HAL
open science

Etude d'un continuum de lumière en régime femtoseconde. Applications au domaine biologique : microscopies et spectroscopie en temps résolu.

Céline Courvoisier

▶ **To cite this version:**

Céline Courvoisier. Etude d'un continuum de lumière en régime femtoseconde. Applications au domaine biologique : microscopies et spectroscopie en temps résolu.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Franche-Comté, 2006. Français. NNT : . tel-00103652

HAL Id: tel-00103652

https://theses.hal.science/tel-00103652v1

Submitted on 4 Oct 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 1154 Année 2006

THÈSE

présentée à

L'U.F.R DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

pour obtenir le

GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
Spécialité Sciences pour l'Ingénieur

Étude d'un continuum de lumière en régime femtoseconde. Applications au domaine biologique : microscopies et spectroscopie en temps résolu

par

CÉLINE COURVOISIER

Soutenue le 03 juillet 2006 devant la Commission d'Examen :

Président	H. MAILLOTTE	Directeur de Recherche, Institut FEMTO-ST, Besançon
Rapporteurs	H. GIOVANNINI	Professeur, Institut Fresnel, Marseille
	O. HAEBERLÉ	Maître de Conférences, Université de Haute Alsace, Mulhouse
Examinateurs	T. GHARBI	Professeur, Institut FEMTO-ST, Besançon
	R. GIUST	Maître de Conférences, Institut FEMTO-ST, Besançon
	T. BINZONI	Privat-Docent, Centre Médical Universitaire de Genève

A toute la joie partagée
A tous nos pots
"Que la lumière soif, et la lumière but !"
A. Beucler

Remerciements

Le travail synthétisé dans ce présent manuscrit a été effectué au sein du Département d'Optique P.M.Duffieux de l'Institut FEMTO-ST (UMR 6174) à l'Université de Franche-Comté.

Je tiens à remercier en premier lieu Monsieur Daniel VAN LABEKE, professeur à l'Université de Franche Comté et Directeur du Département d'Optique P.M.Duffieux pendant la majeure partie de ma thèse, pour m'avoir permis de réaliser cette étude doctorale. J'ajoute toute ma reconnaissance à Monsieur Tijani GHARBI, Professeur à l'Université de Franche-Comté, pour m'avoir confié cette recherche et donné les moyens d'en venir à bout !

Je joins également à ces remerciements ma plus vive gratitude à Monsieur Hugues GIOVANNINI, Professeur à l'Institut Fresnel de Marseille, à Monsieur Olivier HAEBERLÉ, Maitre de Conférences à l'Université de Haute Alsace de Mulhouse, à Tiziano BINZONI, Chargé de Recherche au CMU de Genève, ainsi qu'à Hervé MAILLOTTE , nouveau Directeur du Département d'Optique pour avoir accepté de lire et de juger ce travail.

Je ne sais quels mots trouver pour tenter de remercier à sa juste mesure Monsieur Remo GIUST, Maître de Conférences à l'Université de Franche-Comté. Ce travail de thèse n'aurait tout simplement pas été le même sans son soutien et son aide prodigieuse. Il me semble qu'un manuscrit ne suffirait pas à commenter ou à résumer l'ensemble des épisodes de la série "Encadreur/encadrée" : tant de discussions, de manips, de fous-rires et de complicité ... pour tout ce que nous avons partagé, merci.
Je tiens également à souligner l'importance de chaque membre du Labo E, qui a participé de manière scientifique ou non à la réalisation de cette thèse. Ryad Le Magnifique, le soleil du bureau et MacGyver du Sous-sol ; Pat, l'humoriste sans filtres ; Bert, à qui je dois pas mal de gâteaux ; Luc et Luca, les grosses voix musclées d'à-côté ; Claire-O-z'yeux-bleus ; Milou, la hotline 24h/24 ; Zou, le thé 24h/24 ; Mahla, le défilé de mode quotidien ; Gilbert et Robert, monuments inclassables du Labo ... mais aussi la fine équipe d'en face : Virginie, Yannick, Michaël, Anne, Armand, Jean-Charles, Bertrand, Ludo ...
Un grand merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel et mon ravitaillement alimentaire pendant la rédac' ; merci à mes amis Felice et Ludo, Lili, Clairette, Stéphane, Nat, Marie et PAM, et enfin, un merci tout particulier à mon tendre Alex, qui m'a tant apporté...

Table des matières

1 Etude du continuum **9**
1.1 Avènement des continua 12
1.1.1 Comment générer des fréquences ? 12
1.1.1.1 Origine de l'Optique Non Linéaire 12
1.1.1.2 Manifestations des non linéarités dues aux termes de susceptibilités d'ordre 2, d'ordre 3 16
1.1.1.3 Diffusions Raman et Brillouin 19
1.1.2 Expérimentations de génération de continuum 22
1.1.2.1 Dans les milieux massifs 23
1.1.2.2 Dans les milieux guidants : fibres optiques standards 23
1.2 Description des fibres microstructurées 24
1.2.1 Fabrication des MF 25
1.2.2 Propriétés de guidage 27
1.2.3 Propriétés optiques particulières 31
1.2.3.1 Courbe de dispersion 31
1.2.3.2 Exaltation des effets non linéaires 32
1.3 Génération de continuum dans les fibres microstructurées 33
1.3.1 Différents régimes temporels de pompage 33
1.3.2 Régime femtoseconde 36
1.4 Caractérisation du continuum choisi 42
1.4.1 Quel régime temporel ? Quelle fibre ? 42
1.4.2 Sélection spectrale 45
1.4.3 Spectre de puissance du continuum et fluctuations 46
1.4.4 Durée des impulsions du continuum 53
1.5 Conclusion 60

2 Microscopie confocale de fluorescence 61
2.1 Principe d'un microscope confocal de fluorescence 62
2.1.1 Réponses impulsionnelles 65
2.1.1.1 En microscopie conventionnelle 65
2.1.1.2 En microscopie confocale 66
2.2 Description du montage 70
2.2.1 Sélection spectrale 70
2.2.2 Montage optique 77
2.3 Caractérisation du microscope : résolutions spatiale et spectrale 79
2.3.1 Résolution latérale 79
2.3.2 Résolution axiale 82
2.3.3 Résolution spectrale 83
2.4 Imagerie confocale en mode réflexion 84
2.5 Imagerie confocale de fluorescence 88
2.6 Conclusion 92

3 Microscopie STED 95
3.1 Amélioration de la résolution en microscopie optique 96
3.2 Principe de la microscopie STED 99
3.2.1 Aspect temporel 101
3.2.2 Aspect spatial et spectral 102
3.3 Simulations numériques 104
3.3.1 Comportement tir à tir du continuum de lumière 104
3.3.2 Influence des fluctuations du continuum sur la dépletion de fluorescence 108
3.3.3 Influence des fluctuations du continuum sur la résolution latérale 110
3.4 Montage expérimental 117
3.4.1 Présentation générale 117
3.4.2 Méthode de séparation des faisceaux 118
3.4.3 Méthode de mise en forme spatiale 122
3.4.3.1 Réalisation et caractérisation 122
3.4.3.2 Simulation de la tache STED attendue après focalisation 127
3.4.4 Expérimentation 132
3.4.5 Conclusion 134

4 Spectroscopie de temps de vol : physiologie des milieux diffusants 135
4.1 Modèle théorique de propagation de la lumière 137

4.2 Présentation du système de spectroscopie de temps de vol 141
4.2.1 Montage expérimental 141
4.2.2 Calibration instrumentale 142
4.3 Mesures de spectroscopie de temps de vol en milieux diffusants 146
4.3.1 Spectroscopie de temps de vol dans le tissu musculaire 148
4.3.1.1 Mesures 149
4.3.1.2 Traitement des données et résultats 151
4.3.2 Spectroscopie de temps de vol dans le tissu osseux 154
4.4 Conclusion 157

A Autocorrélation d'impulsions femtosecondes 161

B Réponses impulsionnelles en microscopie confocale 167

C Conditions temporelles des pulses STED 177

D Génération numérique de continua 181

E Modèle numérique de l'AOTF 185

190

Bibliographie 198

Introduction générale

L'élément central de ce travail de thèse est un continuum de lumière couvrant les domaines visible et infra-rouge, généré par l'association d'un laser femtoseconde et d'une fibre microstructurée.
Ce "continuum de lumière", appelé parfois "laser blanc" suscite de nombreux questionnements : quels sont les phénomènes à l'origine de cet extraordinaire élargissement spectral ? Quelles sont les atouts de cette source au regard d'une lampe blanche usuelle ? Quelles sont ses applications potentielles ? En effet, la plupart des travaux en Optique des 40 dernières années découlent de l'invention du laser, source monochromatique par excellence, dont les immenses champs d'applications ne sont plus à démontrer. Que ce soit pour l'étude des atomes, des molécules, des tissus, de la non-linéarité des matériaux..., pour de la chirurgie, de la photothérapie ou encore de la découpe industrielle, le laser a très vite trouvé une place de choix dans tous les domaines propres ou connexes à la physique.
Comparées aux lasers, les autres sources de lumière à spectres de raies ou à spectre continu n'ont pas connu quant à elles, de telles perspectives d'applications : elles présentent une cohérence réduite et n'émettent qu'un flux de photons restreint. Historiquement, ce sont pourtant elles qui ont servi de support à la détermination de la nature même de la lumière. En effet, c'est tout d'abord l'observation du spectre solaire puis de ceux de lampes à vapeur, qui ont conduit à l'émergence des théories du corps noir et de la quantification des états d'énergie atomiques. Ce sont des observations spectroscopiques et des études sur le rayonnement des corps chauds qui ont conduit Planck, Bohr, et Einstein à fournir un modèle quantique de la lumière en accord avec le modèle ondulatoire du XIX ^{eme} siècle.
Ces sources de lumière non monochromatiques sont des lampes à incandescence ou des tubes à décharge. Leurs applications actuelles sont restreintes à de l'éclairage, qu'il soit urbain par utilisation de tubes à décharge haute pression, ou scientifique. Les lampes à filament ou à arc (Mercure, Xénon) sont par exemple employées comme source pour la microscopie classique ou de fluorescence, et pour de l'interférométrie en lumière blanche...
Après l'avènement des lasers et de l'extraordinaire envolée des progrès scientifiques qu'ils ont

engendrés, pourquoi donc développer de nouveau des sources à spectre large ?
Il s'avère que la propriété de monochromaticité des lasers se révèle parfois comme un facteur limitant. En effet, dans le domaine des télécommunications, la quantité d'informations échangées par voie optique est grandement améliorée si l'on peut utiliser en sus du multiplexage en fréquence (ou en phase) le multiplexage en longueur d'onde : chaque longueur d'onde sert de support au transport d'un type d'informations [1]. Dans le domaine de la biologie, la microscopie confocale de fluorescence à balayage laser est l'outil privilégié de l'investigation à l'échelle subcellulaire. Pour réaliser de telles recherches, les biologistes marquent les zones d'intérêts des cellules par différents fluorophores. Mais le nombre et la diversité de ces marqueurs est limité par le spectre de la source employée. Les microscopes commerciaux actuels étant équipés au maximum de 3 lasers, il semble donc très intéressant de pouvoir disposer d'une source à spectre large et de pouvoir y sélectionner la ou les bandes spectrales permettant d'exciter les fluorophores choisis... Une source optique de très faible longueur de cohérence, et donc de très large spectre, serait également particulièrement adaptée à la tomographie optique de cohérence. De même, en spectroscopie résolue en temps, une source d'impulsions courtes couvrant une grande gamme spectrale semble être une source idéale.
Ainsi, il apparaît qu'une source impulsionnelle et de large spectre serait une nouvelle révolution dans de nombreux domaines de recherche. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à vérifier la viabilité d'un continuum de lumière comme source de forte luminance pour différentes applications, plus particulièrement dans le domaine de l'investigation biomédicale.
Dans le premier chapitre, après avoir rappelé les effets physiques conduisant à la génération des continua, nous caractériserons le continuum développé au cours de cette étude, en terme de puissance, spectre, fluctuations de puissance et de forme temporelle des impulsions obtenues.
Le deuxième chapitre sera consacré à l'utilisation du continuum de lumière comme palette d'une multitude de sources pour la microscopie confocale de fluorescence : nous détaillerons quel procédé original de sélection spectrale a été mis en oeuvre, et nous montrerons des images cellulaires multi-couleurs obtenues à l'aide d'un microscope confocal non commercial, entièrement versatile en longueur d'onde.
La microscopie confocale atteint, par construction, les limites de résolution fixées par la diffraction de l'objectif imageur. Nous aborderons dans le troisième chapitre une possibilité d'amélioration importante de cette résolution grâce à la technique de déplétion de fluorescence STED (STimulated Emission Depletion). Celle-ci consiste à diminuer l'étendue de la tache d'excitation effective des fluorophores non pas en agissant sur la longueur d'onde, ou sur l'ouverture numérique de l'objectif, mais en éteignant la fluorescence sur le pourtour de la tache de diffraction, à l'aide d'un faisceau annulaire, de propriétés spectrales et temporelles particulières. Equipé d'un continuum de lumière, ce type de microscope permettrait d'allier un très haut pouvoir de réso-

lution (jusqu'à $\lambda/25$) à une très grande versatilité spectrale. Compte tenu des caractéristiques particulières du continuum en notre possession, le Chapitre 3 consiste en une étude de la faisabilité de l'utilisation de cette source dans un montage de microscopie STED.
Et enfin, au Chapitre 4, nous présenterons une application du continuum en physiologie des milieux diffusants, dans une expérience de spectroscopie de temps de vol. Cette méthode optique permet, de manière non invasive, d'accéder aux propriétés d'absorption et de diffusion des milieux illuminés. L'objectif de cette étude, réalisée en collaboration avec M. Tiziano Binzoni, physiologiste au CHU de Genève, est de fournir des données sur la structure et le métabolisme tissulaire.

Chapitre 1

Etude du continuum

La génération d'un supercontinuum est la formation d'un spectre continu, très large, obtenu par la propagation de pulses très intenses dans un milieu non linéaire. Elle a été observée pour la première fois en 1970 par Alfano et Shapiro [2]. Le terme "supercontinuum" ne désigne pas de phénomène spécifique mais plutôt le résultat de l'ensemble des effets non linéaires qui, par combinaison, génèrent l'extraordinaire élargissement spectral des pulses initiaux. L'objectif de ce chapitre est l'étude complète des caractéristiques de cette source spécifique, afin d'en déterminer ses applications potentielles, en tant que "nouvelle source". Mais comment classer un tel continuum parmi les autres sources optiques ?

Les sources "ordinaires" sont principalement des lampes à incandescence ou à luminescence. L'émission d'un spectre continu par les *lampes à incandescence* est due au passage d'un courant dans un fil métallique résistif, par exemple le tungstène, qui est porté à très haute température par effet Joule. Les *lampes à halogènes* sont basées sur le même principe mais l'utilisation de gaz halogenés à l'intérieur de l'ampoule limite l'évaporation du filament au cours de son utilisation, allongeant ainsi la durée de vie de la lampe. Leur spectre est large et proche de celui d'un corps noir.

Si l'on fait éclater une étincelle dans un tube contenant un gaz ou une vapeur, il peut également y avoir émission de lumière. Contrairement aux lampes à incandescence, le spectre obtenu dans ces *lampes à luminescence*, ici à décharge, est un spectre de raies, la largeur de celles-ci dépendant de la pression du gaz (ex : lampe à vapeur de sodium ou de mercure, lampe néon ...). En tapissant la surface interne des ampoules avec un mélange de poudres fluorescentes qui absorbent le rayonnement UV produit par les gaz, on aboutit à une source d'apparence blanche, dont le spectre est constitué de l'ensemble des raies d'émission des fluorophores.

Un autre type de source par luminescence est la LED, ou diode électroluminescente. Le principe physique sur lequel elle est basée relève du fonctionnement d'une jonction PN. Ses princi-

paux avantages sont un faible coût, une faible consommation électrique, une bonne efficacité de conversion ainsi qu'une très grande simplicité d'emploi. Les LEDs produisent une lumière de très faible étendue spectrale ($\simeq 10\ nm$), mais peuvent émettre sur une grande gamme de longueurs d'onde, de l'ultra-violet jusqu'à l'infra-rouge. Il est également possible de fabriquer des LEDs blanches, obtenues soit par combinaison d'un rayonnement bleu de la diode à un rayonnement jaune d'un luminophore, soit par conversion du rayonnement UV de la diode en rayonnement blanc par un luminophore, soit encore par superposition de trois diodes rouge, bleue et verte. Même si l'utilisation des LEDs tient majoritairement à de la signalisation, de nombreux travaux sont entrepris pour augmenter l'efficacité de conversion de celles-ci afin de les employer massivement dans le domaine de l'éclairage. Actuellement, leur efficacité atteint 110 $lumen/W$, et devient ainsi comparable à celle des lampes à décharge ou à incandescence.
Les sources de type synchrotron peuvent également être soulignées. Le synchrotron est composé d'un tore (ou anneau de stockage) et d'un accélérateur de particules. Des électrons ou des positons sont accélérés à une vitesse proche de celle de la lumière et injectés dans l'anneau. Ils génèrent alors un rayonnement synchrotron qui peut être exploité dans diverses expériences. Ce rayonnement est collecté à différents endroits du tore, appelés lignes de lumière. Chaque ligne de lumière traverse ensuite un ensemble de lentilles et de monochromateurs afin de sélectionner une ou plusieurs longueurs d'onde précises. La lumière synchrotron possède des caractéristiques exceptionnelles en comparaison à d'autres sources de lumière : son spectre d'émission s'étend de l'infra-rouge aux rayons X, le rayonnement est pulsé, très stable. Mais la taille de l'installation n'est en rien comparable à la compacité et aux facilités d'utilisation des autres sources citées ...
Dans une toute autre catégorie, on classe les sources LASER qui se distinguent par :

- leur grande monochromaticité ($\frac{\Delta\nu}{\nu} \sim 2.10^{-13}$) comparée à la lumière solaire ($\frac{\Delta\nu}{\nu} \sim 1$)
- leur grand temps de cohérence τ_c : l'existence d'une bande spectrale $\Delta\nu$ de valeur finie signifie que certaines fréquences présentes dans les faisceau laser peuvent éventuellement être déphasées les unes par rapport aux autres. Le temps requis pour que deux photons de fréquences ν et $\nu + \Delta\nu$ soient en opposition de phase, est $\tau_c = 1/\Delta\nu$: après ce laps de temps, les différentes composantes du faisceau commencent à interférer de manière destructive et le faisceau perd sa cohérence. Même pour un laser quelconque où $\Delta\nu = 1\ MHz$ et $\frac{\Delta\nu}{\nu} \sim 10^{-8}$, le temps de cohérence τ_c est égal à $1\ \mu s$, soit plus d'un million de fois plus long que pour une source couvrant la gamme du visible.
- leur directionnalité : Seule la diffraction impose aux faisceaux laser leur légère divergence, de l'ordre de 10^{-8} stéradians. Les lampes décrites ci-dessus émettent quant à elles de manière isotrope (4π *stéradians*). Certes, la collimation reste possible, mais au prix d'une forte diminution d'intensité.
- leur luminance spectrale β_ν : celle-ci est définie comme le flux de puissance par unité

de surface, par unité spectrale, et par stéradian. Pour caractériser un laser, nous utilisons l'expression suivante [3] :

$$\beta_\nu = \frac{P_\nu}{A\Delta\Omega\Delta\nu} \quad (W/cm^2.Hz.sr) \tag{1.1}$$

où P_ν est la puissance spectrale, A la surface d'émission de la source, $\Delta\Omega$ l'angle solide d'émission et $\Delta\nu$ la largeur spectrale. Un laser He-Ne dont la puissance moyenne est de l'ordre du mW, et une largeur spectrale de $10^4\ Hz$, a une luminance spectrale de $\beta_\nu\ = 25\ W/cm^2.Hz.sr$.

Pour décrire une source thermique, on peut exprimer β_ν en utilisant la formule du corps noir [3] :

$$\beta_\nu = \frac{2\nu^2}{c^2}\frac{h\nu}{e^{h\nu/kT}-1} \quad (W/cm^2.Hz.sr) \tag{1.2}$$

Dans la portion jaune du spectre solaire, avec $T = 5800\ K$, la luminance s'élève à $\beta_\nu\ =\ 3.10^{-12}\ W/cm^2.Hz.sr$. Ainsi filtrée, la lumière solaire est 10^{13} fois moins lumineuse qu'un laser.

Les différences entre une source thermique et une source Laser sont bien évidemment flagrantes. Néanmoins, au prix d'un flux de photons extrêmement faible, il est possible de filtrer un laser et une source "ordinaire" de telle sorte qu'ils possèdent la même luminance, la même largeur spectrale, la même divergence. Il existera toutefois une différence fondamentale entre les deux faisceaux, qui est la statistique de fluctuations dans l'émission des photons reflétant la nature quantique ou non de la source. La statistique d'émission laser est reliée à celle de Bose-Einstein, tandis que la source thermique émet selon une statistique de Poisson.

Le continuum, filtré spectralement, n'est pas *stricto sensu* une succession de raies lasers puisque le mécanisme à l'origine de sa formation n'est pas de l'émission stimulée. Par contre, la luminance d'un continuum est très largement supérieure à celle d'une source thermique. La figure suivante résume ces propos :

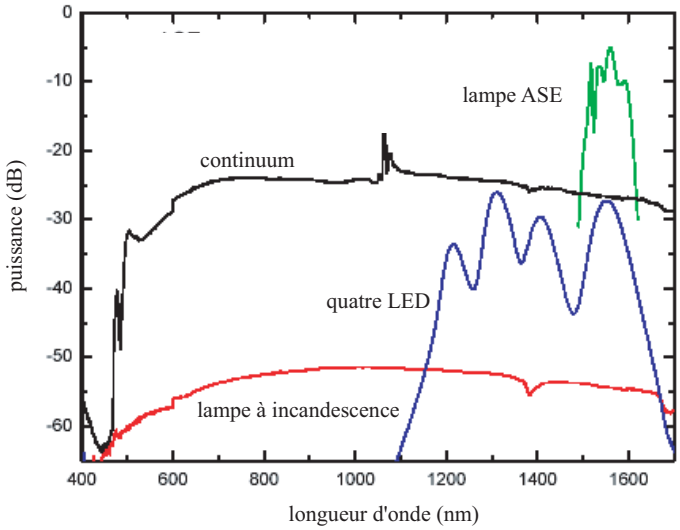


FIG. 1.1 – *Comparaison de spectres de puissance pour un angle solide donné, pour une lampe à incandescence, un ensemble de LED, un continuum fibré et une lampe à arc [4].*

Un continuum de lumière est donc une source "intermédiaire", ajoutant aux avantages d'une source à spectre large, une forte luminance, une forte directivité, une cohérence spatiale ainsi que des qualités de source impulsionnelle[1].
Dans ce chapitre, nous exposerons en premier lieu les différents effets physiques conduisant à la génération des continua de lumière, puis nous proposerons une caractérisation complète de la source utilisée tout au long de cette thèse, en terme de spectre, de puissance, de fluctuations de puissance pulse à pulse, et enfin, en terme de durées des impulsions issues du continuum.

1.1 Avènement des continua

En s'appuyant sur une description microscopique de la matière, nous pouvons justifier le fait que cette génération de nouvelles fréquences est un fait inhérent à l'Optique Non Linéaire.

1.1.1 Comment générer des fréquences ?

1.1.1.1 Origine de l'Optique Non Linéaire

Considérons un milieu matériel quelconque : solide, liquide, gaz ou plasma. Il peut se décrire comme un ensemble d'ions et d'électrons. Lorsque ce milieu est éclairé par un faisceau

[1] Il existe des continua en régime continu.

optique, ces charges voient (la composante magnétique est ici négligée) un champ électrique oscillant à une fréquence de l'ordre de 10^{13} à 10^{15} Hz ; chaque couple de particules chargées, l'une négative et l'autre positive, forme alors un dipôle oscillant. La masse de l'électron étant beaucoup plus faible que celle des ions, on considère avec une bonne approximation que seuls les électrons sont animés d'un mouvement.
On peut modéliser cette situation en considérant les électrons de masse m et de charge $-e$ liés aux cœurs ioniques par une force de type force de rappel d'un ressort, les dipôles étant supposés tous orientés dans la direction du champ électrique $E(t)$ appliqué. L'évolution de l'écart à l'équilibre x des électrons est régie par une équation du type :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \Gamma\frac{dx}{dt} + \omega_A^2 x + (\zeta^{(2)}x^2 + \zeta^{(3)}x^3 + ...) = \frac{-e}{m}E(t) \tag{1.3}$$

où ω_A est la fréquence de résonance du dipôle, $\frac{\Gamma}{2}$ est le facteur d'amortissement dû au rayonnement dipolaire et le membre de droite de l'équation représente la force de Lorentz exercé sur l'électron par le champ électrique induisant son oscillation. La prise en compte du terme entre parenthèses est le point clé permettant d'aborder les non linéarités, puisqu'il permet de passer d'un modèle d'oscillateur harmonique à celui d'un oscillateur anharmonique. Négligeons en premier lieu ce terme et considérons la réponse harmonique à un champ laser monochromatique de la forme $E(t) = Ee^{-i\omega t} + c.c.$ où ω est une fréquence optique et $c.c.$ le complexe conjugué. La solution de cette équation s'écrit :

$$x(t) = \frac{-eE}{m}\frac{e^{-i\omega t}}{\omega_A^2 - \omega^2 - i\Gamma\omega} + c.c. \tag{1.4}$$

La polarisation induite par le milieu est donnée par :

$$\mathcal{P}(t) = -Ne\, x(t) \tag{1.5}$$

où N est le nombre de dipôles oscillants par unité de volume. $x(t)$ étant proportionnel à E, la polarisation induite est, elle aussi, proportionnelle à l'amplitude du champ électrique : on exprime cette propriété à l'aide de la susceptibilité linéaire $\chi^{(1)}$=$\chi^{'(1)} + i\chi^{''(1)}$, selon l'équation suivante :

$$\mathcal{P}(t) = P(\omega)e^{-i\omega t} + c.c. \tag{1.6}$$

$$\mathcal{P}(t) = \varepsilon_0\chi^{(1)}(\omega)E\, e^{-i\omega t} + c.c. \tag{1.7}$$

avec

$$\chi^{'(1)} = \frac{-Ne^2}{2\varepsilon_0 m\omega_A}\frac{\Delta}{\Delta^2 + \frac{\Gamma^2}{4}} \tag{1.8}$$

et

$$\chi^{''(1)} = \frac{Ne^2}{2\varepsilon_0 m\omega_A}\frac{\frac{\Gamma}{2}}{\Delta^2 + \frac{\Gamma^2}{4}} \tag{1.9}$$

les parties réelle et imaginaire de la susceptibilité linéaire, $\Delta = \omega - \omega_A \ll \omega_A$ (l'écart à la résonance est très faible) et ε_0 la permittivité du vide. La susceptibilité traduit les modifications de l'onde optique dues à l'oscillation des dipôles à la fréquence laser ω. Elle intervient dans la définition de l'indice de réfraction vu par l'onde (en milieu dilué : $n_0 = \sqrt{1 + \chi^{'(1)}}$), ainsi que dans l'expression de la densité de puissance Π transférée du champ vers les dipôles :

$$\Pi =< E(t)\frac{d\mathcal{P}}{dt} >_t = 2\varepsilon_0\omega\chi^{''(1)}|E|^2. \tag{1.10}$$

En physique, le domaine de validité d'un principe de linéarité entre une grandeur d'excitation et une grandeur de réponse est restreint. Dans le cas d'un oscillateur comme celui que nous décrivons, la réponse de l'élongation $x(t)$ reste une fonction linéaire du champ appliqué $E(t)$ si l'amplitude des déplacements des particules reste petite devant la taille moyenne du dipôle au repos. Pour des amplitudes de champ plus importantes, l'équation harmonique du mouvement conduirait à obtenir des écarts à l'équilibre si grands que la structure du matériau en serait affectée. Il faut donc insérer des termes en $\zeta^{(2)}x^2 + \zeta^{(3)}x^3 + ...$ dans l'équation (1.3), pour traduire la contention des électrons au voisinage des cœurs ioniques. On arrive ainsi à la description d'un oscillateur anharmonique : soumis à un fort champ E, les oscillateurs rayonnent un champ non seulement à ω, mais aussi à 2ω, à 3ω, ... La polarisation induite par les oscillateurs subit donc une distorsion, puisqu'elle possède des composantes fréquentielles différentes de celle du champ appliqué. Lorsque les termes à ces nouvelles fréquences sont petits par rapport à la composante harmonique[2], l'expression de la polarisation non linéaire présente la forme suivante :

$$P(\omega) = \varepsilon_0[\chi^{(1)}(\omega)E(\omega) + \chi^{(2)}(\omega)E^2(\omega) + \chi^{(3)}(\omega)E^3(\omega) + \cdots] \tag{1.11}$$

où $\chi^{(2)}$,$\chi^{(3)}$... sont les susceptibilités non linéaires d'ordre 2, d'ordre 3... L'onde optique issue de ce milieu fait ainsi apparaître de nouvelles composantes spectrales.
Considérons un cas plus général que celui envisagé précédemment : un milieu éclairé par un champ incident **E**(**r**,t) résultant de la somme d'ondes planes monochromatiques d'amplitude $\mathbf{E}_n$=**E**(ω_n), de vecteurs d'onde $\mathbf{k}_n$, et de fréquence ω_n. Le champ incident s'écrit :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \sum_n \sum_{i=x,y,z} E_i(\omega_n)\,\mathbf{e}_i\, exp(-i\omega_n t + i\mathbf{k}_n \cdot \mathbf{r}) \tag{1.12}$$

où la somme porte sur les valeurs positives et négatives de n, avec la convention suivante traduisant la nature réelle de **E**(**r**,t) :

[2]dans le cas contraire, il n'y a plus de solution générale de l'équation (1.3)

$$\begin{cases} \omega_n = -\omega_n \\ \mathbf{k}_n = \mathbf{k}_{-n} \end{cases} \tag{1.13}$$

La non linéarité du matériau se traduit par l'existence d'une polarisation, fonction non linéaire du champ électrique total, dont nous supposerons qu'elle admet un développement en composantes de Fourier du champ électrique. Dans ces conditions, son expression est :

$$P(\mathbf{r}, t) = \sum_m \sum_{i=x,y,z} P_i(\omega_m)\, \mathbf{e}_i\, exp(-i\omega_m t + i\boldsymbol{k}_m \cdot \mathbf{r}) \tag{1.14}$$

Les non linéarités d'ordre p du matériau sont caractérisées par les termes $P_i(\omega_m)$ (notés aussi $P_i^{(p)}(\omega_m)$) de cette somme impliquant p composantes du champ E. La polarisation non linéaire $P_i^{(p)}(\omega_m)$ s'écrit en fonction des susceptibilités d'ordre p sous la forme :

$$P_i^{(p)}(\omega_m) = \varepsilon_0 \sum_{n_1 \ldots n_p} \sum_{i_1 \ldots i_p} \chi^{(p)}_{i,i_1,\ldots,i_p}(\omega_m; \omega_{n_1}, \ldots, \omega_{n_p}) E_{i_1}(\omega_{n_1}) \ldots E_{i_p}(\omega_{n_p}) \tag{1.15}$$

où la somme est restreinte aux indices n_j vérifiant les deux conditions de conservations de l'énergie et du vecteur d'onde :

$$\omega_m = \sum_{j=1}^{p} \omega_{n_j} \tag{1.16}$$

$$\mathbf{k}_m = \sum_{j=1}^{p} \mathbf{k}_{n_j} \tag{1.17}$$

Comme le montrent les relations (1.15) et (1.16), la polarisation non linéaire comporte des composantes de fréquence absentes du champ électrique incident. Le champ rayonné par les dipôles induits dans le matériau peut donc conduire à la génération de nouvelles ondes.
A ce stade, comment évaluer la valeur seuil de l'amplitude du champ électrique $E(t)$ à appliquer pour sortir du régime linéaire et générer de nouvelles fréquences optiques ?
D'après la discussion précédente, les non linéarités associées aux termes anharmoniques doivent être prises en compte lorsque *le champ laser n'est plus négligeable devant le champ intra-atomique E_{intra} responsable de la liaison électron-cœur ionique*. La relation

$$E_{intra} = \frac{q}{4\pi\varepsilon_0 r^2} \tag{1.18}$$

où r est le rayon atomique ($\sim$1 Å), permet d'estimer ce champ à $10^{11}\ V/m$. Contrairement à une source blanche habituelle, cette valeur est en fait facilement atteinte au point de focalisation d'un faisceau laser. Par exemple, le premier laser (conçu par Mainman en 1960) en fonctionnement déclenché, délivre pour une énergie impulsionnelle de $0,1J$ répartie sur $10\ ns$, une puissance

crête de 10^{13} W/cm^2 lorsqu'il est focalisé sur une tache de 100 μm^2, ce qui correspond en champ, à l'ordre de grandeur de E_{intra}. Un tel laser est donc capable de faire entrer le milieu illuminé en régime non linéaire.
Mais en général, il n'est pas nécessaire d'employer un faisceau laser ayant une si haute densité de puissance. Des effets non linéaires sont en effet observés en utilisant une source moins puissante, mais dans des conditions telles que les dipôles induits oscillent tous de façon cohérente. Ils rayonnent alors un champ dont l'intensité est considérablement plus grande que celle issue de la superposition des champs rayonnés de manière incohérente par le même nombre de dipôles. Le milieu voit donc localement une excitation électrique le conduisant hors de sa zone linéaire. En *optique non linéaire*, cette condition se nomme "condition d'accord de phase".
De même, si la fréquence du champ laser est proche de la fréquence de résonance du dipôle, il n'est pas nécessaire d'avoir une haute densité de puissance pour faire apparaître des processus non linéaires : il s'agit d'*exaltation résonante des non linéarités*.
Nous nous plaçons désormais dans le régime non linéaire du matériau : comment se manifestent ces non linéarités ?

1.1.1.2 Manifestations des non linéarités dues aux termes de susceptibilités d'ordre 2, d'ordre 3

INFLUENCE DU $\chi^{(2)}$

Comme nous l'avons vu précédemment, les susceptibilités jouent un rôle clé en optique non linéaire puisqu'elles traduisent le lien entre le champ incident et la façon dont le matériau réagit à ce champ : l'expression de la polarisation du milieu détermine l'ensemble des effets non linéaires pouvant se manifester.
Considérons donc en premier lieu l'influence de la susceptibilité d'ordre 2. Les effets non linéaires correspondants consistent principalement en des phénomènes de *mélanges d'ondes*, conduisant à des sommes ou différences des fréquences des deux ondes incidentes. Une onde "somme" peut par exemple être générée en illuminant un cristal non linéaire avec une onde plane intense, appelée onde pompe, de fréquence ω et d'amplitude $E(\omega)$.

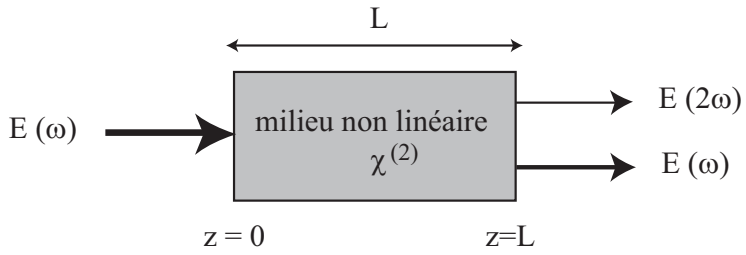


FIG. 1.2 – *Schéma de principe d'une expérience de doublage de fréquence dans un cristal de longueur L. Les champs se propagent selon l'axe Oz*

La polarisation du milieu possède deux composantes de Fourier :

– l'une à la fréquence 2ω :

$$P^{(2)}(2\omega) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega; \omega, \omega) E(\omega)^2 \tag{1.19}$$

qui donnera naissance à un champ à la fréquence double du faisceau pompe incident. Elle est appelée onde de seconde harmonique, par analogie à l'acoustique. D'un point de vue atomique, cet effet correspond à l'absorption de 2 photons de l'onde pompe par la matière, et à l'émission d'un photon de pulsation $\omega_{\text{émis}} = 2\omega$.

– l'autre à la fréquence nulle :

$$P^{(2)}(0) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(0; \omega, -\omega) E(\omega)^2 \tag{1.20}$$

se traduisant par la création d'un champ électrique statique à partir d'une onde lumineuse.

De manière générale, un matériau présentant une susceptibilité $\chi^{(2)}$ élevée réalise le mélange des ondes incidentes en les associant deux à deux, et génère alors des nouvelles fréquences, discrètes, par sommation ou différences des fréquences existantes dans le spectre des champs incidents. Mais ce mélange d'ondes n'est possible que lorsqu'une condition d'accord de phase est réalisée : elle traduit le fait que la conversion fréquentielle doit respecter la conservation de l'énergie apportée par les champs incidents (eq.(1.16)), ainsi que la conservation des impulsions (eq.(1.17)). La technique du doublage de fréquences est très fréquemment utilisée soit pour atteindre des domaines spectraux dans lesquels il y a peu de lasers disponibles (ultra-violet), soit pour produire des faisceaux cohérents dans le visible à partir de lasers infra-rouge puissants (ex. conversion 1064 nm → 532 nm)

INFLUENCE DU $\chi^{(3)}$

Si le matériau illuminé exhibe une susceptibilité d'ordre 3 significative, des mélanges à 3 ondes peuvent apparaître, avec un processus tout à fait similaire au cas précédent : les combinaisons de

fréquences sont alors plus nombreuses, et un accord de phase à 3 ondes doit être réalisé.
Le terme $\chi^{(3)}$ a également une influence sur l'indice de réfraction n vu par l'onde optique. La polarisation induite **P**(**r**,t) et le champ incident **E**(**r**,t) étant reliés par l'équation (1.7), on peut alors écrire :

$$\mathbf{P}(\mathbf{r},t) = \varepsilon_0\,\varepsilon\,\mathbf{E}(\mathbf{r},t) \tag{1.21}$$

La permittivité ε relative au milieu est ainsi clairement dépendante de la susceptibilité de celui-ci, et entre pleinement dans la définition de l'indice de réfraction n du milieu selon la relation suivante :

$$n(\omega,t) = \sqrt{\frac{\varepsilon(\omega,t)}{\varepsilon_0}} = n_0(\omega) + n_2(\omega,t)|E^2(t)| \tag{1.22}$$

où

- n_0 est l'indice de réfraction linéaire,
- $n_2 = \frac{3}{8n_0} Re(\chi^{(3)}_{xxxx})$ (en m^2/W), $Re(\chi^{(3)}_{xxxx})$ est la partie réelle d'une composante du tenseur d'ordre 4 de la susceptibilité du matériau,
- E est l'amplitude du champ optique.

Les valeurs du coefficient n_2 pour les matériaux non linéaires usuels (BBO, KTP) sont de l'ordre de $10^{-18}\,m^2/W$. Dans les fibres optiques en silice, n_2 est nettement plus petit ($n_2 \sim\ 10^{-20}\,m^2/W$), mais les propriétés de confinement du champ, de faibles pertes de puissance et la grande longueur sur laquelle les interactions ont lieu permettent toutefois d'observer ce type de non linéarités.
L'onde optique voit donc un indice de réfraction n dépendant de sa propre intensité. Ce phénomène, appelé *effet Kerr optique*, ne nécessite pas d'accord de phase puisqu'il s'agit d'auto-action d'une onde sur elle-même.
Dans le cas de $n_2 > 0$, l'effet Kerr présente deux manifestations principales :

manifestation spatiale : un milieu Kerr, illuminé par un faisceau gaussien, retarde d'autant plus l'onde que son intensité est importante : le milieu joue le rôle d'une lentille au sens où le centre du faisceau est plus ralenti que les bords. Bien que le faisceau ait une tendance "linéaire" à diverger suite à la diffraction, il a ici tendance à s'auto-focaliser. Les interactions avec la matière deviennent alors très intenses et peuvent génèrer des phonons par effet Raman et Brillouin stimulés (cf.§1.1.1.3). Ceci tend à engendrer le plus grand désordre dans le faisceau, et conduit, par exemple, à la génération d'un continuum de lumière...

manifestation spectrale : Dans un milieu Kerr, n dépend également du temps (eq.(1.22)). Une impulsion gaussienne, d'intensité $I(t)$, centrée à ν_0, traversant un milieu de longueur L, subit une modulation de phase temporelle $\Delta\varphi(t)$:

$$\Delta\varphi(t) = \frac{2\pi}{\lambda}\,\Delta n(t)\,L = -\frac{2\pi}{\lambda}\,n_2 I(t) L \tag{1.23}$$

Ce qui se traduit dans le domaine spectral par :

$$\nu(t) = \nu_0 + \frac{1}{2\pi}\frac{d\Delta\varphi(t)}{dt} = \nu_0 - \frac{n_2 L}{\lambda}\frac{dI(t)}{dt} \tag{1.24}$$

Pour des fortes variations de l'intensité, la fréquence est fortement décalée par rapport à ν_0 : le front avant de l'impulsion subit un glissement vers le bleu, tandis que le front arrière est décalé vers le rouge (cf. figure 1.3).

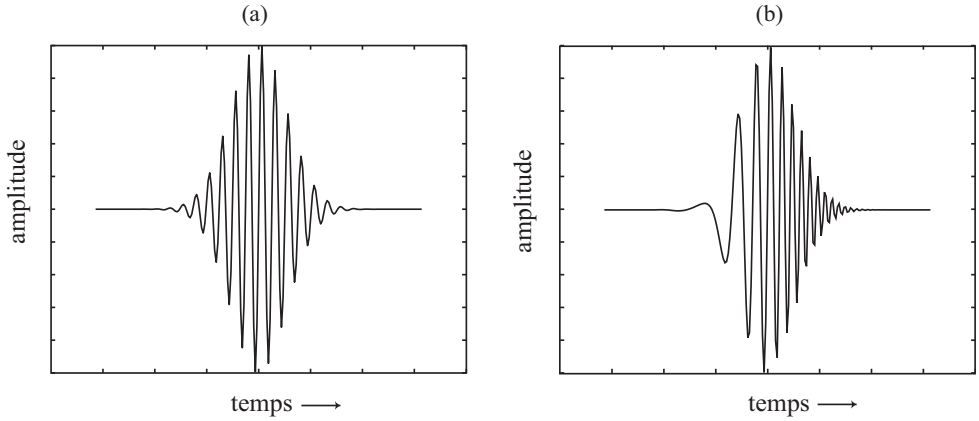


FIG. 1.3 – *Évolution d'une impulsion soumise à la SPM (a) : sans SPM, (b) : avec SPM.*

Ce phénomène d'*automodulation de phase* (Self Phase Modulation, SPM) provoque donc un élargissement spectral de l'impulsion initiale, mais ne la raccourcit pas pour autant puisque les nouvelles composantes fréquentielles ne sont pas en phase. Cet effet est d'autant plus important que les fronts impulsionnels sont abrupts, c'est-à-dire que l'impulsion initiale est courte. Typiquement, pour des impulsions de $150\ fs$, de puissance-crête $100\ kW$, à $\lambda_0 = 800\ nm$ se propageant dans un milieu de longueur $5\ mm$ et d'indice non linéaire $n_2 = 10^{-18} m^2/W$, l'élargissement spectral est de l'ordre de $50\ nm$.

1.1.1.3 Diffusions Raman et Brillouin

Les effets non linéaires dont nous avons parlé dans les paragraphes précédents n'abordent pas les échanges énergétiques possibles entre le champ optique et le milieu, qui sous-tendent potentiellement à la génération de fréquences. Pourtant, dans la zone de linéarité d'un matériau, et *a fortiori* dans sa zone non linéaire, les interactions entre le champ et le milieu ne sont pas systématiquement élastiques. Des phénomènes de diffusion Raman ou Brillouin apparaissent spontanément : le milieu apporte ou retire de l'énergie au champ optique.
Dans une description quantique de ces interactions lumière-matière (fig.1.4), un photon du champ

incident (pompe ω_p) est absorbé par le matériau, pour créer dans la plupart des cas, un photon d'énergie plus faible (ω_S) ou plus grande (ω_{AS}) que le photon pompe, et un phonon possédant une énergie et une impulsion telles qu'il y ait conservation de ces deux quantités au cours du processus. On parle de photon Stokes (cas A) ou anti-Stokes (cas B) : il y a eu ainsi génération discrète de fréquences qui traduisent la structure interne de la matière sondée. Mais celle-ci reste peu probable à basse intensité, car les sections efficaces de diffusion sont très faibles[3]. Il faut donc atteindre un régime fortement non linéaire pour obtenir une conversion de fréquences significative.

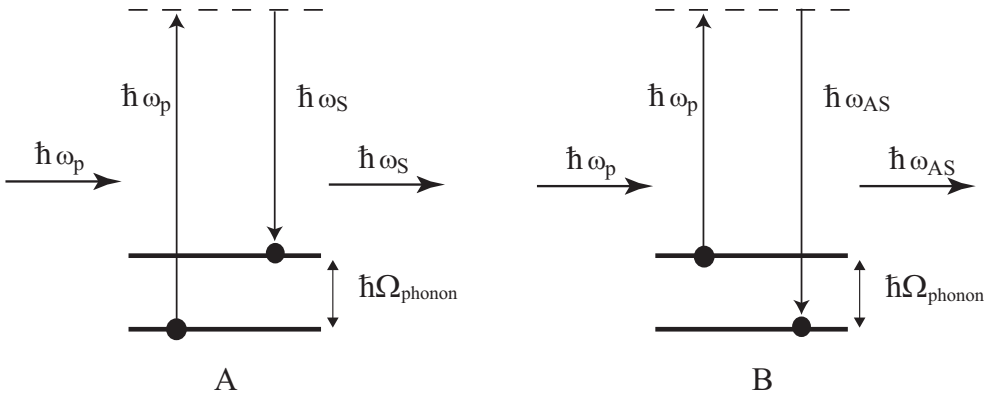


FIG. 1.4 – *Interprétation schématique de la diffusion Raman spontanée. A : Stokes, B : Anti Stokes.*

Stimulés par la présence d'une onde intense (fig.1.5), les processus deviennent beaucoup plus probables. Dans ce cas, le matériau est simultanément éclairé par une onde pompe (ω_p) et une onde sonde (ω_S) de manière à exciter de façon résonante ses modes de vibrations moléculaires ou hyper-sonores.

[3] pour des matériaux massifs, la section efficace de diffusion Raman varie entre 10^{-31} cm^2 et 10^{-29} cm^2, des valeurs de 10^{-16} cm^2 sont cependant atteintes pour les fluorophores.

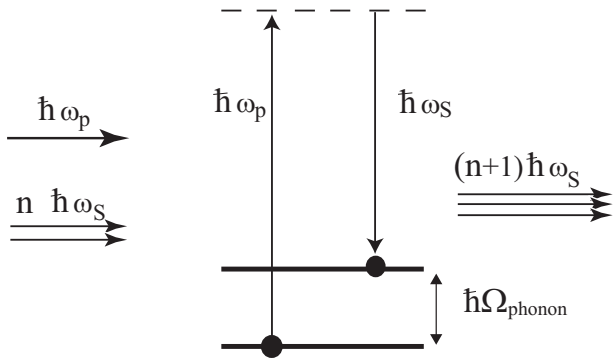


FIG. 1.5 – *Interprétation schématique de la diffusion Raman stimulée Stokes.*

En d'autres termes, ceci correspond à l'émission stimulée d'un photon sonde (ω_S) dans le mode de l'onde sonde, conduisant à une amplification de l'onde sonde aux dépends de l'onde pompe. La différence d'énergie $\hbar\Omega = \hbar(\omega_p - \omega_S)$ est absorbée par le matériau sous la forme d'un phonon optique (Stimulated Raman Scattering SRS) ou acoustique (Stimulated Brillouin Scattering SBS).
Ce phénomène de stimulation est décrit par un paramètre de gain, g_R, désignant la capacité du matériau à dépeupler une onde pompe pour enrichir une onde sonde. Ce coefficient g_R est relié à la susceptibilité d'ordre 3 du matériau. Il atteint couramment une valeur de $0.3\ cm^{-1}$, ce qui signifie qu'après une propagation d'1 cm, 30% de l'intensité incidente a été diffusée et donc convertie. Contrairement aux milieux cristallins où le gain Raman est significatif pour des fréquences discrètes (génération des 2 fréquences "Stokes" et "Anti-Stokes"), les milieux amorphes tels que la silice ont un gain Raman qui s'étend sur un large spectre. Les niveaux vibrationnels de ces matériaux formant une large bande d'énergie, *i.e.* l'énergie des phonons pouvant prendre diverses valeurs, des photons pompe de diverses énergies peuvent être absorbés et convertis : le spectre de cette diffusion stimulée est donc large. De plus, le processus possède un temps de réponse qui dépend du milieu et de sa géométrie : ce temps de réponse se manifeste par une courbe spectrale de susceptibilité Raman anti-symétrique par rapport à la fréquence de l'onde pompe. L'énergie de pompe est transférée du côté des basses fréquences (côté Stokes), correspondant à une bande de gain qui s'étend, pour la silice, sur une plage de fréquence de 30 à $40\ THz$ avec un maximum à $13\ THz$ (fig.1.6). Lorsque cette onde Stokes devient elle-même suffisamment intense, elle joue le rôle de pompe secondaire, et stimule les ordres Stokes supérieurs, successivement décalés en fréquence de la même quantité Ω. On parle alors de cascade Raman.

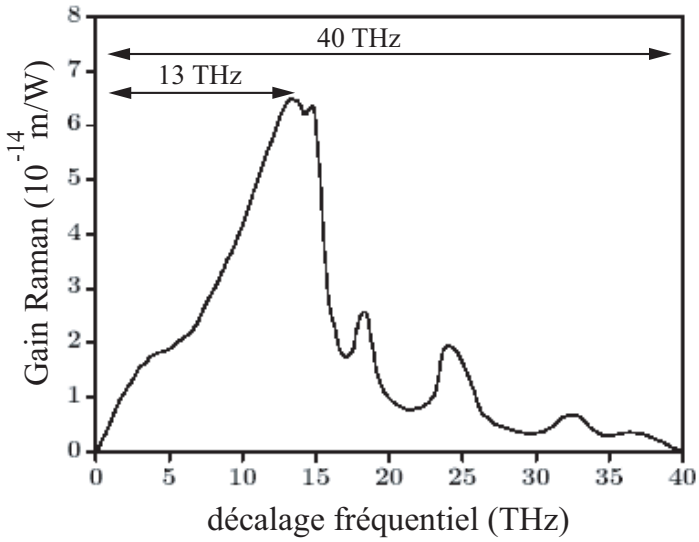


FIG. 1.6 – *Spectre de gain Raman dans une fibre en silice pure [5].*

La description des milieux matériels comme un ensemble de dipôles électriques conduit ainsi à l'émergence d'un paramètre-clé pour la compréhension des phénomènes non linéaires : la susceptibilité χ, qui relie la valeur du champ appliqué à la réponse du matériau. L'interaction lumière-matière entraîne, dans un régime non linéaire, la génération de nouvelles fréquences par le biais de très nombreux processus : génération de seconde harmonique (SHG), mélange à quatre ondes (FWM), diffusion Raman stimulée (SRS), automodulation de phase (SPM), modulation de phase croisée (XPM), effets solitoniques... Un élargissement continu du spectre d'impulsions initiales est le produit de l'interaction de la plupart des ces phénomènes...

1.1.2 Expérimentations de génération de continuum

La génération de continuum de lumière à partir de pulses pompe a été étudiée dans les liquides, les milieux massifs et les fibres optiques dès le début des années 70.
Quelques années après les premières observations d'élargissement spectral[6, 7], Shimizu, en 1967, parvient à identifier son origine lors de la propagation d'un faisceau laser picoseconde dans une cellule remplie de CS_2, liquide fortement non linéaire [4][8]. Il observe la formation de filaments de lumière, de 24 nm d'étendue spectrale, qu'il interprète comme le résultat de SPM.

[4] $n_2^{CS_2} = 3,5\ .10^{-18}\ cm^{-2}/W$

1.1.2.1 Dans les milieux massifs

Mais les travaux fondateurs de l'émergence des continua sont ceux d'Alfano et Shapiro, en 1970 : après avoir mesuré l'élargissement fréquentiel dû au phénomène de SPM dans différents cristaux [9], ils proposent une expérience menant à un élargissement dix fois plus important que tout ce qui a été reporté auparavant. La source-pompe utilisée est un laser picoseconde centré à λ =$1,06$ μm : le faisceau est tout d'abord doublé en fréquence, puis est focalisé sur un cristal de borosilicate (BBO). Des filaments de lumière de quelques dizaines de microns de diamètre apparaissent, avec une densité de puissance de 10^4 GW/cm^2 et un spectre s'étendant de 400 à 700 nm [2]. C'est le premier "supercontinuum" (SC). Sa formation en milieu massif est très complexe : même si la SPM est le point central, elle fait intervenir, d'après Alfano et Shapiro, du self-steepening, un effet de "space-time focusing", de l'absorption multi-photon, des avalanches d'ionisation et la formation de plasmas d'électrons libres.
De nombreuses recherches de génération de SC ont eu lieu dans différents milieux : verres massifs [2, 9, 10], liquides organiques , eau [11, 12], gaz [13, 14]. Dans tous les cas, la puissance de pompe est à ajuster pour engendrer suffisamment d'effets non linéaires sans dépasser le seuil de dommage du matériau. L'objectif est alors de trouver le meilleur support matériel afin de générer un continuum efficacement avec une puissance initiale relativement faible.
L'inconvénient des milieux massifs et liquides est qu'ils entraînent dans certains cas la formation d'un continuum par filamentation [5] : cette nouvelle "source" présente une distribution spatiale inhomogène, la rendant ainsi difficilement exploitable.

1.1.2.2 Dans les milieux guidants : fibres optiques standards

L'utilisation de structures guidantes, telles que les fibres optiques, évite ce désagrément. Les premières expériences de génération de SC dans les fibres sont basées sur l'injection, dans des fibres optiques standards en silice, de pulses de haute puissance dans la région visible du spectre, la fibre ayant une longueur d'onde de zéro de dispersion (λ_{ZDW}) voisine de $1,3$ μm. Par exemple, des pulses nanosecondes, de puissance crête 1 kW, génèrent dans ces conditions un spectre de largeur 200 THz du côté "rouge" du spectre de la pompe [15]. D'autres expériences du même ordre ont par la suite permis de mieux comprendre les phénomènes sous-jacents [16, 17, 18] : contrairement aux milieux massifs dans lesquels on trouve un couplage entre les effets spatiaux et temporels, la génération de SC dans les fibres n'est mise en oeuvre que par des dynamiques temporelles. Pour un pompage dans la zone de dispersion normale de la fibre ($\lambda_{pompe} < \lambda_{ZDW}$), il s'agit d'interactions mutuelles entre SRS, SPM, XPM, et FWM provoquant

[5] l'apparition de filaments dépend de la durée des pulses pompe, de la dispersion du milieu, etc...

à la fois l'émergence de fréquences discrètes, l'étalement fréquentiel de celles-ci, et produisant un spectre final relativement "lissé".
Pour un pompage dans la zone de dispersion anormale ($\lambda_{pompe} > \lambda_{ZDW}$), les effets sont tout autres. Ce régime de pompage rend possible la propagation de *solitons*, et ce sont les perturbations infligées à ceux-ci qui vont mener à l'établissement du SC. On appelle ici soliton une onde optique dont le profil suit une loi du type :

$$u(\xi, \tau) = sech(\tau)e^{i\xi} \tag{1.25}$$

qui ne manifeste aucune déformation au cours de sa propagation[6]. L'étude expérimentale de ce régime a été retardée jusque dans les années 80, par manque de sources impulsionnelles à des longueurs d'onde supérieures à $\lambda_{ZDW_{fibre}} = 1,3\ \mu m$. Des études théoriques puis expérimentales [19, 20, 21] ont mis à jour les effets primordiaux de la génération de SC en régime anormal : avec une pompe puissante, des solitons d'ordres supérieurs (*i.e.* ayant une déformation temporelle périodique au cours de leur propagation) débutent leur propagation, puis sous l'effet d'élargissement spectral et de compression temporelle se fissionnent en solitons fondamentaux. Ceux-ci relâchent au cours de leur propagation des composantes fréquentielles décalées vers les courtes et hautes longueurs d'onde. Ce processus sera développé au paragraphe (1.3.2).
D'autres types de fibres, appelées fibres microstructurées, ont été testées comme support pour la génération de continuum. Elles présentent l'indéniable avantage d'avoir une λ_{ZDW} adaptable car reliée à leur géométrie : on peut ainsi l'abaisser jusqu'au domaine visible et favoriser une excitation en régime anormal avec des sources impulsionnelles non spécialisées. C'est d'ailleurs ce type de fibres que nous utiliserons.
Après une description de leurs structures et propriétés optiques particulières, nous aborderons les phénomènes conduisant à l'obtention de SC.

1.2 Description des fibres microstructurées

La possibilité de modifier les propriétés de guidage et de dispersion en introduisant une structure dans l'indice de la fibre a été suggérée dès les années 70 [22] mais la réalisation proprement dite a été effectuée par l'équipe de Russell en 1996 [23]. Ces travaux ont consisté à développer des fibres en silice pure composées d'un arrangement périodique de plusieurs canaux d'air parallèles à l'axe de la fibre. Si ces fibres présentent, comme nous le verrons, de prodigieux avantages pour la génération de SC, la motivation principale de cette innovation était de concevoir des fibres à cœur creux capables de guider la lumière en utilisant l'effet de bande interdite

[6] La fonction $sech$ est définie par $sech(x) = \frac{1}{ch(x)} = \frac{2}{e^x + e^{-x}}$

photonique, analogue à l'effet de bande interdite électronique dans les milieux cristallins, d'où l'introduction du terme "photonic crystal fiber" (PCF) désignant ce type de fibres. Par contre, lorsque le cœur est constitué de silice, la propagation de la lumière est radicalement différente, puisqu'elle est similaire à de la propagation par réflexion totale interne. Dans ce cas, le terme "fibre microstructurée" (MF) est retenu.

1.2.1 Fabrication des MF

Une *fibre standard* en silice est constituée de deux cylindres concentriques présentant une différences d'indice de refraction de l'ordre de 0.1%. L'indice du cœur central étant plus haut que celui de la gaine extérieure, la lumière est guidée dans le cœur par réflexion totale interne sur l'interface cœur-gaine.
Une *fibre MF* est formée d'un cœur plein en silice (ou creux), et d'une gaine résultant de l'assemblage régulier de trous d'air dans la silice. Le profil est caractérisé par la donnée de la forme de la maille élémentaire et de deux dimensions : le pas Λ entre les trous et le diamètre des trous d (cf.fig1.7).

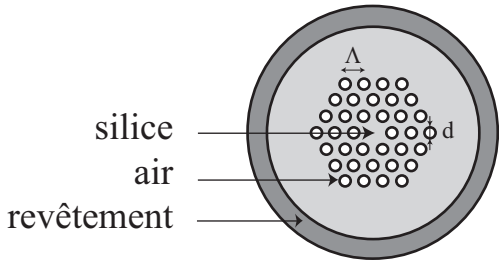


FIG. 1.7 – *Coupe schématique d'une fibre microstructurée et ses paramètres d et Λ*

Les étapes de leur fabrication sont généralement les suivantes :

Étape de préformage Dans un tube de silice de 1 ou 2 cm de diamètre, des dizaines ou centaines de capillaires creux sont empilés autour d'un capillaire plein formant le cœur (fig.1.9). Le profil géométrique de la préforme détermine la structure finale de la fibre, l'arrangement le plus simple fournit des trous répartis de manière hexagonale autour du cœur.

Étape d'étirage La préforme est ensuite étirée à chaud dans une tour de fibrage où la température des fours est de l'ordre de 1900 ^oC : ceci permet de faire fondre la silice tout en maintenant des tensions de surface nécessaires pour conserver des trous intacts (fig.1.8).

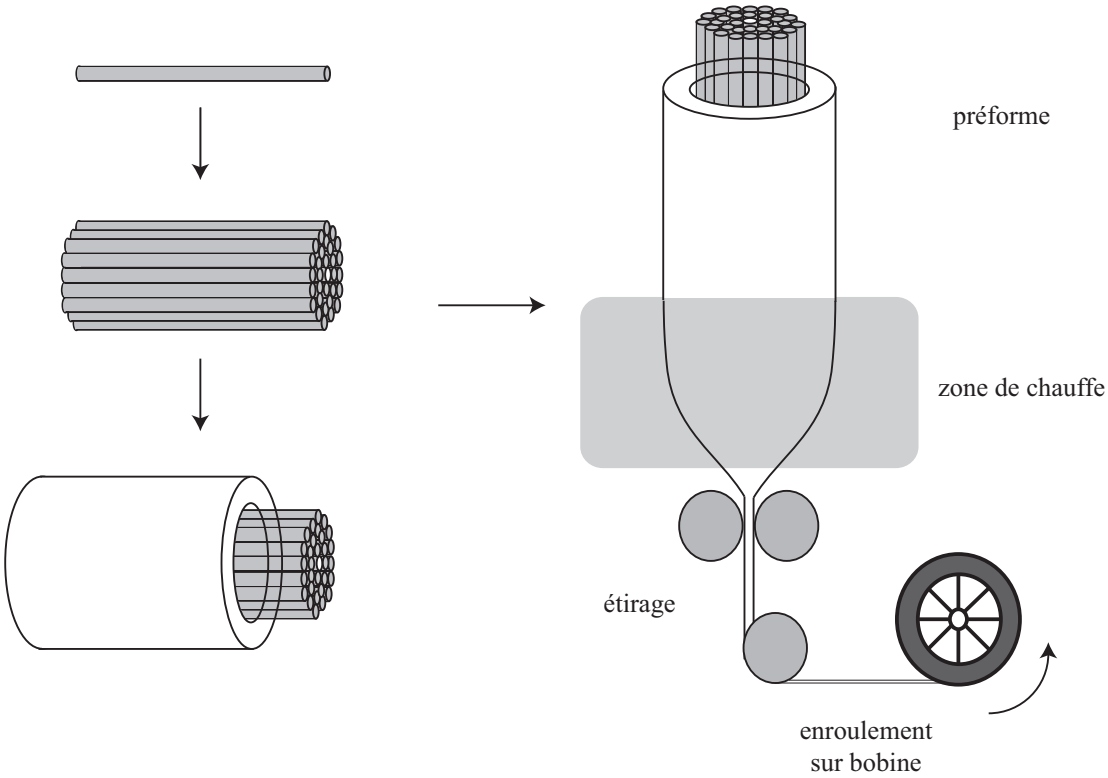


FIG. 1.8 – *Les deux étapes de la fabrication des fibres MF : préforme et étirage [4]*

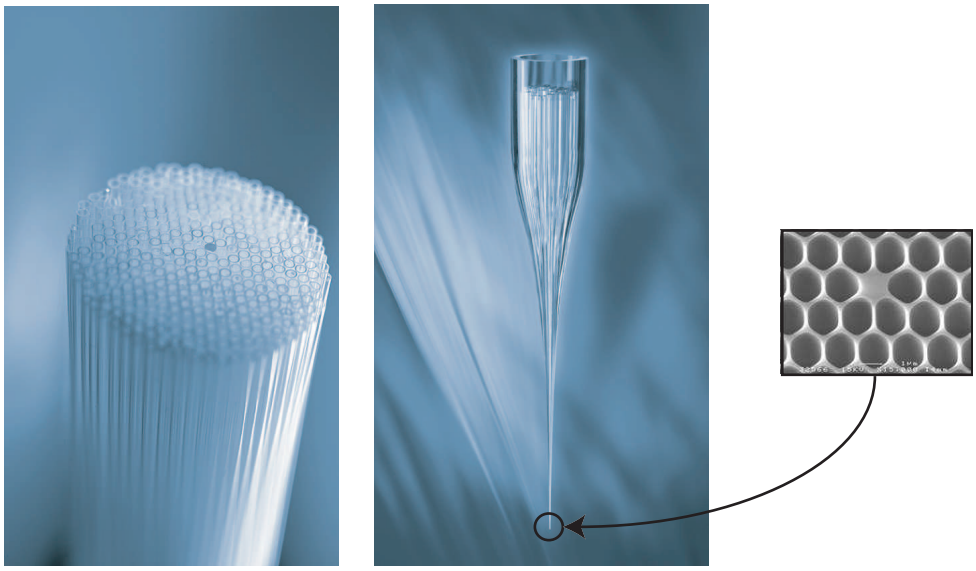


FIG. 1.9 – *Photographie d'un arrangement de capillaires en phase de préforme et d'étirage [4]*

On passe alors d'un tube de quelques centimètres de diamètre à une fibre d'environ $125\ \mu m$

de diamètre extérieur (fig.1.9) et dont les trous intérieurs sont de l'ordre de quelques microns.

1.2.2 Propriétés de guidage

Selon les effets de guidage désirés, plusieurs types de fibres ont été développés. Quelques profils possibles sont présentés sur la figure (1.10), mais deux grandes classes de fibres émergent :

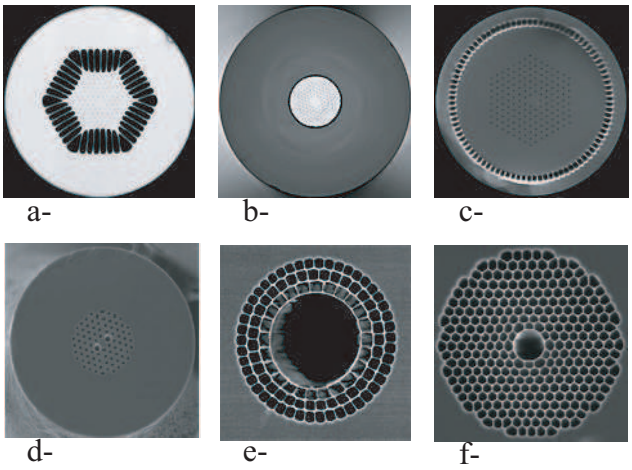


FIG. 1.10 – *Photographies de différents profils de fibres MF [4]. La distance entre deux trous est de l'ordre du micron sur l'ensemble de ces profils.*

1. **les fibres à cœur creux** (types e- et f-)), encore appelées "Hollow Core" réalisant le fascinant challenge de guider la lumière à l'intérieur d'un cœur d'indice plus faible que la gaine. La propagation de la lumière dans l'air limite les pertes intrinsèques dues à l'interaction lumière/matière : de très grandes densités de puissance peuvent être injectées dans le cœur sans phénomènes de claquage du matériau. Les intensités seuil d'apparition de la diffusion de Brillouin, de l'émission stimulée Raman, et d'autres effets non linéaires sont alors repoussées. Ces fibres sont ainsi principalement employées pour de la transmission de signaux avec un minimum de distorsion, ou pour des applications nécessitant de fortes puissances guidées. Mais actuellement, les pertes par absorption s'élèvent encore à $13\ dB/km$ à 1500nm [24], contre $0.1\ dB/km$ pour une fibre standard.
   Comment expliquer ce guidage dans l'air ? Dans le cas de guides périodiques, une forte analogie peut être relevée entre l'équation de propagation d'un champ E(x,y,z) issue des équations de Maxwell (1.26) et l'équation de Schrödinger indépendante du temps, décrivant les conditions d'existence d'une fonction d'onde $\Psi(x, y, z)$ dans un potentiel $V(x, y, z)$ (1.27).

$$\nabla^2 E(x,y,z) = \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon(x,y,z)E(x,y,z) \quad (1.26)$$

$$\nabla^2 \Psi(x,y,z) = -\frac{2m}{\hbar^2}(\mathsf{E} - V(x,y,z))\Psi(x,y,z) \quad (1.27)$$

Si ce potentiel V est périodique, seules des ondes de fréquences particulières peuvent exister dans le milieu : autrement dit, des bandes de fréquences sont interdites. De même, si le guide optique présente une permittivité ε périodique, certaines fréquences ω présentes à l'entrée du guide, ne pourront pas se propager dans cette gaine périodique : autrement dit, *certaines fréquences ne se propagent que dans le cœur*. Plus la périodicité Λ est grande, plus la bande de fréquences interdites dans la gaine est large, *rendant ainsi large bande le cœur creux de la fibre*. La géométrie de la gaine fixe ainsi le spectre de transmission du cœur. On parle d'un guidage par effet de bande interdite photonique (Photonic BandGap, PBG).

Même si ces fibres proposent de très vastes potentiels d'applications, principalement en télécommunications, on leur préfère les fibres à cœur de silice pour la génération de SC.

2. **les fibres à cœur plein** (types a-, b-,c -,d-)), dans lesquelles l'indice du cœur est très supérieur à l'indice de la gaine (cf. figure 1.11). La lumière est guidée comme dans une fibre standard, par effet de réflexion totale interne, que l'on dit ici "modifiée" car l'indice de gaine dépend fortement de la longueur d'onde [25].

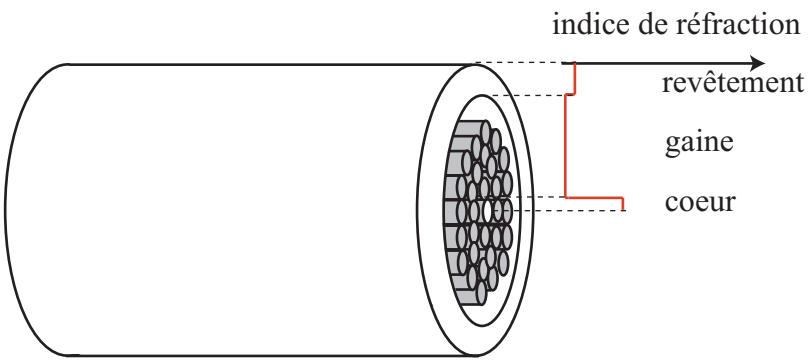


FIG. 1.11 – *Profil d'indice d'une fibre microsctructurée à coeur plein.*

A une longueur d'onde λ_0 donnée, une fibre MF est équivalente à une fibre à saut d'indice. Le cœur a pour indice celui de la silice et la gaine un indice intermédiaire $n_{eff,gaine}$ entre celui de l'air et celui de la silice et relatif à la proportion des deux milieux dans la gaine. Le vecteur d'onde effectif β de propagation selon l'axe de la fibre doit vérifier la condition

suivante, issue de l'expression classique de réflexion totale de Descartes :

$$\frac{2\pi}{\lambda_0} n_{eff,gaine} < \beta < \frac{2\pi}{\lambda_0} n_{coeur} \tag{1.28}$$

D'un point de vue ondulatoire, cette condition revient à dire que les ondes se propageant selon l'axe de la fibre doivent être en interférences constructives (Fig.1.12) : après un aller-retour entre l'interface inférieure et supérieure cœur-gaine, les ondes ont subi un déphasage de 2π (à 2π près).

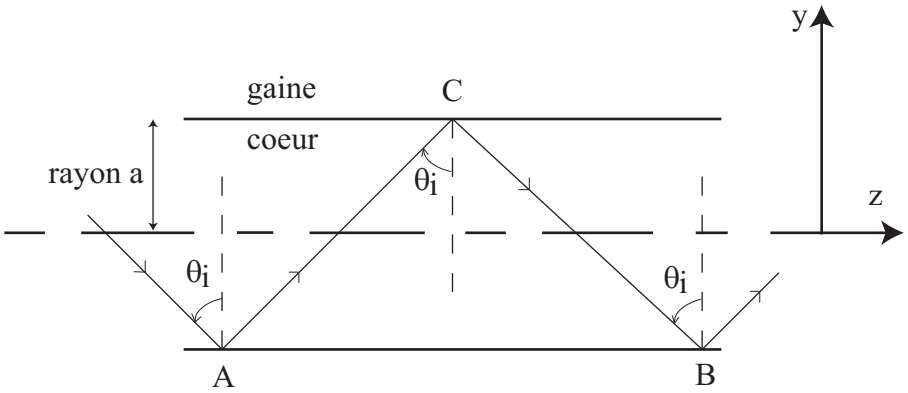


FIG. 1.12 – *Propagation d'une onde par réflexion totale interne dans le cœur d'une fibre*

Ce déphasage s'écrit :

$$\Delta\varphi_{AB} = 2\Delta\varphi_{AC} = -\frac{4\pi}{\lambda_y}(2a) + 2\varphi_{RT} = -2m\pi \tag{1.29}$$

où φ_{RT} est le déphasage introduit par la réflexion sur l'interface cœur-gaine, et λ_y est la longueur d'onde effective de la partie transverse de l'onde.

$$\lambda_y = \frac{\lambda_0}{n_{coeur} cos(\theta_i)} \tag{1.30}$$

Comme la valeur de θ_i dépend du mode considéré, on note θ_m l'angle d'incidence du mode m. Le nombre de modes M maximum que peut tolérer une fibre est déterminé en cherchant l'entier m tel que $\theta_m > \theta_C$, avec θ_C l'angle d'incidence critique permettant une réflexion totale. Alors :

$$cos(\theta_m) \leq cos(\theta_C) \tag{1.31}$$

$\Longleftrightarrow$

$$\frac{\lambda_0}{2\pi(2a)n_{coeur}}(m\pi + \varphi_{RT}) \leq \sqrt{1 - sin^2\theta_C} \tag{1.32}$$

$\Longleftrightarrow$

$$m \leq \frac{2(2a)n_{coeur}}{\lambda_0}\sqrt{1-(\frac{n_{effgaine}}{n_{coeur}}^2)} - \frac{\varphi_{RT}}{\pi} \tag{1.33}$$

En introduisant $\mathbf{V}_{eff}$ la fréquence spatiale normalisée du guide :

$$\mathbf{V}_{eff} = \frac{2\pi n_{coeur}}{\lambda_0} \quad a\sqrt{n_{coeur}^2 - n_{effgaine}^2} \tag{1.34}$$

le nombre maximum de modes se propageant est (en prenant $\varphi_{RT} \simeq 0$) :

$$M = \frac{2\mathbf{V}_{eff}}{\pi} \tag{1.35}$$

Le nombre de modes propagatifs dépend ainsi de la fréquence normalisée $\mathbf{V}_{eff}$. Pour une fibre à saut d'indice, la fréquence de coupure du second mode est $V_{co} = 2.405$: tant que $\mathbf{V}_{eff} < V_{co}$, la fibre est monomode. Cette même fréquence de coupure a été évaluée à environ 4,1 pour des fibres MF ayant un rapport $\frac{d}{\Lambda}$ inférieur à 0,4 [26].

Les courbes de la figure (1.13) représentent l'évolution de la fréquence de coupure $\mathbf{V}_{eff}$ d'une fibre MF en fonction de $\frac{\Lambda}{\lambda}$ pour différents profils de fibre (variation des paramètres d et Λ). Le rayon de cœur choisi est égal à Λ.

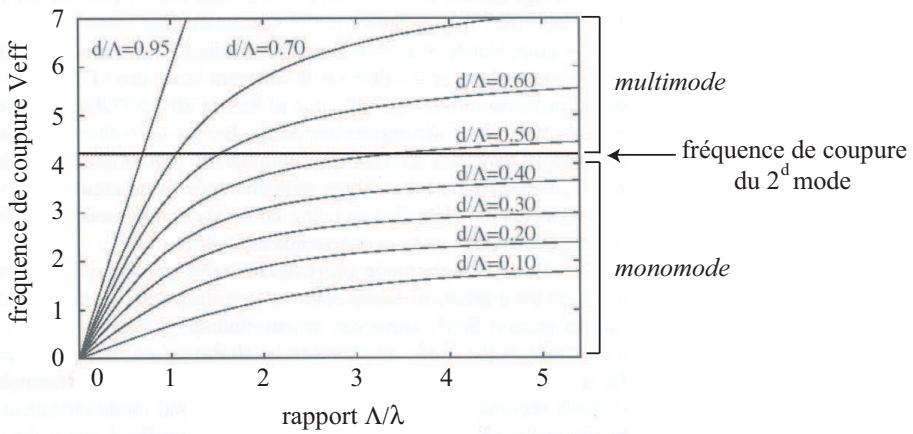


FIG. 1.13 – *Fréquence normalisée effective en fonction de la longueur d'onde, pour différentes géométries de fibres MF [27]*

Ces courbes montrent qu'il est possible d'obtenir une fibre microstructurée dont la fréquence normalisée $\mathbf{V}_{eff}$ est inférieure à la fréquence de coupure du second mode quelle que soit la longueur d'onde, en choisissant $\frac{d}{\Lambda}$ suffisamment petit. La fibre est alors *monomode quelle que soit la longueur d'onde de travail*.

De plus, on peut noter que, lorsque le rapport $\frac{\Lambda}{\lambda}$ est constant, la fréquence normalisée de la fibre dépend uniquement du rapport $\frac{d}{\Lambda}$. On en déduit qu'en augmentant Λ (ce qui revient à augmenter la taille du cœur) à $\frac{d}{\Lambda}$ constant, la structure conserve son caractère monomode large bande. Les fibres MF rendent possible la fabrication d'un guide monomode large bande possédant un cœur de très grande dimension.

Par la suite, nous ne nous intéresserons qu'aux fibres MF à cœur plein.

1.2.3 Propriétés optiques particulières

Comme nous venons de le voir, les fibres MF présentent dans leur réalisation, des degrés de liberté relatifs à la taille des trous, et à la périodicité de ceux-ci autour d'un cœur de taille variable. L'intérêt majeur de ces fibres par rapport aux fibres standards est alors d'offrir *la possibilité de façonner les propriétés de guidage*.

1.2.3.1 Courbe de dispersion

La courbe de dispersion des fibres optiques est logiquement fixée par le matériau, dopé ou non dopé, servant de support, du rayon du cœur de la fibre, et de la différence d'indice cœur-gaine [5].On définit la dispersion chromatique D grâce au terme β_2 introduit ci-dessous. Soit $\beta(\omega)$ le vecteur d'onde effectif de propagation. Il admet un développement de Taylor autour de la pulsation ω_0 :

$$\beta(\omega) = \beta(\omega_0) + \beta_1(\omega_0)(\omega - \omega_0) + \beta_2(\omega_0)\frac{(\omega - \omega_0)^2}{2!} + \beta_3(\omega_0)\frac{(\omega - \omega_0)^3}{3!} + \cdots \tag{1.36}$$

avec

$$\beta_k = \left.\frac{\partial^k \beta}{\partial \omega^k}\right|_{\omega_0} \tag{1.37}$$

Les vitesses de phase et de groupe sont respectivement :

$$v_p = \frac{\omega}{\beta(\omega)} \qquad v_g = \frac{1}{\beta_1} \tag{1.38}$$

Le paramètre de dispersion utilisé dans la suite est :

$$D = -\frac{2\pi c}{\lambda^2}\beta_2 \quad (ps.km^{-1}.nm^{-1}) \tag{1.39}$$

La connaissance de la longueur d'onde annulant la dispersion (λ_{ZDW}) est cruciale en télécommunications puisqu'elle permet de transmettre des signaux au voisinage de λ_{ZDW} avec un minimum de distorsion spectrale et temporelle ; elle l'est également pour la recherche de génération de SC (cf.§1.1.2.2).

Les relations entre la dispersion et les paramètres du guide d'ondes ont déjà été exploitées sur des fibres non microstructurées pour décaler le zéro de dispersion au voisinage de $1,55\ \mu m$, où les pertes par absorption de la silice sont minimales (fibre DSF : Dispersion-Shifted-Fiber). Il est également possible de rendre la courbe de dispersion relativement plate sur une grande gamme de longueurs d'onde en insérant de multiples empilements de gaines autour du cœur.
L'influence de la géométrie du guide sur ses propriétés est rendue extrêmement sensible dans le cas de fibres MF. Les multiples configurations de placement des capillaires permettent décaler de façon très fine λ_{ZDW} à des valeurs plus faibles que la longueur d'onde ZDW intrinsèque de la silice ($\lambda_{ZDW_{silice}} = 1,3\ \mu m$)[28]. La figure (1.14) suivante nous montre le décalage du zéro de dispersion obtenu pour différents couples de paramètres d et Λ.

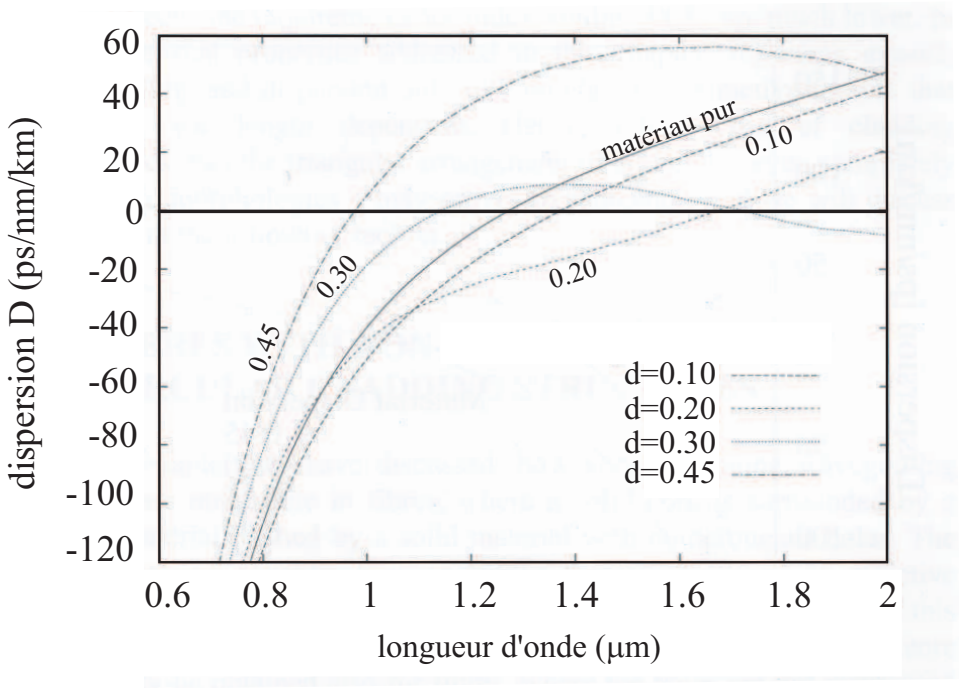


FIG. 1.14 – *Courbes de dispersion de fibres MF pour* Λ=$2,3\ \mu m$ *et différents diamètres de trous d (en* μm*) [27]*

Les plus faibles ZDW pouvant atteindre 550 nm, la génération de continuum peut donc être amorcée dans ces fibres par des lasers émettant dans la domaine du visible.

1.2.3.2 Exaltation des effets non linéaires

L'autre paramètre de fibre particulièrement modifiable dans une fibre MF est le diamètre de cœur, et par conséquent l'aire effective A_{eff} des modes propagatifs, *i.e.* la dimension de

leur distribution spatiale. Dans les fibres standards, les diamètres de cœur sont de l'ordre de 6 à $50\ \mu m$ selon leur caractère mono- ou multimode. Dans le cas des MF, cette dimension peut atteindre $1,5\ \mu m$. Ceci a une incidence directe [29] sur l'exaltation du coefficient non linéaire de la fibre, puisqu'il est inversement proportionnel à A_{eff} :

$$\gamma = \frac{2\pi n_2}{\lambda A_{eff}} \quad (m^{-1}W^{-1}) \tag{1.40}$$

où

- $A_{eff} \simeq \pi a^2$, avec a le rayon du cœur de la fibre
- n_2 est l'indice de réfraction non linéaire défini au paragraphe 1.1

Les ordres de grandeurs de ces coefficients nous donnent : $\gamma_{MF} > 30\ \gamma_{standard}$ [27].Les fibres MF à petit cœur sont par conséquent très fortement non linéaires, et forment un extraordinaire support pour l'exploitation de ces effets.
L'association de ces deux opportunités - dispersion adaptée et γ_{MF} élevé - a effectivement fourni le point de départ pour la création des continua de plus de 1000 nm d'étendue spectrale, générés dans des fibres MF pompées en régime femtoseconde autour de $770\ nm$ [30, 31]. Abordons maintenant les étapes menant à l'émergence de ces continua de fréquences.

1.3 Génération de continuum dans les fibres microstructurées

1.3.1 Différents régimes temporels de pompage

Pratiquement tous les régimes temporels de pompage ont été étudiés : régime continu [32], nanoseconde [33], picoseconde [34], et jusqu'au régime femtoseconde [30]. Ce dernier cas sera traité séparément, en y apportant plus de détails, puisque nous utiliserons ce régime dans la suite de ce travail.
En continu ou avec des impulsions longues (>20 ps), l'élargissement spectral est principalement décrit par un jeu d'effets Raman et d'effets paramétriques (FWM). La génération d'un spectre visible de 350 nm de large en régime nanoseconde [7] à l'aide de $1,80\ m$ de fibre MF a été explicitement décrite par J.M. Dudley et al.(2002) [33]. La mesure des spectres en sortie de fibre en fonction de la puissance incidente a conduit à la détermination de la chronologie de l'enchaînement des effets non linéaires existants.

[7] microchip laser, $\lambda = 532\ nm$, $\tau = 0,8\ ns$, taux de répétition 6,7 kHz

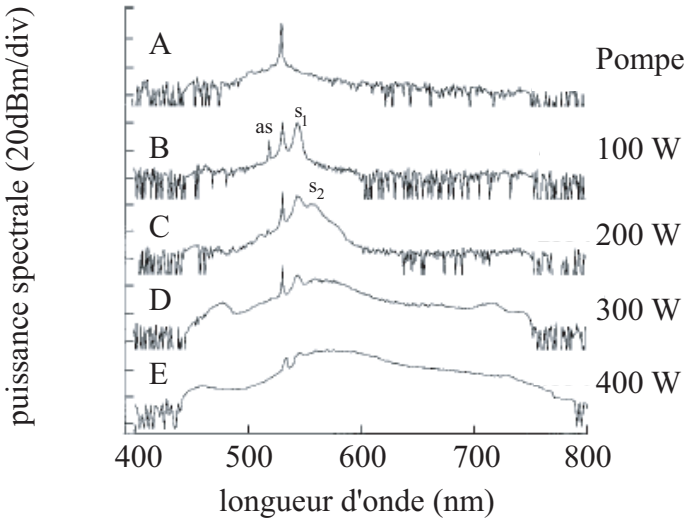


FIG. 1.15 – *Enregistrements en régime nanoseconde des spectres des continua obtenus en augmentant la puissance crête injectée [33]*

La figure (1.15) résulte de la mesure de l'effet de l'augmentation de la puissance crête de l'impulsion pompe sur l'élargissement spectral. Elle permet d'identifier les différentes étapes conduisant à l'obtention d'un continuum de lumière.

1. Étape A : à faible puissance, l'impulsion initiale se propage quasiment sans déformation, le spectre révèle uniquement le pic de pompe à 532 nm,
2. Étape B : avec une puissance crête de pompe de $100\ W$, l'effet de la diffusion Raman stimulée est significative ; on voit apparaître les pics spectraux Stokes (S_1) et Anti Stokes (as), respectivement à 545 et $520\ nm$.
3. Étape C : en doublant la puissance, le processus paramétrique de mélange à quatre ondes (FWM) entre en jeu et provoque un élargissement spectral au niveau du pic Stokes ; ces nouvelles composantes constituent des pompes secondaires pour générer un second ordre Stokes centré à $558\ nm$ (S_2).
4. Étape D et E : quand la puissance crête de l'impulsion initiale atteint $300\ W$, l'énergie contenue dans ces pics (ou bandes) est telle que la plupart des composantes spectrales existantes sont des pompes secondaires, tertiaires, etc ... et créent ainsi de multiples pics discrets (cascade Raman). Ces pics sont élargis et lissés par mélange à quatre ondes : il y génération abrupte du continuum.

Pour mieux comprendre comment le mélange à quatre ondes peut lisser le spectre discret généré par la cascade Raman, il faut souligner le fait que la génération de nouvelles longueurs d'onde par

FWM est gouvernée par une condition d'accord de phase traduisant la conservation de l'énergie et des vecteurs d'onde des photons interagissant : à chaque longueur d'onde *pompe* sont reliées deux longueurs d'onde résultantes, déterminées par la courbe d'accord de phase (fig.1.16 a)) et une efficacité reliée à la valeur du gain paramétrique (fig.1.16 b)).

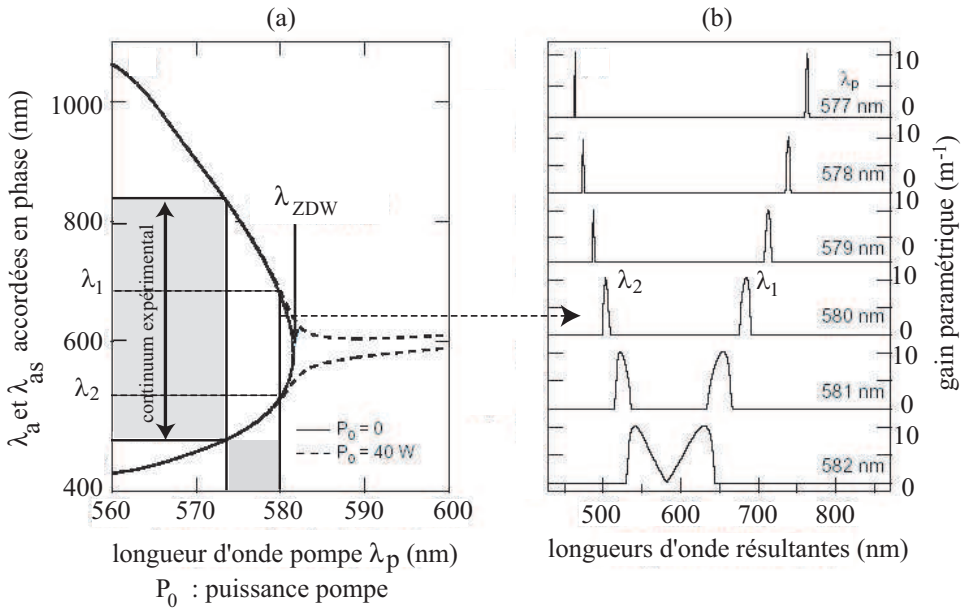


FIG. 1.16 – *(a) Courbes d'accord de phase pour FWM, (b) Gain paramétrique calculé pour différentes longueurs d'onde de pompe [33]*

Par exemple, la courbe 1.16.a) révèle un accord de phase entre des pics spectraux à $\lambda_1 = 500\ nm$, $\lambda_2 = 690\ nm$, et une onde pompe à $580\ nm$. La courbe 1.16.b) révèle que le gain paramétrique correspondant reste très élevé sur une dizaine de nanomètres au voisinage de ces pics. Un pic spectral pompe créé ainsi deux bandes spectrales "Stokes" et "anti-Stokes". Dès lors, on en déduit que les ondes générées entre 575 et $580\ nm$ grâce à la cascade Raman sont des pompes efficaces pour générer, de la même manière, de nouvelles bandes spectrales entre 450 et $800\ nm$. Ce processus permet de combler les lacunes spectrales laissées par la cascade Raman, y compris au voisinage du zéro de dispersion, puisque même pour une puissance de pompe relativement faible, la courbe d'accord de phase l'autorise.
Même si ce pompage en régime nanoseconde est extrêmement avantageux, en raison du faible coût du laser, de son faible encombrement, ou encore de sa consommation électrique réduite, il ne permet pas d'atteindre des puissances crêtes suffisantes pour générer une haute puissance spectrale : actuellement les puissances spectrales moyennes sont de -20 à -10 dBm/nm, soit 10 à $100\ \mu W/nm$. Suivant les applications, une sélection spectrale est nécessaire, et la perte d'énergie

due aux optiques de sélection peut alors réduire de manière fatale la puissance disponible. De hautes puissances spectrales sont atteintes en augmentant la puissance moyenne du laser ou en réduisant la durée des impulsions, et c'est là l'objectif d'un pompage en régime femtoseconde : générer un SC de plus haute densité spectrale.

1.3.2 Régime femtoseconde

Nous nous plaçons dans le cas d'un pompage d'une fibre MF dans son régime de dispersion anormale ($\lambda_p > \lambda_{ZDW}$, $\beta_2 < 0$, $D > 0$). De nombreuses simulations de ce cas de figure [35, 36, 37, 38, 39] et expérimentations [33, 40, 41, 42] ont permis d'aboutir à une meilleure compréhension des phénomènes sous-jacents.
Une description physique complète des processus de génération du SC doit être capable d'expliquer toutes ses caractéristiques. Mais il est clair qu'une approche "linéaire", intuitive de dynamiques aussi complexes n'est pas immédiate. On se limitera donc ici à l'architecture essentielle. Dans le cas d'un pompage en régime de dispersion normale, et quelque soit le domaine temporel utilisé, les effets de génération sont dus à de la diffusion Raman, et à du mélange à quatre ondes. Dans notre cas d'étude en régime de dispersion anormale, les effets sont au contraire principalement dus à une dynamique de propagation de solitons (fig.1.17). Pourquoi ? Cela tient à la définition même du soliton : ce type d'onde se propage sans déformation de son profil spatial et/ou temporel, et ne peut exister que lorsque des conditions particulières sont réunies.

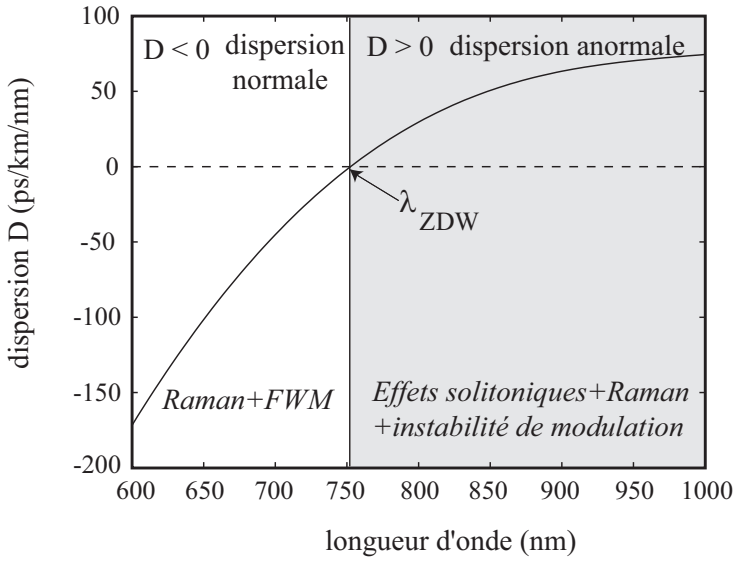


FIG. 1.17 – *Courbe de dispersion d'une fibre MF : mise en évidence des deux régimes de dispersion ($D = -2\pi c\beta_2/\lambda^2$).*

Toute impulsion dans un **milieu linéaire** a une tendance naturelle à s'élargir durant sa propagation dans un milieu. En optique, une onde localisée dans l'espace ou dans le temps peut subir un étalement, soit de son enveloppe temporelle soit de ses dimensions spatiales et/ou des deux simultanément.

- Pour une impulsion temporelle, l'étalement est dû à la dispersion chromatique (β_2) : les différentes composantes fréquentielles qui constituent l'impulsion, voyagent à des vitesses différentes, d'où un étalement chromatique : les basses fréquences se propagent plus vite que les hautes fréquences en dispersion normale ($\beta_2 > 0$), et inversement en dispersion anormale ($\beta_2 < 0$).
- Une impulsion spatiale, ou plus simplement un faisceau, subira un étalement sous l'influence naturelle de la diffraction (cas a. de la figure 1.18).

Dans un **milieu non linéaire** de type Kerr (possédant une susceptibilité $\chi^{(3)}$ importante), on relève de tout autres effets (cf.§1.1.1.2.2) :

- Temporellement, un milieu Kerr peut agir de manière strictement opposée au milieu linéaire précédent : les composantes spectrales de l'impulsion voyagent encore à des vitesses différentes, comme cela a été développé lors de l'introduction de l'effet Kerr (équation 1.23).
- Spatialement, un effet Kerr a le rôle d'une lentille : il s'agit d'autofocalisation du faisceau, strictement opposable à la diffraction (cas b.).

Un soliton optique [5] est tout simplement un état d'équilibre existant entre un effet d'étalement et un effet de compression (cas c.). Il pourra apparaître si la diffraction naturelle et l'étalement temporel sont exactement compensés par l'effet Kerr.

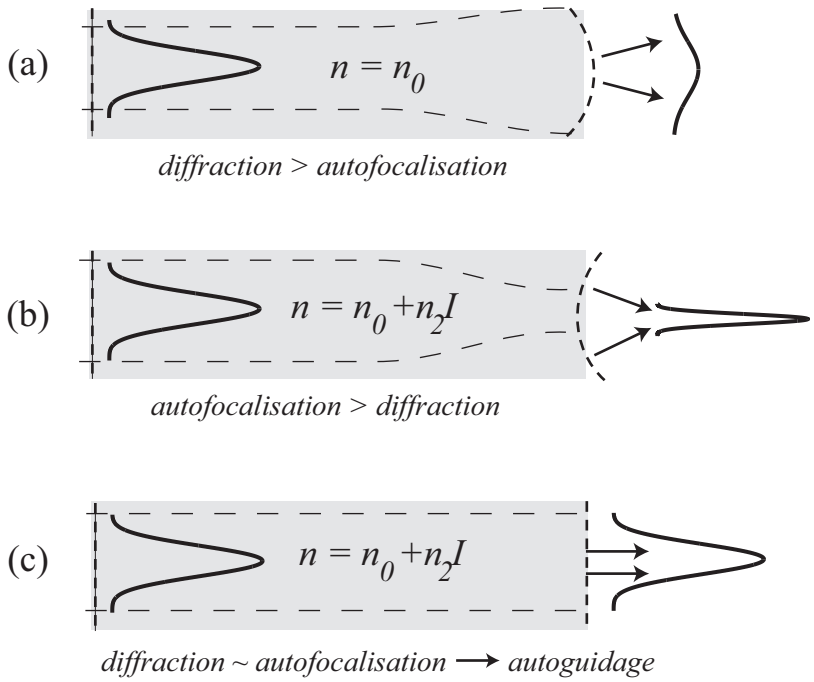


FIG. 1.18 – *Apparition d'un effet soliton spatial : a) à faible intensité, la diffraction domine b) à très forte intensité, l'autofocalisation domine c) équilibre entre diffraction et autofocalisation.*

Abordons la génération du SC proprement dite. Les phénomènes permettant de passer d'un pulse initial ($\tau \sim 100 fs$, $\Delta\lambda \sim 10\ nm$) à un SC sont nombreux, mais l'étude des spectres suivants donnent une première vue d'ensemble. Sur la figure (1.19) sont tracés les spectres calculés des impulsions du SC pour différentes distances de propagation dans une fibre de longueur totale $15\ cm$, ainsi que leurs traces temporelles associées. Ces simulations ont été validées expérimentalement [43, 44].

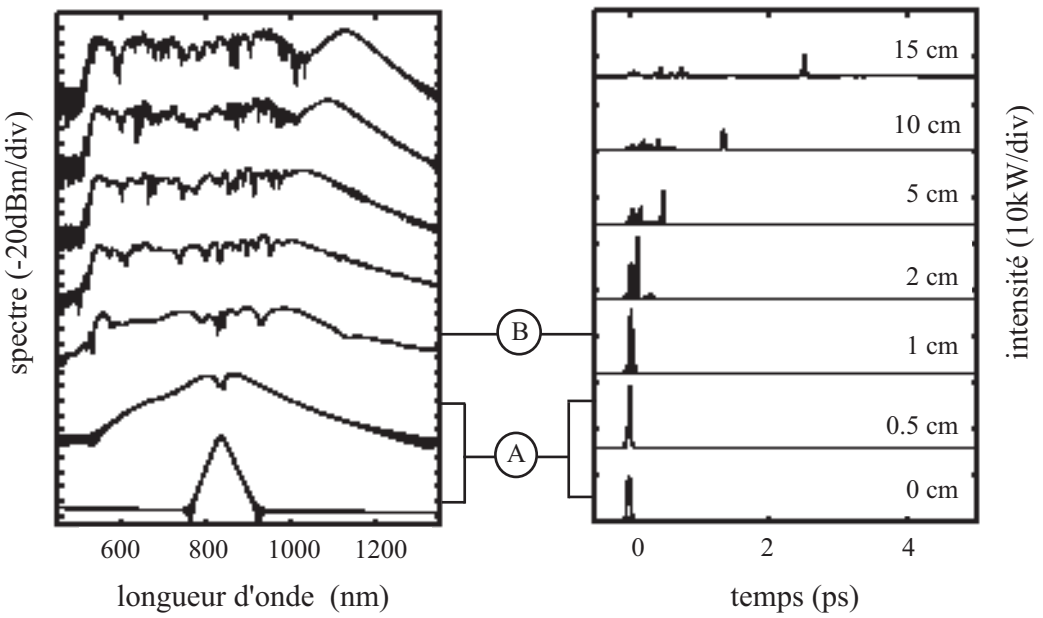


FIG. 1.19 – *Évolutions spectrale et temporelle calculées en fonction de la distance de propagation [45]*

L'étape initiale du premier cm de propagation (zone A) montre un élargissement spectral relativement symétrique, et une très forte compression temporelle. Puis, dès le centimètre suivant (zone B), le spectre devient asymétrique avec l'émergence de pics spectraux distincts, de part et d'autre de la longueur d'onde de pompe. Ceux-ci sont associés au développement de pics temporels.

À partir d'un pulse initial considéré comme un soliton d'ordre supérieur N, la génération peut se décomposer en 4 étapes.

1. Période initiale d'élargissement spectral et de compression temporelle
2. Fission du soliton en N solitons fondamentaux de fréquences et durées différentes, éjectés un à un au cours de la propagation,
3. Chaque soliton se voit subir un décalage fréquentiel vers le "Rouge", sous l'effet du processus de Soliton Self Frequency Shift. L'amplitude du décalage est d'autant plus important que le soliton est court.
4. La dispersion de haut ordre (termes β_3, β_4, ...) stimule les échanges d'énergie résonants entre un soliton et une Onde Dispersive, non solitonique, dont le spectre se situe dans la zone de régime normal (décalage vers le "Bleu").

Détaillons plus précisément chaque étape :

1re **étape : élargissement spectral et compression temporelle** Cette propagation correspond à une évolution "normale" du soliton initial. En effet, dans un régime de dispersion anormale, un pulse initial de puissance crête P_0 suffisante, et de durée T_0 avec $T_{FWHM} = 1,665\, T_0$, se décrit comme étant un soliton d'ordre N, où N est un nombre caractéristique du pulse et des paramètres de la fibre.

$$N = \sqrt{\frac{L_D}{L_{NL}}} \tag{1.41}$$

avec ,

$$L_D = \frac{T_0^2}{|\beta_2|} \qquad et \qquad L_{NL} = \frac{1}{\gamma P_0} \tag{1.42}$$

les longueurs caractéristiques de dispersion et de non linéarité. La puissance nécessaire pour faire apparaître un soliton d'ordre N est N^2 fois celle qu'il faut pour un soliton fondamental $P_1 = \frac{|\beta_2|}{\gamma T_0^2}$. Un soliton d'ordre N a les même propriétés qu'un soliton fondamental, à ceci près qu'il possède une évolution propagative périodique de période spatiale $z_0 = \frac{\pi}{2} L_D$. La figure (1.20) représente le profil spatial et temporel d'un soliton d'ordre 3 lors de sa propagation.

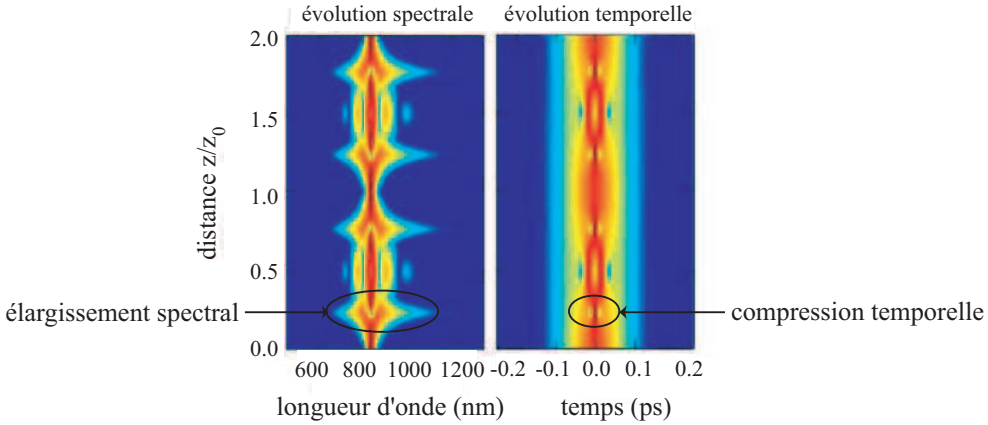


FIG. 1.20 – *Évolutions spectrale et temporelle d'un soliton d'ordre N=3 [46]*

Lorsqu'il se propage dans la fibre, le soliton se contracte temporellement, subit un ensemble de "contractions et respirations", et retrouve sa forme initiale à $z = z_0$. Pour un soliton d'ordre N, la première compression temporelle a lieu à $z_{comp} = L_D \frac{0.32}{N} + \frac{1.1}{N^2}$ (loi empirique [5])[8]

[8]Dans notre cas d'étude, les ordres de grandeur à 800 nm sont les suivants : $\beta_2 = 9ps^2/km$, $T_0 = 60\ fs$, $P_0 \simeq 10\ kW$ ce qui conduit à $L_D = 40\ cm$, $L_{NL} = 0.8\ mm$, et $N = 21$. La puissance nécessaire pour faire apparaître respectivement un soliton fondamental est $P_1 = 26W$, soit pour un soliton d'ordre 21 : $N^2 P_1 = 11,6kW$.

2^d **étape : Fission solitonique** Sous l'effet de perturbations, ce soliton supérieur se brise en ses N constituants solitoniques fondamentaux, d'amplitude plus faible. L'origine des perturbations diffèrent selon la durée du pulse initial : il s'agit soit d'instabilité de modulation, soit de diffusion Raman, ou de dispersion de haut ordre ... Notre étude se place dans le cadre de pulses relativement longs ($T_0 \simeq 100 fs$) [9] : leurs périodes spatiales de compression/élargissement sont donc "grandes" : ils se propagent donc suffisamment longtemps pour subir des instabilités de modulation dues à de l'amplification de bruit par gain Raman avant de se fissionner. Les solitons, produits de cette fission, présentent alors d'importantes fluctuations d'amplitude. Les processus physiques en aval étant tous dépendants de l'amplitudes des solitons fondamentaux, un "jitter" en amplitude, en fréquence et en temps apparaît. Les impulsions du continuum sont donc complètement incohérentes : on parle de brisure induite par Instabilité de Modulation [38, 47].

3e **étape : Soliton Self Frequency Shift** Les N solitons sont éjectés un par un, selon leur puissance crête et leur durée, et subissent alors un décalage spectral. Un modèle simple [20] montre que le décalage fréquentiel $\Delta\nu_k$ que subit un soliton de largeur T_k après une distance z de propagation dans la fibre MF est inversement proportionnel à T_k^4 :

$$\Delta\nu_k \propto -\frac{\lambda^2 D(\lambda) q(T_k) z}{T_k^4} \tag{1.43}$$

où $D(\lambda)$ est la dispersion, et $q(T_k)$ représente le recouvrement entre le spectre du soliton et le spectre de gain Raman. Comme les N solitons ont des amplitudes et des largeurs différentes [48], les fréquences centrales des solitons subissent un décalage spectral propre, mais toujours dirigé vers les basses fréquences. Ceci correspond à l'émergence des pics spectraux distincts observés du côté $\lambda > \lambda_{pompe}$ au bout de quelques centimètres de propagation.

4e **étape** La création de ces nouvelles composantes spectrales, conservant leur caractère solitonique, n'explique pas la formation du SC dans la zone $\lambda < \lambda_{pompe}$. Il s'avère que ces solitons subissent des effets dispersifs de hauts ordres qui tendent à affecter leurs propriétés spectrales et temporelles, sous forme d'un transfert d'énergie dans la zone de dispersion normale, par création d'une onde dite *dispersive* apparaissant à $\lambda < \lambda_{pompe}$. De même

L'impulsion initiale possède une puissance crête P_0 similaire à $N^2 P_1$: l'impulsion initiale peut donc être considérée comme un soliton d'ordre $N = 21$. De plus, comme $z_D = 64\ cm$, la première compression marquant le début de la génération du continuum a donc lieu au bout de 7 mm de propagation dans la fibre.

[9] Avec un tel T_0, le soliton initial est d'ordre très élevé, il est extrêmement sensible aux perturbations incohérentes extérieures. D'après [38], la cohérence d'un continuum peut être conservée en évitant la fission des solitons, c'est-à-dire, soit en pompant dans le régime de dispersion normale, soit en utilisant des pulses de pompage très courts ($\approx 50\ fs$).

que précédemment, chaque soliton ayant une fréquence centrale différente, l'accord de phase avec une onde dispersive entraîne la génération d'intervalles de fréquences pouvant s'étendre jusqu'à l'UV [37].

Cette description de la génération du continuum en différentes étapes provient de simulations numériques basées sur l'équation de Schrödinger non linéaire [43] décrivant la propagation de l'impulsion initiale dans le milieu non linéaire considéré.
Dès l'obtention de ce type de source, et avant même que sa génération soit expliquée, le continuum de lumière a été appliqué comme peigne de fréquences [49], et pour mesurer des fréquences de processus optiques ultra-courts.

Dans les paragraphes précédents, nous avons vu qu'il existe finalement de nombreuses façons de générer un continuum grâce aux choix très vastes du régime temporel de pompage, de la structure de la fibre, de la longueur d'onde de pompage... La suite de ce chapitre consistera donc en une présentation de nos choix pour la génération du continuum utilisé, et de sa caractérisation en terme de spectre de puissance, fluctuations de puissance pulse à pulse, et durée des impulsions.

1.4 Caractérisation du continuum choisi

1.4.1 Quel régime temporel ? Quelle fibre ?

On souhaite disposer d'une source optique couvrant l'ensemble du spectre visible et infrarouge, suffisamment puissante pour pouvoir travailler efficacement avec une raie fine de longueurs d'onde issue de ce spectre, et pour pallier les pertes inhérentes à tout montage optique. Les domaines visible et infra-rouge seront respectivement nécessaires pour l'excitation des marqueurs en microscopie de fluorescence (chapitres 2 et 3), et pour des applications de spectroscopie pour la physiologie des milieux diffusants (chapitre 4).
La demande d'une haute puissance spectrale disponible a, en pratique, entraîné le choix du régime temporel de pompage : celle-ci sera d'autant plus élevée que la puissance crête de pompage l'est. Les lasers picosecondes dont nous disposons fournissent une puissance moyenne d'environ $20\ mW$ pour une puissance crête de $7\ kW$; tandis qu'un laser femtoseconde délivre jusqu'à $1\ W$ de puissance moyenne et $100\ kW$ de puissance crête. Le choix du régime de pompage se tourne donc vers des impulsions femtosecondes.
La longueur d'onde de pompage de la fibre est contrainte par le spectre d'émission du laser, accordable entre 750 et $850\ nm$. Pour générer efficacement un continuum de lumière, le régime de dispersion anormale de la fibre microstructurée utilisée devra donc couvrir au moins partielle-

ment cette zone spectrale. On choisit une fibre dont la longueur d'onde de zéro de dispersion est de $780\ nm$.
Le montage choisi est ainsi le suivant :

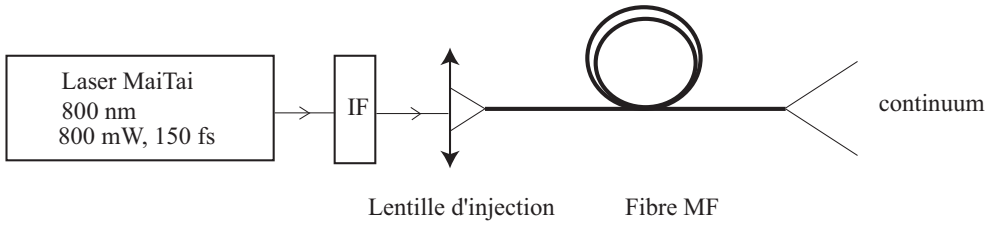


FIG. 1.21 – *Schéma du montage de la génération du continuum utilisé*

Les éléments du montages ont les caractéristiques suivantes : Le laser de pompage femtoseconde délivre des impulsions inférieures à $100\ fs$, de puissance moyenne $0,8\ W$, de puissance crête $125\ kW$, avec une fréquence de répétition de $80\ MHz$. Un isolateur de Faraday (IF) est placé entre le laser et le premier élément optique, afin d'éviter que les réflexions du faisceau sur les dioptres ne retournent dans la cavité laser. L'injection est assurée par une lentille asphérique de focale $2\ mm$ et d'ouverture numérique 0,5. Son choix sera justifié au paragraphe 1.4.3. La fibre microstructurée non linéaire est à maintien de polarisation (type NL.PM.750 Crystal Fiber), ses caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant :

Matériau	silice pure
Longueur	$1\ m$
Diamètre de cœur	$1,8\ \mu m$
Diamètre de gaine	$120\ \mu m$
Géométrie	hexagonale
Ouverture numérique	0,38
Zéro de dispersion	$780\ nm$
Coefficient non linéaire	$95\ W^{-1}km^{-1}$

C'est l'une des fibres les plus usitées pour un pompage au voisinage de $800\ nm$. Elle possède en effet un cœur extrêmement réduit (l'aire effective est d'environ $2\ \mu m^2$), un très fort coefficient non linéaire, et une biréfringence suffisamment élevée ($> 3.10^{-4}$) pour maintenir la polarisation des ondes à l'intérieur de la fibre. L'ensemble des longueurs d'onde générées par effets non linéaires est polarisé suivant l'axe lent de la fibre. Nous aborderons l'importance de cette polarisation à la fin de cette section. Avec ce montage, nous obtenons un continuum de lumière dont le spectre s'étend du proche visible à l'infra-rouge. La photographie ci-dessous est l'image du spectre de la source diffractée par un réseau.

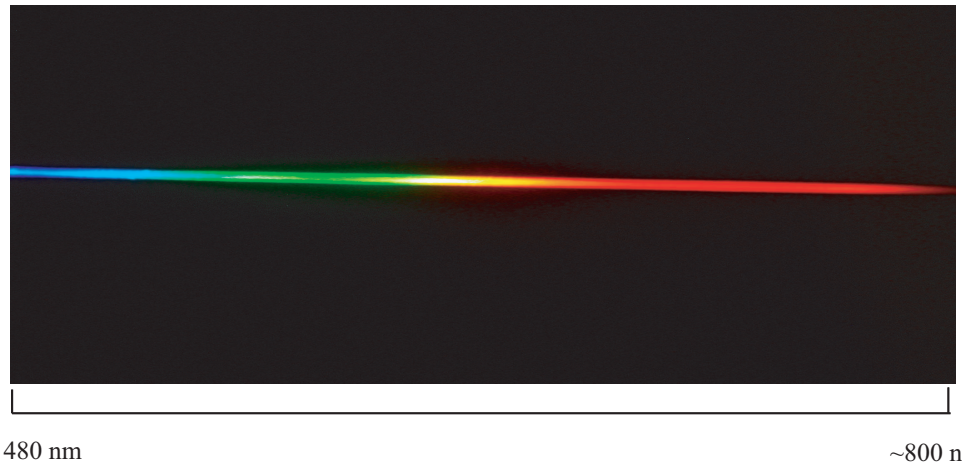


FIG. 1.22 – *Photographie du spectre du continuum de lumière, obtenue par diffraction sur un réseau de 600 traits/mm*

En plaçant à la sortie de la fibre MF des filtres de référence colorimétriques (Filtres Wratten R, G, B ; Kodak), on visualise en champ lointain la distribution modale du continuum pour différentes plages de fréquences (fig.1.23). On vérifie ainsi, conformément aux prévisions, que le continuum est monomode sur toute la gamme du visible [23].

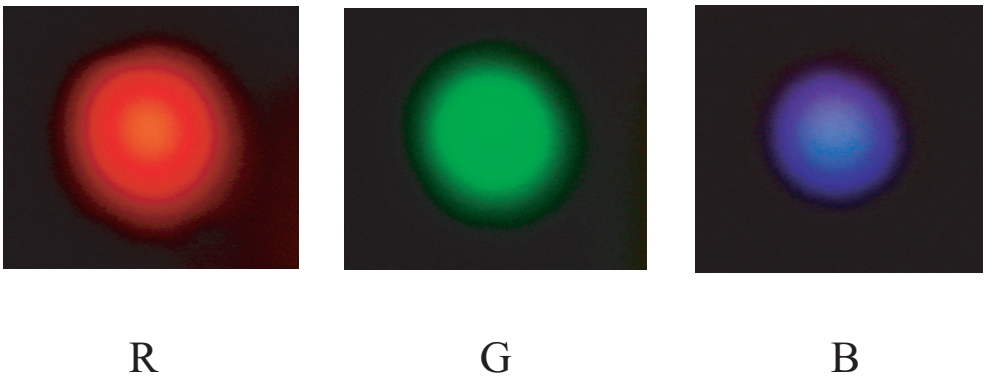


FIG. 1.23 – *Photographies en champ lointain de la distribution spatiale du continuum pour les trois bandes spectrales R, G, B*

Le continuum généré sera employé dans sa globalité, c'est-à-dire toutes longueurs d'onde confondues, pour des applications de spectroscopie, ou utilisé comme palette d'une multitude de sources pour la microscopie de fluorescence, en sélectionnant une tranche de longueurs d'onde $\Delta\lambda$ parmi le spectre disponible.

1.4.2 Sélection spectrale

Cette sélection peut consister en un ensemble de filtres optiques passe-bandes relativement larges ($\Delta\lambda \sim 100\,nm$) ou de filtres interférentiels dont la bande passante est de l'ordre de $10\,nm$. L'inconvénient des filtres, et particulièrement des filtres sélectifs, est leur faible rapport de transmission (T$\sim$ 10 à 40%). Leur emploi ne peut être envisagé que si la source polychromatique délivre une puissance spectrale très supérieure à la puissance utile. D'autre part, nous souhaiterions nous affranchir de la nécessité de disposer d'une multitude de filtres pour atteindre, au choix, n'importe quelle bande spectrale.
Dans ce cas, cette sélection peut s'effectuer par un élément dispersif (prisme, réseau ...), elle doit minimiser les pertes de puissance et permettre une configuration de travail relativement simple. En effet, puisqu'un prisme ou un réseau affecte à chaque longueur d'onde un angle de réfraction ou diffraction différent, une compensation angulaire doit être introduite pour que l'orientation du montage en aval de la sélection n'ait pas à être modifiée lorsque l'on change la longueur d'onde.[10].
Nous nous proposons ici d'utiliser un filtre acousto-optique (AOTF), accordable en longueur d'onde sur la gamme du visible, de très bon rapport de transmission et travaillant dans une configuration angulaire fixée. Ce filtre, dont les propriétés de diffraction sont similaires à un réseau physique, permet ici de disperser une fine partie du spectre du faisceau incident dans un ordre de diffraction préférentiel, avec un excellent rendement. La sélection d'une bande spectrale précise parmi le continuum est schématisée sur la figure (1.24). Un trou de faible diamètre (ici $100\,\mu m$) est placé au point de focalisation d'une lentille interceptant l'un des deux ordres, afin d'épurer spectralement le faisceau diffracté. L'ensemble {AOTF+lentille +trou} forme un *monochromateur* dont les caractéristiques seront présentées au Chapitre 2. La sélection d'une bande spectrale $\lambda \pm \frac{\delta\lambda}{2}$ s'effectue ainsi par simple commande électronique d'une fréquence acoustique, avec une résolution comprise entre $1,8$ et $3\,nm$ sur la plage $[470; 750]\,nm$. L'avantage de ce système sur un réseau physique est la simplicité de la configuration de travail (pas de compensation angulaire, commande électronique), ainsi qu'un rendement de sélection plus élevé. De plus, il est possible de sélectionner plusieurs longueurs d'onde simultanément, par un multiplexage de fréquences acoustiques dans le cristal de l'AOTF.

[10] Dans les microscopes commerciaux, la sélection spectrale est assurée par des filtres optiques ou un réseau : des moteurs placés sur des miroirs ou sur les réseaux eux-mêmes effectuent alors la compensation angulaire

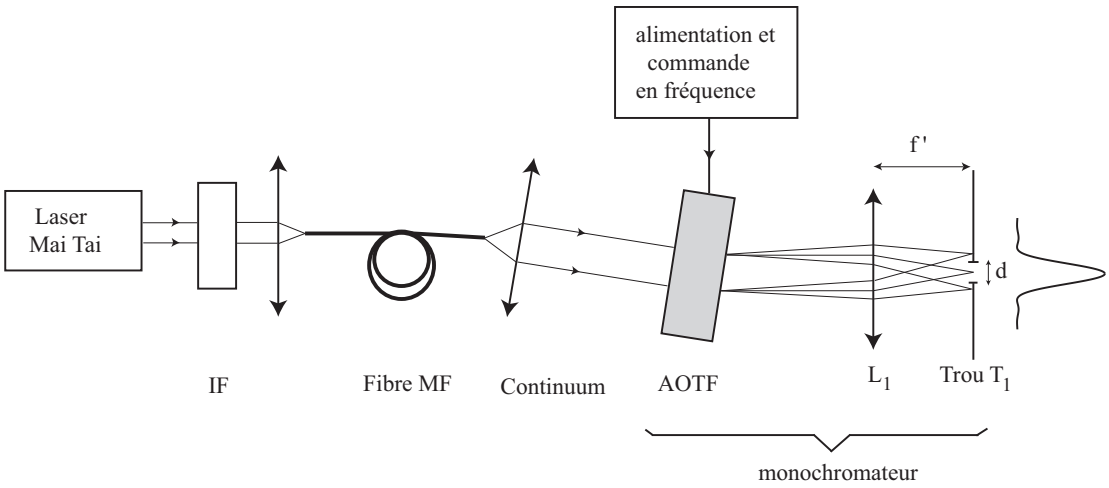


FIG. 1.24 – *Principe du monochromateur acousto-optique. Un seul ordre de diffraction est représenté. Après le trou, l'intensité détectée présente un profil en sinus cardinal.*

1.4.3 Spectre de puissance du continuum et fluctuations

Un premier spectre du continuum, relevé grâce à un Analyseur de Spectre Optique (OSA, Anritsu) à entrée fibrée, nous fournit le résultat suivant, représenté sur la figure (1.25) avec une résolution de 5 nm :

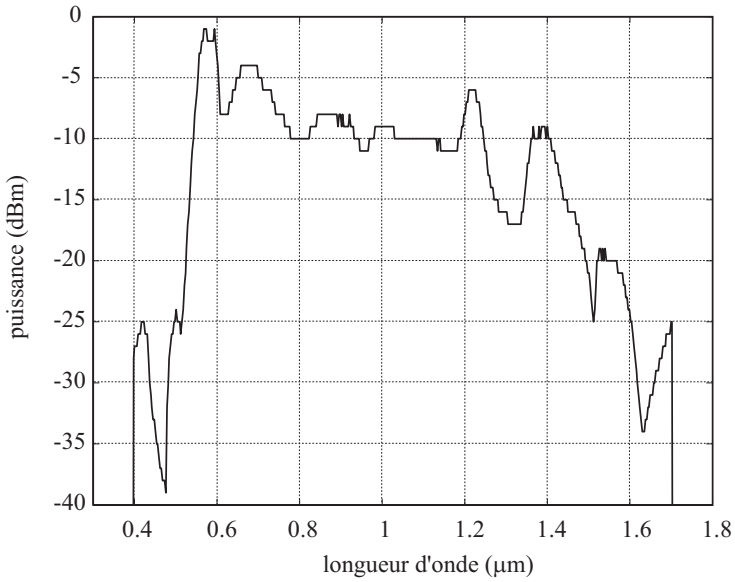


FIG. 1.25 – *Spectre du continuum relevé par OSA avec une résolution de 5 nm,* $\lambda_p = 800nm$.

La source optique obtenue répond à notre attente, puisqu'elle couvre quasiment l'ensemble

de la fenêtre spectrale de l'appareil, avec une gamme de longueurs d'onde allant de $400\ nm$ à $1700\ nm$.
Pour déterminer précisément la puissance spectrale disponible par tranche $\Delta\lambda$ de longueurs d'onde, l'emploi d'un puissance-mètre placé après le dispositif de sélection spectrale décrit précédemment, nous fournit la courbe suivante :

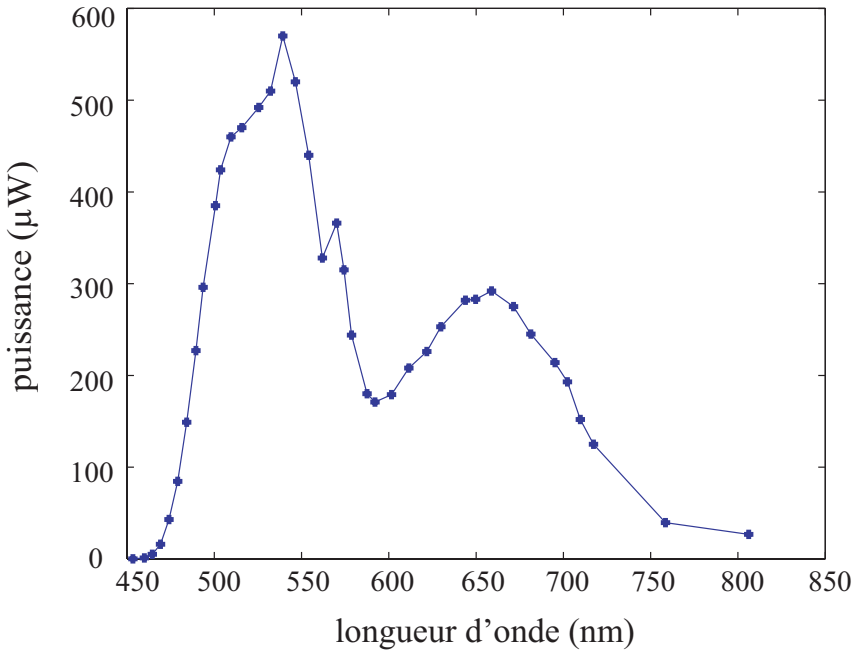


FIG. 1.26 – *Mesure du spectre de puissance du continuum en sortie du monochromateur, résolution spectrale ≤ 3 nm*

La puissance totale délivrée par le continuum définie dans la fenêtre spectrale sélectionnée est :

$$P_{tot} = \sum_{\lambda} P(\lambda).\Delta\lambda \tag{1.44}$$

est ainsi mesurée grâce au spectre précédent. Elle s'élève à $P_{tot} = 97\ mW$. Sachant que l'on utilise un laser délivrant une puissance moyenne de $800\ mW$, l'efficacité de conversion (pertes d'injection comprises) est donc de $12\ \%$. Cette faible valeur peut être imputée à l'écart des ouvertures numériques entre la lentille d'injection ($ON = 0,5$) et la fibre MF ($ON = 0,38$). D'autres lentilles ou objectifs ont été testés, mais la lentille choisie permet d'obtenir le continuum ayant le spectre le plus lisse.

La luminance spectrale du continuum s'évalue grâce à la définition rappelée dans l'introduction

de ce chapitre :

$$\beta_\nu = \frac{P_\nu}{A\Delta\Omega\Delta\nu} \quad (W/cm^2.Hz.sr) \tag{1.45}$$

avec A l'aire effective de la fibre, $\Delta\Omega$ l'angle solide défini par l'ouverture numérique de la fibre et $\Delta\nu$ la largeur spectrale du continuum. Dans ces conditions[11], $\beta_\nu = 4.10^{-9}\ W/cm^2.Hz.sr$, soit environ 1000 fois supérieure à la luminance du spectre solaire.

La puissance mesurée précédemment avec le puissance-mètre résulte d'une moyenne temporelle sur un grand nombre d'impulsions du continuum. Cette information suffit pour la plupart des applications actuelles de cette source (tomographie, colorimètrie, microscopie confocale ...) où les temps d'intégration du signal d'intérêt (en μs ou ms) sont très grands devant la périodicité des pulses du continuum ($T_0 = 12,5\ ns$). Or, l'application de ce continuum comme source pour la microscopie STED (abordée au Chapitre 3) nécessite une caractérisation plus poussée. En effet, cette technique consiste à améliorer la résolution en imagerie de fluorescence en ajustant *pulse à pulse* deux faisceaux issus du continuum, de longueurs d'onde particulières, pour exciter puis désexciter une zone de fluorescence. L'efficacité de dépletion, et par conséquent la résolution, est directement reliée à la puissance contenue dans chacun de ces pulses. Il est alors nécessaire d'avoir accès à la puissance disponible pulse à pulse et longueur d'onde par longueur d'onde, autrement dit, aux fluctuations de puissances pour chaque bande spectrale du continuum.
Ces fluctuations ont été mesurées grâce au montage suivant (fig1.27) :

[11] $P_\nu \simeq 100\ mW$, $A = \pi.(2\ \mu m)^2/4 \simeq 9.10^{-8} cm^{-2}$, $\Delta\Omega = 0,47$, $\Delta\nu = c\Delta\lambda/\lambda^2 = 6.10^{14}\ Hz$ avec $\lambda = 500\ nm$

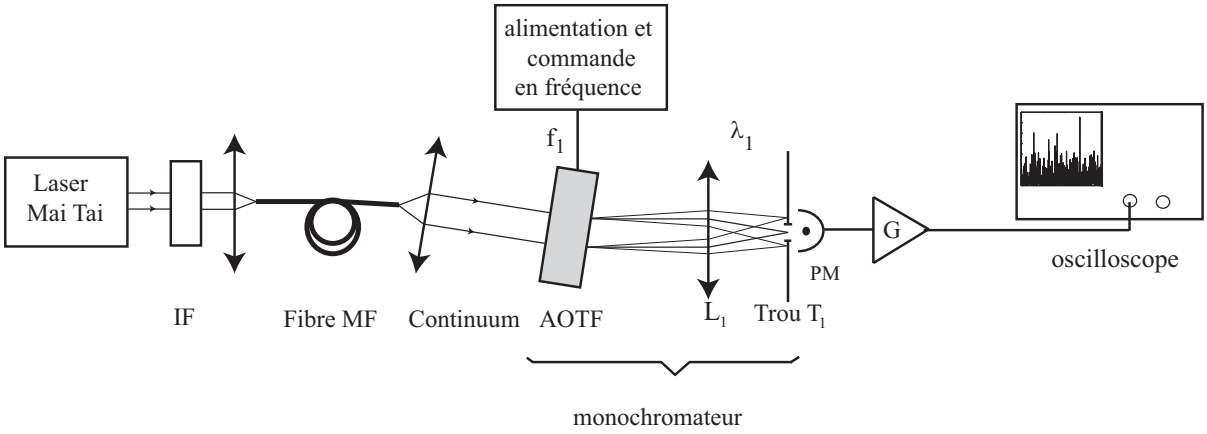


FIG. 1.27 – *Schéma du dispositif d'enregistrement des fluctuations de puissance*

Après le dispositif de sélection spectrale précédent, on enregistre sur oscilloscope le niveau d'intensité des impulsions à l'aide d'un photodétecteur rapide, ici un photomultiplicateur, dont la bande passante est de $150\ MHz$ ($> 80\ MHz$). La base de temps est choisie de sorte de pouvoir disposer d'un grand nombre d'impulsions : pour chaque longueur d'onde, nous effectuons un enregistrement du bruit ambiant, et 10 enregistrements de 160 impulsions du continuum, soit 1600 impulsions sur lesquelles un traitement statistique sera effectué. Un exemple d'enregistrement de pulses pour $\lambda = 620\ nm$ est représenté sur la figure (1.28) : on remarque bien l'apparition des pulses selon la périodicité du laser MaiTai, ils sont d'amplitude très variable et pour certaines positions du peigne temporel, on note une absence totale de pulses.

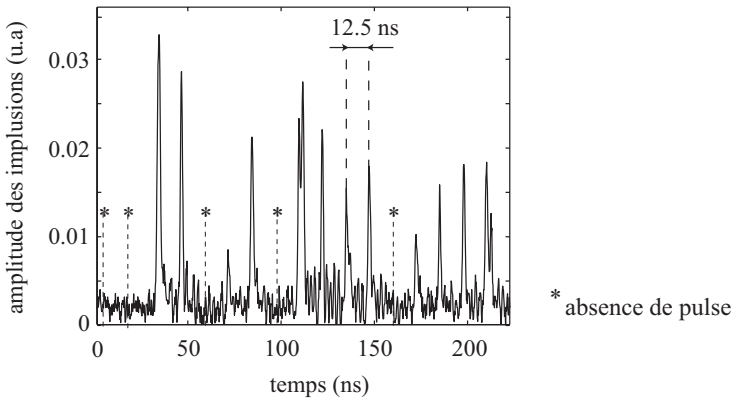


FIG. 1.28 – *Exemple d'un enregistrement de l'amplitude des pulses issus du continuum, à* $\lambda = 620\ nm$ *: la périodicité de 12,5 ns est celle du laser MaiTai.*

Ce type de mesures a été effectué pour une trentaine de longueurs d'onde dans la gamme [470 ;720] nm. Nous traçons ensuite les histogrammes de l'amplitude des pulses du continuum et du bruit, en calculant dans les enregistrements précédents la probabilité d'obtenir un pulse ou un niveau de bruit d'amplitude donnée. Quelques uns des histogrammes obtenus sont représentés sur la figure (1.29) :

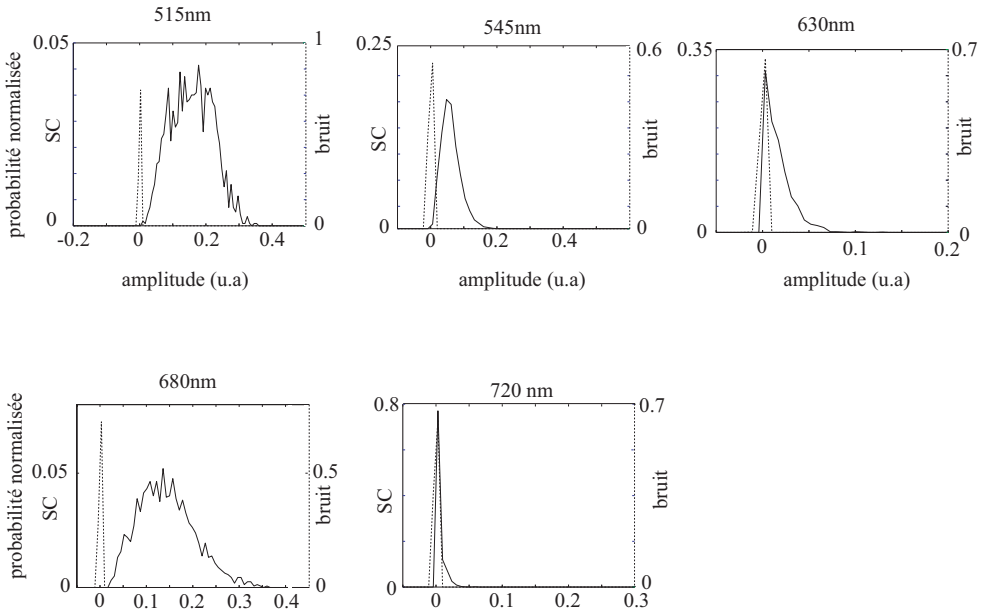


FIG. 1.29 – *Histogrammes fournissant la statistique de la puissance des pulses, ainsi que celle du bruit de détection à différentes longueurs d'onde*

La largeur des histogrammes de l'amplitude des pulses du continuum est directement reliée à l'étendue des variations de puissance d'un pulse à l'autre pour une longueur d'onde donnée. On observe ainsi de fortes différences entre les bandes spectrales : selon les longueurs d'onde, la largeur des histogrammes, *i.e* les fluctuations de puissance, montrent de grandes disparités. D'autre part, pour certaines longueurs d'onde, le recouvrement des histogrammes du bruit ambiant et du continuum indique qu'une partie des pulses du continuum est de même niveau que le bruit (ces mesures sont bien sûr à pondérer par la sensibilité du détecteur qui chute dans le proche infra-rouge).

D'une manière générale, pour calculer la valeur des fluctuations à chaque longueur d'onde à partir de ces histogrammes, il faut tenir compte du fait que le signal $e(t)$ détecté par le PM est constitué de la somme du signal issu des pulses du continuum $s_{SC}(t)$ et du signal issu du bruit ambiant $s_b(t)$. Il s'exprime donc de la manière suivante :

$$e(t) = s_{SC}(t) + s_b(t) \tag{1.46}$$

La variance de $e(t)$ est donc la somme des variances de $s(t)$ et $b(t)$; l'écart-type σ_{SC} de la distribution des pulses est donnée par l'expression suivante :

$$\sigma_{SC} = \sqrt{\sigma_e^2 - \sigma_b^2} \tag{1.47}$$

sachant que l'écart-type des signaux $e(t)$ ou $b(t)$ s'écrit :

$$\sigma^2 = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(X_i - \overline{X})^2 \tag{1.48}$$

où N est le nombre de pulses , X_i est l'amplitude d'un pulse, et $\overline{X}$ est l'amplitude moyenne. Les écarts-type s'écrivent alors :

$$\sigma^2 =< X^2 > - < X >^2 = f_1X_1^2 + f_2X_2^2 + ... + f_NX_N^2 - < X >^2 \tag{1.49}$$

où f_i est la fréquence d'apparition de la valeur X_i. Les histogrammes précédents nous fournissent ainsi l'écart-type de distribution de l'amplitude des pulses pour chaque longueur d'onde.
Pour chacune d'entre elles, l'écart-type σ_{SC} et l'amplitude moyenne $< X_{SC} >$ sont exprimés en volts, et dépendent de la sensibilité du détecteur et du gain utilisé pour chaque longueur d'onde ; néanmoins les rapports $\frac{\sigma_{SC}(\lambda)}{<X_{SC}>(\lambda)}$ sont comparables. Pour connaître les valeurs des fluctuations de puissance $\sigma_{SC_{watt}}$ exprimées en W, on utilise l'égalité suivante :

$$\left.\frac{\sigma_{SC}(\lambda)}{< X_{SC} > (\lambda)}\right|_{PM} = \left.\frac{\sigma_{SC_{watt}}(\lambda)}{P_{moy}(\lambda)}\right|_{\text{puissance-mètre}} \tag{1.50}$$

Puisque le membre de gauche est connu grâce aux histogrammes, et que P_{moy} est connue d'après les mesures réalisées avec le puissance-mètre calibré (fig.1.26), nous déduisons la valeur des fluctuations de puissances d'après l'équation (1.51) :

$$\sigma_{SC_{watt}}(\lambda) = \left.\frac{\sigma_{SC}(\lambda)}{< X_{SC} > (\lambda)}\right|_{PM} P_{moy}(\lambda)(enW) \tag{1.51}$$

La figure (1.30.a)) représente les fluctuations de puissances $\sigma_{SC_{watt}}$ rapportées à la puissance moyenne P_{moy} :

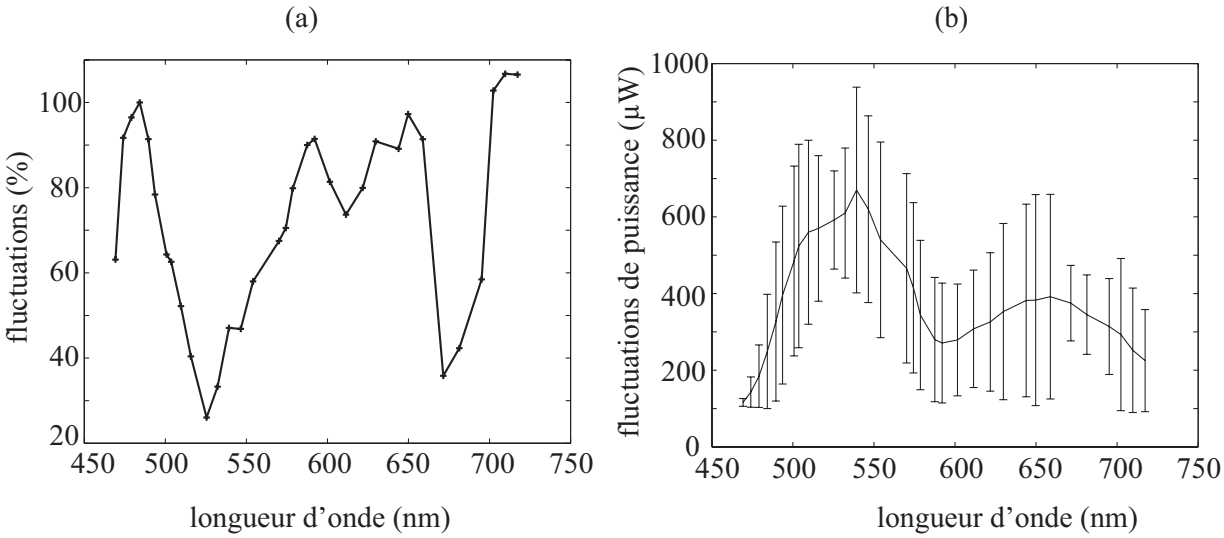


FIG. 1.30 – *(a) Spectre des fluctuations de puissance du continuum (en %), (b) Spectre des fluctuations de puissance du continuum (en μW) et spectre de la puissance moyenne.*

La figure (1.30.b)) représente en ligne solide la puissance spectrale moyenne, et les barres d'erreurs ont pour hauteur $2\sigma_{SC_{watt}}$. Ces fluctuations sont extrêmement importantes, puisqu'elles atteignent parfois 100%, et quelle que soit la longueur d'onde, elles ont une valeur supérieure à 30%. L'origine de ces fluctuations tient majoritairement au processus même de génération du continuum. Dans le cas d'impulsions pompe de l'ordre de $100\ fs$, l'étape initiale de fission du soliton de haut ordre en multiples solitons d'ordres fondamentaux est due à la diffusion Raman stimulée et aux termes de dispersion de hauts ordres (termes en β_3,β_4 ...).
La dispersion consiste en des modifications de l'indice de réfraction vu par l'onde : ses effets dépendent de l'intensité, du spectre et de la durée de l'impulsion, et des propriétés du matériau guidant. Les fluctuations de puissance associées à ce processus sont donc restreintes aux fluctuations de puissance de l'impulsion pompe initiale, qui sont relativement faibles (2%).
Par contre, la diffusion Raman stimulée, dont le principe a été exposé au paragraphe 1.1.1.3, consiste en l'émergence de nouvelles longueurs d'onde, par l'amplification cohérente d'un *signal* contenu dans le spectre de gain Raman, aux dépends d'une *onde pompe* de forte intensité. Dans notre cas, l'onde pompe est l'impulsion solitonique initiale, et le signal est composé majoritairement de bruit (bruit ambiant, bruit quantique ...). Puisque le processus est cohérent, l'intensité du *signal* résultant est directement relié à l'intensité des deux ondes entrant en jeu : le bruit étant aléatoire, la puissance résultante l'est aussi. La suite des étapes permettant d'aboutir au continuum de lumière tient en des processus non linéaires, c'est-à-dire dépendant de l'intensité des impulsions. Dans cette configuration, aucun phénomène ne conduit au lissage des fluctuations.

Si le spectre et la puissance des continua sont des caractéristiques simples à mesurer, il n'en est pas de même pour la détermination de la durée de leurs impulsions. En effet, en régime picoseconde ou femtoseconde, les photodétecteurs classiques, avec un temps de réponse bien supérieur à la picoseconde, sont trop lents pour mesurer des pulses de cette finesse temporelle. La connaissance de la largeur des pulses est pourtant nécessaire, d'une part pour caractériser complètement notre source et évaluer ses champs d'applications potentiels, et d'autre part pour déterminer la viabilité de cette source dans une expérience de STED.

1.4.4 Durée des impulsions du continuum

Depuis les années 80, les mesures de largeurs de pulses courts sont conventionnellement effectuées par autocorrélation [50] : cela s'effectue en imposant un retard variable τ entre deux impulsions identiques $E(t)$ et $E(t-\tau)$ à l'aide d'un interféromètre de type Michelson, puis en utilisant un cristal non linéaire pour former le produit $I(t)I(t-\tau)$, et en mesurant le flux correspondant à cette fréquence double. Le schéma de principe d'un autocorrélateur en configuration colinéaire et non colinéaire est représenté sur la figure (1.31).

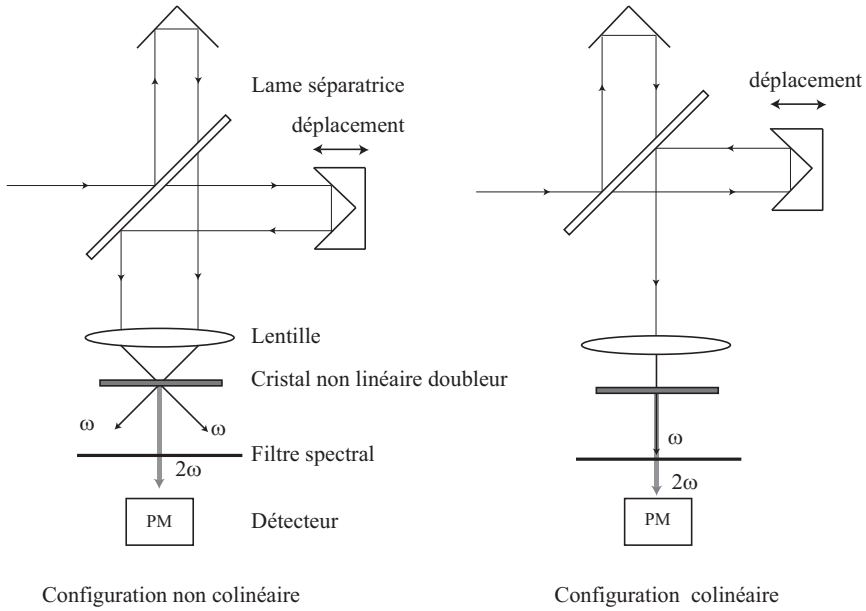


FIG. 1.31 – *Schéma de principe de l'autocorrélation optique par génération du second harmonique non colinéaire ou colinéaire.*

Le signal collecté par le détecteur s'écrit alors :

$$S(\tau) = \int I(t)I(t-\tau)dt \tag{1.52}$$

Pour obtenir l'information $I(t)$, il faut établir des hypothèses sur la forme temporelle de l'impulsion, et c'est là l'inconvénient majeur de cette méthode puisque plusieurs formes d'impulsions peuvent avoir la même trace d'autocorrélation.
A partir des années 90 sont apparues des techniques plus avancées permettant d'accéder à une caractérisation complète des pulses $E(t)$, *i.e.* amplitude et phase. Les méthodes spectrographiques utilisées dans le système de Frequency Resolved Optical Gating (FROG) [51], consistent à multiplier l'impulsion à mesurer $E(t)$ par un filtre d'amplitude $g(t)$, puis à mesurer le spectre de l'impulsion filtrée pour différents délais entre le filtre et l'impulsion à caractériser. On enregistre alors un signal de la forme :

$$S(\omega,\tau) = \left|\int E(t)g(t-\tau)exp(-i\omega t)dt\right|^2 = \left|\int E_{signal}(t-\tau)exp(-i\omega t)dt\right|^2 \tag{1.53}$$

Comme le filtre $g(t)$ est lui-même une fonction de l'impulsion inconnue, l'inversion de S vers E est réalisée par méthode itérative, avec l'inconvénient que celle-ci n'est pas forcément convergente.
D'autres méthodes interférométriques, dites Spectral Phase Interferometry for Direct Electric field Reconstruction (SPIDER), sont basées sur l'enregistrement d'interférences entre différentes fréquences du spectre de l'impulsion à caractériser. Elles donnent accès à une différence de phase spectrale, qui conduit par concaténation à la reconstruction de la phase temporelle de l'impulsion [52, 53].
Dans le même temps, des techniques d'autocorrélation *sans utilisation de cristal* ont vu le jour. Elles sont basées sur la capacité d'absorption à 2 photons d'une photodiode [54, 55] et permettent de combiner à la fois la multiplication de signaux optiques et la transformation de la lumière en courant. Les avantages de la photodiode sont nombreux :

- aucun accord de phase nécessaire
- aucun alignement, excepté la focalisation précise du faisceau sur la photodiode
- un très faible coût
- une grande sensibilité et réponse spectrale large (plusieurs centaines de nm).

L'autocorrélation de pulses laser picosecondes [56, 57] et femtosecondes [58, 59] de forme connue a été démontrée en employant cette technique. Mais dans le cas d'un continuum, la forme temporelle de l'impulsion étant totalement inconnue, il est impossible d'appliquer une méthode d'autocorrélation. Il est cependant envisageable de faire une intercorrélation.
A notre connaissance, l'utilisation de l'absorption à 2 photons d'une photodiode dans un dispositif de mesure d'*intercorrélation* entre un pulse du continuum à mesurer et un pulse femtoseconde connu, issu du laser de pompe n'a été testée qu'une seule fois, sur 5 longueurs d'onde parmi un spectre de 400 nm de large, et avec une faible résolution temporelle [60]. C'est cette technique

que nous nous proposons d'améliorer et d'appliquer à l'ensemble du continuum [12]. Le principe est le suivant : on dispose, grâce au laser femtoseconde, d'impulsions I_0 de forme connue et environ 10 fois plus courtes que les impulsions I_1 à mesurer. Nous les considérerons donc comme portes temporelles de faible durée par rapport aux impulsions à mesurer.
Le signal électrique enregistré, comme dans le cas de l'autocorrélation, s'écrit :

$$i(\tau) = \alpha \int I_1(t) I_0(t-\tau) dt \tag{1.54}$$

où α caractérise le processus d'absorption à 2 photons de la photodiode pour les longueurs d'onde des impulsions et τ le retard entre les 2 impulsions. A la convolution par $I_0(t)$ près, la durée pendant laquelle $i(\tau)$ ne sera pas nul est la durée de l'impulsion I_1, et la forme de $i(\tau)$ est la forme de $I_1(\tau)$. Les étapes principales de l'intercorrélation se résument de la manière suivante :

- Après isolation d'une fraction du faisceau femtoseconde, le retard temporel $\tau = \frac{\delta}{c}$ entre les deux types d'impulsions est géré par l'allongement du chemin optique δ du faisceau I_0,
- Chaque faisceau est modulé afin de le distinguer dans la chaîne de détection électronique,
- La multiplication des impulsions est assurée par l'absorption à deux photons d'une photodiode,
- L'acquisition du signal $i(\tau)$ ou encore $i(\delta)$ est assurée par cette photodiode suivie d'éléments permettant d'isoler l'information utile.

Sur la figure (1.32) est schématisé le montage utilisé [13] :

[12] Un montage FROG ou SPIDER n'a pas été envisagé puisque nous n'avions pas d'impératif relatif à la vitesse d'acquisition des données et que l'obtention de la forme du champ n'était pas un de nos objectifs.

[13] La photodiode choisie pour cette expérience est : Photodiode GaP, EDP-150-0, Roithner, de bande spectrale [150 ; 550] nm.

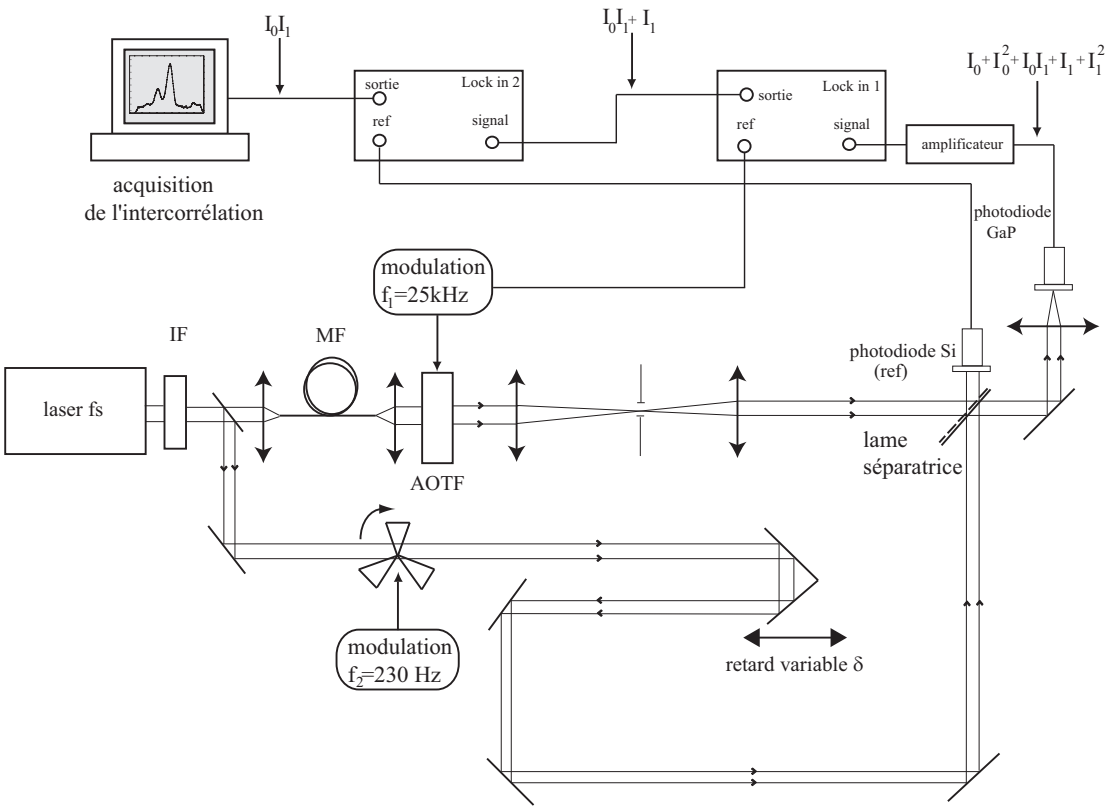


FIG. 1.32 – *Schéma de principe de l'intercorrélation entre un pulse inconnu issu du continuum et un pulse référence issu du laser*

On appelle :

- $\sigma_1(\lambda)$ la sensibilité spectrale d'absorption à un photon de la photodiode,
- $\sigma_2(\lambda_i, \lambda_j)$ la sensibilité spectrale d'absorption à deux photons de la photodiode,
- I_0, λ_0 et I_1,λ_1 les intensités et longueurs d'onde respectives du laser femtoseconde (durée $\leq$ 100 fs), et de l'impulsion à mesurer issue du continuum.

Pour un retard $\delta = c\tau$ fixé, la photodiode délivre une intensité $i(\tau)$ reliée à l'absorption d'un photon de I_0 ou de I_1, et à l'absorption simultanée de deux photons de I_0, de deux photons de I_1 ou d'un photon de I_0 et d'un photon de I_1. Le courant détecté s'écrit alors :

$$i(\tau) = \int \left[\sigma_1(\lambda_0)I_0 + \sigma_1(\lambda_1)I_1 + \sigma_2(\lambda_0, \lambda_0)I_0^2 + \sigma_2(\lambda_1, \lambda_1)I_1^2 + \sigma_2(\lambda_0, \lambda_1)I_0I_1 \right] dt \quad (1.55)$$

Le terme traduisant l'intercorrélation est $\sigma_2(\lambda_0, \lambda_1)I_0I_1$: pour différencier puis isoler ce terme, on choisit de moduler avec deux fréquences différentes les impulsions du continuum et celles du laser femtoseconde, puis d'effectuer deux détections synchrones successives. Le faisceau I_1 est modulé à $f_1 = 25\ kHz$ via l'AOTF, le faisceau I_0 est modulé à $f_0 = 230\ Hz$ par un chopper. Les

modulations sont des signaux en créneaux, du type [0 ; 5] V. Les signaux du type I_i^2 ont donc une fréquence f_i. L'intensité délivrée par la photodiode est ainsi composée de termes de fréquences bien déterminées :

$$\begin{aligned} i(\tau) &= \underbrace{\int \sigma_1(\lambda_0) I_0(t) dt}_{f=f_0} + \underbrace{\int \sigma_1(\lambda_1) I_1(t) dt}_{f=f_1} \underbrace{\int \sigma_2(\lambda_0, \lambda_0) I_0^2(t) dt}_{f=f_0} \\ &+ \underbrace{\int \sigma_2(\lambda_1, \lambda_1) I_1^2(t) dt}_{f=f_1} + \underbrace{\int \sigma_2(\lambda_0, \lambda_1) I_0(t-\tau) I_1(t) dt}_{f=f_0+f_1} \end{aligned} \tag{1.56}$$

La 1ère détection synchrone élimine les termes ne dépendant purement que de la fréquence f_0, on collecte

$$i_{DS_1}(\tau) = \int \sigma_1(\lambda_1) I_1(t) dt + \int \sigma_2(\lambda_1, \lambda_1) I_1^2(t) dt + \int \sigma_2(\lambda_0, \lambda_1) I_0(t-\tau) I_1(t) dt \tag{1.57}$$

A la sortie de la 2ème détection synchrone, on élimine les termes ne dépendant que de f_1, en collectant ainsi $i_{DS_2}(\tau)$ qui correspond au signal d'intercorrélation :

$$i_{DS_2}(\tau) = \int \sigma_2(\lambda_0, \lambda_1) I_0(t-\tau) I_1(t) dt \tag{1.58}$$

En mesurant i_{DS_2} pour différents retards δ, nous obtenons une trace d'intercorrélation dont la largeur nous fournit la durée de l'impulsion $I_1(t)$ à caractériser, sans besoin d'hypothèses préalables sur la forme temporelle. La précision de cette mesure est d'autant meilleure que le pulse de référence I_0 est court.

Avant d'effectuer les mesures, nous avons testé les conditions d'absorption à 2 photons de la photodiode choisie directement sur les pulses issus du MaïTaï. Les résultats de l'autocorrélation, concluants, sont présentés dans l'annexe A.

Nous présentons ci-dessous le résultat de quelques intercorrélations pour différentes longueurs d'onde, c'est-à-dire la forme moyenne $I_1(t)$ des impulsions du continuum.

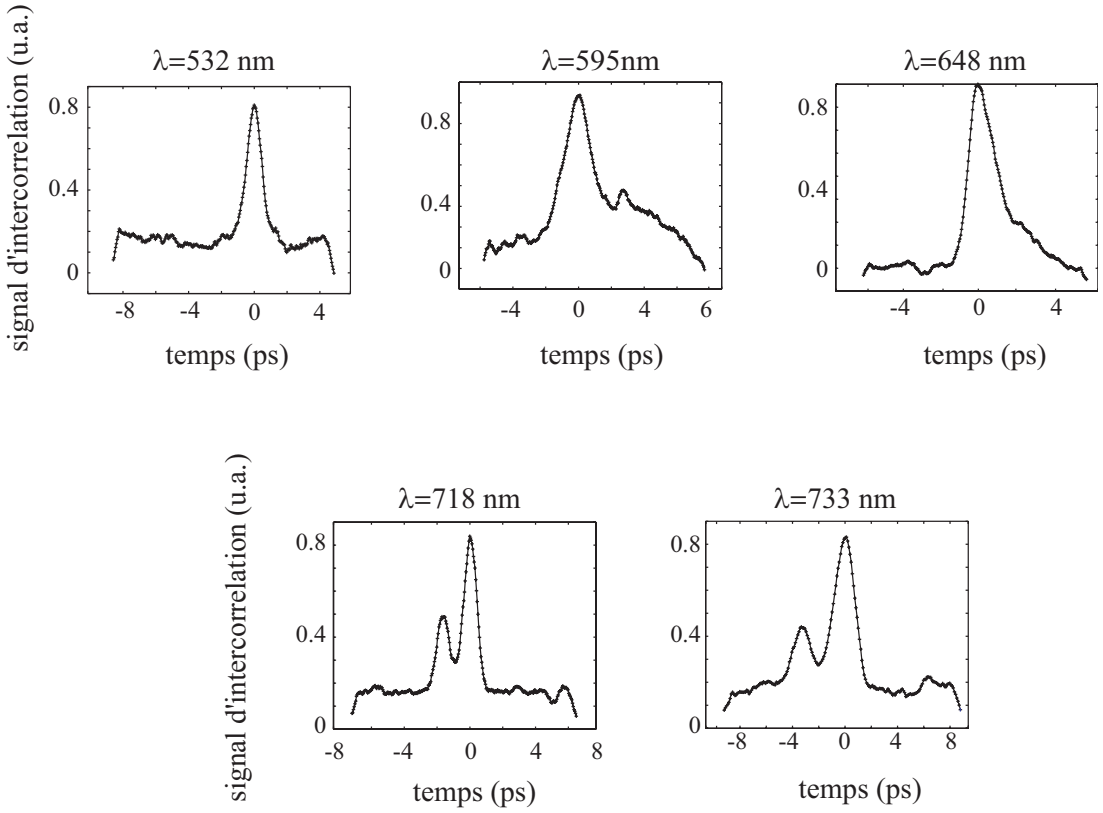


FIG. 1.33 – *Traces d'intercorrélation entre les impulsions du laser MaiTai et les impulsions de différentes longueurs d'onde issues du SC : formes temporelles moyennes des impulsions du SC*

Celles-ci ne manifestent plus aucun point de comparaison avec l'impulsion gaussienne ou sécante hyperbolique du laser femtoseconde. Vues leurs formes complexes, la durée des impulsions est mesurée entre 10 % et 90 % de l'énergie qu'elles contiennent. La figure (1.34) représente en fonction des longueurs d'onde la durée des impulsions ainsi définies.

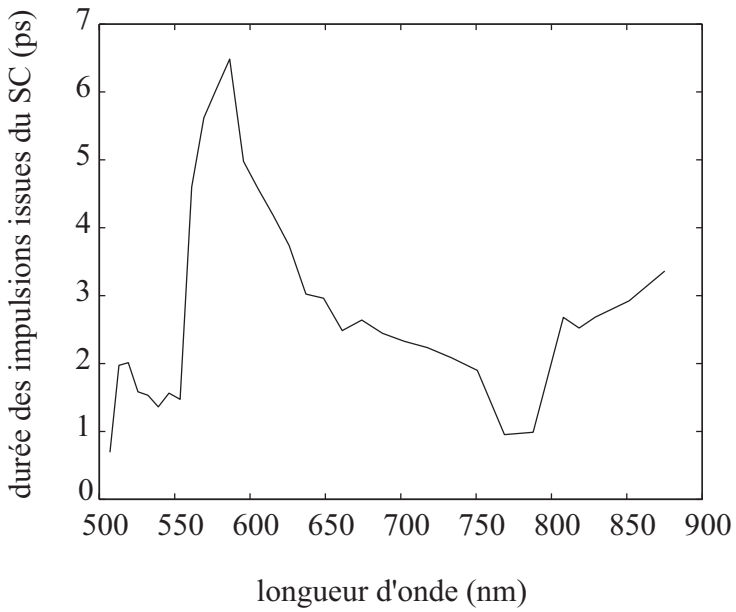


FIG. 1.34 – *Durées des impulsions issues du supercontinuum (SC) en fonction de la longueur d'onde : résultats expérimentaux.*

Elles sont évaluées entre 1 à 6 ps environ sur une plage de mesure [500 ; 870] nm, ce qui est cohérent avec les simulations développées au Chapitre 3 (figure 3.7).
D'autre part, comme la position du coin de cube a été relevée pour chaque mesure à l'aide d'un palpeur mécanique[14], nous avons accès à l'information des temps d'arrivée des impulsions les unes par rapport aux autres. La figure (1.35) représente en fonction des longueurs d'onde, le retard pris par chaque bande spectrale dû à la dispersion de la fibre MF et à la traversée du cristal de l'AOTF. Les données de dispersion (coefficient β_2) de la fibre utilisée et les caractéristiques d'indice et de longueur du cristal étant connues, on peut tracer la courbe de retard théorique et vérifier la bonne adéquation avec les retards mesurés.

[14] la précision en position du palpeur est de 10 μm, soit de 70 fs.

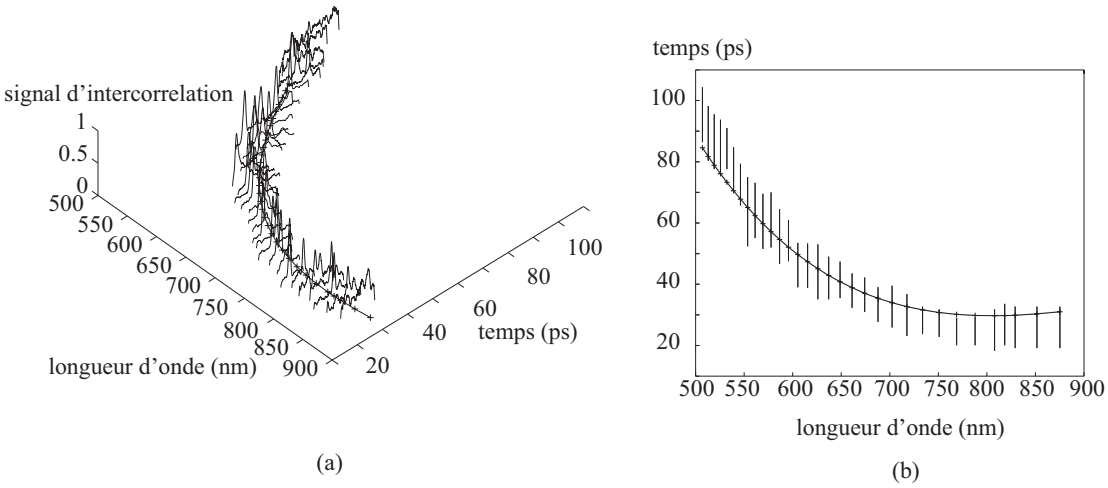


FIG. 1.35 – *Répartition dans le temps des traces d'intercorrélation expérimentales entre les impulsions issues du SC et du laser Maitai ; et courbe théorique du retard imposé par la fibre MF et le cristal de l'AOTF. (a) vue 3D, (b) vue 2D.*

1.5 Conclusion

Les investigations spectrales, temporelles et de puissance apportent une caractérisation complète de la source composée du continuum de lumière et du système de sélection spectrale acousto-optique, en terme de spectre, de puissance disponible par bande spectrale, de fluctuations de puissance, de forme temporelle et de durée des impulsions. Ces informations permettent de mieux appréhender les applications futures de ce type de source, et en particulier la microscopie STED, qui nécessite une description non pas moyennée, mais pulse à pulse de la source. La modélisation de la génération du continuum, d'après un code de programmation de J. M. Dudley et dont les résultats seront exposés au Chapitre 3, a rendu possible la comparaison et la validation de nos mesures avec un schéma théorique couramment admis. La concordance de ces résultats justifie nos méthodes expérimentales d'investigations. Le tableau (1.5) résume l'ensemble des caractéristiques mesurées pour le continuum associé au système de sélection spectrale :

Gamme spectrale utile	[470 ; 850] nm
Puissance spectrale moyenne	250 $\mu W/nm$
Luminance spectrale	$4.10^{-9}\ W/cm^{-2}.sr^{-1}.Hz^{-1}$
Fluctuations de puissance	30 à 100%
Durée des impulsions	1 à 6 ps
résolution spectrale de la sélection	$\leq 3\ nm$

Chapitre 2

Microscopie confocale de fluorescence

Le principe du microscope confocal a été proposé en 1957 [61], puis utilisé expérimentalement à partir de 1980 suite au développement de sources laser adaptées et aux progrès en instrumentation électronique et informatique. Il s'agit d'une détection point à point du signal en transmission ou du signal de fluorescence émis par l'objet observé. Avec l'apparition des premiers modèles commerciaux en 1987, cette technique s'est très vite imposée en routine dans les industries pour le contrôle de pièces comme les circuits semi-conducteurs par exemple, et comme l'outil indispensable en biologie, en permettant l'observation tridimensionnelle de structures microscopiques dans des échantillons biologiques transparents épais tels que des cultures cellulaires ou de tissus [62]. Un microscope confocal fournit en effet des images plus nettes et plus contrastées qu'un microscope conventionnel, sa particularité étant d'éliminer la lumière indésirable issue des points situés hors du plan focal. En plus de faire apparaître un plus grand nombres de détails, chaque image représente un et un seul plan de l'objet : il s'agit d'une coupe très fine, transverse à l'axe optique, dans le volume du spécimen. L'ensemble de ces sections optiques sont enregistrées pour reconstruire une image tridimensionnelle de l'objet. Le biologiste, ou autre utilisateur, a ainsi accès à des informations qui nécessitaient conventionnellement des coupes réelles invasives de l'échantillon. Même si un tel microscope est parfois utilisé en mode de transmission, la plupart des scientifiques l'emploient dans le but de réaliser de l'imagerie de fluorescence. Cette technique permet en effet de mettre facilement en valeur les zones d'intérêt de l'échantillon, telles que l'ADN, des protéines, des virus, etc...
La microscopie confocale de fluorescence est désormais une technique de base sur laquelle diverses améliorations sont apportées ; la microscopie multiphotonique à 2 ou 3 photons en est un exemple [63].
L'objectif de notre travail est de montrer que le continuum de lumière étudié au chapitre 1 est une source optique viable pour des applications dans le domaine biologique, et en particulier pour

réaliser des images confocales de fluorescence de cellules marquées par différents fluorophores. Jusqu'à présent, les sources de lumière pour ces microscopes sont choisies pour exciter différents grands groupes de fluorophores. Il s'agit de lasers à gaz : HeNe (543 nm, 633 nm), Ar (453 nm, 488 nm, 513 nm)..., ou de diodes laser compactes dont la puissance peut être ajustée de façon plus simple que sur les lasers à gaz [64] et qui présentent une plage d'accordabilité de l'ordre de 25 nm [65]. Les microscopes commerciaux sont actuellement équipés de plusieurs lasers et mettent à disposition jusqu'à 7 raies spectrales [66]. Bénéficier d'une *source large*, telle qu'un continuum de lumière permettrait d'éviter la multiplication des sources, de couvrir une gamme plus étendue de spectres d'excitation de fluorophores, et donc de *diversifier les marqueurs fluorescents utilisés*.
Nous reviendrons tout d'abord sur le principe d'un microscope confocal de fluorescence, puis nous détaillerons le montage utilisé pour insérer ce continuum dans un microscope non commercial. Après avoir quantifié les résolutions spatiale et spectrale de ce microscope, nous montrerons des images d'objets fluorescents, et de cellules dont l'ADN et le cytoplasme sont codés par différents marqueurs.

2.1 Principe d'un microscope confocal de fluorescence

Dans un microscope conventionnel, tous les points de l'objet sont imagés de manière simultanée : la lumière de diffusion des points voisins aux zones d'intérêts vient perturber le signal de fluorescence de celles-ci, l'image est alors rendue floue. *A contrario*, l'invention de Minsky fournit des images en focalisant séquentiellement un point de lumière dans l'échantillon, et en ne collectant que la lumière de fluorescence émise par ce petit volume.
Le principe du microscope confocal est schématisé sur la figure (2.1).

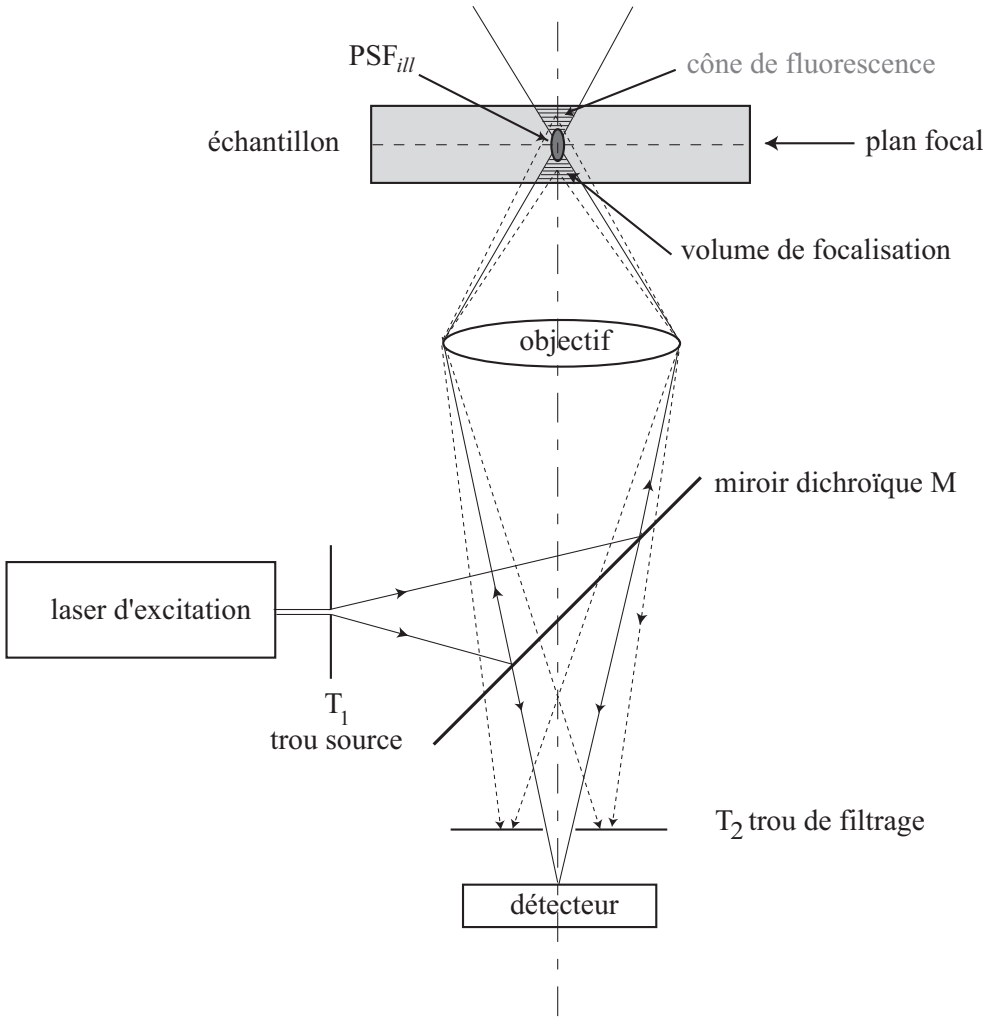


FIG. 2.1 – *Schéma de principe d'un microscope confocal de fluorescence : T_1, le volume de focalisation et T_2 sont conjugués.*

En illuminant l'échantillon en un seul point, c'est-à-dire en faisant l'image d'un trou source (T_1) sur l'objet, on s'affranchit dans un premier temps d'une grande partie de la lumière indésirable. De plus, la lumière émise par l'objet passe par un nouveau trou (T_2) qui filtre la lumière qui ne provient pas directement du plan focal : les points au voisinage de ce plan sont alors invisibles. Le signal de fluorescence issu de ce petit volume (PSF_{ill}) est collecté par un photomultiplicateur (PM) puis enregistré. Le plan imagé est construit point à point en déplaçant l'échantillon sous l'illumination. Le miroir dichroïque M réalise la sélection spectrale : il réfléchit la longueur d'onde d'excitation du fluorophore, et transmet la longueur d'onde d'émission de celui-ci.
Il y a ainsi discrimination optique en profondeur et augmentation du contraste dans l'image. La qualité de celle-ci dépend, comme pour tout microscope optique, des aberrations résiduelles, de

la qualité de l'illumination de la pupille d'entrée, du bruit ambiant (fluctuations de puissance de la source, bruit des détecteurs, bruit électronique...) mais aussi de la taille des trous de confocalité (T_1, T_2). Pour une qualité maximale (contraste et résolution), le trou de filtrage doit être réduit à un diamètre le plus faible possible. L'inconvénient est alors la chute drastique du nombre de photons collectés, d'où l'emploi de sources puissantes[1] et de détecteurs très sensibles.
Plus précisément, l'échantillon n'est pas illuminé en un point géométrique S' mais en un volume de focalisation, représenté sur le schéma (2.1). On considère principalement le volume ellipsoïdal, appelé PSF_{ill} (Point Spread Function d'illumination) sur le schéma (2.1), qui contient plus de 85% de l'énergie focalisée par l'objectif. Il correspond à la réponse impulsionnelle de l'objectif lorsque la source est ponctuelle. Ses dimensions ne dépendent alors que des caractéristiques de l'objectif. La figure (2.2) représente la forme générale de ce volume. Celle-ci n'est pas sphérique car l'objectif ne collecte pas la lumière dans l'angle solide complet (4π stéradians), mais dans un angle solide défini et limité par son ouverture numérique.

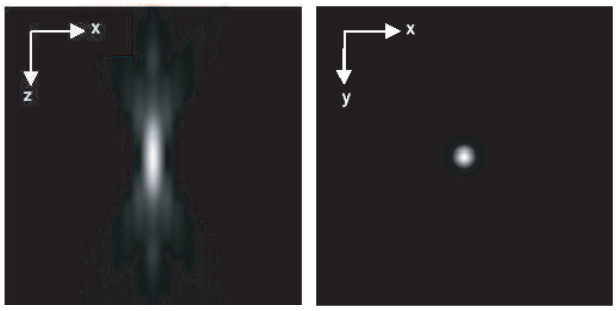


FIG. 2.2 – *Sections verticale et horizontale du volume d'illumination principal PSF_{ill} donné par l'objectif imageur [67]. Les dimensions de ce volume seront précisées dans le paragraphe 2.1.1.2.*

La résolution du microscope est directement reliée aux dimensions du PSF_{tot} peut être définie par l'expression suivante :

$$PSF_{tot} = PSF_{ill} \times PSF_{det} \tag{2.1}$$

où $\times$ symbolise une multiplication, et où PSF_{det} est une fonction traduisant l'influence de tous les éléments existant entre l'objet et la détection : huile, objectif, miroir, trou T_2. PSF_{tot} traduit ainsi le fait que la source est imagée sur l'objet (PSF_{ill}), puis que ce même point est imagé sur le détecteur (PSF_{det}).
Dans le cas d'une source et d'un détecteur non ponctuels, on peut dire de manière très générale

[1] dans la limite acceptable par l'échantillon (photobleaching).

que la discrimination latérale et axiale est d'autant meilleure que les trous T_1 et T_2 ont un faible diamètre.
Pour mieux comprendre les différences de réponses impulsionnelles entre la microscopie conventionnelle et confocale, nous nous limiterons à une théorie simplifiée mais suffisante pour les mettre en avant. Celle-ci est détaillée dans l'annexe B.

2.1.1 Réponses impulsionnelles

2.1.1.1 En microscopie conventionnelle

La réponse impulsionnelle en intensité d'une pupille s'écrit :

$$PSF_{ill}(u,v) = I_1(u,v) = |h_1(u,v)|^2 \tag{2.2}$$

où

- $h_1(u,v)$ est la réponse impulsionnelle en amplitude de la pupille,
- u est la coordonnée optique axiale normalisée :

$$u = \frac{2\pi}{\lambda}\, z\, \frac{ON^2}{n_1} \tag{2.3}$$

- v est la coordonnée optique latérale normalisée :

$$v = \frac{2\pi}{\lambda}\, r\, ON \tag{2.4}$$

- $r = \sqrt{x^2+y^2}$ désigne un point dans le plan image,
- ON définit l'ouverture numérique image de la lentille, et n_1 l'indice du milieu d'immersion (côté image).

Les réponses impulsionnelles dans le plan focal du système optique (cas où $u = 0$) et le long de l'axe optique (cas où $v = 0$) dans le cas d'une pupille circulaire, s'écrivent sous la forme suivante, où J_1 est la fonction de Bessel de première espèce d'ordre 1 :

$$I_1(0,v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v}\right)^2 \tag{2.5}$$

$$I_1(u,0) = \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right)^2 \tag{2.6}$$

$I_1(0,v)$ représente la distribution spatiale de la tache de diffraction de la lentille dans le plan focal, elle est tracée sur la figure (2.3(a)). Cette figure bien connue est le profil spatial d'une tache d'Airy. Selon le critère de Rayleigh, la largeur de cette distribution détermine la résolution

latérale du système. Sachant que J_1 s'annule pour $v = 1,22\pi$, le rayon de la figure de diffraction vaut $0,61\lambda/ON$ et définit la résolution latérale théorique de ce système optique[2].

$I_1(u,0)$ représente l'étalement de la figure de diffraction selon l'axe optique z, sa courbe est tracée sur la figure (2.3(b)). $I_1(u,0)$ s'annule pour $u = 4\pi$, d'où une répartition d'intensité le long de l'axe optique de largeur à mi-hauteur $2\lambda n_1/ON^2$.

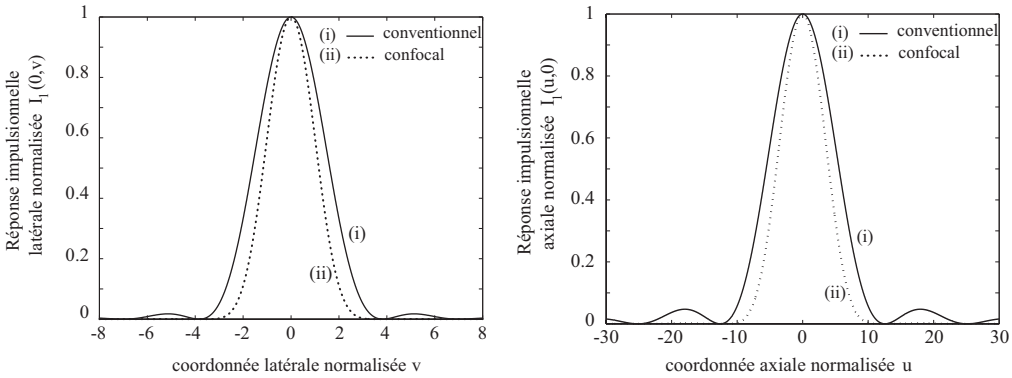
2.1.1.2 En microscopie confocale

Les études théoriques de la propagation de faisceau en configuration confocale [68] donnent les réponses impulsionnelles transverse et axiale suivantes :

$$I_{conf}(0,v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v}\right)^4 \tag{2.7}$$

$$I_{conf}(u,0) = \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right)^4 \tag{2.8}$$

Comme précédemment, le premier rayon (ou rayon de première annulation) de ces réponses définissent les résolutions latérale et axiale[3], qui sont ici respectivement : $0,44\lambda/ON$ et $1,4\lambda n_1/ON^2$. Les profils des réponses impulsionnelles d'un microscope confocal sont comparés à ceux d'un microscope conventionnel sur la figure ci-dessous.



(a) Réponses impulsionnelles latérales en microscopie (i) conventionnelle et (ii) confocale.

(b) Réponses impulsionnelles axiales en microscopie (i) conventionnelle et (ii) confocale.

FIG. 2.3 – *Réponses impulsionnelles en microscopie conventionnelle et confocale.*

[2]Les largeurs à mi-hauteur des réponses latérale et axiale conventionnelles sont respectivement $0,51\lambda/ON$ et $1.77\lambda n_1/ON^2$

[3]En microscopie confocale, les largeurs à mi-hauteur des réponses latérale et axiale sont respectivement $0,37\lambda/ON$ et $1.27\lambda n_1/ON^2$

Au vu des expressions théoriques, on remarque que le passage d'un microscope à un autre se réduit dans l'écriture des réponses impulsionnelles à une simple mise au carré. En conséquence, les résolutions en configuration confocale sont supérieures au cas de la microscopie classique à balayage. Ceci est dû à la présence d'un détecteur ponctuel, dont l'influence est détaillée mathématiquement dans l'annexe B. Cette amélioration peut se comprendre qualitativement, grâce aux figures (2.4) et (2.5), qui détaillent la propagation des faisceaux plan par plan pour chaque type de microscope et pour une source considérée ponctuelle. Quelle que soit la configuration étudiée (classique ou confocale), la succession des plans est la suivante :

Source ponctuelle S / Lentille L / Plan objet (ou intermédiaire) / Lentille L / Détecteur

Les deux montages optiques présentent donc une symétrie par rapport au plan intermédiaire, et l'on peut observer dans ce plan l'influence des différents éléments optiques sur la résolution. Pour ce faire, il suffit de calculer leurs réponses impulsionnelles normalisées dans le plan intermédiaire.
La source étant ponctuelle, elle illumine l'objet selon une répartition d'intensité fixée par la réponse impulsionnelle de la première lentille (PSF_{ill}). Le détecteur est caractérisé par une fonction masque $m(x_2, y_2)$ valant 1 sur la surface du détecteur et 0 ailleurs. La réponse impulsionnelle caractérisant la partie détection du montage, rapportée dans le plan intermédiaire, est PSF_{det}. Elle résulte de la convolution entre la fonction masque et la réponse impulsionnelle de la lentille. La réponse impulsionnelle totale est le produit de ces deux réponses.
Dans le cas classique à balayage, comme il est représenté sur la figure (2.4), le profil de PSF_{det} est similaire à une fonction rectangle à bords arrondis de valeur comprise entre 0 et 1. La multiplication fournit donc une réponse totale PSF_{tot} quasiment identique à PSF_{ill}, *i.e.* une distribution d'Airy.
Dans le cas confocal représenté sur la figure (2.5), le détecteur est ponctuel, il y a donc symétrie complète des éléments optiques et des réponses impulsionnelles : $PSF_{det} = PSF_{ill}$. Dans le plan intermédiaire, la réponse totale est donc PSF_{ill}^2, ce qui a pour conséquence de réduire l'extension spatiale de la zone détectée, et donc d'augmenter la résolution.

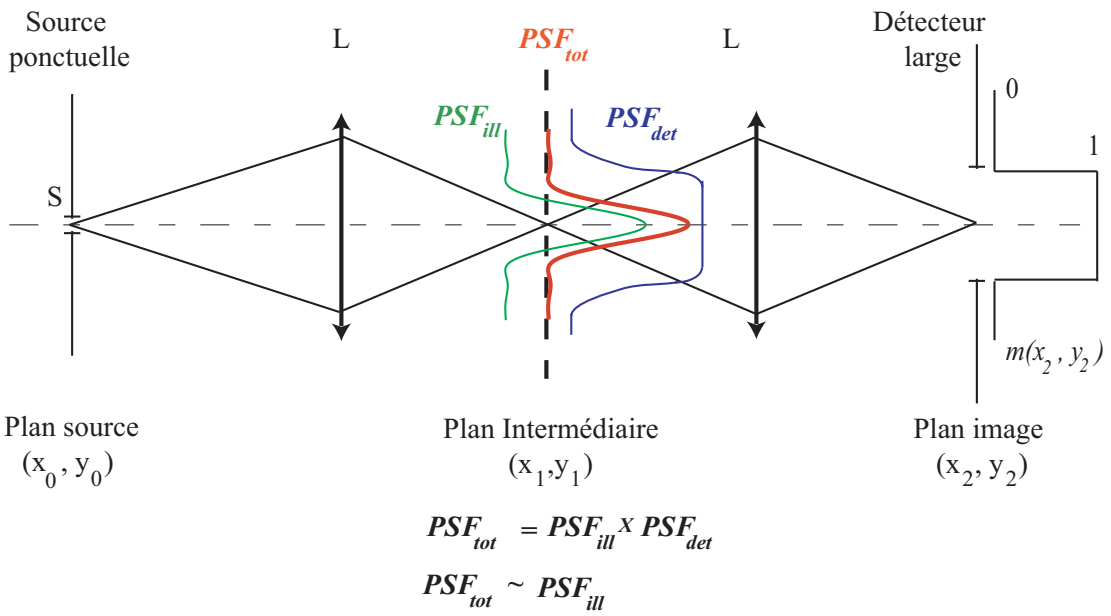


FIG. 2.4 – *Origine de l'expression de la réponse impulsionnelle en microscopie à balayage non confocale.*

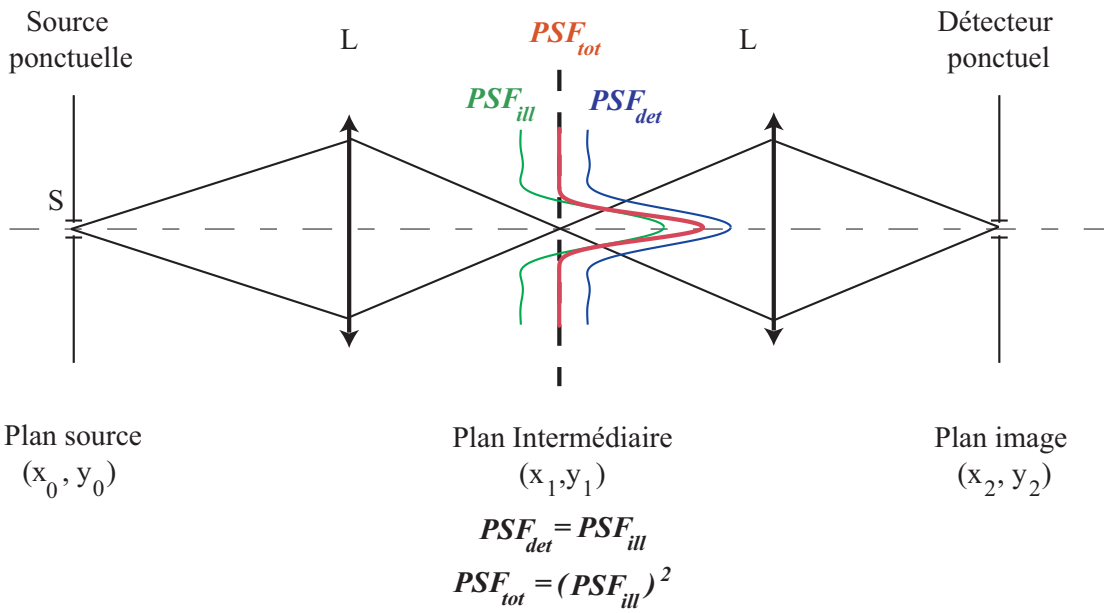


FIG. 2.5 – *Origine de l'expression de la réponse impulsionnelle en microscopie confocale. Les PSF sont légèrement décalées axialement pour plus de clarté.*

Par analogie, l'amélioration de la résolution axiale est issue du même principe.
Les montages classique et confocal à balayage utilisent les mêmes éléments optiques, avec les mêmes propriétés de diffraction. Ce n'est que le filtrage spatial réalisé par le choix de source et détecteur ponctuels, qui modifie les réponses impulsionnelles latérale et axiale des microscopes confocaux, et leur donne des performances supérieures.
L'influence de la taille du trou de détection sur la résolution axiale et latérale a été explicitement décrite par T.Wilson [69]. Les résultats de cette étude sont représentés sur la figure (2.6), indiquant les variations de la résolution latérale et axiale (largeurs à mi-hauteur des réponses impulsionnelles en intensité décrites en (2.8) et (2.7)) en fonction de la variable normalisée v_p. Celle-ci prend en compte la longueur d'onde λ collectée, le grandissement γ_2 et l'ouverture numérique ON_2 de la lentille secondaire vue depuis l'objet, ainsi que le rayon r_d du trou devant le détecteur, selon l'expression suivante :

$$v_p = \frac{2\pi}{\lambda}\, r_d\, \frac{ON_2}{\gamma_2} \tag{2.9}$$

Si le diamètre du détecteur devient important tel que $v_p > 4$ le filtrage conditionnant la confocalité perd de son efficacité et la discrimination en z est dégradée (figure 2.6 b)). A l'inverse, un détecteur excessivement petit réduit la quantité de lumière détectée et diminue le rapport signal à bruit du dispositif.

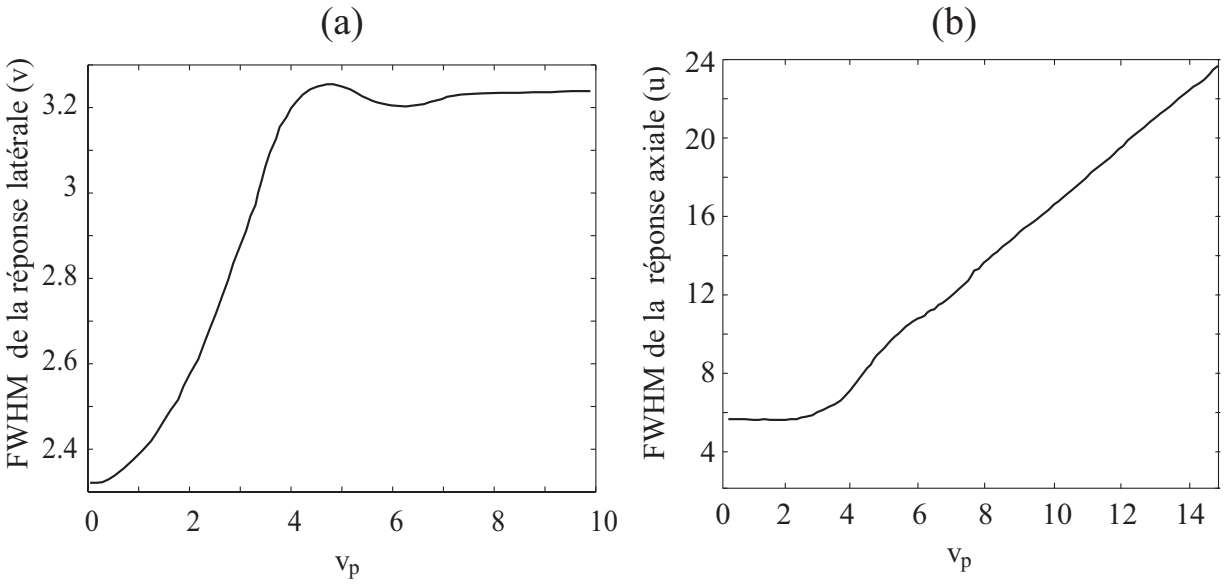


FIG. 2.6 – *Influence de la taille du trou de détection sur la résolution axiale et latérale du microscope [69].*

Grâce à ces caractéristiques (haute résolution, meilleur contraste), le microscope confocal est actuellement l'outil d'investigation par imagerie le plus répandu en biologie. Nous souhaitons insérer sur ce type d'outil le continuum de lumière caractérisé au chapitre 1. Il s'agit de proposer un montage entièrement versatile en longueur d'onde, depuis la sélection de fines bandes spectrales parmi le continuum, pour exciter le ou les fluorophores, jusqu'à la détection de la fluorescence. Ainsi, le biologiste pourra choisir d'utiliser tel ou tel fluorophore non pas pour son adéquation à une source optique, mais uniquement pour ses propriétés biochimiques particulières.

2.2 Description du montage

Après la génération du continuum de lumière, le premier élément du microscope confocal est un filtre acousto-optique assurant la sélection électronique de la ou des longueurs d'onde illuminant l'échantillon. Nous détaillerons les caractéristiques de cette sélection (rendement de diffraction, sélectivité spectrale, vitesse de commutation) avant d'aborder la description du microscope proprement dit.

2.2.1 Sélection spectrale

Le choix d'un filtre acousto-optique (Acousto Optic Tunable Filter, AOTF) comme élément de sélection spectrale a été argumenté au chapitre 1 (§1.4.2). Ce filtre isole une bande spectrale parmi l'ensemble du continuum avec un meilleur rendement et une configuration de travail plus simple qu'un réseau physique.
Un AOTF est constitué d'un transducteur piézo-électrique qui génère, lorsqu'il est alimenté par un signal électrique radiofréquence, une onde de compression haute fréquence très intense dans le cristal de quartz ou de dioxyde de tellure (TeO_2) qui lui est acollé. Cette compression altère localement l'indice de réfraction du milieu. Le cristal parcouru par l'onde acoustique contient alors un réseau de phase, permettant par diffraction, de séparer les longueurs d'onde avec un rendement très élevé (cf. figure 2.7). L'angle de diffraction, appelé angle de Bragg, dépend de la longueur d'onde optique λ, de la longueur d'onde acoustique Λ, et de la vitesse v du son dans le cristal selon la relation suivante [70], dite d'accord de Bragg :

$$\sin\theta_{bragg} = \frac{\lambda}{2\Lambda} = \frac{\lambda f}{2v} \tag{2.10}$$

Pour travailler dans la même configuration spatiale, c'est-à-dire pour collecter le faisceau sélectionné selon un angle fixe, il suffit de modifier la fréquence acoustique du générateur[4]. En effet, à angle θ_{bragg} constant, une radio-fréquence RF f donnée correspond à une longueur d'onde λ sélectionnée à $+\Delta\lambda$ près (cf.figure 2.7). La sélection spectrale s'effectue donc uniquement par la sélection électronique de la fréquence du signal RF.

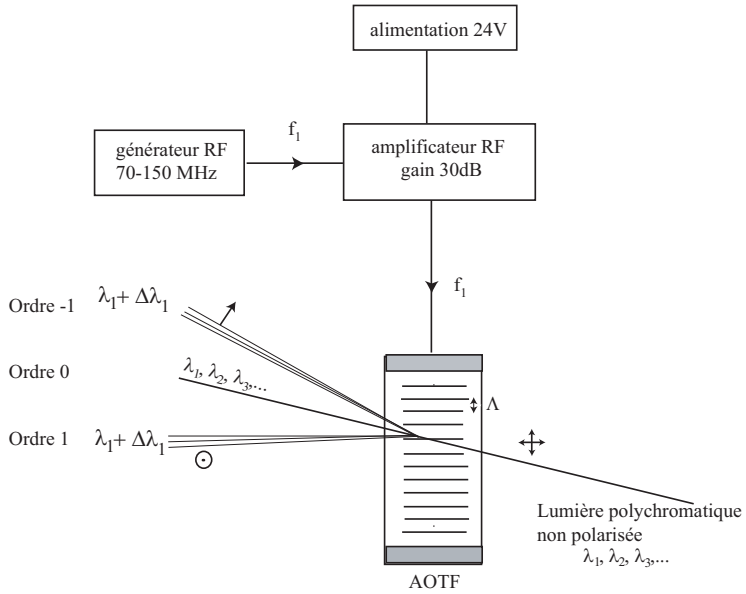


FIG. 2.7 – *Schéma de l'alimentation et du fonctionnement d'un AOTF.*

Le choix de l'AOTF a été dicté par la plage spectrale de fonctionnement, ici le visible-proche infra-rouge, et par une efficacité de diffraction maximale. Le filtre choisi est un AOTF [5] optimisé pour la gamme spectrale [400 ;700] nm, piloté par un générateur de radio-fréquences (RF) pour des signaux allant de 70 MHz à 150 MHz. Le cristal de l'AOTF est taillé de telle façon que les ordres 1 et -1 supportent des polarisations complémentaires. Il suffit ainsi de polariser linéairement le faisceau incident suivant l'une ou l'autre des deux directions de base pour bénéficier d'un rendement maximum sur un ordre choisi. La mesure de l'efficacité η de l'AOTF seul a été effectuée à l'aide d'un laser Hélium-Néon polarisé linéairement de telle sorte à favoriser l'ordre +1. Le rapport entre la puissance P_1 dans l'ordre +1 et la puissance incidente P_0 donne :

$$\eta = \frac{P_1}{P_0} = 80\% \tag{2.11}$$

[4]En toute rigueur, dans une cellule acousto-optique classique, tout changement d'angle de Bragg doit être accompagné d'une réorientation du cristal par rapport au faisceau incident, pour réobtenir une efficacité de diffraction élevée. Dans le cas d'un AOTF, ce dernier réglage n'est pas à faire.

[5]AOTF.nC, $AAOptolectronique$, France

L'avantage de notre montage est qu'il n'y a peu de pertes de puissance dans le continuum dues à la traversée d'un polariseur puisque le continuum est généré essentiellement selon une seule direction de polarisation grâce au profil de la fibre microstructurée (cf.§1.5.1), et que l'orientation par rapport à la ligne de base de l'AOTF s'ajuste par simple rotation de la fibre sur son support.

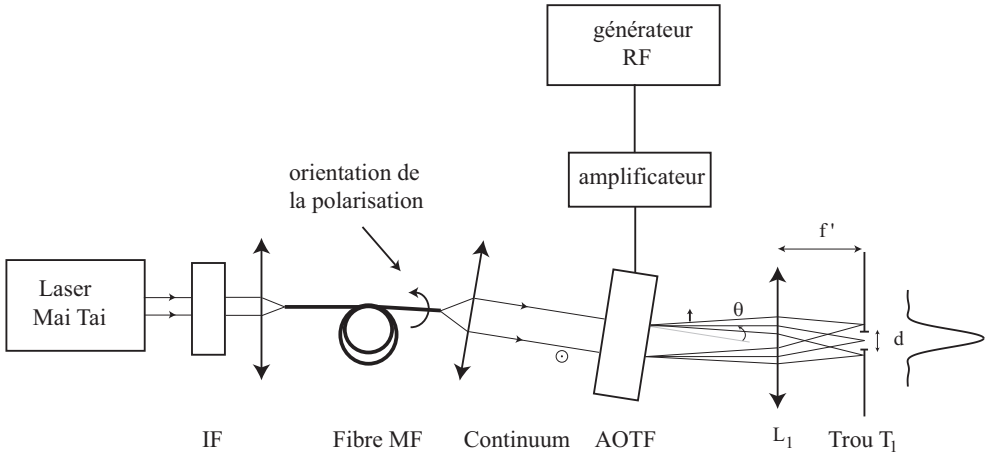


FIG. 2.8 – *Schéma du montage utilisé pour réaliser une sélection spectrale parmi le continuum.*

En pratique, comme le montre la figure (2.8), le continuum de lumière est tout d'abord collimaté puis traverse l'AOTF. Celui-ci est orienté par rapport à l'axe optique de telle façon que le faisceau diffracté dans l'ordre +1 soit colinéaire à l'axe du banc optique en aval.

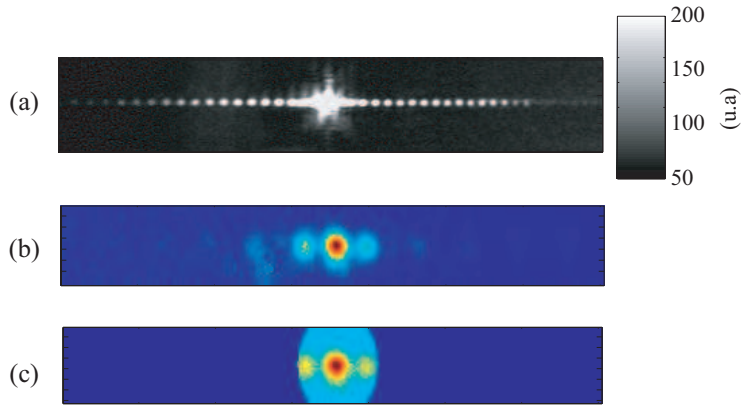


FIG. 2.9 – *(a) Image CCD au foyer d'une lentille du profil spectral de l'ordre 1 du réseau acoustique illuminé par le continuum, avec $\lambda_{selection} = 600\ nm$, (b) Intercalage d'une densité et agrandissement, (c) Masque numérique équivalent à un diamètre de 100 μm placé sur l'ordre 1.*

Dans l'ordre +1, on ne retrouve qu'une très étroite partie du spectre du continuum, contrairement à un réseau physique mince où le spectre complet est diffracté dans chacun des ordres.

L'image (2.9.a.) est obtenue en plaçant une caméra CCD au foyer d'une lentille interceptant l'ordre +1 issu de l'AOTF. Nous observons un profil spectral du type $sinc^2$, et dont la largeur à mi-hauteur est mesurée, sur la figure (2.9.b.) à 20 μm, soit en tenant compte de la focale de la lentille et de la loi de Bragg, une largeur de 0.5 nm. Le trou T_1 de diamètre $100\ \mu m$ sur lequel est focalisé ce spectre filtre les lobes secondaires et épure finement le spectre du faisceau. Nous ne filtrons pas les deux bandes latérales les plus proches du pic central pour conserver un maximum de puissance. La largeur de la bande spectrale transmise par le trou est de alors de 2 nm environ, comme nous le verrons ci-après. L'ensemble {AOTF+L_1+T_1} a ainsi la fonction d'un *monochromateur*, dont la résolution spectrale est déterminée par la réponse impulsionnelle du réseau de phase.

Dans un premier temps, il s'agit de connaître la règle de sélection spectrale que l'on utilisera par la suite, c'est-à-dire la correspondance fréquence acoustique-longueur d'onde optique sélectionnée. Pour ce faire, on illumine l'AOTF par le continuum et on place un spectromètre à la sortie du monochromateur, derrière le trou T_1. En faisant varier la fréquence du signal délivré par le générateur RF, on relève la courbe ci-dessous (fig.2.10.a.). On dispose ainsi des fréquences de commande à utiliser pour obtenir n'importe quelle bande $\lambda \pm \frac{\Delta\lambda}{2}$ parmi le spectre du continuum.

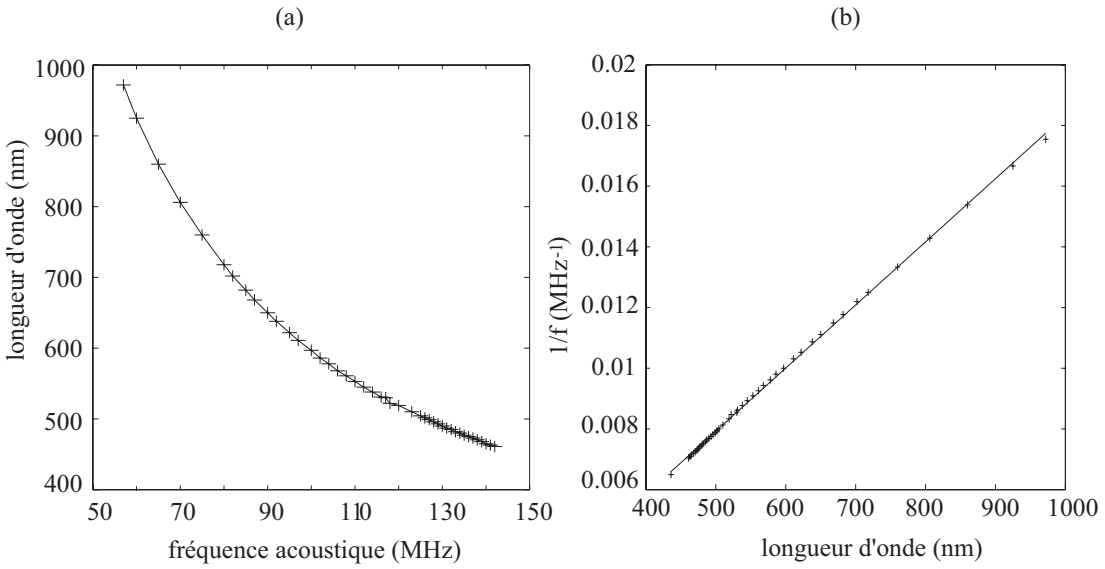


FIG. 2.10 – *Sélection spectrale par monochromateur acousto-optique : correspondance fréquence RF du générateur-longueur d'onde sélectionnée.*

Cette relation fréquence RF-longueur d'onde sélectionnée vérifie bien la relation de Bragg, car la courbe $1/f$ en fonction de λ est bien une droite (figure 2.10.b.). Les points expérimentaux se distribuent sur la courbe théorique avec une précision de 2% sur la gamme [420 ;970] nm,

plus large que celle spécifiée par le constructeur.
Dans un deuxième temps, nous avons mesuré la résolution spectrale de ce monochromateur, c'est-à-dire la largeur $\Delta\lambda$ de la bande spectrale sélectionnée en fonction de λ. Nous choisissons d'illuminer l'AOTF avec un faisceau de spectre très étroit, considéré comme une distribution de Dirac et de relever la largeur de la bande de fréquences RF pendant laquelle le signal optique après le monochromateur est d'intensité non nulle. Lorsque l'AOTF est placé sous l'illumination du laser MaiTai en mode non verrouillé en phase ($\lambda = 755\ nm$), la réponse enregistrée au cours d'un balayage en fréquences par une photodiode placée derrière le trou T_1, a la forme suivante (fig. 2.11) :

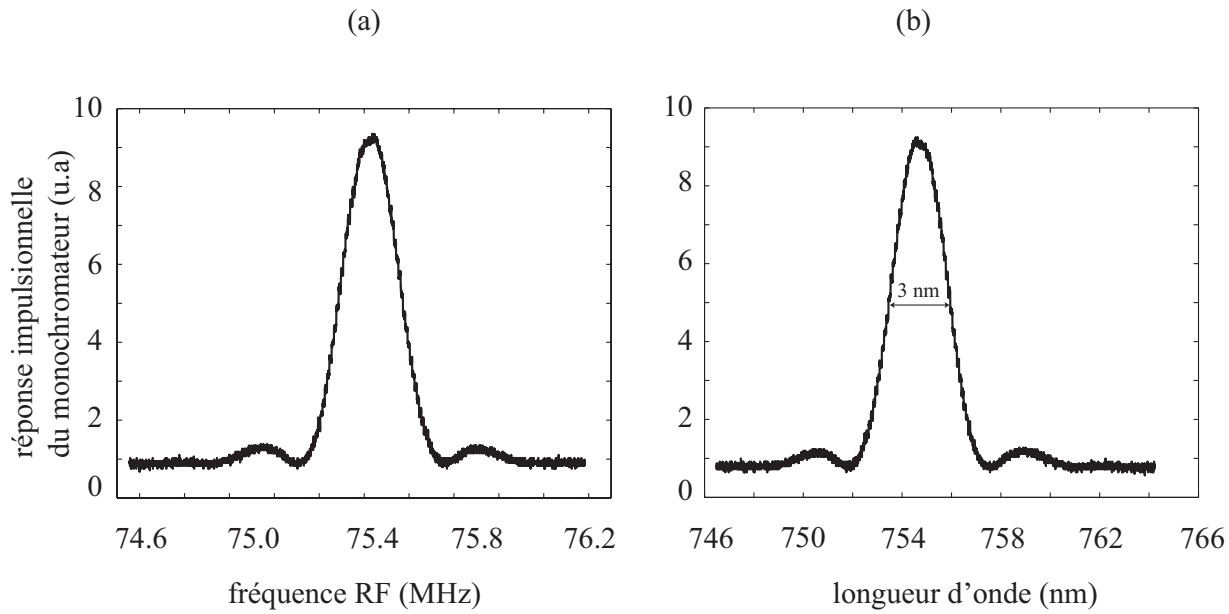


FIG. 2.11 – *(a) Réponse impulsionnelle du monochromateur à 755 nm (laser MaiTai en mode non verrouillé en phase) au cours d'un balayage en fréquence RF, (b) affichage en longueur d'onde.*

D'après la loi de correspondance f_{RF}-λ établie précédemment, cette courbe peut être tracée en fonction des longueurs d'onde optiques. On obtient ainsi la réponse impulsionnelle de l'ensemble {AOTF+L_1+T_1}. Le rapport d'amplitude entre le pic central et le premier pic est de $5,8.10^{-2}$, soit un rapport de -13 dB. Cette courbe a donc bien la forme en $sinc^2$ proposé par le constructeur, relative à la fonction de transfert rectangulaire du champ acoustique. La résolution spectrale du système se définit comme la largeur à mi-hauteur de cette réponse, soit ici 3 nm à

755 nm. Mais cette résolution spectrale dépend de la longueur d'onde. En effet, la largeur de la bande collectée par le trou T_1 dépend de l'angle d'incidence des différentes longueurs d'onde sur la lentille L_1. Pour établir la relation $\Delta\lambda$ en fonction de $\Delta\theta$, on différentie la loi de Bragg (équation 2.10) selon :

$$\Delta\lambda = \frac{2v\cos\theta}{f}\Delta\theta \tag{2.12}$$

Or, d'après la figure (2.8),

$$\Delta\theta \sim \tan\theta = \frac{d}{f'} \tag{2.13}$$

où d est le diamètre du trou T_1 et f' est la longueur focale de la lentille L_1. On en déduit que la largeur $\Delta\lambda$ de la bande spectrale dépend de λ selon la relation 2.14 :

$$\Delta\lambda = \frac{2v}{f'}\frac{d}{f}\cos\theta \tag{2.14}$$

Le trou T_1 et la lentille L_1 gardent une position identique quelle que soit la longueur d'onde λ sélectionnée, l'angle θ est donc constant. Et comme le rapport $\frac{v}{f}$ est proportionnel à λ d'après la loi de Bragg, on en déduit que :

$$\Delta\lambda = \frac{\lambda}{\mathcal{R}} \tag{2.15}$$

Le coefficient de proportionnalité $\mathcal{R}$, *i.e.* la résolution, est donné par la mesure précédente, où $\Delta\lambda = 3\ nm$ pour $\lambda = 755\ nm$, soit $\mathcal{R} = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = 250$. La figure (2.12 .a.) représente l'ensemble des réponses impulsionnelles calculées pour différentes longueurs d'onde incidentes. Chaque trace est un $sinc^2$ dont la position du pic central dans l'espace ($f_{RF} - \lambda_{selection}$) suit la loi de Bragg vérifiée précédemment (fig.2.10). La courbe (2.12 .b.) présente la résolution spectrale du monochromateur sur la gamme de longueurs d'onde utilisées, d'après la relation (2.15).

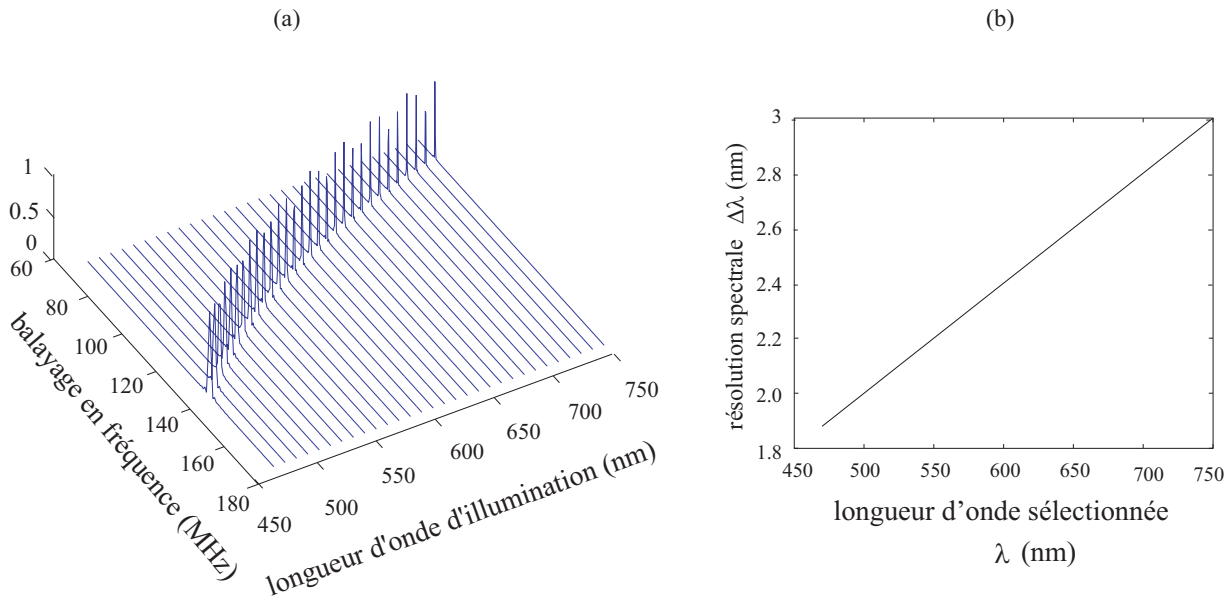


FIG. 2.12 – *(a) Réponses impulsionnelles du monochromateur calculées pour l'ensemble du spectre, (b) Résolution spectrale du monochromateur en fonction de la longueur d'onde sélectionnée.*

La résolution est donc d'autant meilleure que la longueur d'onde est courte.
Le dernier point à aborder est le temps de commutation de l'AOTF. Dans un processus d'imagerie point à point tel que la microscopie confocale, le temps d'acquisition d'une image est dû à la somme d'un certain nombre de temps d'attente pendant lesquels s'effectuent la sélection de la longueur d'onde adéquate, le déplacement de l'échantillon ou d'orientation du faisceau, l'intégration du signal, puis l'acquisition de celui-ci. Réduire la durée d'exécution d'un de ces ordres permet de réduire le temps d'acquisition d'une image. Pour estimer le temps de la mise en place de l'onde acoustique dans le cristal, l'AOTF est soumis à un échelon de tension (signal acoustique composé de "burst") donnant la consigne de l'établissement ou non du réseau acoustique, et est illuminé par un faisceau optique issu d'un laser Helium Néon à 632 nm. Nous observons sur l'ordre +1 de l'AOTF l'arrivée du signal optique sur une photodiode rapide. Nous obtenons la courbe (2.13). Le temps de montée t_r du signal optique entre 10 et 90 $\%$ est de $1,2$ μs, soit une bande passante de 130 kHz.

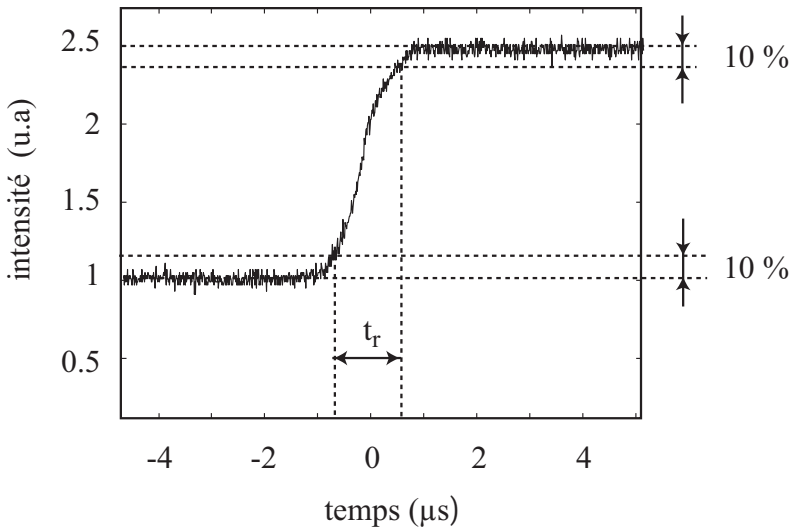


FIG. 2.13 – *Mesure du temps de montée de l'AOTF : réponse à un échelon de tension.*

Ce système de sélection spectrale par élément acousto-optique présente ainsi de nombreux avantages :

- des pertes de puissance minimales
- un fort pouvoir sélectif en longueur d'onde
- une grande bande passante
- capacité de sélectionner simultanément plusieurs longueurs d'onde
- aucun mouvement mécanique nécessaire pour modifier la ou les longueurs d'onde
- une rapidité de sélection
- un seuil de dommage élevé pour résister à l'incidence de faisceaux puissants

2.2.2 Montage optique

Le laboratoire ne disposant pas de microscope confocal sur lequel le continuum aurait pu être inséré, nous proposons le montage complet suivant (fig 2.14) :

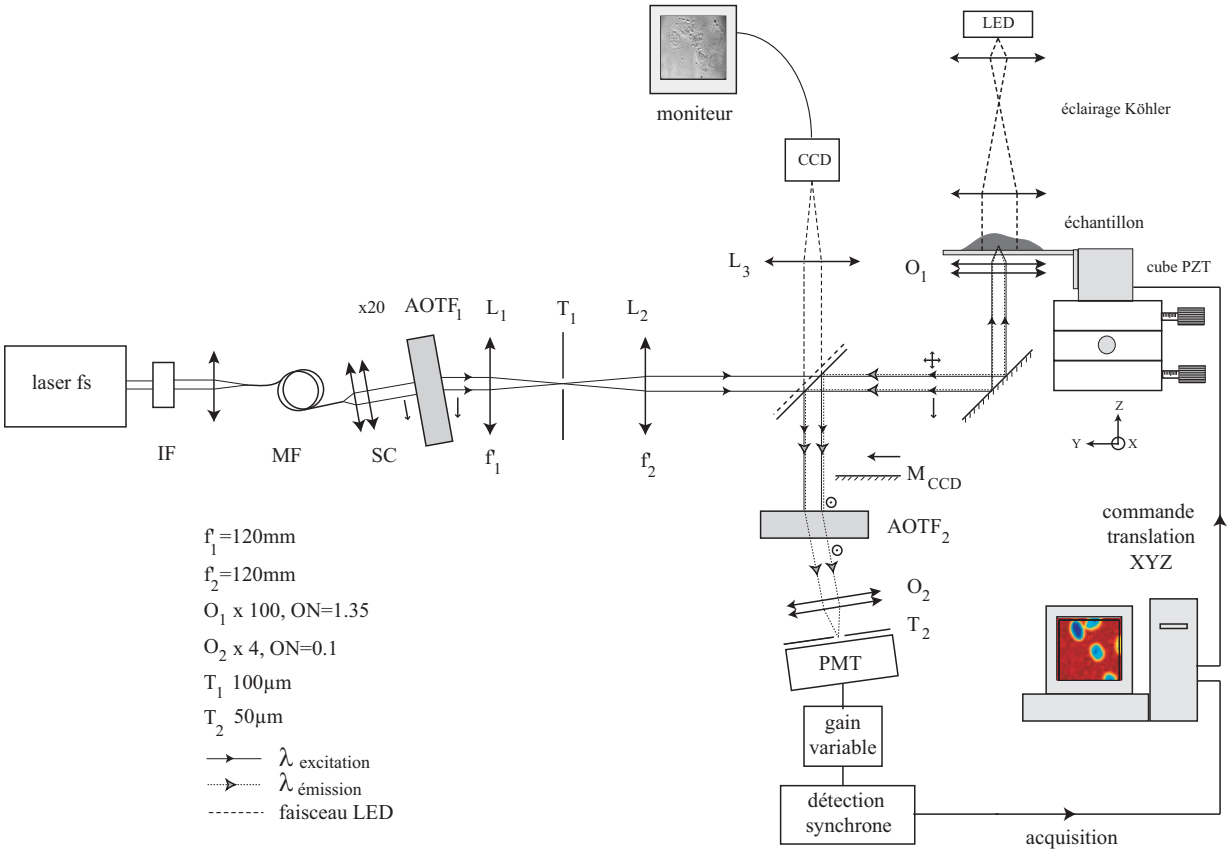


FIG. 2.14 – *Schéma de principe du microscope confocal réalisé*

Le continuum (SC) est tout d'abord collimaté avant d'être filtré par l'AOTF$_1$. Nous collectons dans l'ordre 1 la longueur d'onde d'excitation choisie. Le faisceau est filtré spectralement de manière fine grâce à l'ensemble lentille L_1 et trou T_1, puis il est élargi spatialement par la lentille L_2. Le diamètre du faisceau est alors rendu similaire au diamètre de la pupille d'entrée de l'objectif imageur O_1, pour assurer une utilisation optimale de son ouverture numérique (ON=1,35, immersion à l'huile). Le faisceau, polarisé horizontalement, traverse une lame séparatrice de polarisation large bande 90/10, puis est focalisé sur l'échantillon. Celui-ci est fixé sur un porte-échantillon dont la position est réglée par trois platines de translation et dont le déplacement XYZ est contrôlé par un cube piézo-électrique (PZT) commandé informatiquement. Le signal de fluorescence ainsi que le signal d'excitation diffusés dans le cône de collection de l'objectif imageur sont collimatés par O_1, sont réfléchis par la lame séparatrice. La polarisation verticale est réfléchie de manière préférentielle, avec une efficacité de 90%. Les deux faisceaux traversent un deuxième filtre acousto-optique $AOTF_2$, afin d'assurer la détection de la fluorescence seule, qui est diffractée préférentiellement dans l'ordre -1, représenté sur le schéma. Un

ensemble {objectif O_2+trou T_2} forme le deuxième système de filtrage[6], juste avant un photodétecteur.
Le signal de fluorescence est un signal à bas flux nécessitant l'utilisation d'un détecteur sensible. Nous choisissons un photomultiplicateur équipé d'un gain ajustable [7]. Le signal obtenu est entaché de bruits décorrélés de la fluorescence (bruit ambiant et électronique) altérant de manière très importante la qualité de l'information. Une commande spécifique de l'AOTF$_1$ permet de moduler le faisceau d'excitation : le signal de fluorescence l'est donc également, à la même fréquence. Un boîtier de détection synchrone placé après le photomultiplicateur fournit un signal de fluorescence démodulé et affranchi de la plus grande partie du bruit.
Pour visualiser le placement des échantillons sous le faisceau d'illumination avant l'enregistrement, nous ajoutons un système d'éclairage de Köhler. L'échantillon est éclairé de façon uniforme par une LED blanche. L'objectif O_1 fait l'image de la zone éclairée sur une caméra CCD. Cette image est renvoyée grâce au miroir M_{CCD} à placer devant le filtre $AOTF_2$, puis est agrandie par une lentille L_3 d'une dizaine de cm de distance focale. La position de la caméra est telle que lorsque la configuration confocale est ajustée, l'image du plan objet pointé par l'objectif O_1 est nette sur l'écran vidéo. Ce système d'imagerie sur caméra nous fournit ainsi une image agrandie de la zone de l'échantillon placée dans le plan focal de l'objectif O_1.

Préalablement à l'imagerie, nous avons quantifié les résolutions spatiale et spectrale atteintes avec notre dispositif.

2.3 Caractérisation du microscope : résolutions spatiale et spectrale

La résolution spatiale du microscope correspond aux dimensions de la PSF_{tot}. La mesure de celles-ci nécessite en toute rigueur l'utilisation d'un objet ponctuel. N'ayant pas employé ce type d'objets (billes d'or par exemple), nous n'avons accès qu'à une information indirecte sur la résolution.

2.3.1 Résolution latérale

Nous déterminons ci-dessus la largeur de la PSF_{ill} en mesurant la largeur à mi-hauteur de la figure de diffraction de l'objectif illuminé dans nos conditions expérimentales. En plaçant un

[6]cf. §2.1 Principe du microscope confocal
[7]PMT H6573, gamme spectrale [185 ;850 nm], Hamamatsu, Japan

miroir dans le plan de focalisation, on visualise sur la caméra CCD l'image de la tache d'excitation fixée par l'objectif imageur O_1. Celle-ci est reproduite sur la figure (2.16). Pour déterminer ses dimensions, il suffit d'établir une correspondance pixels CCD $\leftrightarrow$ microns, en réalisant une image d'un objet calibré. Nous utilisons une mire gravée sur un support de silicium : l'image en transmission de cette mire est représentée sur la figure (2.15.a.). Ce type d'objet est obtenu en quelques étapes qui sont : le dépôt d'une résine photosensible sur toute la surface de la plaque de silicium appelé $wafer$, la fabrication d'un masque en silicium oxydé (SiO_2) représentant le motif voulu, l'insolation UV de l'ensemble wafer enduit + masque, le développement de la résine puis l'attaque chimique au KOH pour graver le silicium en profondeur sur les zones non protégées par le masque. Les zones brillantes de la figure (2.15.a.) ont été gravées et sont transparentes, tandis que les zones sombres correspondent à du silicium non gravé, opaque. Avec cet échantillon, nous disposons d'un objet de contraste optimal, et d'un motif de période $8\ \mu m$ avec une précision sur cette valeur supérieure au millième. Le signal vidéo de la caméra nous fournit un profil de l'image du motif, tracé sur la figure (2.15.b.). La connaissance de la période du motif permet de convertir l'axe d'échantillonnage de la caméra en μm et conduit ainsi à la détermination de la taille du spot d'excitation.

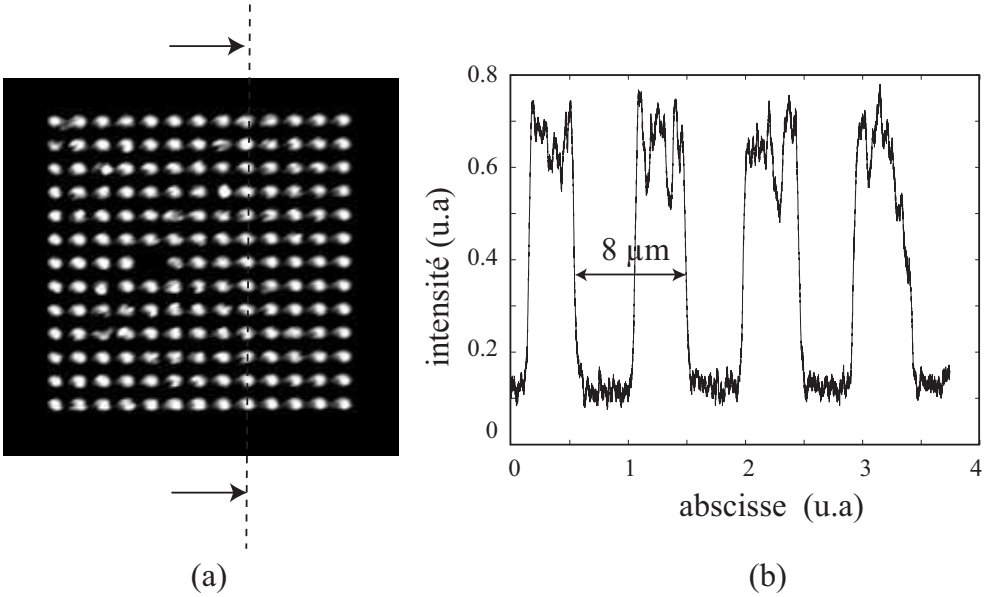


FIG. 2.15 – *Image en transmission d'une mire sur silicium placé sous l'éclairage Köhler et signal vidéo d'une ligne profil de cette image pour la calibration en μm d'une image caméra.*

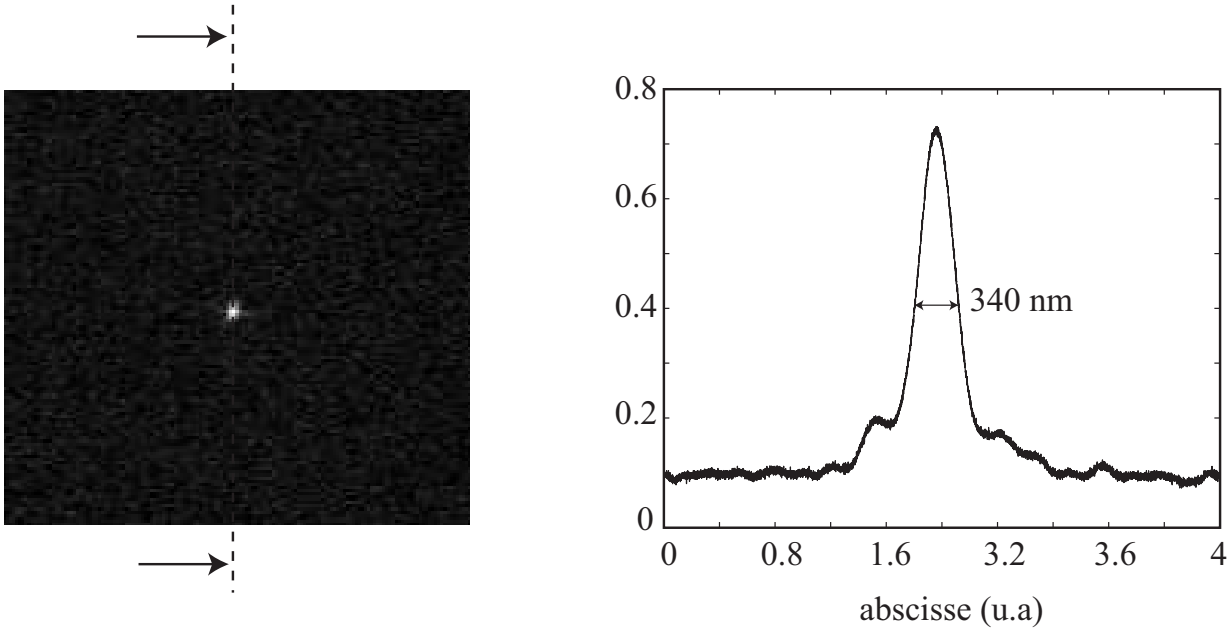


FIG. 2.16 – *Image de la tache de focalisation donné par l'objectif imageur O_1 et profil obtenu par lecture du signal vidéo.*

La largeur à mi-hauteur du spot d'illumination est mesurée à $340\ nm \pm 2\ nm$. La lecture de la périodicité de la mire et de la taille du spot sont les principales sources d'erreur. Pour comparer ce résultat à la résolution attendue, il est impossible d'utiliser les expressions théoriques usuelles rappelées au paragraphe 2.1.1.2, car celles-ci sont calculées dans le cas d'une source ponctuelle et d'un objet ponctuel. Le cas d'une source "large" et d'un objet plan est abordé dans l'annexe B : il en résulte que la distribution transverse détectée est en champ, la convolution dans le plan de l'échantillon, de la fonction décrivant la source et de la réponse impulsionnelle du système dans le cas où la source est ponctuelle et l'objet plan, soit encore la convolution entre une fonction disque et une fonction de Bessel. Pour estimer l'élargissement introduit par cette convolution, il faut quantifier la largeur du disque, c'est-à-dire la largeur de la source vue depuis l'objet ; ainsi que la largeur de la fonction de Bessel.

– D'après la figure (2.9.c.), on peut estimer le diamètre du lobe central du faisceau source à $20\ \mu m$. Le grandissement du système optique entre la source et le plan objet est $\gamma_{tot} = f'_{objectif}/f'_{L_2}$ soit lors de cette mesure $\gamma_{tot} \simeq 1/200$. La largeur de la fonction disque est

donc évaluée à $100\ nm$.

– La fonction de Bessel traduisant la réponse impulsionnelle du système composé d'une source ponctuelle et d'un objet plan s'écrit :

$$\left[\frac{2J_1(\frac{2\pi}{\lambda}ON\ r)}{\frac{2\pi}{\lambda}ON\ r}\right]$$

La largeur à mi-hauteur de cette courbe est estimée à 290 nm.

La convolution de ces deux fonctions fournit une réponse en champ de largeur à mi-hauteur de l'ordre de 390 nm. La réponse en intensité présente donc une largeur légèrement réduite.
L'ordre de grandeur de la largeur de la réponse expérimentale (340 nm) est ainsi vérifié. On peut raisonnablement supposer que la résolution latérale de notre montage est proche de la théorie soit $0.51\lambda/ON \simeq 210\ nm$

2.3.2 Résolution axiale

Le volume d'illumination est approximativement un ellispoïde dont le grand axe est colinéaire à l'axe optique Z. Lors d'un déplacement selon cet axe, un échantillon plan, tel qu'un miroir, traverse l'ellispoïde selon son grand axe. En enregistrant le signal réfléchi par le miroir au cours de sa translation selon l'axe optique, nous obtenons la courbe suivante (fig.2.17) où l'on vérifie bien une augmentation du signal de réflexion, l'atteinte d'un maximum puis la décroissance du signal. Cette courbe représente la réponse axiale du microscope à un objet plan.

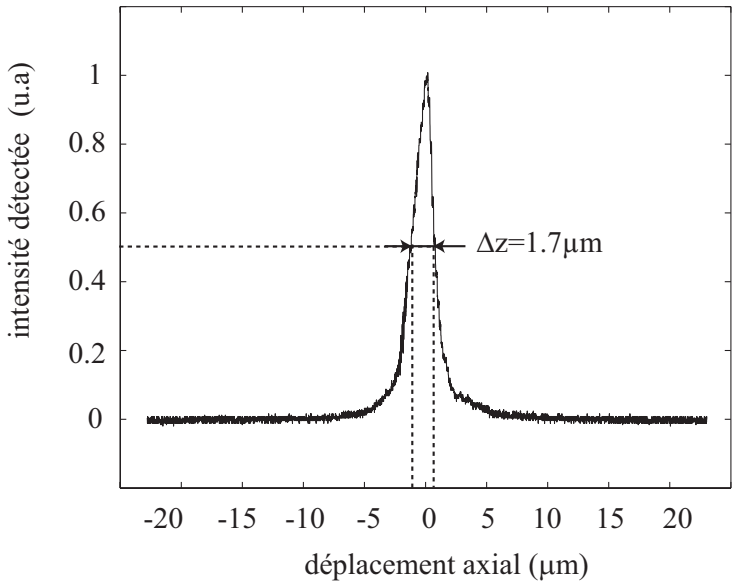


FIG. 2.17 – *Mesure de la réponse axiale du microscope confocal équipé d'un objectif* $\times 100$ *à un objet plan : enregistrement du signal à* $\lambda = 550\ nm$ *réfléchi par un miroir plan en translation selon l'axe optique.*

La largeur à mi-hauteur de cette courbe est ici de $1,70 \pm 0,05\ \mu m$.
Pour les mêmes raisons que précédemment (l'objet n'est pas ponctuel), cette dimension ne peut être comparée à la résolution axiale théorique classiquement utilisée. On peut dire néanmoins que la réponse impulsionnelle axiale en champ correspondant à un système composé d'une source ponctuelle et d'un objet plan est un sinus cardinal s'écrivant $\frac{\sin(u/4)}{u/4}$ avec $u = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{ON^2}{n}\ z$. Sa largeur à mi-hauteur est évaluée à $1,1\ \mu m$. Deux phénomènes peuvent être à l'origine de l'élargissement de cette réponse en champ : il faut prendre en compte d'une part l'étendue de la source, et d'autre part, les aberrations sphériques introduites par l'objectif de focalisation sur le détecteur[8]. La réponse impulsionnelle en intensité du montage complet est ainsi nécessairement élargie.

2.3.3 Résolution spectrale

Comme il l'est indiqué sur le schéma du microscope (figure 2.14), deux AOTF sont utilisés : l'un pour la sélection des raies spectrales d'excitation des fluorophores, et l'autre pour la sélection des raies d'émission parmi l'ensemble de la lumière collectée au niveau de l'échantillon. Ces deux filtres ont les mêmes caractéristiques, la résolution spectrale du filtrage en émission est donc identique à celle du filtrage en excitation, soit de l'ordre de $2\ nm$ (cf. figure 2.12). A titre

[8]Cet objectif n'est pas optimisé pour notre configuration de travail $\infty/foyer$. L'estimation des aberrations sphériques qui le caractérisent montre cependant qu'elles restent faibles.

de vérification du bon positionnement et du bon fonctionnement de l'AOTF$_2$, quelques gouttes de Rhodamine B déposées sur une lamelle de microscope sont placées sur le porte-échantillon. Avec une excitation à $\lambda = 543\ nm$, et un balayage en fréquence de la commande du deuxième AOTF, nous enregistrons le spectre d'émission de la Rhodamine B. Celui-ci est représenté sur la figure (2.18) et se superpose très exactement au spectre publié dans la littérature.

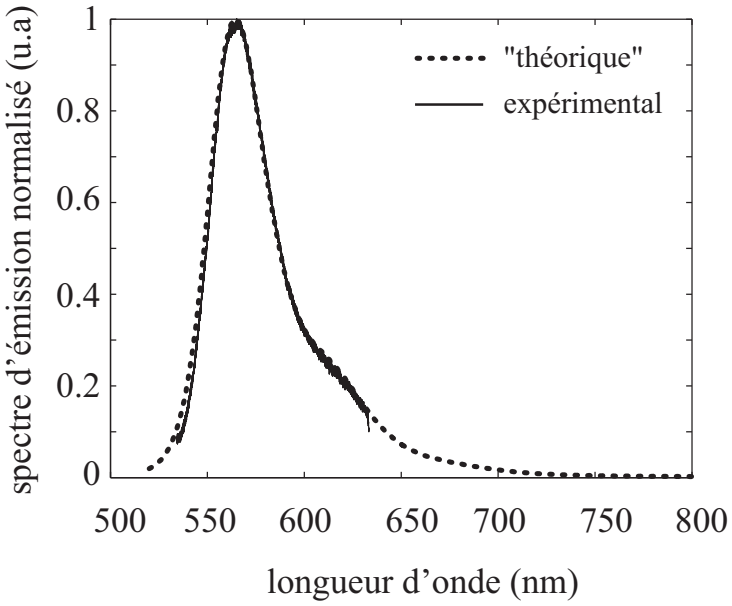


FIG. 2.18 – *Spectres d'émission de la Rhodamine B (excitation à $543\ nm$) : publié dans la littérature (en pointillés) et expérimental (en trait plein) obtenu par balayage en fréquences de l'AOTF$_2$.*

Le système de sélection spectrale en émission de fluorescence est donc tout à fait opérationnel.

2.4 Imagerie confocale en mode réflexion

Les premiers tests de notre système ont consisté en l'imagerie d'objets 2D et 3D réfléchissants et non fluorescents pour écarter tout problème lié à la détection de signal à bas flux. Le déplacement de l'échantillon sous le faisceau d'illumination est assuré par la commande électronique d'un cube piézo-électrique[9] de course $100\ \mu m$ et de pas minimal $1,5\ nm$, selon les trois axes X,Y et Z. La répétabilité sur le positionnement est de 25 nm.

[9]P-611.3-S, $Nanocube$® XYZ PiezoNanopositionning Systems, Physike Instrumente

L'échantillon bidimensionnel utilisé est une mire de silicium de période $8\ \mu m$, identique à celle décrite dans le paragraphe précédent. Une image confocale de cet objet est reproduite sur la figure (2.19). Le champ d'observation est d'environ $20 \times 20\ \mu m^2$ et le déplacement élémentaire de l'échantillon dans les deux directions du plan est de $230\ nm$:

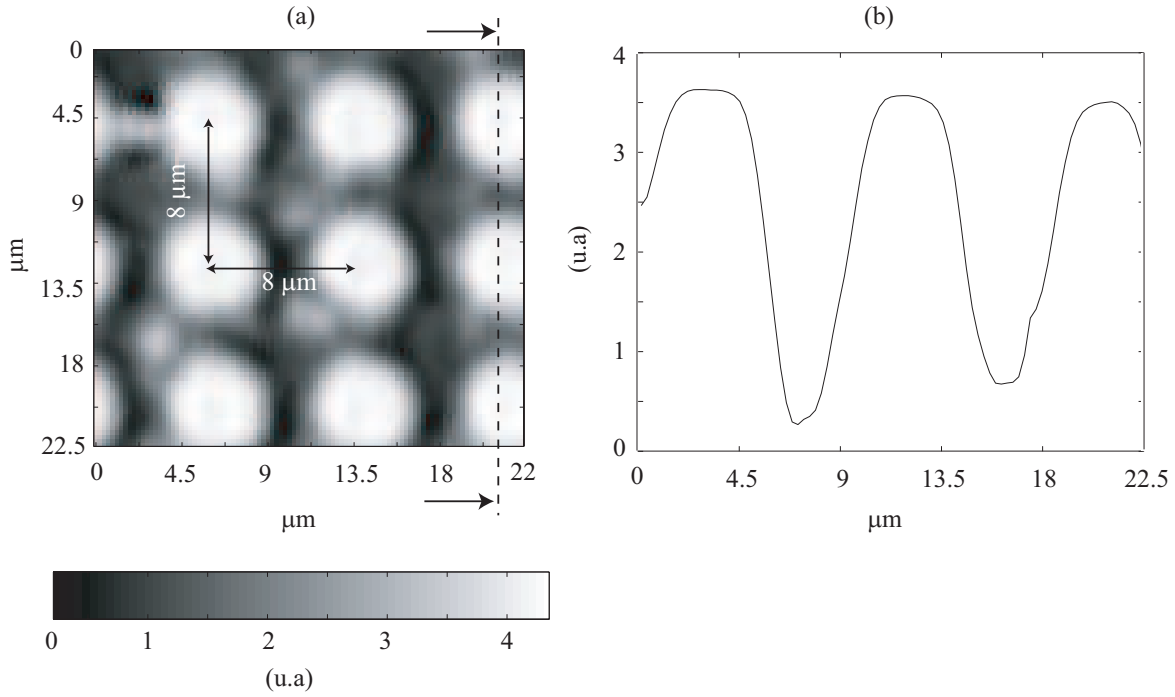


FIG. 2.19 – *(a) Image confocale bidimensionnelle d'une mire silicium réflechissante de période $8\ \mu m$ ($\sim 20 \times 20\ \mu m^2$, pas de 230 nm, $\lambda = 550\ nm$, objectif $\times 100$) et (b) ligne profil de l'image.*

Les zones blanches et sombres correspondent respectivement aux parties transparentes et opaques de l'échantillon. On vérifie tout d'abord la très grande similarité entre cette figure et l'image en transmission donnée par la caméra (fig.2.15.a.). Les zones brillantes apparaissent rondes, et sont caractéristiques du phénomène de sous-gravure existant lors de l'attaque chimique du silicium par le KOH. Les dimensions spatiales de l'image sont reliées au nombre de pas élémentaires réalisés par le cube piézo-électrique au cours de la commande de translation ; d'après la correspondance nombre de pas $\longleftrightarrow$ microns du cube, la périodicité du motif est estimée à $8,05\ \mu m \pm 0,03 \mu m$ à l'erreur de lecture près sur la position des motifs. Sachant que la résolution latérale du microscope est de $0,34\ \mu m$, cette mesure est en excellente concordance avec la valeur attendue et conforte le bon fonctionnement et le bon étalonnage du transducteur.

L'échantillon tridimensionnel choisi est un wafer en silicium présentant une marche de $20\ \mu m$

de hauteur, séparant une surface lisse de silicium en hauteur d'une zone rugueuse de silicium attaqué chimiquement, en contre-bas. Une image de cet échantillon au profilomètre optique est donnée sur la figure (cf. fig.2.20).

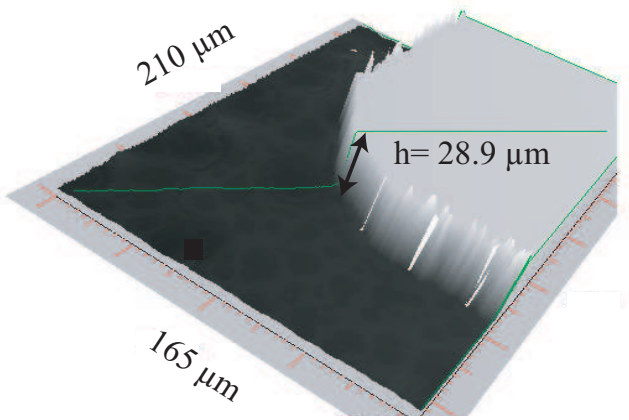


FIG. 2.20 – *Image au profilomètre optique d'un wafer de silicium présentant un relief de hauteur* $20\ \mu m$*).*

La hauteur de la marche de silicium est mesurée à $28,9 \pm 0,05\ \mu m$. La rugosité de la zone inférieure n'est pas visible, car la dynamique de la mesure pour cette surface est nettement dégradée du fait de la hauteur de la marche.
Nous présentons sur la figure (2.21) quelques uns des plans obtenus pour différentes altitudes lors d'un balayage tridimensionnel de l'objet. Chaque plan est un champ de $60 \times 75\ \mu m^2$, avec un déplacement élémentaire dans le plan de $750\ nm$, et un déplacement élémentaire axial de $1,5\ \mu m$.

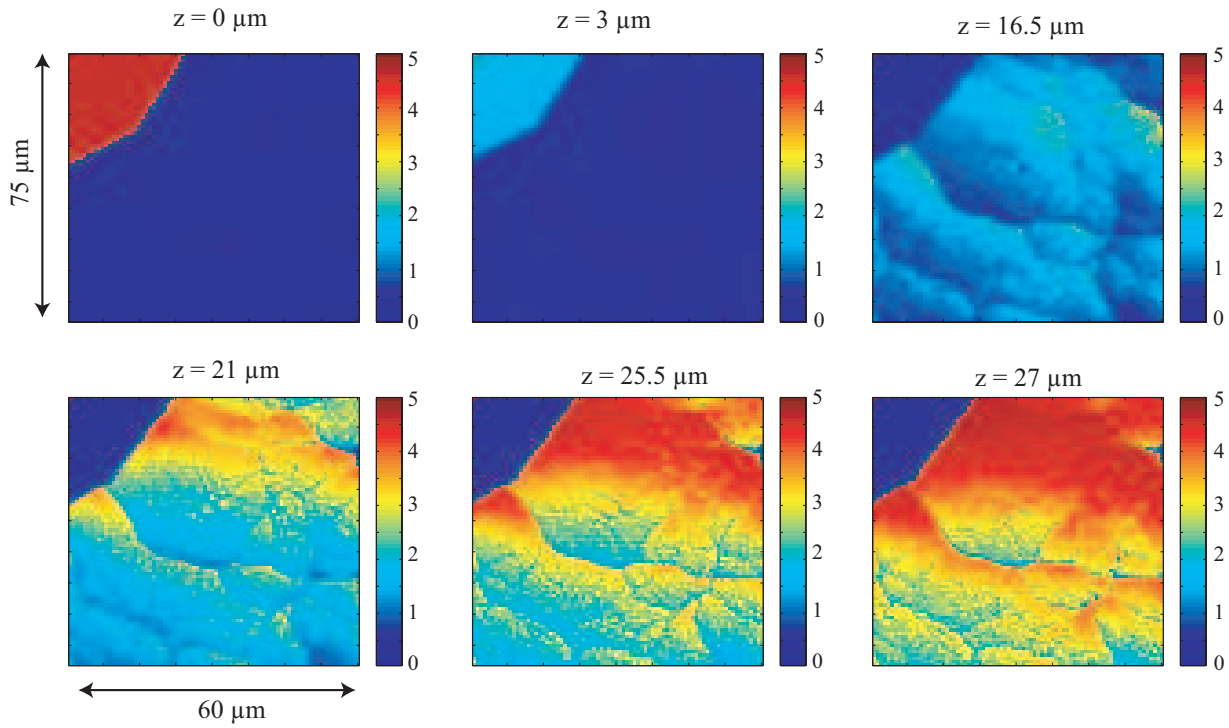


FIG. 2.21 – *Images confocales bidimensionnelles pour différentes altitudes Z d'une surface de silicium présentant un relief* ($60 \times 75\ \mu m^2$, *pas de 750 nm,* $\lambda = 550\ nm$, *objectif* $\times 40$, *ON=0,65 sans immersion). Intensité affichée en unités arbitraires.*

Sur ces images, plus la teinte attribuée à un point tend vers le rouge, plus ce point est à proximité du volume confocal (PSF_{ill}). Au cours du déplacement axial de l'échantillon, nous vérifions d'après la teinte associée au plan rugueux, que celui-ci apparaît dans le plan focal tandis que disparaît le plan supérieur. La hauteur de cette marche est estimée à $27 \pm 3\ \mu m$: l'ordre de grandeur est vérifié et l'incertitude majoritaire provient en partie du faible échantillonnage selon l'axe Z, mais aussi de la taille du volume d'illumination donné par l'objectif $\times 40$ utilisé[10] ($\sim 2,5\ \mu m$). D'autre part, la pente de cette marche est mesurée à 50 ± 5°, selon les zones où cette mesure est effectuée, et théoriquement, l'angle de gravure du silicium - directement lié à la position des plans cristallins - est de $54,7^o$.
Ces images bi- ou tridimensionnelles montrent donc des caractéristiques spatiales tout à fait similaires aux objets observés. On valide ainsi le bon fonctionnement du microscope confocal en "mode réflexion". Le tableau suivant résume l'ensemble des caractéristiques du microscope confocal réalisé (objectif $\times 100$ à immersion) :

[10]Dans le cas d'une source ponctuelle, et d'un objet plan, la réponse axiale en intensité du système optique est un $sinc^2(u/4)$, de largeur à mi-hauteur $u_{1/2} = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{ON^2}{n}\ z = 0,89$, soit $z = 2,2\ \mu m$.

Largeur de PSF_{ill}	340 nm
Largeur de la réponse axiale	1,7 μm
Résolution spectrale	2 nm
Volume d'investigation autorisé	100x100x100 μm^3
Déplacement élémentaire autorisé	1,5 nm
Temps d'acquisition	0,7 $s/point$

Le temps d'acquisition par point est très élevé. Cette lenteur a deux origines principales : d'une part, le système de déplacement de l'échantillon impose, pour un bon fonctionnement, une attente entre deux ordres de commande ($100\ ms$) et d'autre part, l'utilisation d'une détection synchrone impose un temps d'intégration suffisant pour traiter correctement le signal de réflexion ($600\ ms$). La rapidité d'acquisition des images confocales n'était pas un des nos objectifs : l'utilisation de miroirs galvanométriques pour le balayage du faisceau d'illumination sur l'échantillon aurait par exemple considérablement diminué le temps d'acquisition. Pour information, les microscopes commerciaux les plus perfectionnés réalisent 120 images par seconde, soit un temps d'acquisition de $0,6\ ms/point$ (3 $frames/s$, image 512x512 pixels) [66].

2.5 Imagerie confocale de fluorescence

Dans ce paragraphe, nous présentons les images confocales de fluorescence obtenues pour différents types d'échantillons.

Dans un premier temps, nous souhaitons visualiser un objet de forme simple marqué par un seul fluorophore. La première gamme d'échantillons utilisés est une suspension de billes de latex fluorescentes[11]. Quelques gouttes de cette suspension sont déposées sur une lamelle de microscope et placées sur le porte-échantillon. Nous réalisons le balayage d'un volume XYZ de $10 \times 10 \times 20\ \mu m^3$ avec un pas transverse de $250\ nm$ et avec un pas axial de 480 nm. La fluorescence est excitée à $540\ nm$ et est observée à $580\ nm$. Trois plans perpendiculaires issus du balayage tridimensionnel sont représentés sur la figure (2.22) :

[11] Constellation microspheres for imaging, C14837, Molecular probes, diamètres de billes 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 4 μm.

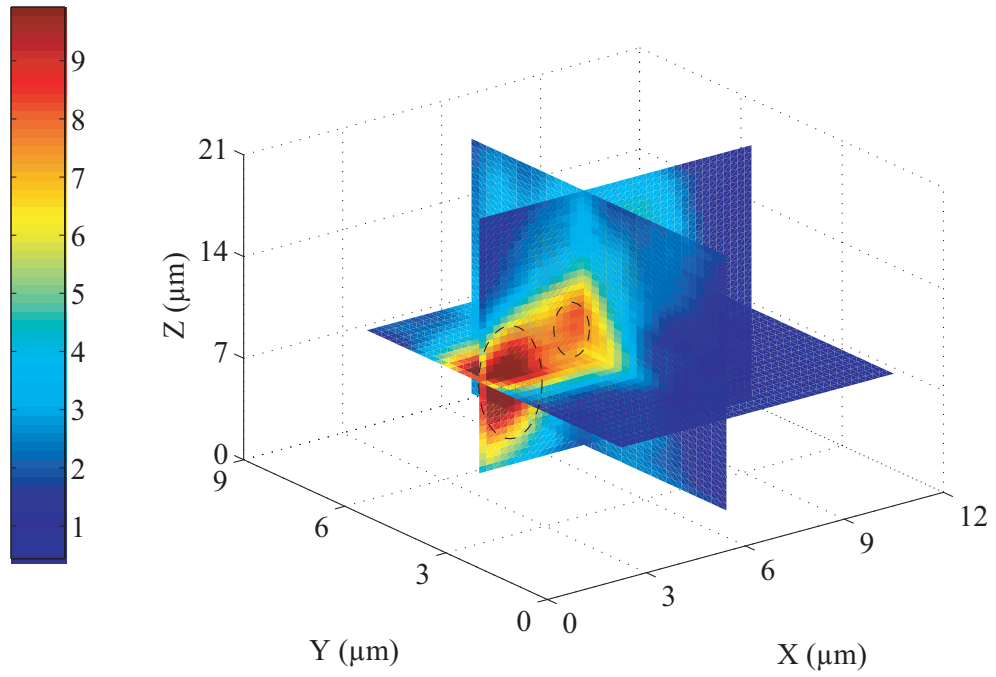


FIG. 2.22 – *Trois plans perpendiculaires issu du balayage tridimensionnel de billes sphériques fluorescentes,* $\lambda_{exc} = 540\ nm$, $\lambda_{em} = 580\ nm$, *objectif* $\times 100$.

Nous remarquons, grâce à un bon rapport signal à bruit, la présence d'une bille fluorescente, associée au rouge foncé, d'un diamètre d'environ 5 μm, ce qui correspond aux specifications annoncées. Néanmoins, la forme imagée obtenue n'est pas sphérique mais ellipsoïdale. Sur l'image de cet objet dont la forme est connue, l'influence du PSF est visible. Une déconvolution numérique de l'image par le volume d'illumination devrait être envisagée, mais l'objectif de ce test est déjà atteint : la chaîne de détection constituée du photomultiplicateur et de la détection synchrone est adaptée à l'imagerie de fluorescence. Nous n'effectuerons pas de déconvolution dans la suite des travaux d'imagerie.

Nous notons également sur cette image la présence d'une bille plus petite accolée à la première, ce qui est tout à fait plausible puisque la suspension utilisée contient des sphères de différents diamètres.

Dans un deuxième temps, nous enregistrons l'image de cellules de type HeLa[12], dont seul le noyau est marqué : le iodure de propidium, molécule fluorescente absorbant à $\lambda = 560\ nm$ et émettant à $\lambda = 630\ nm$, est fréquemment utilisé pour révéler la présence d'ADN. La figure (2.23) est une image en transmission d'une partie de cet échantillon cellulaire.

[12]Ce type de cellules est relativement simple à mettre en culture, elles dérivent d'une lignée de cellules cancéreuses et sont très couramment utilisées pour les études d'interactions cellules-virus.

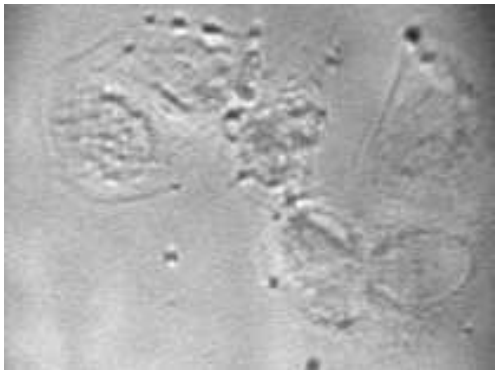


FIG. 2.23 – *Image en transmission de la préparation des cellules HeLa utilisée.*

Une zone de $60 \times 60 \mu m^2$ de ce même échantillon a été imagée en configuration confocale, par pas de 750 nm : nous obtenons l'image (2.24) dans laquelle la couleur bleue correspond à l'enchevêtrement d'ADN contenu dans les cellules. La dimension des noyaux, mesurés entre 10 et 15 μm de diamètre, est l'ordre de grandeur attendu. Les cytoplasmes de ces cellules sont ici invisibles.

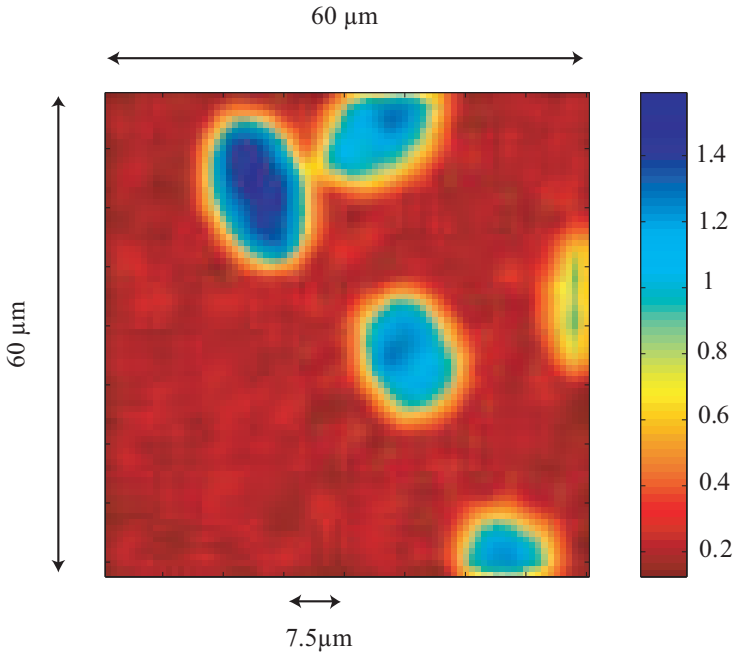


FIG. 2.24 – *Image confocale de cellules HeLa dont le noyau est marqué par du Iodure de propidium (560nm / 630nm) : observation à 630 nm, objectif* $\times 100$.

Des images de cellules doublement marquées ont également été réalisées. Le noyau est codé avec du iodure de propidium, tandis que les filaments d'actine, fibres contenues dans le

cytoplasme permettant à la cellule de contrôler sa forme et son déplacement, sont codés par de la fluoresceine FITC (absorption à $488\ nm$ / émission à $550\ nm$). Ces filaments ont un diamètre de 5 à 10 nanomètres. La résolution des microscopes confocaux ne suffit donc habituellement pas à les distinguer ; néanmoins, ils s'organisent en faisceaux de filaments de quelques centaines de nanomètres de diamètre, qui se révèlent en microscopie de fluorescence. L'image suivante (fig.2.25) est une coupe transverse d'un échantillon cellulaire éclairé par une double excitation à 488 nm et 560 nm. Elle est obtenue par superposition de deux images résultant d'un premier balayage avec une excitation à 488 nm et une collection à 515 nm et d'un deuxième balayage avec une excitation à 560 nm et une collection à 630 nm. On distingue bien une zone centrale rouge correspondant au noyau et une couronne extérieure contenant des filaments d'actine en vert.

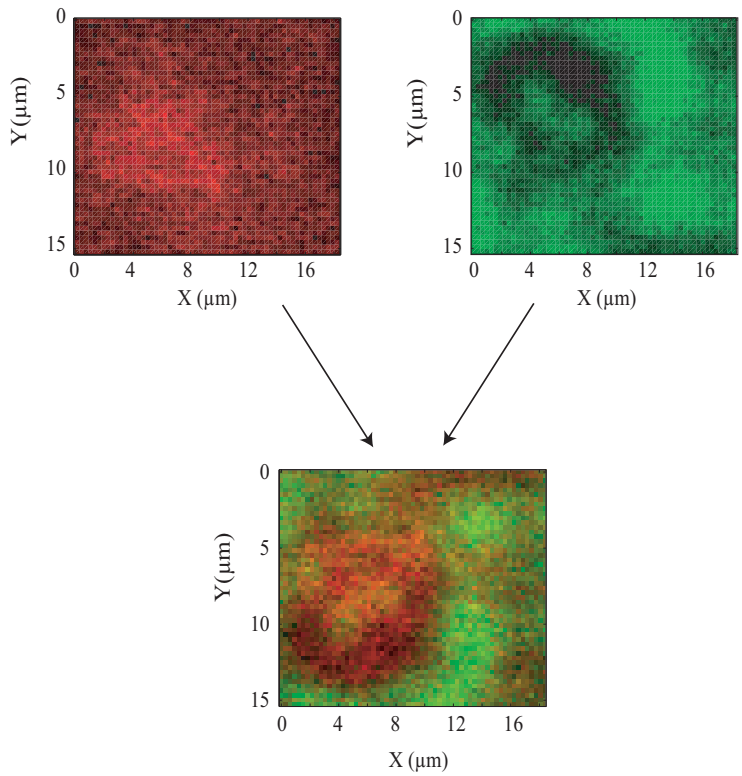


FIG. 2.25 – *Image confocale d'une cellule HeLa dont le noyau est marqué par du Iodure de propidium (560nm / 630nm) et les filaments d'actine par de la fluoresceine FITC (488nm /515nm), objectif* $\times 100$.

Une acquisition tridimensionnelle des signaux de fluorescence contenus dans ces cellules fournit les images suivantes (fig.2.26), chaque image étant obtenue comme précédemment par superposition d'acquisitions aux deux longueurs d'onde d'émission des fluorophores. Nous pré-

sentons 8 plans d'altitudes différentes pour un balayage XY de $25 \times 25\mu m^2$ par pas de $300\ nm$. L'échantillonnage axial est de 3 μm. Nous distinguons clairement la zone nucléaire des cellules en rouge ainsi que l'enchevêtrement des filaments d'actine en vert, qui apparaissent puis disparaissent au cours du balayage en Z.

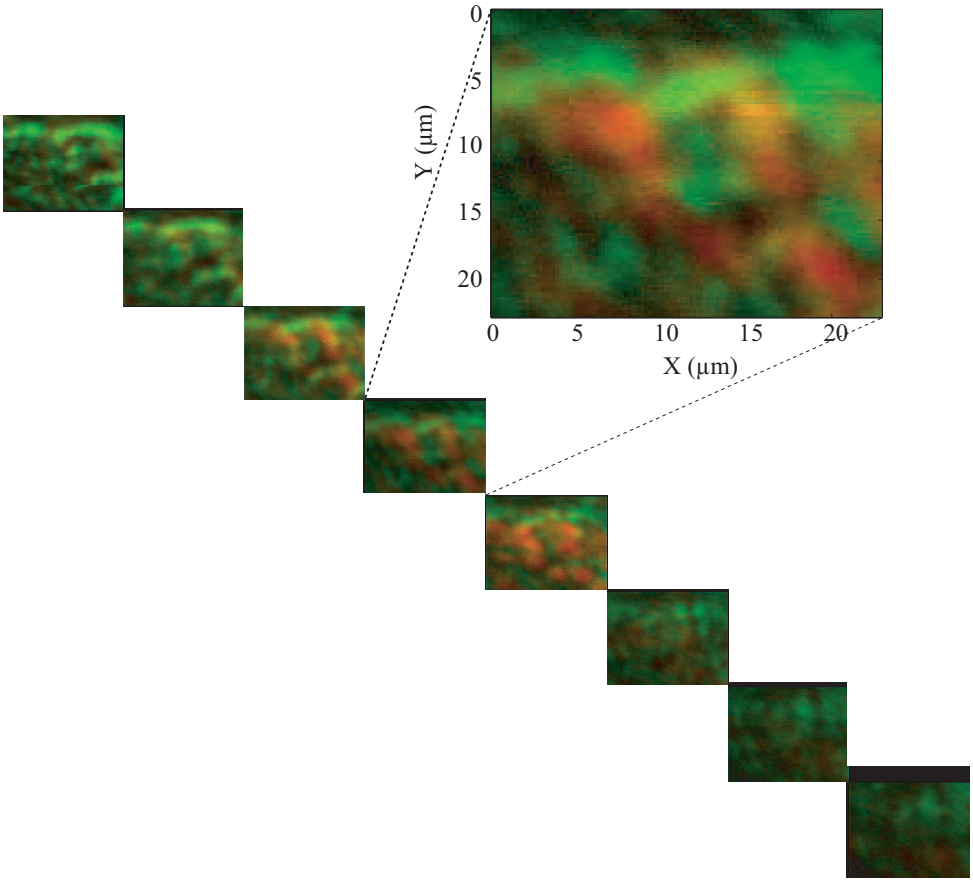


FIG. 2.26 – *Sections confocales d'un tapis cellulaire (derme) dont le noyau est marqué par du Iodure de propidium (560nm / 630nm) et les filaments d'actine par de la fluoresceine FITC (488nm /515nm), objectif* $\times 100$.

2.6 Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de vérifier la viabilité d'une source telle qu'un continuum de lumière dans une expérience de microscopie confocale de fluorescence. L'emploi de cette source est motivé par le fait de pouvoir mettre à disposition de l'utilisateur la gamme complète des longueurs d'onde du visible pour exciter n'importe quel fluorophore avec une grande flexibilité de

travail. Le montage optique du microscope confocal proposé permet en effet d'assurer de manière électronique la sélection des longueurs d'onde d'excitation des fluorophores ainsi que celles des longueurs d'onde d'émission de fluorescence à observer. Après avoir caractérisé le microscope en terme de résolution spectrale et spatiale, nous avons réalisé des images de fluorescence bi et tridimensionnelle d'échantillons cellulaires. La qualité des images ainsi que le temps d'acquisition des images sont incontestablement distancés par ceux des microscopes commerciaux, mais l'utilisation d'un continuum de lumière comme source accordable pour la microscopie de fluorescence est validée. La résolution et la qualité des images seront améliorées en utilisant une lentille ou un objectif à configuration $\infty/foyer$ pour effectuer la focalisation sur le détecteur. Une autre perspective d'amélioration concerne la chaîne de détection et de traitement du signal : il s'agit d'augmenter le rapport signal à bruit en augmentant le temps d'intégration, ou en utilisant un détecteur refroidi, puis d'effectuer la déconvolution des images par la réponse impulsionnelle du microscope.
La première publication d'une utilisation d'un continuum de lumière comme source pour un microscope confocal est datée de juin 2004 [71], c'est-à-dire pendant cette thèse.

Chapitre 3

Microscopie STED

Le grand défi de la biologie moléculaire est de proposer une description élaborée du fonctionnement cellulaire, et plus précisément des processus de signalisation intracellulaire : on appelle "signalisation" l'ensemble des événements moléculaires induits par une stimulation qui conduisent une cellule à prendre une décision, comme par exemple exprimer un gène ou débuter le processus de division cellulaire. Au delà d'une description schématique maintenant cernée, et pour entrer dans une compréhension fine du fonctionnement cellulaire, il s'agit aujourd'hui de découvrir comment se transmettent les flux d'informations, quelles sont les différents supports physiques nécessaires à ces transmissions... La connaissance précise de ces flux d'informations dans la cellule est délicate à obtenir car ceux-ci impliquent souvent plusieurs partenaires, de taille nanométrique, comme les protéines, et s'opèrent à des échelles spatiales et des dynamiques temporelles variées.
Dans ce contexte, les outils pour de telles investigations cellulaires doivent permettre de conserver l'échantillon dans un état physiologique proche de son état naturel, et d'autre part doivent présenter des caractéristiques techniques bien particulières. En effet, les concentrations moléculaires mises en œuvre dans les processus de signalisation sont souvent très faibles : il faut élaborer un mécanisme de contraste permettant de distinguer les molécules d'intérêt du reste des autres entités cellulaires, et de les détecter jusqu'à un niveau mono-moléculaire. Ceci requiert une très haute résolution spatiale et temporelle ainsi qu'une très grande sensibilité. Actuellement, ce sont les techniques de microscopie optique, et plus particulièrement les microscopies de fluorescence qui réalisent le meilleur compromis entre sensibilité, résolutions temporelle et spatiale, innocuité et simplicité d'utilisation.
Pour faire face à l'évolution des études biologiques vers le niveau moléculaire, l'enjeu est donc de parvenir à augmenter la résolution du microscope. Cependant, d'après les lois de la diffraction, la nature ondulatoire de la lumière ne permet pas de visualiser des détails plus petits que

$0,61\lambda/ON$, où λ est la longueur d'onde de la lumière dans le vide et ON l'ouverture numérique du système imageur. On peut en principe réduire cette dimension en utilisant une longueur d'onde plus faible et des objectifs de plus grande ouverture numérique. Toutefois, les échantillons biologiques vivants sont facilement endommagés par des longueurs d'ondes inférieures à 350 nm et l'ouverture numérique maximale d'un objectif est de 1,45 [1]. Dans la meilleure configuration, c'est-à dire dans le cas d'un microscope confocal, les résolutions maximales pouvant être obtenues sont de 150 nm latéralement et $350\ nm$ le long de l'axe optique.
Avec une approche totalement novatrice, et dans le cas d'échantillons fluorescents, la microscopie STED (Stimulated Emission Depletion [72]) propose de s'affranchir littéralement de la limite de diffraction, grâce à une combinaison particulière de deux faisceaux d'excitation ajustés spatialement et temporellement. La résolution peut alors atteindre $\lambda/25$ [73].
Tout comme en microscopie confocale de fluorescence, l'application de la technique STED est actuellement réduite à l'utilisation de fluorophores dont le spectre d'excitation et d'émission correspond aux spectres des sources disponibles en laboratoires. Pour l'heure, les sources utilisées sont des diodes laser [74] ou laser et Oscillateur Paramétrique Optique [75].
L'objectif de ce travail est de déterminer si un continuum de lumière -avec ses caractéristiques particulières- peut être utilisé comme source accordable en longueur d'onde pour la microscopie STED : l'outil résultant pourrait ainsi associer une grande versatilité spectrale à une ultra-haute résolution spatiale.
Nous décrirons dans une première partie différentes techniques conduisant à l'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence et en particulier le principe de la microscopie STED. Puis, sur la base de simulations numériques, nous évaluerons les conséquences des caractéristiques propres du continuum sur l'efficacité de la dépletion de fluorescence. En dernier lieu, nous proposerons un montage optique complet assurant la versatilité en longueur d'onde de chaque élément, ainsi que le résultat de nos expérimentations.

3.1 Amélioration de la résolution en microscopie optique

Depuis la première utilisation d'un microscope pour des observations en biologie il y environ 350 ans, par Robert Hooke, l'amélioration de la résolution de cet outil résulte principalement de l'emploi d'éléments de plus haute qualité, et de la correction des aberrations des optiques. Ce n'est qu'à la fin du XXième siècle que des microscopies hautement résolvantes émergent, principalement en microscopie de fluorescence. La fluorescence apparaît en effet comme l'un des

[1] $ON = 1,45$ avec une huile d'immersion d'indice $n = 1,518$: alpha Plan-FLUAR $100\times$, Zeiss. On peut noter également l'utilisation ponctuelle en microscopie TIRF d'un objectif Olympus d'ouverture numérique 1,65.

processus de contraste optique les plus efficaces, particulièrement adapté à la détection de zones d'intérêt très fines dans l'échantillon. Ces techniques peuvent être classées en de nombreuses catégories parmi lesquelles la microscopie confocale, les méthodes interférométriques, les méthodes non linéaires et les méthodes de surface (champ proche). Un synopsis de ces différentes techniques est représenté sur la figure (3.1).

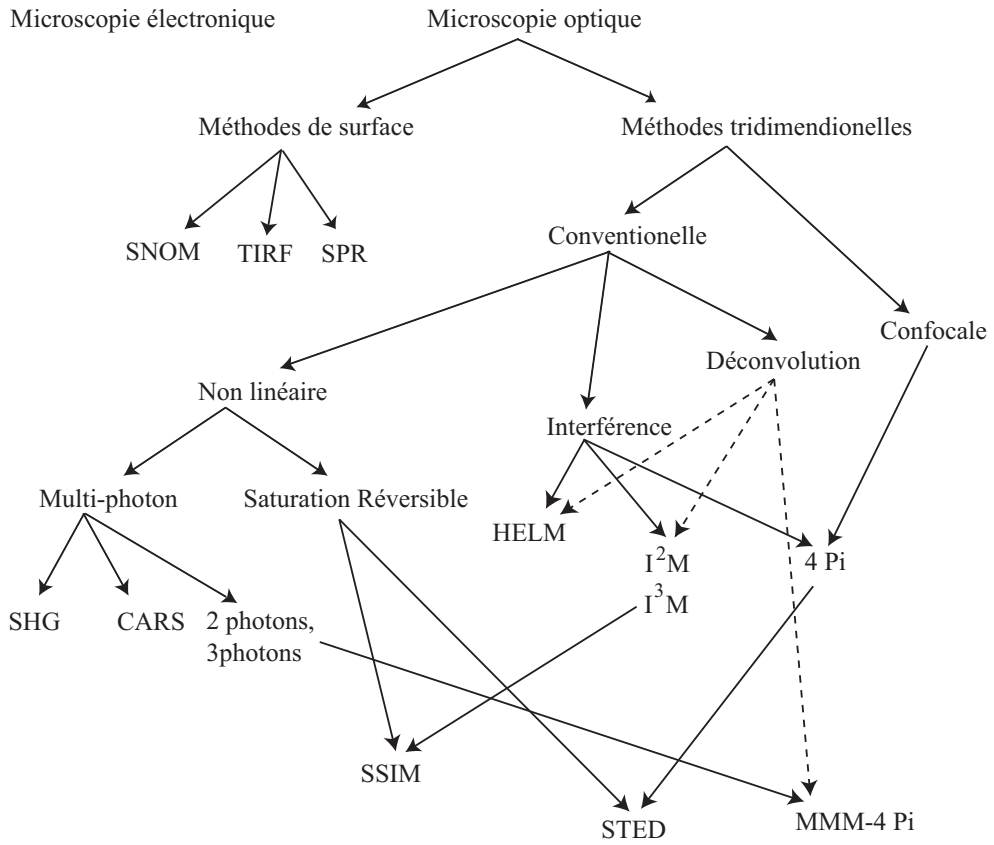


FIG. 3.1 – *Cartographie des différentes méthodes d'approche pour une microscopie de très haute résolution [76]. Notons cependant que, contrairement à ce que laisse supposer ce schéma, la technique de déconvolution s'applique désormais à tout type d'imagerie, dès que la PSF est définie.*

Une approche particulière concerne non pas l'utilisation de longueur d'onde optique ($> 300\ nm$), mais de longueur d'onde de matière ($\lambda_{DeBroglie} \sim 10^{-3}\ nm$). Des faisceaux d'électrons hautement énergétiques utilisés dans les microscopes électroniques fournissent une résolution de $0,1\ nm$ sur des échantillons biologiques [77]. Cette technique est très utilisée en biologie cellulaire puisqu'elle permet de visualiser la majorité des protéines, dont la taille est de l'ordre de $5\ nm$. Néanmoins les échantillons doivent être préparés en coupes minces, et dans la plupart

des cas doivent être marqués par des substances de contraste telles que l'or. Des investigations *in vivo* ne peuvent être envisagées.
Quelques méthodes sont mises en œuvre pour des mesures de très haute résolution en évitant de focaliser la lumière, c'est-à-dire en s'affranchissant de la limite de diffraction d'Abbe. En microscopie en champ proche (Scanning Near Field Optical Microscopy, **SNOM** [78]), la surface de l'échantillon est illuminée à l'aide d'une pointe émettrice dont les dimensions sont plus petites que λ. La zone illuminée, de l'ordre de 50 à $100\ nm$, ne dépend plus de la longueur d'onde mais uniquement des dimensions de la pointe. Cette très haute résolution est cependant restreinte aux investigations de surface ou juste en dessous de la surface.
En microscopie par résonance plasmonique (Surface Plasmon Resonance, **SPR**) ou en microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (Total Internal Reflection Fluorescence, **TIRF**) un champ évanescent est créé dans l'échantillon sur une épaisseur inférieure à $100\ nm$, et peut exciter les molécules fluorescentes qui s'y trouvent. La fluorescence émise est ensuite collectée par un objectif ; la résolution axiale atteint ainsi 100 nm, voire moins. En particulier dans le SPR, de subtiles variations d'indice à la surface de l'échantillon peuvent être mesurées : des interactions surfaciques sont détectées sans avoir recours à un marquage fluorescent. L'activité des membranes cellulaires, les propriétés physiques de molécules biologiques ou les interactions entre protéines peuvent être ainsi étudiées, mais sans résolution latérale très élevée.
Néanmoins, la plupart des investigations cellulaires nécessitent un système d'imagerie tridimensionnelle que seule la microscopie optique en champ lointain peut apporter.
La **microscopie confocale** de fluorescence est en fait l'une des premières méthodes développées pour améliorer la résolution [61, 68], et c'est l'une des techniques les plus utilisées. Grâce à l'utilisation d'une source et d'un détecteur ponctuels (cf.§ 2.1), la réponse impulsionnelle d'un microscope confocal (PSF_{tot}) est le carré de celle d'un microscope conventionnel, la résolution est donc nettement améliorée. Il est à noter que les progrès en acquisition d'images et en traitement de signal permettent désormais de déconvoluer les informations obtenues par la PSF de l'appareil, donnant ainsi accès à des images de très haute qualité.
Les **méthodes interférentielles** ont été initiées il y a une dizaine d'années par Lanni [79]. La technique la plus utilisée et qui d'ailleurs a été commercialisée très récemment, est la **microscopie** 4π [80]. L'idée principale est de réduire artificiellement le volume d'illumination en utilisant des franges périodiques issues de l'interférence entre deux faisceaux d'illumination cohérents. En pratique, deux objectifs sont placés tête-bêche, de part et d'autre de l'échantillon et l'éclairent à l'aide de la même source. La PSF résultante présente une modulation sinusoïdale d'intensité le long de l'axe optique : au sein même de la PSF, seuls les fluorophores se trouvant dans les zones brillantes peuvent être excités. La résolution axiale est donc améliorée et atteint $100\ nm$. Cette technique est cependant limitée aux échantillons minces car la qualité des interférences se

dégrade lors de la transmission à travers l'objet et requiert une étape de déconvolution.
Les méthodes dérivant de cette idée sont nombreuses ; on peut citer la microscopie d'interférences d'images avec une source laser, aussi appelée d'illumination structurée (Image Interference Microscopy, I^2M [81]), ou avec une source incohérente (Incoherent Interference Illumination Microscopy,I^3M [82]), dont le but est d'améliorer la résolution axiale et latérale à l'aide de faisceaux d'excitation structurés sinusoidalement. L'idée principale est de conserver dans l'image les hautes fréquences de l'objet en utilisant le fait que, dans l'espace réciproque, il y a convolution entre le spectre de l'objet et le spectre du faisceau d'illumination. Cette technique nécessite l'enregistrement de plusieurs images successives, ainsi qu'un traitement algorithmique, mais la résolution est alors améliorée d'un facteur 2 par rapport à la microscopie conventionnelle.
On peut citer également la microscopie en lumière d'excitation harmonique (Harmonic Excitation Light Microscopy, **HELM** [83]) où quatre faisceaux se combinent pour interférer sur l'échantillon le long de ses deux axes principaux. Classiquement, la résolution spatiale atteinte par ces méthodes est de 100 nm.
Les techniques ci-dessus ont pour but d'atteindre une haute résolution en agissant directement sur la taille de la PSF par l'augmentation de l'ouverture numérique, ou indirectement, par l'utilisation des phénomènes d'interférences et d'un processus d'imagerie. Les **méthodes non linéaires** sont basée sur une approche différente : en microscopie multi-photonique [63], chaque fluorophore est excité par deux ou trois photons de telle sorte que l'énergie totale soit égale à l'énergie de transition vers l'état excité du fluorophore. Ce processus est efficace là où la probabilité d'obtenir 2 ou 3 photons quasiment superposés spatialement et temporellement est élevée, c'est-à-dire uniquement au foyer de l'objectif imageur. La qualité des images est améliorée, comme dans le cas confocal, grâce à l'illumination d'un seul plan dans l'échantillon. D'autres méthodes non linéaires mettent à profit la génération de seconde harmonique (Second Harmonic Generation, **SHG** [84]) ou la diffusion Raman anti-Stokes cohérente (Coherent anti-Stokes Raman Scattering, **CARS** [85]) qui présente l'avantage de ne nécessiter aucun marquage particulier ainsi qu'une résolution similaire à la microscopie à deux photons.
La dernière technique abordée ici et celle que nous avons choisi de développer dans ce chapitre, est la microscopie **STED** (Stimulated Emission Depletion), introduite il y a une dizaine d'années par S.W.Hell [72], et démontrée expérimentalement récemment [73].

3.2 Principe de la microscopie STED

La microscopie STED est actuellement la technique de fluorescence en champ lointain proposant la meilleure résolution spatiale. L'idée fondamentale n'est pas de réduire la PSF

d'illumination, mais de réduire l'extension du volume où les molécules excitées peuvent émettre le signal de fluorescence. Le volume d'émission est rendu plus petit que le volume d'illumination par annulation du signal de fluorescence émis par les molécules excitées sur le pourtour de la PSF_{ill}. Cette annulation, ou effacement de la fluorescence, est obtenue en favorisant sur le pourtour de la PSF un processus efficace de dépeuplement des molécules excitées : l'émission stimulée.
Pour obtenir cet effet, l'échantillon est soumis à deux types de pulses. Sur la figure 3.2 est représenté le diagramme de Jablonski d'une molécule fluorescente soumise à cette double illumination.

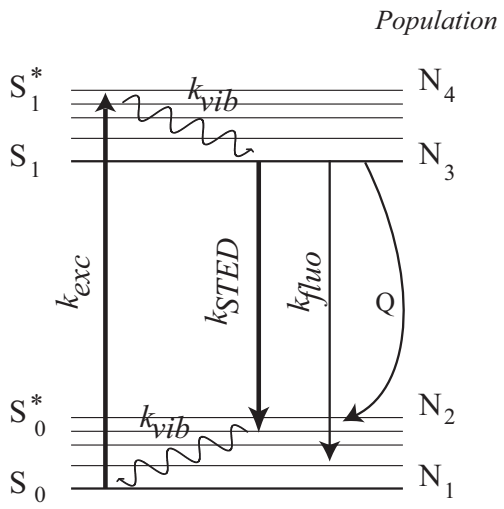


FIG. 3.2 – *Diagramme de Jablonski d'une molécule fluorescente soumise à une excitation STED.*

Les molécules fluorescentes sont tout d'abord excitées de leur état fondamental S_0 jusque dans leur état excité S_1^* par un pulse laser très court. Après une étape de relaxation thermique rapide jusque dans le niveau vibrationnel S_1, les molécules retombent habituellement dans leur état fondamental soit par émission de fluorescence, avec une probabilité $k_{fluo} = 1/\tau_{fluo}$, soit par phénomène de $quenching$, avec une probabilité Q. Pour éviter le phénomène de fluorescence et donc pour dépeupler S_1, les molécules sont soumises à un pulse STED qui les couplent jusqu'au niveau S_0^*, avec une probabilité $k_{STED} = \sigma\Phi_{STED}$ (σ est la section efficace de diffusion du fluorophore (cm^2) et ϕ_{STED} est le flux de photons incident ($ph.cm^{-2}.s^{-1}$)). L'énergie d'excitation initiale, absorbée par les molécules, est donc réémise sous la forme d'un photon stimulé, indiscernable des photons du pulse STED.
Une fois sur le niveau S_0^*, les molécules peuvent être désexcitées vers le niveau fondamental S_0, avec une probabilité $k_{vib} = 1/\tau_{vib}$, ou être ré-excitées par le pulse STED vers S_1, avec la même probabilité que précédemment $\sigma\Phi_{STED}$, ce qui entraînera un nouveau peuplement de S_1.

La compétition existant entre les différents phénomènes cités sur les niveaux S_1 et S_0^* impose au pulse STED d'une part, des caractéristiques temporelles particulières pour qu'une déplétion complète du niveau S_1 ait lieu, et d'autre part des caractéristiques spatiales permettant de ne pas dépeupler toute la zone excitée

3.2.1 Aspect temporel

Pour mieux appréhender ces caractéristiques, il faut étudier les évolutions des populations N_2 et N_3 sous l'effet de la fluorescence, du pulse STED et de la relaxation. On est donc amené à écrire les équations de population suivante :

$$\frac{dN_2(t)}{dt} = k_{STED}[N_3(t) - N_2(t)] + [Q + k_{fluo}]N_3(t) - k_{vib}N_2(t) \tag{3.1}$$

$$\frac{dN_3(t)}{dt} = k_{STED}[N_2(t) - N_3(t)] - [Q + k_{fluo}]N_3(t) \tag{3.2}$$

$$\tag{3.3}$$

Dans le cas (simple) où les pulses STED ont une forme temporelle carrée de durée τ_{STED}, on peut montrer (cf. annexe C) que pour dépeupler efficacement le niveau 3, il faut que :

$$k_{vib} \gg k_{STED} \gg k_{fluo} \tag{3.4}$$

et que

$$\eta_{STED} = e^{-k_{STED}\tau_{STED}} \ll 1 \tag{3.5}$$

Ces deux conditions peuvent s'écrire sous une forme différente en prenant

$$k_{STED} = \frac{\sigma h_{STED}}{\tau_{STED}} \tag{3.6}$$

où σ est la section efficace d'émission stimulée de la molécule et h_{STED} est le nombre de photons par unité de surface du pulse STED ($nb\, photons/cm^{-1}$) :

$$\tau_{vib} \ll \frac{\tau_{STED}}{\sigma h_{STED}} \quad et \quad \eta_{STED} = e^{-\sigma h_{STED}} \ll 1 \tag{3.7}$$

Pour la plupart des fluorophores, $\tau_{vib} \simeq 10^{-11}$ à 10^{-13} s et $\tau_{fluo} \simeq 10^{-9}$ s. Il apparaît donc qu'une durée de pulse STED comprise entre 10 et 100 ps est tout à fait adéquate. Par ailleurs, l'efficacité de dépeuplement est directement liée au nombre de photons absorbés (σh_{STED}) et donc au nombre de photons présents dans chaque impulsion. Les sections efficaces d'émission stimulée sont de l'ordre de 10^{-16} cm^2, la densité surfacique du pulse STED doit donc être de l'ordre de 10^{16} ph/cm^2, soit environ 4 mJ/cm^2 à $\lambda = 0,5\mu m$. Pour une surface de focalisation de 10^{-8} cm^2 (rayon $\simeq$0.55 μm) et une durée de 100 ps, cela correspond à une puissance de pulse de 0,4 W crête, valeur facilement atteignable pour des lasers impulsionnels classiques. A ces conditions temporelles de bonne efficacité s'ajoutent des conditions spectrales et spatiales.

3.2.2 Aspect spatial et spectral

La superposition spatiale des deux faisceaux d'illumination est décrite à partir de la figure (3.3). Les pulses d'excitation sont focalisés sur l'échantillon fluorescent à l'aide d'un objectif usuel O. L'extension spatiale du faisceau d'excitation est donc fixée par les lois de la diffraction. La répartition spatiale du faisceau STED est choisie de manière à ce qu'il n'y ait aucune lumière au point de focalisation de l'objectif O, mais seulement en son voisinage. Il y a ainsi suppression de la fluorescence uniquement dans la zone de superposition des types de faisceaux : la PSF est artificiellement réduite à sa zone centrale. La taille de la zone d'émission de fluorescence est d'autant plus petite que la puissance du pulse STED est grande.

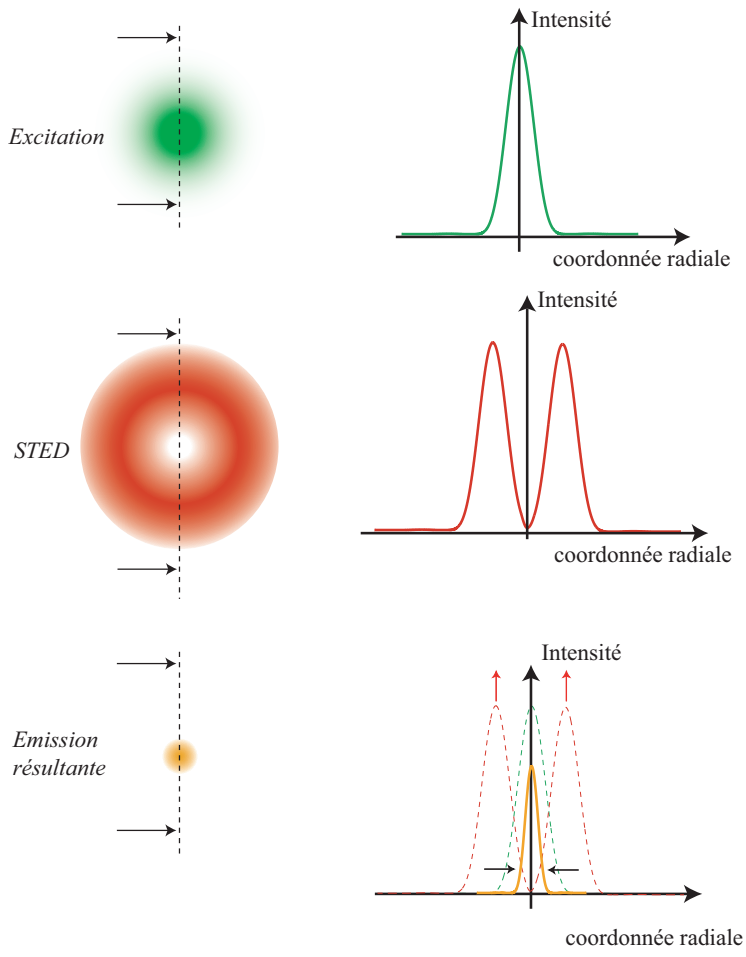


FIG. 3.3 – *Répartition spatiale des faisceaux d'excitation et STED.*

D'un point de vue spectral, les longueurs d'ondes choisies pour les pulses d'excitation et STED sont directement liées aux spectres d'absorption et d'émission du fluorophore. La figure

(3.4) indique sur ces spectres la position des raies spectrales d'illumination et la bande spectrale de détection de la fluorescence émise.

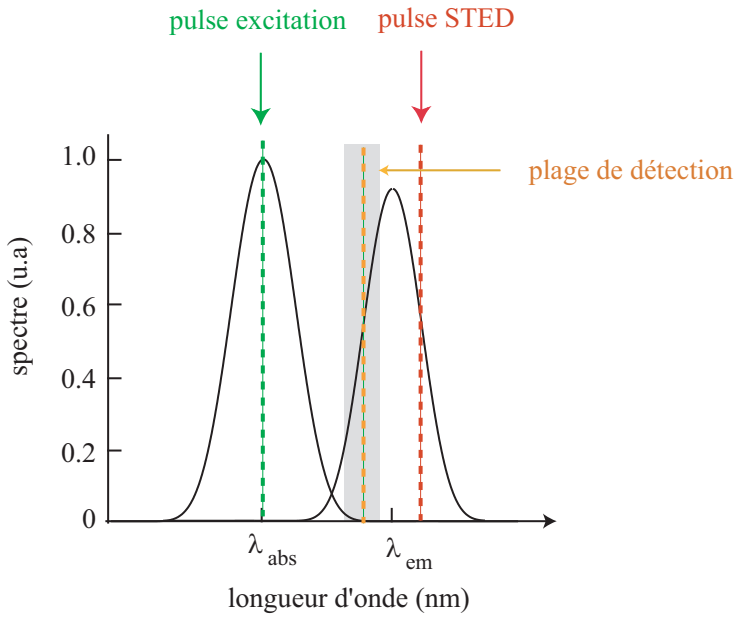


FIG. 3.4 – *Spectres d'émission et d'absorption d'une molécule fluorescente quelconque, positions des raies spectrales des pulses d'excitation et STED, et plage spectrale de détection de la fluorescence émise par l'échantillon.*

Puisque la plupart des spectres d'absorption et d'émission se chevauchent, la longueur d'onde STED est délibérément décalée vers les hautes longueurs d'onde pour éviter tout phénomène d'excitation résiduelle.
Actuellement, toutes les expériences de dépletion de fluorescence sont réalisées avec des sources lasers pulsées dont la fréquence de répétition est telle que la périodicité des pulses est bien supérieure au temps de fluorescence τ_{fluo}. La dépletion de fluorescence est donc effective lorsque l'on ajuste *un* pulse d'excitation et *un* pulse STED : la qualité de la dépletion, et donc la résolution, dépend ainsi de l'énergie contenue dans *chaque* pulse illuminant l'échantillon. Les sources usuelles (diodes laser, laser + OPO, ...) délivrent des impulsions identiques coup-à-coup : le nombre de photons contenus dans chaque pulse est tout à fait similaire d'un pulse à l'autre et la répartition temporelle des photons dans un pulse, généralement du type sécante hyperbolique, est également identique pour chaque pulse. Ces sources permettent donc d'obtenir la même efficacité de dépletion à chaque pulse.
L'objectif du travail suivant est d'estimer la possibilité d'utiliser un continuum de lumière comme source pour la microscopie STED.

La plupart des lasers de pompe employés pour la génération des continua ont un taux de répétition compris entre quelques kHz et plusieurs dizaines de MHz. Même dans le cas de fréquences de répétition très élevées (typiquement $80\ MHz$), le temps de fluorescence reste bien inférieur à la périodicité des pulses de la source[2]. La dépletion de fluorescence à l'aide d'un continuum résulte donc, comme pour les sources usuelles, des propriétés de chaque pulse. Le comportement du continuum choisi doit ainsi être évalué tir à tir, en terme d'énergie contenue dans chaque pulse (fluctuations d'intensité) et de répartition de l'énergie contenue dans chaque pulse (fluctuations de forme temporelle).
Pour chaque longueur d'onde du continuum étudié, les fluctuations d'intensité sont aisément relevées et sont présentées au Chapitre 1 ; mais les fluctuations de forme temporelle ne sont quant à elles, pas directement accessibles à la mesure, étant donnée la très haute résolution temporelle nécessaire. Nous génèrerons donc un continuum par simulation numérique afin de quantifier les fluctuations d'intensité et les fluctuations de forme temporelle, pour chaque longueur d'onde. A l'aide de ces résultats, nous présenterons les conséquences de ces fluctuations sur la résolution latérale attendue en microscopie STED.

3.3 Simulations numériques

3.3.1 Comportement tir à tir du continuum de lumière

Le code numérique permettant de générer les impulsions issues du continuum de lumière nous a été gracieusement fourni par J.M.Dudley [3]. Construit sur la base de l'équation de Schrödinger non linéaire, ce code tient compte de la longueur d'onde et de la puissance de pompe utilisées, des coefficients de dispersion de la fibre microstructurée, et de la longueur de celle-ci. Expérimentalement, la longueur de la fibre employée est de $1\ m$, mais les temps de calculs pour simuler la propagation des impulsions pompe sur cette longueur sont prohibitifs. Nous simulerons un continuum généré par la propagation d'impulsions pompe dans une fibre de 10 cm.
L'organigramme (3.5) présente les étapes de traitement successives réalisées à partir du code numérique.

[2] $\tau_{fluo} \approx 4\ ns < 12,5\ ns$ pour $f_{repetition}$ = 80 MHz

[3] J.M.Dudley, Équipe Optoélectronique, Département d'Optique P.M.Duffieux, Institut FEMTO-ST, Besançon, France.

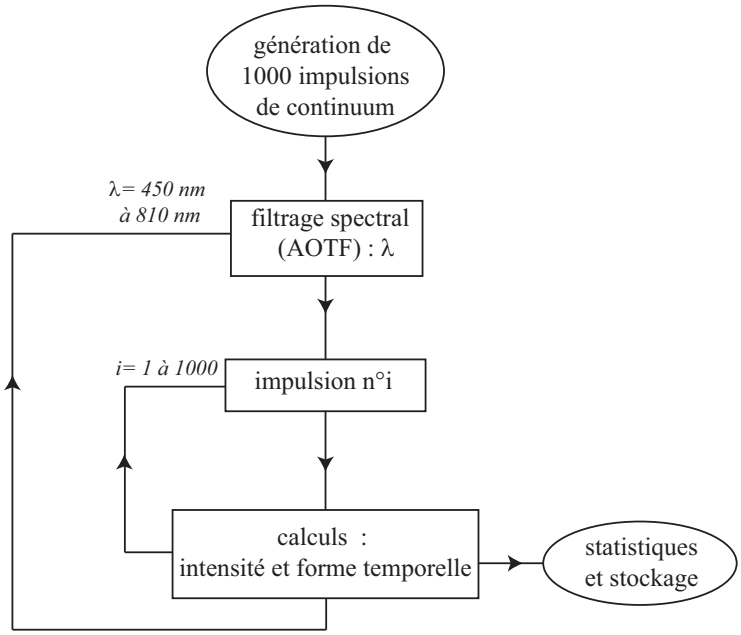


FIG. 3.5 – *Organigramme présentant les différentes étapes du traitement des impulsions de continuum simulées.*

Afin d'effectuer une étude statistique des impulsions issues du continuum pour chaque longueur d'onde, la première étape est la génération numérique de 1000 continua, soit 1000 impulsions. L'annexe D résume les paramètres essentiels de la génération numérique d'un continuum. Un filtrage spectral, tenant compte des caractéristiques de l'AOTF (cf. annexe E) est effectué sur chaque continuum. Pour chaque longueur d'onde sélectionnée, nous relevons l'énergie ainsi que la forme temporelle de chacun des 1000 pulses. Ces données sont alors stockées en vue d'un traitement ultérieur.
La puissance moyenne et les fluctuations associées sont représentés sur le spectre (3.6).

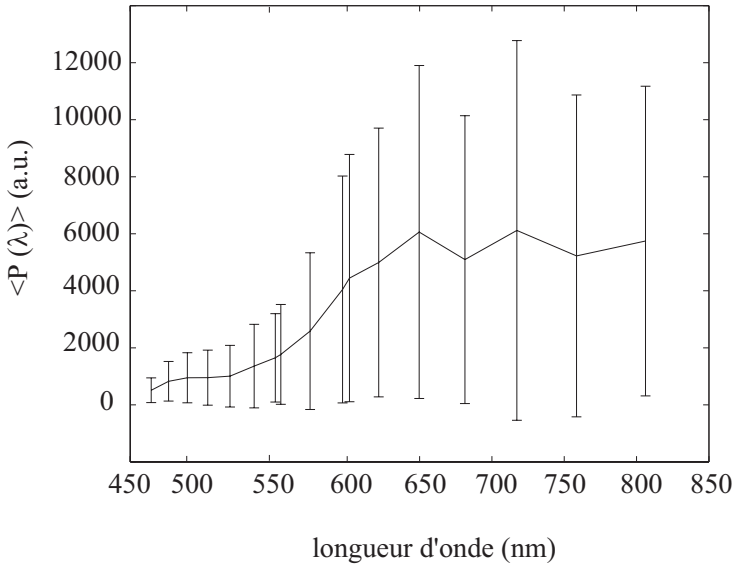


FIG. 3.6 – *Spectre de puissance du continuum simulé (moyenne sur 1000 impulsions) et fluctuations associées (les barres d'erreurs ont pour hauteur 2σ).*

De façon tout à fait comparable aux résultats obtenus au Chapitre 1 (fig. 1.30.b.), cette simulation souligne l'existence de très importantes fluctuations d'intensité apparaissant entre les différents pulses du continuum.
Afin d'estimer les variations des formes et largeurs temporelles entre différents pulses de même longueur d'onde, nous traçons sur la figure (3.7) la fonction d'intercorrélation d'intensité normalisée moyenne $< g_2(\tau) >$ pour l'ensemble du spectre, avec :

$$< g_2(\tau) >= \left\langle \frac{\int I_i(t) I_j(t-\tau) dt}{\sqrt{\int I_i^2(t) dt} \sqrt{\int I_j^2(t) dt}} \right\rangle_{i,j} \qquad (i,j) \in [1;1000] \tag{3.8}$$

où $I_i(t)$ et $I_j(t)$ sont les profils temporels des impulsions n^o i et j, filtrée à la même longueur d'onde, et τ le retard temporel introduit entre elles.

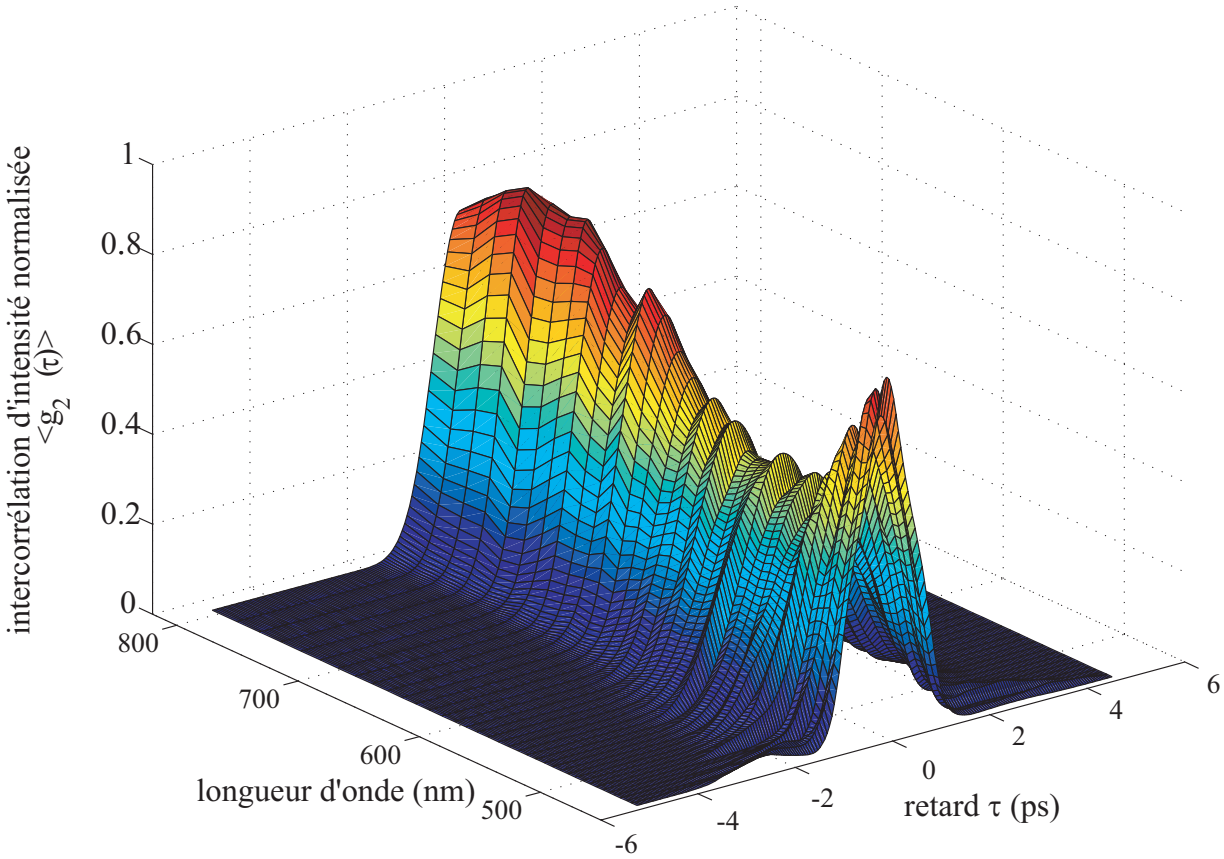


FIG. 3.7 – *Estimation numérique de la similarité des formes temporelles entre pulses du continuum filtrés à la même longueur d'onde : fonction d'intercorrélation en intensité normalisée.*

Pour un retard τ nul, la valeur de $< g_2(0) >$ est d'autant plus proche de 1 que les impulsions i et j sont identiques, pour toutes les valeurs de i et j. Selon la région spectrale, la valeur d'intercorrélation maximale atteinte est comprise entre 0,4 et 0,8 : ces simulations numériques nous montrent donc que les impulsions du continuum filtrées spectralement n'ont pas, tir à tir, le même profil temporel. D'autre part, cette intercorrélation numérique fournit des durées d'impulsions de quelques picosecondes, équivalentes à celles mesurées par intercorrélation à 2 photons (cf. Chapitre 1).

Ainsi, chaque pulse du continuum possède un niveau d'énergie et un profil temporel particuliers. Pour déterminer si un tel continuum peut être utilisé comme source pour la microscopie STED, il est alors nécessaire d'évaluer l'influence de ces fluctuations sur l'efficacité de la déplétion et sur la résolution spatiale.

3.3.2 Influence des fluctuations du continuum sur la dépletion de fluorescence

Dans l'ensemble de ce paragraphe 3.3.2, la puissance spectrale moyenne des pulses issus du continuum est de $5\ mW/nm$ [4] : l'intérêt est d'utiliser dans ces simulations une puissance suffisante pour induire le phénomène d'émission stimulée et d'observer les conséquences des fluctuations du continuum simulé sur la suppression de la fluorescence. L'influence du paramètre de puissance spectrale sera abordée ci-dessous [5].
L'efficacité de la dépletion est quantifiée par le coefficient η défini par la relation 3.7, pouvant s'exprimer également en fonction des populations $N_3(0)$ et $N_3(\tau)$ du niveau S_1 (respectivement avant et après l'arrivée du pulse STED) par :

$$\eta = \frac{N_3(0) - N_3(\tau)}{N_3(0)} \quad (\%) \tag{3.9}$$

D'après cette définition, l'émission stimulée introduite par le pulse STED permet de dépeupler complètement le niveau S_1 sans émission de fluorescence lorsque $\eta = 100\%$. L'objectif des calculs suivants est de déterminer la valeur de η pour des pulses d'excitation et STED issus du continuum simulé.
Il faut ajouter à la condition 3.9 le fait que la durée des pulses doit être comprise entre 10 et 100 ps. Or, les résultats de l'intercorrélation numérique et expérimentale montrent que la durée moyenne de impulsions est de quelques picosecondes seulement. Un allongement des pulses via un "stretcher" est donc nécessaire pour optimiser la dépletion.
L'organigramme (3.8) présente l'ensemble des étapes conduisant à la détermination de η induit par la superposition d'un couple quelconque de pulses issus du continuum. Chacun des 1000 continua calculés précédemment subit successivement un filtrage spectral, identique à la traversée de l'$AOTF_1$ du montage confocal, puis un allongement temporel similaire au passage dans un stretcher. Les fluctuations temporelles et/ou d'intensité sont ensuite prises en compte avant de résoudre les équations de populations. Le coefficient η défini par l'expression (3.9) est ainsi calculé pour n'importe quel pulse issu du continuum.

[4] Ce niveau de puissance moyenne est disponible sur des continua commerciaux, où une fibre microstructurée est pompée par un laser fibré picoseconde : par exemple, le continuum "SC 450" , Fianium LTD.

[5] On fait ici l'hypothèse que les fluctuations du continuum sont indépendantes de la puissance de pompe.

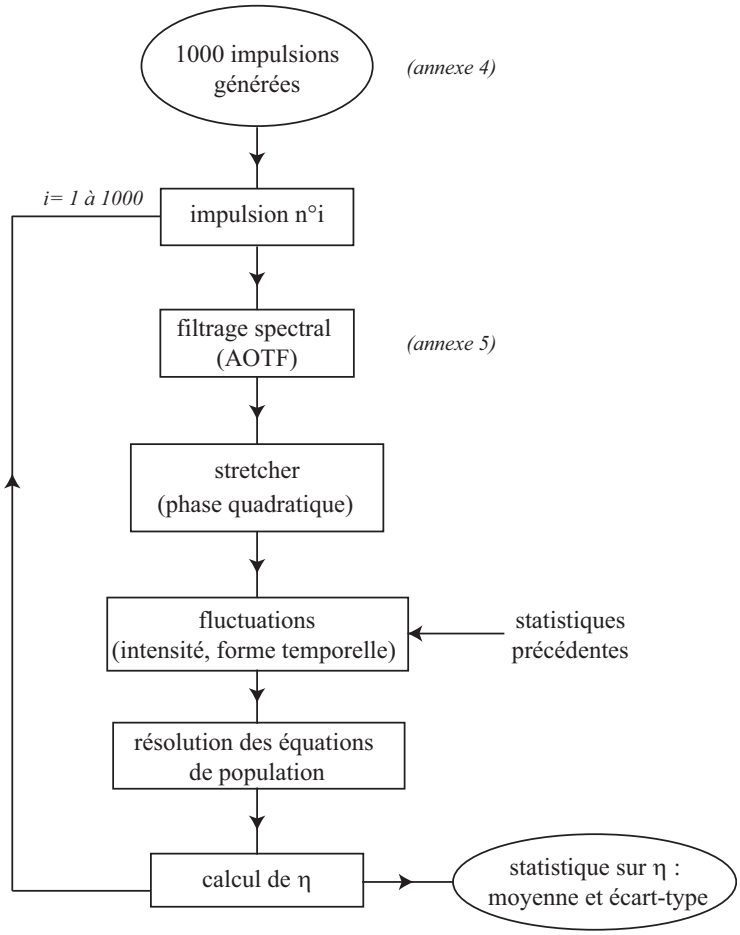


FIG. 3.8 – *Organigramme présentant les différentes étapes du calcul du coefficient d'efficacité η pour des impulsions STED issues du continuum.*

Sur la figure (3.9) est tracée l'évolution du coefficient η en fonction de la largeur τ du pulse STED. En traits pointillés, η est calculé pour des pulses de mêmes intensités, mais de formes temporelles différentes. Pour des pulses STED allongés jusqu'à 30 ps environ, l'efficacité de dépletion atteint $98\ \%$ et les fluctuations de forme temporelle n'ont qu'une influence très faible sur l'efficacité de dépletion : les variations de η sont inférieures à $5\ \%$. En traits pleins, η est calculé en tenant compte des fluctuations de forme temporelle et des fluctuations d'intensité. L'influence de ces dernières est manifestement la plus gênante puisque d'un pulse STED à l'autre, η peut varier de $20\ \%$. Dans la même gamme de largeur temporelle que précédemment ($\simeq 30\ ps$), l'efficacité de dépletion est de $95\ \%$ avec des variations pulse à pulse de $20\ \%$.

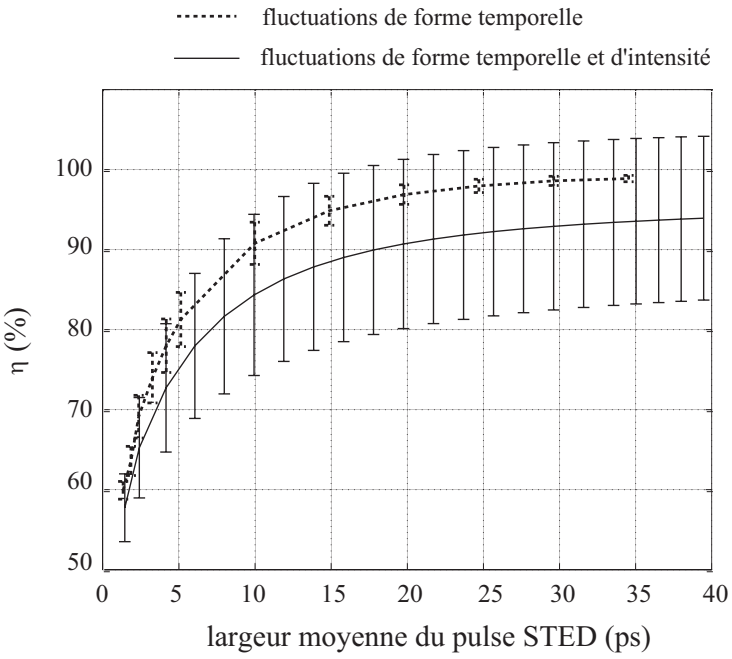


FIG. 3.9 – *Influence des fluctuations de forme temporelle et totales (temporelles et d'intensité) des pulses STED issus du continuum sur l'efficacité de dépletion η, pour différentes largeurs de pulses STED. La limite maximale de 40 ps est limitée uniquement par la taille des données numériques traitées.*

Comme nous l'avons vu au paragraphe (3.2), la résolution latérale d'un microscope STED est directement reliée à l'efficacité de dépletion : il est donc prévisible que la résolution spatiale fluctue d'un pulse STED à l'autre.

3.3.3 Influence des fluctuations du continuum sur la résolution latérale

Dans toutes les simulations suivantes, les impulsions des faisceaux d'excitation et de STED sont issues du continuum de lumière généré numériquement, et possèdent une largeur spectrale de $2\,nm$. Les puissances moyennes utilisées sont respectivement notées $< P_{exc} >$ et $< P_{STED} >$. Le profil du spot d'excitation sera décrit par une tache d'Airy et le spot STED aura un profil décrit par la répartition en champ lointain d'un faisceau de Laguerre-Gauss (cf.3.4.3). Ces derniers sont tracés sur la figure (3.10).

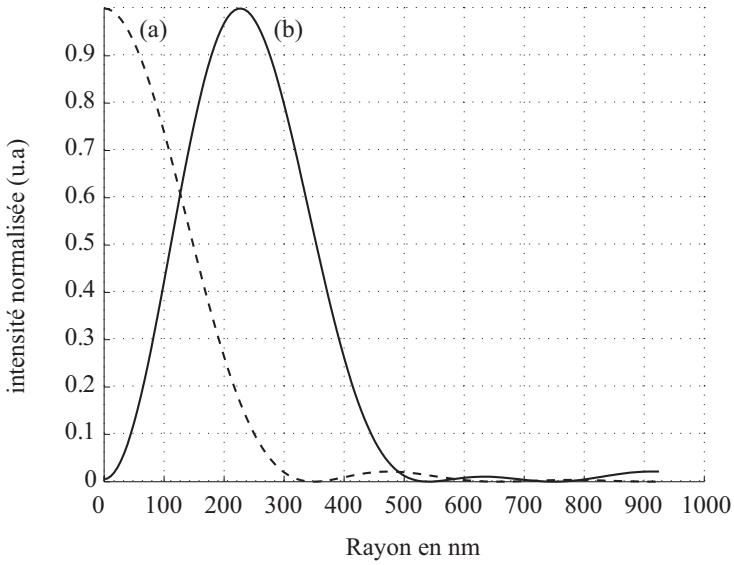


FIG. 3.10 – *Profils des distributions d'intensité utilisés dans les simulations numériques : (a) profil d'Airy du faisceau d'excitation avec un premier zéro à 350 nm, (b) profil Laguerre-Gaussien pour le faisceau STED.*

Puisque le continuum présente tir à tir de fortes fluctuations, l'objectif de ce paragraphe est de déterminer, dans des conditions de puissances moyennes fixées, l'influence de ces variations sur la résolution latérale, c'est-à-dire sur le rayon du spot d'émission de fluorescence après le passage du pulse STED.
Le spot d'émission de fluorescence après le passage du pulse d'excitation présente une distribution spatiale d'Airy s'écrivant :

$$I(v) = \left[\frac{2J_1(v)}{v}\right]^2 \tag{3.10}$$

où J_1 est la fonction de Bessel de première espèce, et $v = \frac{2\pi}{\lambda}\ r\ ON$ la coordonnée radiale normalisée du plan décrite au Chapitre 2. La première annulation de cette distribution a lieu lorsque $v = r_0 = \frac{0{,}61\lambda}{ON}$. Nous choisissons de fixer la valeur de r_0 à l'ordre de grandeur de celle qui a été mesurée dans la configuration confocale avec l'emploi d'un objectif d'ouverture numérique $1,35$, soit $r_0 = 350\ nm$.
Nous choisissons de déterminer la résolution du microscope STED en calculant le rayon $< R_{85\%} >$ de la surface contenant 85% de l'énergie du lobe central de la tache d'Airy. Ce rayon vérifie la relation suivante :

$$\frac{\int_0^{\mathrm{V}} vI_1(v)dv}{\int_0^{\infty} vI_1(v)dv} = 0,85 \quad \text{avec} \quad \mathrm{V} = \frac{2\pi}{\lambda}\ < R_{85\%} >\ ON \tag{3.11}$$

La valeur de $< R_{85\%} >$ dépend de r_0 selon la relation [6] :

$$< R_{85\%} >= 0,607\, r_0 \tag{3.12}$$

On définira ainsi le paramètre $\alpha_{85\%}^{STED}$ pour quantifier dans les simulations suivantes, la résolution obtenue en configuration STED :

$$\alpha_{85\%}^{STED} = \frac{< R_{85\%} >}{r_0} \tag{3.13}$$

Plus $\alpha_{85\%}^{STED}$ est faible, plus la résolution est élevée ; la borne supérieure est $\alpha_{85\%}^{STED} = 1$ ce qui représente le cas où la résolution est identique à celle d'un microscope conventionnel.

Les figures (3.11) représentent une vue transverse des spots d'émission de fluorescence avant et après le passage de 100 pulses STED. Elles ont été tracées en considérant $< P_{exc} >= 0,5\, mW$ et $< P_{STED} >= 10\, mW$, avec l'ensemble des fluctuations inter-pulses calculées précédemment et une largeur d'impulsions de 40 ps.

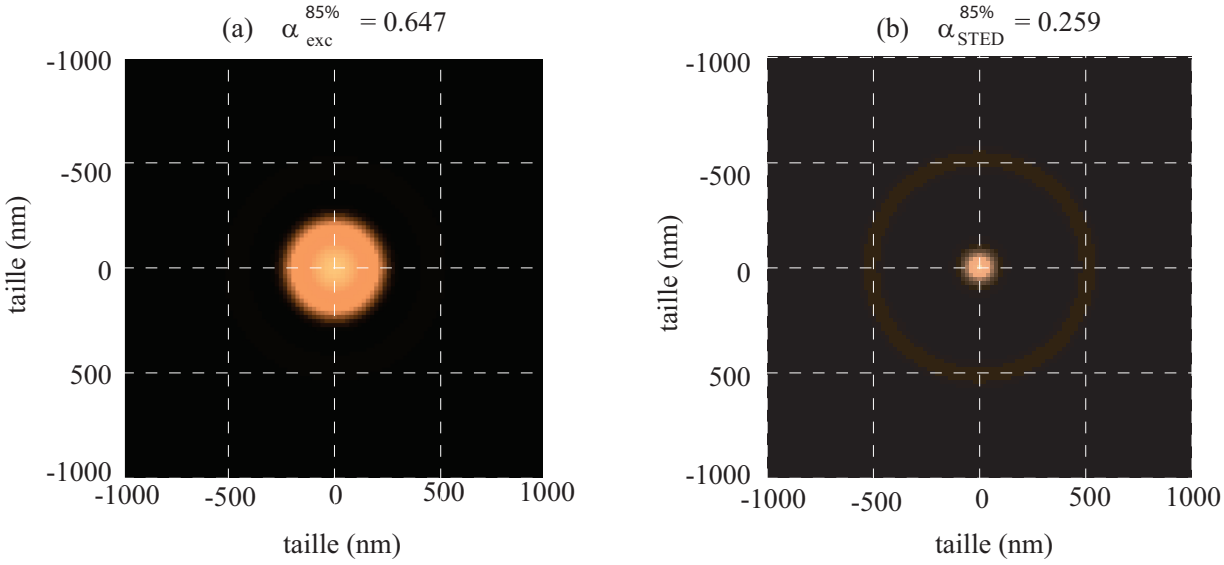


FIG. 3.11 – *(a) Coupe transverse du spot d'émission de fluorescence sans pulse STED. Le rayon de la tache d'Airy donnée par l'objectif est arbitrairement fixé à 350 nm, soit $\alpha_{85\%}^{exc} = 0,647$. (b) Coupe transverse du spot d'emission de fluorescence avec pulses STED (moyennage sur 100 pulses STED), $\alpha_{85\%}^{STED} = 0,259$. Paramètres : $< P_{exc} >= 0,5\, mW$, $< P_{STED} >= 10\, mW$.*

L'image (3.11.a.) est le spot d'émission de fluorescence sans pulse STED, c'est-à-dire identique au spot d'excitation obtenu en configuration confocale, avec un premier rayon de la tache

[6] Pour d'autres seuils d'énergie, on trouve également :$< R_{50\%} >= 0,3865 r_0$, et $< R_{80\%} >= 0,5664\, r_0$

d'Airy fixé à $350\ nm$. 85 % de l'énergie de fluorescence après passage du faisceau d'excitation est contenue dans une surface de rayon 0,607r_0, soit ici 212 nm. L'image (3.11.b.) est le spot moyen résultant de la superposition de 100 couples de pulses excitation/STED différant par leurs fluctuations, et l'on calcule $\alpha_{85\%}^{STED} = 0,259$. La taille moyenne du spot d'émission est réduite à $< R_{85\%} >= 90\ nm$: la résolution habituellement fixée par la diffraction du faisceau d'excitation due à l'objectif est donc très largement dépassée.
Ainsi, pour une puissance moyenne spectrale suffisante et pour une largeur de pulses adaptée, des expériences de microscopie STED avec un continuum de lumière semblent possible. Théoriquement, la résolution spatiale attendue dépend cependant de manière critique de la puissance contenue dans chaque pulse. Deux paramètres importants sont donc à contrôler : la puissance moyenne des pulses STED et la puissance contenue dans chacun des pulses.

Nous observons en premier lieu l'influence sur la résolution d'une élévation de la puissance moyenne des pulses STED. Sur la figure (3.12), le profil (a) correspond à la distribution de fluorescence après le passage des pulses d'excitation (fonction d'Airy de premier zéro r_0). Les profils (b) correspondent aux distributions de fluorescence moyennes après le passage de 100 pulses STED affectés par l'ensemble des fluctuations, et répartis en populations de puissance moyenne $< P_{STED} >$ croissante.

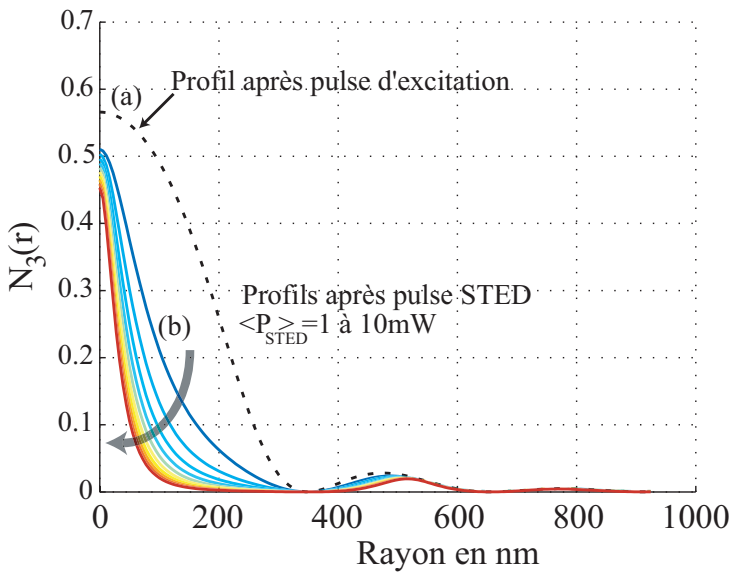


FIG. 3.12 – *(a) Profil de la distribution de fluorescence après excitation, (b) Profils des distributions de fluorescence après STED et pour des puissances moyennes de 1 à* $10\ mW$ *(moyenne sur 100 pulses).*

Comme le prévoit le principe de la microscopie STED, la taille du spot d'émission de fluorescence décroît lorsque la puissance du faisceau STED augmente. En effet, plus les pulses STED sont énergétiques, plus le phénomène d'émission stimulée est favorisé, aux dépends de l'émission de fluorescence. Le profil annulaire du faisceau STED permet finalement de supprimer efficacement toute information provenant du pourtour du volume d'excitation : la résolution latérale est augmentée.

Dans un deuxième temps, on remarque qu'au sein d'une population de pulses ayant la même puissance moyenne, les fluctuations de forme temporelle et plus fortement les fluctuations d'intensité limitent l'augmentation de la résolution. En effet, pour une puissance $< P_{STED} >$ fixée, on observe une très nette différence de résolution selon les caractéristiques du pulse STED utilisé : sur la figure (3.13.A.) sont tracés les spots d'émission de fluorescence relatifs à la superposition d'un pulse d'excitation et du pulse STED respectivement le moins énergétique (cas a.), et le plus énergétique (cas c.). Le résultat dû à la moyenne sur 100 pulses est rappelé sur le cas b.

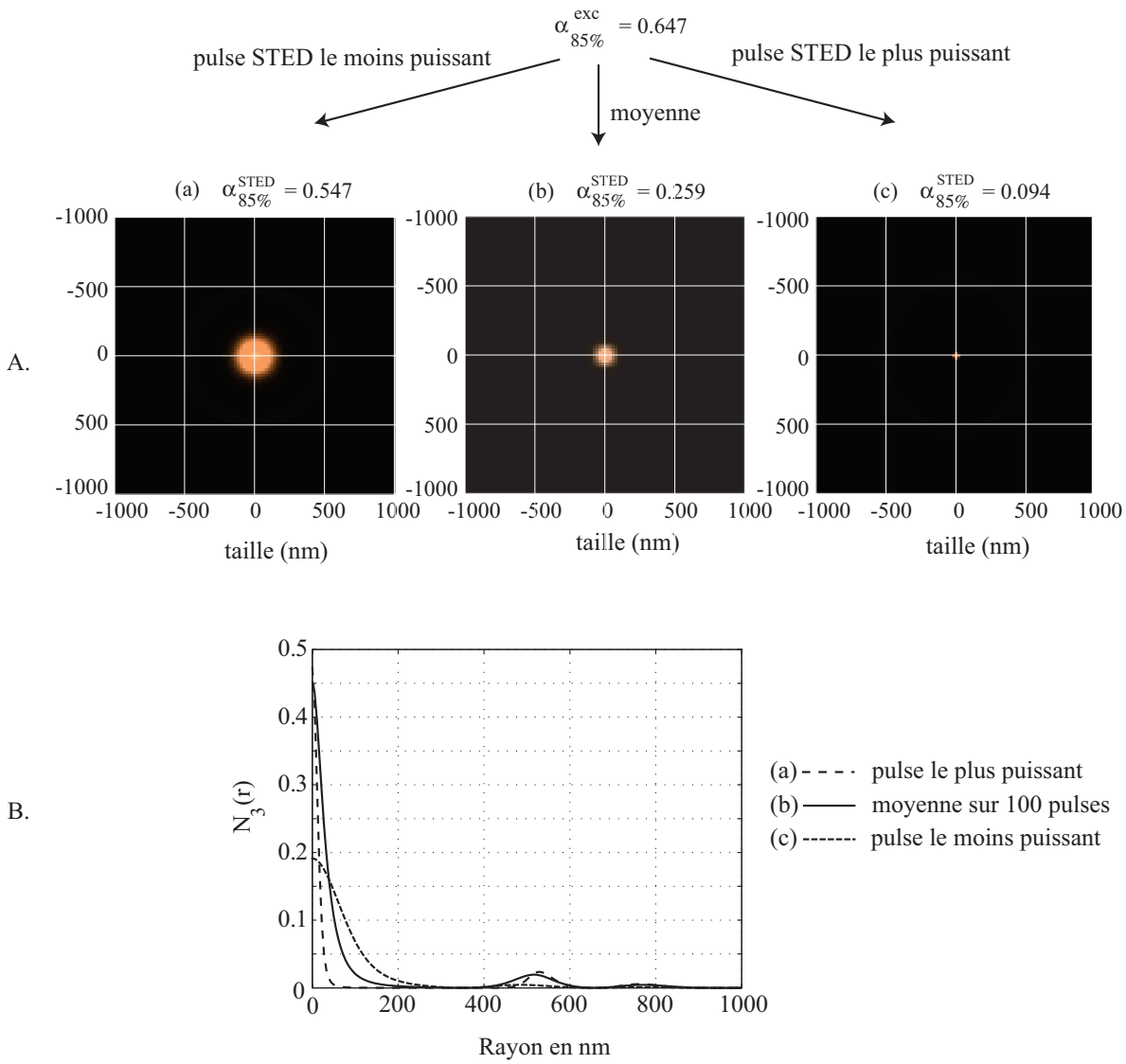


FIG. 3.13 – *A. Coupe transverse du spot d'emission de fluorescence après passage d'un pulse STED. B. Profils des distributions de fluorescence (population N_3) relatif à l'effet STED du pulse le moins puissant (a), le plus puissant (c), et à l'effet STED moyen résultant de 100 pulses (b). Paramètres : $\alpha^{exc}_{85\%}$ =0,647, $< P_{exc} > = 0,5\ mW$ et $< P_{STED} > = 10\ mW$.*

Les profils de distribution de fluorescence correspondants sont représentés sur la figure (3.13.B.). La résolution varie de $\alpha^{STED}_{85\%} = 0,547$ à 0,094, soit ici $< R_{85\%} >$ variant 190 à 33 nm, avec une valeur moyenne de 90 nm.

L'efficacité du faisceau STED sur l'augmentation de la résolution est donc remise en cause pour les pulses les moins énergétiques. En moyenne, la taille du spot d'émission de fluorescence est nettement réduite par rapport à la microscopie classique (d'un facteur $\alpha^{exc}_{85\%}/\alpha^{STED}_{85\%} = 2,5$

environ), mais la résolution peut être encore améliorée (jusqu'à un facteur 7) par l'utilisation de pulses STED sélectionnés selon leur niveau d'énergie. Ceci s'accompagnerait néanmoins d'une augmentation du temps d'acquisition des images STED, selon la proportion des pulses STED vérifiant la condition de haute puissance dans la population des pulses disponibles.
Pour illustrer ce fait, chaque point de la figure (3.14) représente le rapport $\alpha_{85\%}^{STED}$ pour *chaque* pulse STED. Plus la puissance moyenne spectrale est élevée, plus la proportion de pulses STED permettant d'améliorer radicalement la résolution est importante.

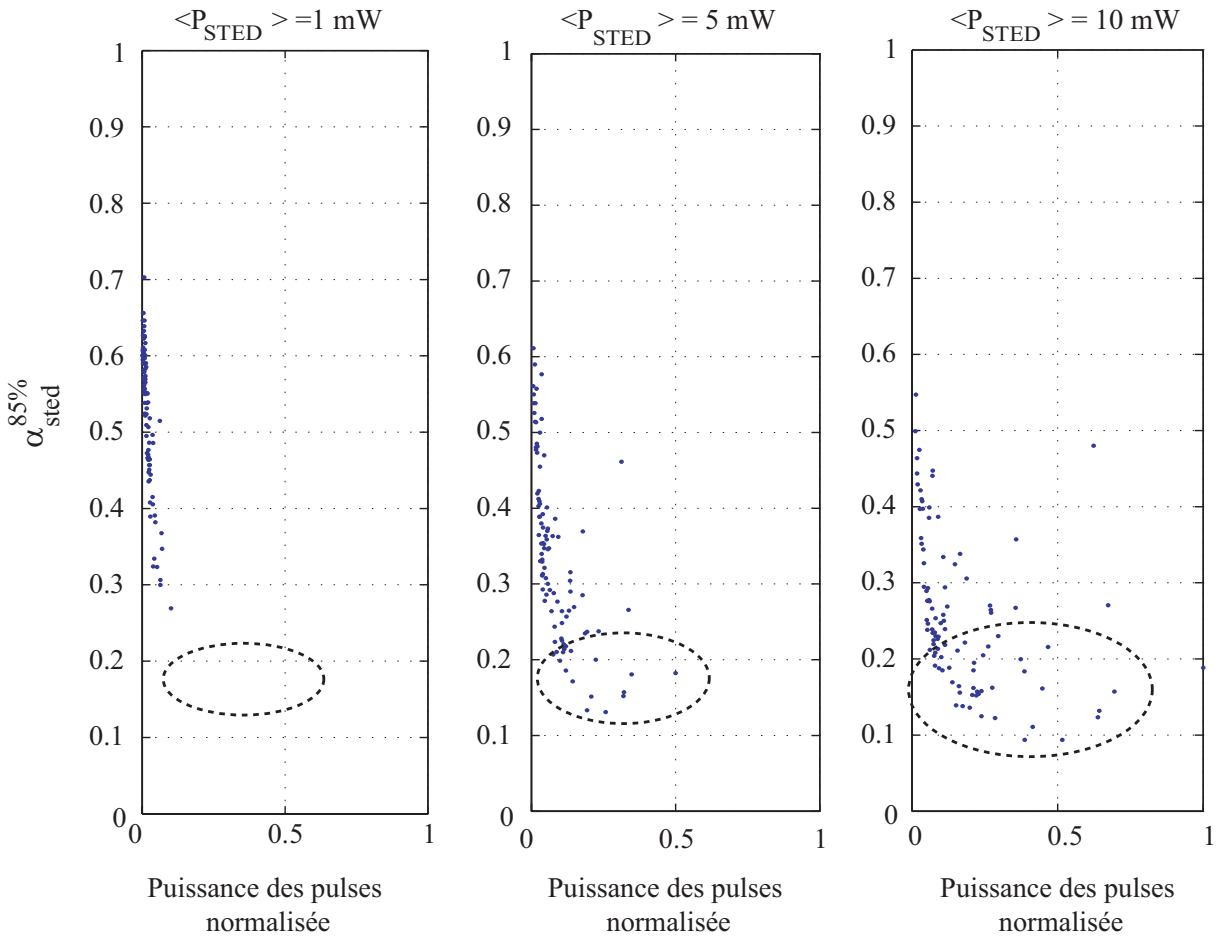


FIG. 3.14 – *Rapport $\alpha_{85\%}^{STED}$ calculé pour chaque pulse STED (population de 100 pulses). Distributions pour des puissances moyennes de 1, 5 et 10 mW et une largeur spectrale $\Delta\lambda = 2\ nm$. Sont entourés en pointillés, les pulses permettant d'obtenir un spot de fluorescence 5 fois plus petit que r_0 (premier rayon du spot confocal).*

Par exemple, si l'on souhaite obtenir une résolution 5 fois meilleure qu'en configuration classique avec un faisceau STED de puissance moyenne de $1\ mW$, aucun pulse ne convient. Par

contre, dans le cas d'une puissance moyenne STED de $5\ mW$, 15% des pulses seront utilisables et pour $10\ mW$, environ 35% des pulses permettront d'atteindre cette résolution, soit l'équivalent d'un pulse pouvant être sélectionné toutes les $40\ ns$ au lieu de $12,5\ ns$.

En conclusion, l'utilisation d'un continuum de lumière en régime femtoseconde comme source pour la microscopie STED semble tout à fait réalisable : le rayon moyen attendu de la tache de fluorescence contenant 85 % de l'énergie est de l'ordre de $90\ nm$, pour $< P_{exc} > = 0,5\ mW$ et $< P_{STED} > = 10\ mW$ et pour r_0 = 350 nm. L'influence des fluctuations de forme temporelle et d'intensité du continuum tend à réduire l'importance de l'augmentation de la résolution. Une résolution supérieure peut en effet être atteinte, mais seulement en sélectionnant les pulses de dépletion présentant une puissance particulièrement élevée.

3.4 Montage expérimental

3.4.1 Présentation générale

Le montage complet du microscope STED réalisé est schématisé sur la figure suivante :

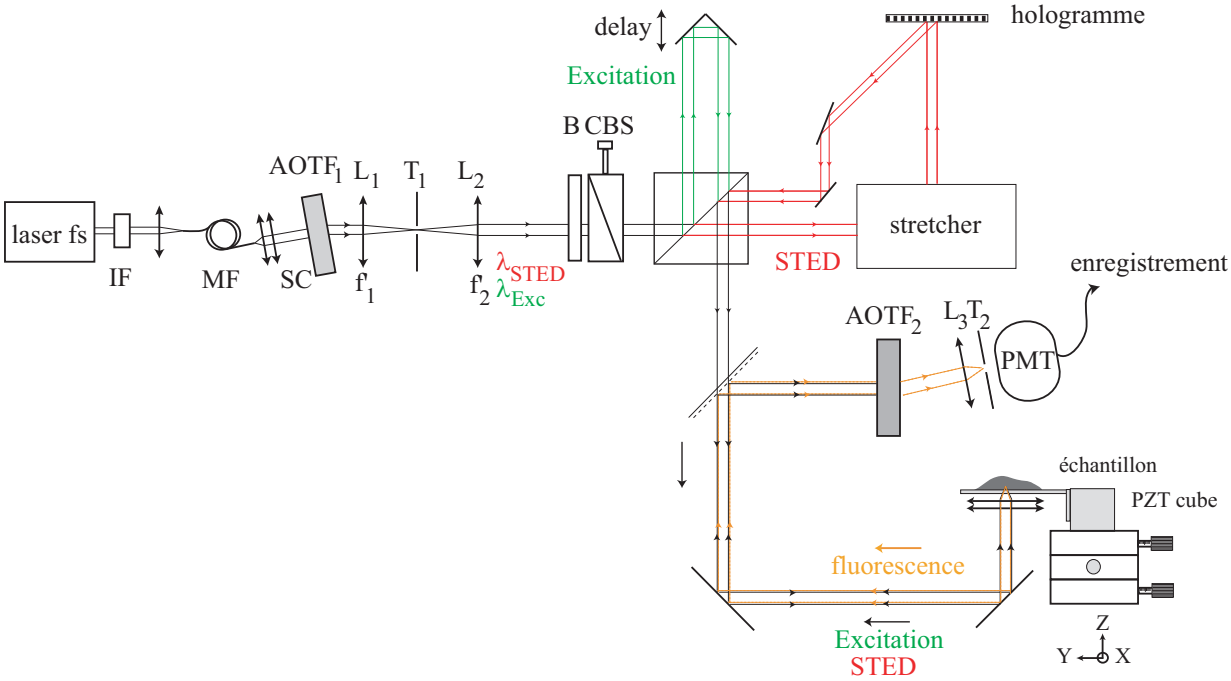


FIG. 3.15 – *Schéma du montage du microscope STED réalisé.*

Le supercontinuum (SC) est généré comme décrit dans le chapitre 1, par l'injection d'im-

pulsions femtosecondes à $\lambda = 800\ nm$ dans une fibre microstructurée (MF). Un premier filtre acousto-optique ($AOTF_1$) permet de sélectionner simultanément parmi ce continuum les deux bandes spectrales correspondant au faisceau d'excitation (λ_{exc}) et au faisceau STED (λ_{STED}), grâce à la propagation dans le cristal de TeO_2 d'une onde acoustique composée de deux fréquences. Les deux faisceaux sont collimatés, colinéaires, superposés et de même polarisation, et ont une finesse spectrale de l'ordre de $2\ nm$.
La séparation des deux faisceaux est effectuée grâce à un montage de polarisation composé d'une lame biréfringente (B), d'un compensateur de Babinet-Soleil (CBS) et d'un cube séparateur de polarisation.
La voie relative au faisceau d'excitation est équipée d'une ligne à retard, tandis que les pulses STED sont tout d'abord allongés temporellement par un stretcher à réseaux, puis mis en forme annulaire par un hologramme de phase en réflexion.
Les deux faisceaux se recombinent sur le cube séparateur avant d'être focalisés sur l'échantillon par un objectif de forte ouverture numérique (x100, ON=1.35, immersion à l'huile). Le positionnement tridimensionnel de l'échantillon est assuré par un cube piezo-électrique, de déplacement minimal 1,5 nm et de précision 25 nm. Le signal de fluorescence ainsi que les deux signaux pompe diffusés par l'échantillon sont collectés et collimatés par le même objectif. Une lame séparatrice réfléchit une fraction de ces trois signaux vers un second filtre acousto-optique ($AOTF_2$) : seul le signal de fluorescence est collecté par le photomultiplicateur (PMT), derrière le trou de confocalité T_2. De façon similaire au microscope confocal, l'intensité du signal de fluorescence est enregistrée, ainsi que la position XYZ de l'échantillon.
Les méthodes utilisées pour la séparation des deux faisceaux et la mise en forme annulaire du faisceau STED sont les deux éléments originaux de ce montage et sont détaillées ci-dessous.

3.4.2 Méthode de séparation des faisceaux

L'utilisation d'un continuum de lumière comme source optique est motivée par le besoin d'utiliser de manière très flexible n'importe quel fluorophore. Le critère requis dans ce montage est donc la versatilité en longueur d'onde de chaque élément optique.
En sortie du filtre acousto-optique, les faisceaux d'excitation et de STED ne diffèrent que par leur longueur d'onde. Un miroir dichroïque pourrait donc simplement être employé pour les séparer. Néanmoins, ces longueurs d'onde étant déterminées d'après les spectres d'émission et d'absorption du fluorophore utilisé (cf.figure 3.4), le miroir dichroïque devrait être remplacé à chaque nouveau marqueur. L'idée développée dans ce montage est d'affecter à chaque voie (excitation ou STED) une direction de polarisation privilégiée, à l'aide d'éléments biréfringents. Un cube séparateur oriente ensuite chacun des deux faisceaux dans la voie correspondante.

L'élément principal est une lame biréfringente associée à un compensateur de Babinet-Soleil. Considérons une lame biréfringente quelconque d'épaisseur e, illuminée par une source blanche, placée entre un polariseur et un analyseur croisés et dont les axes optiques sont orientés à 45° de la polarisation incidente (figure 3.16).

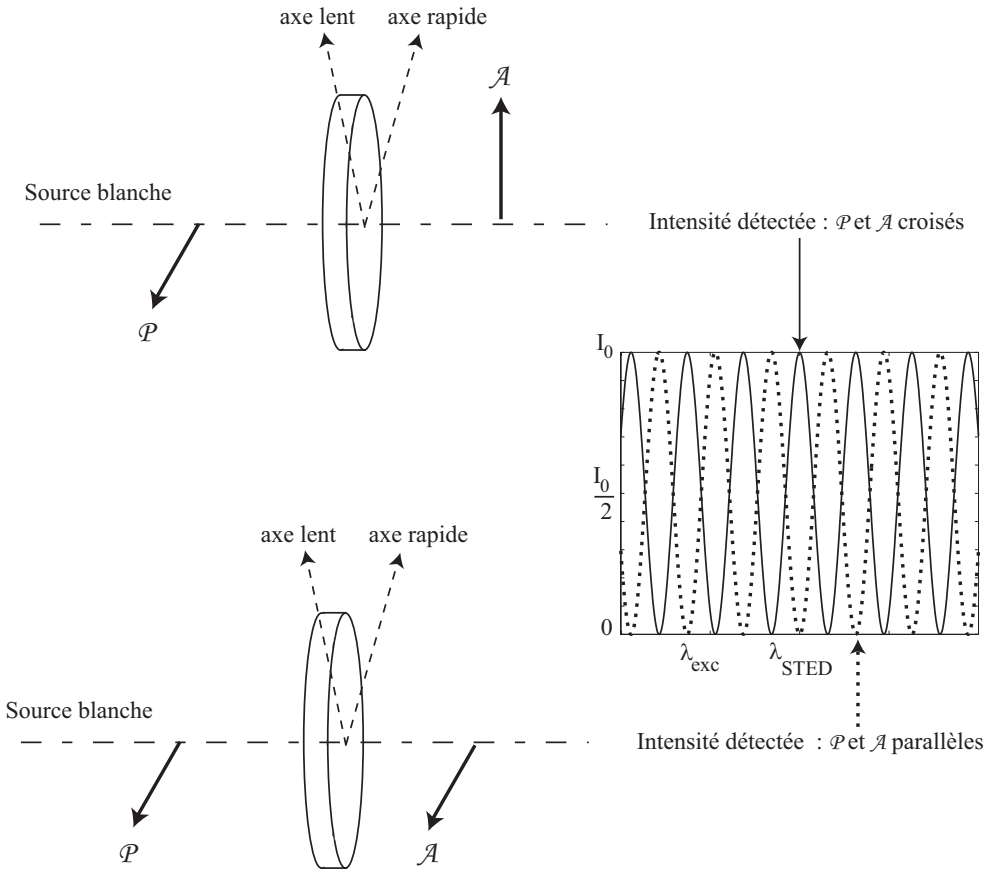


FIG. 3.16 – *Spectres cannelés complémentaires obtenus à l'aide d'une lame biréfringente entre polariseur et analyseur croisés ou parallèles.*

Le spectre obtenu après l'analyseur est cannelé puisque pour certaines longueurs d'onde, le déphasage introduit entre les deux axes neutres par la biréfringence Δn_L de la lame provoque des interférences destructives. L'intensité I_c reçue par un détecteur placé après l'analyseur suit une loi du type :

$$I_c = I_0 \sin^2(\frac{\phi}{2}) \quad \text{avec} \quad \phi = \frac{2\pi}{\lambda}\Delta n_L\, e \tag{3.14}$$

Lorsque l'analyseur est parallèle au polariseur, l'intensité I_p relevée après l'analyseur a pour expression la loi suivante :

$$I_p = 1 - I_c = I_0 \cos^2(\frac{\phi}{2}) \quad \text{avec} \quad \phi = \frac{2\pi}{\lambda}\Delta n_L\, e \tag{3.15}$$

Le spectre obtenu est donc également cannelé, de même périodicité, et complémentaire du précédent. Ainsi, lorsque deux faisceaux polarisés horizontalement de longueurs d'onde λ_{exc} et λ_{STED} (positionnées sur un minimum et un maximum des cannelures) traversent une lame biréfringente, on obtient théoriquement selon l'une des polarisations 100% de l'énergie du faisceau λ_{exc}, sans présence de λ_{STED}, et un rapport inverse sur l'autre direction de polarisation. Les deux faisceaux peuvent être ainsi, par la suite, séparés par polarisation avec des pertes d'énergie minimale.
Cet élément n'est pas strictement versatile, puisque seuls les couples de longueurs d'onde se distribuant selon le peigne fixé par la périodicité des interférences peuvent être séparés. On ajoute alors un compensateur de Babinet-Soleil après la lame biréfringente : celui-ci permet d'ajuster la position de ce peigne, mais ne modifie cependant peu ou pas sa périodicité. Un tel compensateur est constitué d'une lame biréfringente et de deux coins de quartz accolés, taillés perpendiculairement à l'axe optique, l'un des deux coins pouvant se déplacer par rapport à l'autre d'une distance notée d. Ce décalage introduit un déplacement de l'ensemble des franges générées par la lame biréfringente [86].
La lame biréfringente est choisie selon la demi-période des cannelures qu'elle provoque : cette demi-période doit approximativement correspondre à l'écart entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales des fluorophores. Les marqueurs dont nous disposons, comme la Rhodamine B, présentent un décalage de Stokes d'environ 10 à 15 nm. Nous choisissons une lame de quartz d'épaisseur $1\ mm$, et fournissant des cannelures d'une demi-période d'environ 15 nm à 600 nm [7].

[7] La périodicité des cannelures est effective en $\sigma = \frac{1}{\lambda}$. Expérimentalement, on mesure $\Delta\sigma$=$5,5.10^{-5} mm^{-1}$, soit $\Delta\lambda \simeq 20\ nm$ à $600\ nm$.

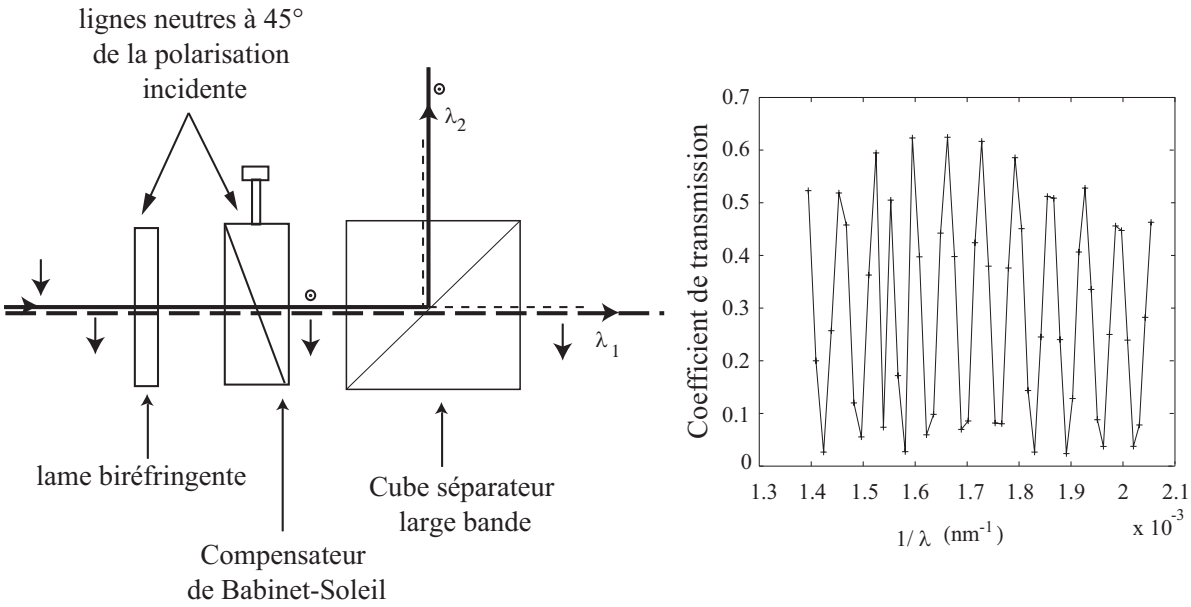


FIG. 3.17 – *Schéma de l'étage de séparation des faisceaux et coefficient de transmission expérimental.*

La figure (3.17) présente la succession des trois éléments optiques permettant la séparation des faisceaux d'excitation et de STED : la lame biréfringente fixe l'écart en longueurs d'onde des faisceaux pouvant être séparés, le compensateur de Babinet permet, grâce à la vis micrométrique de déplacement d'un prisme, l'ajustement de la position du peigne sur les deux longueurs d'onde optimales choisies, et le cube large bande séparant la polarisation horizontale de la polarisation verticale, sépare ainsi les deux faisceaux.
L'efficacité de ce système est mesurée de la manière suivante : longueur d'onde par longueur d'onde, nous mesurons la puissance disponible avant le système de séparation et la puissance transmise par le cube. La courbe du coefficient de transmission T est tracée sur la figure (3.17) en fonction de $1/\lambda$. Nous obtenons bien un spectre cannelé avec un coefficient d'extinction satisfaisant (T= 2 à 8 $\%$ selon la longueur d'onde). La largeur spectrale des cannelures mesurées pour un taux de transmission de 30% est 15 nm à 600 nm, soit 6 à 7 fois plus grand que la largeur spectrale des faisceaux. Néanmoins, on note que le coefficient de transmission maximal n'atteint que 65 $\%$ au lieu des 90 $\%$ attendus après le cube séparateur. Cet écart est imputable à l'absence de traitement anti-reflet sur chacune des 6 interfaces de l'ensemble {lame+compensateur}.
Cette méthode de séparation par polarisation est donc très efficace[8], relativement accordable en

[8]La même méthode aurait pu être appliquée à l'aide de n'importe quel autre interféromètre à 2 ondes, (ex : Mach-Zehnder).

longueur d'onde, mais impose une perte d'énergie substantielle par l'absence d'un traitement adapté des faces optiques.

3.4.3 Méthode de mise en forme spatiale

La mise en forme spatiale du faisceau STED est l'idée-clé permettant de supprimer l'émission de fluorescence sur le pourtour du volume d'illumination imposé par l'objectif imageur.
La forme annulaire du faisceau STED peut être obtenue grâce à un Axicon [87], à un SLM (Spatial Light Modulator) [88], ou à un ensemble de lames de verre recouvertes de MgF_2 disposées de façon à imposer un déphasage de π entre différentes régions du faisceau [73].
Au sein de notre laboratoire, la technique de dépôt calibré d'une telle substance étant peu usitée, nous préférons nous orienter sur un autre type de solution.
Un profil annulaire peut en effet se décrire selon une loi de Laguerre-Gauss [89], dont la forme est la suivante :

$$I(x,y) = I_0 e^{i\theta(x,y)} \quad avec \quad \theta(x,y) = \arctan\frac{y}{x}, \quad (x,y) \in \mathbb{R} \tag{3.16}$$

Un tel faisceau présente une phase hélicoïdale. La mise en oeuvre d'une structure de phase permettant d'imposer un retard helicoidal n'étant pas triviale, nous choisissons de réaliser un hologramme, dont le motif résulte de l'interférence entre un front d'onde hélicoïdal et un front d'onde plan, et sur lequel est diffracté le faisceau STED. Comme toutes les longueurs d'onde issues du continuum présentent un front d'onde plan après la lentille L_2, le faisceau diffracté par l'hologramme illuminé est *a priori* annulaire pour toutes les longueurs d'onde. La figure d'interférences à l'origine de l'hologramme est générée informatiquement et est représentée ci-dessous (figure 3.18). On observe les franges d'interférences habituelles et une singularité au centre de l'image, appelée "singularité de phase". Lorsque l'ensemble de ce motif est utilisé comme réseau de phase et que la différence de chemin optique entre les franges brillantes et les franges sombres correspond à un déphasage de π, le rendement de diffraction est maximal dans les ordres $+1$ et -1 : ils concentrent alors à eux deux $80\ \%$ de l'énergie du faisceau incident tandis que l'ordre 0 est absent[9].

3.4.3.1 Réalisation et caractérisation

La figure d'interférences est transférée sur un wafer de silicium via un masque, par photolithographie. Pour la réalisation du masque, le motif est tout d'abord binarisé : la modulation sinusoïdale disparaît au profit d'une modulation binaire [0 ; 1] ; puis il est décomposé en entités

[9] cf. réseau binaire à profil rectangulaire.

élémentaires ($5\ \mu m \times 5\ \mu m$), dont la juxtaposition est à l'origine des décrochements visibles le long de chaque frange sur l'image en champ lointain de la photolithographie. La dimension limite des motifs élémentaires est fixée par les limites technologiques du masqueur.

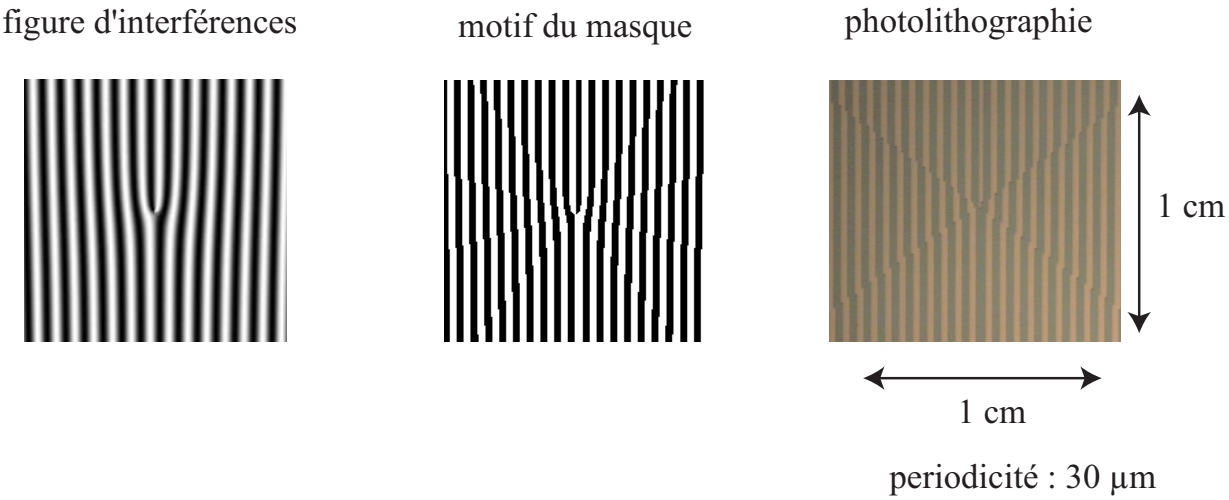


FIG. 3.18 – *Interférences entre des faisceaux présentant un front d'onde plan et hélicoïdal, et transfert du motif sur un wafer de silicium par photolithographie (observation par objectif* $\times 20$*).*

Le support de silicium est tout d'abord enduit de résine photosensible, puis couvert par le masque, il est insolé sous lampe UV. Les régions du wafer non protégées par la résine sont ensuite gravées par attaque chimique au KOH sur une profondeur désirée de $150\ nm$, soit équivalente à $\lambda/4$ pour une longueur d'onde de travail de $\lambda_{STED} \simeq 600\ nm$. Une image tridimensionnelle d'une partie de ce réseau est présentée sur la figure (3.19).

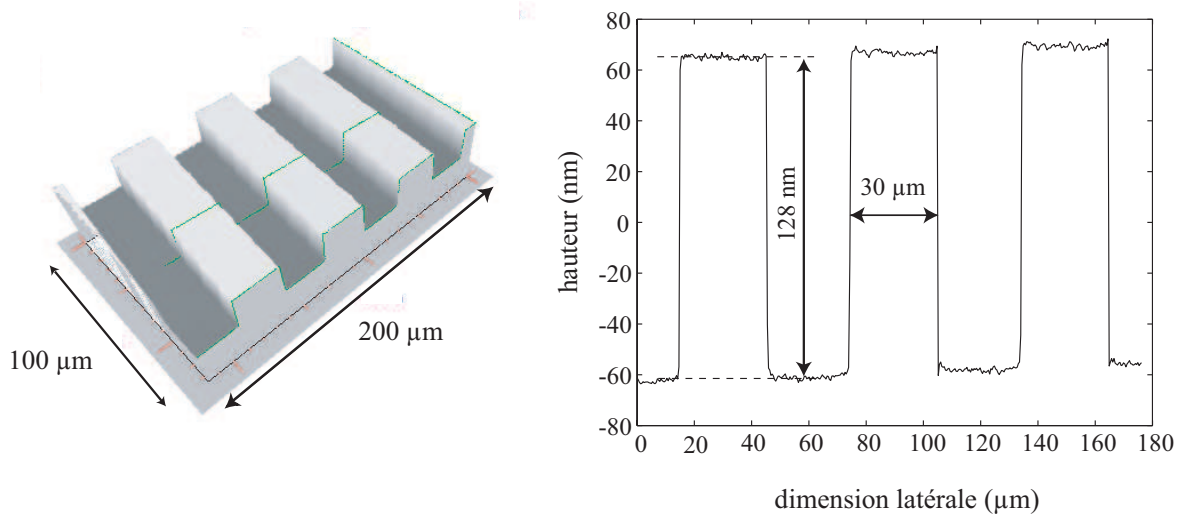


FIG. 3.19 – *Image de profilométrie du réseau gravé sur silicium : vue tridimensionnelle et profil.*

La profondeur est mesurée au profilomètre à $128\ nm \pm 2\ nm$. L'écart est imputable à l'impureté du creuset dans lequel est placé le métal.
Nous obtenons ainsi un hologramme de phase en réflexion, présentant une profondeur équivalente à $\lambda/2$ pour $\lambda_{STED} = 520\ nm$.
Le pas de ce réseau est choisi de telle sorte de bénéficier d'un angle de diffraction important - ce qui impose un pas le plus faible possible- afin de faciliter la collection du faisceau diffracté, sans pour autant introduire une trop forte dispersion chromatique, notée $\frac{d\theta}{d\lambda}$, et sans introduire trop d'erreurs sur la figure d'interférences lors de la réalisation du masque à l'aide de carrés de taille non négligeable. Le pas retenu est finalement de $30\ \mu m$ (l'angle de diffraction dans l'ordre 1 est alors de 0,02 rad).
D'autre part, le coefficient de réflexion du silicium étant relativement faible ($\simeq 30\%$), une couche d'environ $300\ nm$ d'argent a été déposée par évaporation sur l'ensemble de la surface du réseau. Les résultats de la mesure du coefficient de réflexion R du wafer sont représentés sur la courbe (3.20).

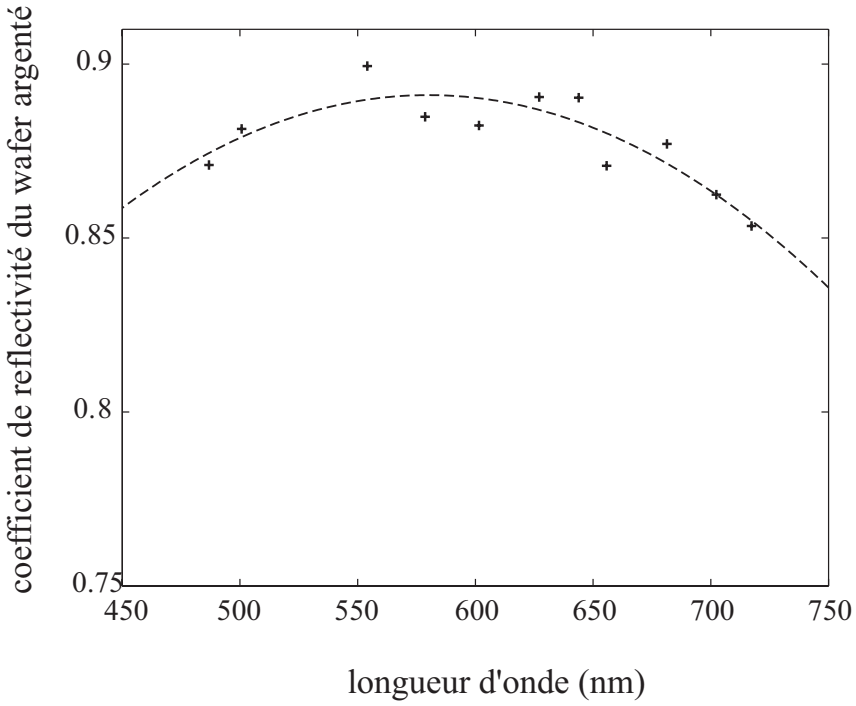


FIG. 3.20 – *Coefficient de réflexion R du support de l'hologramme (wafer de silicium recouvert d'une couche de 300 nm d'argent) sur la gamme du visible.*

La réflectivité du wafer s'élève en moyenne à 88% sur toute la gamme du visible, ce qui atteint quasiment la qualité des miroirs d'argent usuels.
Dans l'objectif de caractériser l'efficacité de cet hologramme gravé sur silicium sur la mise en forme du faisceau STED, nous mesurons tout d'abord son rendement de diffraction dans l'ordre $+1$ en fonction de la longueur d'onde du faisceau incident (figure 3.21). Celui-ci correspond au transfert d'énergie entre le faisceau gaussien incident et le faisceau annulaire qui sera utilisé dans la suite du montage.

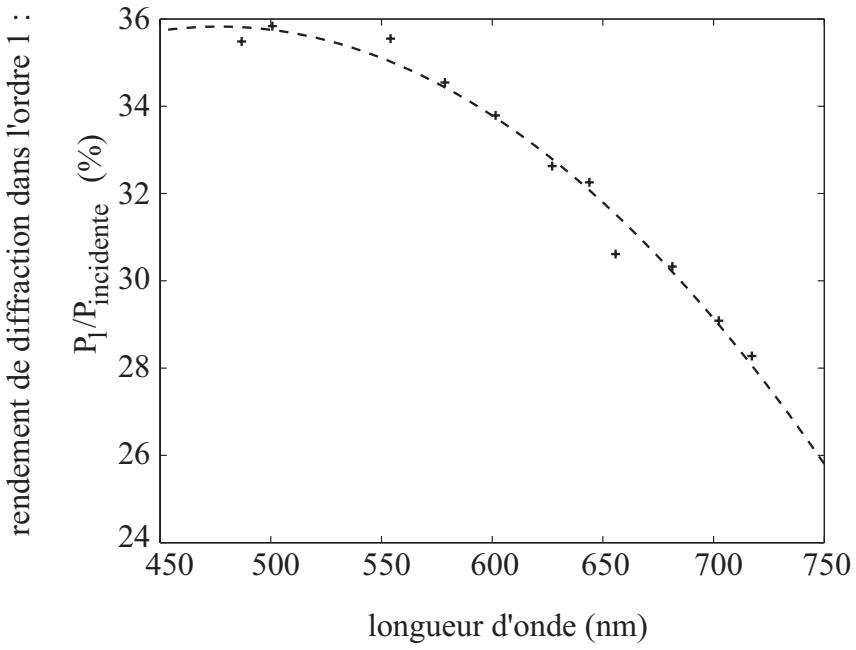


FIG. 3.21 – *Rendement de diffraction dans l'ordre +1 de l'hologramme illuminé en son centre par des ondes planes de longueur d'onde variable (compensé du coefficient de réflexion R).*

On remarque bien qu'un rendement de diffraction optimal est obtenu pour $\lambda \simeq 520\ nm$, et atteint $36\ \%$, valeur très proche du rendement théorique. Le rendement décroît lorsque λ s'écarte de la valeur nominale, mais reste compris entre 25% et 36% ce qui permet l'utilisation de cet unique élément pour mettre en forme le faisceau STED, quelle que soit sa longueur d'onde, sur la gamme [480 ; 750] nm.
Quelle que soit la longueur d'onde du faisceau incident, l'image en champ lointain de la répartition d'intensité dans l'ordre 1 a la forme suivante :

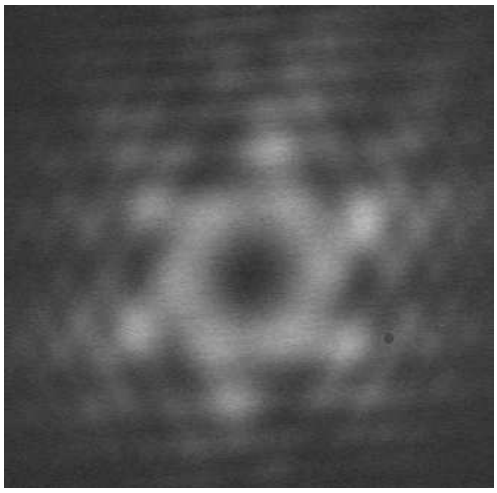


FIG. 3.22 – *Image CCD en champ lointain de l'ordre 1 de diffraction de l'hologramme illuminé en son centre par un faisceau gaussien à* $\lambda = 550\ nm$.

Ce profil fait bien apparaître une absence de lumière en son centre, mais la forme annulaire est fractionnée en de multiples zones. Ceci est dû à la juxtaposition des motifs élémentaires carrés reproduisant les franges d'interférences lors de la réalisation du masque de photolithographie. Afin d'éviter cette parcellisation et d'obtenir une forme annulaire plus conventionnelle, il est possible d'agrandir le pas du réseau ou de lisser les discontinuités rencontrées sur le masque en jouant sur l'orientation des motifs élémentaires pour reproduire au mieux les différentes orientations des franges.
L'hologramme permet donc de donner une forme proche d'un anneau au faisceau STED et ce, pour toutes les longueurs d'onde du visible avec une efficacité comprise entre 25 et 36%. Comme tout réseau, la réflexion sur l'hologramme s'accompagne d'une dispersion angulaire chromatique qui pourra être compensée au moyen d'un prisme [88].

3.4.3.2 Simulation de la tache STED attendue après focalisation

Pour estimer la répartition du champ pompe et STED (supposés monochromatiques de longueurs d'onde dans le vide λ et polarisé) au niveau du point focal de l'objectif imageur nous avons calculé numériquement l'intégrale de Debye suivante [86, 90] :

$$E_\xi^k(\mathbf{r},t) = \frac{n}{\lambda}\int_0^\alpha \int_0^{2\pi} E_{0,\xi}^k(\theta,t)\sqrt{\cos\theta}\,\sin(\theta)\,\exp\left\{i\left[\psi^k(\theta,\phi) + \frac{2\pi n}{\lambda}\,(s-f)\right]\right\} Q_\xi^k\,d\phi\,d\theta \tag{3.17}$$

où $k = \{x, y, z\}$ et $\xi = \{\text{pompe}, \text{STED}\}$. On a également :

$$\mathbf{Q} = \left| \begin{array}{c} \cos^2(\phi - \phi_0)\ \cos\theta + \sin^2(\phi - \phi_0) \\ \sin(\phi - \phi_0)\ \cos(\phi - \phi_0)\,[\cos\theta - 1] \\ -\cos(\phi - \phi_0)\ \sin\theta \end{array} \right. \tag{3.18}$$

L'objectif de distance focale f est caractérisé par sa pupille qui est elle-même décrite par les variables θ (avec $0 \leq \theta \leq \alpha$, où α est le demi-angle d'ouverture) et ϕ. Le milieu de focalisation a un indice optique n. Le terme $\psi^k(\theta, \phi)$ décrit toute modification possible de la phase de l'onde sur la pupille (elle est nulle pour un objectif qui travaille normalement). s est la longueur du trajet reliant un point de l'onde incidente (au niveau de la pupille) de coordonnées (f, θ, ϕ) à un point de coordonnées **r** proche du foyer (ce dernier ayant pour coordonnées $\mathbf{r} = (0, 0, 0)$ comme indiqué sur la figure ci-dessous).

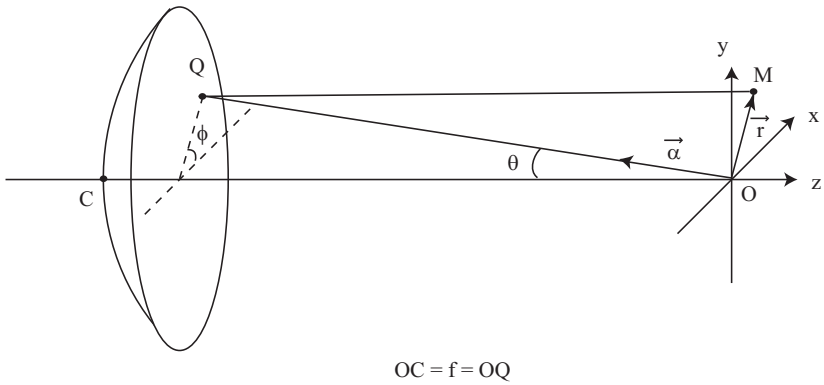
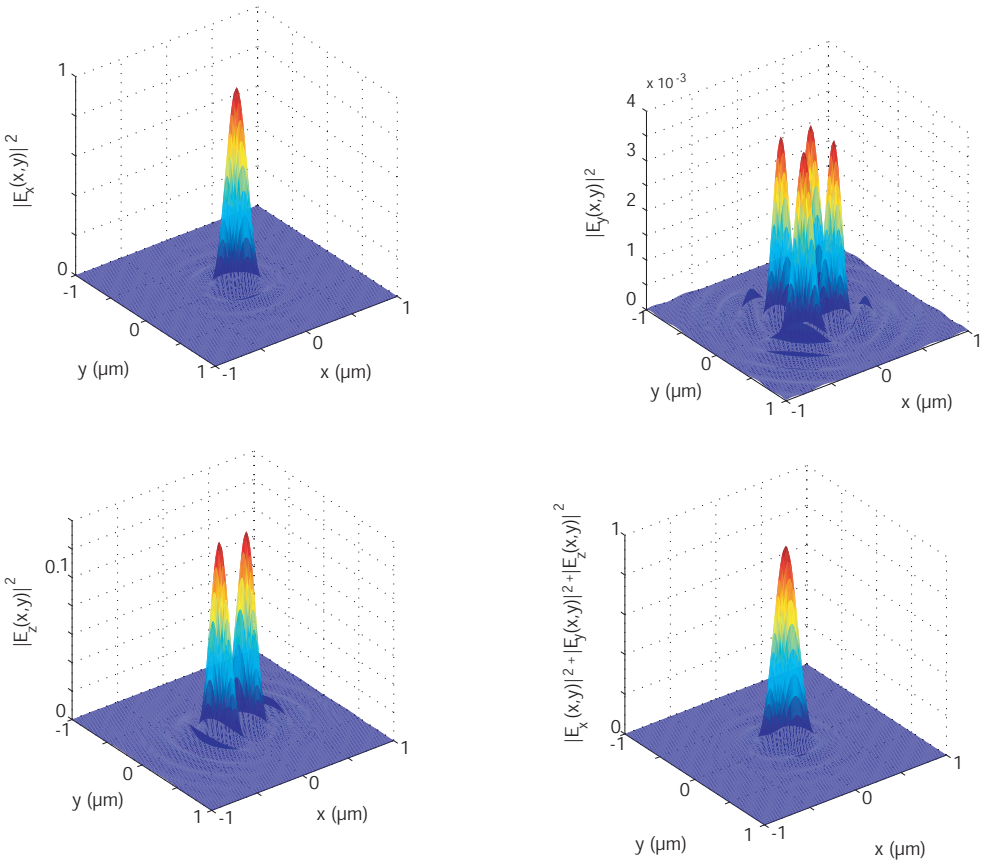


FIG. 3.23 – *Notations géométriques utilisées pour la description d'un front d'onde sphérique.*

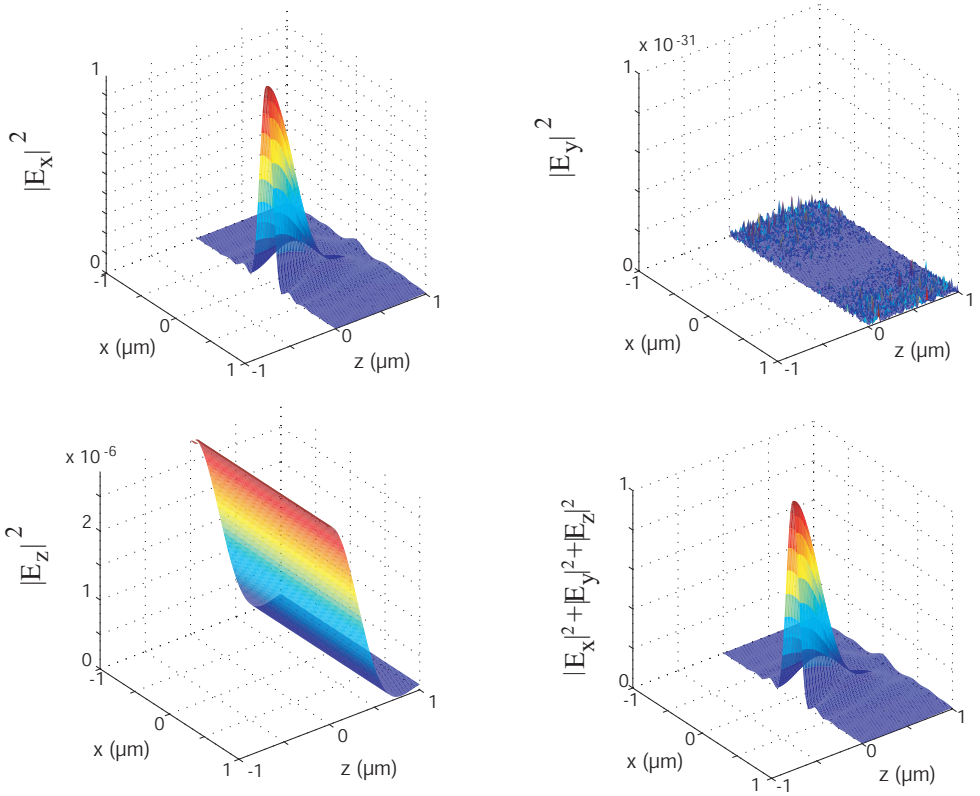
$E^k_{0,\xi}(\theta, t)$ représente les composantes du champ incident.

Dans la suite, nous utilisons un champ optique polarisé suivant l'axe x. Les figures placées ci-après représentent les répartitions transverses et longitudinales des composantes du champ du faisceau pompe ou du faisceau STED au foyer de l'objectif. Le milieu possède un indice optique égal à 1,54 et la longueur d'onde est de 0,55 μm.

Dans le cas de la pompe, aucune modification de la phase à l'entrée de l'objectif n'est effectuée. Sur la figure (3.24(a)), nous représentons dans le plan (x, y) et après focalisation, l'importance de chacune des composantes $|E_x|^2$, $|E_y|^2$, et $|E_z|^2$. On vérifie ainsi que la composante $|E_x|^2$ est très largement majoritaire : sa distribution d'Airy prédomine dans le plan (x, y). Sur la figure (3.24(b)), nous représentons dans le plan $((x, z)$ ces mêmes composantes après focalisation. La conclusion est identique, la contribution de $|E_x|^2$ prédomine, et l'on retrouve la forme classique similaire à une ellipsoïde selon l'axe z.

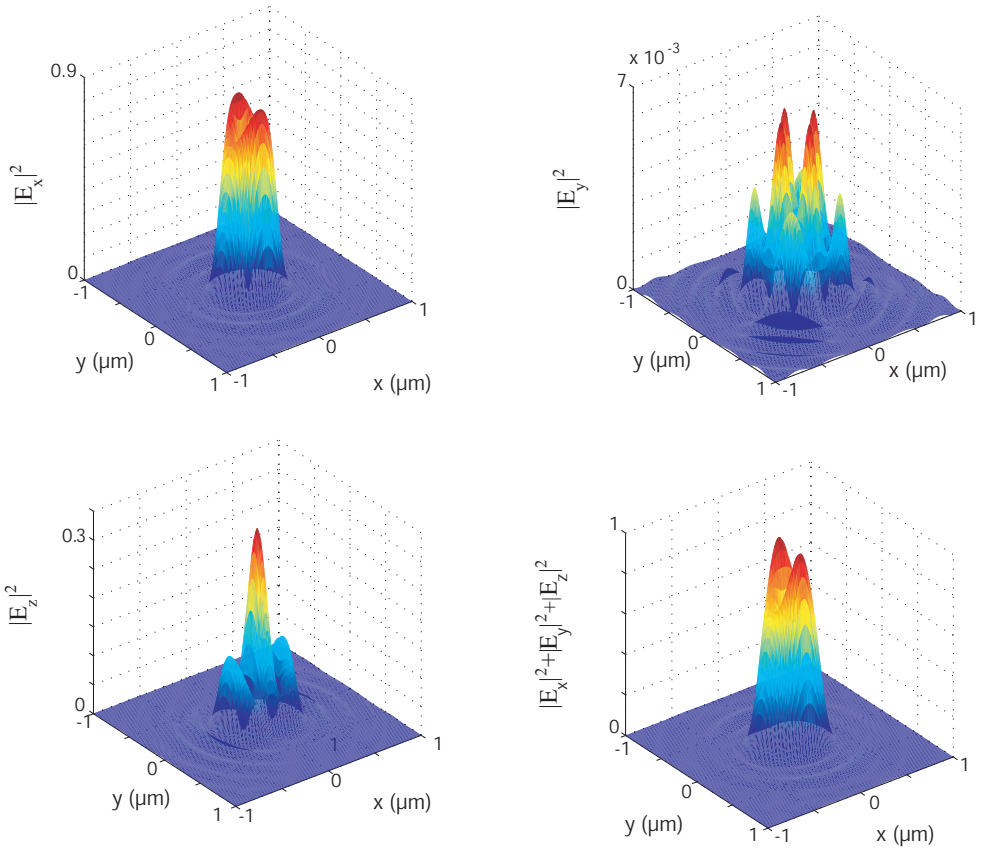


(a) Répartition transverse du champ de pompe.

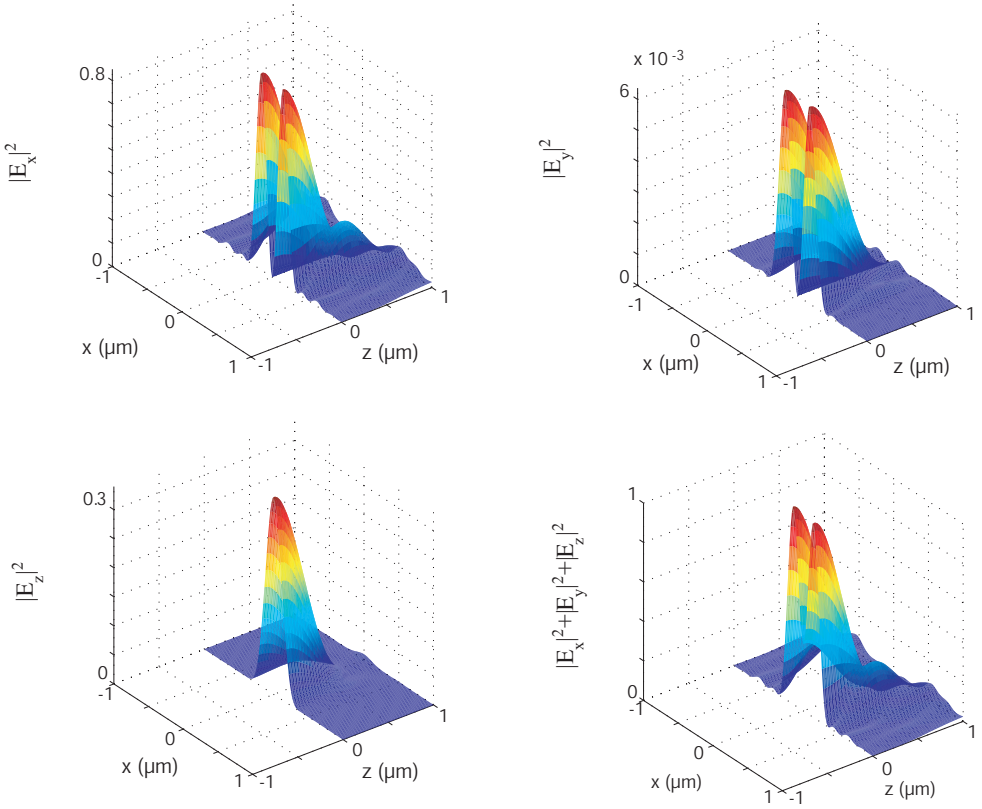


(b) Répartition longitudinale du champ de pompe.

FIG. 3.24 – Répartition des composantes du champ de pompe ($n = 1,54$, $\lambda = 550\,nm$, $O.N. = 1,33$, $f = 1\,mm$)



(a) Répartition transverse du champ STED.



(b) Répartition longitudinale du champ STED.

FIG. 3.25 – Répartition des composantes du champ STED ($n = 1,54$, $\lambda = 550\,nm$, $O.N. = 1,33$, $f = 1\,mm$)

Dans le cas du faisceau STED, la polarisation est toujours selon x, mais une phase hélicoïdale est introduite :

$$\psi^k(\theta) = e^{i\theta(x,y)} \tag{3.19}$$

Les répartitions transverse et longitudinale du champ STED obtenues sont représentées sur la figure (3.25). Comme précédemment, nous représentons l'importance relative de chacune des 3 composantes du champ E focalisé dans le plan (x, y) et dans le plan (x, z). On vérifie sur la figure (3.25(a)) que la forme annulaire donnée à la composante $|E_x|$ est relativement bien conservée après sommation de toutes les composantes. Cependant, on observe tout d'abord qu'il n'y a pas *stricto sensu* absence de lumière au centre de l'anneau et que la répartition d'énergie sur l'anneau ne possède plus strictement une symétrie circulaire. L'origine de ce phénomène est la focalisation, car elle rend possible la conversion d'une fraction de l'énergie existant sur la composante $|E_x|$ initiale, sur les autres composantes, et principalement sur $|E_z|$.
Ainsi, la focalisation par un objectif de forte ouverture numérique du faisceau STED diffracté sur l'hologramme permet d'obtenir une répartition d'intensité dans le plan transverse relativement proche d'un anneau. On doit s'attendre néanmoins à ce que les fluorophores situés au centre des figures de focalisation soient soumis non seulement au faisceau de pompe mais aussi au faisceau STED. Ceci aura pour conséquence de diminuer le nombre de photons de fluorescence pouvant être collectés, et par là même, de diminuer le rapport signal à bruit.
L'ensemble des éléments du montage proposé est opérationnel sur une grande gamme de longueurs d'onde. Seule la technique de séparation des faisceaux d'excitation et de STED manque de versatilité puisqu'elle sépare des longueurs d'onde réparties selon un peigne, de position certes variable sur la gamme du visible, mais de périodicité fixée par la biréfringence de la lame. Un interféromètre type Mach-Zehnder semblerait plus approprié. Les principales caractéristiques du montage sont résumées dans le tableau ci-dessous. La région spectrale indique la gamme spectrale sur laquelle chaque élément *peut* être utilisé.

Élément	**Région spectrale**	**Remarques**
Source : SC	[470 ; 920] nm	80 MHz, impulsions$\simeq ps$
Filtrage : AOTF$_1$	[470 ; 920] nm	résolution $\sim 2\ nm$, optimal sur [400 ;700] nm
Séparation par polarisation	[480 ; 920] nm	écart $\lambda_{STED} - \lambda_{exc}$ fixé
Stretcher	[470 ; 920] nm	ajustement par rotation des réseaux
Hologramme	[470 ; 920] nm	rendement optimal au voisinage de 600 nm
Objectif imageur	[470 ; 920] nm	achromat, ON=1,35, $\times$ 100
Filtrage : AOTF$_2$	[470 ; 920] nm	résolution spectrale $\sim 2\ nm$
Détecteur	[470 ; 850] nm	photomultiplicateur H 6573 Hamamatsu

3.4.4 Expérimentation

La figure (3.12) démontre clairement que plus la puissance moyenne des pulses STED est faible, plus la proportion des pulses permettant une dépletion efficace est réduite. Dans le cas du continuum étudié dans cette thèse, la puissance spectrale disponible après le filtre acousto-optique en moyenne de $250\ \mu W/nm$. En considérant que les faisceaux d'excitation et de STED ont une largeur spectrale de $2\ nm$ après le filtrage, nous disposons donc de faisceaux d'environ $0,5\ mW$, ce qui est déjà deux fois plus faible que la puissance utilisée pour tracer la première courbe de la figure (3.12).
Le calcul suivant nous permet d'estimer rapidement la puissance moyenne du faisceau STED nécessaire pour obtenir une bonne suppression de la fluorescence : le coefficient d'efficacité STED $\eta = e^{-\sigma h_{STED}}$ ne dépend que de la section efficace σ du fluorophore utilisé et de h_{STED}, la densité de photons par pulse et par unité de surface. Une dépletion efficace correspond $\sigma h_{STED} \gg 1$, soit de manière purement arbitraire, $\sigma h_{STED} > 4$. La puissance moyenne STED nécessaire $< P >$ se déduit de cette relation. On note P_c la puissance crête du faisceau, E l'énergie contenue dans un pulse, $h\nu$ l'énergie d'un photon, τ la durée d'un pulse, S l'aire de focalisation du faisceau STED et f la fréquence de répétition du continuum.

$$h_{STED} = \frac{E}{h\nu}\,\frac{1}{S} \tag{3.20}$$

Soit encore :

$$h_{STED} = \frac{P_c\,\tau}{h\nu}\,\frac{1}{S} = \frac{< P >}{f h\nu}\,\frac{1}{S} \tag{3.21}$$

En considérant la valeur numérique des paramètres expérimentaux [10] et $\sigma = 10^{-16} cm^2$ pour les fluorophores usuels, on obtient :

$$\sigma h_{STED} = 4 \quad \Leftrightarrow \quad < P >= \frac{4}{\sigma}\, f\ h\nu\ S \simeq 6\ mW. \tag{3.22}$$

Au niveau de l'échantillon, la puissance moyenne doit donc être de l'ordre de 1 à plusieurs mW pour observer une décroissance du signal de fluorescence lors de la focalisation du faisceau STED. Or, dans notre cas, après la traversée de l'ensemble du montage, la puissance moyenne du faisceau STED au niveau de l'échantillon n'est plus que de $1\ \mu W$. Les pertes d'énergie dans le montage sont extrêmement importantes : environ 70% de pertes par passage dans le stretcher, 60% de pertes par diffraction sur l'hologramme et plus de 60% de pertes cumulées par l'aller-retour dans les éléments biréfringents, qui ne possèdent malheureusement pas de revêtements anti-reflet. L'inconvénient fondamental est toutefois le manque de puissance disponible au niveau même du continuum.

[10] f=80 MHz, $S = 0,5.10^{-8}\ cm^2$, $h\nu \sim 4.10^{-19}\ J$

Une tentative d'observation de la dépletion de fluorescence a toutefois été effectuée sur une solution aqueuse de $Phycobiliprotines$® [11], présentant l'une des sections efficaces les plus élevées proposées commercialement, 10 fois plus importante que les sections efficaces de fluorophores usuels ($\sigma \simeq 10^{-15}\ cm^2$). Cet échantillon nécessite $a\ priori$ 10 fois moins de puissance pour entraîner sa dépletion.

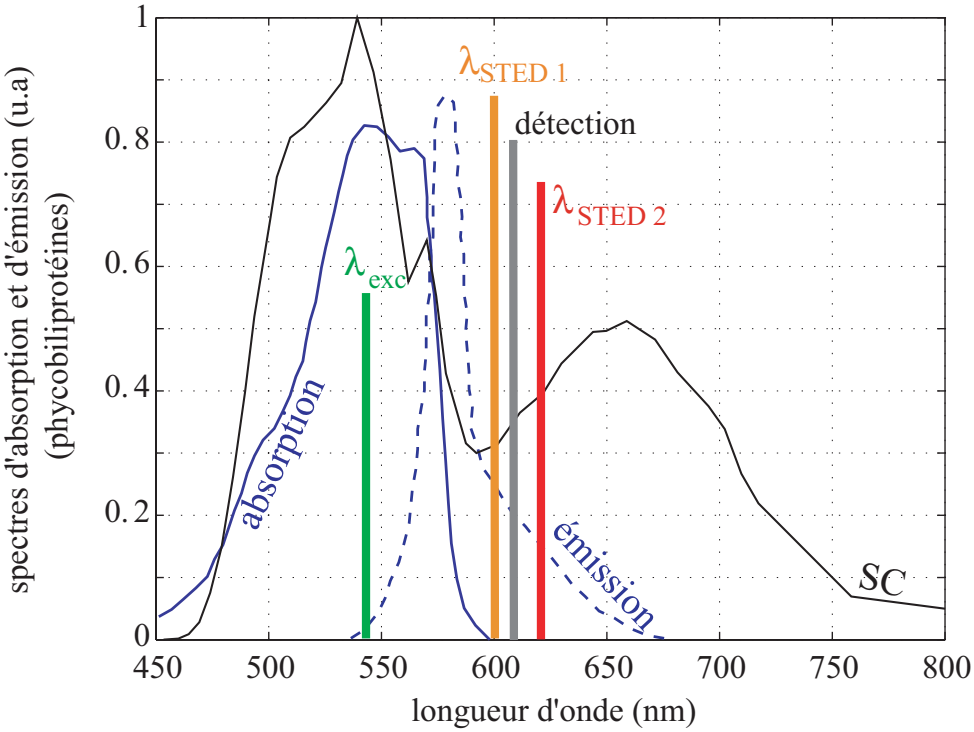


FIG. 3.26 – *Spectre d'émission et d'absorption du fluorophore choisi (phycobiliprotéines) ; spectre normalisé du continuum et position des bandes spectrales utilisées pour le faisceau d'excitation et les faisceaux STED.*

L'AOTF$_1$ permettant de sélectionnant plusieurs bandes spectrales simultanément, l'échantillon est illuminé à $\lambda_{exc} = 550\ nm$, puis est soumis à deux faisceaux STED à $\lambda_{STED} = 600\ nm$ et $630\ nm$, pouvant théoriquement induire de l'émission stimulée puisque ces deux bandes spectrales appartiennent au spectre d'émission des protéines (cf.figure 3.26).
Même en s'affranchissant de l'utilisation de l'hologramme du stretcher et du système de sélection en longueur d'onde, aucune variation du niveau de signal de fluorescence n'a été détectée lors de la focalisation simultanée des trois faisceaux.

[11] P-800, B-phycoerythrin, coefficient d'extinction molaire : $\epsilon = 2410000\ cm^{-1}M^{-1}$,Molecular Probes

3.4.5 Conclusion

Même si les premiers essais expérimentaux ont échoués, l'utilisation d'un continuum de lumière comme source pour la microscopie confocale semble pourtant possible, le point clé étant de pouvoir disposer d'une puissance moyenne suffisamment élevée (de l'ordre de quelques mW au niveau de l'échantillon). Des études récentes montrent qu'il est cependant possible de réaliser un système équivalent au microscope STED en utilisant des pulses de très faible puissance ($\sim nW$) sur des molécules particulières [91].
Compte tenu du fait que les périodes de répétition des sources optiques sont actuellement toujours supérieures aux temps de vie de fluorescence des marqueurs usuels, le phénomène de dépletion de fluorescence a lieu lors de la superposition de chaque pulse du faisceau d'excitation et du faisceau STED. Le fait de sélectionner ces deux faisceaux parmi un continuum de lumière nous pousse à observer le comportement pulse à pulse de celui-ci, entre terme de durée d'impulsions, de fluctuations de puissance et de fluctuations de forme temporelle. Les calculs du coefficient d'efficacité STED η à l'aide d'impulsions de continuum générées numériquement montrent que l'influence des fluctuations de puissance prédomine : η peut en effet varier de 20% d'un pulse à l'autre. Les dimensions latérales du spot d'émission de fluorescence étant directement reliées à la puissance contenue dans chaque pulse STED, la résolution latérale varie à chaque pulse. En moyenne, et pour une puissance STED de $5\ mW/nm$, disponible sur des continua commerciaux, la résolution attendue est de l'ordre de $90\ nm$. Une meilleure résolution pourrait être obtenue en sélectionnant les pulses STED selon un critère de puissance.
Le montage utilisé permet de conserver toute la versatilité en longueur d'onde proposé par le continuum, mais celui-ci fournit actuellement trop peu de puissance par pulse pour pouvoir valider son utilisation en microscopie STED.
Cette validation pourrait sans doute être envisagée en employant un laser femtoseconde plus puissant, ainsi qu'une fibre microstructurée plus courte afin de diminuer les pertes d'énergie par absorption dans celle-ci. De tels types de continua sont déjà disponibles sur le marché. D'autre part, des pompages en régime picoseconde ou nanoseconde semblent être encore plus adaptés car ils permettent de disposer de pulses plus énergétiques. En effet, dans ces régimes de pompage, les lasers usuels ont un taux de répétition de l'ordre de quelques kHz et une puissance moyenne de plusieurs dizaines de mW, ce qui correspond à une amélioration de l'énergie d'un facteur 600 par rapport au cas actuel. De plus, les impulsions fournies par ces continua seront plus longues que celles utilisées actuellement, ce qui permettrait d'envisager la suppression du stretcher dans le montage. Une étude complète du comportement temporel des continua en régime picoseconde ou nanoseconde devra préalablement être amorcée.

Chapitre 4

Spectroscopie de temps de vol : physiologie des milieux diffusants

La physiologie (du grec, $\varphi\upsilon\sigma\eta$, nature, et $\lambda o\gamma o\varsigma$, science) est l'étude du fonctionnement mécanique, physique et biochimique des organismes vivants, de leurs organes et de leurs organisations, de leurs structures et de leurs tissus. La physiologie étudie également les interactions d'un organisme et de son environnement. Dans l'ensemble des disciplines biologiques, en définissant schématiquement des niveaux d'organisation, la physiologie est une discipline voisine de l'histologie et de l'anatomie. Cette discipline a donc pour but de caractériser le fonctionnement visible des organismes vivants, mais aussi, de déceler les raisons de ce fonctionnement : on souhaite atteindre un niveau de compréhension des étapes vitales.
Chaque cellule est, en soi, un système ouvert, dépendant pour sa survie, des échanges de chaleur, d'oxygène, de nutriments, de déchets, et d'information avec son environnement. Grâce au *métabolisme énergétique*, *i.e* à un ensemble de transformations moléculaires se déroulant de manière ininterrompue dans la cellule, ces apports nutritionnels fournissent de l'énergie disponible, nécessaire au fonctionnement cellulaire. L'étude *in vivo* de la physiologie tissulaire reste fort complexe, et quelques groupes de physiologistes souhaitent actuellement développer des techniques de mesures locales et en temps réel, permettant d'accéder à une meilleure compréhension du métabolisme énergétique du muscle, de l'os ou encore de la moelle osseuse. L'état physiologique de ces tissus peut être caractérisé par leur teneur en hémoglobine HbO_2, en déoxyhémoglobine Hb, en eau H_2O et en lipides. Connaître les concentrations de ces derniers localement et en temps réel permet ainsi d'accéder à un état physiologique tissulaire précis. Ni les explorations par rayons X, par émission de positons (TEP, Tomographie par Emission de Positrons), par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), ou encore par échographie, ne donnent accès à de tels paramètres physiologiques.

Le choix d'un caractère non invasif pour la mesure laisse une grande place aux méthodes optiques, et entre autre à la spectroscopie en proche infra-rouge.
Elle consiste en l'illumination de l'échantillon, de l'organe, etc... en un point donné par une source multi-longueurs d'onde pulsée [1], et en la collection en un point voisin de la lumière retro-diffusée. La séparation spectrale des photons collectés, puis l'analyse temporelle du signal obtenu pour chaque longueur d'onde fournit un grand nombre d'informations, notamment sur les propriétés d'absorption et de diffusion du tissu exploré. Dans le cas de tissus très peu diffusants, l'atténuation de la lumière après la propagation de celle-ci dans les tissus est majoritairement due à de l'absorption, qui est à la somme de l'absorption des constituants moléculaires majeurs [93] : chacune des quatre molécules précédemment cités présente un spectre d'absorption caractéristique dans l'infra-rouge. La figure (4.1) fournit l'exemple de l'hémoglobine et de la déoxyhémoglobine.

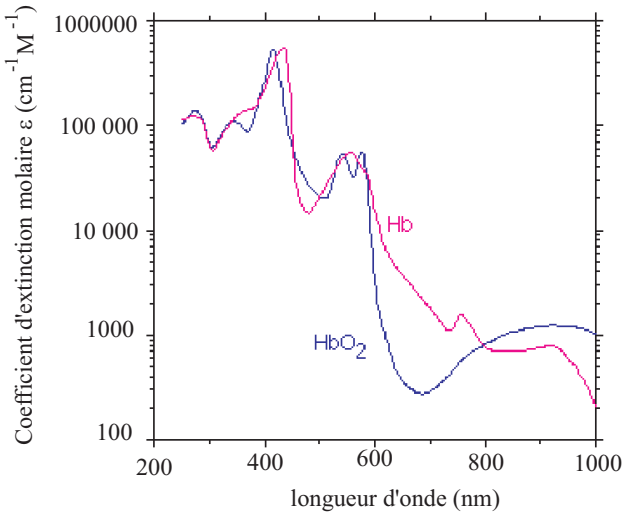


FIG. 4.1 – *Spectre d'absorption de l'hémoglobine (HbO_2) et de la déoxyhémoglobine (Hb) sur la gamme [200 ; 1000]* nm.

D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorption d'une molécule étant directement proportionnelle à sa concentration, une mesure spectrale d'absorption permet d'accéder à sa teneur dans le volume illuminé. Il est alors envisageable de suivre grâce aux variations de concentrations d'un ou plusieurs éléments, les modifications d'oxygénation, de vascularisation au cours d'un effort [94], d'un changement de température [95], d'un traitement médical... Mais la grande difficulté de cette technique est que par la plupart des tissus présentent un caractère fortement diffusif : en

[1] En spectroscopie infra-rouge, la source n'est pas forcément pulsée, mais peut être continue, ou modulée en intensité [92] : les méthodes numériques permettant d'extraire μ_a et μ'_s sont alors différentes.

moyenne, le coefficient de diffusion μ'_s est environ 20 fois plus grand[2] que le coefficient d'absorption μ_a . La lumière a donc tendance à se propager par diffusion : le chemin optique est inconnu, et les variations dans l'atténuation observée dépendent non seulement d'une variation de concentrations des molécules absorbantes, mais aussi du coefficient de diffusion, de la géométrie du tissus, ... Cette méthode nécessite ainsi l'établissement de modèles de propagation de la lumière suffisamment robustes pour tenir compte de la plupart des propriétés des tissus et ne pas induire d'erreurs sur l'interprétation de la forme des pulses collectés [97, 98, 99].
Le travail suivant est le fruit d'une collaboration franco-suisse entre T.Binzoni, physiologiste du Centre Hospitalier Universitaire de Genève et notre équipe. Grâce à son caractère pulsé et large bande, le continuum de lumière dont nous disposons semble une source tout à fait adaptée à ce type d'investigations. En effet, les mesures d'absorption par spectroscopie infra-rouge sont habituellement réalisées à l'aide d'un nombre discrets de longueurs d'onde. Les concentrations déduites de ces mesures sont entachées de nombreuses erreurs (bruit, difficultés de calibration des appareils, problèmes de dynamiques de mesures, absorption due à la présence d'autres composés biologiques en petite quantité...). L'utilisation d'un plus grand nombre d'informations spectrales permet de prévenir ou dépasser ces erreurs : l'emploi d'un continuum a été expérimentalement testé avec succès depuis 2004 [100, 101, 102]. L'objectif de cette collaboration est d'obtenir, par spectroscopie de temps de vol avec continuum de lumière, une "image" *in vivo* du comportement de tissus illuminés par des pulses courts, voire même de mesurer leurs paramètres physiologiques fondamentaux (μ_a, μ'_s), sur une population de volontaires humains.
Dans un premier temps, nous présenterons le modèle de propagation de la lumière choisi pour décrire cette interaction lumière-matière, puis nous détaillerons les différentes étapes de la procédure expérimentale. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus, concernant deux types de tissus explorés : le tissu musculaire, et l'os.

4.1 Modèle théorique de propagation de la lumière

La complexité de l'étude de la propagation de la lumière dans les tissus biologiques vient du fait que ceux-ci ne sont ni homogènes, ni forcément isotropes. La prise en compte de la structure interne des tissus fournit un nombre de paramètres bien trop important pour que le problème soit soluble. Il faut donc, d'une part modéliser le milieu diffusant, mettre en équation la propagation de la lumière et fournir un algorithme de calcul permettant de trouver les solutions de cette équation [103, 104].
Il existe différentes façons d'aborder le problème de la propagation de la lumière dans un mi-

[2]D'après [96], μ'_s = 1 mm^{-1} et $\mu_a = 0.05\ mm^{-1}$ pour la plupart des tissus.

lieu quelconque. On relève principalement le modèle relevant de l'équation de transport radiatif, utilisée pour décrire des problèmes très généraux de transport d'énergie par les photons, et les modèles issus du problème de la "Marche aléatoire" (RW, Random Walk), s'appliquant quant à lui dès que le transport de particules peut s'aborder comme une succession de chocs, ou d'événements chacun entaché d'une certaine probabilité.
Le problème de la marche aléatoire reste, en soi, très général puisqu'il peut s'appliquer à de nombreux contextes, principalement à la diffusion. Il consiste à déterminer quelle est la probabilité pour qu'une particule -ici un photon- se trouve en une zone spatiale donnée, au bout d'un temps donné. Le cas le plus simple, mais généralisable, est celui de la marche aléatoire dans un espace à une seule dimension. Il fournit une solution simple, dans le cas d'un espace-temps discretisé, ou continu .

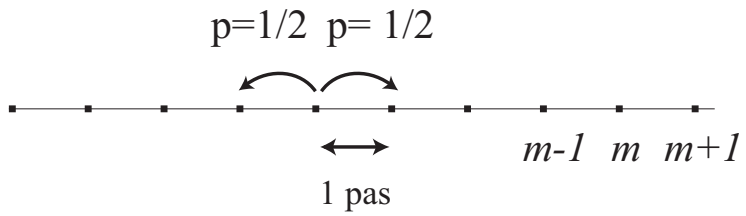


FIG. 4.2 – *Schématisation de la marche aléatoire monodimensionnelle. p est la probabilité de transition d'un centre diffusant au suivant.*

Considérons une particule qui effectue des déplacements le long d'une ligne, par pas de même longueur, vers l'avant ou l'arrière, avec la même probabilité $p = 1/2$. Après N pas, la particule peut être en chacun de ces points : -N, -N+1, -N+2,..., -1, 0, +1,..., N-1, N. La probabilité $W(m, N)$ que le photon arrive au point m après N déplacements s'exprime par la relation suivante [105] :

$$W(m, N) = C^{N}_{\frac{(N+m)}{2}}(\frac{1}{2})^N = \frac{N!}{[\frac{1}{2}(N+m)]![\frac{1}{2}(N-m)]!}(\frac{1}{2})^N \tag{4.1}$$

Le cas le plus intéressant est lorsque $N \gg m$, c'est-à-dire le cas où le parcours moyen de la particule est plus grand que la distance entre deux événements. Dans ce cas, on peut appliquer la formule de Stirling :

$$\log n! = (n + \frac{1}{2}) \log n - n + \frac{1}{2} \log 2\pi + O(n^{-1})(\rightarrow \infty) \tag{4.2}$$

Puisque $N \rightarrow \infty$ et que $N \gg m$, la probabilité précédente s'exprime, tous calculs faits, sous la forme suivante :

$$W(m, N) = (\frac{2}{\pi N})^{\frac{1}{2}} \exp(-\frac{m^2}{2N}) \tag{4.3}$$

On rend cette probabilité applicable aux cas de milieux continus dans le domaine spatial et temporel en écrivant que la valeur x du déplacement total est un nombre entier m de fois la longueur du pas élémentaire l, soit $x = ml$.
En supposant que le photon réalise n déplacements par unité de temps, et en posant $D = 1/2nl^2$, alors la probabilité $W(x,t)\Delta x$ qu'un photon se trouve entre x et $x + \Delta x$ après un temps t est donnée par :

$$W(x,t)\Delta x = \frac{1}{2(\pi Dt)^{\frac{1}{2}}} \exp(\frac{-x^2}{4Dt})\Delta x \tag{4.4}$$

On retrouve ainsi la forme usuelle de l'équation de diffusion, et son paramètre D, valable dans le cas unidimensionnel et isotrope.
Pour être appliquée dans le cas de milieux quelconques, cette théorie est modifiée en relâchant la contrainte sur la durée d'exécution d'un pas et devient la "marche aléatoire en temps continu" (CTRW, Continuous Time Random Walk)[106]. Pour modéliser le fait que les centres diffusants contenus dans le milieu traversé sont placés de manière aléatoire, on considère que ceux-ci sont situés aux intersections d'un maillage orthonormé, tridimensionnel, mais que le temps de passage d'un point à l'autre est une variable aléatoire. La figure (4.3) fournit le schéma d'un maillage spatial bidimensionnel, avec des temps de passage plus courts pour une propagation selon l'axe x que selon l'axe y : le photon "voit" ainsi un milieu anisotrope.

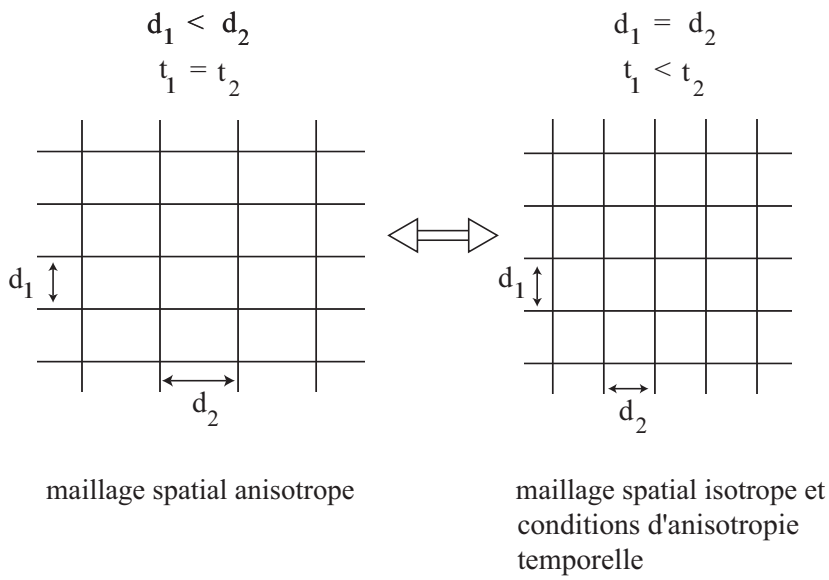


FIG. 4.3 – *Schématisation de la marche aléatoire CTRW bidimensionnelle : utilisation d'une anisotropie temporelle pour traduire une anisotropie spatiale.*

Dans le cas tridimensionnel, la probabilité de passage d'un centre à l'autre n'est donc plus

$1/3$, mais dépend de l'axe de propagation : la probabilité est α, β, ou γ selon que l'axe choisi est x, y ou z (cf. figure 4.4) ; une hypothèse supplémentaire est apportée en considérant que le déplacement du photon est symétrique pour chaque axe, c'est-à-dire que les probabilités de faire le pas $x \rightarrow x+1$ ou le pas $x \rightarrow x-1$ sont identiques.

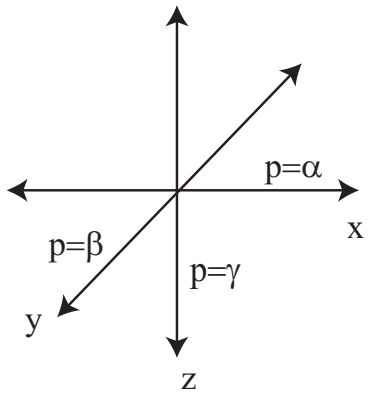


FIG. 4.4 – *Orientation des 3 axes de propagation dans le modèle CTRW et leur probabilité p associée.*

Suite à ces définitions, les probabilités de transition satisfont de fait la condition suivante :

$$2\alpha + 2\beta + 2\gamma \ = \ 1 \tag{4.5}$$

Lorsque le milieu présente une symétrie particulière -par exemple, si $\alpha = \beta \neq \gamma$ - on définit le paramètre d'anisotropie B par la relation suivante :

$$B = \frac{\gamma}{\alpha} \tag{4.6}$$

Les probabilités de transition peuvent alors s'exprimer uniquement en fonction de B :

$$\alpha = \beta = \frac{1}{2B+4} \quad \gamma = \frac{B}{B+4} \tag{4.7}$$

En tenant compte qu'il existe des centres d'absorption dans le milieu, la distribution temporelle d'arrivée des photons suit dans ce cas la loi suivante [dagdug03] :

$$I(d,t) = \frac{(B+2)^{3/2}}{(2\pi)^{3/2}B^{1/2}(\mu'_s ct)^{5/2}} \exp\left\{-(\frac{1}{B}+\frac{1}{2})\left[B+(\frac{d}{\sqrt{2}}\mu'_s)^2\right]\frac{1}{\mu'_s ct} - \mu_a c(t-t_0)\right\} \tag{4.8}$$

où $I(d,t)$ est le flux de photons détectés au temps t et à la distance d du point d'illumination. μ'_s est le coefficient de diffusion du milieu[3], μ_a est le coefficient d'absorption, c la vitesse la lumière

[3] μ'_s est le coefficient de diffusion réduit, il s'exprime en fonction du coefficient de diffusion intrinsèque μ_s par : $\mu'_s = \mu_s(1- < \cos\theta >)$, où $< \cos\theta >$ est l'angle de diffusion moyen [ref].

dans le milieu et t_0 l'instant initial de la propagation.
Ce modèle théorique, très récemment développé, et testé avec succès sur des échantillons (ou "phantoms") calibrés [107], sera utilisé pour interpréter les données expérimentales recueillies au cours de ce travail.

4.2 Présentation du système de spectroscopie de temps de vol

4.2.1 Montage expérimental

Le montage utilisé pour enregistrer la réponse tissulaire à une excitation optique est le suivant :

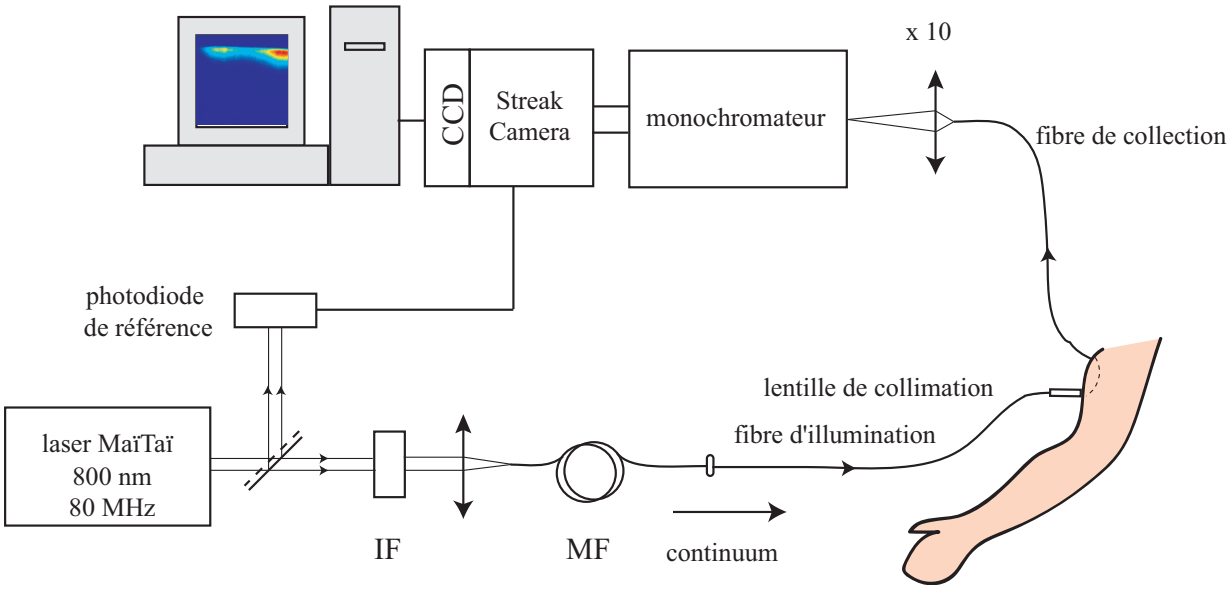


FIG. 4.5 – *Schéma du montage expérimental de spectroscopie de temps de vol .*

La source utilisée est le continuum étudié précédemment, sans élément de filtrage spectral. La sortie de la fibre microsctructurée est immédiatement couplée à une fibre standard à gradient d'indice (diamètre de cœur : $50\ \mu m$). Une lentille collimatrice est directement montée à l'issue de celle-ci ; le faisceau incident sur le tissu à explorer est de $2\ mm$ de diamètre. Les photons diffusent dans l'ensemble du tissu, et sont collectés à une distance d de la position de la fibre d'illumination par une fibre standard, de diamètre de cœur $300\ \mu m$.
Les photons collectés sont ensuite dispersés spectralement par un monochomateur [4], puis leurs

[4] 250 IS, Chromex ; réseau de $50\ traits/mm$, blazé à $600\ nm$, fente d'entrée $50\ \mu m$.

temps d'arrivée, pour chaque canal spectral, sont enregistrés par une Streak-Camera [5]. Celle-ci permet de capturer l'ensemble des pulses du continuum diffusés par l'organe, grâce à une synchronisation sur la fréquence du laser MaïTaï : une fraction du signal laser à $80\ MHz$ est détectée par une photodiode, et sert de signal de déclenchement pour la Streak Camera.
A l'extrémité de la chaîne de détection, une caméra CCD fournit les images des spectres en temps résolus : l'axe horizontal et vertical étant respectivement composés de 512 canaux spectraux, et de 512 canaux temporels. Chaque point d'une image CCD apporte ainsi 3 types d'informations sur les photons diffusés par le milieu : l'intensité du flux de photons, la longueur d'onde de ces photons, et leur temps de propagation dans le tissu. Pour traduire une réalité physique, ces trois axes d'informations sont donc à calibrer.

4.2.2 Calibration instrumentale

Nous avons testé les capacités de linéarité en intensité de la caméra CCD, puis calibré l'axe vertical et horizontal du capteur respectivement en temps et en longueur d'onde.
La calibration en intensité consiste ici à vérifier, pour chaque valeur de gain de la caméra et pour toutes les colonnes du capteur, la linéarité en intensité de la Streak caméra. Un ensemble de densités optiques, préalablement caractérisées sur le spectre [400 ; 1100] nm, sont placées successivement entre les deux fibres de d'émission et de collection (cf.figure 4.6.a). Les valeurs des densités sont [0,13 ; 0,27 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,63 ; 2,97 ; 3,3]. Pour chacune d'entre elles, on enregistre grâce au montage décrit précédemment, le spectre des photons transmis (cf.figure 4.6.b).

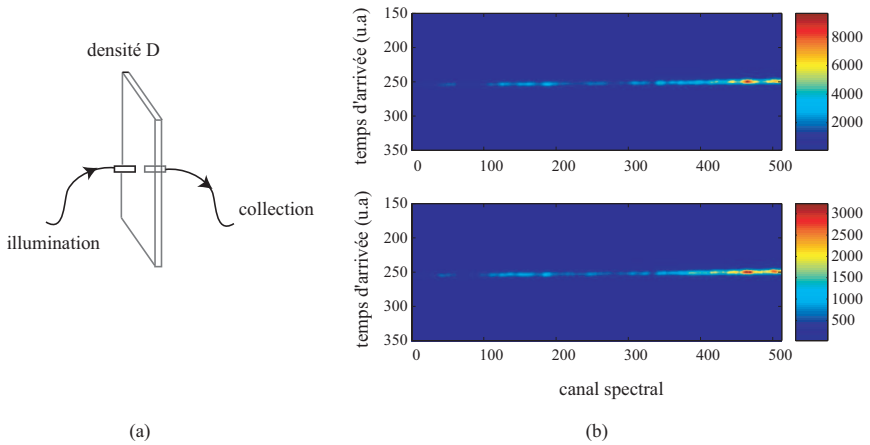


FIG. 4.6 – *(a) Dispositif de mesure du spectre transmis par une densité D : placement des fibres, (b) images CCD correspondant aux spectres enregistrés par la streak camera sans et avec une densité D=3,3 , gain=10.*

[5] C5680, Hamamatsu, Japon.

Pour chaque gain de caméra, on compare le flux de photons effectivement reçu par le capteur au flux de photons incidents (figure 4.7). Chaque point est caractéristique d'une longueur d'onde et d'une densité.

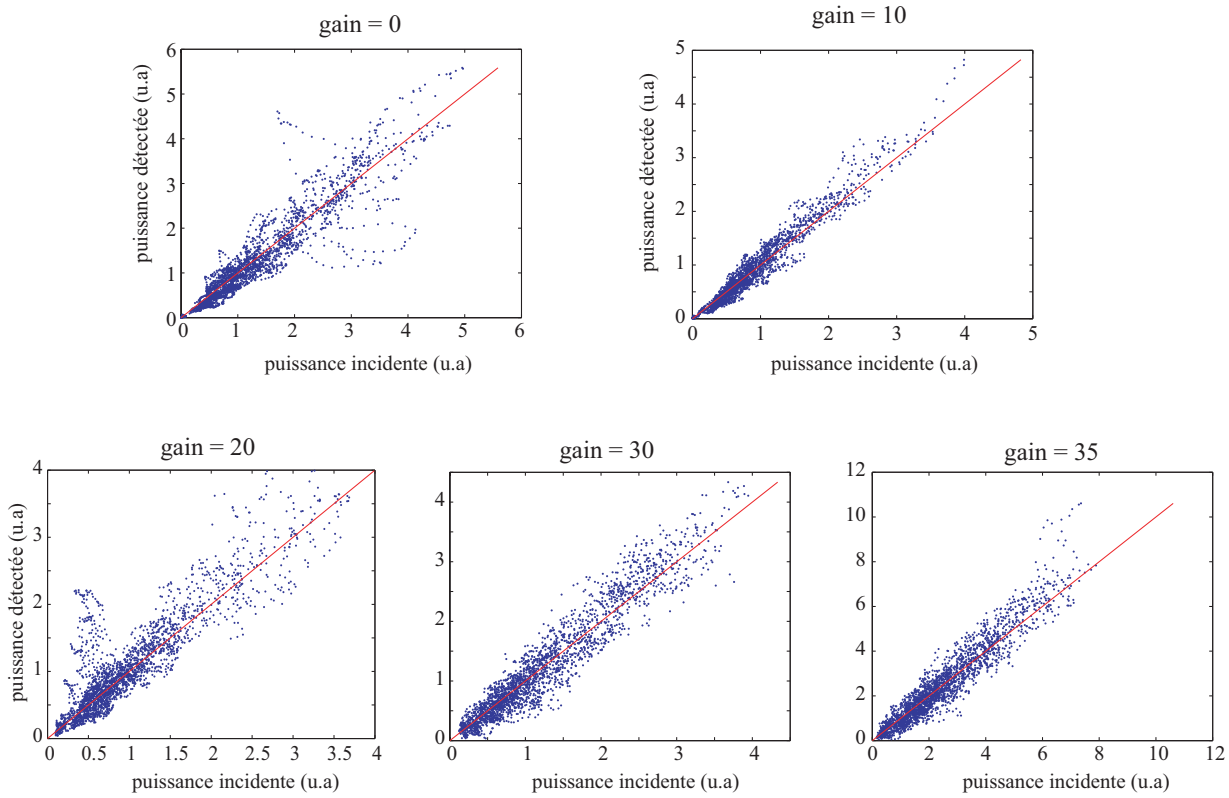


FIG. 4.7 – *Vérification de la linéarité de la streak camera et CCD : enregistrement des rapports entre la puissance incidente et la puissance transmise par les densités optiques (pour chaque canal spectral) pour chaque gain de la streak camera.*

Les points de mesure se distribuent au voisinage d'une droite : la linéarité de la Streak camera pour chaque gain et tous canaux spectraux confondus est ainsi testée et admise.

La calibration en longueur d'onde consiste à affecter à chacune des 512 colonnes du capteur CCD une bande spectrale $\lambda \pm \frac{\Delta\lambda}{2}$ déterminée.
Pour ce faire, les deux fibres d'émission et collection sont placées face à face, et la puissance du laser MaïTaï est diminuée jusqu'à être inférieure au seuil de génération du continuum. La longueur d'onde se propageant est donc celle délivrée par le laser, et peut être comprise entre 750 et 850 nm. On enregistre la trace $I(\lambda, t)$ de ce faisceau sur la Streak camera pour différentes longueurs d'onde. La superposition de ces traces est représentée sur la figure suivante :

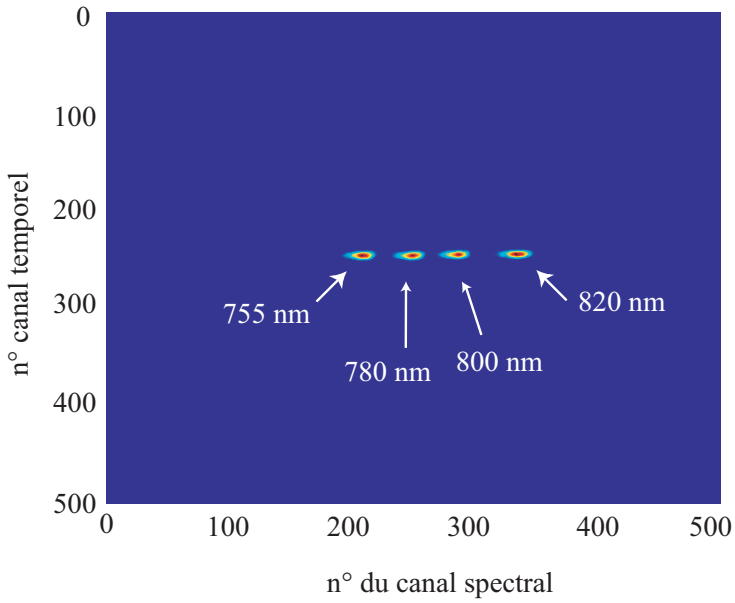


FIG. 4.8 – *Calibration en longueur d'onde des colonnes du capteur CCD de la Streak camera : superposition des traces de faisceaux de différentes longueurs d'onde délivrés par le laser Maï-Taï.*

Le relevé de la position horizontale des maxima d'intensité sur l'image CCD en fonction de la longueur d'onde propagée fournit directement les points expérimentaux de la calibration $colonne\ du\ capteur \leftrightarrow longueur\ d'onde$.

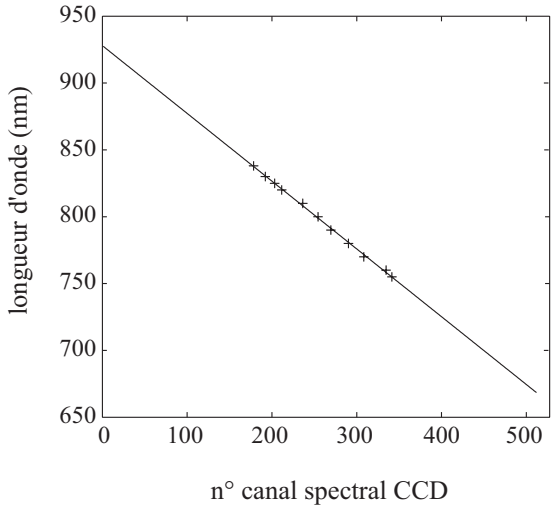


FIG. 4.9 – *Calibration en longueur d'onde des colonnes du capteur CCD de la Streak camera : points expérimentaux et ajustement linéaire.*

L'ajustement linéaire vérifié par les points expérimentaux est une loi du type :

$$\lambda = 917 - 0.5.n^o pixel \quad (nm) \tag{4.9}$$

On en déduit que la plage spectrale visualisée sur les images CCD s'étend de 670 à $920\ nm$ environ, la résolution étant de $0,5\ nm/pixel$.

En ce qui concerne l'axe vertical, c'est-à-dire temporel, des images fournies par la Streak camera, la calibration consiste à relever le décalage entre les différentes traces d'arrivée du continuum lorsque les fibres d'émission et de collection sont séparées par une distance variable et connue.

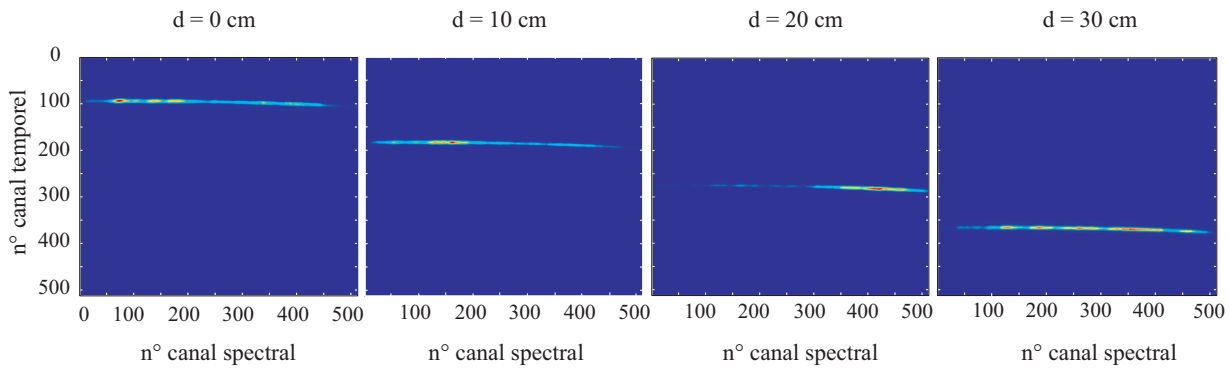


FIG. 4.10 – *Calibration temporelle des lignes du capteur CCD de la Streak camera : traces d'arrivée du continuum pour différentes distances d de propagation dans l'air entre la fibre d'émission et la fibre de collection.*

Pour chaque canal spectral, on relève le numéro du pixel de l'axe vertical en fonction du temps de propagation de l'impulsion entre les deux fibres ($t = d/c$, avec c la vitesse de lumière dans le vide). Par ajustement linéaire, on obtient alors 512 relations $ligne\ du\ capteur \leftrightarrow temps$. En moyennant sur l'ensemble des lignes, la loi est du type :

$$t = 3,7 + 3,6 n^o pixel \quad (ps) \tag{4.10}$$

On en déduit que la plage temporelle disponible sur une image CCD s'étend de 0 à 1.9 ns environ. Il est à noter que le temps "zéro" ne correspond pas forcément au canal n° 0 : il est donné par le n^o du pixel indiquant la trace du continuum lorsque les deux fibres sont accolées. Les trois axes d'informations sous-jacentes à chaque image de la Streak camera sont donc calibrés. Le tableau suivant résume les caractéristiques de l'acquisition des spectres en temps résolu :

Caractéristiques du capteur CCD de la Streak Camera	
Détection en intensité	linéaire
Plage spectrale	[670 ; 920] nm
Plage temporelle	[0 ; 1,9] ns

La réponse impulsionnelle du montage est enregistrée en plaçant face à face les fibres d'illumination et de collection, et en utilisant le continuum complet. La réponse obtenue est tracée sur la figure 4.11. Les profils temporels $I_{reponse}(\lambda, t)$ seront utilisés par la suite pour déconvoluer les spectres de temps de vol relevés après propagation dans un échantillon.

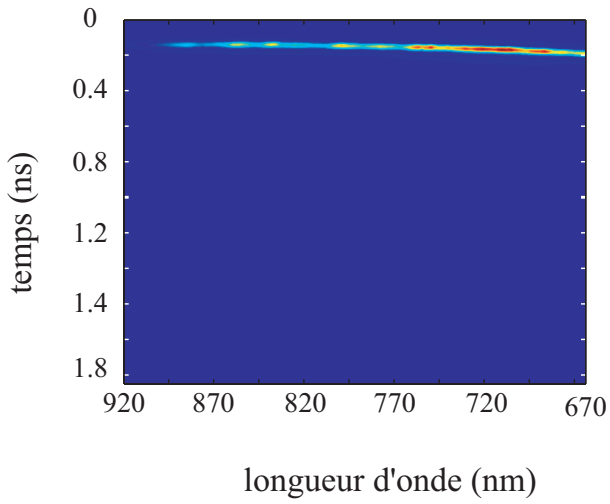


FIG. 4.11 – *Réponse impulsionnelle du montage optique complet de spectroscopie de temps de vol : illumination par le continuum, fibres d'illumination et de collection placées face à face.*

4.3 Mesures de spectroscopie de temps de vol en milieux diffusants

Les mesures de spectroscopie en temps résolu, ou spectroscopie de temps de vol, correspondent à l'enregistrement de la trace temporelle $I(t, \lambda)$ des photons diffusés par le milieu illuminé. Il est clair cependant que la forme de ces traces diffèrent en fonction de la distance d séparant les deux fibres. D'une manière générale, on peut dire que plus d est élevée, plus le nombre de photons collectés sera faible mais aussi plus ces photons proviendront des couches profondes du tissu sondé. Le trajet moyen des photons diffusés a une forme d'arc, comme le représente la figure (4.12) :

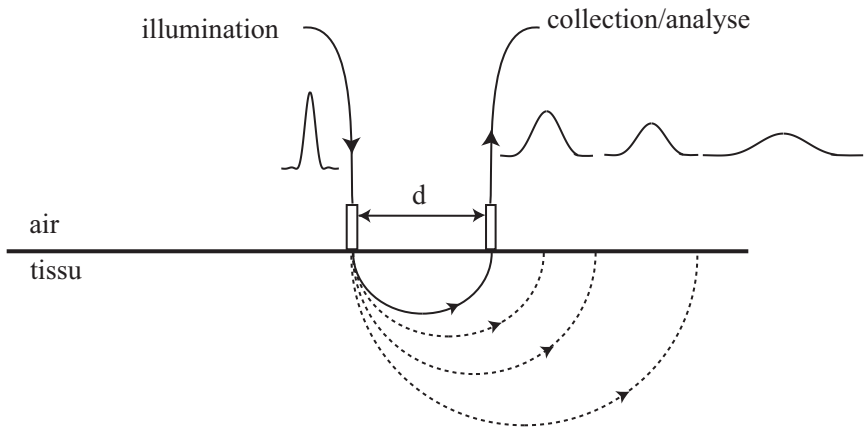


FIG. 4.12 – *Illustration de la relation entre la profondeur des tissus traversés et la distance d entre la zone d'illumination et la zone de collection des photons diffusés.*

Ainsi, en considérant que le chemin optique moyen des photons collectés pénètre le tissu jusqu'à une distance de $d/2$, la distance d entre les deux fibres est à adapter selon le type de tissu que l'on veut explorer. Cet ordre de grandeur liant d à la profondeur sera utilisé dans l'ensemble des mesures ultérieures.

La première étape pour tout enregistrement de spectres résolus en temps est le relevé de la référence temporelle en accolant les fibres d'émission et de collection face à face. Le temps de propagation des photons entre la source et le détecteur est dans ce cas uniquement dû à la traversée des éléments optiques constituant le montage. L'instant d'arrivée des impulsions sur le détecteur fournit la position de l'origine des temps sur l'axe vertical des images (figure 4.15.a.). De même, après chaque mesure, le continuum est éteint et l'ensemble du montage expérimental est maintenu dans la même disposition : il s'agit d'enregistrer le niveau de bruit ambiant, avec le même gain de caméra et le même temps d'acquisition afin de le soustraire aux spectres mesurés.

L'objectif de ce travail est de vérifier dans quelle mesure le continuum de lumière utilisé jusqu'à présent permet de réaliser des images de spectroscopie de temps de vol dans des milieux diffusants tels que les tissus humains (graisse, muscle, os, moëlle osseuse), et si des paramètres physiologiques (coefficient d'absorption, coefficient de diffusion, anisotropie des tissus, ...) peuvent être extraits de ces mesures, dans des conditions $in\ vivo$. A long terme, l'objectif des physiologistes est de connaître ces paramètres fondamentaux sur une grande diversité de tissus afin de mieux comprendre les réactions de l'organisme face à l'effort, à une pathologie, ou à une thérapie ...

Ces mesures ont été effectuées sur 16 volontaires (12 hommes et 4 femmes), dont les mensurations (âge, poids, taille) ont été relevées.

4.3.1 Spectroscopie de temps de vol dans le tissu musculaire

Le premier type d'investigations de spectroscopie concerne le tissu musculaire. L'image (4.13) obtenue par échographie est une coupe transverse d'un exemple de muscle, le biceps humain. On distingue nettement une structure macroscopique : l'aspect strié de ce tissu correspond aux faisceaux de fibres musculaires, manifestement toutes dirigées dans la même direction. D'un point de vue morphologique, cette image montre clairement que ce muscle n'as pas de propriété d'isotropie ; l'aspect strié est d'ailleurs une caractéristique fondamentale de tous les muscles humains rattachés au squelette.

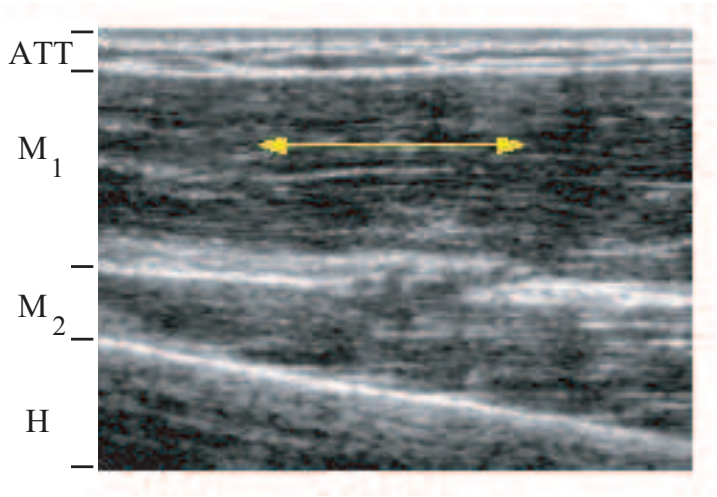


FIG. 4.13 – *Vue longitudinale d'un biceps humain obtenue par échographie. ATT : peau (épiderme, derme et graisse hypodermique) ; M_1 : tête courte du biceps ; M_2 :brachialis ; H : humérus. La flèche indique la direction principale de l'orientation des fibres musculaires.*

Il est maintenant connu qu'à un niveau microscopique, l'orientation des fibres musculaires affecte les propriétés optiques [108, 109]. Cependant, puisque l'hypothèse d'isotropie optique de ce tissu a jusqu'à présent toujours été sous-entendue dans les expériences de spectroscopie proche infra-rouge [6], on ne sait pas *a priori* si les effets d'anisotropie sont observables lorsque les mesures sont réalisées sur de grandes distances ($d \simeq 3\ cm$). L'objectif fixé par le physiologiste à l'initiative de ce projet, est de déterminer si la technique de mesure utilisée précédemment permet de quantifier l'anisotropie du tissu, et d'aboutir ainsi à une connaissance non erronée des paramètres μ_a et μ'_s pour le muscle étudié.
Le choix du muscle s'est porté sur le biceps, en raison de sa position à très faible profondeur

[6] L'anisotropie de la propagation de la lumière a déjà été observée sur la peau humaine [110] et sur les dents [111], mais aucune mesure n'a été effectuée sur les muscles humains *in vivo*.

sous la surface de la peau, de la simplicité de sa structure macroscopique, et de la connaissance de l'orientation de ses faisceaux de fibres sous la peau. En effet, la plupart des autres muscles présentent une direction d'orientation de fibres différente de la direction de contraction, et qui de plus varie sur une échelle de quelques centimètres.

4.3.1.1 Mesures

Le protocole expérimental consiste à placer le volontaire assis, le bras droit placé sur un plan horizontal à hauteur de taille, avec un angle d'environ 145° au niveau du coude afin de placer le biceps dans une position de détente (cf. figure 4.14.b.). A l'aide d'un pied à coulisse, nous estimons pour chaque volontaire l'épaisseur de tissu adipeux (Adipose Tissue Thickness, ATT) situé au-dessus du biceps.

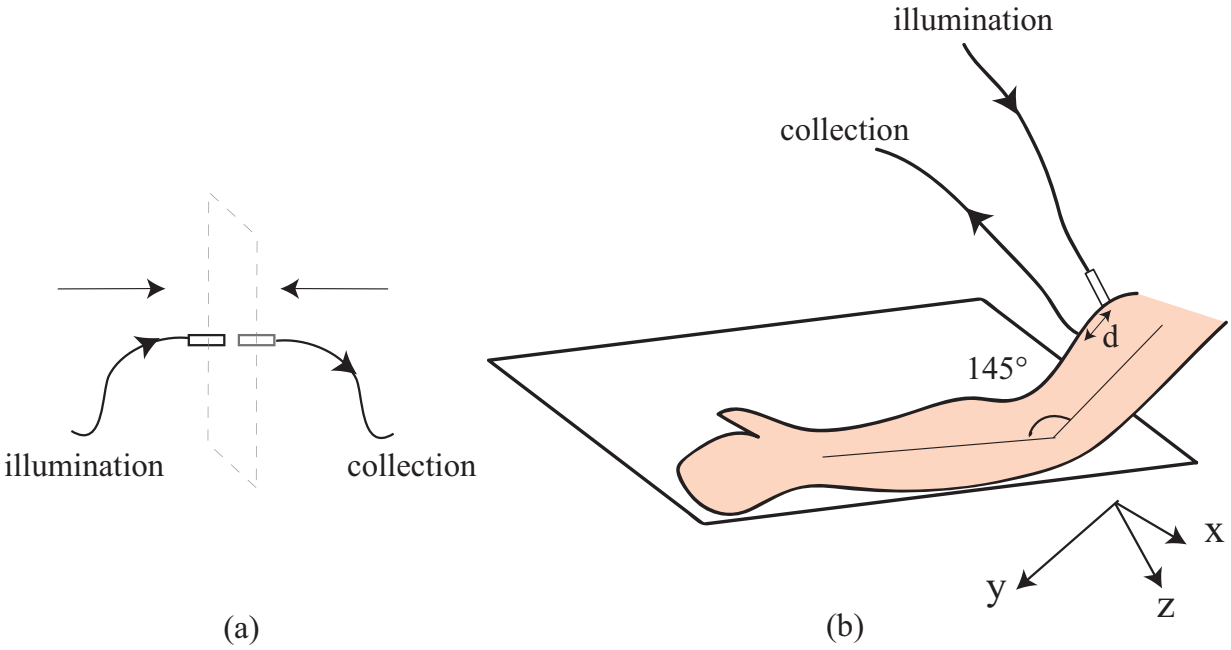


FIG. 4.14 – *(a) Placement des fibres pour la mesure de la référence temporelle des spectres résolus en temps, (b) placement des fibres sur le biceps des volontaires lors des enregistrements.*

Après avoir placé la référence temporelle sur les images de la Sreak Camera grâce à une mesure de spectre de temps de vol sans échantillon (cf.figure 4.14.a.), nous collectons les photons diffusés à une distance $d = 29\ mm$ du point d'illumination dans la direction donnée par l'humérus. Cette distance est identique pour tous les volontaires, puisque le tissu exploré à la profondeur $d/2 \simeq 15\ mm$ est toujours le biceps. Les images suivantes sont deux exemples de

spectres de temps de vol relevés pour deux individus présentant un tissu adipeux sous cutané d'épaisseur très différente.

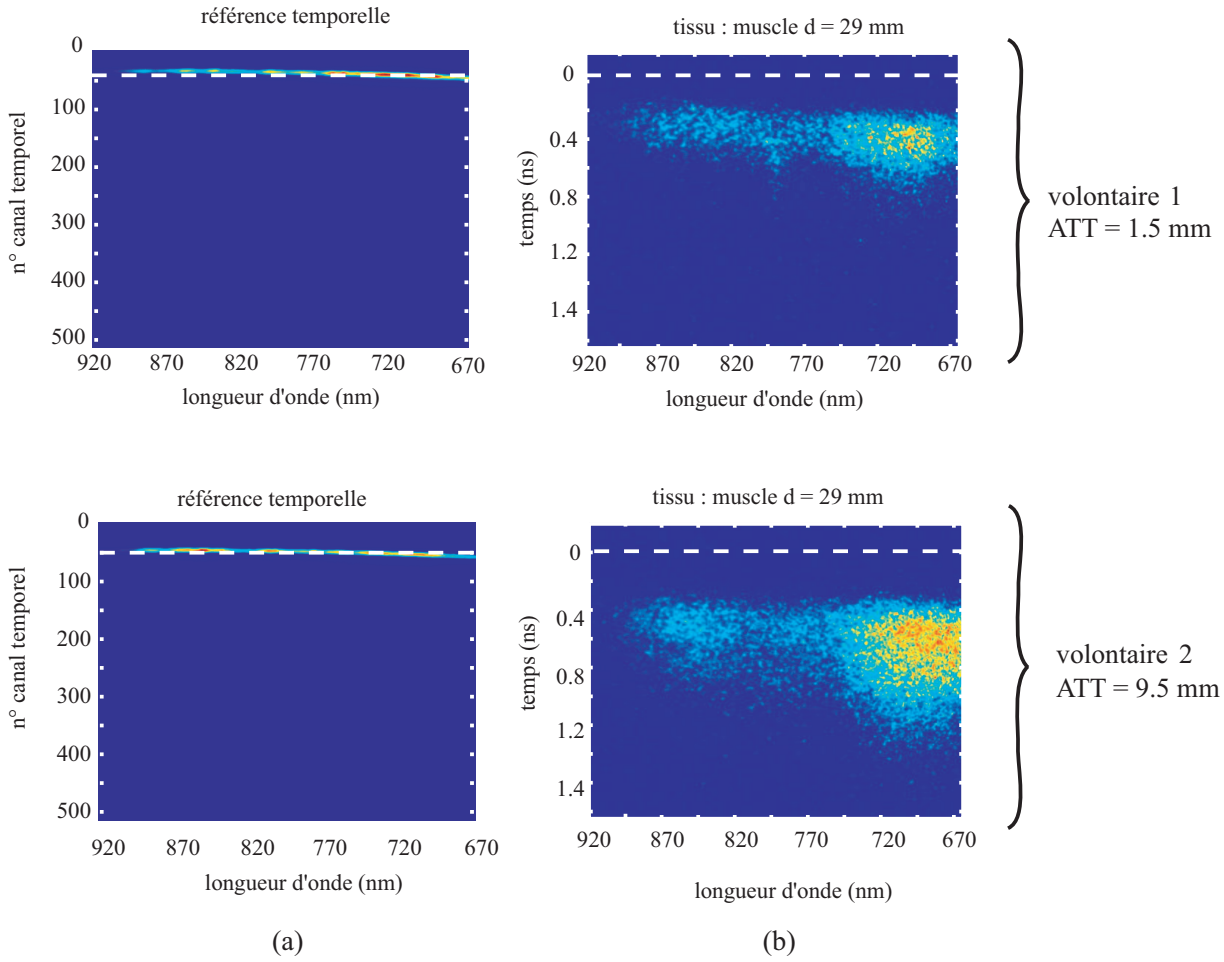


FIG. 4.15 – *(a) Exemples d'enregistrements des références temporelles, (b) spectres de temps de vol de la lumière diffusée dans le biceps dans le cas de 2 volontaires, dont les épaisseurs de tissu adipeux au niveau du biceps sont ATT =1,7 mm et 9,5 mm.*

On remarque deux grandes différences entre ces spectres. Le temps d'arrivée des premiers photons et l'étalement temporel des impulsions sont bien plus grands dans le cas d'une couche adipeuse épaisse. Bien que les photons collectés soient issus en majeure partie du tissu musculaire, ils traversent par deux fois la peau et la graisse situées au-dessus du biceps. La graisse étant un tissu extrêmement diffusant, les photons collectés dans le cas d'une grande ATT ont dû emprunter des chemins optiques plus complexes et donc plus longs pour revenir à la surface.
Le temps d'acquisition de tels spectres est de l'ordre de 4 minutes.

4.3.1.2 Traitement des données et résultats

Les paramètres μ_a et μ'_s ainsi que le coefficient d'anisotropie B sont recherchés grâce à l'ajustement entre l'ensemble de ces images et la loi de diffusion établie à l'équation (4.8) (A est un coefficient de proportionnalité et I est le flux de photons collectés) :

$$I_{image}(d,t) = AI(d,t)$$
$$= A\frac{(B+2)^{3/2}}{(2\pi)^{3/2}B^{1/2}(\mu'_s ct)^{5/2}}\exp\left\{-(\frac{1}{B}+\frac{1}{2})\left[B+(\frac{d}{\sqrt{2}}\mu'_s)^2\right]\frac{1}{\mu'_s ct}-\mu_a c(t-t_0)\right\}$$

Le protocole de traitement est le suivant :

- chaque image (ou spectre) $I(\lambda,t)$, est traitée pour tenir compte des calibrations temporelle et spectrale, de la référence temporelle et du bruit ambiant mesurés.
- Le profil temporel $I(t)$ de l'impulsion est extrait pour chaque longueur d'onde, et il est déconvolué par la réponse impulsionnelle du montage à la même longueur d'onde.
- La loi de diffusion (4.8) est ensuite ajustée à ce profil, avec la contrainte que les paramètres A, μ_a, μ'_s et B soient positifs.

Les courbes suivantes (figure 4.16) donnent pour une même longueur d'onde, un exemple de profil temporel issu d'un spectre de temps de vol par propagation dans le biceps et la réponse impulsionnelle du montage volontairement représentée avec la même échelle temporelle.

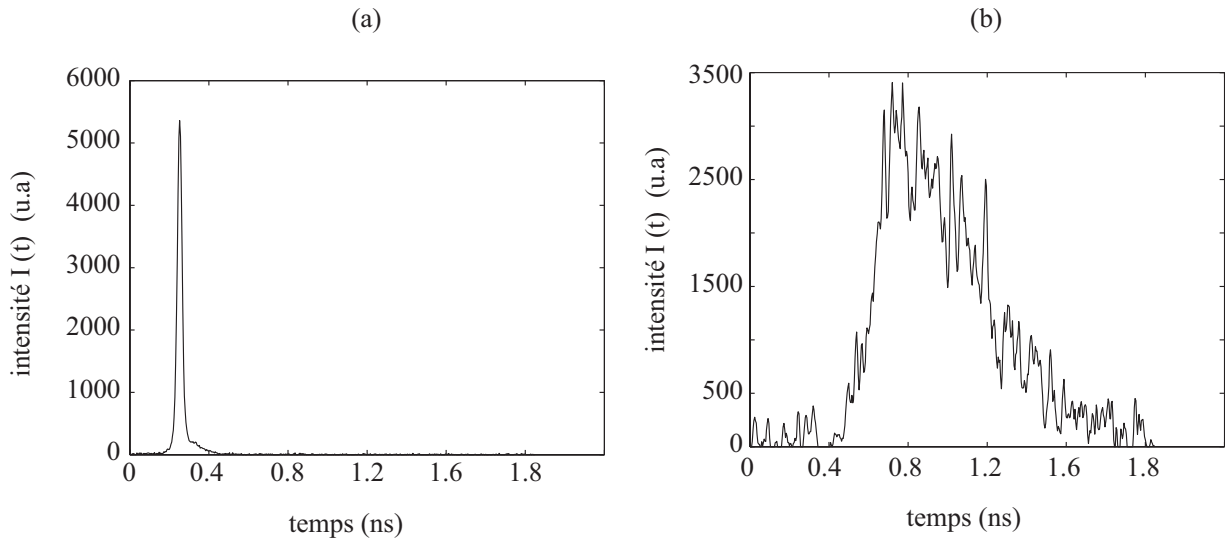


FIG. 4.16 – *(a) Profil temporel de la réponse impulsionnelle du montage à $\lambda = 700\ nm$ (b) Profil temporel à $\lambda = 700\ nm$ des impulsions diffusées dans le biceps (ATT =9,5 mm).*

Chaque image de Streak Camera fournit ainsi 512 valeurs de B, relatives aux 512 canaux spectraux disponibles. Outre l'observation des variations spectrales des coefficients physiolo-

giques, l'utilisation d'un continuum de lumière apporte ainsi également une robustesse aux calculs des paramètres issus d'un ajustement.
On représente sur la figure (4.17) les valeurs calculées du paramètre d'anisotropie B entre l'axe longitudinal (y) et transversal (x ou z) du muscle, pour deux sujets présentant une ATT très différente. La valeur de $B = 1$ signifie que le tissu illuminé est parfaitement isotrope. On représente également, pour les mêmes sujets, les valeurs correspondantes des probabilités de transition α, β, γ relatives aux axes x, y et z. La ligne horizontale représente le cas où $\alpha = \beta = \gamma = 1/6$, c'est-à-dire le cas où les photons ont la même probabilité de déplacement suivant les 3 axes.

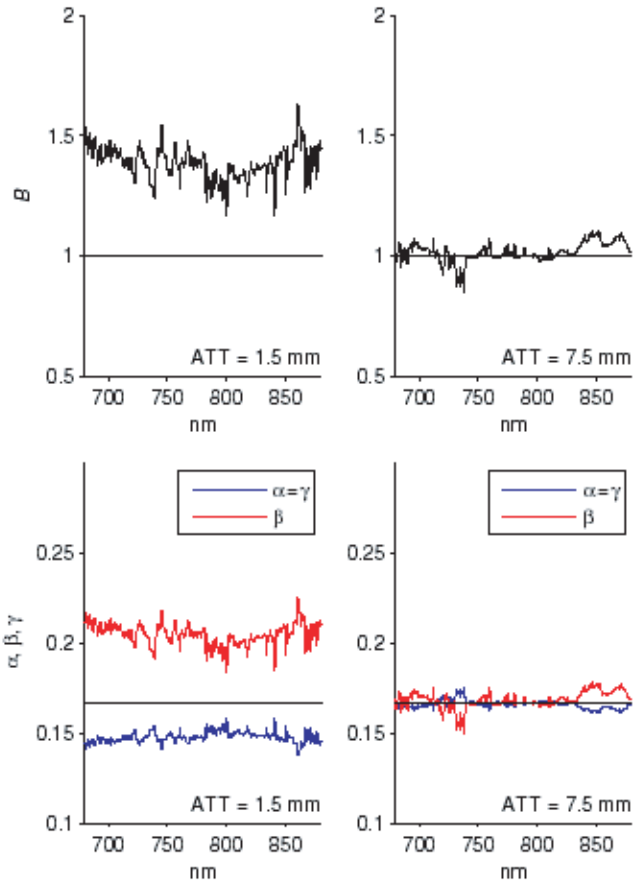


FIG. 4.17 – *Paramètre B et probabilités de transition α, β, γ pour deux volontaires (ATT=1,5 et 7,5 mm) en fonction de la longueur d'onde.*

A la lecture de ces graphes, aucune variation spectrale pour B et par conséquent pour α, β, γ ne peut être relevée. A ce jour, il n'existe pas encore de modèle théorique pour tenter de justifier ces observations. Cependant, on remarque une très forte dépendance de B avec l'épaisseur de tissu adipeux situé au-dessus du biceps. Pour affiner cette observation, on représente sur la figure

(4.18) le comportement global de B, α, β et γ en fonction de cette épaisseur, chaque valeur de paramètre étant moyennée sur l'ensemble des longueurs d'onde.

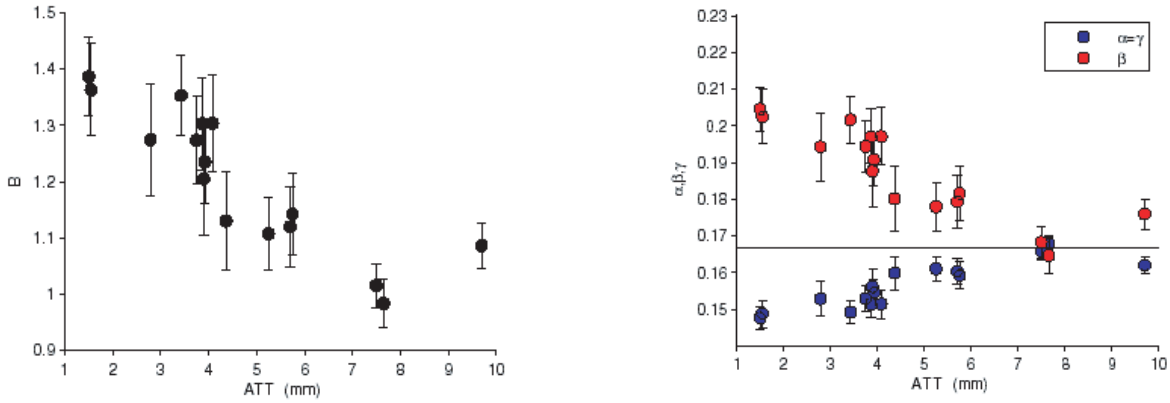


FIG. 4.18 – *(a) Paramètre d'anisotropie B en fonction de l'épaisseur de tissu adipeux (ATT) ; chaque point correspond à un sujet. (b) Paramètres α, β et γ en fonction de l'épaisseur de tissu adipeux (ATT).*

Il est donc clair que B décroît et est d'autant plus proche de 1 que l'ATT est élevée. De même, les probabilités de transition tendent à prendre les mêmes valeurs $\alpha = \beta = \gamma = 1/6$ pour les sujets présentant une plus forte épaisseur de graisse sous-cutanée. Pour des valeurs d'ATT faible, on observe bien $\alpha = \gamma \neq \beta$, ce qui corrobore l'observation échographique de la symétrie cylindrique du biceps ; et on a de plus $\beta > \alpha = \gamma$.
En conclusion, lorsque l'ATT est faible (inférieure à 5 mm), les photons ont tendance à se propager majoritairement selon la direction des fibres musculaires (axe y) et ceci quelle que soit leur longueur d'onde ; et plus l'ATT est élevée, plus les tissus manifestent un caractère isotrope. Ce phénomène trouve probablement son origine dans le fait que plus l'ATT est grande, plus les photons se propagent sur un long trajet dans le tissu adipeux. La contribution du muscle dans l'étalement temporel des impulsions est alors de plus en plus réduite. Or, puisque la graisse ne présente aucune structure macroscopique, les photons "voient" un milieu essentiellement isotrope. Il a été démontré par ailleurs que le derme possède un caractère anisotrope [110], mais comme son épaisseur est de l'ordre de 1 mm, son effet est largement supplanté par celui du tissu adipeux. Il est clair cependant que des conclusions plus fines pourraient être apportées par l'utilisation d'un modèle théorique et d'un algorithme de calcul prenant en compte la structure multi-couche des tissus humains (peau anisotrope, tissu adipeux isotrope, muscle anisotrope, etc...), actuellement en cours d'élaboration dans l'équipe de Francescini (Italie).
Les paramètres d'absorption μ_a et de diffusion μ'_s du milieu illuminé sont issus de l'ajustement

des profils temporels avec la loi (4.8) et sont tracés en fonction de la longueur d'onde sur la figure (4.19). Chacun des deux paramètres a été moyenné sur l'ensemble des sujets, les courbes en pointillés tiennent compte de l'ajout ou du retrait de la valeur de l'écart-type.

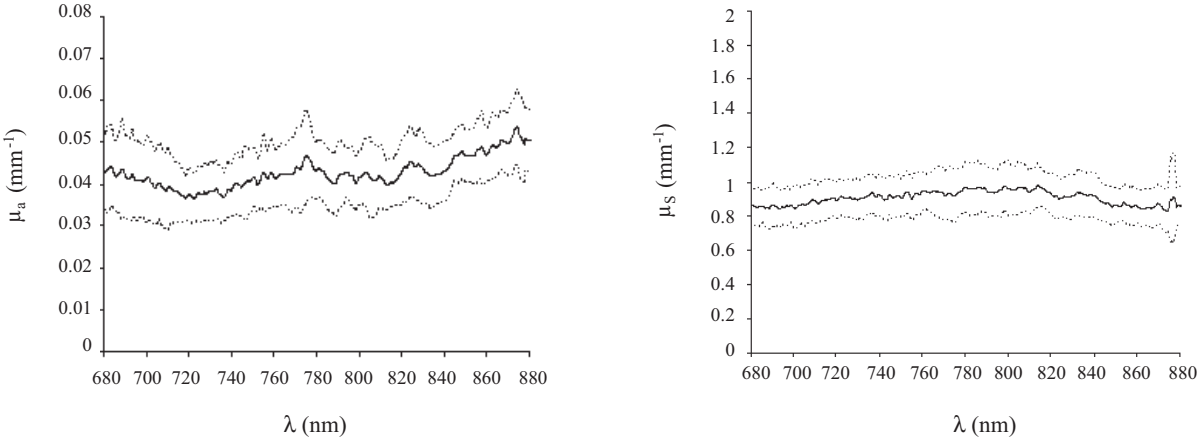


FIG. 4.19 – *(a) Paramètre d'absorption μ_a en fonction de la longueur d'onde ; (b) Paramètre de diffusion μ'_s en fonction de la longueur d'onde (Courbes en pointillés : paramètre augmenté ou diminué de l'écart-type).*

Les ordres de grandeurs de μ_a et μ'_s mesurés pour le biceps sont comparables à ceux donnés dans la littérature. Les très récentes expériences de spectroscopie infra-rouge résolue en temps de J.Swartling sur un muscle de l'avant bras humain *in vivo* mentionne des μ_a= 0,02 à 0,1 mm^{-1}, et μ'_s= 1 à 1,2 mm^{-1} selon la longueur d'onde [102]. Le modèle de propagation de la lumière utilisé ne tient alors compte d'aucune anisotropie.
A partir de ces courbes, il apparaît également que les deux paramètres ne varient que très peu en fonction de la longueur d'onde, sur la gamme spectrale disponible. Or, les mesures de μ_a et μ'_s dans les tissus tels que l'avant bras [102], l'abdomen [101], par le même type de système expérimental mais sans tenir compte d'une quelconque anisotropie, montrent que ces coefficients suivent une loi en $a\lambda^{-b}$ [112]. Là encore, il manque un modèle et d'autres expérimentations pour justifier cette indépendance spectrale.

4.3.2 Spectroscopie de temps de vol dans le tissu osseux

Le deuxième type d'investigations concerne le tissu osseux.
L'intérêt porté au squelette vient du fait qu'il intègre un grand nombre de signaux mécaniques, biochimiques et nerveux produits par l'ensemble du corps : il joue le rôle-clé de système de

rétro-action de notre organisme. Une dégradation de ce système provoque des pathologies telles que fractures, ostéoporose, artériosclérose, tumeurs, ...
A long terme, et de façon similaire aux autres tissus, l'objectif est de mettre en place une technique d'analyse permettant d'accéder au métabolisme interne du squelette, par le suivi de sa dynamique sanguine. Celle-ci est en effet intimement liée aux mécanismes de formation et de résorption osseuse. Puisque l'os, tout comme les autres tissus, est relativement transparent aux longueurs d'onde du proche infra-rouge, la spectroscopie NIRS est donc potentiellement une technique adaptée. Des expérimentations sur le tibia humain $in\ vivo$ ont déjà pu quantifier avec cette technique, les variations de concentrations en oxyhémoglobine (ΔHbO_2), déoxyhémoglobine (ΔHb) et eau (ΔH_2O) contenues dans la matrice osseuse lors d'une variation d'angle imposée à la jambe du sujet [94].

Le choix du tissu osseux à explorer s'est porté sur le tibia, puisqu'il est l'un des os les plus accessibles : l'épaisseur de tissu adipeux ainsi que la vascularisation étant très réduites dans cette zone, les photons diffusent principalement dans l'os. Le protocole de mesure consiste à installer le sujet en position assise, la jambe droite reposant sur une table basse de telle sorte que le tibia soit horizontal. Les fibres d'illumination et de collection sont placées le long de l'axe osseux directement contre la peau, et les spectres résolus en temps sont enregistrés pour différentes distances d entre les fibres , comprise entre 5 mm et 27 mm, par pas de 2 mm. Le placement des fibres sur le volontaire est schématisé sur la figure (4.20.a.). Quelques exemples de spectres de temps de vol concernant le même sujet, pour différentes distances d de collection sont représentés sur la figure (4.20.b.). Les spectres relatifs aux plus grandes valeurs de d ont été enregistrés dans le but de sonder la moëlle osseuse.
Les mêmes mesures ont été effectuées en plaçant les fibres perpendiculairement à l'axe osseux, l'illumination ayant lieu au centre de l'os (cf.figure 4.14.c.) et la collection à une distance d comprise entre 5 mm et la demi-largeur du tibia du sujet.
Le temps d'acquisition pour chaque spectre est de l'ordre de 4 minutes.

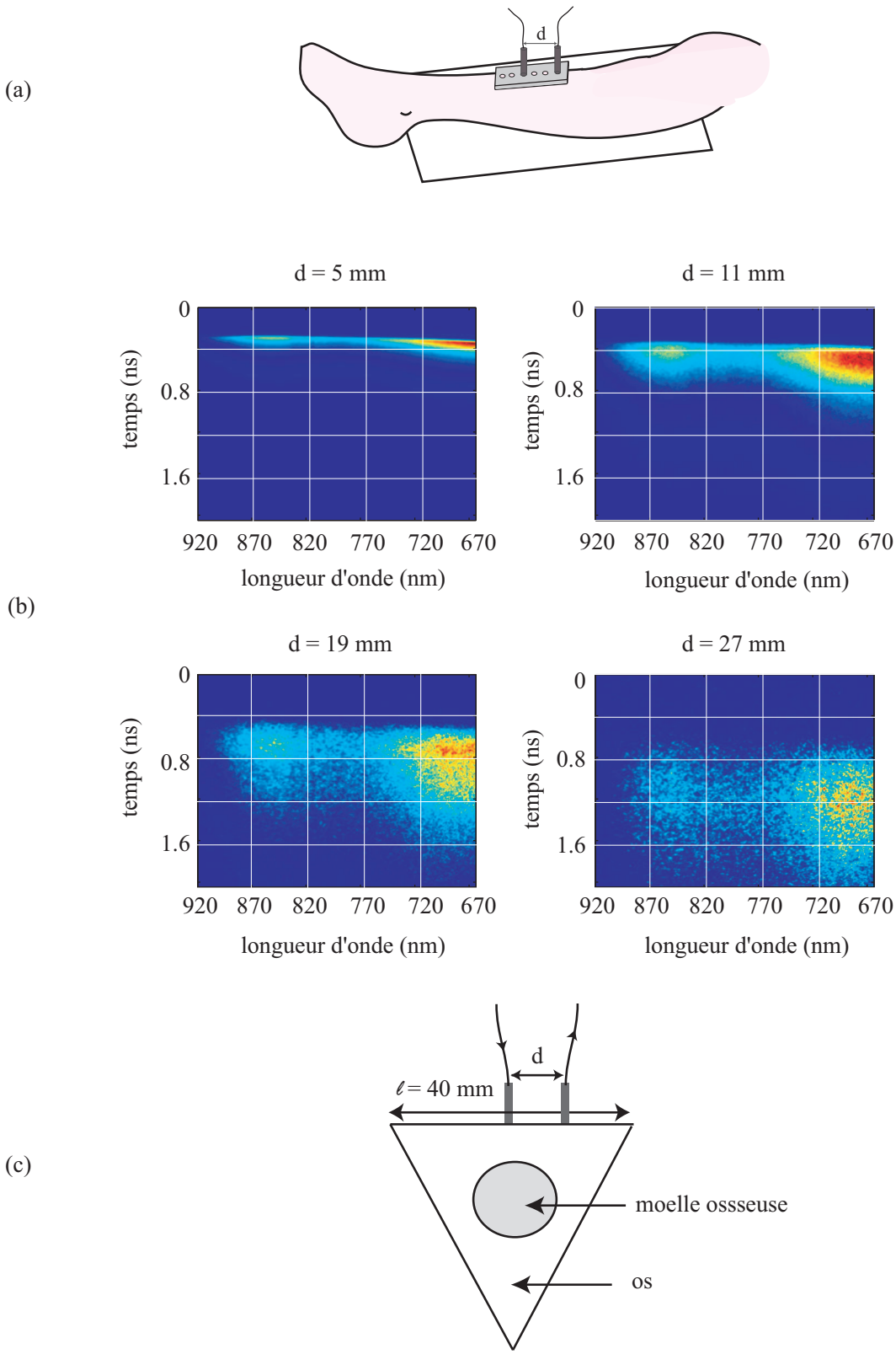


FIG. 4.20 – *(a) Placement des fibres sur la jambe du sujet lors des enregistrements ; (b) Exemples de spectres résolus en temps relevés pour un même sujet (longueur de tibia : 39,5 cm) pour différentes distances d : 5, 11, 19 et 27 mm ; (c) Coupe transversale schématique du tibia et placement des fibres dans le cas d'une collection transverse.*

L'interprétation de ces spectres est rendue extrêmement difficile par le fait que les hypothèses du modèle utilisé jusqu'à présent ne sont plus valides : en effet, il n'est plus possible de considérer l'os du tibia en coupe transverse ou sagittale comme un milieu d'étendue semi-infinie car la profondeur atteinte lors de la propagation des photons dans l'os est du même ordre de grandeur que l'épaisseur de celui-ci. D'autre part, la structure transverse prismatique du tibia pose des conditions aux limites à prendre en compte. Ainsi, ces mesures ne pourront être exploitées que prochainement, une fois un modèle théorique plus complexe établi.

4.4 Conclusion

La spectroscopie infra-rouge (NIRS) est une technique d'investigations des tissus, principalement sous-cutanés, permettant d'apporter, grâce à la mesure spectrale du coefficient d'absorption μ_a, des indications sur les modifications d'oxygénation et sur le métabolisme des tissus sondés. Cependant, les tissus humains présentent un caractère diffusant trop important pour qu'une simple application de la loi de Beer-Lambert entre les flux de photons entrant et sortant soit valide. La détermination du coefficient de diffusion μ'_s du milieu est donc une étape nécessaire. Les modèles théoriques de propagation de la lumière en milieux diffusants tiennent compte d'une étendue semi-infinie, et plus récemment de leur anisotropie potentielle. Dans ce chapitre et en collaboration avec M.Tiziano Binzoni, physiologiste, nous avons mis en place un système expérimental de spectroscopie de temps de vol sur des tissus *in vivo* en utilisant le continuum de lumière à notre disposition comme source optique. Des mesures d'absorption et de diffusion sur le tissu musculaire du biceps de 16 volontaires ont été réalisées. Cette étude[7] souligne en particulier la nécessité de prendre en compte l'influence de l'architecture des tissus explorés sur la valeur des paramètres physiologiques extraits. Des paramètres erronés conduiraient en effet à une mauvaise conclusion sur la teneur du tissu en hémoglobine, oxygène, etc... Des explorations sur le tibia et la moëlle osseuse ont également été entreprises.
L'utilisation d'un continuum de lumière permet d'obtenir en un seul tir, le comportement spectral des éléments majoritaires du tissu ; et de plus, puisque l'on possède un profil temporel de l'impulsion diffusée pour chaque longueur d'onde, la détermination des paramètres physiologiques d'un sujet peut être effectuée sur un grand nombre de profils, ce qui conduit une plus grande robustesse des résultats. Dans le but d'augmenter le rapport signal à bruit des images fournies par la Streak Camera, il pourrait être envisagé de réduire l'extension spectrale du continuum à la gamme du proche infra-rouge, et ainsi d'augmenter le nombre de photons par bande spectrale.
Pour l'heure, l'ensemble des résultats et principalement ceux concernant le tissu osseux n'ont

[7] Cette étude a été publiée récemment [113].

pu être commentés ou justifiés. De nouveaux modèles théoriques beaucoup plus complexes, devraient prochainement voir le jour pour tenir compte de la structure multi-couche de la plupart des tissus humains et de leur géométrie particulière.

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était de valider l'utilisation d'un continuum de lumière fibré, en régime femtoseconde, comme source optique dans différents dispositifs expérimentaux d'imagerie, ou plus généralement, d'investigations biologiques. L'intérêt principal est de proposer à la fois un spectre très large avec une brillance bien supérieure aux lampes "blanches", et une source pulsée : ces caractéristiques sont idéales pour réaliser par exemple des mesures de spectroscopie en temps résolu. D'autre part, l'utilisation d'un filtre acousto-optique placé à l'extrémité de la fibre, rend l'emploi du continuum extrêmement flexible et ouvre de nombreux champs d'applications, notamment en microscopie de fluorescence. La capacité de sélectionner n'importe quelle bande spectrale parmi le spectre visible avec une grande efficacité, rend possible l'excitation de n'importe quel fluorophore. Ceci permettra à terme de diversifier les marqueurs, pour affiner par exemple les explorations intra-cellulaires.
Nous avons tout d'abord caractérisé le plus complètement possible la source que nous avons mis en place. Il s'est agi d'évaluer longueur d'onde par longueur d'onde, la puissance spectrale disponible, la durée et la forme temporelle des pulses issus du continuum. Le comportement tir à tir a également été caractérisé, en terme de fluctuations de puissance et de formes temporelles.
Le premier système expérimental sur lequel a été inséré le continuum concerne la microscopie confocale de fluorescence. Cette technique n'étant pas usitée au sein du laboratoire, nous avons dû développer un tel microscope au cours de ce travail. Celui-ci a été testé et caractérisé avec succès sur des échantillons réfléchissants puis fluorescents, avant d'envisager l'imagerie de préparations cellulaires. Des images mono- et bi-couleurs ont été enregistrées pour des cellules dont le noyau et / ou l'actine du cytoplasme étaient codés. Même si nous n'avons pas augmenté la qualité des images obtenues, en améliorant les performances du système optique et électronique, l'utilisation d'un continuum comme source accordable pour la microscopie de fluorescence est démontrée.
Successivement à ces expériences, et puisque les recherches biologiques s'orientent sur des événements se situant à l'échelle nanométrique, nous avons élaboré un microscope confocal STED en y insérant le continuum étudié : l'objectif était de mettre en place un dispositif alliant la ver-

satilité de la source à la très haute résolution spatiale proposée par la technique de saturation de fluorescence. Cette méthode requiert des conditions énergétiques, temporelles, spectrales et spatiales sur chaque pulse. Au vu des caractéristiques et des importantes fluctuations que présente tir à tir le continuum, des simulations numériques ont tout d'abord été réalisées, afin d'estimer leurs influences sur la faisabilité d'une telle alliance et sur la résolution latérale potentiellement attendue. En moyenne sur un grand nombre de pulses, ces simulations permettent de conclure que la résolution, ou plus exactement la taille de la zone contenant 85% du signal est réduite d'un facteur 2,5 par rapport à la microscopie conventionnelle mais peut être diminuée jusqu'à un facteur 7 en effectuant une sélection par niveau de puissance des pulses du continuum illuminant l'échantillon. Sous certaines conditions, principalement de puissance, un microscope STED équipé d'un continuum est ainsi tout à fait envisageable. D'un point de vue expérimental, nous avons mis en place un montage original dans lequel chaque élément présente une grande versatilité spectrale. Le continuum dont nous disposons ne présentait cependant pas suffisamment d'énergie par impulsion pour qu'une validation expérimentale puisse pour l'heure étayer ce travail.

Enfin, grâce à une collaboration avec l'Hôpital Universitaire de Genève, l'utilisation du continuum a pu été testée comme source large pulsée dans une étude physiologique *in vivo* de milieux diffusants tels que le muscle ou l'os. Il permet en effet d'observer le comportement spectral des composants majoritaires des tissus explorés ainsi que de multiplier le nombre de points de mesures pour assurer une grande qualité aux exploitations numériques ultérieures. Nous avons mis en place un dispositif de spectroscopie de temps de vol et effectué une campagne de mesures sur un grand nombre de volontaires. Si l'ensemble de ces mesures n'a pu être exploité par manque de modèles théoriques actuels, certains résultats sont à l'origine d'une publication et conforte le choix d'un continuum pour ce type d'investigations. Une amélioration du rapport signal à bruit des mesures pourrait sans doute être apportée en augmentant le nombre de photons disponibles par bande spectrale via une réduction de la largeur du spectre à la gamme infra-rouge.

Le continuum de lumière étudié est ainsi une source viable pour l'investigation biologique, tant par l'utilisation de bandes spectrales contenues dans son spectre que par sa caractéristique de source impulsionnelle. Pour ce dernier cas, il est néanmoins à noter que les pulses d'un continuum généré en régime picoseconde ou nanoseconde et avec une cadence de quelques kiloHertz semblent plus appropriés car plus énergétiques. Si le comportement temporel et pulse à pulse d'un tel continuum révèle des caractéristiques similaires au régime femtoseconde, les perspectives d'utilisation de continua seront nombreuses...

Annexe A

Autocorrélation d'impulsions femtosecondes

Introduction

L'expérience d'autocorrélation proposée ici consiste à faire interférer via un Michelson deux impulsions brèves décalées dans le temps d'un retard τ sur un détecteur de type photodiode. Cette photodiode est telle que le gap E_g du semiconducteur qui la compose vérifie :

$$\hbar\omega_0 < E_g < 2\,\hbar\omega_0 \tag{A.1}$$

où ω_0 est la pulsation moyenne du champ incident. Elle est donc incapable d'absorber un seul photon mais peut en absorber deux simultanément[1]. L'intensité du photo-courant généré s'écrit donc :

$$i_{PD}(\tau) = R(\omega_0) \int I_S(t) I_S(t-\tau)\, dt \tag{A.2}$$

où $R(\omega_0)$ est la réponse spectrale de la photodiode et $I_S(t)$ la répartition d'intensité de l'impulsion étudiée. Ce type de détecteur peut donc être utilisé pour réaliser des autocorrélations d'impulsions brèves.

Nous utiliserons dans la suite de cette annexe une forme gaussienne pour modéliser nos impulsions[2]. La dispersion des matériaux traversés par les impulsions brèves étant un facteur important d'élargissement, nous en tiendrons compte dans nos calculs.

[1] La photodiode choisie pour cette expérience d'autocorrélation à 780 nm est : Photodiode GaP, EDP-365, Roithner, de bande spectrale [245 ; 400] nm

[2] D'autres profils temporels peuvent être employés comme par exemple des sécantes hyperboliques.

Écriture de l'intensité détectée par absorption à deux photons

L'amplitude d'une impulsion gaussienne de pulsation moyenne ω_0 se propageant dans la direction z s'écrit sous la forme :

$$\mathcal{A}(t,z) = \frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} A_0\, e^{-\frac{(\omega-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}}\, e^{i(\omega t - kz)}\, d\omega \tag{A.3}$$

Compte tenu du fait que $k = n(\omega)\,\omega/c$, nous pouvons écrire :

$$\mathcal{A}(t,z) = \frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} A_0\, e^{-\frac{(\omega-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}}\, e^{i\omega(t-\frac{z}{c}-\frac{n(\omega)L}{c})}\, d\omega \tag{A.4}$$

Ici L représente la longueur de matière d'indice optique $n(\omega)$ traversée par l'impulsion.

Les amplitudes des impulsions en sortie du cube séparateur du Michelson s'écrivent sous la forme suivante :

$$\mathcal{A}_j(t,z_j) = \frac{A_0}{4\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{(\omega-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}}\, e^{i\omega(t-\frac{z_j}{c}-\frac{n(\omega)}{c}L_j)}\, d\omega \tag{A.5}$$

Pour poursuivre le calcul, nous développons l'indice optique autour de la pulsation ω_0 :

$$\begin{aligned} n(\omega) &= n(\omega_0) + \frac{dn}{d\omega}(\omega_0)(\omega-\omega_0) + \frac{1}{2}\frac{d^2n}{d\omega^2}(\omega_0)(\omega-\omega_0)^2 \\ n(\omega) &= n_0 + n_1\,(\omega-\omega_0) + n_2\,(\omega-\omega_0)^2 \end{aligned} \tag{A.6}$$

En posant :

$$t'_j = t - \frac{z_j}{c} - (n_0 + n_1\omega_0)\frac{L_j}{c} \tag{A.7}$$

$$\phi_j = \omega_0(t - \frac{z_j}{c} - \frac{n_0 L_j}{c}) \tag{A.8}$$

$$A_j^2 = (n_1 + n_2\omega_0)\frac{L_j}{c} \tag{A.9}$$

On obtient une amplitude de la forme suivante :

$$\mathcal{A}_j(t,z_j) = \frac{A_0}{4\sqrt{\pi}}\, e^{i\phi_j}\, \frac{\Delta\omega}{\sqrt{1+i\Delta\omega^2 A_j^2}} e^{-\frac{\Delta\omega^2 t_j'^2}{4(1+i\Delta\omega^2 A_j^2)}} \tag{A.10}$$

A la sortie du Michelson, nous obtenons deux impulsions séparées d'un retard τ que nous supposerons lié à retard purement aérien. Nous traduirons cela en posant : $L_1 = L_2 = L$, $|z_1 - z_2|/c = \tau$ et $A = \mathcal{A}_1 = \mathcal{A}_2$. Le champ en sortie du Michelson s'écrit donc :

$$\begin{aligned} \mathcal{A}(\tau) &= \mathcal{A}_1(t,z_1) + \mathcal{A}_2(t,z_2) \\ \mathcal{A}(\tau) &= \frac{A_0}{4\sqrt{\pi}}\, e^{i\omega_0(t-\frac{z_1}{c}-\frac{n_0 L}{c})}\, \frac{\Delta\omega}{\sqrt{1+i\Delta\omega^2 A^2}} e^{-\frac{\Delta\omega^2}{4(1+i\Delta\omega^2 A^2)}(t-\frac{z_1}{c}-(n_0+n_1\omega_0)\frac{L}{c})^2} \\ &\quad + \frac{A_0}{4\sqrt{\pi}}\, e^{i\omega_0(t-\frac{z_2}{c}-\frac{n_0 L}{c})}\, \frac{\Delta\omega}{\sqrt{1+i\Delta\omega^2 A^2}} e^{-\frac{\Delta\omega^2}{4(1+i\Delta\omega^2 A^2)}(t-\frac{z_2}{c}-(n_0+n_1\omega_0)\frac{L}{c})^2} \end{aligned} \tag{A.11}$$

En posant :

$$t_1 = (z_1 + (n_0 + n_1\omega_0))/c \tag{A.12}$$
$$t_2 = (z_2 + (n_0 + n_1\omega_0))/c \tag{A.13}$$

et en simplifiant l'écriture, on obtient :

$$\mathcal{A}(t, t_1, t_2) = \frac{A_0\, e^{i\omega_0(t+n_1\omega_0 L/c)}}{4\sqrt{\pi}B}\left[e^{-i\omega_0 t_1}\, e^{-\frac{(t-t_1)^2}{4B^2}} + e^{-i\omega_0 t_2}\, e^{-\frac{(t-t_2)^2}{4B^2}}\right] \tag{A.14}$$

On pose :

$$\begin{aligned}\frac{1}{4B^2} &= \frac{\Delta\omega^2}{4(1+i\Delta\omega^2 A^2)}\\ &= \frac{\Delta\omega^2(1-i\Delta\omega^2 A^2)}{4(1+\Delta\omega^4 A^4)}\\ &= \alpha - i\beta\end{aligned} \tag{A.15}$$

c'est-à-dire encore :

$$\alpha = \frac{\Delta\omega^2}{4(1+\Delta\omega^4 A^4)} \tag{A.16}$$
$$\beta = \frac{\Delta\omega^4 A^2}{4(1+\Delta\omega^4 A^4)} = \Delta\omega^2 A^2 \alpha \tag{A.17}$$

Compte tenu de ces notations, l'amplitude en sortie du Michelson s'écrit :

$$\mathcal{A}(t, t_1, t_2) = \frac{A_0\, e^{i\omega_0(t+n_1\omega_0 L/c)}}{4\sqrt{\pi}B}\left[e^{-i\omega_0 t_1}\, e^{i\beta(t-t_1)^2}\, e^{-\alpha(t-t_1)^2} + e^{-i\omega_0 t_2}\, e^{i\beta(t-t_2)^2}\, e^{-\alpha(t-t_2)^2}\right] \tag{A.18}$$

L'intensité se met alors sous la forme :

$$\mathcal{I}_s(t, t_1, t_2) = \frac{I_0}{16\pi|B|^2}\left|e^{-i\omega_0 t_1}\, e^{i\beta(t-t_1)^2}\, e^{-\alpha(t-t_1)^2} + e^{-i\omega_0 t_2}\, e^{i\beta(t-t_2)^2}\, e^{-\alpha(t-t_2)^2}\right|^2 \tag{A.19}$$

Comme nous l'avons déjà signalé, le courant lié à l'absorption à deux photons s'écrit :

$$i_{PD} = \int_{-\infty}^{+\infty} R(\omega)\, \mathcal{I}_s^2(t, t_1, t_2)\, dt \tag{A.20}$$

où $R(\omega)$ est la réponse à deux photons de la photodiode. Après un calcul relativement fastidieux des différents termes qui interviennent dans cette intégrale, nous trouvons :

$$i_{PD} \propto \left[1 + 2e^{-\alpha\tau^2} + e^{-\frac{\alpha^2+\beta^2}{\alpha}\tau^2}\, \cos 2\omega_0\tau + 4e^{-\frac{3\alpha^2+\beta^2}{4\alpha}\tau^2}\, \cos\omega_0\tau\, \cos\frac{\beta}{2}\tau^2\right] \tag{A.21}$$

L'allure typique de cette fonction est donnée sur la figure (4.2).

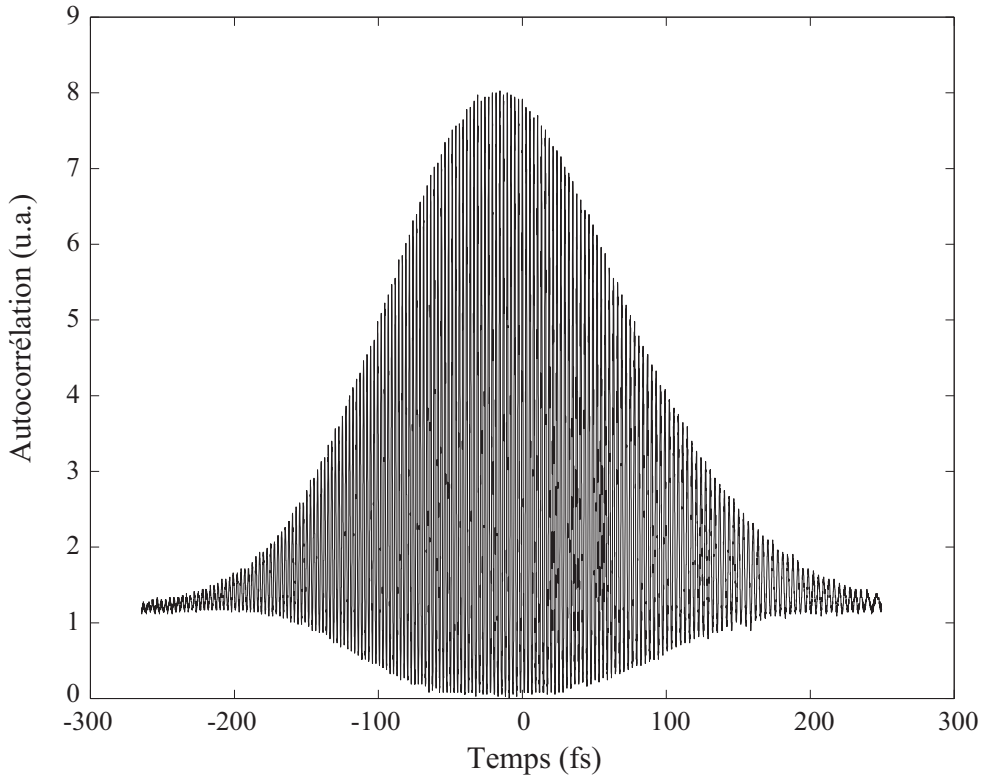


FIG. 4.1 – *Exemple d'une trace d'autocorrélation des impulsions issues du MaiTai ($\lambda = 780\,nm$).*

Enveloppes de l'autocorrélation

Pour déterminer les paramètres de l'impulsion, il faut étudier l'enveloppe de la trace d'autocorrélation. Cette dernière est constituée de deux parties :

– Une enveloppe supérieure pour laquelle on a $\cos\omega_0\tau = 1$, soit :

$$f_S(\tau) = 1 + 2e^{-\alpha\tau^2} + e^{-\frac{\alpha^2+\beta^2}{\alpha}\tau^2} + 4e^{-\frac{3\alpha^2+\beta^2}{4\alpha}\tau^2}\cos\frac{\beta}{2}\tau^2 \tag{A.22}$$

– Une enveloppe inférieure pour laquelle on a $\cos\omega_0\tau = -1$, soit :

$$f_I(\tau) = 1 + 2e^{-\alpha\tau^2} + e^{-\frac{\alpha^2+\beta^2}{\alpha}\tau^2} - 4e^{-\frac{3\alpha^2+\beta^2}{4\alpha}\tau^2}\cos\frac{\beta}{2}\tau^2 \tag{A.23}$$

C'est à partir de ces expressions analytiques que nous avons analysé nos données. Un exemple d'interpolation de données expérimentales est donné sur la courbe suivante : Les paramètres

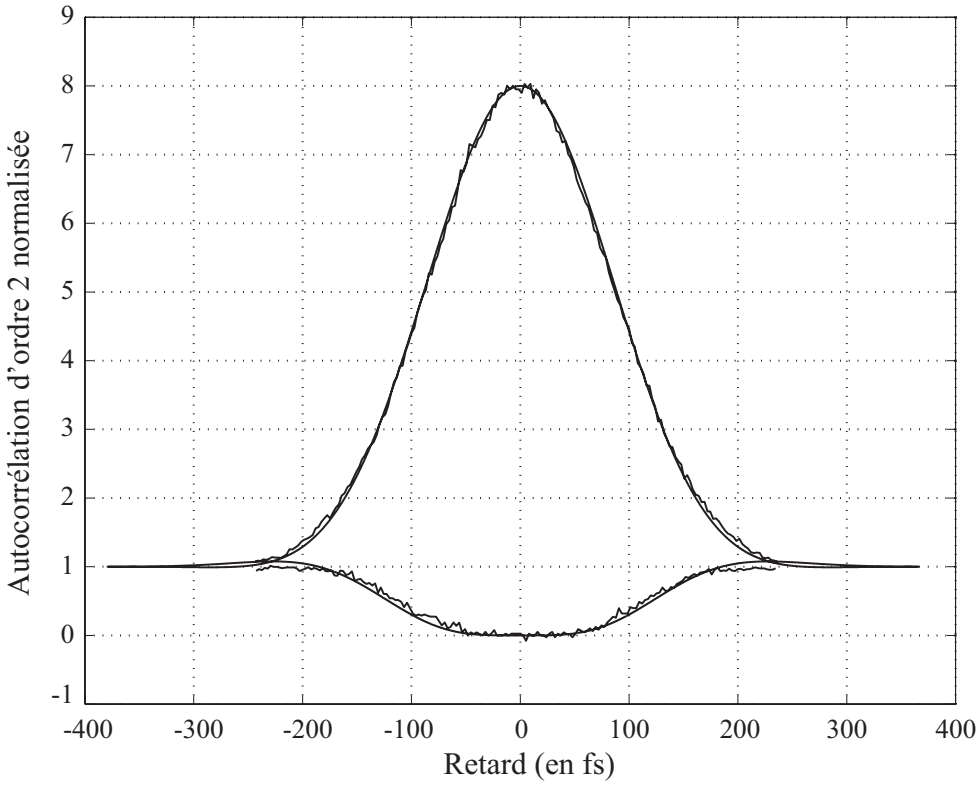


FIG. 4.2 – *Exemple d'interpolation d'une trace d'autocorrélation ($\lambda = 780\,nm$).*

obtenus par interpolation des données expérimentales sont alors :

$$\alpha = 6,30.10^{-5}\ fs^2 \tag{A.24}$$

$$\beta = 6,03.10^{-5}\ fs^2 \tag{A.25}$$

$$\Delta\omega = 22,0\ rd/ps \tag{A.26}$$

$$A = 44,5\ fs \tag{A.27}$$

Résultats obtenus

La société Spectra-Physics certifie que les impulsions du Laser MaiTai sont d'une durée $\Delta\tau_{FWHM}$ inférieure ou égale à 100 fs. Compte tenu de la définition de la répartition d'amplitude que nous avons prise pour les impulsions, cette largeur s'écrit :

$$\Delta\tau_{FWHM}^2 = \frac{2\ln 2}{\alpha} \qquad \Leftrightarrow \qquad \Delta\tau_{FWHM} = \frac{1,18}{\sqrt{\alpha}} = 148\ fs \tag{A.28}$$

S'il n'y a pas de dispersion : $A = 0$, $\alpha = \frac{\Delta\omega^2}{2}$ et $\beta = 0$. Les relations précédentes se mettent sous la forme :

$$\Delta\tau^2_{0,FWHM} = \frac{8\ln 2}{\Delta\omega^2} \qquad \Leftrightarrow \qquad \Delta\tau_{0,FWHM} = \frac{2,35}{\Delta\omega} = 107\ fs \tag{A.29}$$

Grâce à cette autocorrélation, on obtient une valeur de la durée des impulsions du MaiTai en concordance avec la donnée du constructeur. L'élargissement mesuré est imputable à la traversée de quelques centimètres de verre (cube, objectif, ...). Le principe de la mesure de l'autocorrélation par absorption à deux photons dans une photodiode a donc pu être validé.

Annexe B

Réponses impulsionnelles en microscopie confocale

Nous présentons ici une analyse faite dans le cadre de l'optique de Fourier des microscopes à balayage, dans le but de comprendre les avantages d'un microscope confocal sur un microscope classique. Nous rappellerons en premier lieu les formules permettant de passer d'un plan à un autre via un système optique. Nous appliquerons par la ensuite ces résultats aux microscopes à balayage. Nous utiliserons tout au long de cette annexe les notations utilisées par J. W. Goodman [*Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie*, J. W. Goodman, Edition Masson 1972]. Les notations géométriques sont résumées sur le schéma suivant :

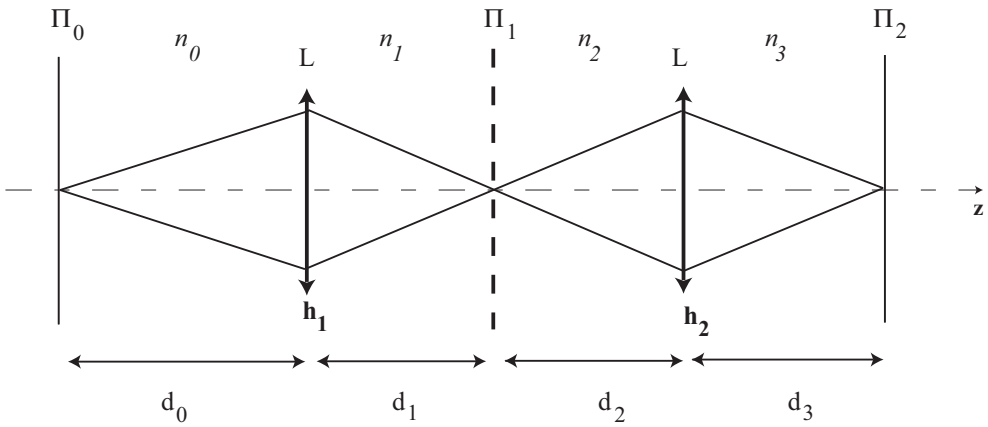


FIG. 4.1 – *Notations utilisées pour la description d'un microscope conventionnel ou confocal. L désigne la position des lentilles et n_i désigne les indices des milieux situés entre les lentilles et les plans Π_i*

Rappels d'optique de Fourier

Éclairage cohérent

Nous appellerons[1] $U_0(x_0, y_0) = U_0(\mathbf{r}_0)$ le champ électromagnétique dans le plan Π_0 situé à une distance d_0 devant une lentille mince et $U_1(x_1, y_1) = U_1(\mathbf{r}_1)$ le champ situé à une distance d_1 dans le plan Π_1 derrière la lentille. D'une manière générale, ces deux champs sont reliés entre-eux par une relation de convolution[2] que nous pouvons écrire :

$$U_1(\mathbf{r}_1) = \int\int_{\Pi_0} h_C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)\, U_0(\mathbf{r}_0)\, d^2\mathbf{r}_0 \tag{B.1}$$

La fonction $h_C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)$ est la réponse impulsionnelle cohérente de la lentille. Sous certaines conditions, elle s'écrit sous la forme :

$$h_C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0) = \frac{-i}{\lambda\, d_0\, d_1} \int\int_{-\infty}^{\infty} P(\mathbf{r})\, e^{-i\frac{\pi}{\lambda}\left[\frac{n_0}{d_0}+\frac{n_1}{d_1}-\frac{n_1}{f'}\right]\mathbf{r}^2}\, e^{-ik\mathbf{r}\left[\frac{n_0}{d_0}\,\mathbf{r}_0+\frac{n_1}{d_1}\,\mathbf{r}_1\right]}\, d^2\mathbf{r} \tag{B.2}$$

$P(\mathbf{r})$ est la fonction décrivant la pupille du système imageur[3] et $k = 2\pi/\lambda$ est le vecteur d'onde dans le vide. En généralisant cette fonction pupillaire sous la forme :

$$P(\mathbf{r},\, d_0,\, d_1) = P(\mathbf{r})\, e^{-i\frac{\pi}{\lambda}\left[\frac{n_0}{d_0}+\frac{n_1}{d_1}-\frac{n_1}{f'}\right]\mathbf{r}^2} \tag{B.3}$$

on voit que la réponse impulsionnelle du système optique peut s'écrire sous la forme d'une transformée de Fourier de la fonction pupillaire :

$$h_C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0) = \frac{-i}{\lambda\, d_0\, d_1}\, \mathcal{TF}\left[P(\mathbf{r},\, d_0,\, d_1)\right]_{\frac{1}{\lambda}\frac{n_1}{d_1}[\gamma\mathbf{r}_0+\mathbf{r}_1]} \tag{B.4}$$

où $\gamma = (n_0\, d_1)/(n_1\, d_0)$ représente le grandissement entre les deux plans. Comme nous ne nous intéresserons qu'à des pupilles de symétrie cylindrique (i.e $P(\mathbf{r},\, d_0,\, d_1) = P(r,\, d_0,\, d_1)$), la formule précédente peut se simplifier et s'écrire :

$$h_C(\mathbf{p},\, d_0,\, d_1) = \frac{-i}{\lambda\, d_0\, d_1} \int_0^{+\infty} P(r,\, d_0,\, d_1)\, 2\pi r\, J_0(2\pi\, p\, r)\, dr \tag{B.5}$$

avec $\mathbf{p} = (\gamma\, \mathbf{r}_0 + \mathbf{r}_1) \cdot n_1/(\lambda d_1)$. Quelques cas simples peuvent être alors étudiés.

[1] Les variables $\mathbf{r}_i$ sont à prendre au sens vectoriel.

[2] La convolution sera plus évidente à voir sur l'équation (B.4).

[3] Elle est classiquement binaire mais peut aussi être composée de termes en exponentielles complexes traduisant des aberrations.

Les plans Π_0 et Π_1 sont conjugués

On a alors :

$$\frac{n_0}{d_0} + \frac{n_1}{d_1} = \frac{n_1}{f'} \tag{B.6}$$

et donc :

$$h_C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0) = \frac{-i\pi\, R^2}{\lambda\, d_0\, d_1} \left[\frac{2\, J_1(v)}{v}\right] \tag{B.7}$$

où R est le rayon de la pupille et nous avons posé :

$$v = \frac{2\pi}{\lambda}\,\text{ON'}\ |\mathbf{r}_1 + \gamma\, \mathbf{r}_0| \quad \text{où} \quad \gamma = \frac{n_0\, d_1}{n_1\, d_0} \tag{B.8}$$

où $ON' = n_1\, \sin\alpha_1$ est l'ouverture numérique côté espace image du système optique (on aura également $ON = n_0\, \sin\alpha_0$ pour ouverture numérique côté espace objet).

Les plans Π_0 et Π_1 sont légèrement non conjugués

On suppose qu'il y a une légère défocalisation, c'est-à-dire que :

$$\frac{n_0}{d_0} + \frac{n_1}{d_1 - z} - \frac{n_1}{f'} \simeq \frac{n_1 z}{d_1^2} \tag{B.9}$$

avec $z \ll d_1$. Dans ce cas on trouve que :

$$h_C(\mathbf{p},\, z) = \frac{-i}{\lambda\, d_0\, d_1} \int_0^{+\infty} P(r)\, e^{i\frac{\pi n_1 z\, r^2}{\lambda d_1^2}}\, 2\pi r\, J_0(2\pi\, p\, r)\, dr \tag{B.10}$$

D'une manière générale, il n'y a pas de forme analytique simple pour cette expression. Cependant, pour $p = 0$ on trouve [86] :

$$h_C(\mathbf{0},\, z) = \frac{-i}{\lambda\, d_0\, d_1}\, \pi R^2\, e^{iu/4} \frac{sin(u/4)}{u/4} \tag{B.11}$$

où :

$$u = \frac{2\pi}{\lambda}\, \frac{ON'^2}{n_1}\, z \tag{B.12}$$

Éclairage incohérent

On peut encore, en éclairage incohérent, écrire une relation de convolution entre le champ situé dans le plan Π_0 et le plan Π_1, mais la réponse impulsionnelle du système imageur n'est plus la même. On a donc :

$$I_1(\mathbf{r}_1) = \int\int_{\Pi_0} h_I(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)\, I_0(\mathbf{r}_0)\, d^2\mathbf{r}_0 \tag{B.13}$$

et

$$h_I(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0) = |h_C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)|^2 \tag{B.14}$$

Choix du système étudié

Le système étudié est schématisé sur la figure (4.1). On y trouve deux systèmes imageurs, le premier conjugant le plan source Π_0 et le plan objet Π_1, le deuxième conjugant le plan objet et le plan détecteur Π_2. Nous traiterons le cas général, à savoir que les systèmes optiques séparent des milieux d'indices optiques différents (notés n_0, n_1, n_2, n_3) et leurs grandissements seront notés $\gamma_1 = (n_0\, d_1)/(n_1\, d_0)$ et $\gamma_2 = (n_2\, d_3)/(n_3\, d_2)$. Ajoutons que nous considérerons les systèmes comme étant aplanétiques, c'est-à-dire que nous pourrons écrire d'après la relation d'Abbe :

$$ON_1 = \gamma_1\, ON_1' \qquad \text{et} \qquad ON_2 = \gamma_2\, ON_2' \tag{B.15}$$

Les systèmes seront caractérisés par leur réponse impulsionnelle h_{C_1} et h_{C_2} dans le cas cohérent et h_{I_1} et h_{I_2} dans le cas incohérent.

Dans toute la suite de cette annexe, nous ne considérerons qu'un éclairage cohérent effectué par une source ponctuelle. Nous pourrons donc écrire le champ $U_0(\mathbf{r}_0)$ sous la forme

$$U_0(\mathbf{r}_0) = S_0\, \delta(\mathbf{r}_0) \tag{B.16}$$

Nous traiterons par contre les cas où la lumière collectée par le deuxième système sera soit cohérente soit incohérente.

Du fait de ces hypothèses, l'éclairement dans le plan Π_1 s'écrit :

$$U_1(\mathbf{r}_1) = \int\int_{\Pi_0} h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)\, U_0(\mathbf{r}_0)\, d^2\mathbf{r}_0 \tag{B.17}$$

$$= S_0\, h_{C_1}(\mathbf{r}_1, 0) \tag{B.18}$$

L'intensité I_2 détectée dépendra bien sûr du détecteur utilisé. De manière générale, nous aurons :

$$I_2 = \int_{S_{det}} |U_2(\mathbf{r}_2)|^2\, d\mathbf{r}_2 \quad \text{avec} \tag{B.19}$$

$$U_2(\mathbf{r}_2) = \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, t_1(\mathbf{r}_1)\, U_1(\mathbf{r}_1)\, d^2\mathbf{r}_1 \tag{B.20}$$

Dans le cas d'un détecteur ponctuel placé en $\mathrm{r}_2 = \mathbf{0}$ nous aurons :

$$I_2 = |U_2(\mathbf{r}_2 = \mathbf{0})|^2 \tag{B.21}$$

Microscopie classique à balayage

Éclairage cohérent-cohérent

Le champ dans le plan objet s'écrit :

$$U_2(\mathbf{r}_2) = \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, t_1(\mathbf{r}_1)\; U_1(\mathbf{r}_1)\, d^2\mathbf{r}_1 \tag{B.22}$$

$$= S_0 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, t_1(\mathbf{r}_1)\; h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{0})\, d^2\mathbf{r}_1 \tag{B.23}$$

La suite du calcul dépend de la nature de l'objet. Comme nous cherchons la réponse impulsionnelle du microscope, il nous faut prendre un objet ponctuel, i.e $t_1(\mathbf{r}_1) = t_0\, \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r})$. Il s'ensuit que le champ dans le plan du détecteur s'écrit :

$$U_2(\mathbf{r}_2) = S_0 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, t_0\, \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r})\; h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{0})\, d^2\mathbf{r}_1 \tag{B.24}$$

$$= S_0\, t_0\, h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r})\, h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0}) \tag{B.25}$$

et l'intensité détectée est :

$$I_2 = |S_0\, t_0|^2 \int_{S_{det}} |h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r})|^2\; |h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0})|^2\; d\mathbf{r}_2 \tag{B.26}$$

$$= |S_0\, t_0|^2\; |h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0})|^2 \int_{S_{det}} |h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r})|^2\; d\mathbf{r}_2 \tag{B.27}$$

$$= |S_0\, t_0|^2\; |h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0})|^2 \int_{S_{det}} \left| \frac{-i\pi\, R^2}{\lambda\, d_2\, d_3} \left[\frac{2\, J_1(\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}_2'\; |\mathbf{r}_2 + \gamma_2\, \mathbf{r}|)}{\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}_2'\; |\mathbf{r}_2 + \gamma_2\, \mathbf{r}|} \right] \right|^2 d\mathbf{r}_2 \tag{B.28}$$

$$\tag{B.29}$$

Dans le cas d'un microscope classique, la taille du détecteur est grande devant celle de la réponse impulsionnelle du deuxième système. L'intégrale précédente ne dépend alors plus de la position $\mathbf{r}$ de l'objet et on obtient :

$$I_2 = cst\; |h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0})|^2 \tag{B.30}$$

$$= cst\; \left[\frac{2\, J_1(\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}_1'\, r)}{\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}_1'\, r} \right]^2 \tag{B.31}$$

La réponse impulsionnelle du microscope cohérent classique à balayage est donc la tache d'Airy habituelle.

Éclairage cohérent-incohérent

Dans le cas d'une émission incohérente d'un objet ponctuel tel que sa transmission en intensité s'écrive $T(\mathbf{r}_1) = T_0\,\delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r})$, l'intensité dans le plan Π_2 de détection s'écrit :

$$\begin{aligned} I_2(\mathbf{r}_2) &= \int\int_{\Pi_1} h_{I_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, T_1(\mathbf{r}_1)\, I_1(\mathbf{r}_1)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.32)} \\ &= T_0 \int\int_{\Pi_1} h_{I_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r})\, I_1(\mathbf{r}_1)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.33)} \\ &= T_0\, h_{I_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r})\, I_1(\mathbf{r}) && \text{(B.34)} \end{aligned}$$

or :

$$\begin{aligned} I_1(\mathbf{r}) &= |S_0\, h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0})|^2 && \text{(B.35)} \\ &= I_0\, |h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0})|^2 && \text{(B.36)} \end{aligned}$$

et

$$h_{I_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}) = |h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r})|^2 \qquad \text{(B.37)}$$

On a donc :

$$\begin{aligned} I_2(\mathbf{r}_2) &= T_0\, h_{I_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r})\, I_1(\mathbf{r}) && \text{(B.38)} \\ &= T_0\, I_0\, |h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r})|^2\, |h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0})|^2 && \text{(B.39)} \end{aligned}$$

L'intensité détectée est

$$I_2 = I_0 T_0 \int_{S_{det}} |h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r})|^2\, |h_{C_1}(\mathbf{r}, \mathbf{0})|^2\, d^2\mathbf{r}_2 \qquad \text{(B.40)}$$

Au niveau de la détection nous obtenons donc le même résultat qu'avec l'éclairage cohérent (cf.équation B.26), *i.e.* la réponse impulsionnelle du microscope cohérent-incohérent classique à balayage est une tache d'Airy.

$$I_2 = cst\, \left[\frac{2\, J_1(\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}_1'\, r)}{\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}_1'\, r} \right]^2 \qquad \text{(B.41)}$$

Microscopie confocale à balayage

Éclairage cohérent-cohérent

Le calcul est identique au cas du microscope classique à balayage, seule l'expression de l'intensité détectée change. En effet, si le détecteur est ponctuel, I_2 s'écrit :

$$\begin{aligned} I_2 &= |S_0\, t_0|^2\, |h_{C_1}(\mathbf{r},\mathbf{0})|^2 \int_{S_{det}} |h_{C_2}(\mathbf{r}_2,\mathbf{r})|^2\, d\mathbf{r}_2 && \text{(B.42)} \\ &= |S_0\, t_0|^2\, |h_{C_1}(\mathbf{r},\mathbf{0})|^2\, |h_{C_2}(\mathbf{0},\mathbf{r})|^2 && \text{(B.43)} \\ &= cst \left| \frac{2\, J_1(\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}'_1\, r)}{\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}'_1\, r} \right|^2 \left| \frac{2\, J_1(\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}'_2\, \gamma_2\, r)}{\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}'_2\, \gamma_2\, r} \right|^2 && \text{(B.44)} \\ &= cst \left| \frac{2\, J_1(\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}'_1\, r)}{\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}'_1\, r} \right|^2 \left| \frac{2\, J_1(\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}_2\, r)}{\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}_2\, r} \right|^2 && \text{(B.45)} \end{aligned}$$

Dans le cas où les deux taches d'Airy ont des tailles sensiblement identiques, la réponse impulsionnelle du système s'en trouve affectée. Par exemple, si les *deux systèmes optiques sont symétriques* (cas d'un microscope confocal travaillant en réflexion), l'intensité détectée s'écrit :

$$I_2 = cst \left| \frac{2\, J_1(\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}'_1\, r)}{\frac{2\pi}{\lambda}\, \mathrm{ON}'_1\, r} \right|^4 \qquad \text{(B.46)}$$

formule que l'on retrouve dans les descriptions courantes des systèmes confocaux.

Éclairage cohérent-incohérent

En considérant toujours un détecteur ponctuel, un calcul identique au précédent montre qu'on obtient une réponse impulsionnelle de la même forme que celle obtenue en cohérent-cohérent.

$$\begin{aligned} I_2 &= \int_{S_{det}} T_0 I_0\, |h_{C_2}(\mathbf{r}_2,\mathbf{r})|^2\, |h_{C_1}(\mathbf{r},\mathbf{0})|^2\, d^2\mathbf{r}_2 && \text{(B.47)} \\ &= T_0 I_0\, |h_{C_2}(\mathbf{0},\mathbf{r})|^2\, |h_{C_1}(\mathbf{r},\mathbf{0})|^2 && \text{(B.48)} \end{aligned}$$

Cette dernière expression est identique à l'équation B.45. Ainsi, tant que la transmission en intensité de l'objet peut s'écrire comme une distribution de Dirac, le type d'éclairage n'influe pas sur la résolution du microscope.

Cas particuliers

Quelques cas particuliers sont intéressants à développer (voir le chapitre 2 portant sur le confocal). Il s'agit du cas où l'objet est plan, illuminé par une source ponctuelle ou par une source large. Ces deux cas seront traités dans le cadre d'un microscope confocal cohérent-cohérent.

Source ponctuelle et objet plan : distribution transverse de l'intensité détectée

Compte tenu de ce qui a été dit dans les paragraphes précédents et que la transmission de l'objet est une constante indépendante de sa position (notée t_1) , nous pouvons écrire le champ dans le plan du détecteur sous la forme :

$$\begin{aligned}
U_2(\mathbf{r}_2) &= S_0 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, t_1(\mathbf{r}_1)\, h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{0})\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.49)}\\
&= S_0 t_1 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{0})\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.50)}\\
&= S_0 t_1 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_2\,|\mathbf{r}_2 + \gamma_2\,\mathbf{r}_1|) \cdot h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_1\,|\mathbf{r}_1|)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.51)}\\
&= S_0 t_1 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_2\left|\frac{\mathbf{r}_2}{\gamma_2} + \mathbf{r}_1\right|) \cdot h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_1\,|\mathbf{r}_1|)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.52)}
\end{aligned}$$

puisque[4] $\mathrm{ON}'_2\,\gamma_2 = \mathrm{ON}_2 = \mathrm{ON}'_1$. En posant $\mathbf{r}'_2 = \mathbf{r}_2/\gamma_2$, on obtient :

$$U_2(\mathbf{r}'_2) = S_0 t_1 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_1\,|\mathbf{r}'_2 + \mathbf{r}_1|) \cdot h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_1\,|\mathbf{r}_1|)\, d^2\mathbf{r}_1 \qquad \text{(B.53)}$$

Nous retrouvons ici la convolution des deux réponses impulsionnelles h_{C_1} et h_{C_2} des systèmes optiques évaluée en $\mathbf{r}'_2$. Si les réponses impulsionnelles sont des fonctions d'Airy, nous pourrons évaluer cette convolution en effectuant une transformée de Fourier. En effet, la transformée de Fourier des deux fonctions d'Airy est une fonction disque D_ρ de même rayon. Il s'ensuit que le produit des deux transformées est égal à la fonction disque D_ρ et que la convolution de h_{C_1} par

[4] le système est toujours considéré symétrique

h_{C_2} est égale à h_{C_1}, soit :

$$\begin{aligned} U_2(\mathbf{r}'_2) &= S_0\, t_1\, h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_1\,|\mathbf{r}'_2|) && \text{(B.54)}\\ &= S_0\, t_1\, h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_1\left|\frac{\mathbf{r}_2}{\gamma_2}\right|) && \text{(B.55)}\\ &= S_0\, t_1\, h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_2\,|\mathbf{r}_2|) && \text{(B.56)}\\ &= S_0\, t_1\, \frac{2J_1\left[\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_2\, r_2\right]}{\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_2\, r_2} && \text{(B.57)} \end{aligned}$$

L'intensité détectée s'écrit donc :

$$I_2(r_2) = |S_0\, t_1|^2 \left|\frac{2J_1\left[\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_2\, r_2\right]}{\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}'_2\, r_2}\right|^2 \qquad \text{(B.58)}$$

Dans une détection confocale, $I_2(r_2) = I_2(0) =$ cst. Par contre la distribution hors de l'origine ne varie plus en puissance 4 comme dans le cas d'un objet ponctuel, on retrouve une réponse identique au cas de la microscopie conventionnelle.

Source large et objet plan : distribution transverse de l'intensité détectée

Contrairement au cas précédent, la source est maintenant définie par sa distribution d'amplitude[5] $S(\mathbf{r}_0)$. Le champ dans le plan objet Π_1 s'écrit donc :

$$U_1(\mathbf{r}_1) = \int\int_{\Pi_0} h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)\, S(\mathbf{r}_0)\, d^2\mathbf{r}_0 \qquad \text{(B.59)}$$

Et celui dans le plan Π_2 s'écrit alors :

$$\begin{aligned} U_2(\mathbf{r}_2) &= \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, t_1(\mathbf{r}_1)\, U_1(\mathbf{r}_1)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.60)}\\ &= t_1 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, U_1(\mathbf{r}_1)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.61)}\\ &= t_1 \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1) \left[\int\int_{\Pi_0} h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)\, S(\mathbf{r}_0)\, d^2\mathbf{r}_0\right] d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.62)}\\ &= t_1 \int\int_{\Pi_0} S(\mathbf{r}_0) \left[\int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)\, d^2\mathbf{r}_1\right] d^2\mathbf{r}_0 && \text{(B.63)}\\ & && \text{(B.64)} \end{aligned}$$

[5] nous la considérerons également à symétrie cylindrique

Plus précisément la dernière équation s'écrit :

$$
\begin{aligned}
K(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_2) &= \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_1)\, h_{C_1}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_0)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.65)}\\
&= \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_2'\,|\mathbf{r}_2 + \gamma_2\,\mathbf{r}_1|) \cdot h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_1'\,|\mathbf{r}_1 + \gamma_1\,\mathbf{r}_0|)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.66)}\\
&= \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_2\,|\mathbf{R}_2 + \mathbf{r}_1|) \cdot h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_1'\,|\mathbf{r}_1 + \mathbf{R}_0|)\, d^2\mathbf{r}_1 && \text{(B.67)}\\
& && \text{(B.68)}
\end{aligned}
$$

où $\mathbf{R}_2 = \mathbf{r}_2/\gamma_2$ et $\mathbf{R}_0 = \gamma_1\,\mathbf{r}_0$. On peut donc écrire cette équation sous la forme d'une convolution :

$$
\begin{aligned}
K(\mathbf{R}_2 - \mathbf{R}_0) &= \int\int_{\Pi_1} h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_2\,|\mathbf{R}_2 - \mathbf{R}_0 + \mathbf{r}|) \cdot h_{C_1}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_2\,|\mathbf{r}|)\, d^2\mathbf{r} && \text{(B.69)}\\
&= h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_2\,|\mathbf{R}_2 - \mathbf{R}_0|) && \text{(B.70)}\\
&= h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_2\left|\frac{\mathbf{r}_2}{\gamma_2} - \gamma_1\,\mathbf{r}_0\right|) && \text{(B.71)}
\end{aligned}
$$

soit finalement :

$$
U_2(\mathbf{r}_2) = t_1 \int\int_{\Pi_0} S(\mathbf{r}_0)\, h_{C_2}(\frac{2\pi}{\lambda}\,\mathrm{ON}_2\left|\frac{\mathbf{r}_2}{\gamma_2} - \gamma_1\,\mathbf{r}_0\right|)\, d^2\mathbf{r}_0 \qquad \text{(B.72)}
$$

Le champ U_2 est donc la convolution d'une fonction décrivant la source avec la réponse impulsionnelle obtenue précédemment dans le cas où l'objet était plan et la source ponctuelle.

Annexe C

Conditions temporelles des pulses STED

Introduction

La description générale de la microscopie STED passe par la mise en équation de l'interaction des faisceaux optiques (de pompe et de STED) avec les molécules fluorescentes. Nous les modéliserons par un système de Jablonski simplifié à 4 niveaux. L'étude de l'interaction lumière-molécule se fera à l'aide des équations de population suivantes sans tenir compte des problèmes de répartition spatiale d'intensité. Ces équations s'écrivent sous la forme suivante[1] :

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = [N_4(t) - N_1(t)] \cdot k_P(t) + N_2(t)\, k_{vib} \tag{C.1}$$

$$\frac{dN_2(t)}{dt} = [N_3(t) - N_2(t)] \cdot k_S(t) - N_2(t)\, k_{vib} + [k_{fluo} + Q]\ N_3(t) \tag{C.2}$$

$$\frac{dN_3(t)}{dt} = [N_2(t) - N_3(t)] \cdot k_S(t) + N_4(t)\, k_{vib} - [k_{fluo} + Q]\ N_3(t) \tag{C.3}$$

$$\frac{dN_4(t)}{dt} = [N_1(t) - N_4(t)] \cdot k_P(t) - N_4(t)\, k_{vib} \tag{C.4}$$

où k_{vib} représente le taux de relaxation des niveaux 4 et 2 essentiellement dû à l'interaction des molécules avec leur environnement. k_{fluo} et Q représentent le taux d'émission spontanée et le taux de "quenching". Enfin $k_P(t)$ et $k_S(t)$ représentent les taux d'absorption et d'émission stimulée sous l'effet de faisceaux pompe ou STED.

Notre étude sera simplifiée en supposant que la forme des impulsions est rectangulaire et

[1] On suppose ici que les sections efficaces d'absorption et d'émission stimulée pour chaque transition sont égaux : $\sigma_P^{absorption} = \sigma_P^{emissionstim.}$ et $\sigma_S^{absorption} = \sigma_S^{emissionstim.}$

leur durée sera notée τ_P et τ_S. Nous pouvons de fait écrire :

$$k_P(t) = k_P = \sigma_P \frac{h_P}{\tau_P} \qquad \text{pour} \qquad 0 < t < \tau_P \tag{C.5}$$

$$k_S(t) = k_S = \sigma_S \frac{h_S}{\tau_P} \qquad \text{pour} \qquad 0 < t < \tau_S \tag{C.6}$$

où σ_P et σ_S sont les sections efficaces d'absorption et d'émission stimulée et où h_P et h_S représentent les densités de photons par unité de surface.

Effet du faisceau STED

Nous ne nous intéressons qu'à la capacité du faisceau STED à dépléter le niveau 3 des molécules. Il n'est pas utile d'étudier précisément comment ces molécules ont été excitées et il nous suffira donc de supposer qu'à l'instant initial la population du niveau 3 est égale à une valeur N_3^0. Cette simplification nous permet de nous concentrer sur les échanges qui ont lieu entre les niveaux 2 et 3 et qui sont modélisés via les équations suivantes[2] :

$$\frac{dN_2}{dt} = [N_3 - N_2] \cdot k_S - N_2\, k_{vib} + [k_{fluo} + Q]\ N_3 \tag{C.7}$$

$$\frac{dN_3}{dt} = [N_2 - N_3] \cdot k_S + N_4\, k_{vib} - [k_{fluo} + Q]\ N_3 \tag{C.8}$$

Leur résolution peut être faite à l'aide de la transformation de Laplace. On trouve alors que :

$$N_2(t) = N_3^0\, \frac{k_{fluo} + k_S}{2\Delta}\ \left[e^{p_+ t} - e^{p_- t}\right] \tag{C.9}$$

$$N_3(t) = \frac{N_3^0}{2}\ \left[\left[1 + \frac{k^*}{\Delta}\right] e^{p_+ t} + \left[1 - \frac{k^*}{\Delta}\right] e^{p_- t}\right] \tag{C.10}$$

où nous avons posé :

$$N_3(0) = N_3^0 \qquad \text{et} \qquad N_2(0) = 0 \tag{C.11}$$

$$k^* = (k_{vib} - k_{fluo})/2 \tag{C.12}$$

$$\Delta = \sqrt{k_S(k_{fluo} + k_S) + k^{*2}} \tag{C.13}$$

$$p_\pm = -k_S - \frac{k_{fluo} + k_{vib}}{2} \pm \Delta \tag{C.14}$$

[2]Pour alléger les écritures, la variable t a été omise

Cas limites

En étudiant ces équations on se rend compte que le niveau 3 sera efficacement dépeuplé si la condition suivante est vérifiée :

$$k_{vib} \gg k_S \gg k_{fluo} \tag{C.15}$$

Dans ce cas, en effectuant un développement limité sur les solutions (C.9) et (C.10) on trouve que :

$$\Delta \approx \frac{k_{vib} - k_{fluo}}{2} \tag{C.16}$$

$$p_+ \approx -k_S \tag{C.17}$$

$$p_- \approx -k_S - k_{vib} \tag{C.18}$$

$$1 + \frac{k^*}{\Delta} \approx 2 \tag{C.19}$$

$$1 - \frac{k^*}{\Delta} \approx 0 \tag{C.20}$$

et donc :

$$N_2(t) = N_3^0 \frac{k_S}{k_{vib}} e^{-k_S t} \tag{C.21}$$

$$N_3(t) = N_3^0 e^{-k_S t} \tag{C.22}$$

A la fin du pulse STED ($t = \tau_S$), on obtient :

$$\eta(\tau) = 1 - \frac{N_3(\tau)}{N_3^0} = 1 - e^{-\sigma_S h_S} \tag{C.23}$$

Un bon dépeuplement du troisième niveau sous l'action du pulse STED sera atteint si les deux conditions suivantes sont réalisées :

1. $k_{vib} \gg k_S \gg k_{fluo}$ soit encore $\tau_{vib} \ll \frac{\tau}{\sigma_S h_S} \ll \tau_{fluo}$
2. $\eta(\tau)$ proche de 1 soit encore $exp\,(-\sigma_S h_S) \ll 1$.

Annexe D

Génération numérique de continua

Présentation

L'objectif de cette annexe est de présenter les grandes étapes ainsi que les paramètres choisis pour simuler la génération de continua de lumière. Ceux-ci sont utilisés pour valider les ordres de grandeurs des mesures du Chapitre 1 (importance des fluctuations d'intensité, formes et durées des impulsions) et pour simuler l'effet STED avec des impulsions pompe et STED issues d'un continuum (Chapitre 3). L'algorithme de génération des continua nous a été aimablement fourni par John Dudley. Ces simulations sont basées sur la résolution des équations de Maxwell en milieu guidé. En faisant l'hypothèse que l'enveloppe des impulsions varie lentement au cours de la propagation, on peut montrer que l'équation de propagation de la lumière prend la forme de équation de Schrödinger non linéaire suivante [5] :

$$\begin{aligned} \frac{\partial A}{\partial z} &= -\frac{i}{2}\,\beta_2\,\frac{\partial^2 A}{\partial \tau^2} + \frac{1}{6}\,\beta_3\,\frac{\partial^3 A}{\partial \tau^3} + \frac{i}{24}\,\beta_4\,\frac{\partial^4 A}{\partial \tau^4} - \frac{\alpha}{2}\,A \\ &+ i\gamma\,|A|^2\,A - \frac{\gamma}{\omega_0}\,\frac{\partial(|A|^2\,A)}{\partial \tau} - i\gamma T_R A\frac{\partial(|A|^2)}{\partial \tau} \end{aligned} \tag{D.1}$$

Plus précisément, cette équation décrit l'évolution de l'enveloppe $A(z,\tau)$ d'une impulsion se propageant suivant l'axe z, étudiée dans un repère retardé se déplaçant à la vitesse de groupe de l'impulsion (on a donc $\tau = t - z/v_g$ où v_g est la vitesse de groupe). La pulsation moyenne de l'onde est prise égale à ω_0.

Les termes linéaires de l'équation représente la dispersion de vitesse de groupe du deuxième (β_2), troisième (β_3) et quatrième ordre (β_4) ainsi que l'atténuation correspondant aux pertes dans la fibre (α).

Le premier terme non linéaire est associé au phénomène d'automodulation de phase (cf.Chapitre 1) caractérisé par un coefficient non linéaire γ. Le deuxième terme non linéaire proportionnel à

γ/ω_0 décrit le fait que la vitesse de groupe dépend de l'intensité du champ optique (effets : *self-steepening* et *shock wave formation*). Le dernier terme non linéaire est lié à la diffusion Raman qui n'est pas instantanée et qui est caractérisée par la pente du gain Raman[1] T_R. Ce terme est à l'origine des phénomènes de glissement de fréquence (*self-frequency shift*).

La résolution de ce type d'équation se fait classiquement en utilisant la méthode dite de *split-step fourier* qui consiste à traiter les termes linéaires (notés D) de l'équation dans le domaine des pulsations et ceux non linéaires (notés N) dans le domaine temporel. Différentes variantes de cet algorithme existent. Elles diffèrent entre elles essentiellement par l'estimation et la réduction des erreurs numériques propres au schéma d'intégration choisi. Nous n'entrerons pas dans ces détails et ne donnons ci-après que l'idée maîtresse du calcul. Celle-ci consiste à réécrire l'équation ($E.2$) sous la forme :

$$\frac{\partial A(z,\tau)}{\partial z} = [D+N]\ A(z,\tau) \tag{D.2}$$

Cette équation s'intègre localement sous la forme :

$$\partial A(z+\Delta z,\tau) = e^{(D+N)\Delta z}\, A(z,\tau) \simeq e^{D\Delta z}\, e^{N\Delta z}\, A(z,\tau) \tag{D.3}$$

Pour des raisons pratiques (*i.e.* forme des termes D et N), on effectue ce calcul en écrivant :

$$\partial A(z+\Delta z,\tau) \simeq \mathcal{TF}^{-1}\left[e^{\widetilde{D}(z,\omega)\,\Delta z}\,\mathcal{TF}\left[e^{N(z,\tau)\,\Delta z}\,A(z,\tau)\right]\right] \tag{D.4}$$

où $\mathcal{TF}$ et $\mathcal{TF}^{-1}$ représentent les transformées de Fourier directe et inverse entre les espaces $\tau \leftrightarrow \omega$. Ces transformées de Fourier sont calculées par les algorithmes classiques de FFT. Techniquement, la fibre est divisée spatialement en $\mathcal{N}$ intervalles de longueur Δz tandis que l'intervalle de temps est fixé par les critères habituels de la FFT (taille de la fenêtre temporelle et nombre d'échantillons dans cette fenêtre). La résolution de la propagation d'une impulsion dans la fibre nécessite donc d'effectuer N fois l'intégration fournie par l'équation ($E.7$). Dans le cas de la génération du continuum, il est également nécessaire d'introduire l'existence de bruit, et ce à chaque pas d'intégration.

Paramètres utilisés

Dans notre cas nous avons fixé, après vérification de la convergence des résultats, les paramètres de génération aux valeurs suivantes pour les 1021 spectres calculés :

[1] Ce coefficient est relié au paramètre numérique f_R.

1. Paramètres de la fibre

	Symbole	Valeur
Longueur de fibre	L	10 cm
Nombre de pas	$\mathcal{N}$	15000
Zéro de dispersion	λ_{ZDW}	780 nm
Aire effective	A	2,4 μm^2
Paramètre Kerr	n_2	$2,6.10^{-20}\ m^2/W$
Coefficient non linéaire	γ	0,085 $W^{-1}m^{-1}$
Coefficient Raman	f_R	0,18

2. Paramètres de l'impulsion initiale

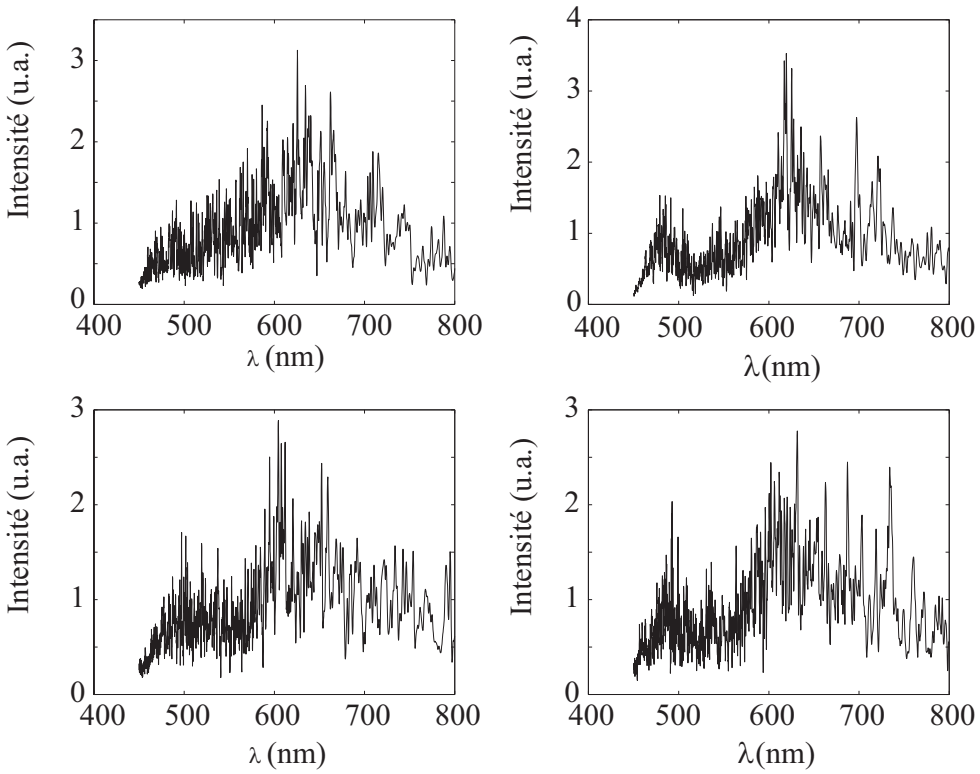
	Symbole	Valeur
Durée	τ_0	100 fs
Longueur d'onde moyenne	λ_0	800 nm
Energie	E	5 nJ

3. Paramètres des FFT

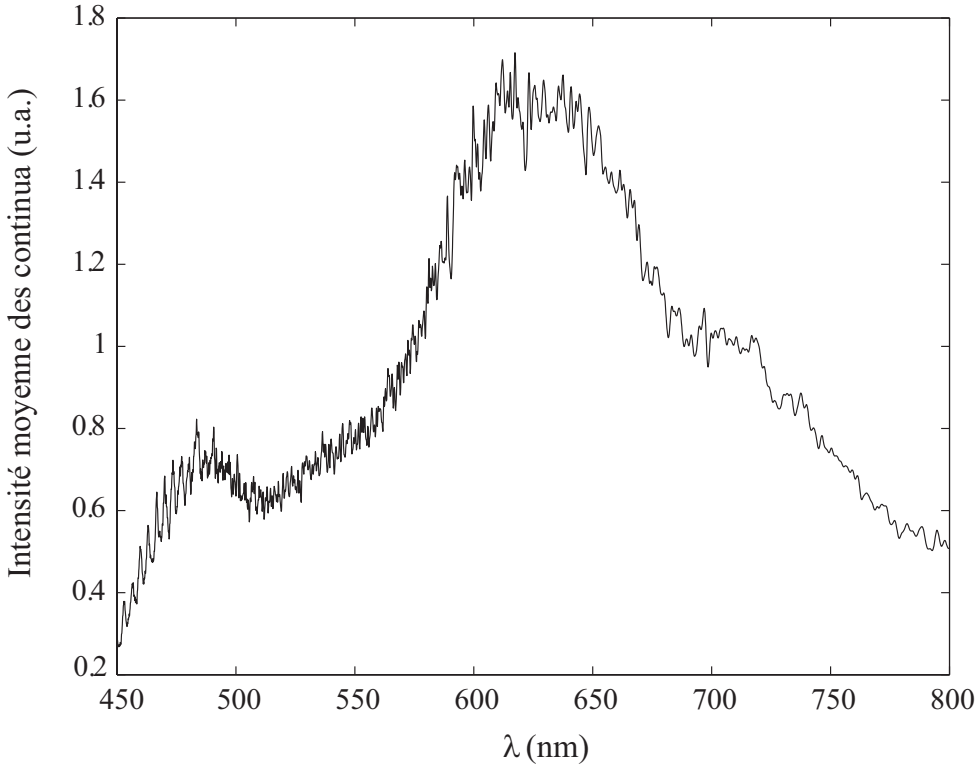
	Symbole	Valeur
Durée de la fenêtre	T	10 ps
Nombre de points	N_T	$2^{15} = 32768$
Spectre couvert	ω_{max}	$12,7.10^{15}\ rad/s$ *i.e.* 149 nm
Spectre couvert	ω_{min}	0 rad/s

Exemples de spectre

A titre d'indication, nous présentons ci-dessous quelques résultats de spectres issus des simulations ainsi que le spectre moyen obtenu :



(a) *Exemple de quatre spectres de continuum.*



(b) *Spectre moyen obtenu à partir des 1021 continuum simulés.*

FIG. 4.1 – *Exemple de spectres de continuum*

Annexe E

Modèle numérique de l'AOTF

Nous décrivons dans ses grandes lignes le modèle mathématique de l'AOTF que nous avons utilisé lors des simulations.

Structure étudiée et hypothèses de calcul

Le calcul ci-dessous est simplifié soit par des approximations concernant l'amplitude des signaux utilisés soit par l'utilisation d'une géométrie particulière, cette dernière ne correspondant pas à celle rencontrée habituellement dans les AOTF (milieux biréfingents). Ainsi, nous supposerons que la géométrie du problème est la suivante (cf. figure 4.1) : le milieu acoustique est borné suivant l'axe z (milieu compris entre $z = 0$ et $z = L$) et infini suivant les axes x et y. Il existe

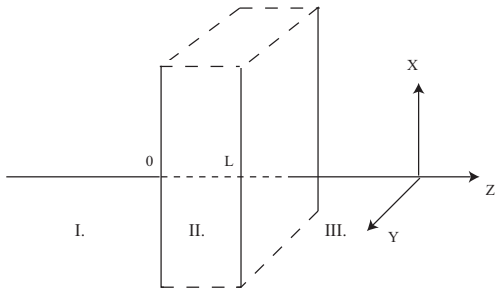


FIG. 4.1 – *Géométrie utilisée pour la description d'un AOTF. Le milieu acoustique est considéré infini selon les directions x et y, mais borné selon z.*

donc 3 espaces :

- espace I : $z < 0$, vide
- espace II : $0 \leq z \leq L$, matériau acousto-optique
- espace III : $z > L$, vide.

Les hypothèses faites dans le calcul sont les suivantes :

1. les champs optiques ont une polarisation transverse électrique (TE)
2. nous supposerons le réseau d'indice immobile (*i.e.* pas de décalage Doppler des champs diffractés)
3. la modulation sera traitée comme une perturbation (à l'ordre 1)

AOTF sans champ acoutisque

En l'absence de champ acoustique, l'AOTF est équivalent à une lame de matériau d'épaisseur L et de permittivité relative ε_r. Les modes propres du champ électromagnétique de cette géométrie sont constitués par des ondes planes dans les milieux I, II et III vérifiant des conditions aux limites (en $z = 0$ et $z = L$). Ces ondes planes sont définies par la donnée de trois vecteurs d'onde $\mathbf{k}^\alpha$ où $\alpha \in \{I, II, III\}$ reliés entre-eux par les conditions aux limites qui imposent que pour un mode propre, $k_x^I = k_x^{II} = k_x^{III} = k_x$ et $k_y^I = k_y^{II} = k_y^{III} = k_y$, avec bien sûr :

$$(\mathbf{k}^\alpha)^2 = (k_x^\alpha)^2 + \left(k_y^\alpha\right)^2 + (k_z^\alpha)^2 = (q_z^\alpha)^2 + (k_z^\alpha)^2 = \varepsilon_r^\alpha\, k_0^2 = \varepsilon_r^\alpha \left(\frac{2\pi}{\lambda_0}\right)^2 \tag{E.1}$$

Dans ces conditions, l'équation de propagation du champ s'écrit en l'absence de champ acoustique :

$$\left[\frac{\partial^2}{\partial z^2} + \varepsilon_r(z)\frac{\omega^2}{c^2}\right] |E_q\rangle = q^2\, |E_q\rangle \tag{E.2}$$

où :

$$\begin{aligned}
\varepsilon(z) &= 1 + \varepsilon_r\, [\Theta(z) - \Theta(z-L)] && \text{(E.3)}\\
q^2 &= k_x^2 + k_y^2 && \text{(E.4)}\\
|E_q\rangle = |E_q(x,y,z)\rangle &= \mathcal{E}_q(z)\, e^{i(k_x\, x + k_y\, y)} && \text{(E.5)}\\
&= \left[\mathcal{E}_q^+\, e^{ik_z^\alpha\, z} + \mathcal{E}_q^-\, e^{-ik_z^\alpha\, z}\right]\, e^{i(k_x\, x + k_y\, y)} && \text{(E.6)}
\end{aligned}$$

$\Theta(z)$ représente la distribution de Heaviside. q et $|E_q\rangle$ sont les valeurs propres et les vecteurs propres associés à la structure sans champ acoustique (il y a une infinité de modes propres et ils sont indicés par le paramètre q). Nous utilisons la notation bra-ket pour des raisons de facilité d'écriture. Comme nous l'avons déjà mentionné, ces modes propres sont des ondes planes vérifiant les conditions aux limites habituelles sur la lame représentant l'AOTF inactif, c'est-à-dire que la grandeur q est conservée lors du passage à travers les dioptres plans du système.

AOTF en présence d'une onde acoustique

Dans ce cas l'équation de propagation des champs électromagnétiques s'écrit :

$$\left[\frac{\partial^2}{\partial z^2} + (\varepsilon_r(z) + \Delta\varepsilon(x,z))\,\frac{\omega^2}{c^2}\right]|F_p\rangle = p^2\,|F_p\rangle \tag{E.7}$$

où :

$$\Delta\varepsilon(x,z) = \Delta\varepsilon\, f(z)\,\cos(Kx) \tag{E.8}$$

$f(z)$ décrit la localisation de l'énergie acoustique.

L'équation (E.7) traduit le fait que les champs $|E_q\rangle$ sont perturbés par la modulation de permittivité $\Delta\varepsilon$ (que nous considérerons petite). Nous chercherons donc quels peuvent être les transferts d'énergie d'un mode $|E_q\rangle$ vers un mode $|E_{q'}\rangle$ sous l'action de cette perturbation. Il nous faut donc évaluer des termes du type :

$$\begin{aligned}
\langle E_{q'}|\Delta\varepsilon(x,z)|E_q\rangle &= \int\int\int dx\,dy\,dz\,\mathcal{E}^*_{q'}(z)\,e^{-i(k'_x\,x+k'_y\,y)}\,\Delta\varepsilon(x,z)\,\mathcal{E}_q(z)\,e^{i(k_x\,x+k_y\,y)} \\
&= \int\int\int dx\,dy\,dz\,\mathcal{E}^*_{q'}(z)\mathcal{E}_q(z)\Delta\varepsilon\,f(z)\,\frac{e^{iKx}+e^{-iKx}}{2}\,e^{i(k_x-k'_x)\,x+i(k_y-k'_y)\,y} \\
&= \frac{\Delta\varepsilon}{2}\int dz\,\mathcal{E}^*_{q'}(z)\mathcal{E}_q(z)f(z)\int dy\,e^{i(k_y-k'_y)\,y}\int dx\,\left[e^{iKx}+e^{-iKx}\right]\,e^{i(k_x-k'_x)\,x} \\
&= \frac{\Delta\varepsilon}{2}\,f_{q,q'}\,\delta(k_y-k'_y)\,\left[\delta(k_x-k'_x+K)+\delta(k_x-k'_x-K)\right]
\end{aligned} \tag{E.9}$$

Cette dernière expression indique qu'il est possible de coupler de l'énergie d'un mode à un autre si :

$$k'_y = k_y \tag{E.10}$$

$$k'_x = k_x + K \qquad \text{ou} \qquad k'_x = k_x - K \tag{E.11}$$

Comme de plus nous avons :

$$k'^2_x + k'^2_y + k'^2_z = k^2_x + k^2_y + k^2_z \tag{E.12}$$

les seules solutions possibles sont alors :

- si $k_z > 0$ et $k_x > 0$ alors $k'_x = k_x - K = -k_x$ et $k'_z = \pm k_z$
- si $k_z > 0$ et $k_x < 0$ alors $k'_x = k_x + K = +k_x$ et $k'_z = \pm k_z$

L'onde incidente est donc réfléchie sur l'onde acoustique. Les équations portant sur les composantes x des vecteurs d'ondes ne font que traduire la loi de conservation de l'impulsion au cours de ce processus.

Le couplage, c'est-à-dire l'efficacité du transfert d'énergie entre un mode et l'autre, est géré par le facteur $\frac{\Delta\varepsilon}{2}\, f_{q,q'}$. Ce dernier terme s'écrit :

$$\begin{aligned} f_{q,q'} &= \int dz\, \mathcal{E}^*_{q'}(z)\mathcal{E}_q(z)f(z) && \text{(E.13)} \\ &= \int dz\, \left[\mathcal{E}^+_{q'}\, e^{ik'^{\alpha}_z} + \mathcal{E}^-_{q'} e^{-ik'^{\alpha}_z}\right]^* f(z)\, \left[\mathcal{E}^+_q\, e^{ik^{\alpha}_z} + \mathcal{E}^-_q e^{-ik^{\alpha}_z}\right] && \text{(E.14)} \\ &= \mathcal{E}^{+*}_{q'}\mathcal{E}^+_q \int dz\, f(z)\, e^{i(k^{\alpha}_z - k'^{\alpha}_z)} + \mathcal{E}^{+*}_{q'}\mathcal{E}^-_q \int dz\, f(z)\, e^{-i(k^{\alpha}_z + k'^{\alpha}_z)} \\ &+ \mathcal{E}^{-*}_{q'}\mathcal{E}^+_q \int dz\, f(z)\, e^{i(k^{\alpha}_z + k'^{\alpha}_z)} + \mathcal{E}^{-*}_{q'}\mathcal{E}^-_q \int dz\, f(z)\, e^{-i(k^{\alpha}_z - k'^{\alpha}_z)} && \text{(E.15)} \end{aligned}$$

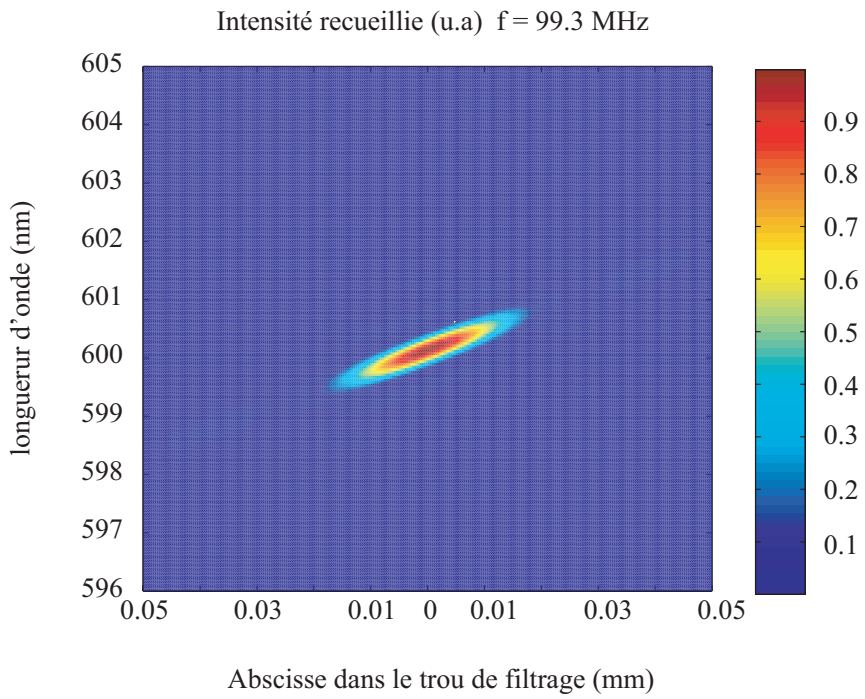
La fonction $f(z)$ étant définie sur un support borné, l'intégrale est à calculer sur l'intervalle $z \in \{0, L\}$. D'une manière générale ces intégrales représentent les transformées de Fourier de la fonction $f(z)$. Suivant le mode d'excitation de la structure, une de ces quatre intégrales a un argument d'exponentiel petit et donc une réponse importante. Si par exemple $f(z) = rect_L(z) = [\Theta(z) - \Theta(z - L)]$ et $k_z > 0$ et $k_x > 0$ alors la réponse sera de la forme :

$$f_{q,q'} \propto \int_0^L dz\, e^{-i(k^{\alpha}_z - k'^{\alpha}_z)} = \frac{L}{2}\, e^{i(k^{\alpha}_z - k'^{\alpha}_z)L/2} sinc((k^{\alpha}_z - k'^{\alpha}_z)L/2) \qquad \text{(E.16)}$$

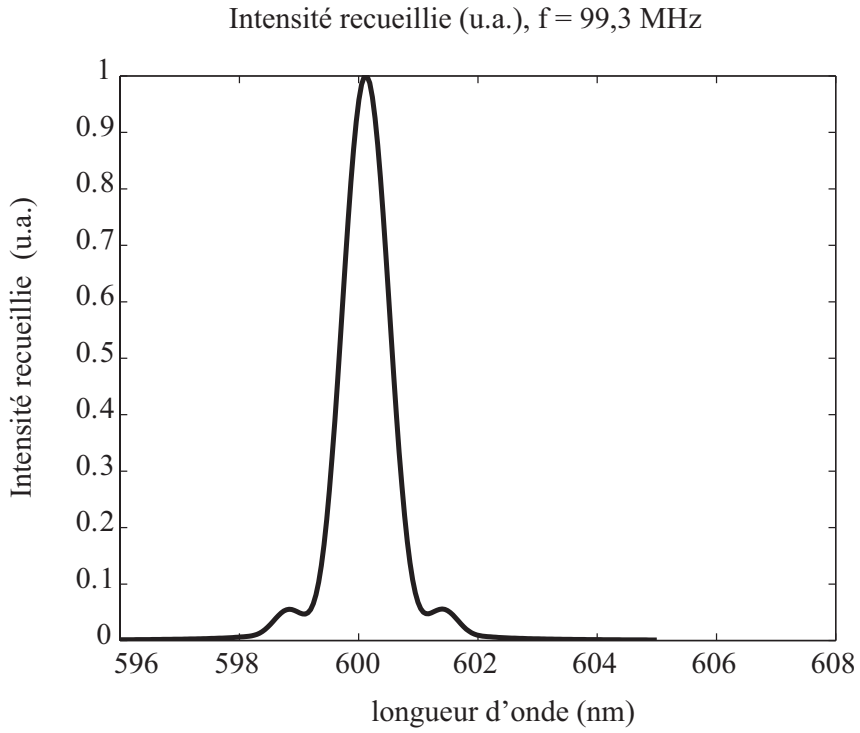
La réponse angulaire (cf. $k^{\alpha}_z - k'^{\alpha}_z$) de l'AOTF est donc un sinus cardinal d'autant plus fin que la largeur L du cristal est grande. C'est ce type de réponse que nous avons utilisé pour modéliser l'action de notre AOTF sur les champs optiques issus du continuum.

Exemple de sélection spectrale

A titre indicatif, nous présentons ci-dessous l'effet de la sélection spectrale de l'AOTF sur une source à spectre continu. La loi $\lambda_{selectionnee} = f(f_{acoustique})$ de sélection est celle obtenue grâce aux mesures.



(a) *Répartition de l'intensité sélectionnée dans le plan focal d'une lentille en fonction de la position et de la longueur d'onde*



(b) *Répartition spectrale de l'intensité sélectionnée après le trou d'épuration (∅ 100 μm) placé dans le plan focal d'une lentille.*

FIG. 4.2 – *Sélection spectrale par l'AOTF.*

Table des figures

1.1 *Comparaison de spectres de puissance pour un angle solide donné, pour une lampe à incandescence, un ensemble de LED, un continuum fibré et une lampe à arc [4].* . . . 12
1.2 *Schéma de principe d'une expérience de doublage de fréquence dans un cristal de longueur L. Les champs se propagent selon l'axe Oz* . . . 17
1.3 *Évolution d'une impulsion soumise à la SPM (a) : sans SPM, (b) : avec SPM.* . . . 19
1.4 *Interprétation schématique de la diffusion Raman spontanée. A : Stokes, B : Anti Stokes.* . . . 20
1.5 *Interprétation schématique de la diffusion Raman stimulée Stokes.* . . . 21
1.6 *Spectre de gain Raman dans une fibre en silice pure [5].* . . . 22
1.7 *Coupe schématique d'une fibre microstructurée et ses paramètres* d *et* Λ . . . 25
1.8 *Les deux étapes de la fabrication des fibres MF : préforme et étirage [4]* . . . 26
1.9 *Photographie d'un arrangement de capillaires en phase de préforme et d'étirage [4]* . . . 26
1.10 *Photographies de différents profils de fibres MF [4]. La distance entre deux trous est de l'ordre du micron sur l'ensemble de ces profils.* . . . 27
1.11 *Profil d'indice d'une fibre microsctructurée à coeur plein.* . . . 28
1.12 *Propagation d'une onde par réflexion totale interne dans le cœur d'une fibre* . . . 29
1.13 *Fréquence normalisée effective en fonction de la longueur d'onde, pour différentes géométries de fibres MF [27]* . . . 30
1.14 *Courbes de dispersion de fibres MF pour* Λ=$2,3$ μm *et différents diamètres de trous d (en* μm*) [27]* . . . 32
1.15 *Enregistrements en régime nanoseconde des spectres des continua obtenus en augmentant la puissance crête injectée [33]* . . . 34
1.16 *(a) Courbes d'accord de phase pour FWM, (b) Gain paramétrique calculé pour différentes longueurs d'onde de pompe [33]* . . . 35

1.17 *Courbe de dispersion d'une fibre MF : mise en évidence des deux régimes de dispersion ($D = -2\pi c\beta_2/\lambda^2$).* 36
1.18 *Apparition d'un effet soliton spatial : a) à faible intensité, la diffraction domine b) à très forte intensité, l'autofocalisation domine c) équilibre entre diffraction et autofocalisation.* 38
1.19 *Évolutions spectrale et temporelle calculées en fonction de la distance de propagation [45]* 39
1.20 *Évolutions spectrale et temporelle d'un soliton d'ordre N=3 [46]* 40
1.21 *Schéma du montage de la génération du continuum utilisé* 43
1.22 *Photographie du spectre du continuum de lumière, obtenue par diffraction sur un réseau de 600 traits/mm* 44
1.23 *Photographies en champ lointain de la distribution spatiale du continuum pour les trois bandes spectrales R, G, B* 44
1.24 *Principe du monochromateur acousto-optique. Un seul ordre de diffraction est représenté. Après le trou, l'intensité détectée présente un profil en sinus cardinal.* 46
1.25 *Spectre du continuum relevé par OSA avec une résolution de 5 nm, $\lambda_p = 800nm$.* 46
1.26 *Mesure du spectre de puissance du continuum en sortie du monochromateur, résolution spectrale $\leq$ 3 nm* 47
1.27 *Schéma du dispositif d'enregistrement des fluctuations de puissance* 49
1.28 *Exemple d'un enregistrement de l'amplitude des pulses issus du continuum, à $\lambda = 620\ nm$: la périodicité de 12,5 ns est celle du laser MaiTai.* 49
1.29 *Histogrammes fournissant la statistique de la puissance des pulses, ainsi que celle du bruit de détection à différentes longueurs d'onde* 50
1.30 *(a) Spectre des fluctuations de puissance du continuum (en %), (b) Spectre des fluctuations de puissance du continuum (en μW) et spectre de la puissance moyenne.* 52
1.31 *Schéma de principe de l'autocorrélation optique par génération du second harmonique non colinéaire ou colinéaire.* 53
1.32 *Schéma de principe de l'intercorrélation entre un pulse inconnu issu du continuum et un pulse référence issu du laser* 56
1.33 *Traces d'intercorrélation entre les impulsions du laser MaiTai et les impulsions de différentes longueurs d'onde issues du SC : formes temporelles moyennes des impulsions du SC* 58
1.34 *Durées des impulsions issues du supercontinuum (SC) en fonction de la longueur d'onde : résultats expérimentaux.* 59

1.35 *Répartition dans le temps des traces d'intercorrélation expérimentales entre les impulsions issues du SC et du laser Maitai ; et courbe théorique du retard imposé par la fibre MF et le cristal de l'AOTF. (a) vue 3D, (b) vue 2D.* 60

2.1 *Schéma de principe d'un microscope confocal de fluorescence : T_1, le volume de focalisation et T_2 sont conjugués.* 63
2.2 *Sections verticale et horizontale du volume d'illumination principal PSF_{ill} donné par l'objectif imageur [67]. Les dimensions de ce volume seront précisées dans le paragraphe 2.1.1.2.* 64
2.3 *Réponses impulsionnelles en microscopie conventionnelle et confocale.* 66
2.4 *Origine de l'expression de la réponse impulsionnelle en microscopie à balayage non confocale.* 68
2.5 *Origine de l'expression de la réponse impulsionnelle en microscopie confocale. Les PSF sont légèrement décalées axialement pour plus de clarté.* 68
2.6 *Influence de la taille du trou de détection sur la résolution axiale et latérale du microscope [69].* 69
2.7 *Schéma de l'alimentation et du fonctionnement d'un AOTF.* 71
2.8 *Schéma du montage utilisé pour réaliser une sélection spectrale parmi le continuum.* 72
2.9 *(a) Image CCD au foyer d'une lentille du profil spectral de l'ordre 1 du réseau acoustique illuminé par le continuum, avec $\lambda_{selection} = 600\ nm$, (b) Intercalage d'une densité et agrandissement, (c) Masque numérique équivalent à un diamètre de 100 μm placé sur l'ordre 1.* 72
2.10 *Sélection spectrale par monochromateur acousto-optique : correspondance fréquence RF du générateur-longueur d'onde sélectionnée.* 73
2.11 *(a) Réponse impulsionnelle du monochromateur à 755 nm (laser MaiTai en mode non verrouillé en phase) au cours d'un balayage en fréquence RF, (b) affichage en longueur d'onde.* 74
2.12 *(a) Réponses impulsionnelles du monochromateur calculées pour l'ensemble du spectre, (b) Résolution spectrale du monochromateur en fonction de la longueur d'onde sélectionnée.* 76
2.13 *Mesure du temps de montée de l'AOTF : réponse à un échelon de tension.* 77
2.14 *Schéma de principe du microscope confocal réalisé* 78
2.15 *Image en transmission d'une mire sur silicium placé sous l'éclairage Köhler et signal vidéo d'une ligne profil de cette image pour la calibration en μm d'une image caméra.* 80

2.16 *Image de la tache de focalisation donné par l'objectif imageur O_1 et profil obtenu par lecture du signal vidéo.* 81
2.17 *Mesure de la réponse axiale du microscope confocal équipé d'un objectif $\times 100$ à un objet plan : enregistrement du signal à $\lambda = 550\ nm$ réfléchi par un miroir plan en translation selon l'axe optique.* 83
2.18 *Spectres d'émission de la Rhodamine B (excitation à $543\ nm$) : publié dans la littérature (en pointillés) et expérimental (en trait plein) obtenu par balayage en fréquences de l'AOTF$_2$.* 84
2.19 *(a) Image confocale bidimensionnelle d'une mire silicium réflechissante de période $8\ \mu m$ ($\sim 20 \times 20\ \mu m^2$, pas de 230 nm, $\lambda = 550\ nm$, objectif $\times 100$) et (b) ligne profil de l'image.* 85
2.20 *Image au profilomètre optique d'un wafer de silicium présentant un relief de hauteur $20\ \mu m$).* 86
2.21 *Images confocales bidimensionnelles pour différentes altitudes Z d'une surface de silicium présentant un relief ($60 \times 75\ \mu m^2$, pas de 750 nm, $\lambda = 550\ nm$, objectif $\times 40$, ON=0,65 sans immersion). Intensité affichée en unités arbitraires.* . . 87
2.22 *Trois plans perpendiculaires issu du balayage tridimensionnel de billes sphériques fluorescentes, $\lambda_{exc} = 540\ nm$, $\lambda_{em} = 580\ nm$, objectif $\times 100$.* 89
2.23 *Image en transmission de la préparation des cellules HeLa utilisée.* 90
2.24 *Image confocale de cellules HeLa dont le noyau est marqué par du Iodure de propidium (560nm / 630nm) : observation à 630 nm, objectif $\times 100$.* 90
2.25 *Image confocale d'une cellule HeLa dont le noyau est marqué par du Iodure de propidium (560nm / 630nm) et les filaments d'actine par de la fluoresceine FITC (488nm /515nm), objectif $\times 100$.* 91
2.26 *Sections confocales d'un tapis cellulaire (derme) dont le noyau est marqué par du Iodure de propidium (560nm / 630nm) et les filaments d'actine par de la fluoresceine FITC (488nm /515nm), objectif $\times 100$.* 92

3.1 *Cartographie des différentes méthodes d'approche pour une microscopie de très haute résolution [76]. Notons cependant que, contrairement à ce que laisse supposer ce schéma, la technique de déconvolution s'applique désormais à tout type d'imagerie, dès que la PSF est définie.* 97
3.2 *Diagramme de Jablonski d'une molécule fluorescente soumise à une excitation STED.* 100
3.3 *Répartition spatiale des faisceaux d'excitation et STED.* 102

3.4 *Spectres d'émission et d'absorption d'une molécule fluorescente quelconque, positions des raies spectrales des pulses d'excitation et STED, et plage spectrale de détection de la fluorescence émise par l'échantillon.* 103
3.5 *Organigramme présentant les différentes étapes du traitement des impulsions de continuum simulées.* 105
3.6 *Spectre de puissance du continuum simulé (moyenne sur 1000 impulsions) et fluctuations associées (les barres d'erreurs ont pour hauteur 2σ).* 106
3.7 *Estimation numérique de la similarité des formes temporelles entre pulses du continuum filtrés à la même longueur d'onde : fonction d'intercorrélation en intensité normalisée.* 107
3.8 *Organigramme présentant les différentes étapes du calcul du coefficient d'efficacité η pour des impulsions STED issues du continuum.* 109
3.9 *Influence des fluctuations de forme temporelle et totales (temporelles et d'intensité) des pulses STED issus du continuum sur l'efficacité de dépletion η, pour différentes largeurs de pulses STED. La limite maximale de 40 ps est limitée uniquement par la taille des données numériques traitées.* 110
3.10 *Profils des distributions d'intensité utilisés dans les simulations numériques : (a) profil d'Airy du faisceau d'excitation avec un premier zéro à 350 nm, (b) profil Laguerre-Gaussien pour le faisceau STED.* 111
3.11 *(a) Coupe transverse du spot d'émission de fluorescence sans pulse STED. Le rayon de la tache d'Airy donnée par l'objectif est arbitrairement fixé à 350 nm, soit $\alpha_{85\%}^{exc} = 0,647$. (b) Coupe transverse du spot d'emission de fluorescence avec pulses STED (moyennage sur 100 pulses STED), $\alpha_{85\%}^{STED} = 0,259$. Paramètres : $< P_{exc} >= 0,5\ mW$, $< P_{STED} >= 10\ mW$.* 112
3.12 *(a) Profil de la distribution de fluorescence après excitation, (b) Profils des distributions de fluorescence après STED et pour des puissances moyennes de 1 à 10 mW (moyenne sur 100 pulses).* 113
3.13 *A. Coupe transverse du spot d'emission de fluorescence après passage d'un pulse STED. B. Profils des distributions de fluorescence (population N_3) relatif à l'effet STED du pulse le moins puissant (a), le plus puissant (c), et à l'effet STED moyen résultant de 100 pulses (b). Paramètres : $\alpha_{85\%}^{exc}$ =0,647, $< P_{exc} >= 0,5\ mW$ et $< P_{STED} >= 10\ mW$.* 115
3.14 *Rapport $\alpha_{85\%}^{STED}$ calculé pour chaque pulse STED (population de 100 pulses). Distributions pour des puissances moyennes de 1, 5 et 10 mW et une largeur spectrale $\Delta\lambda = 2\ nm$. Sont entourés en pointillés, les pulses permettant d'obtenir un spot de fluorescence 5 fois plus petit que r_0 (premier rayon du spot confocal).* 116

3.15 *Schéma du montage du microscope STED réalisé.* 117
3.16 *Spectres cannelés complémentaires obtenus à l'aide d'une lame biréfringente entre polariseur et analyseur croisés ou parallèles.* 119
3.17 *Schéma de l'étage de séparation des faisceaux et coefficient de transmission expérimental.* 121
3.18 *Interférences entre des faisceaux présentant un front d'onde plan et hélicoïdal, et transfert du motif sur un wafer de silicium par photolithographie (observation par objectif* $\times 20$*).* 123
3.19 *Image de profilométrie du réseau gravé sur silicium : vue tridimensionnelle et profil.* 124
3.20 *Coefficient de réflexion R du support de l'hologramme (wafer de silicium recouvert d'une couche de 300* nm *d'argent) sur la gamme du visible.* 125
3.21 *Rendement de diffraction dans l'ordre +1 de l'hologramme illuminé en son centre par des ondes planes de longueur d'onde variable (compensé du coefficient de réflexion* R*).* 126
3.22 *Image CCD en champ lointain de l'ordre 1 de diffraction de l'hologramme illuminé en son centre par un faisceau gaussien à* $\lambda = 550\,nm$*.* 127
3.23 *Notations géométriques utilisées pour la description d'un front d'onde sphérique.* 128
3.24 Répartition des composantes du champ de pompe ($n = 1,54$, $\lambda = 550\,nm$, $O.N. = 1,33$, $f = 1\,mm$) 129
3.25 Répartition des composantes du champ STED ($n = 1,54$, $\lambda = 550\,nm$, $O.N. = 1,33$, $f = 1\,mm$) 130
3.26 *Spectre d'émission et d'absorption du fluorophore choisi (phycobiliprotéines) ; spectre normalisé du continuum et position des bandes spectrales utilisées pour le faisceau d'excitation et les faisceaux STED.* 133

4.1 *Spectre d'absorption de l'hémoglobine (HbO$_2$) et de la déoxyhémoglobine (Hb) sur la gamme [200 ; 1000]* nm*.* 136
4.2 *Schématisation de la marche aléatoire monodimensionnelle. p est la probabilité de transition d'un centre diffusant au suivant.* 138
4.3 *Schématisation de la marche aléatoire CTRW bidimensionnelle : utilisation d'une anisotropie temporelle pour traduire une anisotropie spatiale.* 139
4.4 *Orientation des 3 axes de propagation dans le modèle CTRW et leur probabilité* p *associée.* 140
4.5 *Schéma du montage expérimental de spectroscopie de temps de vol* 141

4.6 *(a) Dispositif de mesure du spectre transmis par une densité D : placement des fibres, (b) images CCD correspondant aux spectres enregistrés par la streak camera sans et avec une densité D=3,3 , gain=10.* 142
4.7 *Vérification de la linéarité de la streak camera et CCD : enregistrement des rapports entre la puissance incidente et la puissance transmise par les densités optiques (pour chaque canal spectral) pour chaque gain de la streak camera.* . . 143
4.8 *Calibration en longueur d'onde des colonnes du capteur CCD de la Streak camera : superposition des traces de faisceaux de différentes longueurs d'onde délivrés par le laser MaïTaï.* 144
4.9 *Calibration en longueur d'onde des colonnes du capteur CCD de la Streak camera : points expérimentaux et ajustement linéaire.* 144
4.10 *Calibration temporelle des lignes du capteur CCD de la Streak camera : traces d'arrivée du continuum pour différentes distances d de propagation dans l'air entre la fibre d'émission et la fibre de collection.* 145
4.11 *Réponse impulsionnelle du montage optique complet de spectroscopie de temps de vol : illumination par le continuum, fibres d'illumination et de collection placées face à face.* 146
4.12 *Illustration de la relation entre la profondeur des tissus traversés et la distance d entre la zone d'illumination et la zone de collection des photons diffusés.* 147
4.13 *Vue longitudinale d'un biceps humain obtenue par échographie. ATT : peau (épiderme, derme et graisse hypodermique) ; M_1 : tête courte du biceps ; M_2 :brachialis ; H : humérus. La flèche indique la direction principale de l'orientation des fibres musculaires.* 148
4.14 *(a) Placement des fibres pour la mesure de la référence temporelle des spectres résolus en temps, (b) placement des fibres sur le biceps des volontaires lors des enregistrements.* 149
4.15 *(a) Exemples d'enregistrements des références temporelles, (b) spectres de temps de vol de la lumière diffusée dans le biceps dans le cas de 2 volontaires, dont les épaisseurs de tissu adipeux au niveau du biceps sont ATT =1,7 mm et 9,5 mm.* . 150
4.16 *(a) Profil temporel de la réponse impulsionnelle du montage à $\lambda = 700\ nm$ (b) Profil temporel à $\lambda = 700\ nm$ des impulsions diffusées dans le biceps (ATT =9,5 mm).* 151
4.17 *Paramètre B et probabilités de transition α, β, γ pour deux volontaires (ATT=1,5 et 7,5 mm) en fonction de la longueur d'onde.* 152

4.18 *(a) Paramètre d'anisotropie B en fonction de l'épaisseur de tissu adipeux (ATT) ; chaque point correspond à un sujet. (b) Paramètres α, β et γ en fonction de l'épaisseur de tissu adipeux (ATT).* 153
4.19 *(a) Paramètre d'absorption μ_a en fonction de la longueur d'onde ; (b) Paramètre de diffusion μ'_s en fonction de la longueur d'onde (Courbes en pointillés : paramètre augmenté ou diminué de l'écart-type).* 154
4.20 *(a) Placement des fibres sur la jambe du sujet lors des enregistrements ; (b) Exemples de spectres résolus en temps relevés pour un même sujet (longueur de tibia : 39,5 cm) pour différentes distances d : 5, 11, 19 et 27 mm ; (c) Coupe transversale schématique du tibia et placement des fibres dans le cas d'une collection transverse.* 156

4.1 *Exemple d'une trace d'autocorrélation des impulsions issues du MaiTai ($\lambda = 780\,nm$).* 164
4.2 *Exemple d'interpolation d'une trace d'autocorrélation ($\lambda = 780\,nm$).* 165

4.1 *Notations utilisées pour la description d'un microscope conventionnel ou confocal. L désigne la position des lentilles et n_i désigne les indices des milieux situés entre les lentilles et les plans Π_i* 167

4.1 *Exemple de spectres de continuum* 184

4.1 *Géométrie utilisée pour la description d'un AOTF. Le milieu acoustique est considéré infini selon les directions x et y, mais borné selon z.* 185
4.2 *Sélection spectrale par l'AOTF.* 189

Bibliographie

[1] J.P. Goedgebuer et al. A novel electro-optic technique suitable for modulating broad-band sources. *Journal of Optics*, **15,** p. 403–407, 1984.

[2] R.R. Alfano et S. L. Shapiro. Emission in the region 4000 to 7000 řa via four-photon coupling in glass. *Phys. Rev. Lett.*, **24,** p. 584–587, 1970.

[3] P. Milonni et J. Eberly. *Lasers*. Wiley Interscience Publications,John Wiley&Sons, New York, Chichester.

[4] http ://www.blazephotonics.com/. Technical report.

[5] G.P. Agrawal. *Nonlinear Fiber Optics*. Academic Press Inc., San Diego, 2001.

[6] B.P. Stoicheff. Characteristics of stimulated raman radiation generated by coherent light. **7,** p. 186–188.

[7] R.G. Brewer. Frequency shifts in self-focused light. *Physical Review Letters*, **19,** p. 8–10, 1967.

[8] F. Shimizu. Frequency broadening in liquids by a short light pulse. *Physical Review Letters*, **19,** p. 1097–1100, 1967.

[9] R.R. Alfano et S.L. Shapiro. Observation of self-phase modulation and small-scale filaments in crystals and glasses. *Phys. Rev. Lett.*, **24,** p. 592–594, 1970.

[10] W. Yu, R.R. Alfano, C.L. Sam et R.J. Seymour. Spectral broadening of picosecond 1.06 ţm pulse in kbr. *Opt. Commun.*, **14,** p. 344–347, 1975.

[11] W. Werneck, A. Lau, M. Pfeifer, K. Lenz, H.J. Weigmann et C.D. Thuy. Anomalous frequency broadening in water. *Opt. Commun.*, **4,** p. 413–415, 1972.

[12] R L. Fork, C.V. Shank, C. Hirlimann, R.Yen et W.J. Tomlinson. Femtosecond white-light continuum pulses. *Optics Letters*, **8,** p. 1–3, 1983.

[13] P.B. Corkum, C. Rolland et T. Srinivasan-Rao. Supercontinuum generation in gases. *Phys. Rev. Lett.*, **57,** p. 2268–2271, 1986.

[14] V. François, F.A. Ilkov et S.L. Chin. Experimental study of the supercontinuum spectral width evolution in co2 gas. *Opt. Commun.*, **99,** p. 241–246, 1993.

[15] C. Lin et R. Stolen. New nanosecond continuum for excited-state spectroscopy. *Appl.Phys. Lett.*, **28,** p. 216–218, 1976.

[16] P.L. Baldeck et R.R. Alfano. Intensity effects on the stimulated four photon spectra generated by picosecond pulses in optical fibers. *J. Lightwave Technol.*, **LT-5,** p. 1712–1715, 1987.

[17] T. Morioka, K. Mori et M. Saruwatari. More than 100-wavelength-channel picosecond optical pulse generation from single laser source using supercontinuum in optical fiber. *Electron. Lett.*, **29,** p. 862–864, 1993.

[18] I. Ilev, H. Kumagai, K. Toyoda et I. Koprinkov. Highly effcient wideband continuum generation in a single mode optical fiber by powerful broadband laser pumping. *Appl.Opt.*, **15,** p. 2548–2553, 1996.

[19] P.K. Wai, C.R. Menyuk, Y.C. Lee et H.H. Chen. Nonlinear pulse propagation in the neighborhood of the zero-dispersion wavelength of monomode optical fibers. *Optics Letters*, **11,** p. 464–466, 1986.

[20] J.P. Gordon. Theory of the soliton self frequency shift. *Optics Letters*, **11,** p. 662–664, 1986.

[21] F.M. Mitschke et L.F. Mollenauer. Discovery of the soliton self-frequency shift. *Optics Letters*, **11,** p. 659–661, 1986.

[22] P.V. Kaiser et H.W. Astle. **53,** p. 1021–1039, 1974.

[23] J.C. Knight, T.A. Birks, P.St.J. Russell et D.M. Atkin. All-silica single-mode optical fiber with photonic crystal cladding. *Optics Letters*, **21,** p. 1547–1549, 1996.

[24] N. Venkataraman, M.T. Gallagher, C.M. Smith et J.C. Fajardo. Low loss(13db/km) air core photonic band-gap fibre. *ECOC'2002, Copenhagen, Denmark*, Post deadline paper PD1.1, 2002.

[25] T. A. Birks, J. C. Knight et P. St. J. Russel. Endlessly single-mode photonic crystal fiber. *Optics Letters*, **22,** p. 961–963, 1997.

[26] T.A. Birks, D. Mogilevtsev, J.C. Knight, P.St.J. Russell, J.Broeng, P.J. Roberts, J.A. West, D.C. Allan et J.C.Fajardo. The analogy between photonic crystal fibres and step index fibres. *Optical Fiber Communication Conference, OSA Technical Digest Series*, 1999.

[27] A. Bjarklev, J. Broeng et A.S. Bjarklev. *Photonic Crystal Fibres*. Kluwer Academic Publishers, 2003.

[28] D. Mogilevtsev, T.A. Birks et P.St.J. Russell. Group-velocity dispersion in photonic crystal fibers. *Optics Letters 23, 1662Ű1664.*, **23,** p. 1662–1664, 1998.

[29] N.G. Broderick, T.M. Monro, P.J. Bennett et D.J. Richardson. Nonlinearity in holey optical fibers : measurement and future opportunities. *Optics Letters*, **24,** p. 1395–1397, 1999.

[30] J. K. Ranka, R. S. Windeler et A. J. Stentz. Visible continuum generation in air-silica microstructure optical fibers with anomalous dispersion at 800 nm. *Optics Letters*, **25,** p. 25–27, 2000.

[31] W.J. Wadsworth, J. C. Knight, A. Ortigiosa-Blanch, J. Arriaga, E. Silvestre et P. St.J. Russell. Soliton effects in photonic crystal fibres at 850 nm. *Electron. Lett.*, **36,** p. 53–55, 2000.

[32] A. Avdokhin, S. Popov et J. Taylor. Continuouswave, high-power, in raman continuum generation holey fibers. *Optics Letters*, **28,** p. 1353–1355, 2003.

[33] J. M. Dudley, L. Provino, N. Grossard, H. Maillotte, S. Coen, R. S. Windeler et B. J.Eggleton. Supercontinuum generation in air-silica microstructured fibers with nanosecond and femtosecond pulse pumping. *J. Opt. Soc. Am. B*, **19,** p. 765–771, 2002.

[34] S. Coen, H. L. Chau, R. Leonhardt, J. D. Harvey, J. C. Knight, W. J. Wadsworth et P. St. J. Russell. Supercontinuum generation by stimulated raman scattering and parametric four-wave mixing in photonic crystal fibers. *J. Opt. Soc. Am. B*, **19,** p. 753–764, 2002.

[35] A. Hasegawa et F.Tappert. Transmission of stationary nonlinear optical pulses in dispersive dielectric fibers. i. anomalous dispersion. *Applied Physics Letters*, **23,** p. 142–144, 1973.

[36] L.F. Mollenauer, R H. Stolen et J.P. Gordon. Experimental observation of picosecond pulse narrowing and solitons in optical fibers. *Physical Review Letters*, **45,** p. 1095–1098, 1980.

[37] A. Husakou et J. Hermann. Supercontinuum generation of higher-order solitons by fission in photonic crystal fibers. *Phys. Rev. Lett.*, 87, 2001.

[38] M. Nakazawa, K. Suzuki, H. Kubota et H. A. Haus. High-order solitons and the modulational instability. *Physical Review A*, **39,** p. 5768–5776, 1989.

[39] E.A. Golovchenko, P.V. Mamyshev, A.N.Pilipetskii et E. M. Dianov. Numerical analysis of the raman spectrum evolution and soliton pulse generation in single-mode fibers. *Journal of the Optical Society of America B*, **8,** p. 1626–1632, 1991.

[40] A.L. Gaeta. Nonlinear propagation and continuum generation in microstructured optical fibers. *Optics Letters*, **27,** p. 924–926, 2002.

[41] K.L. Corwin, N.R. Newbury, J.M. Dudley, S. Coen, S.A. Diddams, K. Weber et R. Windeler. Fundamental noise limitations to supercontinuum generation in microstructure fiber. *Physical Review Letters*, **90,** p. 113904, 2003.

[42] X. Gu, M. Kimmel, A. Shreenath, R. Trebino, J. Dudley, S. Coen et R. Windeler. Experimental studies of the coherence of microstructure-fiber supercontinuum. *Optics Express*, **11,** p. 2697–2703, 2003.

[43] G. Genty, M.Lehtonen, H. Ludvigsen, J. Broeng et M. Kaivola. Spectral broadening of femtosecond pulses into continuum radiation in microstructured fibers. *Optics Express*, **10,** p. 1083–1098, 2002.

[44] B.R. Washburn, S.E. Ralph et R. Windeler. Ultrashort pulse propagation in air-silica microstructure fiber. *Optics Express*, **10,** p. 575–580, 2002.

[45] J.M. Dudley et al. Cross-correlation frequency resolved optical gating analysis of broadband continuum generation in photonic crystal fiber : simulations and experiments. *Optics Express*, **10,** p. 1215–1221, 2002.

[46] J.M. Dudley, G. Genty et S. Coen. Supercontinuum in photonic crystal fiber. *Review of Modern Physics*, soumis, 2006.

[47] J.N. Kutz, C. Lyng et B.J. Eggleton. Enhanced supercontinuum generation through dispersionmanagement. *Optics Express*, **13,** p. 3989–3998, 2005.

[48] Y. Kodama et A. Hasegawa. Nonlinear pulse propagation in monomode dielectric guide. *IEEE J.Quantum Electron.*, **23,** p. 510–524, 1987.

[49] Th. Udem, J. Reichert et T.W. Hansch. Accurate measurement of large optical frequency differences with a mode-locked laser. *Optics Letters*, **24,** p. 881–883, 1999.

[50] K. Sala et al. Autocorrelation measurements of picosecond laser pulses. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **16,** p. 990–997, 1980.

[51] D.J.Kane et R.Trebino. Characterization of arbitrary femtosecond pulses using frequency-resolved optical gating. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **29,** p. 571–579, 1993.

[52] C. Iaconis. Spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction of ultrashort optical pulses. *Optics Letters*, **23,** p. 792–794, 1998.

[53] L.Gallmann et al. Characterization of sub-6-fs optical pulses with spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction. *Optics Letters*, **24,** p. 1314–1316, 1999.

[54] S. Imamura et al. Double photon emission from alkali antinmonides. *Physical Review*, **166,** p. 322–324, 1968.

[55] W.R. Bennett, D.B. Carlin et G.J. Collins. Picosecond time-interval measurement and intensity correlations using the two-quantum photoelectric effect. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, pages 97–99, 1974.

[56] Y.Takagi, T. Kobayashi et K. Yoshihara. Multiple- and single-shot autocorrelator based on two-photon conductivity in semiconductors. *Optics Express*, **17,** p. 658–670, 1992.

[57] F.R. Laughton et al. The two-photon absorption semiconductor waveguide autocorrelator. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **30,** p. 838–845, 1994.

[58] J. K. Ranka et A. L. Gaeta. Autocorrelation measurement of 6-fs pulses based on the two-photon-induced photocurrent in a gaasp photodiode. *Optics Letters*, **22,** p. 1344–1346, 1997.

[59] D. T. Reid, M. Padgett, C. McGowan, W. E. Sleat et W. Sibbett. Light-emitting diodes as measurement devices for femtosecond laser pulses. *Optics Letters*, **22,** p. 233–235, 1997.

[60] T.Nagahara, K.Imura et H.Okamoto. Time-resolved scanning near-field optical microscopy with supercontinuum light pulses generated in microstructure fiber. *Review of Scientific Instruments*, **74,** p. 45284533, 2004.

[61] M. Minsky. *Microscopy apparatus*. US Patent 3013467, 1957.

[62] M.Terasaky et M.E.Dailey. *Confocal microscopy of living cells, in the Handbook of biological confocal microscopy, Chap 19, 327-346*. J.B. Pawley, 1995.

[63] W. Denk, J.H. Strickler et W.W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248,** p. 73–76, 1990.

[64] J.M. Girkin et A.I. Ferguson. Confocal microscopy using an ingan violet laser diode at 406nm. *Optics Express*, **7,** p. 336–341, 2000.

[65] N.L. Sivers et al. Improving fluorescence confocal microscopy with cryogenically-cooled diode lasers. *Optics Express*, **12,** p. 4157–4165, 2004.

[66] www.leica microsystems.com/ConfocalMicroscopes. Technical report.

[67] *Confocal Laser Scanning Microscopy (Tutorial Zeiss)*.

[68] T. Wilson. *Confocal Microscopy*. Academic Press, 1990.

[69] T. Wilson et A. R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Optics Letters*, **12,** p. 227–229, 1987.

[70] A. Korpel. *Acousto-optics*.

[71] G. McConnell. Confocal laser scanning fluorescence microscopy with a visible continuum source. *Optics Express*, **12,** p. 2844–2850, 2004.

[72] S.W. Hell et J. Wichman. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, **19,** p. 780–783, 1994.

[73] V. Westphall, L. Kastrup et S.W. Hell. Lateral resolution of 28 nm (lambda/25) in far-field fluorescence microscopy. *App.Phys.B Lasers and Optics*, 2003.

[74] V. Westphal, C.M. Blanca, M. Dyba, L. Kastrup et S.W Hell. Laser-diode-stimulated emission depletion microscopy. *Applied Physics Letters*, **82,** p. 3125–3127, 2003.

[75] M. Dyba et S.W. Hell. Focal spots of size l/23 open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Physics Review Letters*, **88,** p. 163901, 2002.

[76] Y. Garini, B.J. Vermolen et I.T.Young. From micro to nano : recent advances in high resolution microscopy. *Current Opinion in Biology*, **16,** p. 3–12, 2005.

[77] L. Reimer. *Scanning electron microscopy*. Springer Series in Optical Sciences, 1985.

[78] D.W. Pohl et D. Courjon. *Near Field Optics*. Dordrecht, 1993.

[79] B. Bailey, D.L. Farkas, D. Taylor et F. Lanni. Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation. *Nature*, **366,** p. 44–48, 1993.

[80] S.W. Hell et E.H.K. Stelzer. Fundamental improvement of resolution with a 4-pi confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Optics Communications*, **93,** p. 277–282, 1992.

[81] M.G. Gustafsson, D.A. Agard et J.W. Sedat. Sevenfold improvement of axial resolution in 3d widefield microscopy using two objective lenses. *Proceeding SPIE*, **2412,** p. 147–156, 1995.

[82] M.G. Gustafsson, D.A. Agard et J.W. Sedat. I5m : 3d widefield light microscopy with better than 100nm axial resolution. *Journal of Microscopy*, **195,** p. 10–16, 1999.

[83] J.T. Frohn, H.F Knapp et A. Stemmer. Three-dimensionnal resolution enhancement in fluorescenec microscopy by harmonic excitation. *Optics Letters*, **26,** p. 828–830, 2001.

[84] D.A. Dombeck, M. Balchard-Desce et W.W. Webb. Optical recording of action potentials with second-harmonic generation microscopy. *Journal of Neurosciences*, **24,** p. 999–1003, 2004.

[85] N. Dudovitch, D. Oron et Y. Silberg. Single-pulse coherently controlled non linear raman spectroscopy and microscopy. *Nature*, **418,** p. 512–514, 2002.

[86] M. Born et E. Wolf. *Principles of Optics*. Pergamon Press, 1987.

[87] M. Endo. Numerical simulation of an optical resonator for generation of a doughnut-like laser beam. *Optics Express*, **12,** p. 1959–1965, 2004.

[88] J. Leach et M.J. Padgett. Observation of chromatic effects near a white-light vortex. *New Journal of Physics*, **5,** p. 154.1–154.7, 2003.

[89] J. Arlt, R. Kuhn et K. Dholakia. Spatial transformation of laguerre-gaussian laser modes. *Journal of Modern Optics*, **48,** p. 783–787, 2001.

[90] T.A. Klar, E. Engel et S. Hell. Breaking abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes. *Physical Review E.*, 64, 2001.

[91] M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs et S. W. Hell. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102,** p. 17656–17569, 2005.

[92] D.T. Delpy et M. Cope. Quantification in tissue near-infrared spectroscopy. *Phil.Trans.R.Soc.Lond. B*, **352,** p. 649–659, 1997.

[93] G. Zaccanti et al. Optical properties of biological tissues. *Proceeding SPIE*, 2389.

[94] R. Giust, C. Courvoisier, T. Binzoni T.S. Leung et David T. Delpy. Blood volume and haemoglobin oxygen content changes in human bone marrow during orthostatic stress. *Journal of Physiological Antropology*, **25,** p. 1–6, 2006.

[95] T. Binzoni et al. Non-standard o 2 consumption-temperature curves during rest and isometric exercise in human skeletal muscle. *Comp.Biochem.Physiol.A Mol.Integr.Physiol.*, **132,** p. 27–32, 2002.

[96] W.F. Cheong, S.A. Prahl et A.J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **26,** p. 2166–2185, 1990.

[97] S.R. Arridge, M. Cope et D.T. Delpy. The theoretical basis for the determination of optical pathlength in tissue : temporal and frequency analysis. *Physics in Medicine and Biology*, **37,** p. 1531–1560, 1992.

[98] F. Martelli, A. Sassaroli, Y. Yamada et G. Zaccanti. Analytical approximate solutions of the time-domain diffusion equation in layered slabs. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.*, **19,** p. 71–80, 2002.

[99] O.K. Dudko, G.H. Weiss, V. Chernomordik et A.H. Gandjbakhche. Photon migration in turbid media with anisotropic optical properties. *Physics in Medicine and Biology*, **49,** p. 3979–3989, 2004.

[100] C. Abrahamsson, T. Svensson, S. Svanberg, S. Andersson-Engels, J. Johansson et S. Folestad. Time and wavelength resolved spectroscopy of turbid media using light continuum generated in a crystal fiber. *Optics Express*, **12,** p. 4103–4112, 2004.

[101] A. Bassi, J. Swartling, C. D'Andrea, A. Pifferi, A. Torricelli et R. Cubeddu. Time-resolved spectrophotometer for turbid media based on supercontinuum generation in a photonic crystal fiber. *Optics letters*, **29,** p. 2405–2407, 2004.

[102] J. Swartling et al. Dynamic time-resolved diffuse spectroscopy based on supercontinuum light pulses. *Appl.Optics*, **44,** p. 4684–4692, 2002.

[103] R.F. Boner et al. Model for photon migration in turbid biological media. *J.Opt.Soc.Am. A*, **4,** p. 423–432, 1987.

[104] M.S. Patterson, B. Chance et B.C. Wilson. Time-resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissu optical properties. *Applied Optics*, **28,** p. 2331–2336, 1989.

[105] S. Chandrasekhar, J.L. Doob et S.O. Rice. *Selected papers on noise and stochastic processes*. Dover publications, Inc., 1954.

[106] G.H. Weiss. Aspects and applications of the random walk. *(Amsterdam : North-Holland)*, 1994.

[107] J.C. Hebden, J.J. Guerrero, V. Chernomordik et A.H. Gandjbakhche. Experimental evaluation of an anisotropic scattering model of a slab geometry. *Optics Letters*, **29,** p. 2518–2520, 2004.

[108] J.R.Zijp et J.J. Bosch. Optical properties of bovine muscle tissue in vitro ; a comparison of methods. *Physics in Medecine and Biology*, **43,** p. 3065–3081, 1998.

[109] R. Marchesini. Comments on the paper optical properties of bovine muscle tissue in vitro ; a comparison of methods. *Physics in Medecine and Biology*, **44,** p. 7–8, 1999.

[110] S. Nickell, M. Hermann, M. Essenpreis, T.J. Farrell, U. Kramer et M.S. Patterson. Anisotropy of light propagation in human skin. *Physics in Medecine and Biology*, **45,** p. 2873–2886, 2000.

[111] A. Kienle, F.K. Forster, R. Diebolder et R. Hibst. Light propagation in dentin : influence of microstructure on anisotropy. *Physics in Medecine and Biology*, **48,** p. 7–14, 2003.

[112] F. Bevilacqua, A.J. Berger, A.E. Cerussi, D. Jakubowski et B.J.Tromberg and. Broadband absorption spectroscopy in turbid media by combined frequency-domain and steady-state methods. *Applied Optics*, **39,** p. 6498, 2000.

[113] C. Courvoisier, R. Giust, T. Binzoni et al. Anisotropic photon migration in human skeletal muscle. *Physics in Medicine and Biology*, **51,** p. 19–89, 2006.

RÉSUMÉ

La génération de continuum de lumière fibré a débuté dès les années 2000. Ce nouveau type de source conjugue de multiples avantages dont une grande gamme spectrale, une haute brillance, un caractère pulsé.
L'objectif de cette thèse est de caractériser spectralement, temporellement et en puissance un continuum généré en régime femtoseconde et d'envisager son utilisation comme source optique dans des instrumentations dédiées au domaine biomédical.
Muni de filtres acousto-optiques, le continuum a été employé avec succès comme source accordable pour la microscopie de fluorescence. Des images confocales d'échantillons biologiques marquées par différents fluorophores ont été réalisées.
Nous avons de plus étudié et validé l'emploi du continuum dans un montage de microscopie STED afin de mettre en place un outil d'imagerie ultra-résolvant et versatile spectralement.
Une sonde optique a été finalement élaborée pour réaliser des expériences de spectroscopie de temps de vol infra-rouge sur des milieux diffusants *in vivo*, tels que les muscles, l'os, la moelle osseuse... Ce type d'outil nous a permis d'obtenir des paramètres physiologiques relevant du métabolisme énergétique de ces tissus.

MOTS-CLÉS

Continuum de lumière, Intercorrélation, Microscopie de fluorescence, Confocal, STED, Spectroscopie de temps de vol.

ABSTRACT

For few years, a new type of source, called "continuum of light", has been developed. It presents many advantages like a wideband spectrum, a huge brilliancy, a pulsed nature.
The aim of this work is to perform a complete characterization of a continuum generated by the injection of femtosecond pulses into a microstructured fiber, and to consider the use of this continuum as optical source for biomedical applications.
With acousto-optic filters, the continuum has been successfully employed as tunable source for fluorescence microscopy. Confocal images of biological samples, which were marked by several fluorophores, were recorded.
Moreover, we studied and checked the use of the continuum in a STED microscopy set-up, allowing the acquisition of ultra-resolved images with a spectral versatility.
A third application is an optical probe, developed to realize time of flight infra-red spectroscopy on in vivo turbid media, like muscle, bone, marrow of bone... This type of instrument allowed the retrieval of physiological parameters characteristic of the energetic metabolism of those tissues.

KEY-WORDS

Continuum of light, Intercorrelation, Fluorescence microscopy, Confocal, STED, Time-of-light spectroscopy