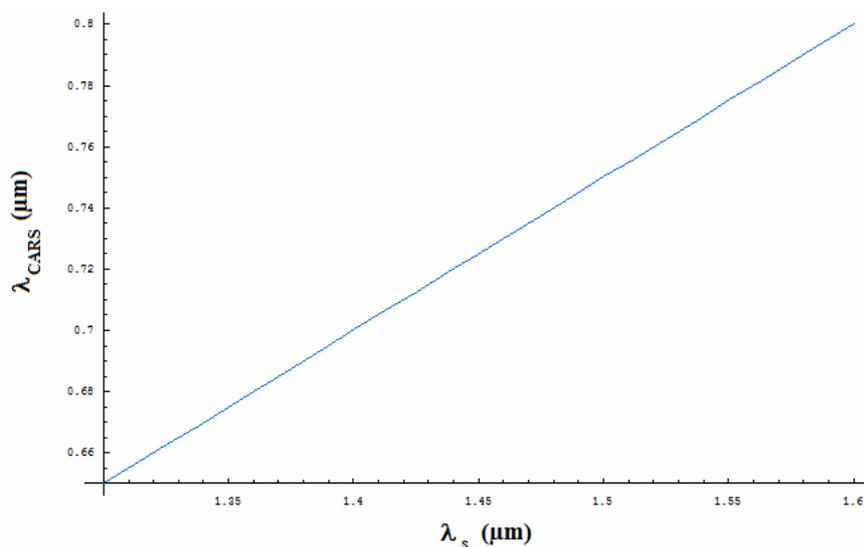


Figure 8 : Longueur d'onde du signal CARS (en μm) en fonction de la longueur d'onde du faisceau s (en μm).

Nous pouvons ainsi prédire grâce à cette modélisation à quelle longueur d'onde le signal CARS sera détecté et ainsi sélectionner convenablement le filtre isolant cette longueur

d'onde en amont de la détection. Dans notre configuration le signal CARS sera compris entre 0,65 μm pour un faisceau **s** à 1,3 μm et 0,8 μm pour un faisceau **s** à 1,6 μm .

Des essais ont été effectués sur ce microscope CARS : pour cela nous avons utilisé les mêmes objectifs de microscope utilisés sur le prototype de microscope par GTH et nous avons travaillé en point fixe c'est-à-dire que le système de balayage des faisceaux (système identique à celui utilisé pour le prototype GTH) est inactif.

Nous avons effectué une expérience de microscopie CARS résolue en temps sur des verres de borophosphate et des résultats préliminaires ont été obtenus à basse fréquence. Nous avons utilisé un filtre Notch de la société Kaiser Optics permettant de rejeter le faisceau **p'** à 810 nm (OD=6, bande rejetée : 20 nm) ; pour analyser le signal CARS nous avons utilisé un filtre interférentiel compris entre 750 et 780 nm de la société Chroma. Les faisceaux **p** et **s** ont été accordés pour une excitation par battement de fréquences à 600 cm^{-1} et le signal **as** dans cette configuration est donc émis à 770 nm (voir la figure 8). Les faisceaux **p** et **s** sont modulés en intensité à une basse fréquence (3kHz) pour une détection synchrone et une détection sur fond noir du signal.

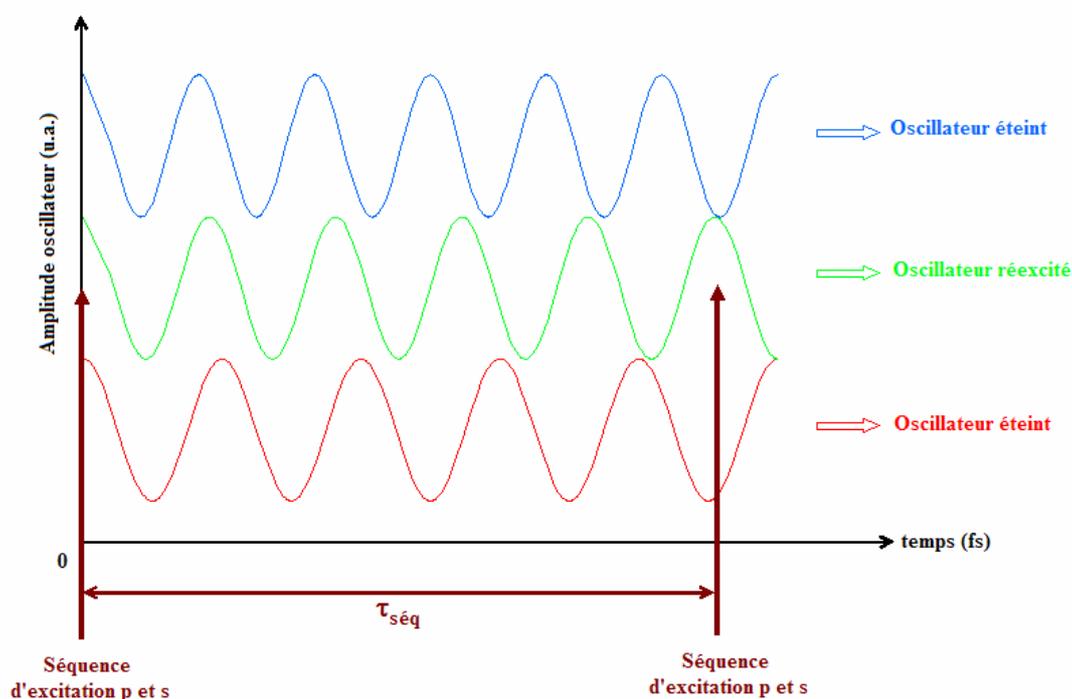
Nous avons observé un signal constant à l'intérieur de ce verre suivant **z** contrairement à un signal TH qui n'est maximal qu'aux interfaces de ce verre. En décalant temporellement le faisceau **p'** du couple (**p**, **s**) nous avons observé un signal de corrélation de durée équivalente à la durée des impulsions. En effet, dans ce verre, les bandes de vibration étant très larges, les vibrations s'amortissent alors très vite et nous n'observons pas de battement comme dans les simulations précédentes.

Nous pouvons dire qu'à présent le développement de ce microscope CARS résolu en temps est terminé et des améliorations concernant le rapport signal sur bruit sont à mener et le temps d'acquisition pour effectuer des expériences d'imagerie en microscopie CARS.

III- PERSPECTIVES

Nous envisageons pour améliorer le signal CARS et la résolution spectrale d'utiliser comme source d'excitation une séquence d'impulsions (**p** et **s**) comme cela est habituellement fait en RMN.

L'idée est de choisir un délai τ_{seq} entre les impulsions **p** et **s** pour exciter en phase l'oscillateur visé et diminuer par interférences destructives les contributions des autres oscillateurs. La figure 9 ci-dessous illustre schématiquement cette idée.



*Figure 9 : Délai τ_{seq} entre deux séquences d'excitation **p** et **s** permettant d'exciter en phase l'oscillateur visé et de diminuer par interférences destructives les contributions des autres oscillateurs.*

Considérons trois oscillateurs avec chacun une fréquence différente mais relativement proche. Au temps $t = 0$, une première séquence d'impulsions **p** et **s** vient exciter ces trois oscillateurs en phase et à cet instant il vont se mettre à osciller. Comme leur fréquence est différente, les trois oscillateurs vont être déphasés au bout d'un certain temps. A un temps $t = \tau_{\text{seq}}$, une nouvelle séquence d'impulsions vient exciter les oscillateurs. Grâce à ce temps τ_{seq} judicieusement choisi, nous allons exciter de façon cohérente l'oscillateur en phase. Celui-ci va donc être réexcité et son mouvement amplifié alors que les deux autres vont être en opposition de phase par rapport à l'excitation et l'amplitude de leurs vibrations diminue.

La meilleure solution pour réaliser expérimentalement ces séquences est d'insérer sur le trajet des faisceaux **p** et **s** un interféromètre Fabry Perot. En effet, cet appareil permet de

réglé le temps entre les séquences en déplaçant la distance entre les deux lames du Fabry Perot. Ainsi il est aisé de construire une série de séquences constamment séparées du même temps. Malheureusement à chaque séquence successive, l'intensité d'excitation diminue.

Comparons cette technique, en prenant en compte la diminution de l'intensité des impulsions excitatrices après chaque séquence, par rapport à une excitation unique d'une impulsion \mathbf{p} et d'une impulsion \mathbf{s} pour évaluer le comportement du signal CARS sur une raie Raman. Cette simulation est illustrée sur la figure 10 à partir de la résolution de l'équation (V-2), l'intensité du signal CARS correspondant à une excitation par une série de 7 séquences chacune séparées du temps τ_{seq} est représenté en rouge et l'intensité du signal CARS correspondant à une excitation unique, de même énergie que la série, est représenté en bleu.

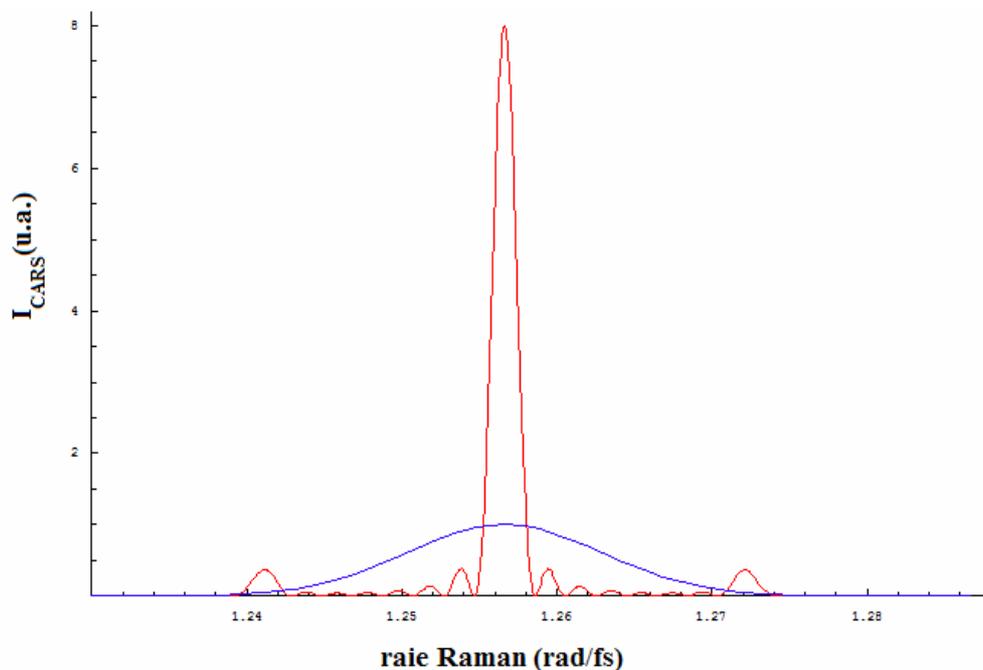


Figure 10 : Intensités du signal CARS et résolution spectrale sur une raie Raman correspondant à une excitation par une série de 7 séquences (en rouge) et correspondant à une excitation unique (en bleu) .

Grâce à cette simulation nous pouvons envisager qu'avec 7 séquences d'impulsions d'intensités décroissantes, le rapport signal résonant sur non résonant gagne un facteur 100 et l'intensité du signal CARS gagne un facteur 10 par rapport à une excitation unique. Par ailleurs l'intensité du signal résonant est augmentée par rapport au signal non résonant car celui-ci n'est sensible qu'à la dernière séquence d'impulsions qui a une intensité assez faible.

Cette technique offre donc un signal et une résolution spectrale largement supérieure à une excitation unique d'un couple d'impulsions \mathbf{p} et \mathbf{s} . De plus, comme le microscope CARS

est résolu en temps, il est toujours possible d'éloigner temporellement l'impulsion \mathbf{p}' de la dernière séquence $\mathbf{p} + \mathbf{s}$ afin d'éliminer encore mieux la contribution non résonante sur le signal.

CONCLUSION

Nous avons construit un microscope CARS standard basé sur la technique résolue en temps. L'architecture du microscope a été validée et des expériences d'imagerie en microscopie CARS sont à mener.

Nous avons par ailleurs, imaginé une nouvelle technique optique pour améliorer l'intensité relative du signal CARS résonant par rapport à celui non résonant (contribution à éliminer). De plus grâce à cette technique, basée sur des séquences d'excitation judicieusement séparées temporellement, nous obtiendrions une meilleure résolution spectrale. Cette technique devra être validée expérimentalement et l'équipe de recherche dirigée par Lionel Canioni construit actuellement un Fabry Perot particulier pour la conduite des faisceaux vers le microscope CARS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] W. Supatto, D. Débarre, B. Moulia, E. Brouzès, J.L. Martin, E. Farge, E. Beaurepaire, « *In vivo* modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses », Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 102, N°4, pp. 1047-1052 (2005)
- [2] D. Débarre, W. Supatto, E. Farge, B. Moulia, M.C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire, « Velocimetric third-harmonic generation microscopy: micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos », Optics Letters, Vol. 29, Issue 24, p. 2881 (2004)
- [3] S.W. Chu, S.Y. Chen, T.H. Tsai, T.M. Liu, C.Y. Lin, H.J. Tsai, C.K. Sun, « *In vivo* developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy », Optics Express, Vol. 11, Issue 23, p. 3093 (2003)
- [4] A. Volkmer, L.D. Book, X.S. Xie, « Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Imaging based on Raman free induction decay », Applied Physics Letters, Vol. 80, N° 9, p. 1505 (2002)
- [5] J.X. Cheng, X.S. Xie, « Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications », Journal of Physical Chemistry B, Vol. 108, N°3, p. 827 (2004)
- [6] D. Oron, N. Dudovitch, D. Yelin, Y. Silberberg, « Narrow-Band Coherent Anti-Stokes Raman Signals from Broad-Band Pulses », Physical Review Letters, Vol. 88, N° 6, p. 063004-1 (2002)
- [7] J.X. Cheng, A. Volkmer, X.S. Xie, « Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy », JOSA B, Vol. 19, Issue 6, pp. 1363-1375 (2002)
- [8] J.X. Cheng, A. Volkmer, L.D. Book, X.S. Xie, « An Epi-Detected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (E-CARS) Microscope with High Spectral Resolution and High Sensitivity », Journal of Physical Chemistry B, Vol. 105, N°7, p. 1278 (2001)
- [9] A. Volkmer, J.X. Cheng, X.S. Xie, « Vibrational Imaging with High Sensitivity via Epi-detected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy », Physical Review Letters, Vol. 87, N° 2, p. 023901-1 (2001)
- [10] J.X. Cheng, L.D. Book, X.S. Xie, « Polarization coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy », Optics Letters, Vol. 26, Issue 17, p. 1341 (2001)

- [11] C.L. Evans, E.O. Potma, X.S. Xie, « Coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry: determination of the real and imaginary components of nonlinear susceptibility $\chi^{(3)}$ for vibrational microscopy », *Optics Letters*, Vol. 29, Issue 24, p. 2923 (2004)
- [12] Spectra-Physics lasers, « Mode-locked Ti:sapphire laser », User's Manual
- [13] J.R. Lalanne, C. Rullière, « Les Lasers à solides », Formation Laser, SUNFOREP Bordeaux
- [14] C. Le Blanc, Thèse de l'école Polytechnique, « Principes et réalisations d'une source laser Terawatt femtoseconde basée sur le saphir dopé au titane »
- [15] Spectra-Physics, « Opal, Synchronously pumped parametric oscillator », User's Manual
- [16] J.D. Kafka, M.L. Watts, J.W. Pieterse, « Synchronously pumped optical parametric oscillators with LiBO_3O_5 », *JOSA B*, Vol.12, N° 11, pp. 2274-2287 (1995)
- [17] M.O. Martin, Thèse d'université de Bordeaux 1, « Détermination des propriétés non linéaires des matériaux optiques à 1,5 μm par interférométrie et absorption en configuration pompe sonde colinéaire. Prise en compte de la forme spatio-temporelle du champ », soutenue le 15 décembre 1998, n° d'ordre 2010

Conclusion

Dans le cadre de ce travail, nous avons été amenés à analyser théoriquement et expérimentalement des techniques de microscopies non linéaires. La majeure partie de notre travail a consisté à mettre en place un microscope basé sur la génération de tierce harmonique. Le prototype réalisé présente comme performances une résolution optique submicrométrique dans les trois dimensions de l'espace. Par ailleurs, nous avons conçu un système d'acquisition et de balayage du faisceau laser fondamental est assez rapide. En effet, le temps nécessaire pour la réalisation d'une image standard de 512 x 512 pixels est de 656 ms. Ses performances sont ainsi comparables à un microscope de fluorescence confocal commercial. En outre, le prototype a été conçu de sorte que n'importe quel expérimentateur puisse l'utiliser facilement et rapidement de façon routinière.

Des expériences de microscopie par GTH ont été réalisées dans plusieurs domaines : métrologie optique, chimie et biologie. En métrologie optique, nous avons présenté une méthode de GTH sur une simple interface permettant d'effectuer un contrôle complet du faisceau fondamental après un système de focalisation tel qu'un objectif. En effet les aberrations optiques, la résolution, la potentialité de transmission et l'élargissement des impulsions du faisceau laser fondamental peuvent être complètement déterminés. En appliquant cette méthode, un choix judicieux du système optique peut être opéré pour réaliser n'importe quelle expérience de microscopie non linéaire. En sciences des matériaux, des expériences sur des matériaux vitreux ont été effectuées et ont permis une analyse qualitative précise. Nous avons pu déterminer si les verres étudiés présentaient des défauts mais également voir l'homogénéité en terme de susceptibilité non linéaire d'ordre trois. Nous avons pu aussi vérifier les changements des propriétés physiques suite à des traitements particuliers (« poling », fabrication de guides d'onde). La microscopie par GTH est donc une méthode novatrice pour caractérisation optique sur des matériaux vitreux. En biologie, la microscopie par GTH peut apporter des informations structurelles sur les cellules étudiées. Nous avons vu que par cette technique, des gouttes de lipides sont détectables sur des cellules *in vivo*. Ceci pourrait conduire à une méthode de dépistage de maladies du foie lors d'une biopsie. Par ailleurs, nous avons vu que la microscopie par GTH permet une étude fonctionnelle lors d'évènements intracellulaires. Notre étude portait sur le déclenchement de l'apoptose sur une population de cellules données et nous avons vu l'évolution au cours du temps de ces cellules.

Le microscope par GTH offre donc un grand potentiel dans l'étude structurelle et fonctionnelle d'objets que ce soit des matériaux ou des échantillons biologiques.

Une autre partie de notre travail a consisté à l'étude et à la réalisation d'un microscope CARS basé sur la technique résolue en temps. L'architecture générale du microscope CARS est validé et des expériences d'imagerie sont à mener. Par ailleurs, nous avons imaginé une nouvelle technique optique pour améliorer l'intensité du signal CARS résonant par rapport à celui non résonant (contribution à éliminer). Grâce à cette technique, basée sur des séquences d'excitation judicieusement séparées temporellement, nous pouvons en outre obtenir une meilleure résolution spectrale. Cette technique reste à être validée expérimentalement...

MICROSCOPIES NON LINEAIRES : ANALYSES ET INSTRUMENTATIONS

RESUME :

La démarche de ce travail a consisté à étudier et développer différents microscopes basés sur des techniques d'optique non linéaire cohérente. Un microscope à balayage laser femtoseconde dont le mécanisme de contraste est la génération de seconde et de tierce harmonique a été réalisé. Ce mode de contraste a été utilisé pour caractériser les modifications des propriétés optiques induites localement par photochimie dans des matériaux vitreux. Dans le domaine de la biologie, des études ont été menées démontrant que ce mode de contraste permet une visualisation qualitative de cellules en trois dimensions ainsi qu'une certaine fonctionnalité.

Par ailleurs un prototype de microscope CARS résolu en temps a été développé et une nouvelle technique optique améliorant l'intensité relative du signal CARS a été imaginée.

MOTS CLES : Microscopie linéaire de fluorescence – Laser – Impulsion femtoseconde – Microscopie non linéaire cohérente – Génération de seconde et tierce harmonique – CARS – Imagerie 3D – Traitement du signal – Susceptibilités non linéaire d'ordre deux et trois – Poling – matériaux vitreux – imagerie cellulaire

NON LINEAR MICROSCOPY : ANALYSIS ET INSTRUMENTATIONS

ABSTRACT :

The approach of this work was to study and develop various microscopes based on coherent nonlinear optic techniques. A microscope with femtosecond laser scanning whose mechanism of contrast is the second and the third harmonic generation was built. This mechanism of contrast was used to locally characterize the modifications of induced optical properties by photochemistry in vitreous materials. In Biology, studies were undertaken showing that this mechanism of contrast allows a qualitative visualization of cells in three dimensions and also functionality.

Moreover a prototype of time resolved CARS microscope was developed and a new optical technique improving the relative intensity of CARS signal was devised.

KEY WORDS : Linear fluorescence microscopy – Laser – Femtosecond pulse – Nonlinear coherent microscopy – Second and third harmonic generation – CARS – 3D imaging – Signal processing – Second and third nonlinear susceptibility – Poling – vitreous materials – Cellular imaging