



HAL
open science

Microscopie par diffusion cohérente RamanCARS: Application à l'imagerie des milieux biologiques

Nadia Djaker

► **To cite this version:**

Nadia Djaker. Microscopie par diffusion cohérente RamanCARS: Application à l'imagerie des milieux biologiques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de droit, d'économie et des sciences - Aix-Marseille III, 2006. Français. NNT: . tel-00121943

HAL Id: tel-00121943

<https://theses.hal.science/tel-00121943>

Submitted on 22 Dec 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.

Université Paul Cézanne Aix-Marseille III

2006AIX30038

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL CEZANNE
Faculté des Sciences et Techniques

par

Nadia DJAKER-OUJDHARA

Sujet :

**Microscopie par diffusion cohérente Raman
CARS :**

**Application à l'imagerie des milieux
biologiques**

Spécialité : Optique électromagnétique et image
École Doctorale : Physique et Sciences de la Matière

Soutenue le 20 octobre 2006 devant la Commission d'examen :

M. Didier MARGUET	Président
M. Christophe HADJUR	Examinateur
M. Pierre-François LENNE	Examinateur
M. Jean-Claude VIAL	Rapporteur
M. Marie-Claire SCHANNE-KLEIN	Rapporteur
M. Hervé RIGNEAULT	Directeur de thèse

Université Paul Cézanne Aix-Marseille III

2006AIX30038

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL CEZANNE
Faculté des Sciences et Techniques

par

Nadia DJAKER-OUJDHARA

Sujet :

**Microscopie par diffusion cohérente Raman
CARS :**

**Application à l'imagerie des milieux
biologiques**

Spécialité : Optique électromagnétique et image
École Doctorale : Physique et Sciences de la Matière

Soutenue le 20 octobre 2006 devant la Commission d'examen :

M. Didier MARGUET	Président
M. Christophe HADJUR	Examinateur
M. Pierre-François LENNE	Examinateur
M. Jean-Claude VIAL	Rapporteur
M. Marie-Claire SCHANNE-KLEIN	Rapporteur
M. Hervé RIGNEAULT	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail, financé par une Allocation de Recherche ACI attribuée par le ministère de l'éducation nationale, a été réalisé au sein de l'Institut Fresnel¹ (UMR CNRS 6133), dont je remercie ici tous les membres et notamment le Directeur Claude AMRA, pour leur accueil.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait l'ensemble des membres du jury en de lire et de juger ce travail : Messieurs D. Marguet, C. Hadjur et P-F. Lenne, et en particulier Monsieur J-C. Vial et Madame M-C. Schanne-Klein pour avoir accepté d'en être les rapporteurs.

Ce travail ne serait rien sans mon directeur de thèse, Hervé RIGNEAULT, grâce à ses immenses qualités scientifiques, sa qualité d'écoute, son enthousiasme, sa patience sans fin... et tant d'autres qualités ! Je te remercie d'avoir été si disponible pendant ces trois années et d'avoir guidé ce travail avec tant de dynamisme. J'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés, que ce soit intellectuellement ou humainement, mille fois merci !

Un grand merci à Pierre-François Lenne, en qui j'ai pu compter à chaque instant de cette thèse, merci pour ton soutien, ton aide et tes encouragements. Didier Marguet de m'avoir initié efficacement à la biologie cellulaire. Un grand merci pour ta patience, ta rigueur et tes explications toujours très claires et adaptées à une simple opticienne !

Je remercie chaleureusement Eileen Gallery de l'institut Kolling à l'université de Sydney (Australie) pour sa collaboration. Elle a su non seulement enrichir mes connaissances scientifiques, mais aussi apporter son soutien et ses encouragements lors des derniers mois de cette thèse. Merci Eileen pour ton amitié, ta rigueur et ta sincérité. J'ai beaucoup appris en travaillant à tes cotés.

Je tiens à remercier Anne Colonna et Christophe Hadjur du groupe L'Oréal-Recherche (Paris), pour les divers échantillons qu'ils nous ont fourni. Merci Anne pour les spectres Raman, pour tes encouragements et ta disponibilité.

¹D.U. St-Jérôme 13397 Marseille cedex 20

Je n'oublierai pas les aides permanentes reçues du personnel administratif : Josiane, Laure et Corinne, afin de me faciliter les différentes tâches. Merci à Jean-Pierre de l'atelier de mécanique, pour ta disponibilité et ta bonne humeur. Un grand merci à Frédérique Forestier sur qui j'ai pu compter pour tous mes problèmes d'informatique.

Une pensée toute particulière pour David Gachet, Laure Wawrezynieck et Nicolas Sandeau, que je dois à la fois remercier pour leur amitié mais aussi pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons eus. Leur apport a été essentiel à des nombreux plans et j'ai pu ainsi partager au quotidien mes doutes, mes réussites, mes problèmes divers et variés.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance au groupe des thésards/postdocs de l'institut Fresnel qui a été une grande famille pour moi : Martina, Jérémie, Mickaël, Franck, Federico, Matteo,....Grand merci.

Un grand merci à Jérôme Wenger pour ses conseils, son aide, et de m'avoir permis de réaliser mes spectres Raman. Je n'oublierai pas Serge Monneret d'avoir accepté de lire et de relire mon manuscrit. Merci pour ton aide, ta patience et ta grande gentillesse.

A mes parents, mes frères et soeur : Rafik, Amine, Karim et Magda. Je dois ici leur rendre hommage pour leur écoute et la confiance qu'ils m'ont toujours accordées. Ils m'ont soutenue jusqu'au bout, et c'est grâce à eux et à l'amour qu'ils m'ont donné que j'ai pu arriver au bout de mon rêve. Merci encore mille fois...

A ma belle famille : mama Zahia, Toufik, Faiza, Halim (merci pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eu!), Djamel, Nabil (je n'oublierai jamais tes interventions dans les moments durs!) et à mes deux soeurs et amies de coeur Zoulikha et Baya.

Je voudrais dédier ce travail à mon mari Fodil, l'amour de ma vie, pour m'avoir soutenu pendant ces trois années de thèse. Merci mon amour pour ta grande patience, tes encouragements et ton immense affection. A toi mon âme soeur sans qui rien n'aurait de sens...

Table des matières

Introduction	1
I <i>État de l'art</i>	5
1 La microscopie optique en biologie	7
1.1 Introduction	7
1.2 La microscopie à fluorescence	8
1.2.1 Principe	8
1.2.2 Techniques basées sur la fluorescence	11
1.3 La microscopie non linéaire	18
1.3.1 La microscopie par génération de seconde harmonique (SHG)	18
1.3.2 La microscopie par génération de troisième harmonique (THG)	22
1.4 La microscopie Raman	24
1.4.1 La diffusion Raman	24
1.4.2 L'imagerie Raman	25
1.5 Conclusion	27
II <i>La microscopie CARS</i>	29
2 Microscopie CARS	31
2.1 Introduction	31
2.2 Microscopie CARS : principe et configurations	32
2.3 Génération CARS : éléments de théorie	37
2.4 Imagerie CARS : état de l'art	47
2.5 Développements récents	52
2.6 Conclusion	55

III	<i>Mise en place du système expérimental</i>	57
3	Sources lasers	59
3.1	Introduction	59
3.2	Le laser saphir dopé titane	60
3.2.1	Blocage des modes : Effet Kerr	63
3.2.2	Contrôle de la durée des impulsions : Interféromètre Gires-Tournois	65
3.3	Synchronisation des cavités laser	66
3.4	Division de fréquence	68
3.5	Contrôle de la synchronisation	70
3.5.1	Synchronisation par autocorrélation optique	71
3.5.2	Synchronisation par absorption à deux photons	75
3.6	Conclusion	77
4	Dispositif expérimental	79
4.1	Introduction	79
4.2	Le montage expérimental	80
4.3	La caractérisation des signaux CARS	84
4.4	F-CARS et E-CARS	88
4.5	Effets réfractifs en imagerie CARS	91
4.6	Conclusion	93
IV	<i>Applications en imagerie des systèmes biologiques</i>	95
5	Imagerie CARS	97
5.1	Introduction	97
5.2	Imagerie des systèmes modèles	98
5.2.1	Préparation des vésicules géantes	99
5.2.2	Imagerie CARS des vésicules géantes	103
5.2.3	Etude de la sensibilité de l'imagerie CARS	105
5.3	Imagerie des systèmes biologiques	108
5.3.1	Imagerie cellulaire	108
5.3.2	Imagerie des tissus	112
5.4	Conclusion	127
	Conclusion	129

Table des figures

1.1	Diagramme de Jablonski	9
1.2	Emission de la fluorescence sous excitation par un ou deux photons	10
1.3	Le principe du montage confocal	12
1.4	Cellules <i>HeLa</i> par microscopie de fluorescence (un photons) . .	12
1.5	Cellules <i>RBL</i> par microscopie de fluorescence (deux photons) .	14
1.6	Image FLIM d'une partie de la membrane d'une cellule <i>hépatocyte</i> vivante	15
1.7	Diagramme simplifié du phénomène de FRET	16
1.8	Principe de la microscopie FCS	18
1.9	Processus de génération du signal SHG comparé à la fluorescence	19
1.10	cellules en culture imagées par microscopie SHG et microscopie biphotonique	20
1.11	cellules nerveuses imagées par microscopie SHG et microscopie biphotonique	21
1.12	Images THG de cellules végétales <i>Cystolithes</i>	23
1.13	Images TPEF-THG d' <i>embryons de Drosophiles</i>	23
1.14	Schéma de la diffusion Rayleigh, Raman Stokes et Anti-Stokes.	26
1.15	Image Raman d'une Cellule tumorale <i>MD-435</i>	27
2.1	Diagramme d'énergie (Processus CARS)	33
2.2	Schéma des différentes techniques basées sur le principe du microscope CARS en configuration colinéaire	35
2.3	Dépendance de l'intensité du signal CARS en fonction de l'intensité de l'excitation.	41
2.4	Processus CARS	44
2.5	Susceptibilité de troisième ordre en fonction de la fréquence d'excitation	46
2.6	Intensité CARS en fonction de la fréquence d'excitation. . . .	47
2.7	Images E-CARS, F-CARS et DIC de cellules <i>NIH 3T3</i>	48

2.8	Images E-CARS de la peau d'oreille de souris à différentes profondeurs	49
2.9	Spectres Raman et CARS des liaisons CH ₂ et CD ₂	51
2.10	Principe du microscope Multiplex-CARS (M-CARS)	53
2.11	Images de cellules vivantes <i>NIH 3T3</i> en CARS avec détection hétérodyne	55
3.1	Courbes d'absorption et d'émission du cristal saphir dopé au titane.	61
3.2	Schéma de l'oscillateur laser picoseconde à saphir dopé au titane.	62
3.3	Illustration du phénomène d'autofocalisation par effet Kerr et sélection par une fente du régime impulsionnel.	63
3.4	Courbes de puissances optiques à la sortie des lasers (Sa-Ti).	64
3.5	Représentation schématique d'un interféromètre Gires-Tournois.	65
3.6	Configuration électronique du système de synchronisation.	67
3.7	Schéma du principe de fonctionnement du diviseur de fréquence.	69
3.8	Schéma de principe de l'autocorrélation optique.	72
3.9	Schéma de principe de la corrélation croisée dans un semi-conducteur.	76
3.10	les courbes d'absorption à deux photons en fonction de la puissance laser.	77
4.1	Schéma du dispositif de Microscopie CARS.	81
4.2	Le microscope CARS.	82
4.3	Efficacité quantique de la photodiode à avalanche.	83
4.4	Schéma représentant le système de comptage de photons via le programme Labview.	84
4.5	Enregistrement de la corrélation du signal CARS.	85
4.6	Image CARS de billes en Polystyrène ($C = C$) de 5 μm de diamètre.	86
4.7	Image CARS d'une bille en Polystyrène ($C=C$) de 100 nm de diamètre.	87
4.8	Spectres CARS de différents milieux.	88
4.9	Emission avant et arrière CARS en fonction de la longueur d'interaction.	90
4.10	Courbes de profil CARS d'une bille de polystyrène.	92
5.1	Modèle moléculaire des molécules de phospholipides (DOPC et DMPC(D54)).	100
5.2	La cellule d'électroformation.	102
5.3	Variation de la tension au cours de l'électroformation.	102

5.4	Images F-CARS d'une vésicule unilamellaire géante (GUV) . .	104
5.5	sensibilité de la microscopie CARS à la polarisation électrique.	104
5.6	Intensité du signal F-CARS en fonction de la concentration des liaisons chimiques.	106
5.7	Modèle moléculaire et spectre CARS des molécules de Choles- téról(D5).	107
5.8	Cellules COS-7 par microscopie à contraste interférentiel dif- férentiel (DIC).	108
5.9	Images CARS de cellules vivantes (<i>COS-7</i>).	110
5.10	Images DIC de cellules COS-7 marquées au (DMPC-D54). . .	111
5.11	Images F-CARS de cellules COS-7 marquées au DMPC(D54).	111
5.12	Coupe transversale de la peau.	114
5.13	Images E-CARS de la peau (souris) à différentes profondeurs.	116
5.14	Signal E-CARS en fonction de la profondeur de pénétration dans une couche de stratum cornéum.	117
5.15	Images E-CARS d'une pastille de "stratum corneum" artificiel à différentes profondeurs.	118
5.16	Spectre Raman du cheveu.	119
5.17	Images E-CARS du cheveu (Kératine).	120
5.18	Schéma du lit placentaire dans le cas normal et anormal. . . .	122
5.19	Images du tissu placentaire par microscopie de transmission et par microscopie CARS.	124
5.20	Images du tissu placentaire par microscopie de transmission et par microscopie CARS.	125
5.21	Images du tissu placentaire observé par microscopie de trans- mission et par microscopie CARS.	126

Introduction

En 1931, Maria Goppert-Mayer, Suédoise et Prix Nobel de physique, démontre que si un photon ne possède pas l'énergie suffisante pour produire une excitation électronique, l'arrivée d'un second photon de même énergie dans un laps de temps très court peut conduire à cette excitation. Ce phénomène est connu aujourd'hui sous le nom d'*absorption multi-photonique* [1]. Ce n'est qu'en 1961, grâce au laser, qu'un processus non-linéaire a pu être mis en évidence par le groupe de Franken (Harrison Randall Laboratory of Physics de l'Université de Michigan) [2] qui a généré, à travers un cristal de quartz, la seconde harmonique à 347,2 nm d'un laser pulsé à rubis d'une longueur d'onde de 694,3 nm. Le développement de spectroscopies non linéaires s'est produit à la fin des années 1980 grâce à Y. R. Shen [3] qui, en 1987, a démontré expérimentalement la spectroscopie par génération de fréquence-somme (SFG) simplement résonnante. Il s'agit en fait d'une spectroscopie vibrationnelle améliorée, qui peut être utilisée complémentaiement aux spectroscopies classiques infrarouge et Raman, à la fois pour des études ex-situ ou in-situ de films organiques sur isolants et conducteurs [4–6]. Aujourd'hui, les processus non-linéaires en optique sont à la base de très nombreuses applications, dans différents domaines, allant des télécommunications jusqu'à la microscopie.

En microscopie, l'optique non-linéaire est utilisée particulièrement pour l'imagerie en biologie [7], notamment grâce à l'apport de nouveaux mécanismes de contraste (SHG, THG, CARS, etc...), mais aussi d'une meilleure résolution spatiale dans certains modes d'utilisation. Ainsi, la microscopie multi-photonique est aujourd'hui une des techniques largement utilisées pour la visualisation des structures morphologiques des cellules et des tissus, à l'échelle du micron et même en dessous. Ces dernières années, l'effort s'est porté sur le développement de techniques permettant une imagerie tridimensionnelle avec une grande résolution spatiale, une bonne sensibilité, ainsi qu'une grande sélectivité chimique.

En particulier, la microscopie de fluorescence avec détection confo-

cale [8], ou excitation multi-photonique [9, 10] s'est avérée une puissante technique pour la recherche en biologie [11, 12]. La sélectivité chimique provient du marquage avec des particules fluorescentes (fluorophores) naturelles ou artificielles [13, 14], excitables par absorption à un ou deux photons. Ces sondes, parfois toxiques pour les systèmes biologiques *vivants* et sujettes à la photo-destruction, sont souvent de grandes tailles par rapport aux molécules auxquelles elles sont attachées et peuvent perturber les fonctions cellulaires étudiées. Pour les espèces chimiques ou les composantes biologiques qui ne fluorescent pas ou qui ne tolèrent pas la toxicité et la photo-destruction associée à ces fluorophores [15], on préfère utiliser des techniques d'imagerie sans marquage. La microscopie non-linéaire par génération de second harmonique en est un exemple. Elle est spécifique aux ordres moléculaires non-centrosymétriques, et est utilisée pour distinguer des arrangements ordonnés de molécules au niveau tissulaire [16, 17].

Les microscopies et spectroscopies par absorption infrarouge [18] et par diffusion Raman [19] utilisent les propriétés vibrationnelles intrinsèques des molécules dans les systèmes biologiques pour générer un mécanisme de contraste dans l'image. Ces techniques sont utilisées dans le domaine de l'imagerie des tissus, mais sont souvent limitées. L'absorption infrarouge souffre de sa faible résolution spatiale, à cause des grandes longueurs d'ondes utilisées, ainsi que de l'absorption de la plupart des solvants. A contrario, la microscopie par diffusion Raman spontanée utilisant des lasers dans le visible et le proche infrarouge contourne ces problèmes. Cette technique de diffusion inélastique est cependant peu sensible (faible section efficace de diffusion Raman) et reste difficile à utiliser au niveau subcellulaire. Elle est surtout utilisée dans la détection d'amas cancéreux [20]. L'utilisation de lasers de grandes puissances (plusieurs dizaines de milliwatts) est nécessaire pour obtenir un bon contraste, mais génère une autofluorescence endogène souvent gênante.

Comme d'autres techniques de microscopie utilisant des processus optiques cohérents, la diffusion cohérente Raman anti-Stokes (CARS) a été combinée à la microscopie optique, par Duncan et al [21, 22] en 1982, puis développée avec des sources solides infrarouges par Zumbusch et al en 1999 [23]. Ce type de microscopie a une bonne sensibilité (10^6 meilleure que la diffusion Raman) et une résolution spatiale limitée par la diffraction. CARS utilise une diffusion Raman stimulée qui lui permet d'avoir une sensibilité spectrale limitée par celles des lasers utilisés. De plus l'utilisation des lasers infrarouges pour l'excitation augmente la profondeur de pénétration dans les milieux diffusants (comme les tissus biologiques), tout en évitant les problèmes de photo-

destruction liés à la présence des fluorophores. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont également bien séparées puisque l'émission CARS se fait à une plus grande fréquence. A cause de ces nombreux avantages, la microscopie CARS a été exploitée dans différentes applications telles : l'imagerie cellulaire [23–25], la caractérisation des protéines [24, 26–28], ainsi que l'imagerie in vivo dans des tissus [29, 30].

Ce travail de thèse consiste en l'étude et à la réalisation d'un microscope CARS dédié à l'imagerie des systèmes biologiques². Le manuscrit est composé de quatre parties décrivant chronologiquement le déroulement de cette thèse (mise en oeuvre, caractérisation, puis applications). La première partie est un état de l'art sur les différentes techniques de microscopie et de spectroscopie optiques utilisées dans le domaine de l'étude des systèmes biologiques. Les performances, les avantages ainsi que les inconvénients de chaque technique sont exposés. La seconde partie est consacrée à la microscopie CARS. On y décrit le principe ainsi que la théorie de la génération de l'onde cohérente, pour finir avec un état de l'art sur les dernières avancées de cette technique récente de microscopie. Les deux dernières parties présentent le coeur du travail de cette thèse qui a consisté à construire et à caractériser un microscope CARS. La troisième partie propose tout d'abord un descriptif du montage expérimental et la caractérisation spatiale ainsi que spectrale de notre système expérimental sur des objets modèles. Enfin la dernière partie est consacrée aux applications en imagerie CARS, que ce soit dans l'imagerie des systèmes modèles comme les vésicules géantes, ou dans le cadre de l'imagerie de cellules vivantes et de tissus complexes.

²premier montage de microscopie CARS réalisé en France à l'Institut Fresnel dans le cadre de cette thèse (cinquième mondialement).

Première partie

État de l'art

Chapitre 1

Techniques de microscopie optique pour l'étude des systèmes biologiques

Sommaire

1.1	Introduction	7
1.2	La microscopie à fluorescence	8
1.2.1	Principe	8
1.2.2	Techniques basées sur la fluorescence	11
1.3	La microscopie non linéaire	18
1.3.1	La microscopie par génération de seconde harmonique (SHG)	18
1.3.2	La microscopie par génération de troisième harmonique (THG)	22
1.4	La microscopie Raman	24
1.4.1	La diffusion Raman	24
1.4.2	L'imagerie Raman	25
1.5	Conclusion	27

1.1 Introduction

En 1668, la biologie cellulaire était née avec l'invention du premier microscope optique par Antonie van Leeuwenhoek, qui observe tout d'abord le poivre pour vérifier s'il porte des aiguilles minuscules pour produire son effet

sur la langue. Cela l'amène à une découverte accidentelle, des petits animaux connus aujourd'hui sous le nom de protozoaires, et il décrit de façon précise les globules rouges. A la fin du XVIIe siècle, Hooke améliore encore le dispositif en introduisant un oculaire : c'est le microscope composé. Depuis, la microscopie optique est devenue un outil indispensable pour les observations des systèmes biologiques. Cette association de la biologie et de l'optique sera à l'origine de très nombreuses découvertes scientifiques, au cours des siècles qui suivirent.

En 1957, Marvin Minsky propose un microscope confocal dans lequel l'utilisation astucieuse d'un diaphragme permet d'imager un point particulier de l'échantillon, permettant ainsi des coupes virtuelles d'un objet tridimensionnel par un balayage point par point. L'utilisation conjointe de cette technique et de marqueurs fluorescents permet d'accéder à une observation 3D in situ en ciblant très spécifiquement l'objet biologique d'intérêt (organites cellulaires, suivi de macromolécules, etc...). Progressivement le domaine d'utilisation du microscope s'étend. De la cellule on passe aux tissus vivants puis à l'organe, du morphologique on évolue vers le fonctionnel. Ces dernières années les techniques de microscopie optique, basées sur différents mécanismes de contraste (fluorescence, diffusion Raman, etc...), furent exploitées dans le domaine de la biologie et se sont considérablement développées en raison de nouvelles technologies optiques. Parmi celles-ci, les avancées dans le domaine des lasers ont permis de dépasser le stade de la réponse linéaire des échantillons pour exploiter des effets non-linéaires susceptibles d'amener de nouvelles informations aux biologistes.

Dans ce chapitre, nous allons citer quelques applications, dans le domaine de la biologie, des différentes techniques de microscopie optique utilisées ces dernières années, en décrivant pour chacune d'elles : le mécanisme de génération du contraste, ses avantages ainsi que ses inconvénients.

1.2 La microscopie à fluorescence

1.2.1 Principe

Une des techniques les plus couramment utilisées dans l'étude des systèmes biologiques est sans doute la microscopie de fluorescence. Il s'agit dans ce cas d'associer une molécule fluorescente appelée *fluorophore* aux biomolécules d'intérêt. Généralement, ce fluorophore est excité par une source optique, et se désexcite en émettant un rayonnement appelé *fluorescence*.

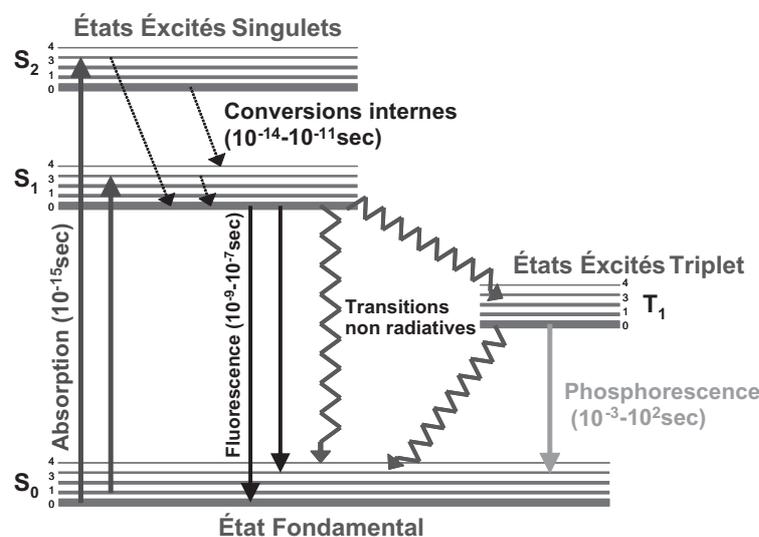


FIG. 1.1 – Diagramme de Jablonski représentant les niveaux énergétiques d'un fluorophore (S_0 , S_1 , S_2 , T_1). Chacun de ces états d'énergie se répartit en plusieurs états vibrationnels (0, 1, 2, ...).

Les caractéristiques de cette fluorescence dépendent de la nature des états d'énergie de la molécule fluorescente.

Le diagramme de Jablonski (voir FIG. 1.1) illustre les processus d'excitation et d'émission du fluorophore [31]. L'excitation optique s'effectue par l'absorption d'un photon d'énergie suffisante (longueur d'onde allant du visible à l'UV) pour faire passer la molécule de l'état fondamental S_0 à l'état excité singulet S_1 ou S_2 , dont la durée de vie est d'environ de 10^{-9} à 10^{-7} seconde. Deux cas sont possibles pour le retour de la molécule de l'état excité singulet S_1 vers l'état fondamental S_0 .¹ Le premier est l'émission de photons de fluorescence, le deuxième est une transition non radiative liée à la présence de l'état triplet ou à l'environnement de la molécule.

L'utilisation des sources d'excitation monophotonique (absorption à un photon) entraîne un problème majeur en microscopie de fluorescence, qui est la dégradation rapide des échantillons biologiques, en raison des forts co-

¹la probabilité de passage de l'état excité singulet S_1 vers l'état triplet T_1 est beaucoup plus faible que la désexcitation radiative de S_1 vers S_0 . Le passage de la molécule vers cet état triplet T_1 se fait via une transition non radiative, alors que le retour vers l'état fondamental S_0 se fait par l'émission d'un photon de phosphorescence, ou par transition non radiative.

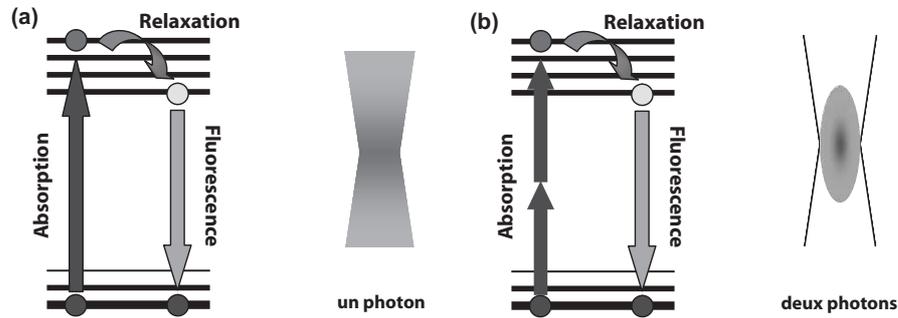


FIG. 1.2 – Emission de la fluorescence sous excitation à (a) un ou (b) deux photons.

efficents d'absorption des entités biologiques dans le domaine du visible et de l'ultraviolet. La photo-dégradation a lieu sur tout le trajet du faisceau exciteur, même en dehors de la zone d'étude. D'autres inconvénients se rajoutent au précédent tels la faible profondeur de pénétration dans les tissus biologiques ($<50\mu\text{m}$), la fluorescence *parasite* émise hors du plan de focalisation, ainsi que les pertes du signal de fluorescence lors de l'utilisation d'un miroir dichroïque (dus à la proximité des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés).

La microscopie de fluorescence par excitation biphotonique (absorption à deux photons ou TPFE²) résout la majorité de ces problèmes. Apparue en 1990 [9], elle consiste en l'utilisation de lasers impulsifs infrarouges comme sources d'excitation à deux photons. L'émission de fluorescence n'a lieu qu'au point où la densité de photons est la plus élevée, c'est à dire, au voisinage du point focal de l'objectif de microscope. Ce point est illustré sur la FIG. 1.2 : si l'excitation est linéaire (absorption à un photon), la fluorescence est excitée sur la totalité du trajet du faisceau alors que dans le cas de l'excitation à deux photons, la fluorescence est localisée au point focal. Il suffit alors de collecter à chaque instant la totalité de la fluorescence émergeant de l'échantillon pour avoir accès au signal généré même si le milieu étudié est diffusant.

²Two-Photon Fluorescence Excitation (TPFE)

1.2.2 Techniques basées sur la fluorescence

Il existe différents types de fluorophores (Bodipy, Fluorescéine, Rhodamine 6G, etc...) dont les spectres d'absorption et d'émission sont bien adaptés aux moyens technologiques actuels d'excitation (lampes, lasers, etc...) et de détection (filtres, miroirs dichroïques, etc...). L'utilisation de ces fluorophores dans le cas de l'étude des systèmes biologiques est très courante, et tire son avantage du fait que ces molécules fluorescentes sont faciles à manipuler, à introduire dans les systèmes biologiques et ont une grande efficacité quantique. Ces avantages ouvrent la porte à plusieurs applications qui se différencient par la manière d'analyser le signal de fluorescence, dans le temps et l'espace. Nous évoquerons ici les techniques les plus utilisées pour l'étude des systèmes biologiques.

Microscopie confocale de fluorescence

En 1957, Minsky [32, 33] propose le principe du microscope confocal, mais ce n'est qu'en 1980, avec le développement des sources laser et l'instrumentation électronique et informatique que l'utilisation expérimentale de ce type de microscope devient importante. Il permet l'observation des structures microscopiques dans des échantillons biologiques transparents épais tels que des cultures cellulaires ou des tranches de tissus [34]. Cette technique consiste à mettre un trou de filtrage avant le détecteur dans le plan focal image de l'objectif du microscope (voir la FIG. 1.3); ce trou permet d'obtenir une bonne résolution tridimensionnelle, qui permet l'imagerie détaillée d'échantillons biologiques avec peu de bruit de fond³.

La microscopie confocale de fluorescence est couramment utilisée par les biologistes en raison de ses possibilités de détection *in vivo* de structures qui ne peuvent être visualisées en microscopie optique conventionnelle. Les domaines d'application sont très variés allant de l'étude des systèmes cellulaires à l'imagerie des tissus biologiques. Un exemple de la puissance du microscope confocal est montré dans la FIG. 1.4. Cette comparaison entre l'image d'un réseau de microtubules dans la cellule obtenue en microscopie conventionnelle et confocale, montre l'efficacité en terme de contraste et de résolution optique du microscope confocal [35].

³lors de l'excitation des fluorophores par une source émettant dans le domaine visible ou ultraviolet, la fluorescence est émise sur la quasi-totalité du trajet du faisceau dans l'échantillon; ainsi on appelle bruit de fond (signal indésirable) la fluorescence émise par les plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation.

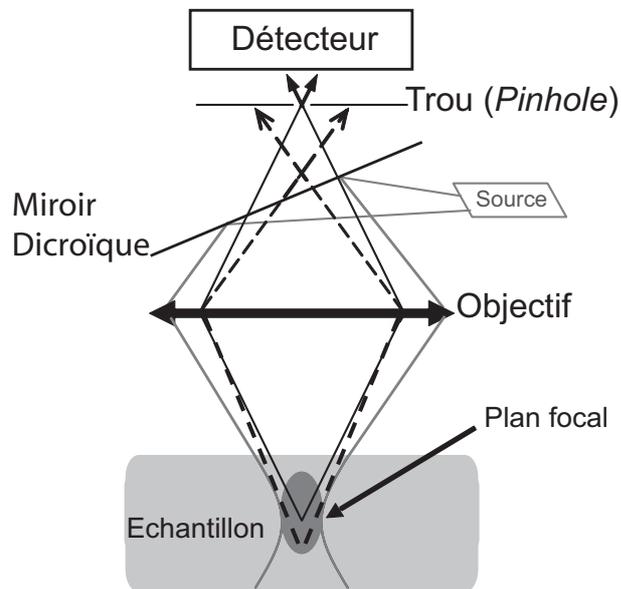


FIG. 1.3 – Le principe du montage confocal

A cause de ses propriétés, la microscopie confocale permet de construire des images point par point en déplaçant l'échantillon grâce à une platine à micro déplacements, ou par balayage laser. Des images en trois dimensions peuvent ensuite être générées en acquérant une série d'images dans des plans de focalisation successifs. Néanmoins, le microscope confocal présente certains inconvénients, qui viennent surtout des sources d'excitation

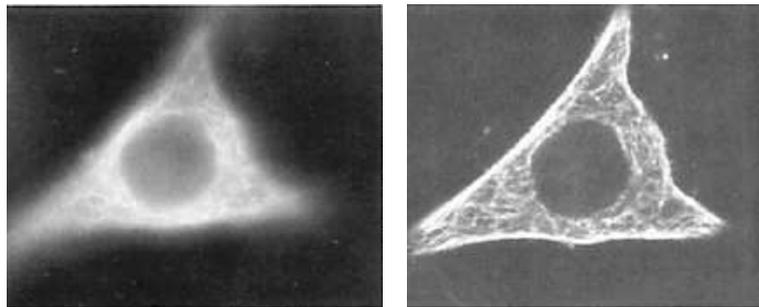


FIG. 1.4 – Réseau de microtubules dans les cellules *HeLa* marquées FITC, par microscopie de fluorescence par excitation à un photon : (à gauche) imagerie conventionnelle, (à droite) imagerie confocale [35].

monophoniques que nous avons citées précédemment (absorption des tissus biologiques, photo-endommagement, etc...). Il apparaît en plus, des pertes du signal de fluorescence liées à l'utilisation du trou confocal, car la taille de ce trou doit être judicieusement choisie et l'alignement du montage parfaitement réalisé afin de minimiser ces pertes.

Microscopie de fluorescence biphotonique

L'apparition des systèmes laser infrarouges femtosecondes solides (laser saphir dopé titane), a permis à la microscopie de fluorescence biphotonique de prendre une très grande place dans les applications biologiques. Cette technique limite le photo-endommagement des systèmes biologiques [9, 36], présente une bonne résolution spatiale tridimensionnelle, et devient ainsi une alternative intéressante à la microscopie confocale. La microscopie biphotonique offre par ailleurs des avantages supplémentaires [37, 38] : très peu de bruit de fond (car la fluorescence ne se génère qu'au point focal), les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont bien séparées (la longueur d'onde d'excitation est quasiment le double de la longueur d'onde de fluorescence), et une meilleure profondeur de pénétration dans les tissus biologiques [39, 40] (faible absorption dans l'infrarouge). Tout ces avantages rendent cette technique très utilisée dans les expériences d'imagerie de fluorescence des milieux biologiques vivants, notamment dans l'imagerie des systèmes cellulaires (voir la FIG. 1.5).

Cependant, l'excitation biphotonique présente quelques inconvénients, nous allons en citer quelques uns : La section efficace d'absorption à deux photons de la plupart des fluorophores est très faible [41] par rapport à la section efficace d'absorption à un photon, c'est pour cela que des puissances élevées (qq. dizaines de milliwatts) sont utilisées en imagerie. L'utilisation des lasers impulsions (quelques 100 femtosecondes), focalisés dans un volume de quelques microns, peut engendrer des densités de puissance (qq. Gigawatts/cm²) qui peuvent détruire les cellules vivantes [42–44]. D'autre part l'utilisation des lasers infrarouges (grandes longueurs d'ondes) limite la résolution spatiale par rapport à la microscopie confocale monophotonique. Des solutions techniques ont été proposées pour améliorer la résolution spatiale des microscopes biphotoniques comme l'utilisation d'un trou de filtrage, à condition de trouver un bon compromis entre le signal collecté et la taille du trou. Une autre technique consiste à faire interférer les signaux de fluorescence provenant du plan focal de deux objectifs disposés de part et d'autre de l'échantillon (Microscope $4Pi$) [45].

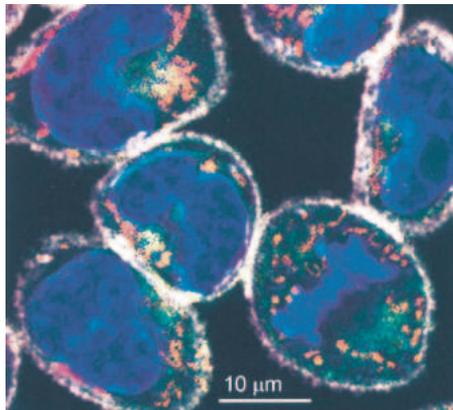


FIG. 1.5 – Imagerie cellulaire (cellules *RBL*) par microscopie de fluorescence par excitation à deux photons : membrane plasmique (pyrene lysophosphatidycholine), noyau (DAPI), appareil de Golgi (Bodipy sphingomyelin), mitochondrie (rhodamine 123) [10].

Microscopie par fluorescence résolue dans le temps (FLIM : Fluorescence Life-time Imaging Microscopy)

Intrinsèquement, la durée de vie de la fluorescence dépend de l'environnement de la molécule fluorescente, indépendamment de la concentration des fluorophores. Ceci a permis la réalisation de plusieurs instruments basés sur l'étude de la durée de vie de la fluorescence par excitation à un photon [46], ou plus récemment par excitation biphotonique [47, 48].

L'imagerie par fluorescence résolue dans le temps (FLIM) est basée sur la mesure de la décroissance de l'intensité de fluorescence dans un échantillon après excitation optique. Des informations fonctionnelles peuvent être déduites à partir de la durée de vie du fluorophore à travers son taux de décroissance radiative et non radiative. Cette technique est utilisée pour différencier les différentes molécules fluorescentes (avec différents taux de décroissance) ou étudier localement les effets de perturbations de l'environnement sur le taux de décroissance des fluorophores. Ces fonctionnalités ont été exploitées pour quantifier des paramètres physiologiques y compris le pH [49, 50], le $[Ca^{2+}]$ [51], et le taux de O_2 [52].

En pratique l'imagerie par microscopie FLIM peut être réalisée dans le domaine fréquentiel, ou temporel, car les données en temps et fréquence sont équivalentes et reliées par transformée de Fourier [54]. Les développements

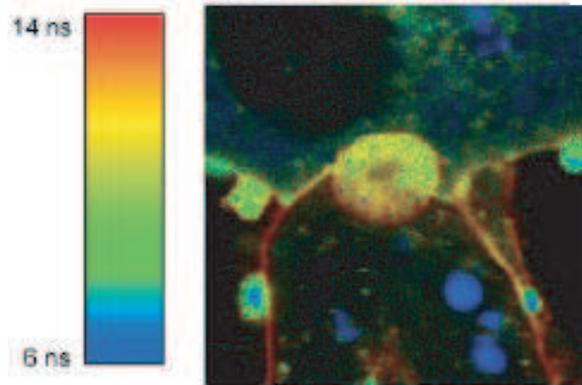


FIG. 1.6 – Image FLIM d’une partie de la membrane d’une cellule *hépatocyte* vivante [53].

récents de lasers ultrarapides et les technologies d’imagerie ont permis à cette technique de devenir un outil simple et accessible [55]. Expérimentalement, on mesure le taux de décroissance de l’intensité de fluorescence pour chaque pixel de l’image. Le signal est alors ajusté par un modèle de décroissance théorique, usuellement une fonction exponentielle multiple avec des durées de vie discrètes. L’image obtenue par microscopie FLIM représente alors une carte de distribution spatiale de la durée de vie des fluorophores étudiés. Une des applications prometteuses est l’utilisation de la fluorescence endogène sensible aux propriétés physicochimiques de l’environnement. La décroissance de l’auto-fluorescence a été observée dans le collagène, l’élastine, et d’autres composants du tissu biologique [56]. Des modèles de fit de cette décroissance ont été développés [57] ainsi que l’étude de l’effet de l’environnement sur cette décroissance [58]. La FIG. 1.6 représente une image FLIM d’une partie de la membrane d’une cellule *hépatocyte* vivante, marquée avec le fluorophore NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole), dont la durée de vie dépend du degré d’hydrophobie de la molécule par rapport à l’environnement. Chaque pixel est le résultat d’un fit exponentiel de la décroissance de la fluorescence de tous les photons contenus dans ce pixel [53].

Autres Microscopies...

Dans les études concernant l’analyse du rôle des structures macromoléculaires impliquées dans les différents mécanismes cellulaires et leur régulation, on combine généralement la microscopie avec d’autres techniques comme

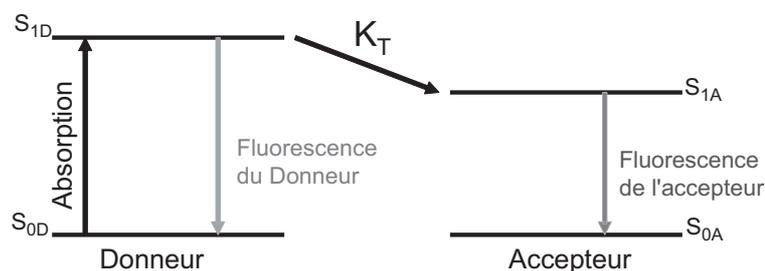


FIG. 1.7 – Diagramme simplifié du phénomène de FRET (K_T est la vitesse de transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur) : S_{0A} et S_{0D} représentent respectivement l'état fondamental du donneur et celui de l'accepteur. S_{1A} et S_{1D} sont les états excités singulets de ces deux molécules.

le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert), le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ou la FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy). Le principe de transfert d'énergie de fluorescence FRET a été décrit par Förster [59] : lorsque deux fluorophores, un donneur et un accepteur dont les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur se recouvrent, se trouvent à une distance inférieure à 100 Å et que leurs dipôles de transition électronique ont une orientation respective appropriée, il existe un transfert d'énergie de fluorescence. Le processus de transfert d'énergie entre deux molécules est représenté sur la FIG. 1.7. La technique FRET consistant à mesurer ce transfert est parfaitement adaptée à l'étude des interactions macromoléculaires, en permettant de mesurer des distances intra ou intermoléculaires de quelques nanomètres.

Le FRET est considéré comme une règle spectroscopique pour caractériser la structure de complexes macromoléculaires [60]. De nombreuses études ont été effectuées d'abord sur des vésicules lipidiques en solution, puis sur des cellules vivantes (par exemple, la caractérisation des membranes lipidiques par la détermination de l'orientation de chromophores dans la bicouche lipidique donne des informations sur l'organisation de cette bicouche). Plus récemment, l'homoFRET, mesuré par anisotropie de fluorescence, a permis de caractériser l'organisation de protéines membranaires en micro domaines à la surface de la cellule [61,62]. L'étude des déclins d'anisotropie a également permis à l'équipe de Verkman [63] d'étudier la diffusion rotationnelle de la GFP exprimée en cellule vivante parallèlement aux études de FRAP dans le cytoplasme [64], dans le réticulum endoplasmique [65] et dans la matrice mitochondriale [66].

En FRAP, les molécules fluorescentes présentes dans le volume d'observation sont détruites par photo-blanchiment en utilisant la pleine puissance d'un laser. On mesure alors la réapparition de la fluorescence dans ce volume qui provient de la diffusion des molécules fluorescentes voisines qui n'ont pas été détruites. Au départ, le FRAP en cellule vivante consistait principalement à mesurer la mobilité latérale de molécules membranaires. Verkman et son équipe ont utilisé cette méthode avec la GFP pour caractériser la microviscosité dans le cytoplasme [64], dans le reticulum endoplasmique [65] et dans la matrice mitochondriale [66]. Avec le développement commercial des microscopes confocaux permettant de faire du FRAP, de très nombreuses études de biologie cellulaire utilisent aujourd'hui cette approche.

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS pour Fluorescence Correlation Spectroscopy) a été formalisée en 1974 par Elson et Magde [67]. Rigler a utilisé et développé ce formalisme pour proposer une méthode expérimentale de FCS [68]. En 1997, un montage commercial est mis sur le marché par Zeiss : le Confocor. Le principe de la FCS consiste à observer l'amplitude et la fréquence des fluctuations de l'intensité de fluorescence dans un volume d'observation (voir la FIG. 1.8). Les fluctuations de la fluorescence sont corrélées avec les mouvements browniens de diffusion des particules entrant et sortant du volume d'observation, mais aussi de tout processus réactif à l'échelle moléculaire qui jouerait sur l'intensité de fluorescence. Des développements récents de cette technique permettent de mesurer les fluctuations de fluorescence pour deux couleurs (Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy) [69]. Il est alors envisageable de mesurer non seulement la diffusion de chaque couleur mais aussi les éventuelles interactions entre les deux espèces moléculaires marquées par chaque couleur. On peut aussi imaginer effectuer des mesures de FCS en polarisation en utilisant une source excitatrice polarisée et en recueillant les fluctuations à travers un polariseur. La fenêtre de temps accessible permettrait de mesurer des vitesses de diffusion rotationnelle très lentes impossibles à mesurer par déclin d'anisotropie. Cette technique est utilisée aussi pour mesurer le coefficient de diffusion des molécules en solution ou la viscosité du milieu intracellulaire pour une concentration de fluorophores faible [70, 71].

Chaque technique de microscopie par fluorescence possède des caractéristiques la prédisposant à certaines applications. Néanmoins, dans les applications où les échantillons ne tolèrent pas de marquage ou de traitement chimique, et pour l'étude des fonctions cellulaires fortement sensibles à la toxicité, il est nécessaire de développer des techniques alternatives. Parmi celles-ci, certaines sont basées sur des effets d'optique non-linéaire et utilisent

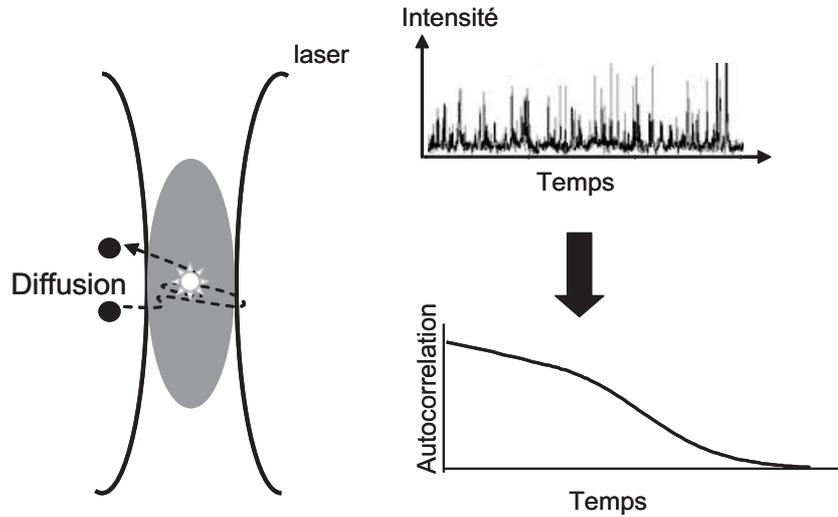


FIG. 1.8 – Principe de la microscopie FCS : Courbe d'autocorrélation construite à partir des fluctuations du signal de fluorescence dans le temps.

d'autres mécanismes optiques que la fluorescence pour générer le contraste dans l'image. Dans cette thèse, nous nous limitons à citer celles qui trouvent des applications dans le domaine biomédical.

1.3 La microscopie non linéaire

A la différence de la microscopie de fluorescence, dans la microscopie non linéaire le marquage fluorescent n'est pas toujours nécessaire. Ces techniques sont basées sur des processus cohérents de l'optique non linéaire, et peuvent bénéficier d'effets interférentiels, une fois les conditions physiques réunies. Dans cette thèse, nous allons citer deux exemples : le premier est la microscopie par génération de seconde harmonique (SHG), le second est la microscopie par génération de troisième harmonique (THG). Ce sont les techniques les plus connues et utilisées dans le domaine de l'imagerie biomédicale.

1.3.1 La microscopie par génération de seconde harmonique (SHG)

La microscopie par génération de seconde harmonique (SHG) est souvent associée à la microscopie de fluorescence biphotonique (TPFE) car

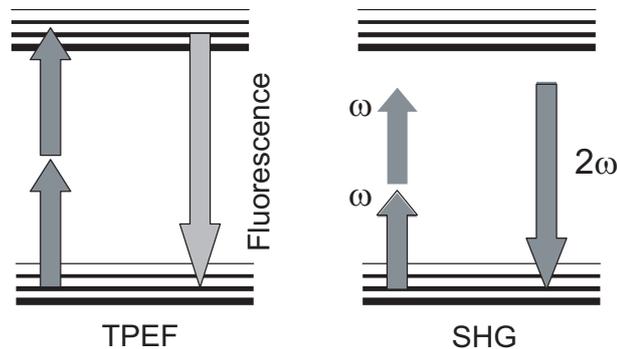


FIG. 1.9 – Contrairement à la génération de la fluorescence, le processus de génération de second harmonique est cohérent, en SHG la fréquence d'excitation est doublée (génération d'une onde à 2ω), ce processus est exalté dans le cas d'une résonance électronique.

elle utilise le même système d'excitation (laser infrarouge ou proche infrarouge). La microscopie SHG permet d'obtenir une information morphologique (comme la fluorescence) mais apporte aussi des informations sur l'organisation moléculaire, inaccessibles par des techniques classiques. La génération du second harmonique (SHG) est similaire à la fluorescence induite par une absorption biphotonique. Dans les deux cas, deux photons incidents sont *convertis* en un photon d'émission. Néanmoins, ces phénomènes diffèrent fondamentalement : pour générer de la fluorescence, une molécule absorbe de l'énergie lumineuse et la libère ensuite après un temps indéterminé sous la forme d'un photon de fluorescence. La phase de ce photon est donc aléatoire. En revanche, pour générer un photon par interaction SHG, une molécule n'absorbe pas l'énergie incidente mais la diffuse plutôt, de manière non-linéaire (en convertissant deux photons en un). Cette diffusion est quasi-instantanée, et la phase de l'émission est bien fixée.

La génération de second harmonique (SHG) a été appliquée pour l'observation des tissus biologiques dès 1971, par Fine et al [73]. En effet, le signal de second harmonique est généré par un processus non-linéaire cohérent qui dépend de la susceptibilité de second ordre $\chi^{(2)}$ du milieu. Ce paramètre dépend de la configuration électronique, de la symétrie moléculaire, de la morphologie locale, ainsi que de l'orientation et de l'alignement des molécules dans l'échantillon. Ces propriétés font la spécificité de la microscopie SHG [74]. En 1981, Freund et al rapportent l'imagerie des fibres de collagène dans la queue de rats sans coloration avec la SHG : ces struc-

tures tissulaires sont en effet très denses et très bien orientées, et émettent de forts signaux de second harmonique. Il en est de même des filaments de myosine dans les muscles, ou des microtubules [75]. D'autres études ont suivi soulignant les caractéristiques de cette génération d'onde à travers les milieux biologiques que ce soit pour l'étude des propriétés structurales [76] ou fonctionnelles [77] de la membrane cellulaire. Dans ce cas, on utilise un marquage avec des molécules présentant un fort signal SHG. Un autre champ d'application majeur de cette technique dans le domaine de la biologie, où les processus électriques gouvernent les fonctions biologiques, est l'étude du potentiel membranaire rapportée par Bouevitch et al en 1993 [78, 79]. Le signal de second harmonique peut être généré soit par des marqueurs exogènes souvent toxiques, soit par des molécules endogènes comme les fibres de collagènes (muscles tendons), ou par les microtubules (axones, chromosomes). Cependant, les molécules endogènes doivent respecter les mêmes contraintes que les colorants exogènes, à savoir présenter une asymétrie électronique et une asymétrie de la répartition spatiale.

La génération de second harmonique in situ, a été utilisée dès 1996 comme un *révélateur* spécifique des membranes cellulaires. Comme il s'agit en effet d'un phénomène cohérent du second ordre qui s'annule pour tout milieu centrosymétrique, il n'est donc sensible qu'aux interfaces et ceci représente un avantage certain pour l'observation des membranes (voir la FIG. 1.10). En plus de l'utilisation des lasers infrarouges ou proche infrarouge qui diminue considérablement le photo-endommagement des milieux biologiques et augmente la profondeur de pénétration dans les tissus [8] (voir la FIG. 1.11), la microscopie SHG est spécifique aux molécules non centrosymétriques dans les

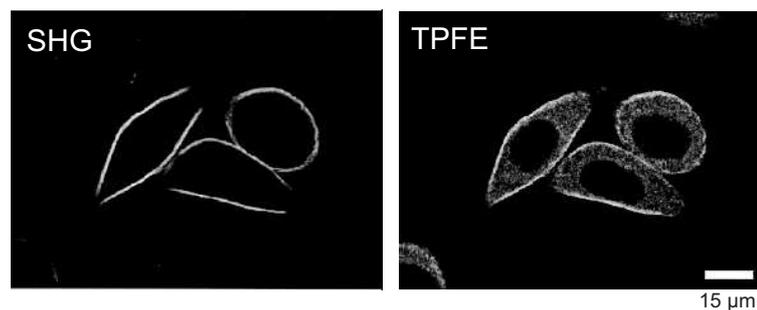


FIG. 1.10 – Cellules isolées Ncadl en culture, marquées à l'aide d'un colorant membranaire RH237. Le contraste membranaire est bien meilleur en SHG (image de gauche) qu'en fluorescence (image de droite) [72].

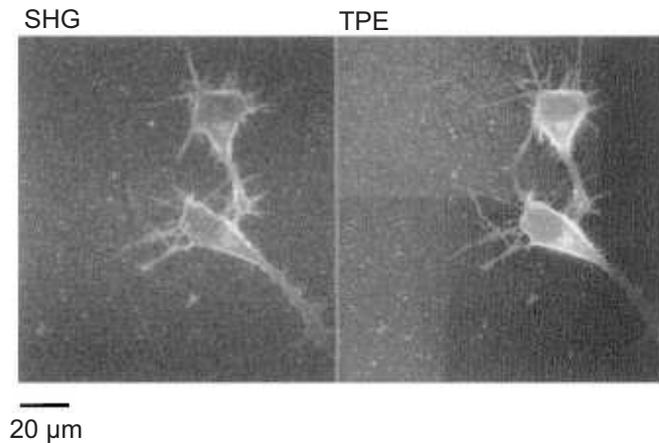


FIG. 1.11 – cellules nerveuses imagées par microscopie SHG et microscopie biphotonique : les différentes composantes cellulaires des neurones marquées JPW-2080 (dendrites, cônes de croissance, axones, etc...) apparaissent bien contrastées dans les deux techniques d'imagerie [80].

milieux biologiques, et permet l'utilisation de milieux non-centrosymétriques pour augmenter le processus de génération de l'onde de second ordre [81].

Dans le domaine des marqueurs mis en oeuvre pour augmenter le contraste dans l'imagerie SHG, certains appelés *harmonophores* sont utilisés pour l'imagerie des membranes plasmiques en SHG [72, 80, 82]. Cependant ces marqueurs ont tendance à rapidement s'internaliser et s'équirépartir sur les faces interne et externe de la membrane cellulaire conduisant à un arrangement centrosymétrique qui annule le signal de second harmonique. Afin de pallier cette limitation, A. Lewis propose en 1993 d'utiliser des colorants chiraux⁴ [78], possédant de nombreuses propriétés (solubilité dans les milieux physiologiques et les membranes biologiques, non toxique pour les cellules, etc...) pour l'imagerie biologique.

Récemment, avec le développement des technologies (lasers, marqueurs, etc...) plusieurs applications ont été rapportées utilisant la microscopie SHG, la localisation de structures bio-cristallines dans les tissus biologiques [83], l'imagerie de protéines endogènes [84, 85], et des vaisseaux sanguins [86], l'observation de la morphologie cellulaire [87], et embryonnaire [88], et pour la détection des dynamiques intracellulaires de Ca^{2+} [89], ainsi que l'imagerie

⁴la chiralité est la propriété que possède un objet de ne pas être superposable à son image dans un miroir.

in vivo des tissus épais [75, 90, 91].

1.3.2 La microscopie par génération de troisième harmonique (THG)

Les techniques de microscopie cohérente par mélange d'ondes⁵ permettent, non seulement de bonnes résolutions tridimensionnelles comme dans le cas de la microscopie biphotonique, mais aussi, de s'affranchir de l'utilisation d'un agent exogène quelconque, en utilisant comme agent de contraste les propriétés physiques intrinsèques de l'échantillon, à travers la susceptibilité non linéaire. La microscopie THG a été rapportée récemment par Barad et al [92], où des fibres de verre sont observées dans une matrice d'indice différent. En effet, dans ce type de microscopie la génération de l'onde est indépendante de la symétrie, contrairement à la SHG, mais se produit surtout pour les échantillons qui présentent des interfaces entre deux milieux différents, ou de susceptibilités $\chi^{(3)}$ différentes⁶. Pour cette raison l'interprétation des images des systèmes biologiques obtenues par la microscopie THG est assez délicate (on utilise souvent la microscopie de fluorescence en plus de cette technique pour la reconnaissance des constituants cellulaires).

A partir de 1998, cette technique est appliquée pour l'observation de cellules végétales [95–97], pour l'étude de l'ordre moléculaire dans les cellules à cristaux liquides [98, 99], ainsi que sur des objets biologiques comme les cellules nerveuses (neurones) [100]. Récemment, par le développement des sources lasers infrarouges impulsionnelles (femtosecondes) puissantes, la combinaison des techniques TPEF, SHG, et THG dans un seul montage expérimental est devenue possible pour l'imagerie à grande profondeur [101], pour l'étude *in vivo* des dynamiques du Ca^{2+} à travers des membranes cellulaires [89, 102], ou bien dans l'imagerie cellulaire [103].

Avec la microscopie par génération de troisième harmonique (THG), il est maintenant possible de réaliser des images en microscopie sans prépara-

⁵Dans la microscopie par génération de troisième harmonique (THG), l'excitation par une fréquence (ω) permet de générer un signal à une fréquence (3ω)

⁶Lorsque l'échantillon au plan focal est homogène, les ondes de troisième harmonique générées avant et après le plan focal interfèrent d'une manière destructive. Il ne peut y avoir de signal de troisième harmonique dans un milieu homogène. Cependant, lorsque l'échantillon présente des inhomogénéités proches du plan focal, comme dans le cas d'une interface entre deux milieux, la symétrie le long de l'axe optique est brisée, il y a donc génération de l'onde de troisième harmonique [93].

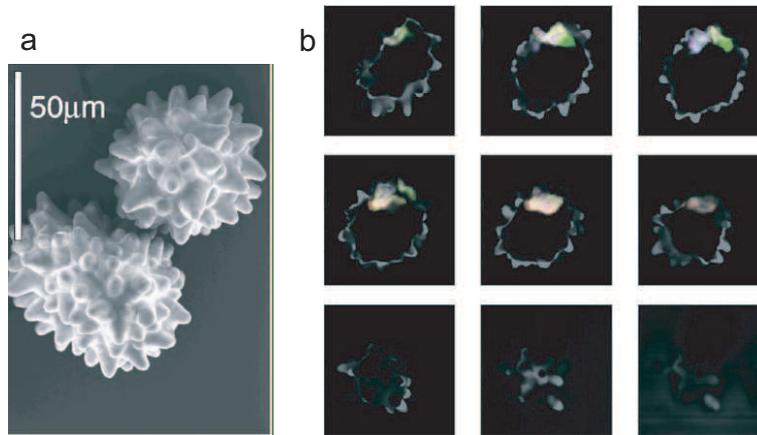


FIG. 1.12 – (a) image SEM (microscopie électronique à balayage) de deux cystolithes (corps intercellulaires présents dans les feuilles végétales de certains arbres, composées de carbonate de calcium amorphe). (b) images ($70 \times 70 \mu m^2$) de sections optiques ($8 \mu m$ entre chaque section) de cystolithes obtenues par microscopie THG [94].

tion particulière des échantillons. Cette technique apporte un intérêt majeur pour l'étude d'objets massifs (opaques⁷) en biologie, comme dans le cas des

⁷Dans la limite de pénétration des rayons lumineux.

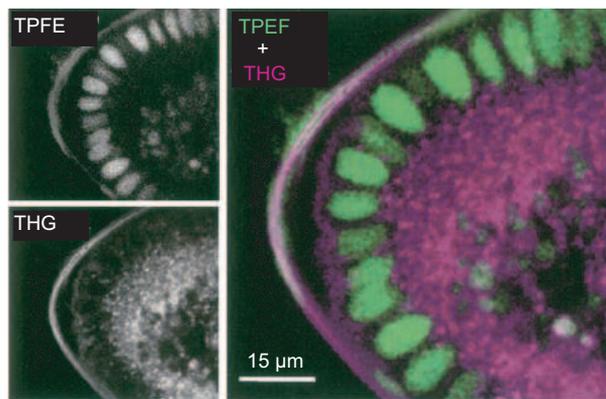


FIG. 1.13 – Images TPEF-THG d'*embryons de Drosophiles*. Les noyaux cellulaires observés en TPEF sont marqués GFP (excitation à 820 nm), des vésicules lipidiques sont observées par la microscopie THG (excitation à 1180 nm) [104].

embryons [94,104–106] ou des tissus biologiques [107].

1.4 La microscopie/spectroscopie Raman

Une des techniques qui connaît un essor important dans le domaine de la médecine est la microscopie/spectroscopie par diffusion Raman. Comme dans le cas de la spectroscopie IR, la microscopie Raman est une technique basée sur les vibrations moléculaires, fournissant des détails sur la composition chimique, la structure moléculaire, et les interactions moléculaires dans les cellules et les tissus. Comme les dysfonctionnements biologiques conduisent généralement à des changements dans la composition moléculaire des tissus affectés, il est possible de les détecter dans les spectres vibrationnels. En outre, si les changements spectraux sont assez spécifiques, ils peuvent être utilisés comme marqueurs phénotypiques (spécifiques) de la maladie. Mais avant de citer les applications basées sur cette technique, une brève définition de l'effet Raman est nécessaire pour la compréhension du mécanisme de contraste généré par cette technique.

1.4.1 La diffusion Raman

L'effet Raman a été découvert par C.V. Raman en 1928 [108]. Quand une lumière monochromatique (ex : un faisceau laser) éclaire une substance, une diffusion d'origine électronique survient. La majeure partie de la lumière diffusée est la diffusion Rayleigh qui a la même fréquence que la lumière incidente. Une partie beaucoup plus petite de la lumière diffusée change de fréquence, à cause d'un transfert d'énergie aux molécules (ou vice versa) pendant l'oscillation de l'électron. La FIG. 1.14 illustre la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman d'une molécule diatomique simple après excitation par un faisceau laser avec une longueur d'onde λ_0 . L'énergie E_0 du photon du rayon laser est définie comme :

$$E_0 = h\nu_0 = h\frac{c}{\lambda_0} \quad (1.1)$$

où ν_0 est la fréquence du rayon laser, h la constante de Planck ($6.62 \times 10^{-34} J.s$), et c la vitesse de la lumière ($3 \times 10^8 m/s$).

Lorsque l'énergie du photon incident se transfère à l'énergie de vibration moléculaire ou vice versa, la lumière diffusée perd (diffusion Stokes) ou gagne (diffusion anti-Stokes) une quantité d'énergie ΔE , définie par :

$$\Delta E = E_\nu = h\nu_\nu = h\frac{c}{\lambda_\nu} = hc\tilde{\nu} \quad (1.2)$$

où $\tilde{\nu}$ est le nombre d'onde exprimé en cm^{-1} correspondant à la fréquence Raman.

La diffusion Raman est très faible comparée à la diffusion Rayleigh et à la diffusion de fluorescence⁸. En conséquence, la diffusion Raman s'est avérée difficilement utilisable jusqu'au développement de sources laser puissantes et de filtres très sélectifs pour couper le fort signal de diffusion Rayleigh. Des techniques basées sur la diffusion Raman ont aussi été développées récemment pour réduire la fluorescence endogène et exalter le signal Raman [110,111].

1.4.2 L'imagerie Raman

L'imagerie basée sur la diffusion Raman apporte non seulement des informations spectrales et structurales sur les molécules intrinsèques de l'échantillon mais aussi sur la distribution spatiale de ces molécules d'intérêt dans un spécimen hétérogène, et ceci sans aucun traitement chimique ou marquage chromatique. L'utilisation de cette technique couvre différents champs de recherche dans le domaine biomédical, comme par exemple l'étude de la structure des protéines et de l'ADN [112–114], et même des virus [115]. D'autres études ont été rapportées par Puppels et al sur des cellules humaines vivantes [116], et ont permis de voir les spectres des différentes composantes cellulaires (cytoplasme, noyau, protéines, etc) [117,118]. Le diagnostic des tumeurs cancéreuses est un domaine qui emploie cette technique [20,119] (voir la FIG. 1.15⁹), l'analyse de tissus malades peut se faire *in situ et in vivo* [120], de la peau [121], ou du sein [122].

Dans le domaine des recherches des drogues anti-cancéreuses, l'équipe de M.Manfait en France combine l'imagerie spectrale Raman aux techniques d'exaltation en surface (SRS), pour étudier comment ces drogues interagissent avec des cellules cancéreuses vivantes [123,124]. D'autres groupes utilisent des fibres optiques afin d'étendre l'imagerie Raman des cellules cancéreuses *in situ in vivo* chez l'humain [125].

⁸Pour donner un exemple, pour chaque million de photons diffusés, 999000 proviennent de la diffusion Rayleigh, 999 de la diffusion de fluorescence, et seulement un photon provient de la diffusion Raman [109].

⁹*Paclitaxel* : Drogue anti-cancéreuse qui stabilise les microtubules, un composant du cytosquelette qui joue un rôle important dans la division cellulaire.

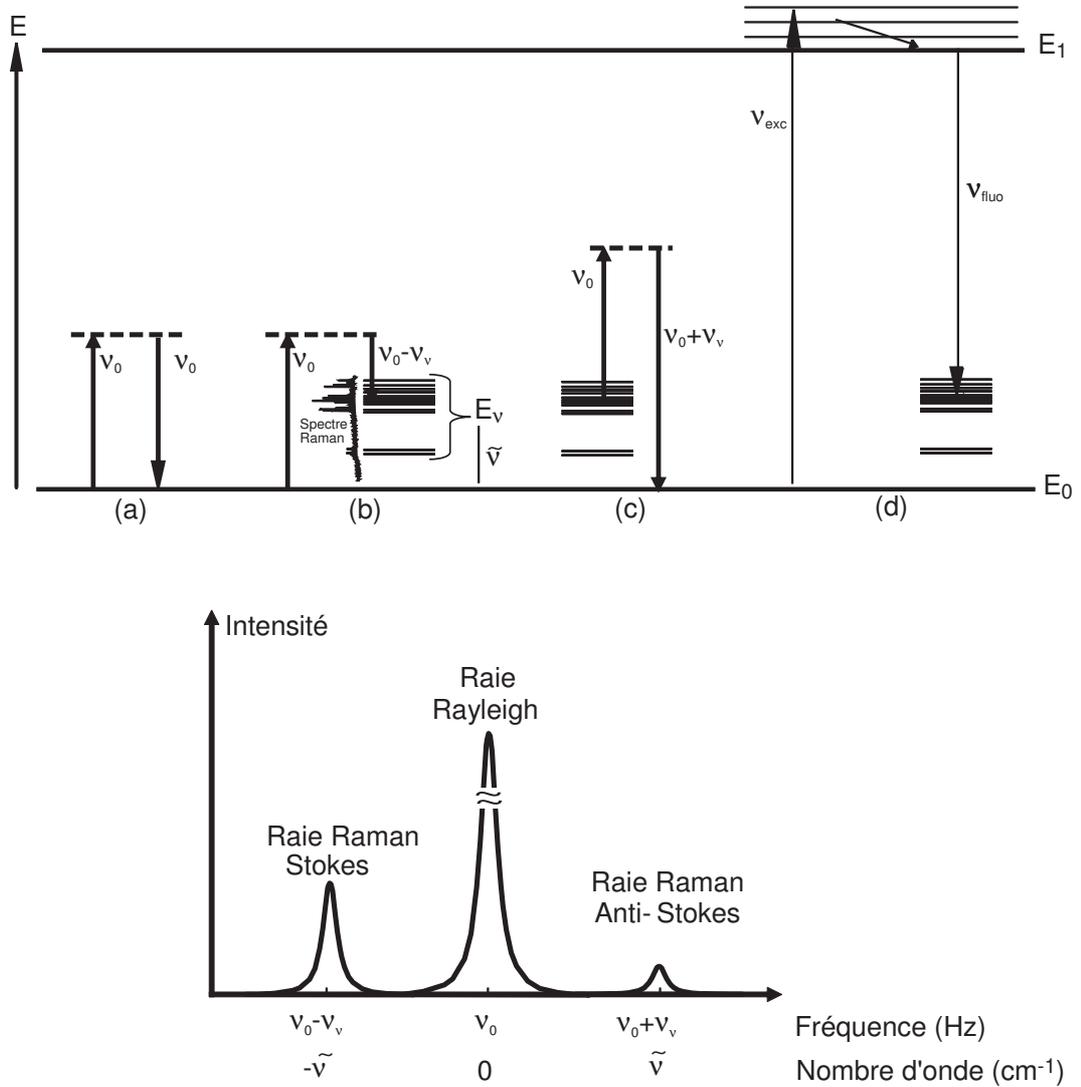


FIG. 1.14 – La diffusion Rayleigh (a), la diffusion Raman Stokes (b), la diffusion Raman Anti-Stokes (c), et la fluorescence (d), dans une molécule diatomique simple avec des niveaux d'énergie électroniques (E_0 , E_1) et vibrationnels (E_ν).

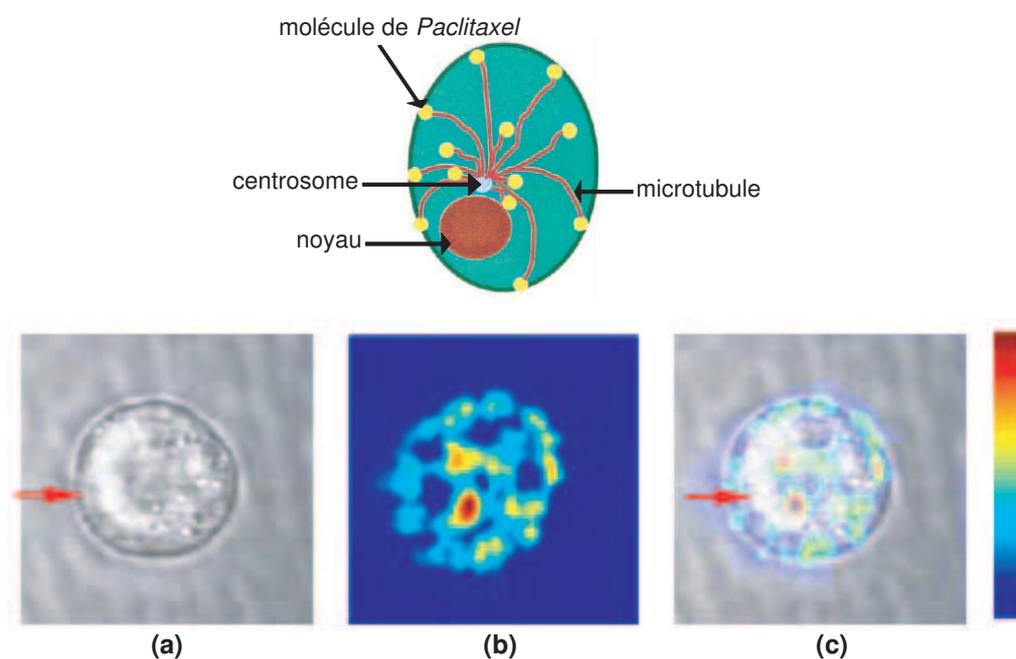


FIG. 1.15 – Cellules tumorales *MD-435* traitées au *Paclitaxel*. (a) image en lumière blanche d'une cellule *MD-435* illustrant la structure cellulaire (la flèche rouge indique la région du noyau), (b) image Raman de la cellule illustrant la distribution de l'intensité de la bande Raman à 1000 cm^{-1} spécifique au *Paclitaxel*, (c) la superposition des deux images (a) et (b). La barre de couleur indique l'intensité du signal Raman (croissante vers le haut) [119].

1.5 Conclusion

Dans ce chapitre, plusieurs techniques de microscopie ont été décrites ; chacune d'elles a une spécificité par rapport à la génération du contraste dans l'image. La plupart des exemples cités démontrent les inconvénients ainsi que les avantages de ces différentes approches. Ceci dit, ces dernières années ont connu un grand développement technologique au niveau des systèmes laser et des systèmes électroniques de détection, qui ont permis à certaines de ces techniques de se distinguer en imagerie en les rendant moins invasives pour l'exploration des systèmes biologiques vivants, ou encore de développer de nouvelles technologies avec différentes performances. Le chapitre suivant est consacré à l'une de ces nouvelles technologies, appelée "CARS", très récente, qui combine la microscopie et la spectroscopie en un seul outil, associant la microscopie non-linéaire et la diffusion Raman. De la même manière, le prin-

cipe, les avantages ainsi que les inconvénients seront exposés.

Deuxième partie

La microscopie CARS

Chapitre 2

Microscopie CARS : principe, théorie et état de l'art

Sommaire

2.1	Introduction	31
2.2	Microscopie CARS : principe et configurations	32
2.3	Génération CARS : éléments de théorie	37
2.4	Imagerie CARS : état de l'art	47
2.5	Développements récents	52
2.6	Conclusion	55

2.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à la microscopie CARS. Une première partie décrit le principe de la génération Raman cohérente de l'onde anti-Stokes (CARS), suivie d'une brève démonstration théorique de ce phénomène non-linéaire de troisième ordre, en se focalisant particulièrement sur le mécanisme de contraste généré dans ce type de microscopie. Finalement, un état de l'art de cette technique nous permet de connaître les derniers développements récents dans ce domaine de microscopie.

2.2 La microscopie par diffusion cohérente Raman anti-Stokes (CARS)

L'imagerie infrarouge ainsi que l'imagerie par diffusion Raman spontanée sont les deux méthodes les plus répandues en microscopie vibrationnelle. La première est limitée par une faible résolution spatiale car de grandes longueurs d'ondes (infrarouges) sont utilisées. La microscopie par diffusion Raman spontanée avec des lasers d'excitation dans le visible ou dans le proche infrarouge évite ce problème, toutefois elle est limitée par la faible section efficace de l'émission Raman ($\sigma = 10^{-30} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}$), ce qui nécessite l'utilisation de fortes puissances lasers (de quelques dizaines à quelques centaines de milliWatts focalisés). Comme dans le cas de ces deux techniques, la microscopie CARS (diffusion cohérente Raman anti-Stokes) utilise les propriétés moléculaires vibrationnelles intrinsèques pour générer un mécanisme de contraste dans l'image¹.

Cependant, il existe plusieurs différences subtiles entre le processus Raman spontané et le Raman cohérent (CARS). Le signal cohérent est dû à une oscillation vibrationnelle collective avec une phase bien définie, son intensité croît quadratiquement avec le nombre de molécules. Le signal spontané, par contre, est linéaire avec le nombre de molécules. Alors que le signal spontané est émis dans toutes les directions de l'espace, le signal cohérent est émis seulement dans la direction où le signal est constructif, une condition appelée la condition d'accord de phase (voir partie suivante "élément de théorie"). Le principe de la diffusion Raman Anti-Stokes cohérente (CARS) est schématisé sur la FIG. 2.1. Dans ce cas, l'échantillon est simultanément éclairé par une onde (pompe) à la fréquence ω_P ($\omega_P = 2\pi c\tilde{\nu}_P$), et une onde (Stokes) à la fréquence ω_S ($\omega_S = 2\pi c\tilde{\nu}_S$). Un photon anti-Stokes à la fréquence ω_{AS} ($\omega_{AS} = 2\omega_P - \omega_S$) est émis de façon stimulée, lorsque la différence de fréquence entre les ondes pompe et Stokes correspond à la fréquence vibrationnelle résonante Ω_R de la liaison excitée ($\omega_P - \omega_S = \Omega_R$).

¹Chaque liaison chimique est caractérisée par des fréquences vibrationnelles ($\Omega_R = 2\pi c\tilde{\nu}_R$) propres à ses modes vibratoires. Par convention, les chimistes utilisent le nombre d'onde ($\tilde{\nu}_R$) pour exprimer ces fréquences de résonance. Par exemple $C = C$ ($\tilde{\nu}_R = 1600 \text{ cm}^{-1}$), CH_2 ($\tilde{\nu}_R = 3000 \text{ cm}^{-1}$), etc.

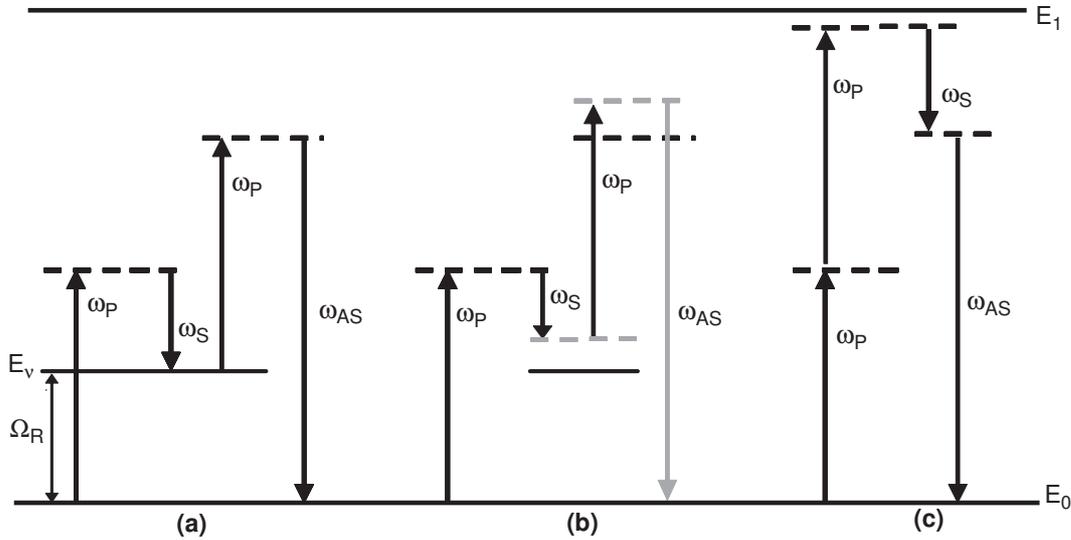


FIG. 2.1 – Diagramme d'énergie (Processus CARS). (a) Processus résonant de génération de l'onde anti-Stokes ($\omega_P - \omega_S = \Omega_R$), (b) processus non résonant ($\omega_P - \omega_S \neq \Omega_R$), (c) contribution non résonante d'un état électronique (bruit électronique). (E_0 , E_1 états électroniques de la molécule, E_v état vibrationnel du mode Raman résonant avec une fréquence de résonance Ω_R).

Techniques d'analyse et configurations en microscopie CARS

Bien que le principe de la diffusion cohérente Raman anti-Stokes ait été rapporté en 1965 par Maker et Terhune [126] comme un outil de spectroscopie pour l'analyse chimique à l'état gazeux et condensé [127], ce n'est qu'en 1982, avec le développement des sources laser et de l'électronique, que la diffusion cohérente Raman anti-Stokes a été combinée à la microscopie optique par Duncan et al [21, 22, 128]. Il a utilisé pour cela deux lasers pompe et Stokes en configuration colinéaire dans le visible, et deux détecteurs bidimensionnels pour enregistrer le signal CARS. L'utilisation de lasers visibles engendre cependant un très fort bruit non résonant à cause de l'absorption à deux photons (FIG. 2.1(c)) dans les liaisons chimiques. En 1999, Zumbusch et al [23] utilisent le microscope CARS avec deux lasers très focalisés Pompe et Stokes colinéaires dans le proche infrarouge, ce qui améliore nettement l'efficacité du processus (amélioration du rapport signal/bruit).

A cause de la nature stimulée et cohérente du rayonnement diffusé (les liaisons moléculaires oscillent en phase, et interfèrent de façon constructive), le

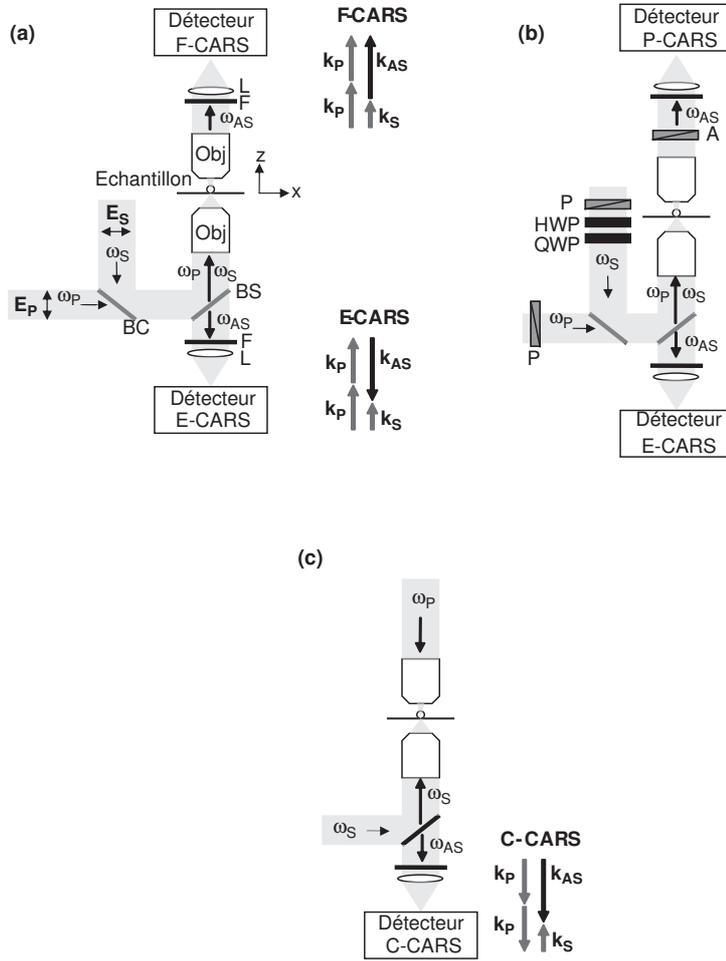
signal CARS est 10^6 fois plus fort que la diffusion Raman spontanée. Contrairement à la microscopie de fluorescence ou par diffusion Raman spontanée, le mécanisme de contraste dans l'imagerie CARS est produit par la somme des radiations cohérentes résonantes et non résonantes de l'échantillon et/ou du solvant (FIG. 2.1(a,b)).

La microscopie CARS a de nombreux avantages : **(1)** elle n'a pas besoin de marquage fluorescent, les échantillons sont directement imagés sans aucun traitement chimique ou biologique, **(2)** comme il n'y a pas de population dans un état électronique excité de la molécule, il n'y a pas de photo-endommagement ou de photo-blanchiment, **(3)** elle est plus sensible que la microscopie par diffusion Raman spontanée, tout en utilisant des puissances moyennes d'excitation tolérables pour les objets biologiques, **(4)** comme la microscopie multi-photonique, elle offre des possibilités de sectionnement tridimensionnel et de confinement de la zone de génération du signal sans avoir à utiliser la détection confocale, **(5)** l'utilisation de l'excitation infrarouge minimise l'échauffement de l'échantillon ainsi que le bruit non-résonant, ceci à cause de la faible absorption de l'eau à ces longueurs d'ondes, et augmente la profondeur de pénétration pour l'imagerie des tissus épais et des cellules.

Néanmoins, le bruit dans l'image CARS provient surtout des contributions électroniques de la susceptibilité de troisième ordre de l'échantillon, et du solvant, en plus du signal non-résonant CARS du solvant (voir partie suivante "élément de théorie"). Différentes techniques ont été développées pour diminuer le signal CARS non-résonant du solvant. Parmi celles-ci :

- La détection arrière du signal CARS (Epi-CARS ou E-CARS) [24, 129] : cette configuration diminue efficacement le signal non-résonant du solvant car le signal CARS du solvant, généré par un effet non-linéaire cohérent, n'est constructif que dans la direction de propagation des faisceaux excitateurs (direction avant-voir partie suivante "élément de théorie"), ce qui augmente considérablement la sensibilité de la technique. Une autre configuration qui permet d'augmenter la sensibilité suivant le même principe, est l'utilisation des faisceaux d'excitation contra-propagatifs (C-CARS). Des simulations numériques ont démontré que le signal "forward" dans ce cas est peu constructif, ce qui réduit largement la contribution du bruit non-résonant du solvant [130].

- L'onde cohérente anti-Stokes (CARS) est sensible à la polarisation des champs excitateurs. On peut montrer que le signal non-résonant est dé-polarisé d'un facteur qui dépend de la susceptibilité du troisième ordre de l'échantillon observé. Le contraste de l'image CARS ainsi que la sensibilité



Obj: objectif, BS: lame séparatrice, BC: lame 50/50, F: filtre, NA: ouverture numérique,
L: lentille, P: polariseur, A: analyseur, HWP: lame ($\lambda/2$), QWP: lame ($\lambda/4$).

FIG. 2.2 – Schéma des différentes techniques basées sur le principe du microscope CARS en configuration colinéaire, les lasers d'excitation Pompe (ω_P) et Stokes (ω_S) sont polarisés horizontalement (E_P , E_S). La direction de chaque vecteur d'onde des trois champs impliqués est représentée le long de l'axe optique z (k_P , k_S , k_{AS}) pour chaque configuration. (a) Microscope E-CARS et F-CARS avec des rayons d'excitation co-propagatifs, la collection du signal CARS se fait en arrière (E-CARS) et en avant (F-CARS) de l'axe optique (configuration développée dans cette thèse). (b) Microscope P-CARS. (c) Microscope C-CARS avec des rayons d'excitation contra-propagatifs.

sont nettement améliorés, si on oriente spécifiquement la polarisation des champs excitateurs, ainsi que le système de polariseurs au niveau de la détection du signal CARS ; cette détection sensible à la polarisation est appelée P-CARS [27].

- D'autres techniques plus sophistiquées permettent d'améliorer la sensibilité. Par exemple, la détection par impulsions séquencées (T-CARS) [131] utilise un retard induit entre la paire de lasers (pompe, et Stokes) et un troisième laser (Sonde) qui vient exciter les liaisons chimiques résonantes (le processus non-résonant qui implique des niveaux d'énergie virtuelles est plus rapide que le processus résonant impliquant des durées de vie de niveaux vibrationnelles de la molécule). Une autre technique est basée sur le contrôle de la cohérence spectrale des faisceaux excitateurs [132], en utilisant des modulateurs de phases spectrales (SLM) sur des impulsions laser ultra-courtes. Ces systèmes contrôlent l'interférence entre les différentes composantes des champs excitateurs, ce qui permet de réduire considérablement le signal non-résonant.

En résumé, il existe différentes configurations de microscopie CARS, mais les plus utilisées sont schématisées sur la FIG 2.2. Dans les montages les plus courants, les faisceaux d'excitation (pompe et Stokes) sont co-propagatifs et polarisés horizontalement (FIG 2.2(a,b)), et le signal CARS est émis dans les deux directions de l'axe optique : le signal collecté en arrière de la direction de propagation des faisceaux excitateurs est appelé E-CARS (pour Epi-CARS), et celui collecté en avant est appelé F-CARS (pour Forward-CARS). La configuration P-CARS, où un système de polariseurs est placé de telle façon à différencier le signal CARS résonant du signal non-résonant est représentée par la FIG 2.2(b). Une autre configuration du montage de microscopie CARS est montrée dans la FIG 2.2(c), utilisant des faisceaux d'excitation contra-propagatifs (C-CARS). Ces deux dernières techniques permettent d'améliorer nettement la sensibilité du signal.

Il existe d'autres approches permettant d'améliorer la résolution optique et la sensibilité, assez difficiles et compliquées à réaliser, comme par exemple, la microscopie CARS combinée avec la microscopie à champ proche [133]. Certains échantillons métalliques peuvent également exalter la génération CARS [134].

Afin de comprendre le mécanisme de contraste généré dans la microscopie CARS, quelques éléments de théorie en optique non-linéaire sont traités dans le paragraphe suivant. Cette partie rappelle la théorie du mélange à quatre ondes (CARS), la condition d'accord de phase dans la génération de CARS, ainsi que l'interprétation des spectres (CARS).

2.3 Génération CARS : éléments de théorie

La découverte des lasers dans les années soixante a permis l'exploration des phénomènes optiques non-linéaires, et leur intégration dans différents outils d'analyse et d'imagerie, notamment la microscopie et la spectroscopie. Ces sources de lumière cohérente, monochromatique, directionnelle et de forte intensité, interagissent avec le matériau donnant naissance à ce que nous appelons une génération optique *non-linéaire*. Dans ce cas, la réponse du matériau excité avec un champ optique intense dépend de l'intensité de ce champ de façon non linéaire. Les propriétés optiques du matériau commencent à dépendre quadratiquement ou à la puissance cubique de l'intensité d'excitation ainsi que la nature spectrale, temporelle et spatiale du champ électromagnétique résultant. La relation constitutive entre la polarisation induite dans le matériau et le champ électrique lumineux appliqué admet un développement en puissances des composantes de polarisation du champ, qui est de la forme suivante :

$$\mathcal{P}_i = \epsilon_0 \left[\chi_{ij}^{(1)} \mathcal{E}_j + \chi_{ijk}^{(2)} \mathcal{E}_j \mathcal{E}_k + \chi_{ijkl}^{(3)} \mathcal{E}_j \mathcal{E}_k \mathcal{E}_l + \dots \right] \quad (2.1)$$

où ϵ_0 est la permittivité du vide, et $\chi^{(i)}$ est le tenseur susceptibilité électrique d'ordre i (le premier terme de ce développement, ou susceptibilité linéaire, définit la constante diélectrique du milieu $\epsilon = 1 + \chi^{(1)}$).

Lois de Maxwell dans un matériau

Le point de départ pour l'établissement de l'équation des ondes non linéaire est l'ensemble des équations de Maxwell décrivant la propagation des ondes dans un milieu matériel. Dans la situation d'un milieu non magnétique où les densités de charge et de courant macroscopiques sont nulles (ce qui est très généralement le cas en optique), celles-ci prennent la forme suivante :

$$\nabla \cdot \mathcal{D} = \nabla \cdot \mathcal{B} = 0 \quad (2.2)$$

$$\nabla \times \mathcal{E} = -\frac{\partial}{\partial t} \mathcal{B} \quad (2.3)$$

$$\nabla \times \mathcal{B} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial}{\partial t} \mathcal{E} + \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial}{\partial t} \mathcal{P} \quad (2.4)$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide. En combinant le rotationnel de l'Eq. (2.3) et la dérivée temporelle de l'Eq.(2.4), on obtient alors :

$$\nabla \times \nabla \times \mathcal{E} = -\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathcal{E} - \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathcal{P} \quad (2.5)$$

qu'il est possible de transformer au moyen de l'identité vectorielle :

$$\nabla \times \nabla \times \mathcal{E} = \nabla (\nabla \cdot \mathcal{E}) - \nabla^2 \mathcal{E} \quad (2.6)$$

En utilisant le fait que le premier terme du second membre de l'Eq.(2.6) est nul, puisque le champ électrique E est somme discrète d'ondes planes, l'Eq.(2.5) se réduit alors à :

$$\nabla^2 \mathcal{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathcal{E} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathcal{P} \quad (2.7)$$

Il est alors commode d'effectuer une décomposition de Fourier *temporelle* du champ électrique et de la polarisation du milieu, tout en distinguant les parties linéaire et non linéaire de celle-ci. En supposant le matériau isotrope, et caractérisé par une susceptibilité linéaire $\chi^{(1)}$ purement réelle (ce qui revient à négliger l'absorption linéaire, phénomène que l'on cherche toujours systématiquement à minimiser dans les applications), on peut ainsi écrire pour chaque composante de fréquence $\mathcal{P}(\omega)$ de la polarisation :

$$\mathcal{P}(\omega) = \epsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) \mathcal{E}(\omega) + \mathcal{P}^{NL}(\omega) \quad (2.8)$$

où \mathcal{P}^{NL} est la polarisation non linéaire induite dans le milieu. En portant l'Eq.(2.8) dans l'Eq.(2.7), on obtient alors :

$$\nabla^2 \mathcal{E}(\omega) + n^2(\omega) \frac{\omega^2}{c^2} \mathcal{E}(\omega) = -\frac{\omega^2}{\epsilon_0 c^2} \mathcal{P}^{NL}(\omega) \quad (2.9)$$

où $n(\omega) = \sqrt{1 + \chi^{(1)}(\omega)}$ est l'indice de réfraction du milieu à la fréquence ω . Avec $\mathcal{E}(\omega) = E(z, t) e^{i(kz - \omega t)}$ et $\mathcal{P}^{NL}(\omega) = P^{NL}(z, t) e^{-i\omega t}$.

L'Eq.(2.9) est appelée *équation des ondes non linéaire*. Elle a la forme de l'équation des ondes habituelle pour un milieu d'indice de réfraction $n(\omega)$, mais possède un terme source proportionnel à la polarisation non linéaire du milieu. Les produits d'amplitudes des champs contenus dans $\mathcal{P}^{NL}(\omega)$ décrivent l'interaction entre ondes lasers présentes dans le milieu non linéaire, et les coefficients de couplage entre ondes sont proportionnels aux susceptibilités non linéaires du matériau. La propagation des champs dans le milieu non linéaire doit être décrite par un système d'équations couplées du type (2.9), dont le nombre est généralement supérieur à celui des ondes lasers incidentes. Selon leur dépendance spatiale et temporelle, les composantes de polarisation $\mathcal{P}^{(i)}(\omega_m)$ peuvent en effet engendrer deux types de processus dans le milieu

non linéaire. Le premier correspond à une modification de la propagation des ondes lasers incidentes (changement de l'indice de réfraction, modification de l'intensité), tandis que le second correspond à la génération de nouvelles composantes de Fourier du champ à partir des ondes incidentes (mélange de fréquence, effet Raman stimulé, conjugaison de phase, etc...).

En général, on ne peut pas résoudre l'équation (2.9), c'est pourquoi un nombre d'approximations est utilisé conduisant à des simplifications qui permettent de résoudre analytiquement l'équation de propagation. Une simplification couramment utilisée est celle de l'*Approximation des enveloppes lentement décroissantes (SVEA²)*, qui consiste à supposer que les enveloppes des champs varient peu sur une longueur d'onde. Mathématiquement, cela se traduit par : $\left| \frac{\partial^2 E}{\partial z^2} \right| \ll \left| 2k \frac{\partial E}{\partial z} \right|$, on peut ainsi négliger la dérivée seconde dans l'équation de propagation.

Dans le cas dépendant du temps (propagation d'impulsions), les enveloppes sont lentement variables en z et en t :

$$\frac{\partial^2 \mathcal{E}}{\partial z^2} = \left(\frac{\partial^2 E}{\partial z^2} + 2ik \frac{\partial E}{\partial z} - k^2 E \right) e^{i(kz - \omega t)} \quad (2.10)$$

$$\frac{\partial^2 \mathcal{E}}{\partial t^2} = \left(\frac{\partial^2 E}{\partial t^2} + 2i\omega \frac{\partial E}{\partial t} - \omega^2 E \right) e^{i(kz - \omega t)} \quad (2.11)$$

ces équations deviennent :

$$\frac{\partial^2 \mathcal{E}}{\partial z^2} \approx \left(2ik \frac{\partial E}{\partial z} - k^2 E \right) e^{i(kz - \omega t)} \quad (2.12)$$

$$\frac{\partial^2 \mathcal{E}}{\partial t^2} \approx \left(2i\omega \frac{\partial E}{\partial t} - \omega^2 E \right) e^{i(kz - \omega t)} \quad (2.13)$$

L'équation de propagation de l'onde constitue l'équation fondamentale de l'optique non-linéaire, qui devient alors :

$$\left(\frac{\partial}{\partial z} + \frac{n}{c} \frac{\partial}{\partial t} \right) E = \frac{i}{2\epsilon_0} \frac{\omega}{nc} P^{NL} e^{-ikz} \quad (2.14)$$

La diffusion Raman stimulée (CARS)

Processus CARS

La diffusion cohérente Raman anti-Stokes (CARS) est un mélange à quatre ondes qui fait intervenir, comme dans le cas de la génération de troi-

²Slowly Varying Envelope Approximation

sième harmonique, le paramètre de susceptibilité $\chi^{(3)}$. Ce processus est donc un processus non-linéaire de troisième ordre basé sur la diffusion Raman, dans lequel interagit un laser pompe et un laser Stokes avec des fréquences ω_P et ω_S respectivement ($\omega_P > \omega_S$) (voir FIG.(2.4,a)). Les champs électromagnétiques respectifs avec des amplitudes E_P et E_S , ayant des vecteurs d'onde k_P et k_S , interagissent avec un milieu, et induisent une polarisation de troisième ordre, qui est décrite par [127, 135] :

$$P^{(3)}(\omega_{AS}) = \epsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_{AS}; \omega_P, \omega_P, -\omega_S) E_P^2(\omega_P) E_S^*(\omega_S) \quad (2.15)$$

Intensité du signal CARS

Pour le calcul de l'intensité du signal CARS, nous allons utiliser l'équation d'onde (2.14) déjà citée dans la partie précédente. Cette équation s'écrit dans le cas de la génération de l'onde anti-Stokes en fonction du champ E_{AS} :

$$\left(\frac{\partial}{\partial z} + \frac{n_a}{c} \frac{\partial}{\partial t} \right) E_{AS}(z, t) = \frac{i}{2\epsilon_0} \frac{\omega_{AS}}{n_a c} P^{(3)} e^{-ik_{AS}z} \quad (2.16)$$

La polarisation anti-Stokes induite lors de l'interaction CARS est décrite dans l'équation (2.15), en fonction des amplitudes des champs *pompe* et *Stokes*. En injectant l'équation (2.15) dans l'équation (2.16), nous retrouvons :

$$\frac{\partial}{\partial z} E_{AS} = i \frac{\omega_{AS}}{n_a c} \chi^{(3)} E_P^2 E_S^* e^{-i\Delta k z} \quad (2.17)$$

Le résultat de l'intégrale de la dernière équation en fonction de z (distance le long de l'axe optique), bornée entre 0 et D , avec la condition initiale $E_{AS}(0) = 0$, s'écrit :

$$E_{AS}(D) = i \frac{\omega_{AS}}{n_a c} \chi^{(3)} E_P^2 E_S^* \frac{e^{i\Delta k D} - 1}{i\Delta k} \quad (2.18)$$

La distance "D" représente la distance de l'interaction CARS, ou la taille de l'échantillon. Comme l'intensité est proportionnelle au carré du champ électrique, nous écrivons :

$$I_{AS} \propto |E_{AS}|^2 = \left(\frac{\omega_{AS}}{n_a c} \right)^2 \cdot |\chi^{(3)}|^2 \cdot I_P^2 \cdot I_S \cdot D^2 \cdot \left(\frac{\sin(\Delta k D / 2)}{\Delta k D / 2} \right)^2 \quad (2.19)$$

Le paramètre Δk exprime la relation entre les vecteurs d'onde des champs impliqués dans le processus CARS ($\Delta k = k_{AS} - (2k_P - k_S)$). Une

condition importante à réaliser pour la génération des ondes cohérentes est appelée "la condition d'accord de phase". Cette condition apparaît dans l'équation (2.19), dans le terme $\text{sinc}(\Delta k D/2)$. La condition d'accord de phase s'écrit, dans ce cas : $\Delta k D \ll \pi$. Cette condition est réalisée lorsque $\Delta k = 0$, ou $D \approx 0$. Pour un échantillon dont la dimension "D" est négligeable devant la longueur d'onde, la condition d'accord de phase est réalisée quelque soit Δk . Dans le cas contraire ($D \gg \lambda_P$), la condition $\Delta k = 0$ reste à vérifier. Dans le cas de la microscopie CARS, cette dernière relation est toujours vérifiée, ceci est dû à l'utilisation d'objectifs à immersion à très grande ouverture numérique qui permettent d'avoir des couples de vecteurs d'onde réalisant toujours la condition d'accord de phase.

D'après la dernière équation, l'intensité du signal anti-Stokes (CARS) dépend linéairement de l'intensité du laser Stokes (I_S), et quadratiquement de l'intensité du laser pompe (I_P) (voir FIG. 2.3), ainsi que du paramètre $\chi^{(3)}$ qui est propre à chaque milieu. Ce paramètre est celui qui va donner la spécificité spectrale de l'outil de spectroscopie CARS.

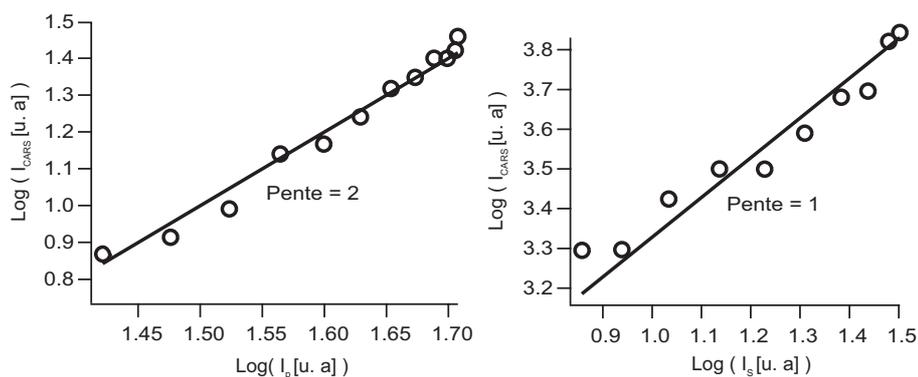


FIG. 2.3 – Intensité du signal CARS généré dans du polystyrène riche en liaisons C=C (fréquence Raman à 1600 cm^{-1}) : (à gauche) dépendance quadratique avec l'intensité du laser pompe, (à droite) dépendance linéaire avec l'intensité du laser Stokes.

Dans la FIG. 2.3, le phénomène de saturation n'est pas une limite comme c'est généralement le cas en fluorescence (état triplet). Cependant en pratique, les puissances lasers utilisées en microscopie CARS sont limitées par les effets thermiques supportables par les échantillons. Ceci dit, à la différence des processus spontanés (fluorescence, Raman), le processus CARS étant cohérent, les vibrations moléculaires oscillent en phase dans le volume

d'excitation, et interfèrent entre elles. Par conséquent, le signal CARS est proportionnel au carré de la concentration des liaisons vibrationnelles³.

Interprétation des spectres CARS

La polarisation du troisième ordre CARS est une source de radiation cohérente à une fréquence plus élevée ω_{AS} ($\omega_{AS} = 2\omega_P - \omega_S$), et résonante lorsque la différence entre les deux fréquences d'excitation correspond à la fréquence Raman résonante et spécifique du milieu ($\omega_P - \omega_S = \Omega_R$) (voir FIG.2.4). Considérons que ces radiations sont émises par un ensemble d'oscillateurs harmoniques, l'équation classique gouvernant le mouvement est donnée par :

$$\ddot{x} + 2\Gamma\dot{x} + \Omega_R^2 x = \frac{F(x, t)}{m}, \quad (2.20)$$

où x est l'élongation par rapport à la position d'équilibre. La fréquence de résonance de cet oscillateur est donnée par : $\Omega_R = \sqrt{\frac{k}{m}} \Rightarrow \Omega_R^2 = \frac{k}{m}$.

Dans une molécule, la lumière interagit avec le moment dipolaire qui s'écrit :

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_{\text{permanent}} + \vec{\mu}_{\text{induit}} \quad (2.21)$$

Le moment induit $\vec{\mu}_{\text{induit}}$ ($\vec{\mu}_{\text{induit}} = \epsilon_0 \alpha^{ij} \mathcal{E}_j$) dépend du champ électrique appliqué \mathcal{E}_j , ainsi que α qui est la polarisabilité. Le paramètre χ est la susceptibilité utilisée dans le cas d'un grand nombre d'atomes et de molécules, or α est utilisé pour un seul atome ou molécule, nous pouvons écrire dans ce cas :

$$\vec{\mu}_{\text{induit}} = \epsilon_0 \left(\alpha^{ij} + \frac{d\alpha^{ij}}{dx} \cdot x + \dots \right) \mathcal{E}_j \quad (2.22)$$

Nous distinguons deux cas à partir de l'équation (2.22) :

- $\vec{\mu}_0 = \epsilon_0 \alpha^{ij} \mathcal{E}_j$ qui correspond à la diffusion *Rayleigh*.
- $\vec{\mu}_1 = \epsilon_0 \frac{d\alpha^{ij}}{dx} \mathcal{E}_j$ qui correspond au processus Raman, où x et \mathcal{E}_j sont deux fonctions harmoniques.

Le mélange de ces deux fonctions harmoniques donne naissance à des nouvelles composantes fréquentielles ($\omega_P \pm \Omega_R$)⁴. Dans le cas de la diffusion

³La dépendance est linéaire dans le cas de la fluorescence ou de la diffusion Raman spontanée.

⁴Lors du développement des équations, ces nouvelles composantes fréquentielles proviennent de l'équation : $\cos(a) \cdot \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a-b) + \cos(a+b)]$.

CARS, cette force dépend des champs électriques appliqués, et peut être écrite :

$$F(x, t) = \frac{\epsilon_0}{2} \left(\frac{d\alpha_{ij}}{dx} E_P E_S^* + c.c. \right) \quad (2.23)$$

Dans ce cas, les champs lasers appliqués \mathcal{E}_P et \mathcal{E}_S sont des ondes planes qui s'écrivent : $\mathcal{E}_j = E_j \cdot e^{i(k_j z - \omega_j t)}$ où, $j = P, S$ (P pour le champ pompe, et S pour le champ Stokes).

en combinant les équations (2.20) et (2.23), une solution est proposée décrite par la fonction harmonique suivante :

$$x(t) = X(z) \cdot e^{-i(kz - \omega t)} + c.c. \quad (2.24)$$

où $X(z)$ est l'amplitude que nous allons calculer par la suite, k est le vecteur d'onde ($k = k_P - k_S$), et ω est la fréquence de vibration ($\omega = \omega_P - \omega_S$). Nous allons appliquer cette solution, dans l'équation (2.20), les trois termes de cette équation deviennent :

$$\begin{aligned} - \ddot{x} : \frac{dx^2}{dt^2} &= (i\omega)^2 x(t) = -\omega^2 x(t) \\ - 2\Gamma \dot{x} : \frac{dx}{dt} &= (2i\omega\Gamma) x(t) \\ - \Omega_R^2 \cdot x(t) & \end{aligned}$$

En remplaçant ces trois parties dans l'équation (2.23), on obtient :

$$X(z) = \frac{\epsilon_0}{m} \left(\frac{\frac{d\alpha_{ij}}{dx} E_P(z) E_S^*(z)}{(\Omega_R^2 - \omega^2 + i(2\Gamma\omega))} \right) \quad (2.25)$$

Le moment induit peut s'écrire dans ce cas :

$$\overset{\rightarrow}{\mu}_{induit} = \epsilon_0 \frac{d\alpha_{ij}}{dx} \cdot x \cdot \mathcal{E}_j \quad (2.26)$$

Dans ce cas la polarisation est $P^{(NL)} = N \cdot \mu_{induit} = N \cdot \epsilon_0 \frac{d\alpha_{ij}}{dx} \cdot x \cdot \mathcal{E}_j$, avec, $\mathcal{E}_j = E_j \cdot e^{i(k_j z - \omega_j t)}$, nous retrouvons :

$$P^{(NL)} = \frac{\epsilon_0^2 \left(\frac{d\alpha_{ij}}{dx} \right)^2 E_P^2 E_S^*}{m [(\Omega_R^2 - \omega^2) + i(2\Gamma\omega)]} \quad (2.27)$$

Comme la polarisation est définie par : $P^{(NL)} = \epsilon_0 \chi^{(3)} E_P^2 E_S^*$, ce qui nous permet d'écrire :

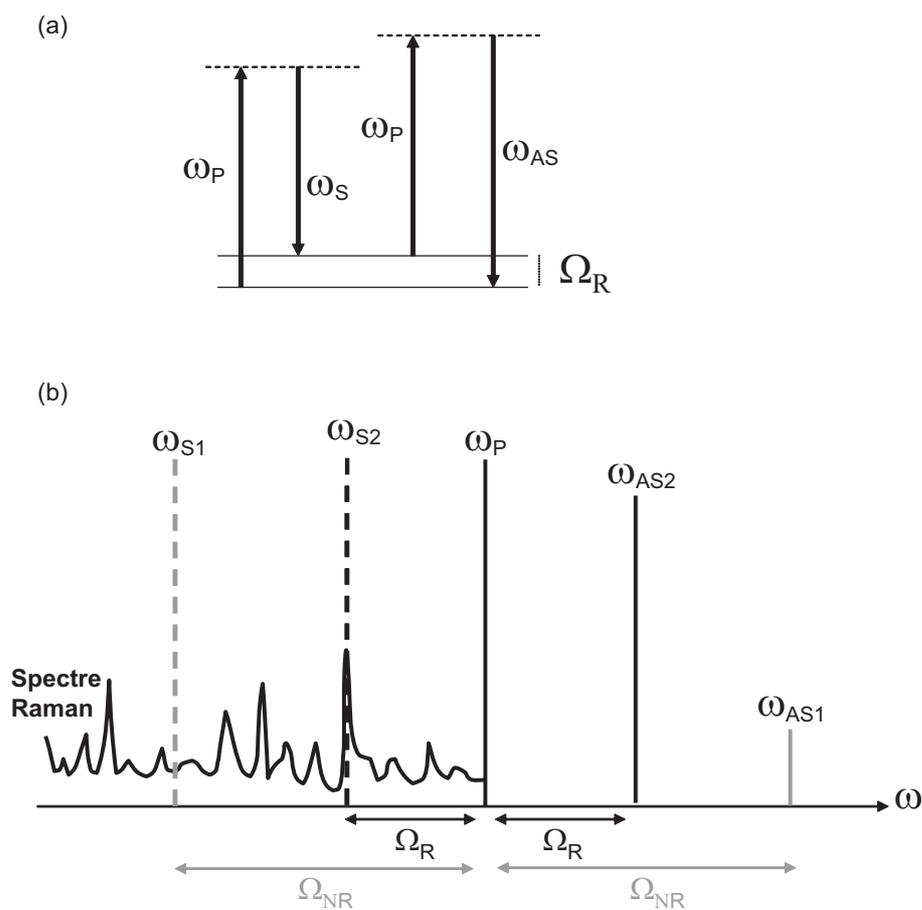


FIG. 2.4 – Schéma du processus CARS. (a) processus CARS résonant ($\omega_P - \omega_S = \Omega_R$). (b) la génération CARS est exaltée pour une résonance Raman de la molécule excitée ($\omega_{AS2} = 2\omega_P - \omega_{S2}$)

$$\chi^{(3)} = \frac{\epsilon_0 \left(\frac{d\alpha_{ij}}{dx}\right)^2}{m [(\Omega_R^2 - \omega^2) + i(2\Gamma\omega)]} \quad (2.28)$$

Lorsque la fréquence de vibration de l'oscillateur est proche de la fréquence de résonance de la bande Raman ($\omega \approx \Omega_R$), on obtient :

$$\Omega_R^2 - \omega^2 + 2i\Gamma\omega = (\Omega_R + \omega)(\Omega_R - \omega) + 2i\Gamma\omega = 2\Omega_R(\Omega_R - \omega + i\Gamma) \quad (2.29)$$

On définit $\chi_r^{(3)}$, impliqué dans la diffusion du Raman résonant ($\omega = \Omega_R$) par :

$$\chi_r^{(3)} = \frac{\epsilon_0}{2m \cdot \Omega_R} \left(\frac{d\alpha}{dx}\right)^2 \quad (2.30)$$

nous pouvons écrire :

$$\chi_R^{(3)} = \frac{\chi_r^{(3)}}{\delta + i\Gamma} \quad (2.31)$$

où δ est l'écart en fréquence défini par : $\delta = \Omega_R - (\omega_P - \omega_S)$.

Au final, nous obtenons :

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)} \quad (2.32)$$

Résumé

La polarisation de troisième ordre induite lors de l'interaction CARS est exprimée avec une partie résonante qui dépend de la réponse Raman de l'échantillon, et une partie non-résonante indépendante des fréquences d'excitation. Cette polarisation s'écrit dans le cas de la diffusion CARS :

$$P^{(3)} = (P_{NR}^{(3)} + P_R^{(3)}) \propto \left(\chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)}\right) E_P^2 E_S^* \quad (2.33)$$

Le paramètre $\chi_R^{(3)}$ est un complexe, $\chi_R^{(3)} = \chi_R' + i\chi_R''$, qui représente la réponse Raman spécifique à chaque liaison chimique, et qui est responsable du mécanisme de contraste dans la microscopie CARS. Ce paramètre s'écrit en fonction de Γ (2Γ est la largeur du niveau vibrationnel Raman), et de l'écart δ , ces deux paramètres étant représentés sur la figure (2.5) :

$$\chi_R' = \frac{\chi_r^{(3)} \delta}{\delta^2 + \Gamma^2} \quad (2.34)$$

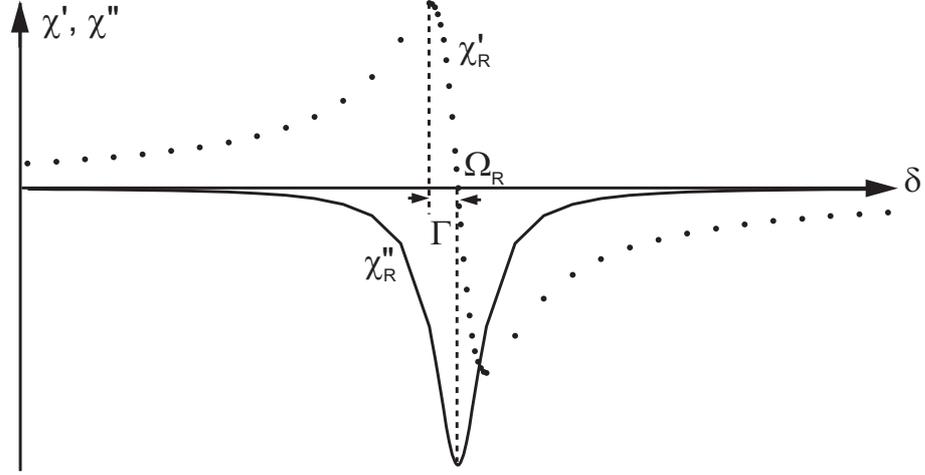


FIG. 2.5 – La partie réelle χ'_R et imaginaire χ''_R de la susceptibilité CARS en fonction de l'écart en fréquence δ .

$$\chi''_R = -\frac{\chi_r^{(3)}\Gamma}{\delta^2 + \Gamma^2} \quad (2.35)$$

Par contre, le terme non-résonant $\chi_{NR}^{(3)}$ est un paramètre réel, qui est indépendant des fréquences d'excitation, et représente la partie du signal générée par les autres liaisons de non-intérêt. Ce bruit de fond limite le contraste et la sensibilité dans la détection CARS, ce que nous allons chercher à minimiser dans l'expérience (voir FIG.(2.4,b) : $\omega_P - \omega_{S1} = \Omega_{NR}$).

L'intensité du signal CARS (I_{CARS}) dépend quadratiquement de la susceptibilité de troisième ordre $\chi^{(3)}$, la courbe $|\chi^{(3)}|^2$ en fonction de l'écart en fréquence δ étant représentée sur la figure (2.6). Cette courbe nous permet de voir la forme générale du spectre CARS, qui apparait, par rapport au spectre Raman spontanée, décalé vers les basses fréquences Raman à cause de la contribution de la partie non-résonante du signal ($\chi_{NR}^{(3)}$). Ce décalage s'écrit :

$$\delta_{max/min} = \Omega_R + \frac{1}{2}\left(-\frac{\chi_R}{\chi_{NR}} \pm \sqrt{\left(\frac{\chi_R}{\chi_{NR}}\right)^2 + 4\Gamma^2}\right) \quad (2.36)$$

Dans le cas où le signal résonant est beaucoup plus fort que le signal non-résonant ($\chi_R \gg \chi_{NR} \Rightarrow \left|\frac{\chi_R}{\chi_{NR}}\right| \gg \Gamma$), ceci nous permet d'écrire :

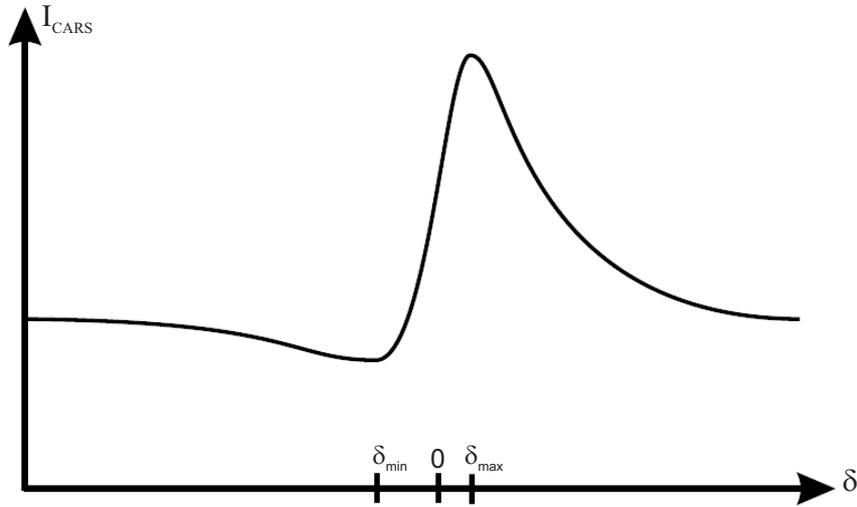


FIG. 2.6 – Le décalage du spectre CARS par rapport au spectre de diffusion Raman spontanée de la molécule qui est dû à l’interférence entre les paramètres (χ_R) et (χ_{NR}) [136].

$$\delta_{max/min} = \Omega_R + \frac{1}{2} \left(-\frac{\chi_R}{\chi_{NR}} \pm \frac{\chi_R}{\chi_{NR}} \right) \quad (2.37)$$

Avec $\delta_{max} \approx \Omega_R$ et $\delta_{min} \approx \Omega_R - \frac{\chi_R}{\chi_{NR}}$, le décalage est donc négligeable lorsque le signal CARS résonant est beaucoup plus fort que le signal CARS non-résonant. Ceci nous permettra de bien comprendre les spectres CARS obtenus dans la partie expérimentale (spectres Deutérium).

La spécificité de la microscopie CARS produisant des images avec un bon contraste (processus cohérent) et une spécificité spectrale, lui a permis d’entrer dans plusieurs champs d’applications. Le paragraphe suivant en décrit quelques unes dans le domaine de l’imagerie cellulaire et tissulaire, ainsi que les développements récents combinant cette technique avec d’autres technologies intéressantes (comme l’interférométrie).

2.4 Imagerie CARS : état de l’art

Une des applications clé de la microscopie CARS est l’imagerie cellulaire non invasive utilisant des liaisons moléculaires naturellement présentes dans la cellule. L’utilisation de lasers infrarouges ayant des puissances d’exci-

tations modérées (quelques centaines de μW) diminue l'endommagement des cellules et permet de réaliser des images avec une bonne résolution spatiale ($\approx \mu m$) sans avoir recours au marquage fluorescent. Différents travaux de recherche démontrent la sensibilité de cette technique aux vibrations de différentes liaisons chimiques. La FIG 2.7 représente une comparaison d'images de cellules obtenues par microscopie DIC⁵ (FIG 2.7(a)) et par microscopie CARS (FIG 2.7(b),(c)). Le contraste CARS est obtenu dans ce cas par l'excitation de la liaison symétrique aliphatique CH_2 (2845 cm^{-1}) qui est présente surtout dans les membranes lipidiques plasmiques et intracellulaires. Les organelles intracellulaires telles que l'appareil de Golgi (autour du noyau) et les petites vésicules sont bien claires en imagerie CARS (alors qu'elle sont non visibles par microscopie DIC).

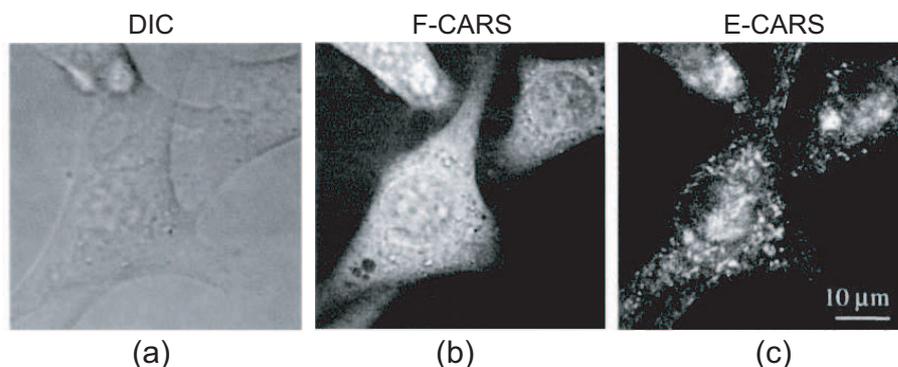


FIG. 2.7 – Images de cellules *NIH 3T3* obtenues par microscopie DIC et par microscopie CARS : les deux faisceaux laser d'excitation à une fréquence pompe de 14054 cm^{-1} et Stokes de 11187 cm^{-1} correspondent à l'excitation de la vibration Raman de la liaison symétrique aliphatique C-H (2845 cm^{-1}). Cette liaison est présente surtout dans les membranes lipidiques plasmiques et intra-cellulaires [25].

A cause de sa spécificité spectrale, l'imagerie CARS offre un important avantage par rapport aux autres techniques de microscopie optique. Cette spécificité a permis de sonder différentes liaisons moléculaires dans différents systèmes cellulaires. A titre d'exemple la liaison C-H a été imagée dans les membranes lipidiques et nucléiques [137–139], de même la liaison P-O (1090 cm^{-1}) s'est révélée détectable dans les chromosomes [25]. Il est également possible d'imager le milieu environnant la cellule comme cela a été fait pour la liaison O-H [140, 141] (étude hydrodynamique dans les cellules).

⁵(DIC) à contraste interférentiel différentiel.

La technique de microscopie CARS a été également utilisée pour l'imagerie de membranes lipidiques artificielles [142, 143], ainsi que pour la caractérisation de différentes protéines [27, 28].

Récemment, l'imagerie in vivo dans des tissus biologiques complexes riches en lipides a été démontrée [29, 30]. La microscopie E-CARS est spécialement utilisée dans ce genre d'applications, pour l'observation des structures fines dans des tissus épais généralement opaques pour la microscopie de transmission. L'excitation dans le proche infrarouge permet d'aller à de très grandes profondeurs dans le tissu (quelques centaines de microns) avec une très bonne qualité d'imagerie (comparable à la microscopie biphotonique), sans avoir à marquer l'échantillon. Prenant l'avantage que le signal anti-Stokes (CARS) est généré à une longueur d'onde plus courte que l'excitation, la fluorescence endogène n'est pas gênante dans cette technique, en plus de

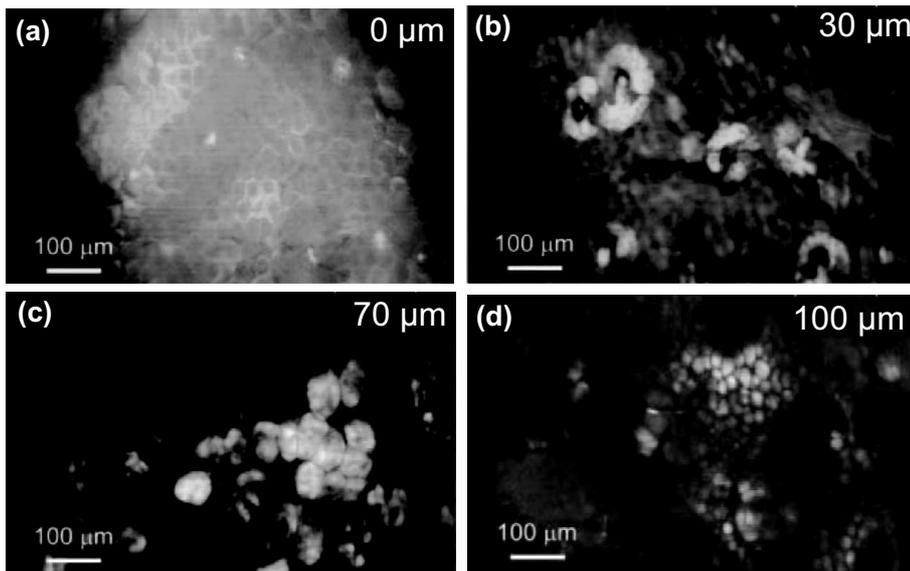


FIG. 2.8 – Images E-CARS de la peau d'oreille de souris à différentes profondeurs : (a) à $0\mu m$, sur la surface de la peau, le stratum corneum (première couche de l'épiderme), les cellules en forme polygonale appelées "Kératynocytes", (b) à $30\mu m$ de profondeur, des glandes lipidiques (*Sébum*) riches en CH_2 , (c) à $70\mu m$ de profondeur, les cellules de la couche dermique appelées "Adipocytes", (d) à $100\mu m$ de profondeur, les cellules "Adipocytes" de la couche subcutanée. Le contraste des images CARS est lié à la présence de la liaison CH_2 dans les composants lipidiques de la peau. [30]

son caractère spectroscopique qui en fait un outil optique prometteur dans le domaine de l'histologie et dans la détection des pathologies.

Il est vrai que cette technique récente a peu de recul dans le cadre des applications biomédicales, mais elle reste en cours d'exploration et de développement, notamment dans le domaine de l'endoscopie [144]. La FIG 2.8 représente des images E-CARS *in vivo* de la peau à différentes profondeurs, le contraste dans l'imagerie étant obtenu par excitation des liaisons CH_2 (2845 cm^{-1}) présentes dans les différentes composantes lipidiques de la peau (cellules, glandes, etc...).

Le marquage au Deutérium

Le signal CARS provenant de la liaison chimique ciblée (signal CARS résonant) est toujours accompagné par un signal CARS généré par les autres liaisons présentes dans l'échantillon (signal CARS non-résonant). Ce signal non-résonant n'a pas de spécificité spectrale et, dans certaines conditions, peut être supérieur au signal résonant⁶. Une telle situation diminue considérablement le contraste de l'image CARS. Une première solution permettant de maximiser le signal résonant consiste à utiliser des impulsions lasers picosecondes (2 à 5 ps) pour optimiser le recouvrement entre la largeur de la bande Raman (10 à 20 cm^{-1}) et celui des impulsions laser pompe et Stokes incidentes. Cependant cette stratégie peut s'avérer insuffisante pour les études dans des domaines spectraux vibrationnels très denses (cas de la région spectrale en dessous de 1500 cm^{-1}) ou pour des constituants fortement représentés dans la cellule. C'est par exemple le cas des lipides qui comportent de nombreuses liaisons CH , CH_2 et CH_3 dont les fréquences de résonance Raman des divers modes de vibrations s'étendent de 2800 cm^{-1} à 3500 cm^{-1} [145]. Il est ainsi difficile de différencier certains lipides car leurs fréquences de vibrations se recouvrent et/ou sont assez similaires. Pour remédier à ce problème en microscopie CARS, on utilise un marquage très peu invasif, qui consiste à remplacer les groupes de liaisons CH_2 par des liaisons de CD_2 . Ceci ne perturbe pas le milieu cellulaire car on remplace l'hydrogène par un atome de deutérium qui lui est très proche. Les liaisons aliphatiques ou aromatiques (CD_2) ont une résonance Raman à 2100 cm^{-1} , située dans une région spectrale entre 1800 et 2700 cm^{-1} que l'on décrit comme "région *silencieuse*" de

⁶Le signal CARS dépend non seulement du nombre des molécules, mais aussi de la force de la liaison chimique ((voir partie suivante "élément de théorie")). Le signal CARS non-résonant qui provient des nombreuses liaisons chimiques présentes dans le solvant et qui est constructif vers l'avant (F-CARS), va noyer le faible signal provenant des quelques molécules constituant les détails que l'on veut observer dans l'échantillon (par exemple la membrane cellulaire dont l'épaisseur n'est que de quelques nanomètres).

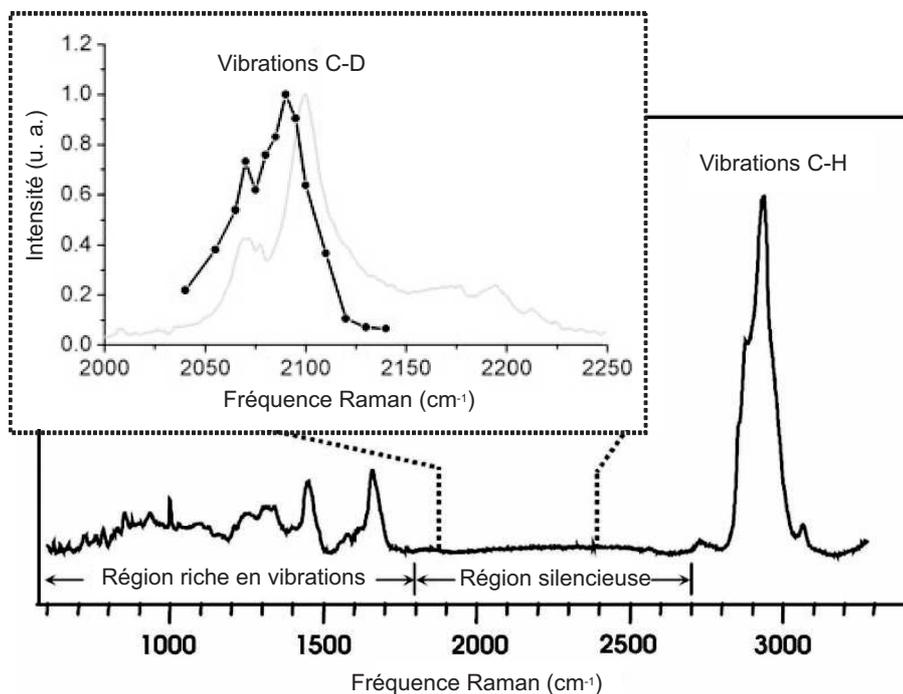


FIG. 2.9 – Spectre Raman dans des cellules *HeLa* séchées. Une région du spectre Raman est "silencieuse" entre 1800 et 2700 cm^{-1} . (en haut) Spectre CARS d'un lipide (DSPC) marqué au deutérium ($[\text{D}_{70}]$ DSPC), montrant un pic de résonance de la liaison CD_2 à 2100 cm^{-1} [146].

la cellule car très peu encombrée par les signatures Raman des autres liaisons endogènes présentes dans la cellule [146].

La FIG 2.9 montre le spectre CARS d'un lipide (DSPC)⁷ marqué au deutérium (DSPC(D70)) riche en liaisons CD_2 . La résonance de cette liaison (2100 cm^{-1}) se situe dans une région propre spectralement par rapport aux résonances des liaisons C-H dans les cellules *HeLa*. Plusieurs applications découlent de cette spécificité, que ce soit pour l'imagerie des cellules vivantes [137], ou pour étudier les ségrégations de phases et l'implication du cholestérol dans les membranes lipidiques modèles de vésicules géantes (*GUVs*)⁸ [146, 147].

⁷1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine.

⁸Giant Unilamellar Vesicles.

2.5 Développements récents

La Microscopie/Spectroscopie CARS

La microscopie CARS est combinée avec différentes techniques de spectroscopie, dont la spectroscopie M-CARS qui est utilisée depuis quelques temps pour l'étude des structures physicochimiques de différents échantillons [148]. La technique de microscopie *Multiplex-CARS* (M-CARS) consiste en l'utilisation de deux lasers (pompe et Stokes), le premier laser impulsionnel fonctionnant en régime picoseconde et l'autre en régime femtoseconde (voir FIG 2.10). Ce dernier permet d'exciter une large plage spectrale (limitée par la largeur spectrale de l'impulsion laser utilisée). L'objectif de ce genre de montage est d'avoir un double outil de microscopie/spectroscopie CARS.

L'excitation avec deux lasers impulsionnels picosecondes augmente la sensibilité⁹ et le contraste dans l'imagerie par rapport à l'excitation avec des lasers femtosecondes (excitation de plusieurs niveaux vibrationnels). Néanmoins, la nécessité d'avoir des spectres CARS des différents échantillons biologiques étudiés rend la technique M-CARS indispensable. En effet, en utilisant la microscopie CARS avec des lasers picosecondes, les spectres CARS sont enregistrés en faisant une acquisition point par point, en changeant la longueur d'onde Stokes, et ceci peut prendre un temps très important, ce qui limite cette technique pour l'étude des variations dynamiques spectrales. La microscopie M-CARS apporte un énorme avantage, car il n'y a plus besoin de balayage de la longueur d'onde dans l'intervalle spectral d'intérêt. Ainsi le spectre CARS est enregistré simultanément (voir la FIG 2.10).

Dans le domaine de la biologie, la technique M-CARS est spécifiquement utilisée pour la caractérisation des lipides (ex : DOPC, DSPC, POPS, etc.)¹⁰ [142, 149] et protéines (ex : AMP, ADP, ATP et NAD⁺)¹¹ [150], ainsi que pour l'étude de l'organisation et de l'état thermodynamique des systèmes de bicouches lipidiques [26, 151, 152].

Comme la microscopie par corrélation de fluorescence (FCS), la microscopie par corrélation de la diffusion CARS (CS-CARS) a été utilisée

⁹La largeur spectrale des impulsions picosecondes est comparable à la largeur du niveau Raman (2-3 cm⁻¹).

¹⁰DOPC : 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, POPS : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine.

¹¹AMP, ADP, ATP : Adénosine Mono-, Di-, et Triphosphate, NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucleotide.

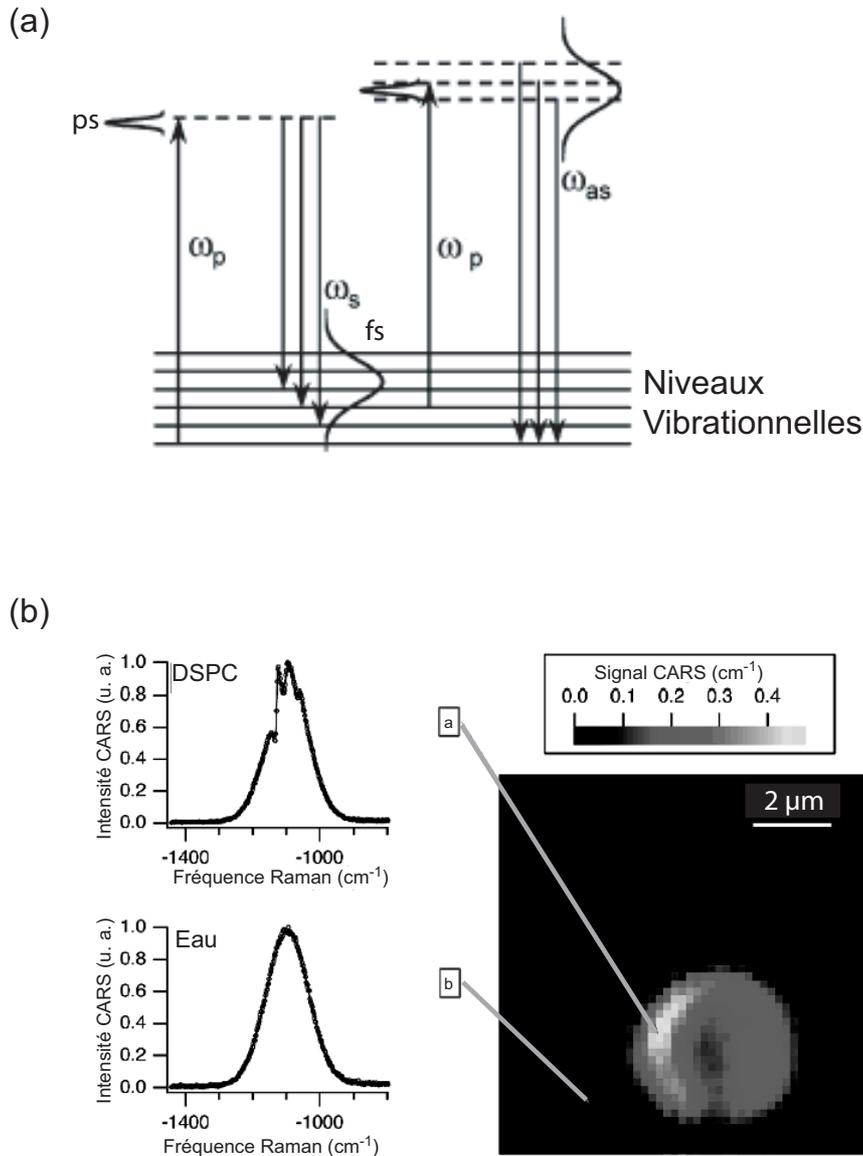


FIG. 2.10 – Principe du microscope M-CARS : (a) Diagramme d'énergie de la contribution résonante du signal M-CARS, le faisceau pompe ω_P est en régime picoseconde (ps), alors que le faisceau Stokes ω_S est en régime femtoseconde (fs) (large spectralement). (b) Image M-CARS d'une vésicule multilamellaire en DSPC, le contraste est obtenu à 1128 cm^{-1} . Spectre CARS du (a) lipide (DSPC), (b) eau.

pour l'étude des processus dynamiques en analysant les fluctuations du signal CARS dans des petits volumes d'observation. Cette technique a permis l'analyse des dynamiques de diffusion tridimensionnelle de billes ou d'agrégats moléculaires avec une grande sensibilité [153, 154].

Microscopie/Interférométrie CARS

Dans les techniques basées sur l'interférométrie non-linéaire de la génération CARS [155, 156], le champ CARS généré par l'échantillon est mélangé avec un champ oscillateur local qui provient d'une autre source de signal CARS non-résonant. Cette méthode de détection est appelée la détection *hétérodyne* ou OHD (Optical Heterodyne Detection). Dans la technique de microscopie/interférométrie CARS, comme les deux champs anti-Stokes générés dans chaque bras d'un interféromètre de Mach-Zehnder sont cohérents entre eux, la différence de phase peut être contrôlée par la variation d'un délai optique entre les deux sources CARS. La suppression du signal non-résonant CARS est ainsi obtenue par la modulation de la phase du champ. Le potentiel de l'interférométrie/microscopie CARS dans l'amélioration de la sensibilité et du contraste par la suppression du bruit non-résonant, sans atténuation du signal comme dans le cas de la technique P-CARS, est exploité en utilisant une détection dans le domaine temporel [157, 158] ainsi que dans le domaine fréquentiel [159]. Plusieurs applications dans le domaine de la biologie prennent l'avantage de la détection hétérodyne dans la microscopie CARS pour l'étude des monocouches [151], et des bicouches lipidiques, ainsi que dans l'imagerie cellulaire (voir FIG 2.11) [160, 161].

Récemment, Silberberg et son équipe [132, 162] ont introduit une approche différente utilisant, pour contrôler la phase des ondes d'excitation en CARS, des techniques de contrôle cohérent. Le grand avantage qu'apporte cette technique est que l'excitation provient d'un seul laser impulsionnel ultra-court (dizaines de femtosecondes). Ce laser est assez large spectralement pour contenir les deux fréquences pompe et Stokes nécessaires pour l'interaction CARS. La phase spectrale des impulsions provenant de ce laser est contrôlée en utilisant un modulateur spatial à cristaux liquides (SLM), la résolution spectrale dans ce cas étant limitée par la taille de pixel du SLM. En variant cette phase, les différentes composantes spectrales de l'impulsion contrôlée varient, l'interférence CARS dans l'échantillon est plus ou moins constructive, ce qui permet d'augmenter le contraste dans l'image, tout en réduisant le signal non-résonant. Plusieurs démonstrations ont été rapportées, où le signal non-résonant CARS est largement réduit [163, 164].

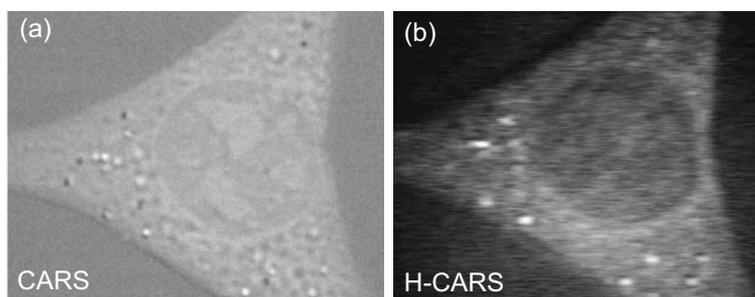


FIG. 2.11 – Comparaison entre images CARS de cellules vivantes *NIH 3T3* obtenues avec la microscopie/interférométrie CARS par excitation de la liaison CH_2 à 2845 cm^{-1} . (a) le signal non-résonant fort diminue le contraste de l'image. (b) l'image après suppression du signal non-résonant [161].

2.6 Conclusion

La microscopie par diffusion cohérente Raman anti-Stokes est une des techniques de microscopies les plus récentes. Elle comporte plusieurs avantages (déjà cités), mais reste assez compliquée pour être utilisée par des biologistes ou des médecins (il s'agit pour l'instant d'un outil de physiciens!). Elle est par ailleurs assez coûteuse pour le moment, car elle utilise des montages expérimentaux compliqués à gérer. Néanmoins, l'application de cette technique dans le domaine biomédical est très prometteuse, car en dépit de sa complexité, elle présente des avantages attrayants pour les sciences du vivant.

Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur les spécificités de la génération CARS en microscopie, ce qui permet de comprendre les subtilités de l'outil de microscopie/spectroscopie CARS par rapport aux autres techniques. Cette description théorique nous a permis de situer les avantages et les inconvénients de cette technique par rapport à des techniques basées sur des effets non-linéaires assez proches de la génération CARS, et permet aussi d'appréhender nos choix expérimentaux qui seront décrits au chapitre suivant, ainsi que les résultats obtenus lors de ce travail de thèse.

Troisième partie

Mise en place du système expérimental

Chapitre 3

Systemes lasers pour la microscopie CARS

Sommaire

3.1	Introduction	59
3.2	Le laser saphir dopé titane	60
3.2.1	Blocage des modes : Effet Kerr	63
3.2.2	Contrôle de la durée des impulsions : Interféromètre Gires-Tournois	65
3.3	Synchronisation des cavités laser	66
3.4	Division de fréquence	68
3.5	Contrôle de la synchronisation	70
3.5.1	Synchronisation par autocorrélation optique	71
3.5.2	Synchronisation par absorption à deux photons	75
3.6	Conclusion	77

3.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'avantage principal de la génération CARS est le fort signal produit dû à l'efficacité de transfert de l'énergie au champ $E_{AS}(\omega_{AS})$ ainsi que la nature cohérente de l'émission. Comme le signal généré CARS est des millions de fois plus fort que la diffusion Raman spontanée, l'outil de microscopie CARS est idéal pour étudier de très basses concentrations de liaisons chimiques d'intérêt dans les échantillons. Par contre, l'inconvénient majeur lors de la mise en oeuvre de la

technique de microscopie CARS est la contribution au signal des états non-résonants qui vont causer un fort signal de fond (background) et masquer le signal résonant. Nous avons vu que ceci peut être contourné par l'utilisation de la détection arrière (E-CARS) ou par diverses autres techniques (P-CARS, C-CARS, interférométrie, etc...). Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en oeuvre un microscope CARS en configuration colinéaire (voir FIG. 2.2a) avec une détection avant (F-CARS) et arrière (E-CARS). Ce choix vient de la simplicité relative de réaliser ce type de montage dans un microscope inversé. Le système laser ainsi que ses accessoires (systèmes de synchronisation, diviseurs de fréquence, etc...) ont été choisis afin de réaliser le montage expérimental, respectant certaines conditions, qui sont :

- **Sources lasers accordables** : l'utilisation d'une source laser accordable permet de faire varier l'écart en fréquence entre le laser pompe et Stokes afin de sonder différents niveaux vibrationnels correspondants aux différentes liaisons moléculaires.
- **Puissances crêtes importantes** : l'intensité du signal CARS dépend de l'intensité des lasers excitateurs. Pour générer une onde CARS efficacement, des lasers impulsionsnels avec d'importantes puissances crêtes sont utilisés.
- **Synchronisation des impulsions** : pour produire l'effet non-linéaire et générer l'onde anti-Stokes, les impulsions provenant des lasers pompe et Stokes doivent être superposées temporellement (et spatialement) dans l'échantillon.
- **Puissance moyenne faible** : la puissance moyenne dépend de la fréquence des lasers. Généralement, des cellules de Bragg (diviseurs de fréquence) sont utilisées pour diminuer la cadence (fréquence) des lasers impulsionsnels, ce qui permet de ne pas endommager les échantillons biologiques.

En résumé, la microscopie non-linéaire CARS est basée sur un processus multi-photonique (mélange à quatre ondes) qui nécessite l'utilisation de faisceaux lasers impulsionsnels. Le choix d'utiliser des lasers à saphir dopé au titane sera justifié et leur caractérisation sera décrite dans la première partie de ce chapitre. Dans les parties qui suivent, nous nous proposons de décrire succinctement chaque partie de ce dispositif complexe afin de comprendre les conditions et contraintes expérimentales que nécessite la microscopie CARS.

3.2 Le laser saphir dopé titane

La source la mieux adaptée pour les applications de microscopie multiphotonique est le laser à saphir dopé au titane [103, 165]. En effet, il est à ce jour la seule source capable de générer des impulsions de durée allant de quelques dizaines de femtosecondes à quelques picosecondes, à des fré-

quences de répétition élevées (autour de 80 Mhz) et accordable en longueur d'onde de 690 à 1000 nm [166]. Cette large gamme permettra l'excitation de tout un domaine de niveaux vibrationnels de liaisons chimiques. Dans le cadre de notre projet, nous utiliserons deux sources laser commerciales à saphir dopé au titane (Pompe et Stokes) : le modèle MIRA-900 (COHERENT, USA), pompé en régime continu à 532 nm avec une puissance de 5 W par un laser tout solide pompé par diodes. Ce dernier laser est le Nd : vanadate (Nd : YVO4) doublé en fréquence grâce à un cristal de LBO, (VERDI, COHERENT, USA). L'utilisation de sources laser solides présente certains intérêts : ces sources sont compactes, très stables et ne nécessitent que très peu d'entretien (en comparaison au laser à saphir dopé au titane pompé par laser à argon).

La génération d'impulsions ultra-brèves requiert l'utilisation de matériaux caractérisés par un spectre d'émission de fluorescence large, la durée des impulsions ($\Delta\tau$) étant inversement proportionnelle à la largeur du spectre en fréquence ($\Delta\nu$) (principe d'incertitude d'Heisenberg : $\Delta\tau \cdot \Delta\nu \geq cte$).

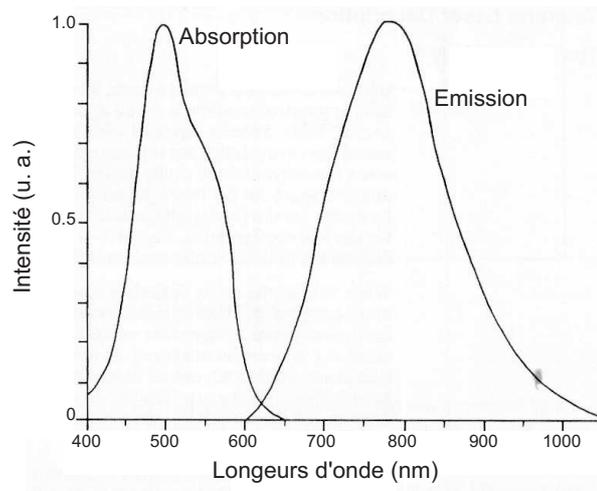


FIG. 3.1 – Courbes d'absorption et d'émission du cristal saphir dopé au titane.

Dans le cristal de saphir dopé au titane ($Ti^{3+} - Al_2O_3$), le couplage entre les niveaux d'énergie de l'ion (Ti^{3+}), et l'interaction du cristal avec les photons du faisceau d'excitation contribuent lors de la relaxation à créer un continuum de niveaux d'énergie plus large que dans les lasers à colorants. La caractéristique principale est la très large bande d'absorption s'étalant

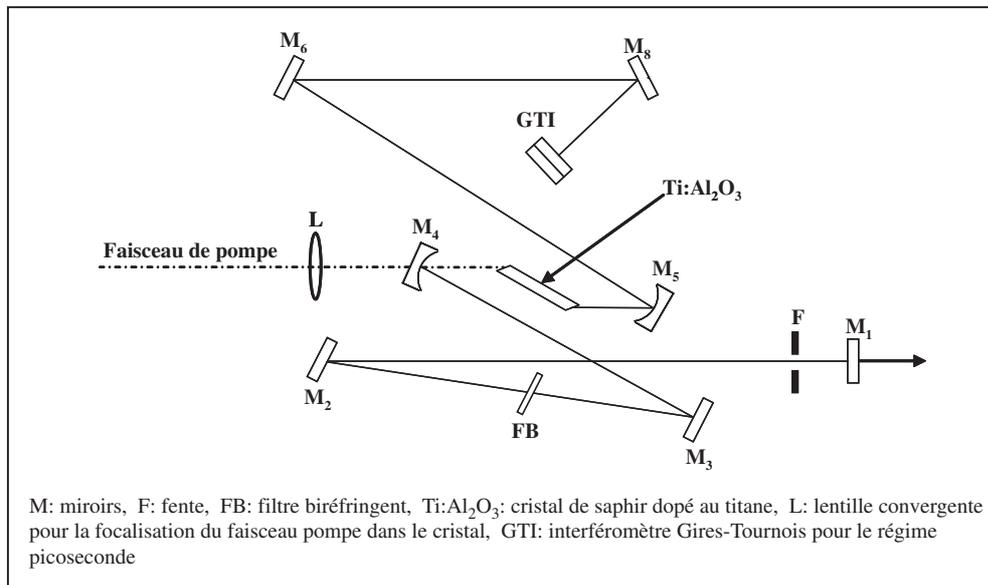


FIG. 3.2 – Schéma de l'oscillateur laser picoseconde à saphir dopé au titane.

de 400 à 600 nm et une large bande de fluorescence entre 650 et 1100 nm présentant un maximum à 750 nm (voir FIG.3.1) [167]. Ce cristal constitue donc un excellent candidat pour la production d'impulsions courtes.

Nous rappellerons ici brièvement le principe de fonctionnement de l'oscillateur picoseconde à saphir dopé au titane utilisé dans cette expérience (voir FIG.3.2). Comme nous venons de l'indiquer, l'oscillateur laser utilise comme milieu à gain le cristal de saphir dopé au titane. L'inversion de population est réalisée au moyen du laser de pompe focalisé dans le cristal par la lentille convergente L. La méthode utilisée pour la production d'impulsions est le verrouillage de modes passif basé sur l'effet Kerr [166]. Dans la plupart des lasers qui émettent en continu, seuls quelques modes longitudinaux¹ de la cavité sont émis à chaque instant. Pour le cas du laser saphir titane 5.10^4 modes oscillent dans la cavité².

¹Un laser oscille simultanément sur toutes les fréquences de résonance de la cavité ($\nu_q \approx q.c/2L$ où q est un entier, c est la vitesse de la lumière et L la longueur de la cavité) pour lesquelles le gain non saturé est supérieur aux pertes de la cavité : ces fréquences constituent les modes longitudinaux du laser.

²Les ondes émises oscillent de manière indépendante et subissent en permanence des sauts de phase et de fréquence de sorte que l'intensité résultante est constante en moyenne et bruitée par les battements aléatoires entre les modes émis.

3.2.1 Blocage des modes : Effet Kerr

La génération d'un train périodique d'impulsions lumineuses repose sur l'idée suivante : il faut des conditions telles que toutes les ondes qui se superposent soient synchrones à un instant donné. Alors les champs électromagnétiques s'ajoutent de manière constructive à cet instant. Si l'on s'écarte de cet instant, les ondes se désynchronisent à cause de leur différence de fréquence et peu à peu les amplitudes s'annihilent les unes les autres : il se crée ainsi une impulsion. Après un temps égal à l'inverse de la différence de fréquence entre les ondes (soit un temps d'un aller retour dans la cavité " $2L/c$ "), elles se retrouvent à nouveau synchrones, et une nouvelle impulsion se forme. Pour créer une impulsion, il suffit donc de faire passer le plus grand nombre possible de modes d'une cavité laser par un même point. On montre que plus le nombre de modes est important, plus l'amplitude de l'impulsion est grande. Lorsque la densité de puissance crête dans la cavité, et donc dans le cristal est très élevée, il apparaît une variation non linéaire de l'indice de réfraction du cristal : c'est l'effet Kerr. Le cristal se comporte alors comme une lentille convergente. C'est le phénomène d'autofocalisation. Cette autofocalisation est à l'origine du verrouillage en phase des modes de la cavité. Il se traduit par une diminution de la section du faisceau. Si le laser fonctionne en mode continu, le phénomène non linéaire d'autofocalisation ne peut avoir lieu, et la section du faisceau est plus grande. Il suffit alors d'introduire dans la cavité une fente, dont l'ouverture est plus petite que le diamètre du faisceau continu mais plus grande que la section du faisceau impulsionnel. Cette fente va être à l'origine de pertes plus importantes pour le régime continu que pour le régime impulsionnel (FIG.3.3). L'oscillateur fonctionne ainsi préférentiellement en régime impulsionnel. Cependant, un oscillateur à saphir dopé au

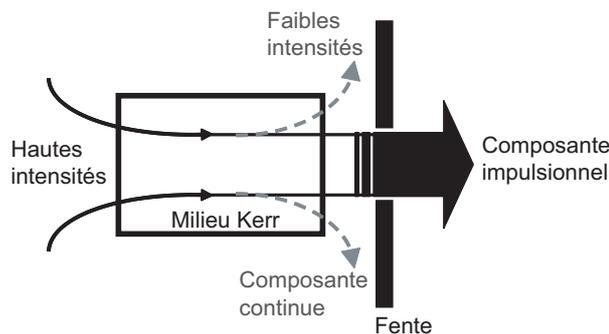


FIG. 3.3 – Illustration du phénomène d'autofocalisation par effet Kerr et sélection par une fente du régime impulsionnel.

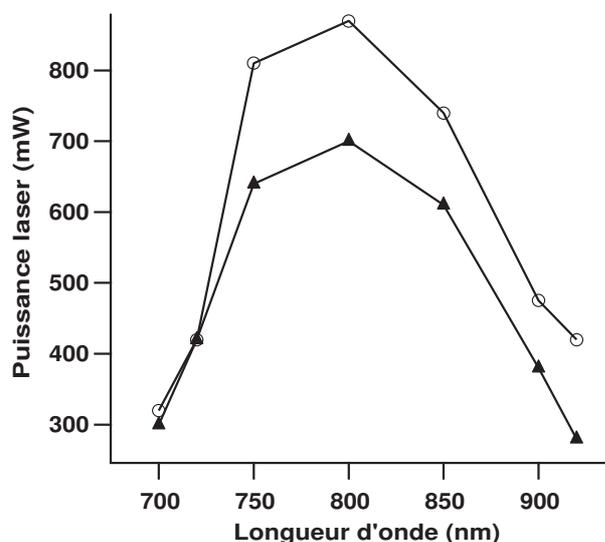


FIG. 3.4 – Courbes de puissances optiques à la sortie des lasers (Sa-Ti) en fonction de la longueur d'onde.

titane pompé en continu est stable en mode continu, les non-linéarités du cristal n'étant pas suffisantes pour démarrer le verrouillage de modes par effet Kerr. Le mode de fonctionnement impulsionnel est ici amorcé grâce à un système créant une perturbation dans la cavité à l'aide d'une lame de verre montée sur un galvanomètre (l'oscillation de la lame induit des variations rapides de la longueur de la cavité et donc des battements de modes qui induisent une modulation temporelle).

Le laser utilisé dans notre montage fonctionne à une fréquence de 80 MHz. La polarisation du faisceau en sortie du laser est horizontale. La cavité de notre laser MIRA 900 est d'autre part muni d'un jeu de miroirs large bande permettant une accordabilité entre 690 et 1000 nm par rotation du filtre biréfringent (FB). Dans notre expérience, la largeur de ces impulsions par rapport à la largeur du niveau de vibration Raman de la molécule doit satisfaire la relation $(\omega_{pompe} \pm \delta\omega_{pompe}) - (\omega_{Stokes} \pm \delta\omega_{Stokes}) = (\Omega_R \pm \delta\Omega_R)$, ce qui nous impose de travailler en régime picoseconde (3 picosecondes), pour avoir des impulsions étroites spectralement. Cette largeur est imposée par l'utilisation d'un interféromètre Gires-Tournois (voir FIG. 3.2).

3.2.2 Contrôle de la durée des impulsions : Interféromètre Gires-Tournois

Les miroirs de l'interféromètre Gires-Tournois (GTI) [168], ont pour rôle d'introduire dans la cavité une dispersion modale afin de compenser le déphasage de toutes les composantes dues à l'automodulation de la phase et à la dispersion imposée par le cristal de saphir dopé au titane. Ceci permet de compenser au mieux la dispersion globale de la cavité, assurant ainsi une compression optimale des impulsions générées. Un miroir GTI est typiquement un étalon de type Fabry-Pérot (FP) ayant pour caractéristique une réflexion totale sur sa face arrière associée à une faible réflexion sur sa face avant (voir FIG.3.5). Un miroir GTI peut être fabriqué en ajoutant une faible cavité sur la face avant d'un miroir dichroïque construit avec des empilements quart-d'onde de matériaux de différents indices de réfraction. Cette cavité ne change pas significativement la réflectivité globale du miroir mais crée un changement très rapide de la phase à la réflexion ce qui conduit à une modification significative de l'impulsion. La dispersion du GTI est déterminée, comme tout étalon de FP, par l'épaisseur de l'étalon et par la réflectivité de ses miroirs. L'épaisseur de l'étalon est conçue en insérant une couche large d'empilements demi onde d'indice de réfraction faible suivie d'une couche quart d'onde d'indice de réfraction élevé. Naturellement, la dispersion induite par le GTI peut être ajustée en changeant l'angle d'incidence.

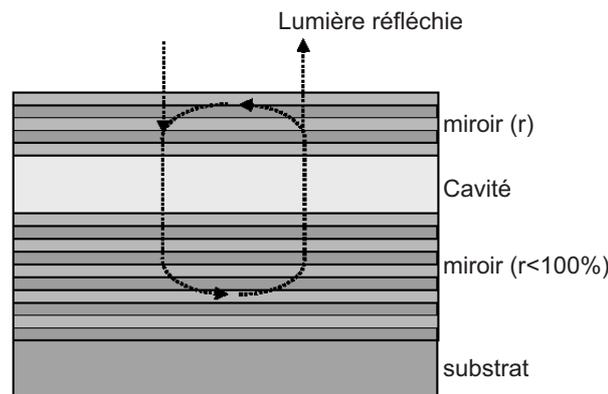


FIG. 3.5 – Représentation schématique d'un interféromètre Gires-Tournois.

3.3 Le système de synchronisation (Synchro-Lock)

La génération du signal CARS nécessite l'utilisation simultanée de deux trains d'impulsions laser, le premier à la fréquence pompe et le deuxième à la fréquence Stokes. En conséquence, on utilise deux cavités laser différentes pour la génération des impulsions, avec blocage de modes par effet Kerr, ce qui nécessite de synchroniser les deux trains d'impulsions par rapport à une horloge extérieure en utilisant un système électronique (SynchroLock900) communiquant avec les deux cavités lasers. Ceci nous permet non seulement de synchroniser les deux fréquences lasers, mais aussi de le faire avec une très bonne résolution temporelle ("timing jitter" $\approx 150\text{fs}$ pour une largeur d'impulsion de 3 ps).

Dans le cadre de notre expérience, ce système travaille de la façon suivante : dans la cavité du laser saphir titane, un des miroirs de la cavité est monté sur un élément piézo-électrique (PZT). Ce miroir sert à ajuster la longueur de la cavité afin d'obtenir une fréquence de tirs d'impulsions de l'ordre de 76MHz. Une partie du faisceau laser est prélevée par une photodiode ultra-rapide, qui envoie ce signal électronique au système de synchronisation (SynchroLock900, COHERENT, USA). Ce dernier va tenter de comparer les fréquences des deux trains d'impulsions prélevés sur les deux lasers (en configuration maître et esclave) au niveau du "phase shifter" (PS) (voir FIG.3.6), et d'ajuster la longueur de la deuxième cavité (laser esclave) de façon qu'il soit synchronisé avec le laser maître. Le principe de cette synchronisation est de comparer la fréquence du laser maître à une horloge extérieure de même fréquence (76 MHz), puis de la comparer avec celle du laser esclave.

L'ajustement grossier de la fréquence des deux lasers se fait à 76 MHz, l'ajustement fin se fait en générant la neuvième harmonique (684 MHz), qui va régler les deux trains d'impulsions à une échelle sub 250 fs (4.10 Hz), en envoyant un signal électronique aux servos qui le transforment en une commande électrique pour déplacer le piézo-miroir. Ainsi, on agit directement sur la cavité du laser esclave pour minimiser la différence de fréquence. Si au niveau de la boucle de comparaison entre les deux fréquences, cette différence n'est pas nulle, le système tente de recommencer la procédure de synchronisation, jusqu'à ce que la différence de fréquence enregistrée par les PS soit nulle.

Le système de synchronisation est contrôlé automatiquement par une unité informatique, qui nous permet d'accéder à quelques paramètres de synchronisation tels que : le délai désiré entre les impulsions, le courant appliqué sur

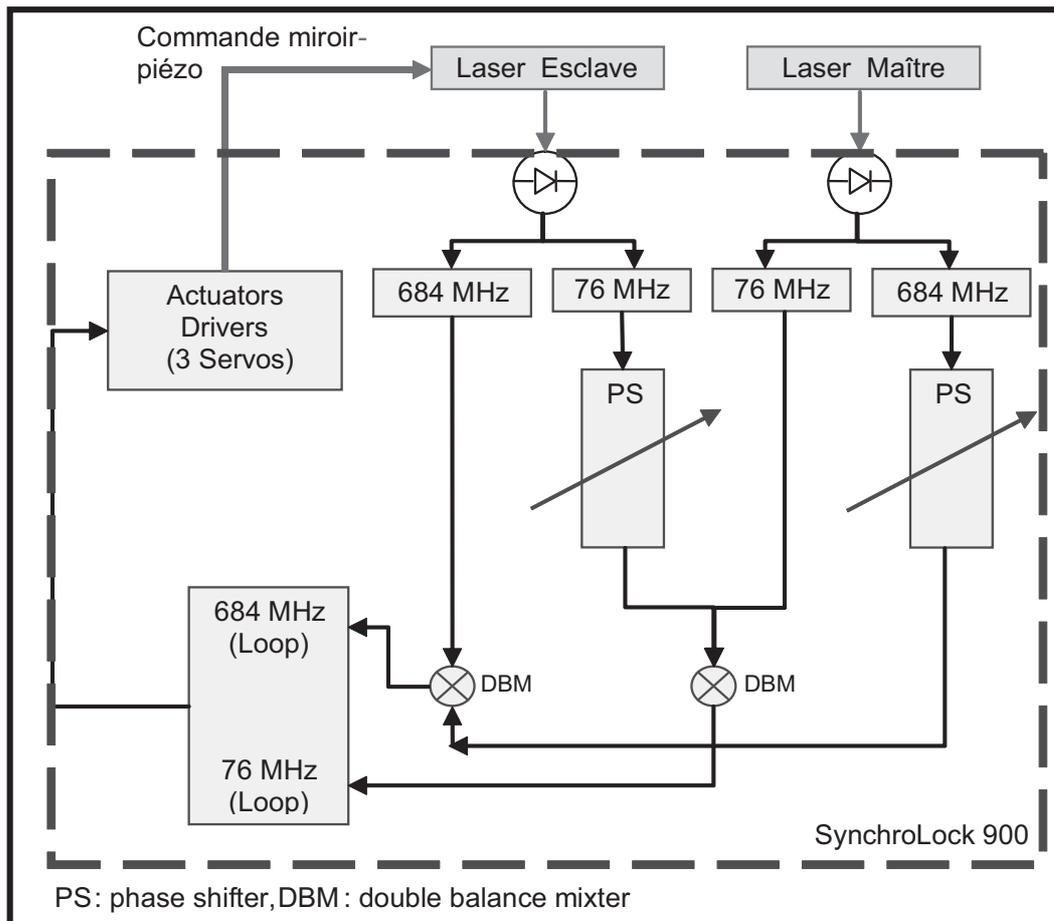


FIG. 3.6 – Configuration électronique du système de synchronisation des impulsions laser (SynchroLock900).

le miroir (PZT) et sur les paramètres des photodiodes (gain), ainsi qu'aux fenêtres de calibration des positions des miroirs dans la cavité, en plus de la fenêtre de contrôle manuel du moteur de déplacement du miroir.

3.4 Le système de division de fréquence (Pulse Picker)

Pour un bon nombre de lasers fonctionnant en régime de blocage de modes, la fréquence des impulsions est autour de 80 MHz. Cette fréquence correspond à une durée entre deux impulsions d'environ 12.5 ns. Pour certaines applications entraînant la mesure des temps de durée de vie de la fluorescence par exemple dans le cas de la technique FLIM, cette grande fréquence de tirs constitue un important avantage. Par contre, dans le cas de la microscopie CARS, une grande fréquence de tir n'est pas nécessaire, sachant que l'efficacité de la génération du signal CARS dépend de la puissance crête des impulsions³. Dans notre dispositif de microscopie CARS, nous allons tenter de réduire la puissance moyenne⁴ qui dépend essentiellement de la fréquence de tirs des impulsions laser, afin de ne pas endommager les échantillons surtout dans les cas d'applications en biologie.

Afin d'atteindre cet objectif, un système opto-électronique est utilisé (Pulse Select, APE, Allemagne). Le principe de fonctionnement de ce système repose sur un effet acousto-optique qui fonctionne de la manière suivante : Les contraintes mécaniques produites par une onde acoustique se propageant dans un milieu génèrent, du fait de l'effet photoélastique, une modification de l'indice de réfraction. Une onde acoustique variant périodiquement va produire un réseau d'indice de réfraction de même période. Une onde optique interagissant avec ce réseau va être diffractée :

- Soit suivant plusieurs ordres, c'est le régime de Raman-Nath.
- Soit suivant un seul ordre, c'est le régime de Bragg.

Les modulateurs de Bragg sont capables de fonctionner comme commutateurs puisque le faisceau de sortie fait un angle avec le faisceau d'entrée. Si la fréquence de l'onde acoustique est maintenue constante, le faisceau peut être commuté de $2\theta_B$ (voir FIG.3.7), en appliquant une puissance acoustique suffisante pour produire dans la cellule acousto-optique 60% de diffraction

³ $Energie(Joules) = P_{crête} \times \Delta\tau = 4KW \times 3ps = 12nJ$

⁴ $P_{moyenne} = E \times Cadence = 12nJ \times 80MHz = 1W$

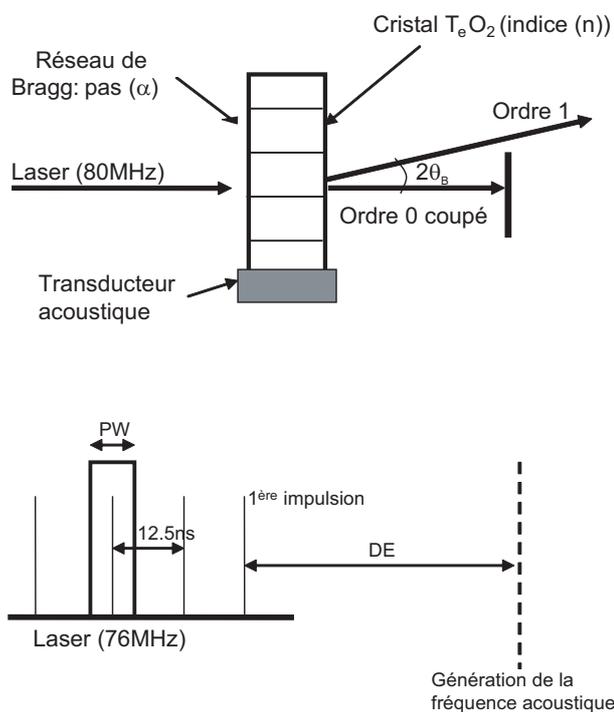


FIG. 3.7 – Schéma du principe de fonctionnement du diviseur de fréquence (Pulse Select) : (en haut) diffraction de Bragg dans la cellule acousto-optique, (en bas) schéma des Commandes du transducteur acoustique.

de l'ordre 0 dans l'ordre 1. Le système de modulation (division) de fréquence (Pulse Select) utilisé dans le montage expérimental est constitué de deux modules : un module optique, et un module électronique de contrôle. Le module optique contient une cellule de Bragg avec deux miroirs de focalisation, et une lame opaque pour bloquer l'ordre 0 de diffraction. Le module électronique comporte un modulateur de signaux RF générant le réseau de diffraction. Une interface électronique permet la synchronisation du signal RF avec les systèmes laser qui se fait par injection d'un signal électronique provenant de la cavité laser et correspondant à la fréquence du laser saphir titane (maître). La partie du module électronique nous permet d'accéder à plusieurs paramètres du transducteur acousto-optique, ceci nous permet de varier les propriétés du train d'impulsions à la sortie du système. Ces paramètres sont sélectionnés sur l'écran d'affichage, et les plus utilisés sont décrits dans le schéma de la (FIG.3.7).

Commandes du transducteur acoustique :

- **DR (taux de division)** : Cette fonction permet de sélectionner le taux de division de la fréquence laser. La fréquence de génération des ondes acoustiques est égale à 4MHz au maximum pour $DR=20$ ($80\text{MHz}/20$), toutes les 20ème pulsations le laser est diffracté au premier ordre. La fréquence minimale est à 16KHz pour $DR=5000$. La cadence de sortie est limitée par le temps d'accès (temps de parcours de l'onde acoustique dans le milieu optique : typiquement de l'ordre de $1.68 \mu\text{s}/\text{cm}$ pour la silice). Pour améliorer cette caractéristique le faisceau lumineux est focalisé dans le cristal à l'aide de deux miroirs concaves.
- **PO (puissance du signal acoustique (RF))** : A un taux de division ($DR < 40$) (grande fréquence laser), la puissance (PO) de l'onde acoustique est limitée à 16.5 W. Dans le cas d'un fonctionnement en continu (le signal de sortie à 80 MHz) la puissance est limitée à 300 mW, afin de ne pas endommager le cristal.
- **PW (largeur de l'impulsion)** : La modulation se comporte comme une porte pour sélectionner les impulsions laser (durée de vie du réseau). Dans notre expérience la durée de vie correspond à $PW(\text{optimum})= 10 \text{ ns}$.
- **DE (délai)** : Ce temps est relatif à l'arrivé de la première impulsion du laser maître par rapport à la génération des ondes acoustiques.

A la sortie des systèmes de division de fréquence, les deux faisceaux pompe et Stokes sont élargis au moyen de systèmes optiques (télescopes), et recombinaison à l'aide d'un filtre dichroïque. Après la recombinaison des faisceaux, il est nécessaire de contrôler la synchronisation temporelle des trains d'ondes avant de les injecter dans le microscope optique, sachant qu'ils ont parcouru différents chemins optiques.

3.5 Contrôle de la synchronisation temporelle

Le contrôle et la mesure des impulsions laser ultra-brèves est problématique. Pour de telles impulsions, les systèmes électroniques actuels ne permettent pas la manipulation des impulsions aussi courtes⁵. Il est par conséquent nécessaire de faire appel à des méthodes indirectes pour contrôler ces impulsions, la plus courante d'entre elles étant la corrélation optique par génération du second harmonique.

Dans cette expérience, nous voulons non seulement vérifier la durée des impulsions laser, mais aussi régler le décalage temporel entre les deux trains d'impulsions pompe et Stokes au moyen d'une ligne à retard pour pouvoir les synchroniser temporellement. L'autocorrélateur optique par génération

⁵Par exemple, les oscilloscopes à échantillonnage ont une résolution temporelle limitée à environ 25 ps.

du second harmonique, permet la mesure de la durée des impulsions pour chaque laser, ainsi que de faire une corrélation croisée entre les deux trains d'impulsions. Nous allons décrire dans cette partie le principe de l'autocorrélation optique, et la méthode de corrélation optique croisée permettant la synchronisation des impulsions laser. Une autre technique relativement récente, basée sur le processus d'absorption à deux photons (dans une LED⁶), simple et peu coûteuse permet la synchronisation temporelle des impulsions lasers au foyer d'une lentille, avec un minimum de réglage optique.

3.5.1 Synchronisation par autocorrélation optique

Le principe de l'autocorrélateur optique est de transformer une information temporelle en une information spatiale plus facile à enregistrer. Le schéma expérimental de l'autocorrélateur est représenté sur la FIG.3.8, et ce n'est autre qu'un interféromètre de Michelson légèrement modifié. Chaque impulsion picoseconde incidente est divisée en deux parties égales à l'aide d'une lame séparatrice.

Le premier faisceau est réfléchi par un coin de cube et le second par un second coin de cube réglé de telle sorte que les deux faisceaux soient parfaitement parallèles avant d'être focalisés par une lentille. Ces deux impulsions sont focalisées dans un cristal non linéaire (BBO) taillé de manière à obtenir le maximum d'intensité à la fréquence double de celle des impulsions. Un photomultiplicateur détecte le signal en aval d'un filtre (pour filtrer le laser du signal généré, doublé en fréquence). L'intensité du signal de fréquence double obtenu, est proportionnelle au produit des intensités des impulsions lumineuses sur les deux bras du Michelson qui traversent le cristal au même instant. Dans l'un des bras se trouve un vibreur se déplaçant à basse fréquence ; si l'une des impulsions est retardée par rapport à l'autre, l'intensité produite après le cristal est :

$$I_{2\omega}(t) \approx I_1(t).I_2(t - \tau), \quad (3.1)$$

où τ est le retard entre les deux impulsions traversant les deux bras du Michelson, I_1 et I_2 leurs intensités. La largeur temporelle du signal doublé est du même ordre de grandeur que celle de l'impulsion initiale (extrêmement courte par rapport au temps de réponse du photomultiplicateur). Par conséquent, on mesure le signal intégré :

$$S(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_1(t).I_2(t - \tau)dt \quad (3.2)$$

⁶Diode électro-luminescente

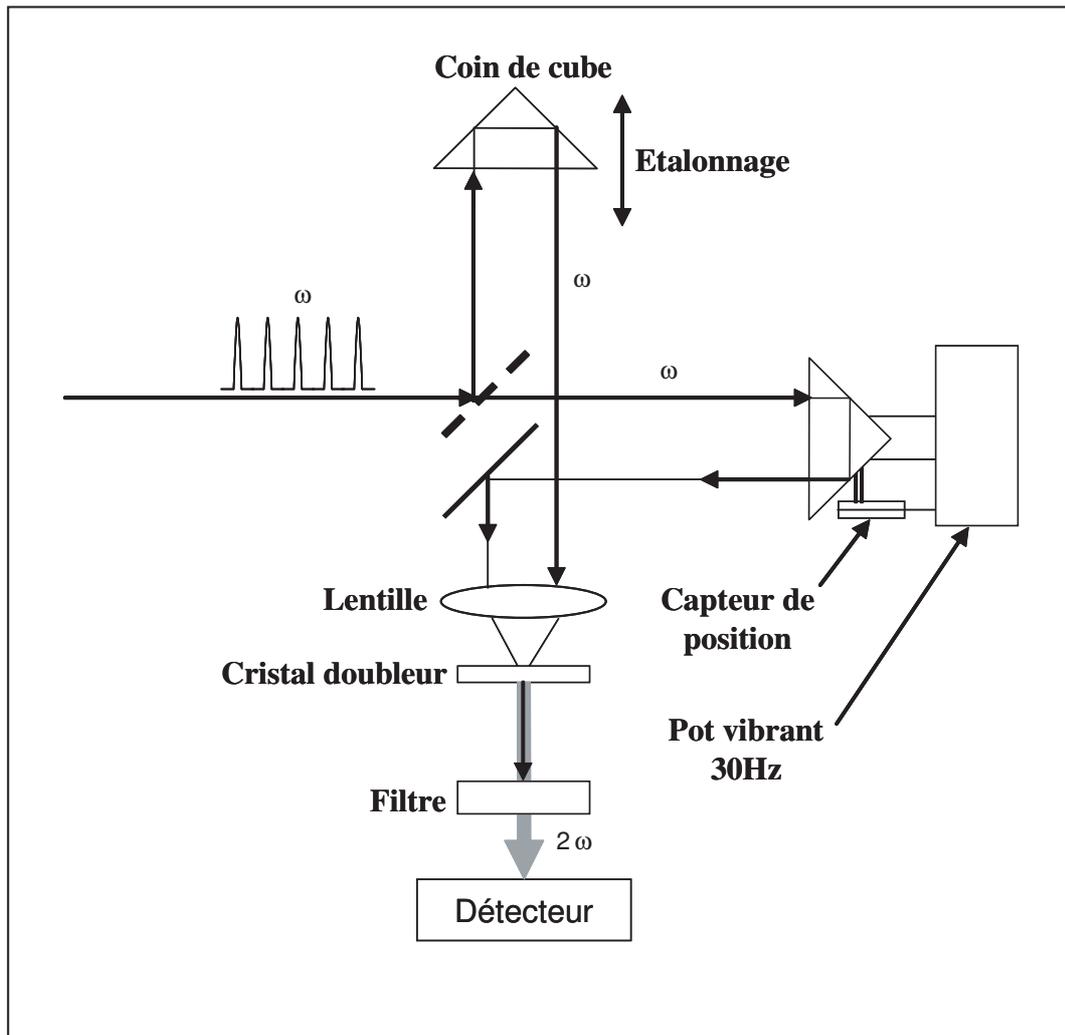


FIG. 3.8 – Schéma de principe de l'autocorrélation optique par génération du second harmonique en configuration non-collinéaire.

Cette fonction mesurée et visualisée sur l'oscilloscope est directement proportionnelle à la fonction d'autocorrélation du second ordre $G(\tau)$ qui est définie par :

$$G(\tau) = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} I_1(t) \cdot I_2(t - \tau) dt}{\int_{-\infty}^{+\infty} I_1(t) \cdot I_2(t) dt} \quad (3.3)$$

Le déplacement "x" du coin de cube sur l'une des voies par rapport à l'autre introduit un retard $\tau = 2x/c$ où c est la vitesse de la lumière. Un capteur de position monté sur le coin de cube, permet de connaître exactement le retard entre les deux impulsions et est relié au même oscilloscope. Ainsi, la courbe visualisée est directement proportionnelle à $G(\tau)$. La durée des impulsions pour chaque laser est vérifiée sur l'oscilloscope branché sur la sortie du corrélateur optique. Un signal d'autocorrélation du laser indique dans notre cas une largeur d'impulsion de l'ordre de 2.8 ps.

Dans le cas d'une impulsion Gaussienne, la fonction d'autocorrélation est une Gaussienne de largeur $\sqrt{2}$ fois plus grande. Par contre pour une impulsion de forme carrée, la largeur de l'autocorrélation est 1.54 fois plus grande. La largeur de la fonction d'autocorrélation donne donc une indication sur la durée de l'impulsion. Cependant, la fonction d'autocorrélation est symétrique et ne contient aucune information sur la phase. Par conséquent, les éventuelles distorsions ou dissymétries des impulsions ainsi que les effets de dérive de fréquence passent dans ce cas totalement inaperçus. Pour obtenir plus d'informations, il est nécessaire d'employer la configuration colinéaire de l'autocorrélateur ou autocorrélateur interférométrique.

Dans notre expérience CARS, la forme et la durée exacte de l'impulsion nous importent peu du moment que l'on est en régime picoseconde (suffisamment étroit spectralement). Notre objectif lors de l'utilisation du corrélateur optique est de pouvoir synchroniser temporellement les deux trains d'impulsions provenant des lasers maître et esclave à un endroit donné du montage expérimental.

Corrélation croisée des impulsions pompe et Stokes

Dans le cas d'une corrélation optique croisée par génération de second harmonique, la même configuration optique (non-colinéaire) est utilisée. Un délai électronique est rajouté sur l'un des bras de l'interféromètre, qui fait disparaître l'autocorrélation (déplacer le miroir vibreur) de chaque laser. La corrélation croisée entre les deux faisceaux est obtenue en changeant le délai grossièrement entre les deux trains d'impulsions au moyen du système de

synchronisation (SynchroLock900) qui déplace le train d'impulsion avec un pas minimum de 4ps ; puis finement en utilisant une ligne à retard mécanique ($1mm = 3ps$) (miroir en forme de demi cube).

Une courbe de corrélation croisée entre les faisceaux pompe et Stokes est obtenue lorsque les deux trains d'impulsions sont synchronisés temporellement. Une fois les deux lasers synchronisés, nous pouvons mesurer la précision de cette synchronisation ("timing jitter"). Lorsque le miroir vibreur est arrêté, la courbe de corrélation croisée disparaît, puisque l'enveloppe est dessinée par le déplacement du miroir vibreur. En déplaçant la ligne à retard, l'intensité du signal aux deux positions synchrone et non-synchrone est mesurée. Ce signal est transformé en signal de tension mesuré dans les deux cas en continu et en alternatif. Le premier représente le signal effectif alors que le deuxième représente les fluctuations du signal (ou le bruit). L'erreur RMS sur la mesure de la synchronisation δ est décrite par :

$$\delta = \frac{\text{bruit}}{\text{signal}} \times \Delta t \quad (3.4)$$

où Δt représente la largeur à mi hauteur de l'enveloppe de corrélation croisée, elle est mesurée à 2 ps.

Les résultats de mesure de la précision de synchronisation que nous avons obtenus, sont mesurés pour différents couples de longueurs d'ondes pompe et Stokes. Le signal mesuré (en mV) correspond à la valeur de la tension générée en régime continu lorsque les impulsions sont synchronisées moins le signal généré lorsque ces impulsions sont non-synchronisées. Tandis que le bruit (en mV) est mesuré avec la même méthode mais en régime alternatif (fluctuation du signal). Ces mesures sont rapportées dans le tableau 3.1.

Laser (P) (nm)	Laser (S) (nm)	Signal (mV)	Bruit (mV)	δ (fsec)
750	750	840-190	100-25	230
750	800	850-600	36-2	272
750	900	950-700	25-2	184
800	800	1650-190	100-30	95

TAB. 3.1 – Résultat de mesure de la précision de synchronisation (Timing-Jitter δ) pour différents couples de longueurs d'ondes pompe et Stokes.

D'après les mesures effectuées, nous remarquons que lorsque les deux trains d'impulsions croisées s'éloignent en longueur d'onde, l'erreur sur la synchronisation augmente. Ceci est dû au bruit électronique de l'appareillage

sachant que l'angle d'accord de phase du cristal doubleur est différent pour chaque longueur d'onde, et la course de balayage qu'effectue le piézo-miroir est différente selon les couples de longueurs d'onde choisis. L'autocorrélateur nous permet de synchroniser les deux trains d'impulsions laser avec une erreur moyenne de 200 fs (ce qui est largement suffisant pour des impulsions de largeur 3 ps). Pour affiner la synchronisation des trains d'onde à n'importe quel endroit du montage expérimental, nous utilisons une deuxième méthode basée sur l'absorption à deux photons dans un semi-conducteur.

3.5.2 Synchronisation par absorption à deux photons

La plupart des méthodes utilisées pour la mesure de la largeur des impulsions ultra brèves sont basées sur l'autocorrélation interférométrique et la génération d'un signal de second harmonique. Pour les impulsions laser sub10fs l'utilisation d'un cristal fin ($< 25\mu m$) doubleur de fréquence est nécessaire pour minimiser la dispersion, et ainsi augmenter l'accord de phase. Le polissage d'un cristal doubleur d'une telle épaisseur est un procédé technologique assez difficile et coûteux, et l'efficacité de conversion de fréquence faible d'un cristal fin nécessite l'utilisation d'un tube photomultiplicateur pour mesurer le signal généré. Une autre technique permet d'utiliser un processus optique non-linéaire sans génération de second harmonique, et sans nécessité d'un accord de phase par l'utilisation de la génération de porteurs libres induite par absorption à deux photons dans un semi-conducteur. Le premier avantage de l'introduction d'un semi-conducteur dans les mesures d'autocorrélation est que la réponse à deux photons et la transformation de la lumière en courant électrique sont combinées dans un seul composant solide. En général, c'est des composants à base de GaAsP ou GaP qui sont utilisés pour mesurer des longueurs d'impulsions allant de 6 fs jusqu'à 10 ps [169].

Le courant électrique généré par l'absorption à deux photons est mesuré en fonction de la largeur de l'impulsion, son énergie, et la longueur d'onde. Ces composants sont très sensibles et faciles à implanter dans un montage expérimental, et surtout moins coûteux que les autocorrélateurs optiques utilisant un cristal doubleur de fréquence. En plus, comme nous voulons synchroniser des lasers proche-infrarouges (autour de 800 nm), en utilisant l'absorption à deux photons, il est plus facile et précis d'utiliser une LED dont le gap correspond à une émission dans le domaine du bleu que d'utiliser une photodiode dont le domaine spectral de détection est plus large. Des travaux expérimentaux [169] ont montré que l'efficacité quantique de la réponse à deux photons (définie comme le nombre de photoélectrons générés

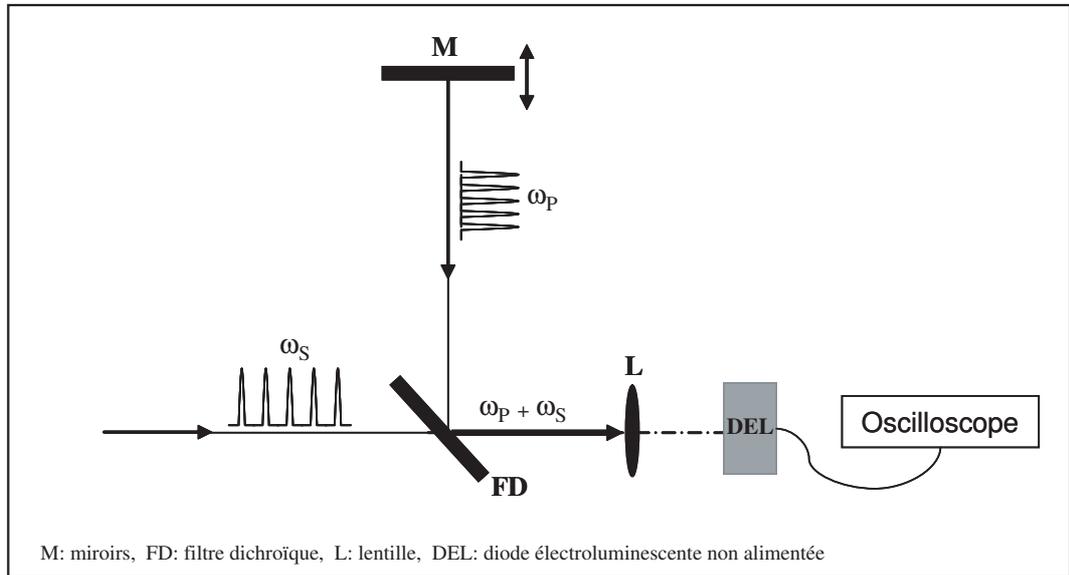


FIG. 3.9 – Schéma de principe de la corrélation croisée dans un semi-conducteur.

par un photon incident) est de l'ordre de $2 \cdot 10^{-4}$, ce qui est comparable à l'efficacité de génération de second harmonique d'un cristal BBO d'épaisseur de $100 \mu\text{m}$.

Dans cette expérience, nous avons utilisé une diode électroluminescente (LED) conçue dans un semi-conducteur de type AlGaP (bleu). Cette LED est branchée à un amplificateur de signal, relié à un voltmètre. La LED est utilisée dans ce cas en polarisation inverse, c'est-à-dire qu'en injectant les deux trains d'impulsions, une tension électrique est générée par la LED puis mesurée. Au moment de la synchronisation des deux trains d'impulsions, l'absorption à deux photons augmente dans le matériau semi-conducteur, et la tension passe par une valeur maximale lorsque les deux trains sont synchrones. Cette condition est obtenue en déplaçant le miroir demi cube (délai mécanique) de quelques dizaines de microns (3 ps) (voir FIG.3.9).

Lors de la synchronisation, la tension générée par la LED est mesurée en fonction de la puissance des lasers pour différents couples de longueurs d'onde pompe et Stokes. La FIG. 3.10 représente les courbes d'absorption à deux photons en fonction de la puissance laser. L'efficacité de cette absorption est importante pour certains couples de longueurs d'ondes, et diminue pour d'autres, cela est dû à la nature du gap du semi-conducteur. Néanmoins un

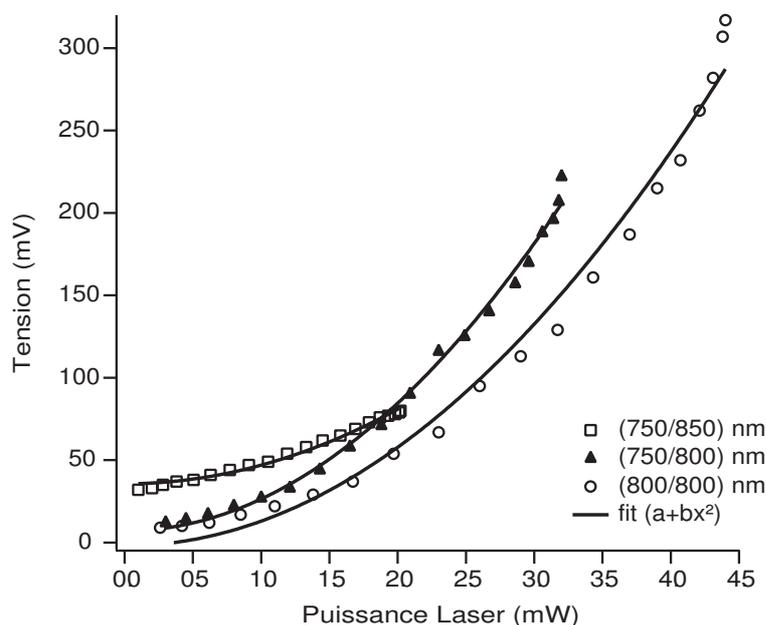


FIG. 3.10 – les courbes d’absorption à deux photons en fonction de la puissance laser.

bon ajustement des courbes par une fonction polynomiale de second ordre est obtenu, ce qui correspond très bien à l’absorption à deux photons. Cette méthode nous permet ainsi d’affiner la synchronisation sur n’importe quel point du montage expérimental, et en particulier sur le point focal de l’objectif du microscope optique [170, 171] (point où seront focalisés les deux lasers d’excitation pour la génération de l’onde cohérente Raman (CARS)).

3.6 Conclusion

Les différents dispositifs de corrélation optique que nous avons utilisés constituent un ensemble complet pour le contrôle des impulsions picosecondes délivrées par l’oscillateur à saphir dopé au titane. Ce contrôle est assuré en permanence par le système de synchronisation, et vérifié lors de chaque manipulation. En effet la génération CARS n’est possible que lorsque ces conditions sont atteintes.

Dans ce chapitre, nous avons décrit le principe de fonctionnement et l’utilisation de nos deux sources lasers accordables (pompe et Stokes), synchronisées spatialement et temporellement. Nous allons maintenant décrire

dans le prochain chapitre le montage CARS proprement dit.

Chapitre 4

Dispositif expérimental de la microscopie CARS

Sommaire

4.1	Introduction	79
4.2	Le montage expérimental	80
4.3	La caractérisation des signaux CARS	84
4.4	F-CARS et E-CARS	88
4.5	Effets réfractifs en imagerie CARS	91
4.6	Conclusion	93

4.1 Introduction

Ce chapitre concerne le montage de microscopie CARS, que j'ai entièrement développé dans le cadre du projet "Mosaic" à l'Institut Fresnel. Ce nouveau type de microscope CARS par excitation non-linéaire a été le premier construit en France. Ses avantages ainsi que ses inconvénients ont déjà été cités dans les chapitres précédents (voir partie 2.2). Dans cette partie du manuscrit, nous allons décrire les différents constituants de ce microscope ainsi que sa caractérisation dans les domaines spatial et spectral. La mise en place du système ainsi que sa caractérisation ont constitué une partie très importante de mon travail de thèse.

En effet ce type de microscopie non-linéaire est très récent [23], ce qui fait que le domaine d'applications de la microscopie CARS ainsi que ses

différentes configurations, et ses nombreux potentiels n'ont pas encore été entièrement exploités. Malgré le fait que ces équipements soient assez coûteux, ils présentent l'avantage de pouvoir être utilisés dans beaucoup d'applications. De plus, ce montage est évolutif et adaptable à plusieurs applications que se soit en microscopie ou en spectroscopie surtout dans le cadre de l'étude des milieux biologiques ou des diagnostics médicaux.

Nous présenterons donc dans ce chapitre notre technique de microscopie CARS, appliquée principalement à l'imagerie des différents systèmes biologiques vivants (voir chapitre IV). Une première partie décrira le système expérimental développé, et des études préliminaires réalisées sur des objets modèles seront présentées afin de valider et de montrer les performances de notre technique. Dans ce but, nous exposerons les résultats expérimentaux obtenus pour différents échantillons (composition chimique, dimensions, etc...). Le chapitre se terminera par un travail original que nous avons réalisé sur les effets réfractifs en microscopie CARS.

4.2 Le montage expérimental

La première partie de ce paragraphe présentera le montage expérimental mis en place pour les études de microscopie cohérente Raman anti-Stokes. Une deuxième partie concernera plus précisément l'acquisition, la caractérisation spatiale et spectrale de ce type de montage, ainsi que les images obtenues. Le montage expérimental réalisé pour les études de microscopie CARS est représenté sur la FIG.4.1. Nous avons choisi la configuration CARS colinéaire, du fait de sa simplicité de mise en oeuvre sur un microscope inversé.

Comme dans le cas des montages expérimentaux à base de processus d'optique non-linéaire, de fortes puissances lasers sont nécessaires pour une génération efficace du signal CARS. Des sources lasers impulsives picosecondes ou femtoseconde sont généralement utilisées. Le choix est déterminé par la résolution spectrale exigée. Dans cette expérience, nous utilisons des lasers impulsifs émettant dans le proche infrarouge, ce qui réduit fortement l'excitation des niveaux électroniques de l'échantillon et par conséquent évite les problèmes de photo-endommagement. Les impulsions ont une durée de 3 ps correspondant à une résolution spectrale de 2 cm^{-1} , ce qui est largement suffisant pour sonder spectralement les niveaux Raman moléculaires. Notre microscope CARS, comme représenté dans la FIG.4.2, utilise deux lasers impulsifs picosecondes synchronisés temporellement et spatialement. Le laser Pompe et le laser Stokes (avec des fréquences ω_P et ω_S respectivement) sont pompés par deux lasers Saphir dopé au titane opérant à 80 MHz

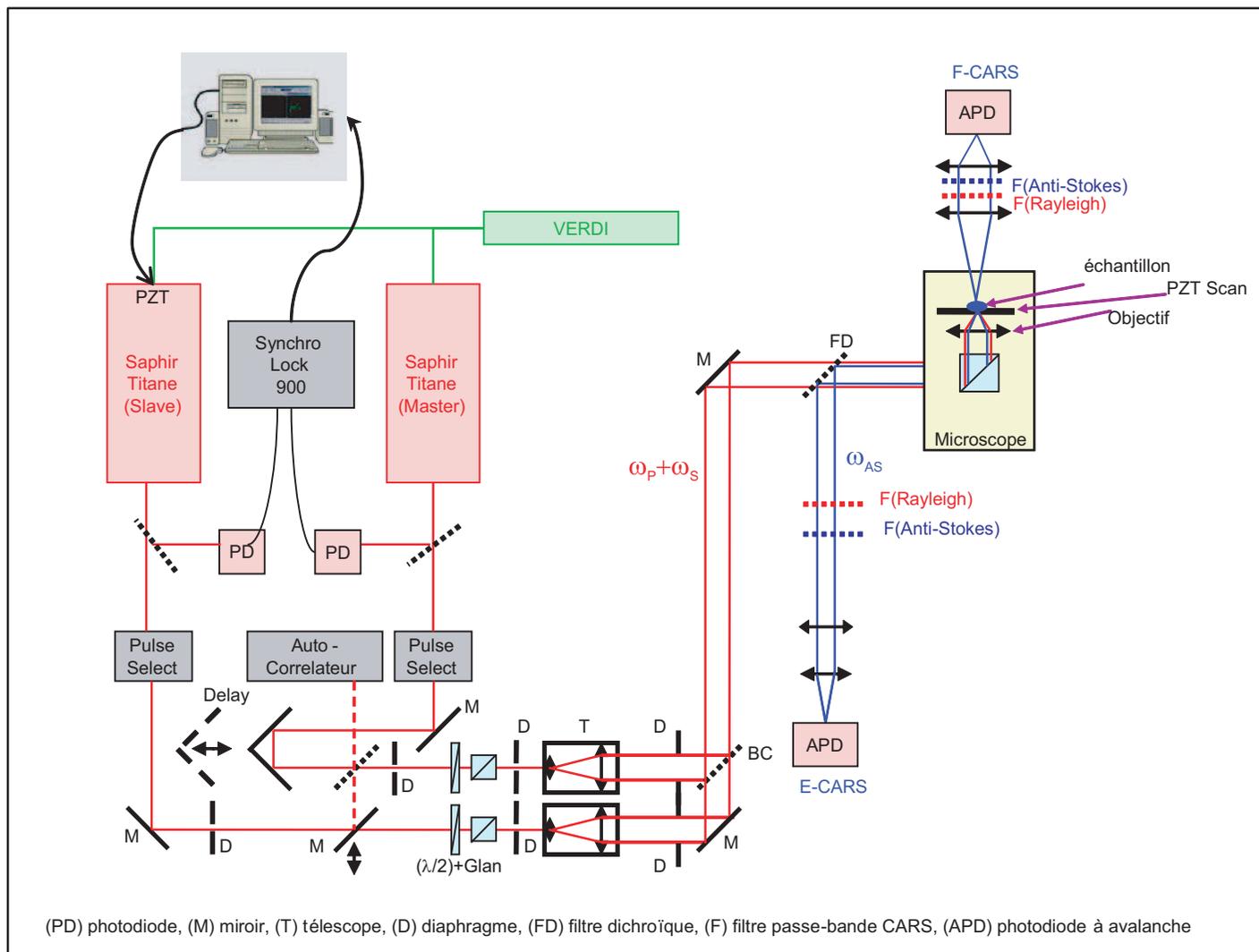


FIG. 4.1 – Schéma du dispositif de Microscopie CARS.

(Mira-900, Cohérent, USA) accordables entre 700 nm et 1100 nm afin de couvrir la région entière du spectre Raman des vibrations moléculaires présentes dans les systèmes biologiques (jusqu'à 3000 cm^{-1}).

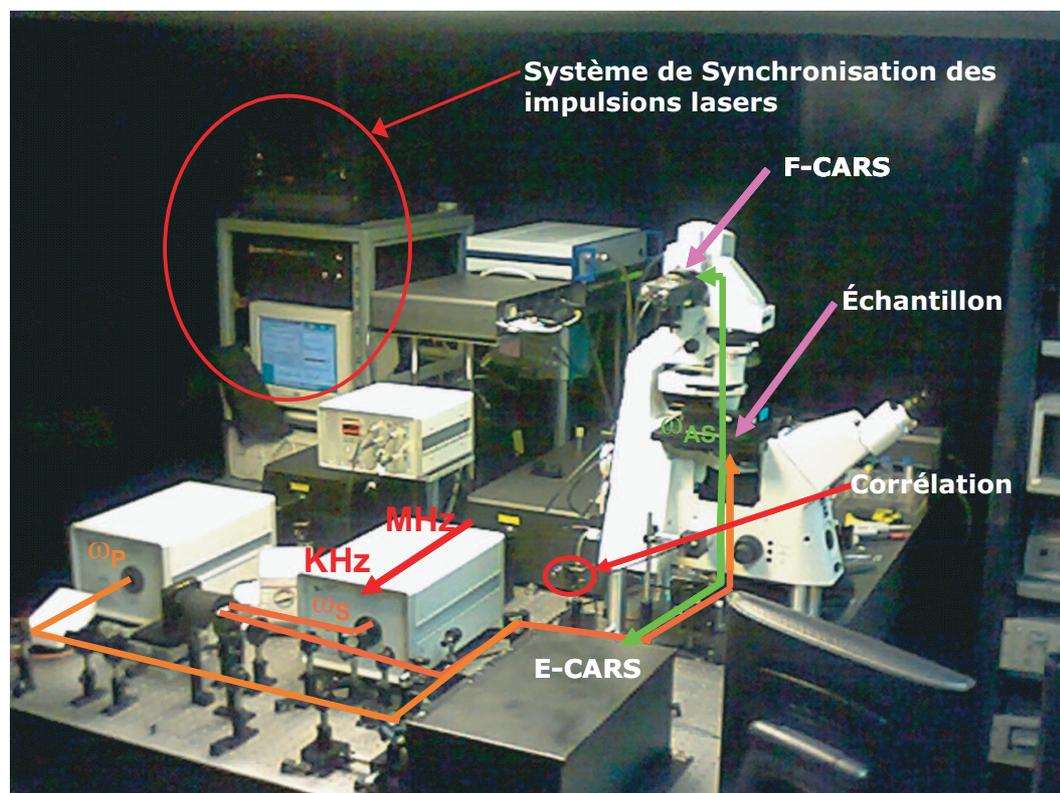


FIG. 4.2 – Le microscope CARS.

Les deux trains d'impulsions (polarisés horizontalement) sont synchronisés fréquemment à l'aide d'un système électronique asservi (Synchro-Lock, Cohérent, USA), avec une précision de l'ordre de 250 fs. Le taux de répétition des deux lasers pompe et Stokes est réduit simultanément par deux cellules de Bragg (Pulse Picker, APE, Allemagne) à quelques centaines de kilohertz, afin d'éviter l'endommagement des échantillons tout en maintenant les fortes puissances crêtes nécessaire pour la génération du signal CARS. Les deux trains d'impulsions pompe et Stokes sont synchronisés temporellement à l'aide d'une ligne à retard optique. Les faisceaux lasers sont élargis spatialement (téléscopes), recombinaés en configuration colinéaire, envoyés via un miroir dichroïque (filtre passe bas 700 nm) dans un microscope inversé (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Allemagne), et focalisés sur l'échantillon par un

objectif à immersion à eau (C-Apochromat, Carl Zeiss, Allemagne) avec une ouverture numérique ON de 1.2 et un grandissement de $\times 40$. Le signal CARS est émis en avant (F-CARS) et en arrière (E-CARS) de l'objectif de microscope. Le signal E-CARS est collecté par le même objectif d'excitation alors que le signal F-CARS est collecté par la lentille du condenseur d'ouverture numérique de 0.5.

Les signaux E-CARS et F-CARS sont filtrés (filtres passe-bande, largeur 10 nm, Omega Optical, USA), et détectés par deux photodiodes à avalanche avec une région active de $200 \mu\text{m}^2$ (SPCM-AQR14, Perkin Elmer, Canada); nous avons choisi ce type de détecteur à cause de leur bonne sensibilité (l'efficacité quantique est de 85% à 700 nm et le courant d'obscurité est de l'ordre de 100 coups/s). Tandis que le signal E-CARS est quasi-totalement collecté par l'objectif à immersion à eau, le signal F-CARS quant à lui ne représente que seulement 1/5 du signal émis vers l'avant. Cette limitation dans la collection du signal F-CARS est due aux mauvaises propriétés de l'imagerie de la lentille du condenseur (ON=0.5). Cette lentille produit une tache cinq fois plus grande que la surface active de la photodiode à avalanche.

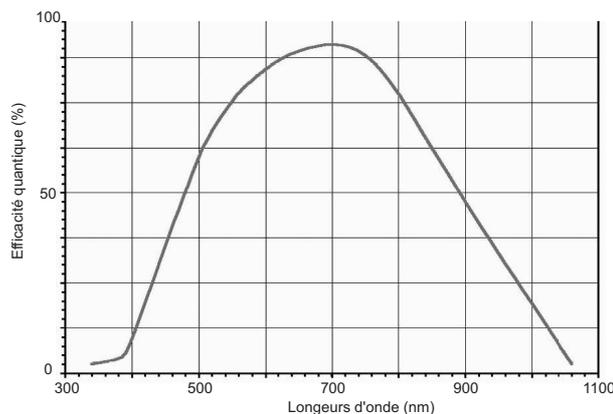


FIG. 4.3 – Courbe de l'efficacité quantique de la photodiode à avalanche en fonction de la longueur d'onde.

Notre microscope est équipé d'une platine de déplacement (x,y,z) actionnée par des calles piézo-électriques (PZ82E- $200 \times 200 \times 20 \mu\text{m}$ — Physike Instrument, Allemagne), reliée à un contrôleur (Digital PZT Controller E-710, Physike Instrument, Allemagne) permettant, par le biais d'une connexion IEEE, le pilotage par ordinateur des déplacements fins des échantillons. Cette platine est commandée à l'aide d'un programme en Labview, qui nous permet de faire une image de l'échantillon sur la zone sélectionnée

en utilisant le signal mesuré par la photodiode à avalanche. Cette photodiode est intégrée dans un amplificateur rapide générant une impulsion TTL de durée 40 ns à partir de chaque photoélectron produit. Ces impulsions sont envoyées sur la carte d'acquisition (National Instrument, USA), et mesurées pour chaque position du scan. Le contraste est ainsi obtenu par le nombre de photons CARS générés dans chaque point de l'échantillon. Le pas du scan ainsi que le temps passé sur chaque point sont ajustés via le programme Labview, selon la nature (liaison chimique) de l'échantillon ainsi que sa taille [172].

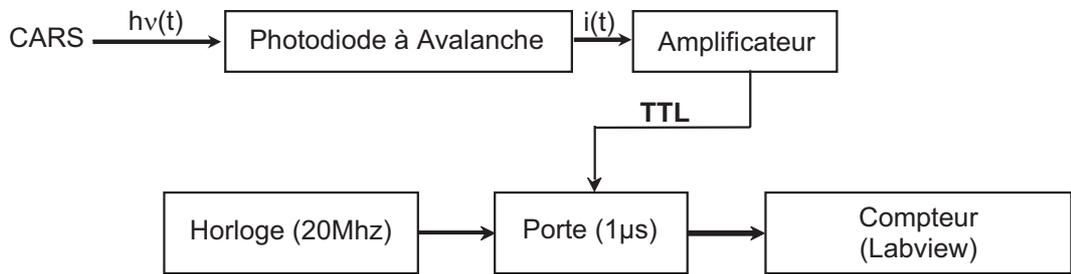


FIG. 4.4 – Schéma représentant le système de comptage de photons via le programme Labview.

4.3 La caractérisation des signaux CARS

Une première étape primordiale avant toute mesure de signal CARS consiste en une calibration du volume d'excitation, c'est-à-dire en une détermination précise des dimensions axiale et latérale de ce volume. Afin de caractériser les images obtenues en microscopie CARS, nous avons utilisé des échantillons "test". Ces échantillons sont des billes en polystyrène (Sigma Aldrich, USA) de différents diamètres que nous piégeons dans du gel d'Agarose (2%) d'indice de réfraction 1.33. La longueur d'onde des lasers excitateurs a été réglée à 740 nm pour le faisceau pompe, et 840 nm pour le faisceau Stokes, ce qui correspond à la fréquence de résonance de la vibration Raman de la liaison C=C (1600 cm^{-1}) présente dans les cycles benzéniques dont est riche le polystyrène.

Dans une telle configuration, le signal CARS généré apparaît à la longueur d'onde de 660 nm (1600 cm^{-1}). Ceci est vérifié au début de l'expérience par un monochromateur équipé d'une caméra CCD refroidie à l'azote. La FIG. 4.5 représente le spectre du signal CARS obtenu dans les billes en polystyrène,

ainsi que son intensité en fonction du retard entre les impulsions des lasers pompe et Stokes (corrélation croisée sur le signal CARS : le signal CARS est maximal lorsque le délai entre les impulsions est nul). Sur la FIG. 4.5, il est intéressant de noter que la largeur spectrale du signal CARS est de l'ordre de celle des lasers pompe et Stokes. Cette caractéristique justifie l'utilisation des filtres passe-bande (largeur d'environ 10 nm) utilisés dans la détection (voir FIG. 4.1).

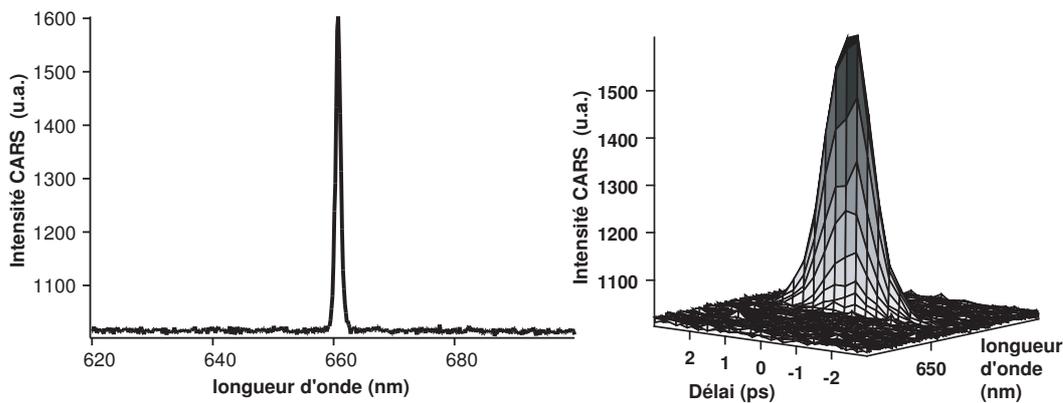


FIG. 4.5 – Enregistrement du signal CARS généré dans du polystyrène (CH_2) : (à gauche) analyse spectrale du signal CARS, (à droite) courbe de corrélation du signal CARS en fonction du retard entre les impulsions laser.

Des images CARS de billes en polystyrène de différents diamètres sont construites point par point, le nombre de photons CARS émis pour chaque point de l'échantillon pendant un intervalle de temps de typiquement 10 ms est enregistré. L'image de deux billes en polystyrène, de $5 \mu m$ de diamètre, piégées dans le gel d'agarose, est présentée sur la FIG. 4.6 (image de 80×80 point). La puissance moyenne des faisceaux lasers excitateurs est de $160 \mu W$ pour le laser pompe (740 nm) et $80 \mu W$ pour le laser Stokes (840 nm), avec un taux de répétition de 400 KHz, le rapport signal à bruit est de l'ordre de 40 :1.

Une estimation des dimensions du volume CARS a été effectuée en imageant des billes en polystyrène de faibles dimensions par rapport à la longueur d'onde. Nous avons utilisé des billes de 100 nm de diamètre piégées dans du gel d'agarose. Nous noterons que la solution initiale contenant les billes doit être suffisamment diluée de manière à ce que la concentration en billes à l'intérieur du gel soit d'environ une bille par élément de volume de $1 \mu m^3$. La FIG. 4.7 présente l'image E-CARS d'une bille de 100 nm de diamètre ainsi

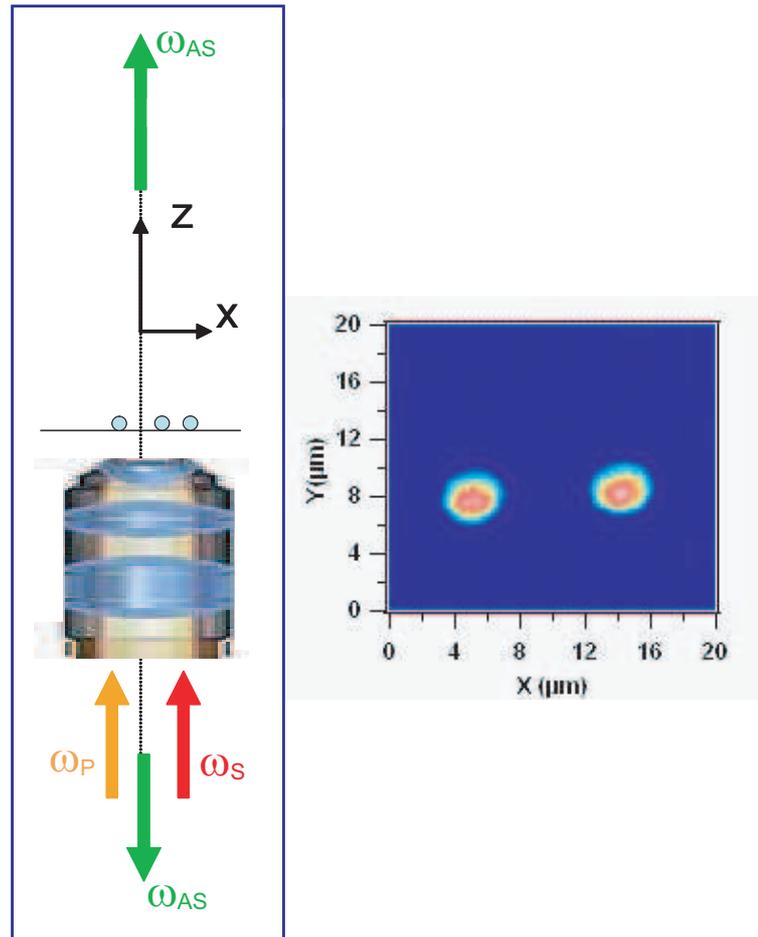


FIG. 4.6 – (à gauche) Schéma expérimental de génération du signal CARS en avant (F-CARS) et en arrière (E-CARS) de l'objectif du microscope. (à droite) Image F-CARS de billes en Polystyrène ($C = C$) de $5 \mu\text{m}$ de diamètre.

que le profil spatial de l'intensité du signal CARS dans les directions latérale (x) et longitudinale (z) (voir FIG. 4.6). Les profils de l'intensité sont ajustés avec un modèle Gaussien, ce qui nous permet de définir les paramètres du volume CARS (convolution spatiale entre les deux faisceaux excitateurs). Ce volume a une largeur à mi-hauteur $\Delta x = 0.7\mu m$ dans la direction latérale (x,y), et $\Delta z = 2.2\mu m$ dans la direction longitudinale (z). Cette différence entre Δx et Δz reflète la géométrie de ce volume produit par une interaction non-linéaire entre le laser pompe et le laser Stokes.

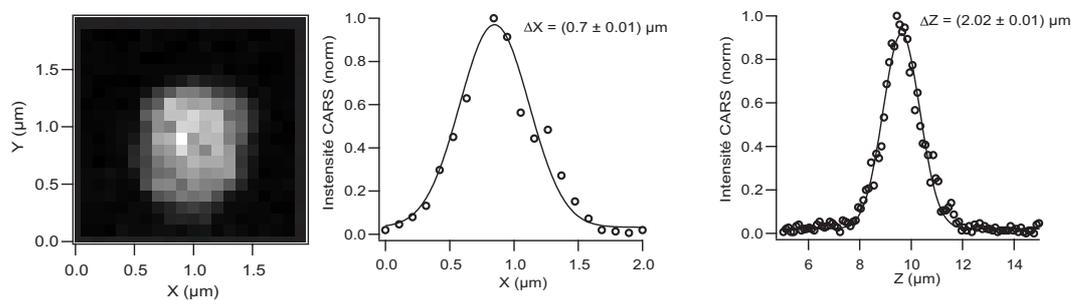


FIG. 4.7 – Image CARS d'une bille en Polystyrène (C=C) de 100 nm de diamètre (20×20 pixels, 10ms/pixel).

Dans le chapitre 2, nous avons montré le spectre spécifique de la génération CARS en fonction de l'écart en fréquence entre les lasers excitateurs pompe et stokes ($\omega_P - \omega_S$). Avant de réaliser l'imagerie CARS il est nécessaire de connaître les fréquences de vibration des liaisons chimiques que nous allons exciter dans l'échantillon car le contraste dans l'image CARS dépendra des propriétés d'émission de cette liaison. Comme nous l'avons déjà expliqué, il existe un décalage entre la fréquence de résonance Raman spontanée et CARS ainsi qu'une forme spécifique des spectres liée aux susceptibilité résonant ($\chi_R^{(3)}$) et non-résonant ($\chi_{NR}^{(3)}$) (voir FIG. 2.6). Ceci nous a amené à faire les spectres CARS des liaisons les plus courantes dans les échantillons étudiés. La caractérisation spectrale des liaisons les plus présentes dans les objets biologiques (CH, OH, etc...) permet de connaître les fréquences d'excitation et de génération optimale du signal CARS.

La FIG. 4.8 représente quelques spectres CARS enregistrés dans différents milieux (polystyrène (C=C), eau (OH), chlorobenzène (CH)). L'intensité du signal CARS est mesurée en fonction du décalage entre les fréquences pompe et Stokes ($\omega_P - \omega_S$). Le maximum du signal est enregistré lorsque ce décalage atteint la fréquence de résonance de la liaison chimique concernée.

Dans le cas contraire l'intensité CARS ne tombe jamais à zéro, à cause de la partie non-résonante de $\chi^{(3)}$. Cette remarque est assez importante car le contraste CARS dans une image dépend non seulement du nombre de liaisons chimiques d'intérêt et de la force de résonance de la liaison (rapport entre $\chi_R^{(3)}$ et $\chi_{NR}^{(3)}$), mais aussi du signal non-résonant CARS émis par les liaisons de non intérêt présentes dans les objets à imager.

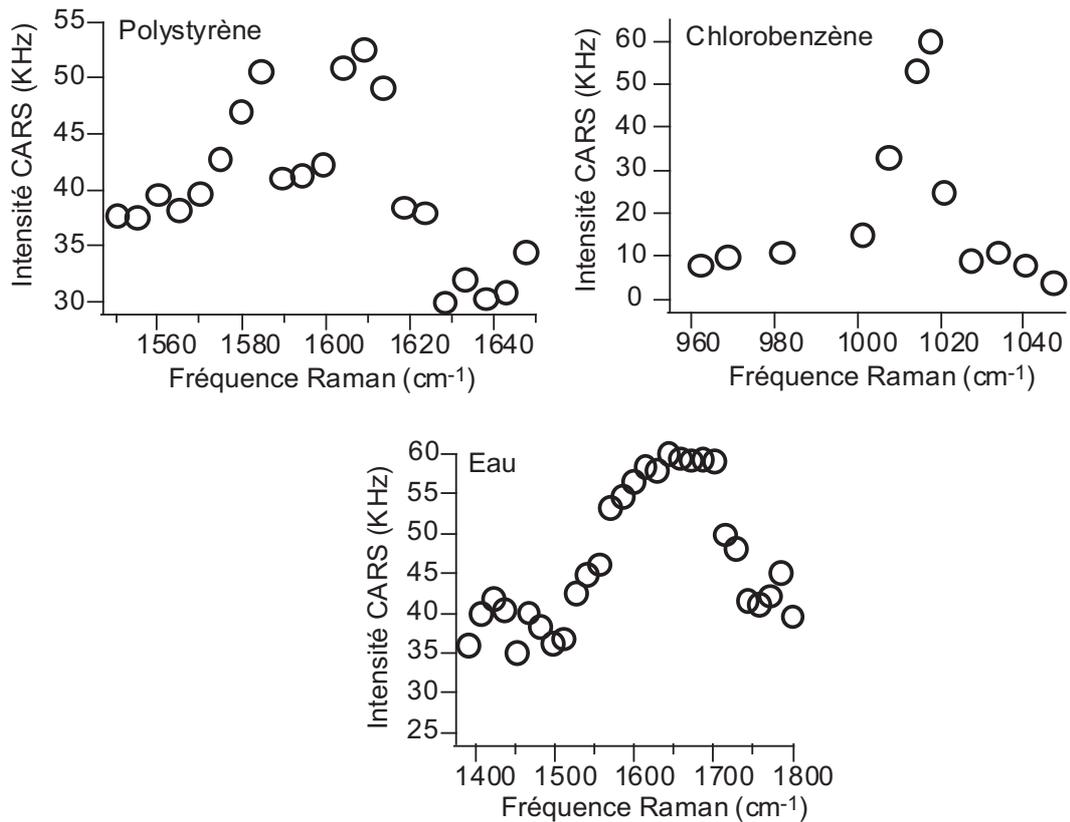


FIG. 4.8 – Spectres CARS de différents milieux.

4.4 F-CARS et E-CARS

Contrairement à la fluorescence ou à la diffusion Raman spontanée, l'émission cohérente CARS dépend de la taille et de la forme des échantillons, car le signal est construit à partir de l'interférence des radiations CARS provenant de différentes liaisons chimiques. Nous pouvons les comparer à des dipôles émettant chacun une onde CARS, avec une phase bien

fixe (voir chapitre 2). Lorsque le diamètre de l'échantillon est très faible devant la longueur d'onde pompe, la condition d'accord de phase est relaxée et le signal CARS est émis autant dans la direction avant (F-CARS) que arrière (E-CARS) comme dans le cas d'un dipôle unique (voir FIG. 4.9(a)). Par contre, lorsque ce diamètre devient plus grand que la longueur d'onde pompe, l'émission CARS devient constructive dans la direction avant (F-CARS) de la propagation, et confinée dans un petit cône (voir FIG. 4.9(b)). Dans le cas d'échantillons ayant le même volume, l'émission CARS dépend aussi de leur forme. Elle se trouve plus directive dans la direction avant lorsque la forme est sphérique. Une simulation numérique de l'émission CARS d'un ensemble de dipôles a été rapportée dans la référence [173]. Nous avons proposé une modélisation alternative (voir FIG. 4.9) qui confirme ces résultats dans [174]. Pour résumer, les signaux collectés dans les deux directions avant (F-CARS) et arrière (E-CARS) amènent des informations complémentaires sur l'échantillon. F-CARS est utile dans le cas de l'imagerie des objets de dimensions supérieures ou égales à la longueur d'onde d'excitation. Pour les objets de faibles dimensions, le contraste dans l'imagerie F-CARS est limité par le fort signal non-résonant du solvant. La détection arrière (E-CARS) apporte une imagerie plus sensible pour les objets de faibles dimensions devant la longueur d'onde d'excitation car le signal CARS provenant du solvant est destructif dans cette direction opposée à la propagation [24, 129, 130].

Dans la figure FIG. 4.9, nous présentons nos résultats de modélisation basée sur la somme d'onde CARS d'un ensemble de dipôles hertziens cohérents placés à l'intérieur d'un échantillon sphérique (bille). Les résultats sont présentés dans le cas de deux billes de diamètre 100 nm et 2 μm respectivement ($\lambda_P = 740$ nm, $\lambda_S = 840$ nm). Pour le cas de la bille à 100 nm de diamètre ($d \ll \lambda_P$), l'émission CARS calculée est symétrique dans les directions avant (F-CARS) et arrière (E-CARS). Pour le deuxième échantillon ($d = 2 \mu\text{m}$), l'émission CARS est fortement confinée dans la direction avant (F-CARS). Le rapport des signaux E-CARS/F-CARS en fonction du paramètre d/λ_P est présenté sur la FIG. 4.9(c). Cette courbe confirme que le signal E-CARS décroît rapidement avec l'augmentation du diamètre de l'échantillon [174].

Dans la simulation représentée dans la FIG. 4.9, les indices de réfraction de l'échantillon et de son milieu environnant ns sont pas pris en considération, car les effets réfractifs sont difficiles à introduire dans la modélisation électromagnétique. Nous avons mené une étude détaillée des effets réfractifs en imagerie CARS [174].

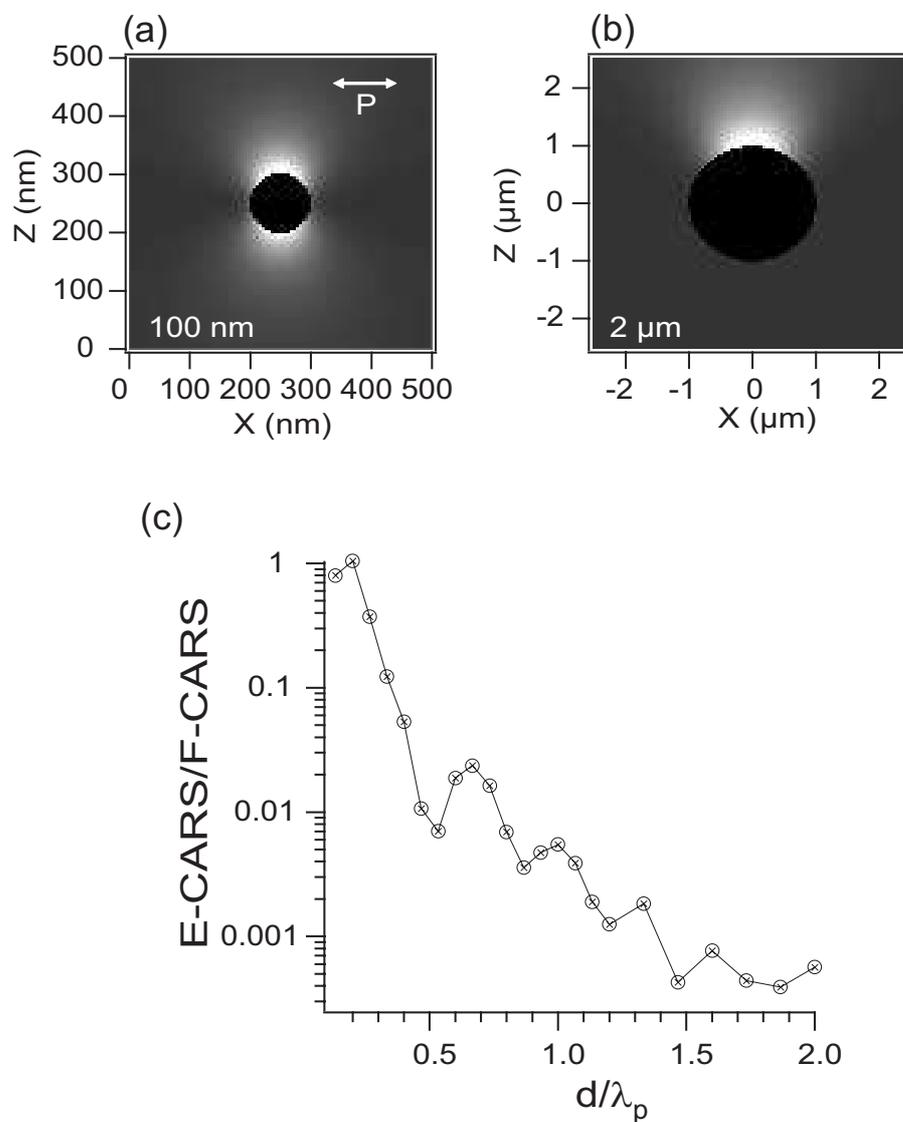


FIG. 4.9 – (a) et (b) l'émission avant et arrière du signal CARS calculée pour différents diamètres de billes ($d = 100$ nm et $d = 2$ μm). (c) le rapport ($E/F\text{-CARS}$) en fonction de la longueur d'interaction. La polarisation des champs pompe et Stokes est horizontale (selon l'axe (x)).

4.5 Effets réfractifs en imagerie CARS

L'influence de la différence d'indice de réfraction dans les échantillons sur l'imagerie en microscopie a été étudiée dans différents travaux. Dans le cas de la microscopie confocale, des valeurs de l'épaisseur de sphères fluorescentes micrométriques ont été comparées en variant l'indice de réfraction de leurs solvants [175–177]. Dans d'autres travaux, l'influence des effets réfractifs en imagerie par microscopie par excitation à deux photons dans des sphères fluorescentes nanométriques a été étudiée [178, 179]. Récemment, une procédure de correction de l'épaisseur des objets en microscopie confocale a été proposée [180].

Une partie du travail réalisé dans cette thèse, concerne l'étude des effets réfractifs dans le cas de la microscopie Raman CARS. Nous avons démontré que dans la plupart des cas d'imagerie CARS, le signal détecté en arrière (E-CARS) se compose généralement d'une grande partie du signal CARS généré en avant (F-CARS) et réfléchi en arrière à cause de ces effets réfractifs [174]. Une étude expérimentale vient consolider nos résultats de simulation. Dans ces expériences, des billes en polystyrène avec un indice de réfraction de 1.6 sont imagées dans différents milieux : l'air ($n = 1$), le gel d'agarose ($n = 1.33$) et l'huile ($n = 1.45$). Les signaux E-CARS et F-CARS sont enregistrés dans chaque cas.

Dans la FIG. 4.10, les profils CARS d'une bille de polystyrène de $2 \mu\text{m}$ de diamètre le long de l'axe optique sont présentés, en fonction de l'indice de réfraction du milieu environnant. L'intensité du signal détecté en arrière varie en fonction de la différence d'indice entre la bille et le solvant. Dans le cas où cette différence est grande (FIG. 4.10(a)), le signal E-CARS est maximum, tandis que dans le cas de l'huile qui a un indice de réfraction très proche de la bille de polystyrène, le signal E-CARS est nul (FIG. 4.10(c)). Cette expérience démontre l'influence de l'effet réfractif sur la distribution des signaux E-CARS et F-CARS. Nous avons expliqué ces résultats expérimentaux à travers des simulations numériques basées dans un cas sur les lois de l'optique géométrique, dans l'autre sur une modélisation électromagnétique de l'excitation CARS. Les résultats de ces simulations permettent de bien interpréter les courbes expérimentales et de démontrer l'importance des effets réfractifs dans l'imagerie par microscopie CARS [174]. Une copie de l'article [174] se trouve à la fin de ce chapitre.

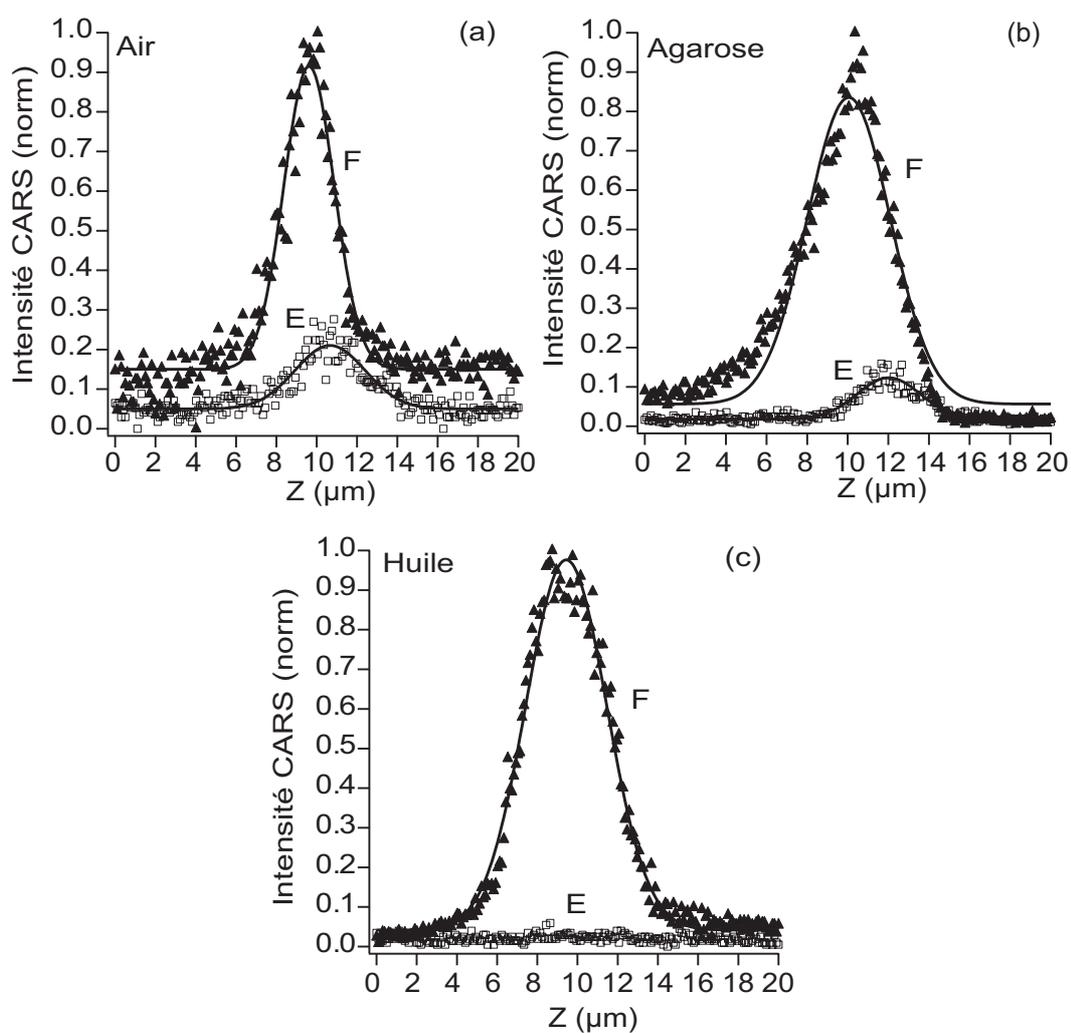


FIG. 4.10 – Résultats expérimentaux du profil CARS d’une bille de polystyrène de $2\mu\text{m}$ de diamètre le long de l’axe optique, en fonction de l’indice de réfraction du milieu environnant.

4.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons réalisé un microscope par diffusion cohérente Raman (CARS) qui présente de bonnes performances, notamment une résolution optique comparable à celle des microscopes confocaux. Cet outil combine les deux fonctions de microscopie et de spectroscopie optique, ce qui le rend adaptable à différentes applications dans le domaine des sciences du vivant.

L'avantage majeur de la microscopie CARS est le mécanisme de contraste qui utilise l'échantillon lui-même via les liaisons chimiques le constituant. Ainsi il n'est pas nécessaire d'introduire dans le milieu étudié d'éléments extérieurs comme des fluorophores ou des chromophores. Cependant cette technique nécessite l'utilisation d'une technologie complexe, et la spécificité de l'émission cohérente nécessite un apprentissage sur la compréhension et sur l'interprétation des images CARS réalisées.

Dans le chapitre suivant, nous allons présenter les mesures que nous avons réalisées durant ce travail de thèse. Ces expériences ont été conduites en partenariat avec différents groupes de recherches : des biologistes du centre d'immunologie de *Marseille-Luminy* (CIML) pour l'imagerie cellulaire et tissulaire (groupe de D.Marguet), des biophysiciens du groupe l'Oréal-Recherche *Paris* pour l'imagerie des tissus (groupe de C.Hadjur), ainsi qu'une collaboration avec le professeur en médecine Eileen Gallery de l'institut *Kolling* de la recherche médicale de l'université de Sydney en *Australie* pour le diagnostic médical. Nous verrons que la microscopie CARS est un outil très intéressant pour donner des informations structurales et chimiques des objets visualisés et offre une grande potentialité pour l'imagerie fonctionnelle.

Refractive effects in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy

Nadia Djaker, David Gachet, Nicolas Sandeau, Pierre-Francois Lenne, and Hervé Rigneault

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy with high sensitivity and high three-dimensional resolution has been developed for the vibrational imaging of chemical species. Due to the coherent nature of the CARS emission, it has been reported that the detection of epi-CARS and forward-CARS (F-CARS) signals depends on the size and shape of the sample. We investigate theoretically and experimentally the effects on the CARS signal of refractive index mismatches between the sample and its surroundings. Backward-CARS and F-CARS signals are measured for different polystyrene bead diameters embedded in different refractive index solvents. We show that index mismatches result in a backward-reflected F-CARS signal that generally dominates the experimentally backward-detected signal. Simulations based on geometrical and wave optics comparing forward- and backward-detected signals for polystyrene beads embedded in different index solvents confirm our findings. Furthermore, we demonstrate that the maxima of forward- and backward-detected signals are generated at different positions along the optical axis in the sample if refractive index mismatches are present between the sample and its surroundings. © 2006 Optical Society of America

OCIS codes: 180.6900, 190.4380, 170.5650, 290.5910, 300.2570, 300.6230.

1. Introduction

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) is a four-wave mixing process in which a pump and Stokes laser beams, with center frequencies of ν_P and ν_S , respectively, are spatially overlapping, and interact with a sample. When the frequency difference between the pump and the Stokes lasers coincides with the frequency of a molecular vibration present in the sample, the CARS signal at the anti-Stokes frequency $\nu_{AS} = (2\nu_P - \nu_S)$ is strongly enhanced leading to a light contrast mechanism with chemical selectivity.

As a third-order nonlinear process, the CARS-induced polarization can be expressed as

$$P^{\text{NL}}(\omega_{AS}) = \chi^{(3)} E_P(\omega_P)^2 E_S(\omega_S)^*, \quad (1)$$

where $\chi^{(3)}$ is the third-order nonlinear tensor, $E_P(\omega_P)$

and $E_S(\omega_S)$ are the respective electromagnetic fields of the pump and Stokes beams, and ω_P , ω_S , and ω_{AS} , respectively, refer to pulsations of the pump, Stokes, and anti-Stokes fields.

The $\chi^{(3)}$ tensor splits between a resonant vibrational contribution and a nonresonant electronic contribution,¹ the latter leading to a nonspecific signal that usually limits the desired CARS specific molecular sensitivity. First implemented in microscopy by Zumbusch *et al.*² under tight focusing conditions and collinearly propagating pump and Stokes beams, CARS microscopy appears today as a powerful contrast mechanism to study living matter with chemical selectivity, reduced photodamage, and 3D sectioning capability.³

As a coherent process, the CARS signal generation relies on a phase-matching condition so that its spatial distribution proves to depend on the shape and size of the sample. In the collinear beam geometry (see Fig. 1) and under tight focusing the usual plane wave phase-matching condition $\Delta\mathbf{k} \cdot L \ll \pi$ [where $\Delta\mathbf{k} = \mathbf{k}_{AS} - (2\mathbf{k}_P - \mathbf{k}_S)$] is strongly relaxed due to the large cone angle of wave vectors and the small interaction length L that is located at the very vicinity of the objective focal point.^{4,5} Consequently, as reported in Refs. 6 and 7, a strong CARS signal is generated in the forward direction (denoted F-CARS) if the sample

The authors are with the Institut Fresnel UMR CNRS 6133, Mosaic Team, Université Paul Cézanne, Aix-Marseille III, Domaine Universitaire Saint Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France. H. Rigneault's e-mail address is herve.rigneault@fresnel.fr.

Received 14 December 2005; accepted 14 February 2006; posted 2 March 2006 (Doc. ID 66636).

0003-6935/06/277005-07\$15.00/0

© 2006 Optical Society of America

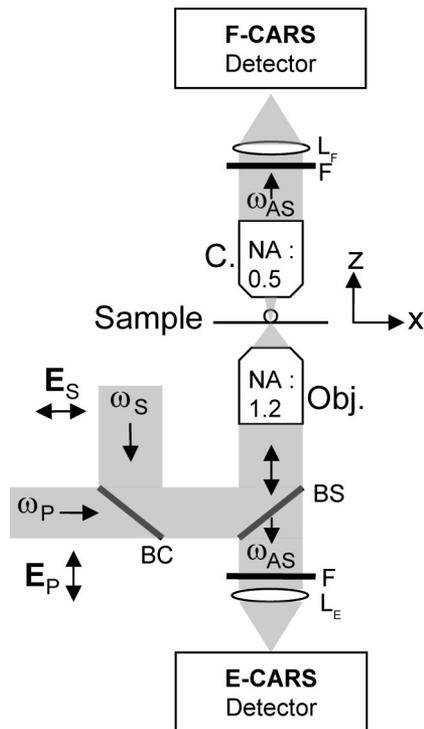


Fig. 1. Experimental setup used for collinear CARS microscopy (F, filter; BS, beam splitter; BC, beam combiner; L_E and L_F , lenses; C, condenser).

extension along the z axis, d , is larger than the excitation fields wavelengths ($d \geq \lambda_p$). On the other hand, if $d \leq \lambda_p$ the sample is too small to take advantage of the constructive interference in the forward direction and the radiation pattern is dipolelike leading generally to a similar CARS signal in the forward and backward directions, (the latter denoted E-CARS).

Although these general considerations are valid, the accurate CARS far-field emission depends on the shape of the object. To match our experiments, we have modeled the CARS far-field emission of beads. Taking into account the 3D vector structure of the excitation field, the total CARS signal is computed at different spatial positions by summing the CARS radiation of an ensemble of coherently induced Hertzian dipoles located inside the scatterer (i.e., inside the bead). For simplicity we assume that $\chi^{(3)}$ is a scalar and that the polarizations states of the incoming fields are linear along the x axis at the back aperture of the microscope lens (see Fig. 1). Furthermore, we neglect the near-field terms in the dipolar emission since we are interested only in far-field radiation. This technique of calculation will be detailed in a future paper and is equivalent to the methods presented in Refs. 6 and 7. Figure 2 presents the results of computation for two beads of diameter 100 nm and 2 μm centered at the objective focal point together with the ratio of the total intensity emitted in the E and F directions ($\lambda_p = 740$ nm, $\lambda_s = 840$ nm). As mentioned above, when the bead diameter d is much smaller than the pump wavelength ($d = 100$ nm), the CARS radiation pattern is dipolelike and symmetric in both the E

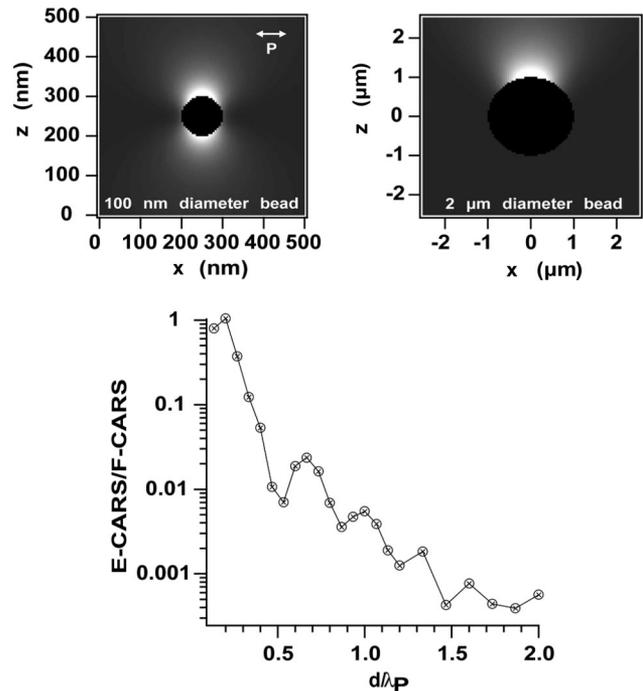


Fig. 2. Radiation pattern of a spherical shaped sample with different diameter d , ($d = 100$ nm and $d = 2$ μm). Ratio E-CARS–F-CARS versus the diameter of the sample ($\lambda_p = 740$ nm, $\lambda_s = 840$ nm). Polarizations of the pump and Stokes beams are set along the x axis.

and F directions. When the sample size increases ($d = 2$ μm), the CARS radiation is mainly confined in the forward direction. The E-CARS–F-CARS plot, shown in Fig. 2, confirms the results already reported in Refs. 6 and 7, and illustrates how fast the E-CARS signal drops down with increasing bead diameter.

The computation reported in Fig. 2 was performed assuming no refractive index mismatch between the bead and the surrounding medium. This hypothesis is rarely fulfilled in most experiments, and the present paper addresses the issue of how the E-CARS and F-CARS signal are affected by refractive index mismatches between the beads and surrounding media. For clarity we will denote backward-CARS (B-CARS), as the CARS signal that is detected in the backward direction and includes refractive effects. As refractive effects are difficult to introduce in a full CARS electromagnetic modeling for wavelength scale scatterers, we pursue here an alternative by using experimental results together with simple geometric optics and wave-optics modeling.

The influence of refractive index mismatch in high-resolution 3D confocal microscopy was studied by several authors. Visser *et al.*^{8,9} compared measured thickness values of fluorescent micrometer spheres immersed in liquids of varying refractive indices. In other experiments, using an oil-immersion objective, cross-sectional images through a fluorescent layer were compared, with and without n mismatch.^{10,11} Moreover, refractive index mismatch effects on the image formation in a two-photon microscope were

studied, by using fluorescent nanometer beads at different focusing depths.^{12,13} Finally, a procedure to determine the correct thickness of an object with confocal microscopy in case of refractive index mismatch was tested by using water-polymer layers.¹⁴ We clearly demonstrate that in the case of index mismatch, distortions are introduced in the CARS image formation process while detected B-CARS signal results in most cases of back-reflected F-CARS emission.

The paper is organized as follows: in Section 2 we briefly present our CARS experimental setup. Section 3 focuses on the experimental results for the B-CARS and F-CARS signals of polystyrene beads embedded in different refractive index media, and Section 4 presents the simulations and a discussion.

2. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Setup

Similar to other nonlinear optical processes, high peak powers are necessary for the efficient generation of the CARS signal. These are readily available using picosecond or femtosecond light pulses, the choice of which is determined by the spectral resolution required. We use near-IR excitation pulses that do not give rise to direct electronic excitations in the sample and therefore avoid photochemical damage due to photobleaching.

Our CARS microscope, as depicted in Fig. 1, uses two synchronized picosecond pulse trains.¹⁵ The pump and Stokes beams (with respective frequencies ν_p and ν_s) are generated by two picosecond Ti-sapphire lasers operating at 80 MHz (Mira-900, Coherent) tunable from 700 to 1000 nm to cover the entire spectrum region of molecular vibrations in biological systems (up to 3000 cm^{-1}). The two pulse trains (pulse duration 3 ps horizontally polarized) are electronically synchronized (SynchroLock System, Coherent), with a typically measured jitter of ~ 250 fs. The pump and Stokes beams are synchronously pulse picked through two Bragg cells (Pulse Picker, APE, Germany) to reduce the repetition rate of the pulse trains to several hundred kilohertz, thus avoiding photodamage of the sample while still maintaining high peak power for CARS generation. The collinearly combined and expanded beams are sent into an inverted microscope (Carl Zeiss, Axiovert 200M, Germany), and focused onto the sample by a water-immersion objective lens (C-Apochromat, Carl Zeiss, Germany) with an NA of 1.2. The B-CARS signal is collected by the same objective lens while the F-CARS signal is collected by a condenser lens with an NA of 0.5. The B-CARS and F-CARS signals are filtered and detected by two avalanche photodiodes with a $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ active area (Perkin Elmer, Canada). As the B-CARS signal represents the total back-collected CARS signal in the 1.2 NA, the F-CARS signal represents only one fifth of the actually emitted F-CARS light. This limitation in F-CARS signal detection is due to the poor imaging properties of the 0.5 NA condenser lens combined with lens L_F , which

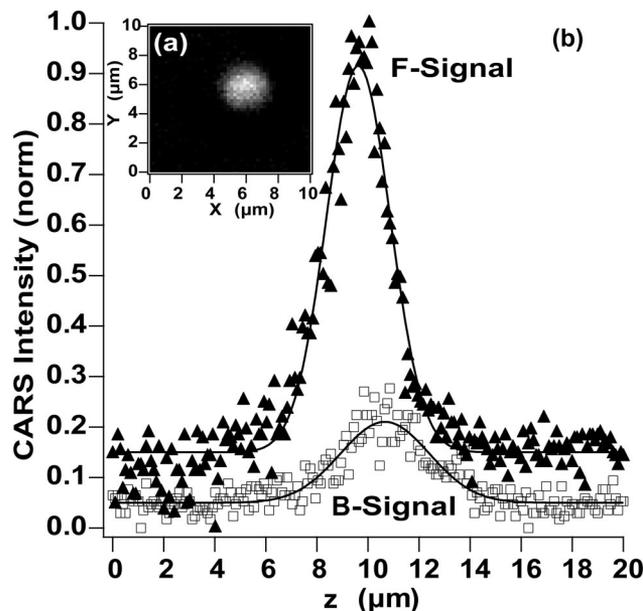


Fig. 3. (a) F-CARS xy image of $2\text{ }\mu\text{m}$ polystyrene bead in air sitting on a glass cover slip (Raman shift 1600 cm^{-1} corresponding to C=C stretch). The average pump and Stokes powers are 200 and $100\text{ }\mu\text{W}$, respectively, at 400 kHz repetition rate (gray scale in arbitrary units). (b) F-CARS (solid triangles) and B-CARS (open squares) z axis signal profiles (taking at the bead center in the xy plane). Gaussian fit curves (solid curves) for F-CARS (FWHM = $4.50\text{ }\mu\text{m}$) and B-CARS (FWHM = $4.15\text{ }\mu\text{m}$).

produces a spot five times bigger than the avalanche photodiode active surface. The CARS images are collected by raster scanning the sample, using an XYZ piezoflexure stage (Physike Instrument, Germany).

3. Experimental Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Imaging With Refractive Effects

To characterize the imaging properties of the CARS microscope, we use polystyrene beads (Sigma Aldrich) of well-defined sizes. Figure 3 shows an F-CARS image of a $2\text{ }\mu\text{m}$ polystyrene bead (Raman shift centered at 1600 cm^{-1} corresponding to C=C vibration stretch) sitting on the microscope slide in air. In the same figure are shown the raw F- and B-CARS signals simultaneously recorded while scanning along the z axis. Similar results are obtained for beads of different diameters. Several intriguing features are present in these traces. First, the B/F ratio is approximately 0.20, whereas from Fig. 2, no more than a few 10^{-4} for a $2\text{ }\mu\text{m}$ polystyrene bead, is expected. Second, we note that the z positions of the F-CARS and B-CARS signal maxima do not coincide, as already observed in a melamine bead embedded in an agarose gel.¹⁶ Finally the FWHM of both the F-CARS and B-CARS curves is approximately $4\text{ }\mu\text{m}$, a value much larger than the actual bead diameter ($2\text{ }\mu\text{m}$).

To investigate the origin of these discrepancies, the refractive index n of the medium surrounding the beads was changed. Figure 4 shows the F-CARS and B-CARS signals while scanning along the z axis for $2\text{ }\mu\text{m}$ diameter polystyrene beads embedded in air

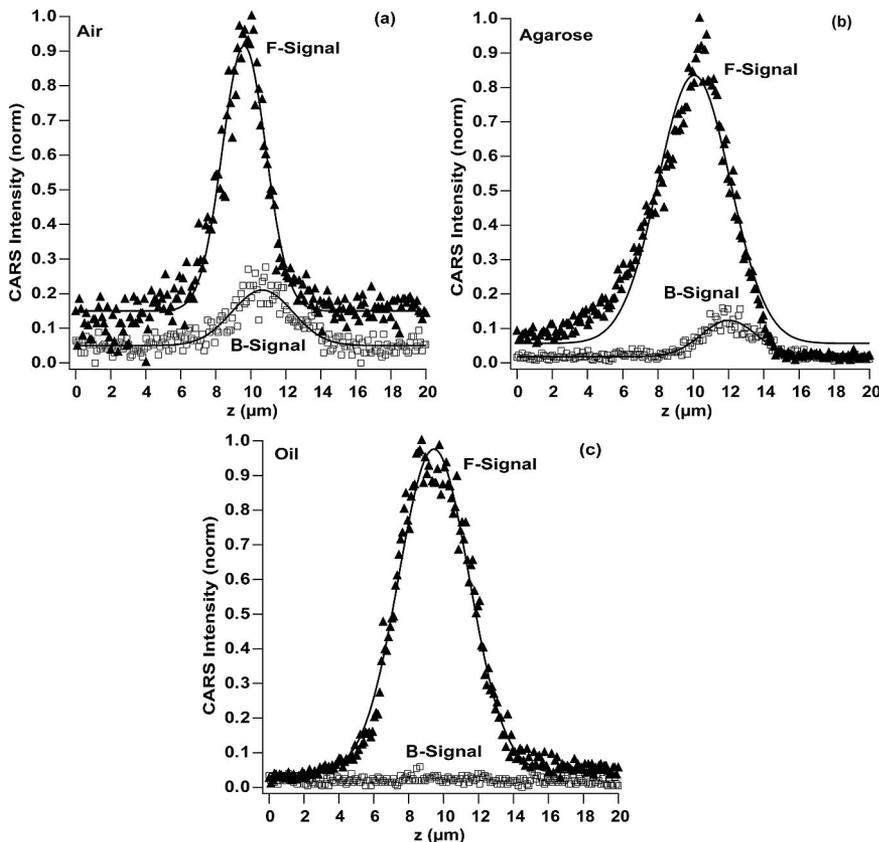


Fig. 4. F-CARS and B-CARS profiles (markers) along z axis (taking at the bead center in the xy plane) for $2 \mu\text{m}$ beads embedded in different media of refractive index n (a) air, $n = 1$; (b) agarose gel, $n = 1.33$; (c) oil, $n = 1.45$. Gaussian fit curves (solid curves).

($n = 1$), in agarose gel ($n = 1.33$), and in oil ($n = 1.45$). When the bead refractive index ($n = 1.6$) differs significantly from that of the surrounding media (air or agarose gel), a B-CARS signal is detected, which disappears when the refractive index mismatch is lowered (the oil case).

Figure 4 proves the refractive origin of the B-CARS detected signal. In air and agarose gel, the B-detected signal is interpreted as a backward-reflected F-CARS emission. To understand further the experimental results and study the refractive effects on the CARS signal detection, we have performed several numerical simulations.

4. Numerical Simulations and Discussion

Although a full electromagnetic theory of the CARS emission process in beads including the refractive effects is, in principle, possible, its numerical implementation is extremely computation consuming. As a comprehensive approach, we report, here, two simulation methods to study the refractive effects in CARS microscopy. The first one, based on geometrical optics, permits to model the CARS emission (anti-Stokes) and collection while the second one based on wave optics gives access to the excitation fields.

A. Geometrical Optics: Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Emission and Collection Functions in Beads

We use a ray tracing software (Oslo, Lambda Research) to investigate how F-CARS and E-CARS emitted beams are refracted by a bead (see Fig. 5). We

simply model the CARS emission by a forward-propagated set of beams whose NA matches that of the experimental pump and Stokes beams.

Working with a $2 \mu\text{m}$ bead, we consider the B-CARS signal as a pure reflection of the forward-emitted CARS signal on the upper bead interface. To do so, we set a reflecting mirror on the upper bead interface and calculate, for each position z of the focal point in the bead along the z axis, the NA of the reflected beams cone angle $\text{NA}_B = \sin \theta_B$. To simulate the F-CARS signal we use upper media with different refractive indices, and we calculate, for each position z of the focal point in the bead along the z axis, the NA of the transmitted beams cone angle $\text{NA}_F = \sin \theta_F$.

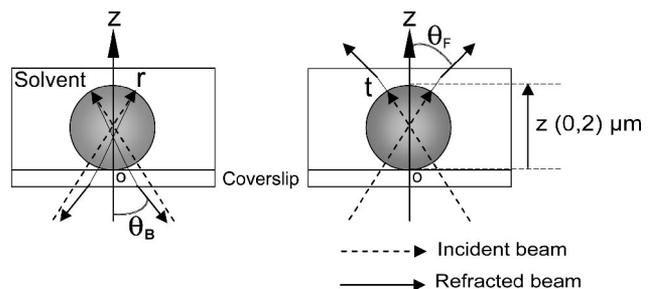


Fig. 5. Refractive model system used in geometrical optics simulations. The bead stands on a glass cover slip and is embedded in a solvent of refractive index n . (Left) H-CARS signal is considered as a pure reflection of the forward-emitted CARS signal on the upper bead interface. (Right) F-CARS signal is refracted by the bead-solvent interface.

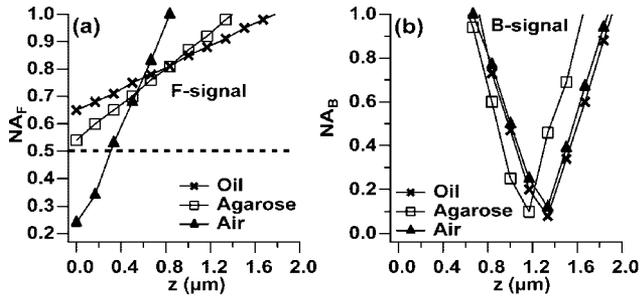


Fig. 6. Calculated numerical apertures as a function of the emitted CARS position z in a $2\ \mu\text{m}$ polystyrene bead. (a) Resulted NA_F of forward-reflected beams. (b) Resulted NA_B of backward-reflected beams.

The CARS emission is considered only along the z axis with the origin set at the bead–cover glass interface (see Fig. 5).

Figure 6 shows the calculated NAs $NA_F(z)$ and $NA_B(z)$ as a function of the emitted CARS position z in a $2\ \mu\text{m}$ polystyrene bead. From Fig. 6(a) it can be seen that the forward-reflected beams are poorly collected by the $NA = 0.5$ condenser lens used in the experiment. At least only the positions satisfying $z < 0.3\ \mu\text{m}$ for a bead in air are fully collected by the condenser lens.

For the backward reflected beams [Fig. 6(b)], $NA_B(z)$ is always shorter than 1, a value smaller than the NA ($NA = 1.2$) of the water-immersion objective lens used to detect the B signal. Although this B signal is well collected, it is interesting to see that it mostly comes from the bead center whatever the surrounding media are.

From $NA_F(z)$ and $NA_B(z)$, we can define the collection functions $C_F(z)$ and $C_B(z)$ that are the ratio of the collected power to the total emitted power in the forward and the backward direction, respectively. Making the simple assumption that the emitted CARS power per unit solid angle is constant we get the expression

$$C_F(z) = B(z) \frac{1 - [1 - ON_{\text{col}F}^2]^{1/2}}{1 - [1 - ON_F^2]^{1/2}}, \quad (2)$$

where $B(z) = 1$ in the bead and $B(z) = 0$ outside the bead, $ON_{\text{col}F} = 0.5$ is the condenser NA used for the F-signal detection. A similar expression is obtained for $C_B(z)$ replacing index F by B . As an example, Fig. 7 shows $C_F(z)$ and $C_B(z)$ for a $2\ \mu\text{m}$ bead diameter (in air) centered at $z = 10\ \mu\text{m}$. As expected from Fig. 6, $C_F(z)$ concentrates in the lower z positions and decreases quickly for larger z , whereas $C_B(z)$ is stronger in the bead center. We believe that this asymmetry between $C_F(z)$ and $C_B(z)$ explains why the F-signal maximum appears before the backward-signal maximum in Figs. 4(a) and 4(b).

B. Wave Optics: Excitation Fields in Beads

The second numerical simulation we have implemented is based on wave optics using a commercial

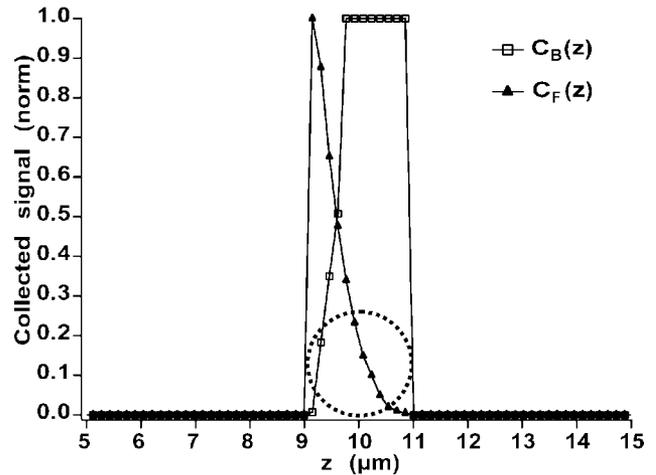


Fig. 7. Calculated collection functions $C_F(z)$ (solid triangles) and $C_B(z)$ (open squares) in a $2\ \mu\text{m}$ diameter polystyrene bead (dotted curve).

finite-difference time-domain (FDTD) software (Fullwave, Rsoft). In this Subsection, 2D calculations are reported for focused excitation beams (pump and Stokes) in beads embedded in various media. For simplicity we concentrate on an excitation field whose wavelength ($\lambda = 800\ \text{nm}$) is close to those of the pump ($\lambda_P = 740\ \text{nm}$) and Stokes ($\lambda_S = 840\ \text{nm}$) fields.

Let us first concentrate on the excitation Poynting intensity $I_{\text{ex}}(x, z)$ and its maximum (beam waist) when a scan is performed along the bead z axis. The calculations are performed in a space composed of two semi-infinite media (glass and upper medium) separated by an interface (located at $z = 3\ \mu\text{m}$) on which a polystyrene bead can be settled. First, considering no bead at the interface, a Gaussian beam (waist $0.5\ \mu\text{m}$) is launched from the glass side. This beam focuses at z_{laser} in the upper medium. Then, a polystyrene bead is settled at the interface. We observe how the intensity pattern $I_{\text{ex}}(x, z)$ is affected, and we concentrate on the new location z_{max} of the intensity maximum. Figure 8(a) gives an example of results obtained with a $2\ \mu\text{m}$ diameter bead (centered at $z = 4\ \mu\text{m}$), settled at the glass surface (the solid white line at $z = 3\ \mu\text{m}$) and embedded in air. While the bead is scanned along the z axis, the high refractive index mismatch between air ($n = 1$) and polystyrene ($n = 1.6$) clearly confines z_{max} into the bead as compared to z_{laser} (dashed line). Figure 8(b) plots z_{max} versus z_{laser} for a $2\ \mu\text{m}$ bead diameter embedded in various media (oil, agarose, air).

From Fig. 8(b), the excitation beam focal point z_{max} clearly depends upon the refractive index mismatch between the polystyrene bead ($n = 1.6$) and its surrounding medium. As the refractive index contrast increases, z_{max} remains confined in the bead although z_{laser} is set well above the bead. The strongest effect is obtained in air [Fig. 8(a)]. In this case, for z_{laser} varying between 3.5 and $7\ \mu\text{m}$, the location of the excitation beam focal point z_{max} remains in the bead and a CARS signal is still generated. This phenomenon explains qualitatively why the CARS bead extension

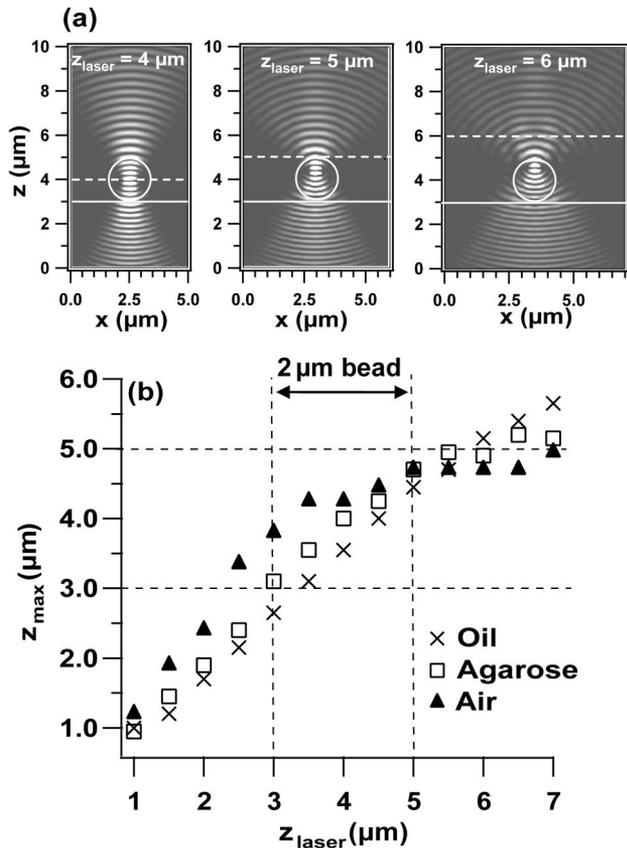


Fig. 8. FDTD calculation in a 2 μm polystyrene bead centered at $z = 4 \mu\text{m}$. (a) Excitation Poynting intensity mapping $I_{\text{ex}}(x, z)$ ($\lambda = 800 \text{ nm}$, waist $0.5 \mu\text{m}$) in the bead settled on a glass-air interface ($z = 3 \mu\text{m}$; white line). In the absence of bead the beam focuses at $z_{\text{laser}} = 4; 5$ and $6 \mu\text{m}$ (dashed line). (b) z_{max} versus z_{laser} for the bead embedded in various media (oil, agarose, air).

along the z axis is larger than the actual bead diameter in our experiments (see Fig. 4).

Let us concentrate now on the ratio of the F-CARS to the B-CARS signals shown in Fig. 3. In air, we have found experimentally a ratio of 5:1 in favor of the F-CARS detected signal. FDTD simulations report that 4.5% of the F-CARS emission is backreflected by the upper bead interface and penetrates into the glass substrate while 90% is transmitted to the F detection. Since our F detector collects roughly 20% of the F-CARS signal, we reach an expected ratio of 4:1 in favor of the F-CARS detected signal, which is

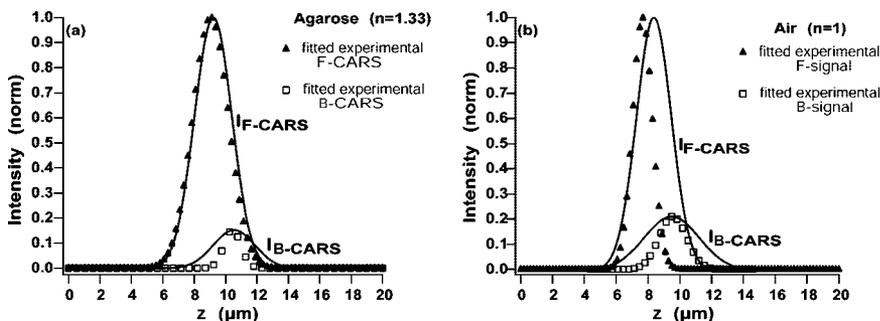


Fig. 9. Comparison between experimental and theoretical CARS signals obtained when scanning along the z axis for a 2 μm bead diameter (z scan performed along the symmetry axis of the bead). Experimental F-CARS signal (solid triangle), B-CARS (open squares), $I_{\text{F-CARS}}$ and $I_{\text{B-CARS}}$ (continuous black curve). (a) Bead embedded in agarose, (b) bead embedded in air.

in acceptable agreement with the experiment. In agarose, the experimental ratio of 10:1 is also in good agreement with the simulation. These results demonstrate again the back-reflected F-CARS origin of the backward detected signal.

C. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Profile Modeling along the z Axis

To take the refractive effects fully into consideration we now combine our results from the geometrical and wave optics simulations. We simply model the CARS signal obtained along the z axis as a convolution between the collection function and the cube of the excitation intensity. This is clearly a crude approximation that does not take into account the coherent nature of the CARS emission. Nevertheless, this simple analysis is motivated by the inclusion of refractive effects in both the collection function and the excitation intensity. With the above mentioned notations, the F-CARS signal $I_{\text{F-CARS}}$ is given by

$$I_{\text{F-CARS}}(z) = K \int_{z'} C_F(z') I_{\text{ex}}^3(z - z') dz', \quad (3)$$

where K is a constant. A similar expression is obtained for the B-CARS signal $I_{\text{B-CARS}}$. $I_{\text{F-CARS}}$ and $I_{\text{B-CARS}}$ can now be compared to their respective fitted experimental values (recorded in Fig. 4). Figure 9 compares, in the same graph, theoretical and experimental results for the agarose and air cases. When agarose is taken as the surrounding medium [Fig. 9(a)], a good agreement is found between theory and experiment. The B-CARS signal maximum is shifted 1.3 μm after the F-CARS signal maximum. Similarly, the experimental FWHM of both F- and B-CARS signals are larger than the bead diameter, still in good agreement with theory. When agarose is replaced with air [Fig. 9(b)], the main features still operate. The B-CARS maximum is shifted 1.8 μm after the F-CARS signal maximum and the FWHMs of both the F- and B-CARS signals are still larger than the bead diameter. Nonetheless, the discrepancy between experiment and theory is stronger, pointing out the limitations of our model. Indeed, it does not fully take into consideration the coherent nature of the CARS emission process and considers the B-CARS signal as a sole reflection of the F-CARS

signal. In the above results we have shown the important contribution of refractive effects in CARS imaging and more generally in any nonlinear microscopy process.

Two important results have been pointed out. First, we have demonstrated the prominent contribution of the strong forward-emitted CARS signal to the epi-detected signal via backreflection due to the refractive index mismatch between the sample and its surrounding medium. This does not preclude that in the backward-detected signal, a true E-CARS emission exists and was, in this case, mixed with the backreflected F-CARS emission. As a consequence, the radiation pattern shown in Fig. 2 has to be reconsidered, taking into account the refractive effects to match the experimentally detected B-CARS–F-CARS ratio.

Second, we have highlighted the distortion of the excitations and CARS emitted fields due to the refractive index mismatch, and induced distortion of CARS images. On the one hand, in the scope of our experiment, the F-CARS signal was well collected only close to the glass interface (see Fig. 7). On the other hand, the excitation fields remained trapped in the high refractive index bead while the beam was scanned upward (see Fig. 8). Combining both effects in the final CARS imaging process [as depicted in Eq. (2)] induced image distortions such as altered FWHM, or maximal F-CARS and B-CARS signals detected at distinct positions.

5. Conclusion

In this paper we have investigated the effects of refractive index mismatch between the sample (polystyrene bead) and its surrounding medium in CARS microscopy. We have pointed out the influence of a backreflected F-CARS signal on the B-CARS detected signal, and in some cases this could be a major contribution to the epi-detected signal. Moreover, we have emphasized the leading effect of the refractive index mismatch on CARS images distortion. Perturbations induced to excitations and CARS fields were bound to the shape and the refractive index of the sample. Although refractive effects are believed to play a minor role in nonlinear microscopy, the diversity of compounds found in a living cell—lipid ($n = 1.48$), protein ($n = 1.50$), melanin ($n = 1.7$), and mitochondria ($n = 1.40$)—justifies a special care for fine imaging investigation.

We acknowledge financial support from the CNRS, the French National Education Ministry, the P.A.C.A. region, and the E.U. (FEDER). We thank

Kien Phan Huy for his help with the FDTD computation.

References

1. H. Lotem, R. T. Lynch, and N. Bloembergen, "Interference between Raman resonances in four-wave difference mixing," *Phys. Rev. A* **14** (5), 1748–1755 (1976).
2. A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, "Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering," *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4142–4145 (1999).
3. A. Volkmer, "Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *J. Phys. D* **38**, R59–R81 (2005).
4. G. C. Bjorklund, "Effects of focusing on third-order nonlinear processes in isotropic media," *IEEE J. Quantum Electron.* **QE11**, 287–296 (1975).
5. E. O. Potma, W. P. Boeij, and D. A. Wiersma, "Nonlinear coherent four-wave mixing in optical microscopy," *J. Opt. Soc. Am. B* **17**, 1678–1684 (2000).
6. A. Volkmer, J. X. Cheng, and X. S. Xie, "Vibrational imaging with high sensitivity via epi-detected coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *Phys. Rev. Lett.* **87**, 023901 (2001).
7. J. X. Cheng, A. Volkmer, and X. S. Xie, "Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *J. Opt. Soc. Am. B* **19**, 1363–1375 (2002).
8. T. D. Visser, J. L. Oud, and G. J. Brakenhoff, "Refractive-index and axial distance measurements in 3D microscopy," *Optik* **90**, 17–19 (1992).
9. T. D. Visser and J. L. Oud, "Volume measurements in 3-dimensional microscopy," *Scanning* **16**, 198–200 (1994).
10. S. Hell, G. Reiner, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer, "Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive-index," *J. Microsc.* **169**, 391–405 (1993).
11. H. Jacobsen, P. Hannien, E. Soini, and S. W. Hell, "Refractive-index-induced aberrations in 2-photon confocal fluorescence microscopy," *J. Microsc.* **176**, 226–230 (1994).
12. G. J. De Grauw, J. M. Vroom, H. T. M. Van der Voort, and H. C. Gerritsen, "Imaging properties in two-photon excitation microscopy and effects of refractive-index mismatch in thick specimens," *Appl. Opt.* **38**, 5995–6003 (1999).
13. A. Diaspro, F. Federici, and M. Robello, "Influence of refractive-index mismatch in high-resolution three-dimensional confocal microscopy," *Appl. Opt.* **41**, 685–690 (2002).
14. L. C. Kuypers, W. F. Decraemer, J. J. J. Dirckx, and J. P. Timmermans, "A procedure to determine the correct thickness of an object with confocal microscopy in case of refractive index mismatch," *J. Microsc.* **218**, 68–78 (2005).
15. E. O. Potma, D. J. Jones, J. X. Cheng, X. S. Xie, and J. Ye, "High-sensitivity coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with two tightly synchronized picosecond lasers," *Opt. Lett.* **27**, 1168–1170 (2002).
16. J. X. Cheng and X. S. Xie, "Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications," *J. Phys. Chem. B* **108**, 827–840 (2004).

Quatrième partie

Applications en imagerie des systèmes biologiques

Chapitre 5

Microscopie CARS : Applications en biologie

Sommaire

5.1	Introduction	97
5.2	Imagerie des systèmes modèles	98
5.2.1	Préparation des vésicules géantes	99
5.2.2	Imagerie CARS des vésicules géantes	103
5.2.3	Etude de la sensibilité de l'imagerie CARS	105
5.3	Imagerie des systèmes biologiques	108
5.3.1	Imagerie cellulaire	108
5.3.2	Imagerie des tissus	112
5.4	Conclusion	127

5.1 Introduction

Les cellules sont entourées d'une paroi, *la membrane cellulaire*, qui évite la dispersion de l'intérieur de la cellule dans le milieu environnant. Une membrane similaire forme la paroi des compartiments internes de la cellule, permettant ainsi une organisation complexe. La membrane cellulaire est principalement formée de lipides, mais est aussi un milieu complexe et dynamique : elle est le siège d'un mouvement moléculaire continu et est constamment renouvelée par le transport des lipides et protéines. Elle est présentée par Singer et al [181], comme étant un modèle moléculaire dit "*en mosaïque*"

*fluide*¹. Il décrit la matrice lipidique fondamentale comme un fluide bidimensionnel isotrope, où les lipides et les protéines sont en perpétuel mouvement de diffusion. Des études expérimentales de la dynamique moléculaire dans les membranes ont été menées au sein de l'équipe *Mosaic* par des techniques basées jusqu'à présent essentiellement sur la fluorescence [182, 183].

Comme la technique CARS est un outil très récent qui a peu de recul sur l'étude des systèmes cellulaires complexes, nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur des systèmes modèles (formés uniquement de lipides), qui vont mimer la membrane. Les lipides ont la capacité de s'assembler spontanément en une double couche de molécules, comme dans la membrane cellulaire. Lorsqu'elle est plongée dans l'eau, cette bicouche peut se refermer sur elle-même pour former une vésicule. Cette organisation spontanée est due au caractère amphiphile et à la forme cylindrique des lipides [184]. Les vésicules permettent de comprendre les propriétés ainsi que l'architecture de la membrane cellulaire, mais leur intérêt biomimétique ne s'arrête pas là : elles permettent aussi de mimer des processus cellulaires impliquant la membrane. De plus il est facile de les fabriquer à partir d'un mélange de lipides, dont la composition se rapproche de celle de la cellule.

Dans cette partie du manuscrit, afin d'évaluer les performances de notre appareil, nous nous proposons d'effectuer différentes expériences. Tout d'abord, nous allons nous intéresser à l'imagerie des systèmes modèles par la microscopie cohérente Raman anti-Stokes (CARS). Nous présentons tout d'abord, les signaux enregistrés issus des liaisons chimiques excitées présentes dans les lipides, ainsi que leurs spectres CARS. Puis nous passerons à l'imagerie de systèmes vivants plus complexes comme les cellules et les tissus (peau, et placenta). Le but de ce chapitre étant d'illustrer les potentialités de notre microscope CARS.

5.2 Les vésicules géantes (*GUV*)

Par rapport à la membrane cellulaire, les vésicules sont des objets beaucoup plus simples mais aussi beaucoup plus aisés à contrôler expérimentalement. Suivant le mode de préparation, le rayon d'une vésicule varie entre 30 nm et 10 μm . Dans la suite, nous nous intéresserons uniquement aux vésicules géantes unilamellaires (*GUV*), des vésicules formées d'une seule bicouche de lipides avec des rayons typiques de quelques dizaines de microns

¹d'où le nom de l'équipe *Mosaic* qui s'intéresse à étudier tout ce qui est relié à la membrane cellulaire et à son organisation.

(correspondant environ à la taille d'une cellule). Ces vésicules résultent de l'hydratation progressive des lipides, initialement en poudre ou en solution dans un solvant organique.

5.2.1 Préparation des vésicules géantes

La membrane artificielle formant la vésicule géante est constituée de phospholipides. Ces molécules amphiphiles possèdent une partie hydrophile appelée "tête", et une autre hydrophobe appelée "queue". Ces lipides forment spontanément des membranes planaires de bicouche en raison de leur forme cylindrique (c'est-à-dire, la tête polaire et la somme des deux chaînes ont approximativement la même section). Lors des expériences, nous allons utiliser deux types de phospholipides (voir leurs structures moléculaires dans la FIG. 5.1), qui sont le DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), et le DMPC(D54) (1,2-Dimyristoyl-D54-sn-Glycero-3-Phosphocholine). Dans ce dernier les liaisons CH_2 sont remplacées par des liaisons CD_2 (voir partie 2.4).

Généralement, les lipides se trouvent dans différentes phases (liquide ou solide) en fonction de leur température de transition " T_M ". Cette température change avec la longueur et le degré de saturation des chaînes de carbone dans la partie hydrophobe. Ainsi, les températures de transition inférieures sont associées aux chaînes les plus courtes et avec le degré le plus élevé d'insaturation. Par exemple, $T_M = 25^\circ C$ pour le DMPC(D54), et $T_M = -22^\circ C$ pour le DOPC. C'est pour cela que lors de la préparation des GUV, il est important que les lipides se trouvent à l'état liquide. En conséquence, la température de formation doit impérativement dépasser la température de transition.

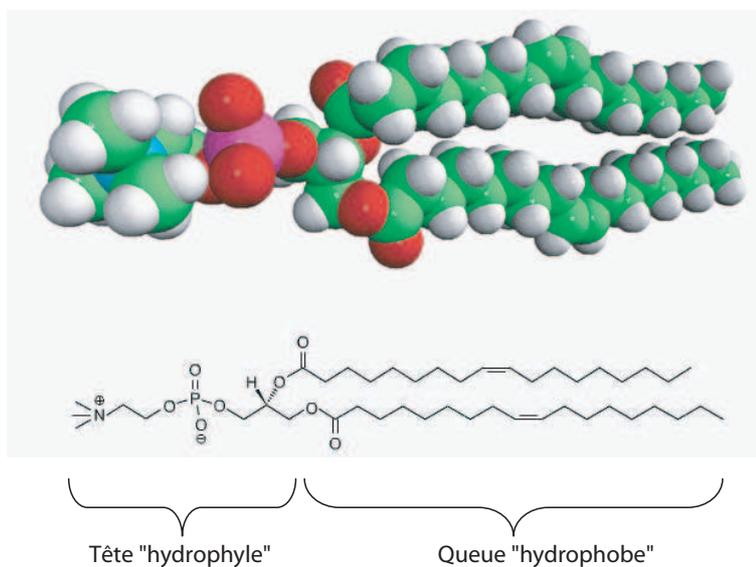
Conservation des lipides

Les phospholipides sont des produits sensibles à l'hydrolyse et à l'oxydation. On les conserve à $-20^\circ C$, à l'abri de l'air et de l'humidité. Les produits commerciaux utilisés dans nos expériences proviennent d'*Avanti Polar Lipids*², et *Sigma Aldrich*³. Ils sont conditionnés sous argon, à l'état de poudre ou en solution dans le chloroforme. Pour limiter la durée de stockage, on achète les lipides par petites quantités (25 mg). Les solutions mères de lipide sont préparées à 10 mg/mL dans le chloroforme, en évitant de les laisser longtemps à l'air.

²Avanti Polar Lipids, Alabama(USA)

³Sigma-Aldrich, St. Louis, (USA)

DOPC



DMPC(D54)

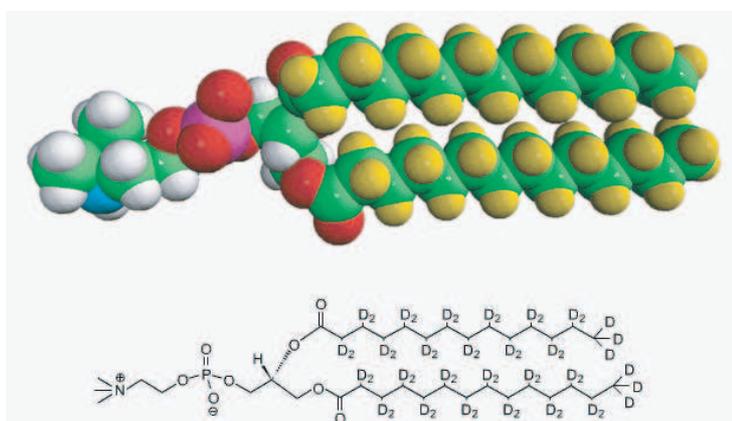


FIG. 5.1 – Modèle moléculaire des molécules de phospholipides (DOPC et DMPC-D54). Sur la formule semi développée apparaît la partie hydrophyle (tête) et la partie hydrophobe (queue).

Il existe plusieurs protocoles pour la préparation des vésicules lipidiques, comportant des variantes suivant les auteurs et les applications voulues. Nous rapportons ici la méthode de l'*électroformation* qui a été utilisée au cours de ce travail.

Electroformation

Les vésicules géantes (GUV) sont le plus souvent fabriquées par la méthode d'électroformation [185, 186]. Elle consiste à appliquer un champ électrique, oscillant à basse fréquence (5 à 20 Hz), perpendiculairement au film lipidique. Le lipide est déposé directement sur les électrodes (deux lames transparentes et conductrices d'ITO). Sous l'effet des flux périodiques d'électro-osmose, induits dans la solution, la dernière bicouche empilée est déstabilisée, et enfle progressivement, par alimentation à partir du film lipidique. Lorsque la bicouche se referme sur elle-même, les vésicules se détachent de l'électrode, formant des petites sphères faisant quelques dizaines de microns. Le protocole utilisé dans notre laboratoire est le suivant :

Préparation des lames d'ITO :

Les lames d'ITO sont formées d'un dépôt conducteur d'ITO (Indium Tin Oxyde). Le côté conducteur est facilement reconnu à l'ohmmètre. Une pâte de scellement (Vitrex, Polylabo) permet d'espacer les deux lames et d'assurer l'étanchéité de la chambre (voir FIG. 5.2).

Protocole :

- Laver les deux lames d'ITO au chloroforme et à l'éthanol, puis rincer à l'eau.
- Sécher sous flux d'azote, puis environ 10 minutes sous vide.
- Prélever 10 μl de solution de lipides à l'aide d'une seringue en verre, et déposer la solution rapidement sur les lames, de la façon la plus homogène possible.
- Sécher les lames sous vide pendant environ 3 heures, ou toute une nuit.
- Placer les deux lames dans la chambre d'électroformation, en s'assurant de l'étanchéité de la chambre.

Electroformation :

Le champ électrique est contrôlé par une rampe alimentée par un générateur basse fréquence délivrant une tension alternative incrémentée toutes

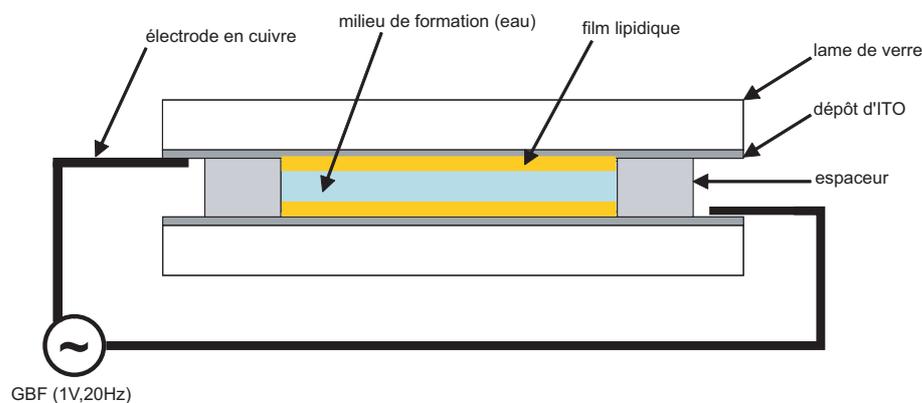


FIG. 5.2 – La cellule d'électroformation.

les 5 minutes de 20 mV à 1 V (voir FIG. 5.3). La formation des GUV prend environ 2-3 heures. On diminue ensuite la fréquence à 4 Hz en augmentant la tension à 1.5 V pour décoller les vésicules.

Protocole :

- Brancher le générateur et la rampe.

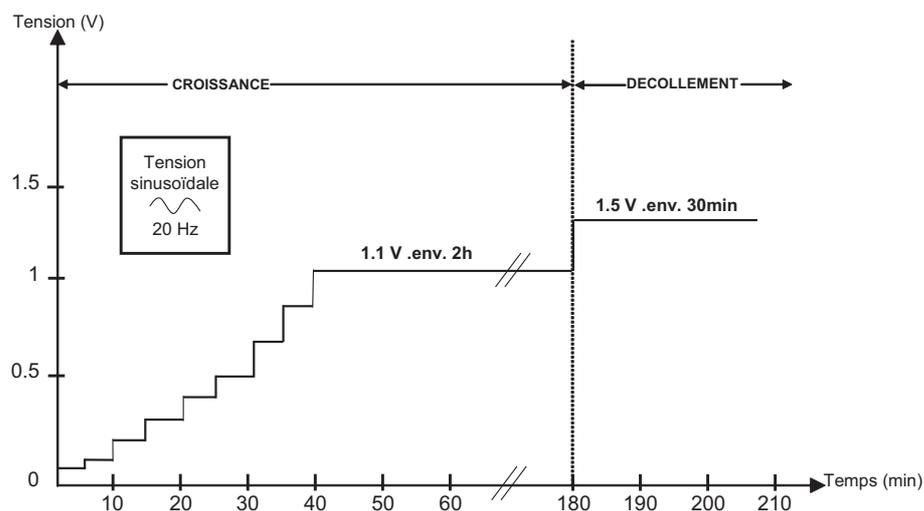


FIG. 5.3 – Variation de la tension appliquée au cours de l'électroformation des vésicules géantes.

- Remplir la chambre avec le milieu de formation (eau pure) en évitant les bulles d'air.
- Fermer la chambre avec la pâte de scellement, puis brancher rapidement les électrodes et la rampe de tension.
- Après une heure, vérifier au microscope la formation des GUV.
- Baisser la fréquence à 4Hz et augmenter la tension à 1.5 V pendant 15-20 minutes pour décoller les GUV. Prélever avec une seringue et conserver à 4 °C.

5.2.2 Imagerie CARS des vésicules géantes

Les vésicules géantes sont réalisées à partir d'une solution de lipides deutérés (CD_2) et non-deutérés (CH_2). Dans cette partie de nos travaux nous nous intéressons au marquage par le deutérium, et ceci pour deux raisons : **(1)** le marquage au deutérium, comme nous l'avons déjà indiqué (voir Chapitre 2.4), est peu invasif et peut être utilisé dans des milieux biologiques vivants tels les cellules, **(2)** le fort contraste Raman des liaisons CH_2 est difficilement utilisable pour étudier un lipide particulier, car tous les lipides signent sur cette liaison dans la bande 2800-3000 cm^{-1} . Le marquage au deutérium doit nous permettre d'isoler une structure d'intérêt dans une région qui est propre spectralement (autour de 2000 cm^{-1}), où il n'y a pas de fréquences de résonance pour les groupes CH, CH_2 , CH_3 (voir FIG. 2.9).

La FIG. 5.4 représente des images F-CARS que nous avons obtenues pour des membranes marquées au deutérium de vésicules unilamellaires géantes, produites à partir d'une solution de lipides deutérés (DMPC(D54)). Lorsque la différence de fréquence entre l'onde pompe et Stokes atteint la fréquence de résonance de la liaison CD_2 (2105 cm^{-1}), l'intensité de l'onde Anti-Stokes générée augmente considérablement. Par contre lorsque cette différence de fréquence s'éloigne de la fréquence de résonance (2140 cm^{-1}), l'intensité de l'onde Anti-Stokes décroît et le contraste de l'image devient quasiment nul.

En plus de la spécificité spectrale, la microscopie CARS présente un autre point fort dans l'imagerie, lié à la propriété de cohérence de son rayonnement. Cette cohérence permet de différencier les signaux CARS générés par les diverses orientations des liaisons chimiques présentes dans l'échantillon. Le signal CARS est en effet maximum si la liaison chimique est orientée suivant la direction de polarisation des faisceaux pompe et Stokes. Plusieurs travaux expérimentaux ont illustré cette spécificité de l'imagerie CARS [140, 143]. Sur la FIG. 5.5, on constate que l'intensité du signal CARS est forte au pôle sud

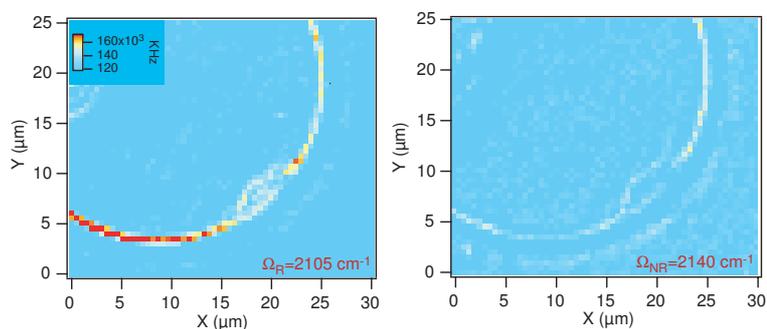


FIG. 5.4 – Images F-CARS d’une vésicule unilamellaire géante : (à gauche) l’image enregistrée à la fréquence de résonance de la vibration Raman de la liaison CD_2 à 2105 cm^{-1} . (à droite) la même vésicule enregistrée à une fréquence de non-résonance de la liaison CD_2 (2140 cm^{-1}).

lorsque les liaisons CD_2 sont parallèles à la polarisation des champs incidents (suivant x dans ce cas indiquée par le vecteur P).

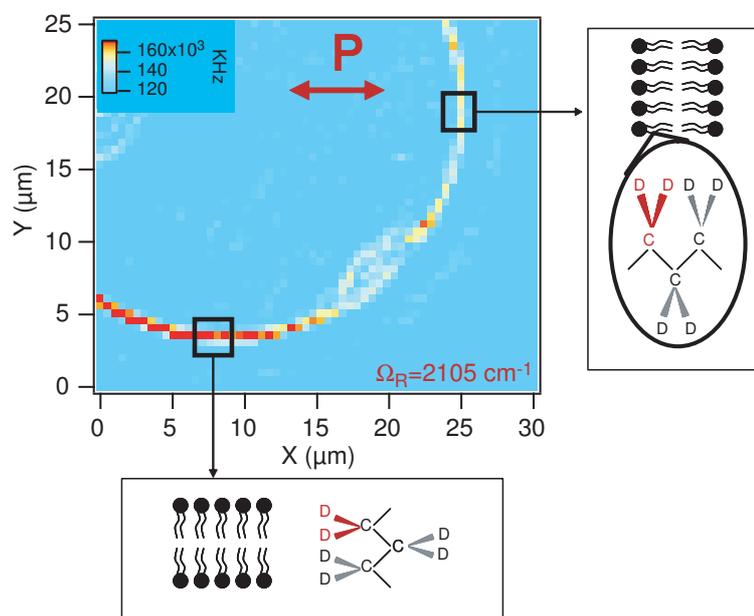


FIG. 5.5 – Images F-CARS d’une vésicule unilamellaire géante enregistrée à la fréquence de résonance de la vibration Raman de la liaison CD_2 .

5.2.3 Etude de la sensibilité de l'imagerie CARS

La microscopie CARS permet de réaliser des images de liaisons chimiques spécifiques. Il est également possible de l'utiliser comme un outil de spectroscopie en faisant varier l'écart fréquentiel ($\omega_P - \omega_S$) entre les lasers pompe et Stokes. On obtient alors un spectre comme en spectroscopie Raman mais présentant une bien meilleure sensibilité ($\approx 10^6$). Cette approche de spectroscopie CARS a été utilisée pour caractériser spectralement certains lipides. Dans le cadre de notre étude, nous voulons connaître le nombre minimal de liaisons chimiques auquel est sensible la technique CARS. Pour cela nous avons étudié la signature spectrale d'un mélange de lipides deutérés (DSPC(D70)) et non-deutérés (DOPC) en fonction de la fréquence Raman ainsi que de leur concentrations respectives.

Des solutions de différentes concentrations sont préparées à partir d'une poudre de lipides deutérés et non-deutérés diluée dans un mélange (chloroforme 90% + méthanol 10%). Chaque solution est déposée sur une lamelle, puis séchée à l'azote. Nous obtenons facilement une couche de lipides (poudre) sur la lamelle de verre, dont le spectre est représenté pour chaque concentration sur la FIG. 5.6.

La FIG. 5.6 représente le spectre CARS d'un mélange lipidique de DOPC et DSPC(D70) pour différentes concentrations de DSPC(D70). Le spectre CARS du DSPC(D70) est présenté autour de la fréquence vibrationnelle de la liaison CD_2 à 2105 cm^{-1} . L'intensité du signal CARS résonant de CD_2 dépend du nombre de liaisons présentes dans l'échantillon. La concentration minimale de liaisons présentes dans le volume d'excitation, à partir de laquelle on peut détecter un signal CARS est de l'ordre de 20%.

Une étude similaire sur des membranes (bicouches) unilamellaires, marquées au deutérium (DPPC/DPPC(D62)) a été rapportée dans [147]. La concentration minimale de DPPC(D62) est également de 20% comme dans notre expérience menée à partir de la poudre de lipides (désordonnés). Cette concentration minimale pour laquelle une signature CARS des liaisons CD_2 est observable, correspond à un marquage de l'ordre de quelques millimolaires⁴.

En plus des études sur la sensibilité au marquage au deutérium, d'autres travaux ont permis de détecter les différentes phases lipidiques et d'étudier

⁴La surface d'un lipide DPPC(D62) est d'environ 60 \AA^2 [187]. Dans une surface de 1 \mu m^2 (CARS), le nombre de molécules lipidiques est d'environ 4×10^6 molécules. Une sensibilité de 20% au marquage au deutérium, correspond à environ 10^6 de molécules lipidiques deutérées, soit environ 10^{21} molécules lipidiques/litre (1 mM).

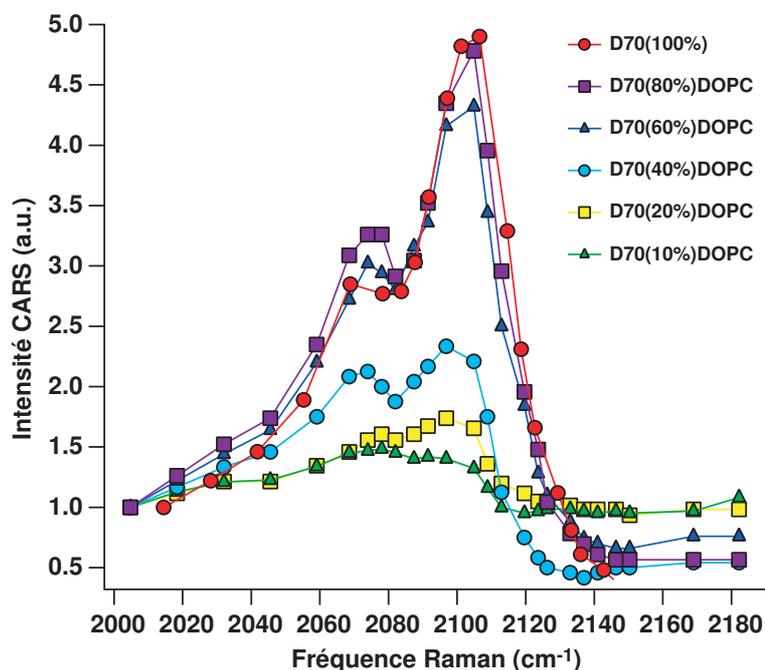


FIG. 5.6 – Intensité du signal F-CARS en fonction de la concentration du lipide deutéré (DSPC(D70)) dans une mixture lipidique (DSPC(D70)/DOPC) en poudre : Intensité du signal F-CARS obtenue utilisant différentes mixtures de lipides deutérés (DSPC(D70)) et non-deutérés (DOPC), enregistrés sur une plage de fréquence allant de 2000 à 2180 cm^{-1} . La concentration minimale de liaisons (DSPC(D70)) détectable par la microscopie CARS est de l'ordre de 20 %.

l'implication du cholestérol dans l'organisation des membranes en utilisant le marquage au deutérium en microscopie CARS [147].

Nous avons donc également étudié la sensibilité du signal CARS pour détecter des molécules de cholestérol, qui est un composant important dans la membrane cellulaire. Ces molécules deutérées sont synthétisées à l'Institut Européen de Chimie et Biologie (Bordeaux)⁵ par *E. Dufourc* suivant [188]. Chaque molécule de cholestérol deutéré ne contient que deux liaisons CD_2 . Comme pour le DSPC(D70), nous avons cherché à mesurer la concentration minimale de cholestérol(D5) détectable en CARS. Dans la FIG. 5.7, des spectres du cholestérol en poudre (même protocole qu'avec les lipides) à 100 % ainsi qu'un échantillon de mélange (cholestérol(D5)-

⁵Ecole Polytechnique, CNRS et Universités de Bordeaux I et II, Pessac, France

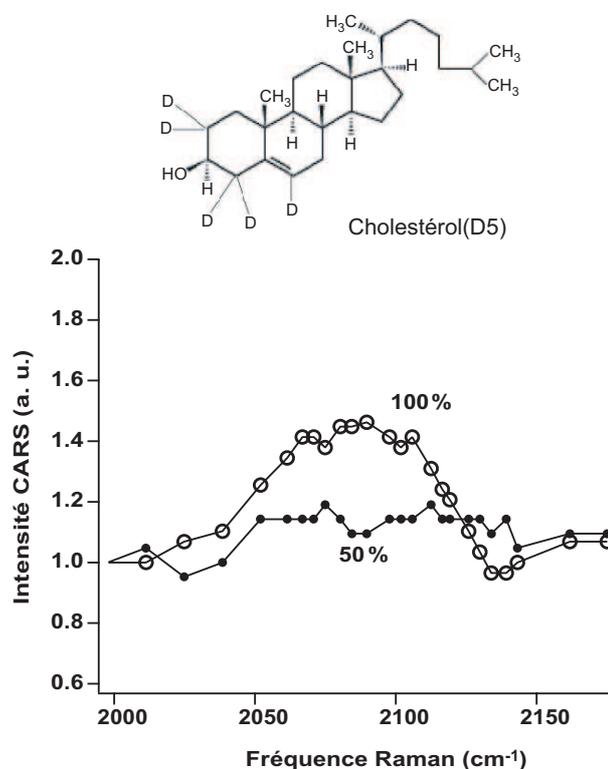


FIG. 5.7 – Modèle moléculaire (en haut) et spectre CARS (en bas) des molécules de Cholestérol(D5).

DOPC) à 50% sont représentés. La signature spectrale des liaisons CD_2 est observable uniquement pour la poudre de cholestérol pur (100 %). En faisant l'hypothèse que ce résultat reste valable pour une bicouche, une telle valeur est en accord avec celle trouvée dans le cas du lipide DSPC(D70). En effet nous avons détecté $5 \cdot 10^7$ liaisons de CD_2 (20% de DSPC(D70) dans DOPC). Dans le cas de la molécule de cholestérol(D5) qui ne contient que deux liaisons CD_2 , il faudrait introduire $2 \cdot 10^7$ molécules dans la membrane pour obtenir un signal détectable. Une telle concentration correspond à la totalité des molécules constituant la membrane⁶.

⁶Sachant que la surface de la molécule du cholestérol est d'environ 20 \AA^2 [187], une surface de $1 \mu\text{m}^2$ contient ($2 \cdot 10^7$) de molécules de cholestérol.

5.3 Imagerie des systèmes biologiques

5.3.1 Imagerie cellulaire

A ce jour, la microscopie CARS fait partie des outils permettant de détecter des molécules spécifiques (raisonnablement abondantes) dans un spécimen biologique. Pour tester la potentialité de cette technique pour l'imagerie cellulaire, nous avons mené une étude en collaboration avec le groupe de Didier Marguet (CIML-Luminy) sur l'imagerie cellulaire. Les cellules utilisées sont des cellules COS-7 (lignée cellulaire issue de fibroblaste de singe vert "*Cercopithecus aethiops*") (FIG. 5.8), qui sont faciles à cultiver et à manipuler. Dans ce cas, le contraste de l'image CARS se construit à partir de l'émission cohérente des liaisons moléculaires intrinsèques excitées. Ces émissions interfèrent de manière constructive vers l'avant pour donner des images F-CARS (FIG. 5.9).

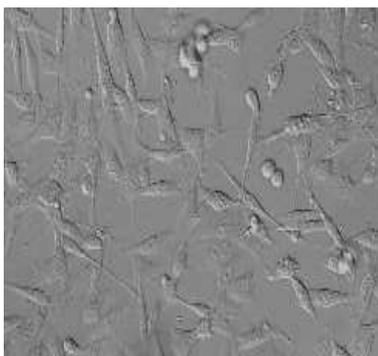


FIG. 5.8 – Cellules COS-7 par microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC)- Objectif ($\times 40$, $NA0.5$).

Culture cellulaire

Les cellules COS-7 sont cultivées dans des flasques stériles. Elles sont de nature adhérentes ce qui facilite leur observation (FIG. 5.8). Le milieu utilisé pour la culture est du DMEM auquel on ajoute des antibiotiques et de la glutamine (milieu nourrissant). Les cellules sont incubées à $37^{\circ}C$ dans une atmosphère de 95% d'air et 5% de CO_2 . Lorsque les cellules deviennent confluentes, elles sont décrochées à l'aide d'une enzyme, la trypsine, qui dégrade leurs protéines de surface, puis diluées etensemencées dans de nouvelles boîtes. 24 heures avant l'expérimentation, les cellules sont décrochées

des boîtes de culture et ensemencées sur des lamelles de verre circulaires de diamètre 120 mm. Une dilution d'environ 0.2 ml (fonction de la densité cellulaire avant passage) de cellules confluentes dans 5 ml de milieu mis en culture pendant 24 heures nous permet d'obtenir des lamelles sur lesquelles les cellules sont parfaitement isolées les unes des autres. Ceci nous permet donc d'effectuer des expériences sur cellules isolées.

Imagerie CARS des cellules (COS-7)

La FIG. 5.9 présente une comparaison d'images de cellules obtenues par microscopie DIC (à contraste interférentiel différentiel) (FIG. 5.9(a)) et par microscopie CARS (FIG. 5.9(b-f)). Le contraste CARS est obtenu dans ce cas par la liaison symétrique aliphatique CH_2 qui est présente surtout dans les membranes lipidiques plasmique et intracellulaires. Les organelles intracellulaires telles que l'appareil de Golgi (autour du noyau) et les petites vésicules sont bien claires en imagerie CARS alors qu'elles sont non visibles par microscopie DIC.

Les deux faisceaux laser pompe et Stokes de fréquence 13513 cm^{-1} (730 nm) et 10668 cm^{-1} (920 nm) respectivement, produisent une onde Anti-stokes à 16358 cm^{-1} (605 nm) correspondant à la fréquence de résonance de la liaison CH_2 (2845 cm^{-1}). Les images E-CARS sont similaires aux images obtenues en F-CARS avec moins de signal. Les puissances des lasers pompe et Stokes sont de l'ordre de $800\text{ }\mu\text{W}$ pour une fréquence de répétition de 2 MHz. Le temps d'acquisition est d'environ 10 ms/pixel [189].

Marquage cellulaire au Deutérium

Contrairement à la microscopie de fluorescence et à la microscopie par diffusion Raman spontanée, l'interprétation quantitative des images obtenues par la microscopie CARS est beaucoup plus complexe. Ceci est dû à la construction du signal cohérent induit par les différentes liaisons moléculaires présentes dans le volume focal d'excitation. Par conséquent, la suppression effective du bruit non-résonant provenant de l'échantillon et du solvant simplifie considérablement l'interprétation de l'image.

Une autre approche permettant d'améliorer le contraste de l'image CARS est basée sur le marquage peu invasif utilisant des molécules qui se rapprochent de la structure de l'échantillon lui-même.

Avec comme objectif l'étude de la dynamique de la membrane cellulaire, nous avons voulu, dans le cadre du projet *Mosaic*, intégrer l'outil CARS dans l'analyse de certains constituants membranaires tels les lipides ou le cholestérol. Le marquage au deutérium nous permet dans ce cas d'iso-

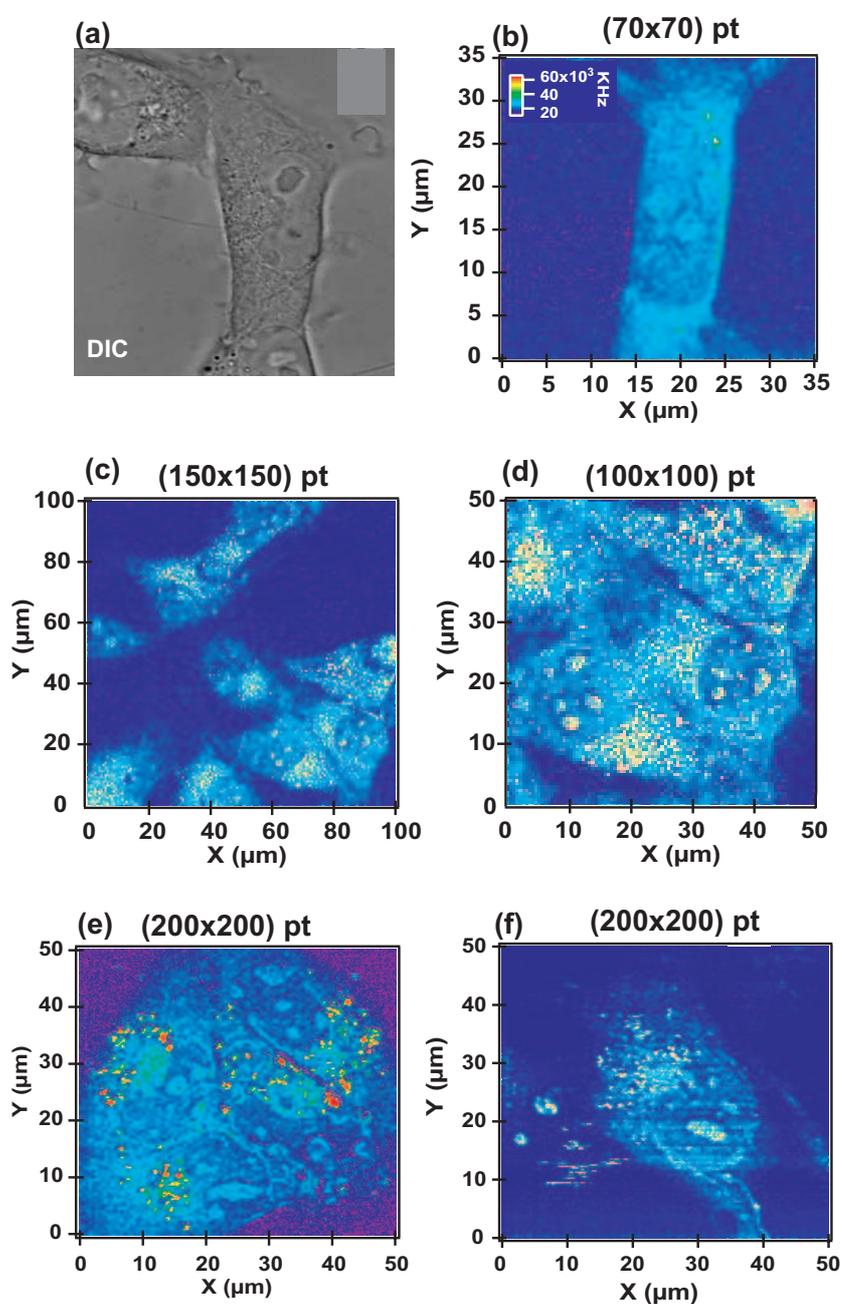


FIG. 5.9 – Images de cellules (*COS-7*) obtenues par microscopie DIC (a) et par microscopie CARS (b-f) (images F-CARS) : contraste correspondant à l'excitation de la liaison symétrique aliphatique CH_2 présente surtout dans les membranes lipidiques plasmique et intra-cellulaires (temps d'acquisition 1ms/pixel).

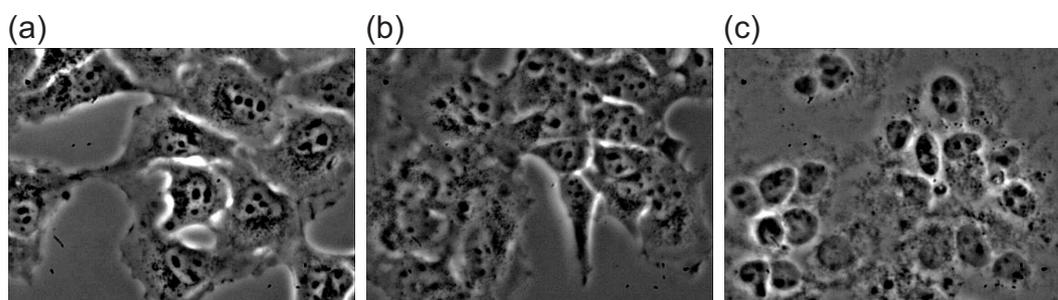


FIG. 5.10 – Images DIC de cellules *COS-7* marquées au DMPC-D54 : (a) $0 \mu M$ (cellules vivantes), (b) $5 \mu M$, (c) $20 \mu M$ (cellules mortes).

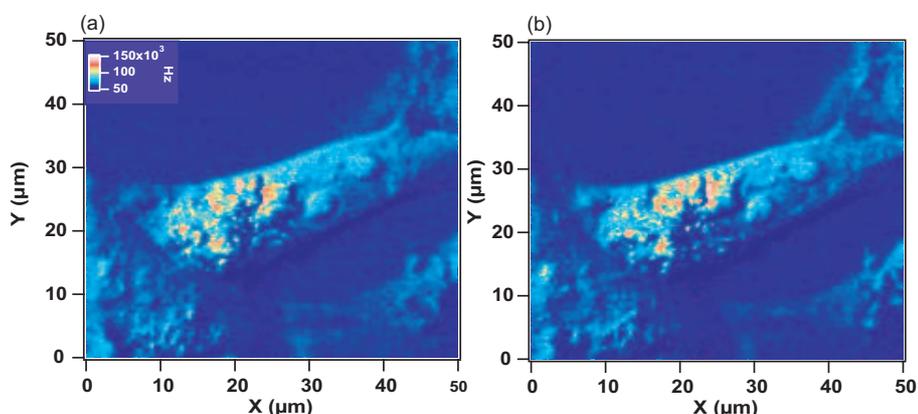


FIG. 5.11 – Images F-CARS de cellules *COS-7* marquées au DMPC(D54) à $5 \mu M$: (a) image à résonance (2105 cm^{-1}), (b) image à non-résonance (2140 cm^{-1}). Le contraste est identique, indiquant que le signal a essentiellement une origine non-résonante (200×200 pixels, 1 ms/pixel).

ler le complexe moléculaire à étudier par rapport aux autres composantes de la cellule. Dans un premier temps, nous avons marqué les cellules *COS-7* avec une solution de lipides deutérés DMPC(D54). Nous avons constaté lors du marquage que la concentration maximale tolérée par les cellules était de l'ordre de $5 \mu M$ (voir FIG. 5.10), ce qui est beaucoup moins létal que le marquage avec des analogues lipidiques fluorescents où les concentrations maximales tolérées ne sont que de quelques centièmes de μM ⁷.

⁷Néanmoins, la grande sensibilité de la microscopie de fluorescence permet de travailler à des concentrations très faibles, tolérables par les objets biologiques.

Les images F-CARS de cellules *COS-7* marquées à $5 \mu M$ avec le DMPC(D54) ont été réalisées (voir FIG. 5.11). Nous remarquons que pour les deux cas de cellules marquées et non marquées, le résultat est identique car le nombre de liaisons CD_2 dans la membrane cellulaire est en dessous de la limite de sensibilité de notre outil CARS. En deuxième étape, nous avons essayé de marquer la membrane cellulaire avec le cholestérol deutéré. Dans ce cas, le marquage cellulaire peut atteindre une concentration maximale d'environ 40 %. Ici encore les marquages effectués avec le cholestérol(D5) ont été insuffisants pour obtenir un contraste CARS spécifique de la liaison CD_2 . Il faut donc retenir que pour avoir un contraste CARS notable, il faut environ 10^6 à 10^7 liaisons chimiques d'intérêt dans le volume CARS. Ce chiffre peut être cependant revu à la baisse, si les liaisons chimiques étudiées présentent une non-linéarité du troisième ordre plus forte.

5.3.2 Imagerie des tissus

Dans le domaine de l'exploration des tissus biologiques, la microscopie optique est l'unique technique d'imagerie en profondeur ayant une résolution subcellulaire. Elle permet la visualisation des détails de la structure morphologique des tissus qui ne peuvent pas être résolus par imagerie par ultrasons (échographie) ou par résonance magnétique (IRM).

Pour les différents types de microscopie optique utilisés, le contraste de l'image dépend du processus physique utilisé. Le contraste dans le cas de la microscopie confocale par réflexion [190] et de la tomographie optique cohérente (OCT) [191], par exemple, est basé sur les différences de l'indice de réfraction dans l'échantillon. Ces techniques ne permettent pas d'analyser la composition chimique des structures tissulaires. La microscopie de fluorescence est limitée par la sélectivité chimique, car le nombre de fluorophores intrinsèques, tels que le NAD(P)H, la riboflavine, et l'élastine [192, 193] reste très faible. L'introduction de fluorophores extrinsèques pour des études spécifiques ciblées, est souvent responsable d'effets toxiques non désirables.

Les techniques basées sur l'optique non-linéaire sont aussi utilisées dans ce domaine. La microscopie par génération de second harmonique (SHG) est utile pour visualiser les ensembles de protéines bien arrangées, tels les fibres de collagène, mais n'a pas assez de sensibilité et de spécificité chimique pour les autres composantes du tissu biologique [16, 193].

Les spectres vibrationnels des tissus contiennent une multitude de signatures moléculaires qui peuvent être utilisées pour identifier les différentes composantes biochimiques les constituant. Les méthodes de microscopie vibrationnelle conventionnelles cependant, manquent de sensibilité exigée pour

l'examen rapide des tissus. A titre d'exemple, la microscopie infrarouge est limitée par la faible résolution spatiale à cause de l'utilisation des grandes longueurs d'onde (infrarouge) [194], mais aussi par la forte absorption de l'eau qui est fortement présente dans les spécimens biologiques. La microspectroscopie Raman est capable de discriminer *in vivo* les tissus sains des tissus malades dans le domaine de la cancérologie [20], mais elle est limitée par les longs temps d'intégration et/ou les fortes puissances laser utilisées qui sont généralement déconseillées dans le domaine biomédical.

Récemment, des travaux expérimentaux menés sur des coupes de tissu biologique ont montré la capacité de l'outil de microscopie CARS dans l'imagerie tissulaire [29], et ceci sans marquage chimique, et en utilisant des puissances laser modérées. Nous avons vu que les signaux CARS les plus forts sont obtenus habituellement en mode de transmission (F-CARS). Ce mode semble incompatible avec l'étude des tissus vivants épais nécessitant la détection dans la direction arrière (E-CARS). Par ailleurs, il a été montré que la méthode E-CARS est sensible aux structures sub-longueur d'onde, alors que les structures de grande taille sont invisibles dans ce mode de détection [130]. On pourrait penser que cette propriété de dépendance de la génération du signal CARS avec la taille de l'échantillon empêche son utilisation pour l'imagerie des tissus épais qui contiennent beaucoup de structures avec des dimensions plus grandes que la longueur d'onde. Néanmoins, il a été montré [30], que le fort signal émis par le tissu dans la direction avant (F-CARS) est pour partie réfléchi en arrière (détection E-CARS) à cause des effets diffusifs présents dans les tissus. Ceci rend la détection E-CARS tout à fait utilisable dans le cas de l'étude de tissus épais.

5.3.2.1 Imagerie de la peau et du cheveu

Dans le cadre d'une collaboration avec le CIML⁸ (Marseille) et le groupe L'Oréal-Recherche (Paris), nous nous sommes intéressés à l'imagerie de la peau. Pour le CIML, il s'agissait de tester les potentialités de CARS en imagerie tissulaire, alors que pour l'Oréal, le but final est de tester les produits cosmétiques, et d'étudier leur impact sur la composition moléculaire de la peau et du cheveu. Dans ce cadre, l'outil Raman (spectroscopie) est très utilisé par cet industriel [195, 196]. Cependant, la microscopie CARS offre non seulement un outil de spectroscopie Raman avec une plus grande sensibilité (processus cohérent), mais combine aussi cette spectroscopie à l'imagerie (avec une résolution sub-micronique).

⁸Centre d'Immunologie Marseille-Luminy (France).

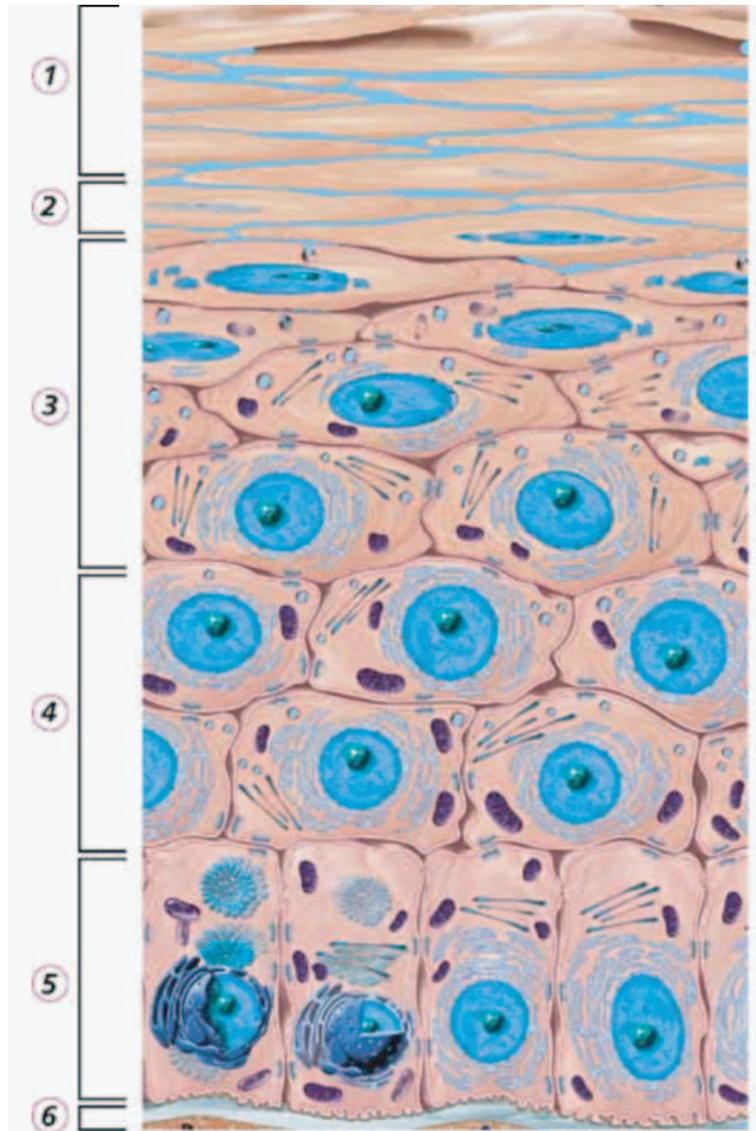


FIG. 5.12 – Coupe transversale de la peau : (1) stratum corneum, (2) stratum lucidum, (3) stratum granulosum, (4) stratum spinosum, (5) stratum basale, (6) membrane basale [197].

Imagerie de la peau

La peau est un organe complexe couvrant toute la surface du corps en continuité avec les muqueuses. La peau a pour fonction principale la protection de l'organisme contre des agressions externes physiques, chimiques ou biologiques, grâce à sa structure élaborée associant des tissus de diverses origines (épithélial, conjonctif, vasculaire, musculaire) [198]. La peau est constituée de trois couches, de l'extérieur vers l'intérieur (de haut en bas sur le schéma) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est constitué de plusieurs types cellulaires : 90 à 95% de kératinocytes et 5 à 10% de mélanocytes (ces cellules assurent la protection naturelle contre les rayons solaires et sont responsables de la pigmentation de la peau), de cellules de Langerhans (cellules présentatrices d'antigène), et de cellules de Merkel.

L'épiderme est organisé en quatre couches de cellules, de la plus superficielle à la plus profonde (FIG. 5.12) : la couche cornée (stratum corneum), la couche granuleuse, la couche muqueuse et la couche basale. Le derme est un tissu conjonctif de soutien, d'épaisseur variable, lâche en périphérie et plus dense (fibreux) en profondeur. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et des terminaisons nerveuses. L'hypoderme, situé sous le derme, est un tissu conjonctif lâche contenant en fonction de sa localisation plus ou moins de tissu adipeux (cellules adipocytes). Il constitue un important réservoir énergétique pour l'organisme.

Dans cette partie des travaux de thèse, nous avons voulu utiliser le microscope CARS pour l'imagerie des tissus biologiques. Des échantillons de tissus de peau d'oreille de "souris" ont été fournis par D.Marguet (CIML). Ces échantillons sont rasés puis fixés à l'aide d'une solution de Formaldéhyde (8%) dans un tampon salin (PBS). L'épaisseur de la section de peau est de l'ordre de 3 mm. Les images CARS sont obtenues à différentes profondeurs (FIG. 5.13), en excitant les liaisons CH_2 présentes dans les structures cellulaires (lipides) dont est riche la peau (la fréquence Raman est à 2845 cm^{-1}).

La FIG. 5.13(a) est une image E-CARS de la couche superficielle de la peau "stratum corneum" (SC). La forme polygonale brillante représente les cellules appelées "Cornéocytes" qui forment le SC. La FIG. 5.13(b) est enregistrée à $15\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur dans la peau. Elle représente les cellules appelées "Adypocytes". Un fort signal CARS est généré lorsque les fréquences d'excitation correspondent à la fréquence de résonance de liaison CH_2 , dans le cas contraire, le signal devient très faible (FIG. 5.13(c)). On peut encore apprécier ici l'avantage de la sélectivité chimique de la technique CARS. Dans ces images, le contraste est probablement obtenu par le signal F-CARS généré

en avant qui est réfléchi et détecté dans la direction arrière (E-CARS). Cet exemple illustre la possibilité d'utiliser un simple microscope inversé CARS pour l'imagerie des tissus épais (non transparents). La résolution optique le long de l'axe z est de $3 \mu\text{m}$.

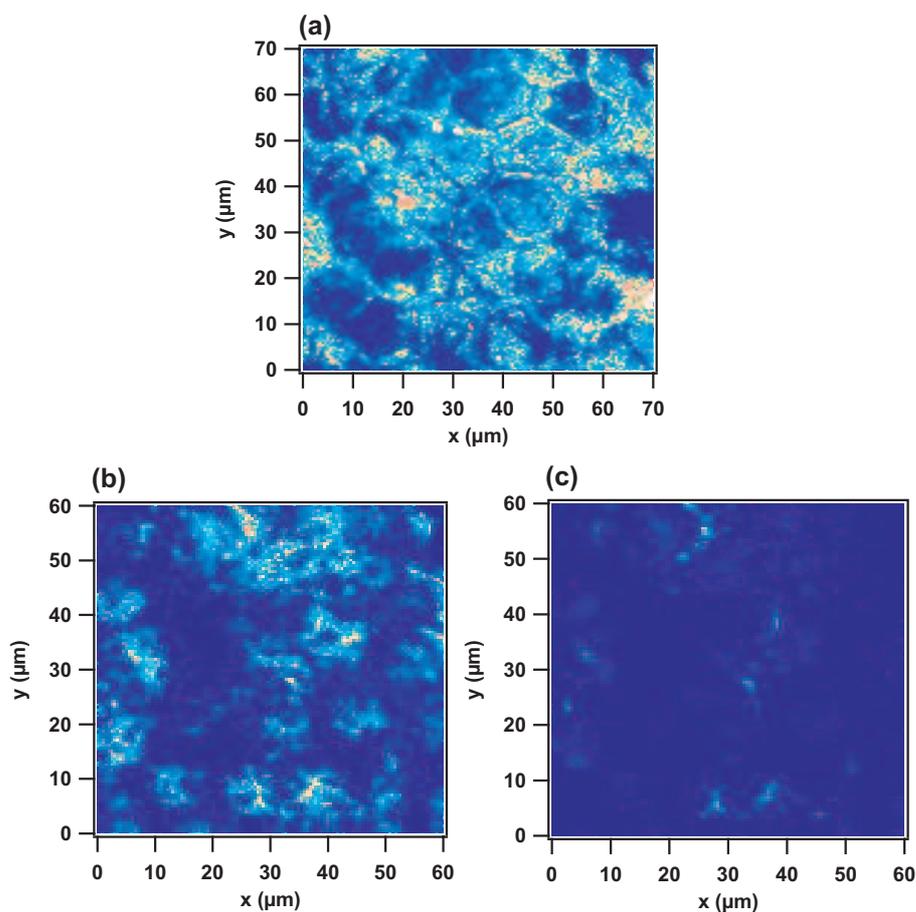


FIG. 5.13 – Images E-CARS de la peau d'oreille (souris) à différentes profondeurs : (a) image E-CARS du stratum cornéum, (b) image E-CARS à $15 \mu\text{m}$ de profondeur dans l'hypoderme à résonance de la liaison CH_2 (2845 cm^{-1}), (c) même image E-CARS à non-résonance (2500 cm^{-1}). Les puissances laser pompe et Stokes sont 3 mW et 1.5 mW , respectivement, (200×200 pixels, $1 \text{ ms}/\text{pixel}$).

Poursuivant le même objectif, nous avons mené une étude d'imagerie en profondeur avec le groupe de recherche de L'Oréal-Paris. Dans ce cadre, nous avons réalisé des images CARS sur des échantillons de couches de stratum cornéum (SC) de peau humaine assemblées par compression pour former une pastille de quelques millimètres d'épaisseur (peau artificielle). Des images E-CARS (FIG. 5.15) ont été obtenues à différentes profondeurs de la pastille, sachant que la compression des couches de SC la rend très opaque.

Comme dans le cas de la peau animale (souris), la couche de stratum cornéum humain est formé de cellules appelées "Cornéocytes" qui sont de forme *polygonale*. Dans la FIG. 5.15, ces cellules sont imagées à différentes profondeurs de la pastille. La limite de pénétration pour ce genre d'échantillon très opaque est de l'ordre de $80 \mu\text{m}$ (voir FIG. 5.14), et de quelques centaines de microns dans le cas d'un échantillon de peau animale [29,30], ce qui est largement suffisant pour les études en perspective. Ainsi, l'outil CARS permet d'aller à des profondeurs similaires à celles obtenues par la microscopie biphotonique (centaines de microns) avec un très bon rapport signal à bruit, ce qui le rend très intéressant pour l'étude de la diffusion d'agrégats moléculaires dans la peau.

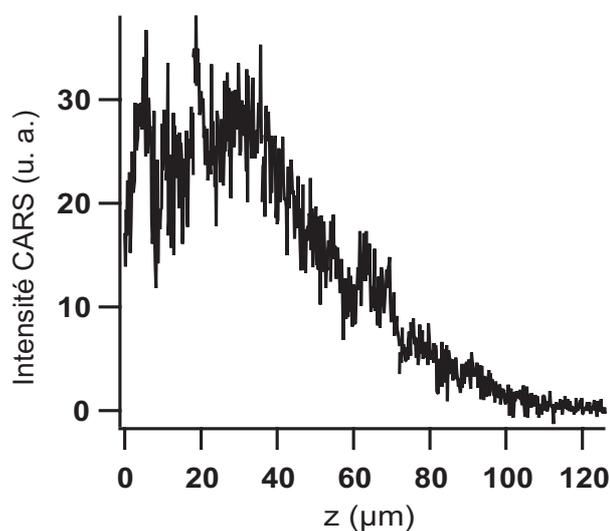


FIG. 5.14 – Signal E-CARS en fonction de la profondeur de pénétration dans une couche de stratum cornéum artificielle enregistré à résonance de la liaison CH_2 (2845 cm^{-1}).

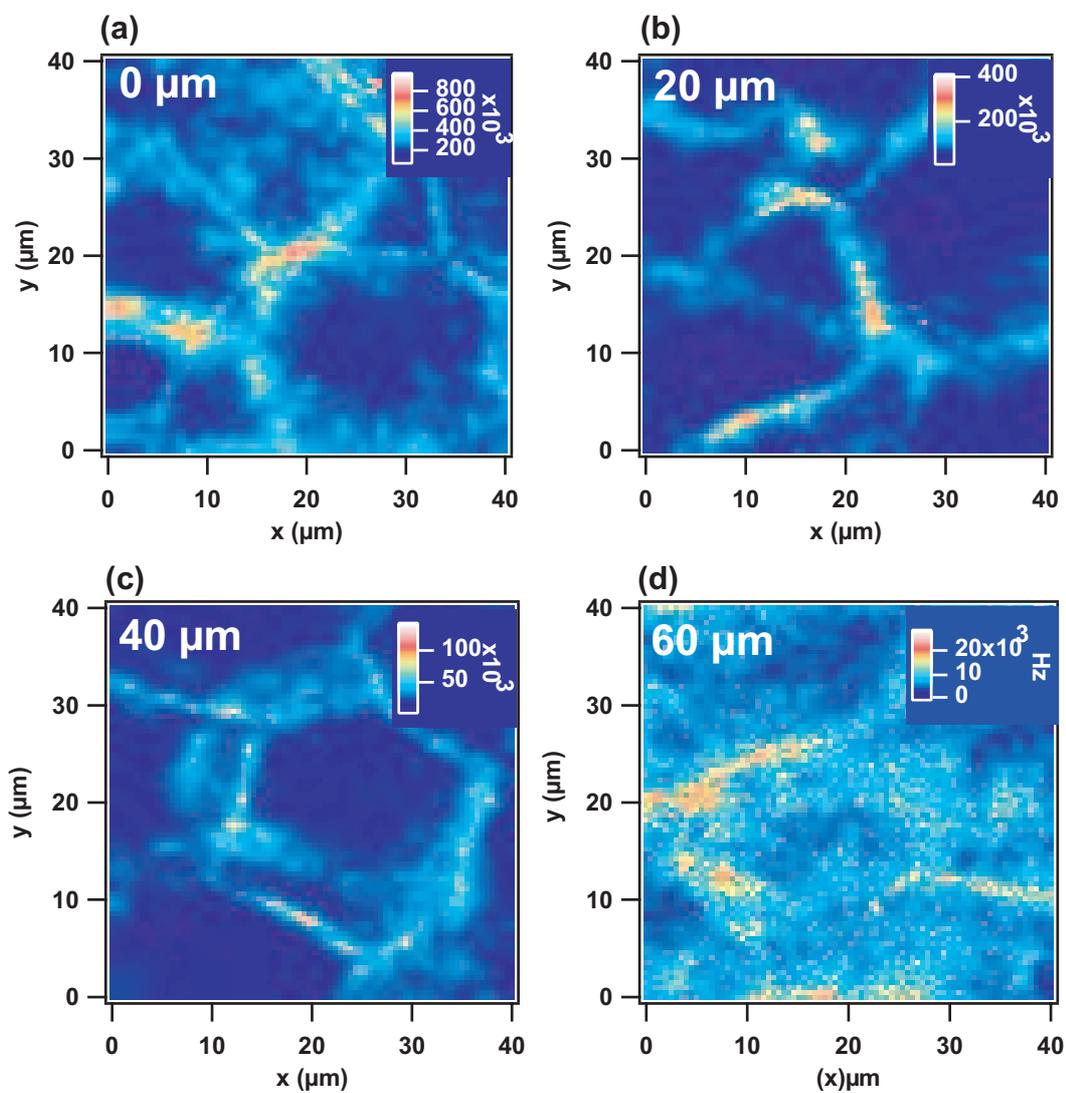


FIG. 5.15 – Images E-CARS d'une pastille de "stratum corneum" artificiel à différentes profondeurs. La fréquence Raman d'excitation est à 2845 cm^{-1} . (a) $0\ \mu\text{m}$, (b) $20\ \mu\text{m}$, (c) $40\ \mu\text{m}$, (d) $60\ \mu\text{m}$ (160×160 pixels, $1\ \text{ms}/\text{pixel}$).

Imagerie du cheveu

Le cheveu est composé essentiellement d'une protéine soufrée appelée "la kératine" (substance fondamentale du cheveu qui assure sa résistance et sa souplesse) et de pigments "la mélanine" qui déterminent sa couleur. La kératine est une protéine constituée essentiellement de glycine et de leucine ainsi que d'un acide aminé soufré : la cystéine. La chaîne polypeptidique forme une hélice droite dont la forme est maintenue par des ponts hydrogène (structure secondaire de la protéine). Plusieurs de ces hélices sont liées entre elles par d'autres ponts hydrogène et par des ponts disulfures (S-S), dont le nombre et l'emplacement donnent aux cheveux leur forme.

Prenons un exemple de traitement de cheveux le plus couramment utilisé, "la permanente". Cette opération consiste en deux réactions chimiques successives. La première est la *réduction* : elle rompt un certain nombre de ponts disulfures. La structure de la protéine est relâchée. On enroule alors

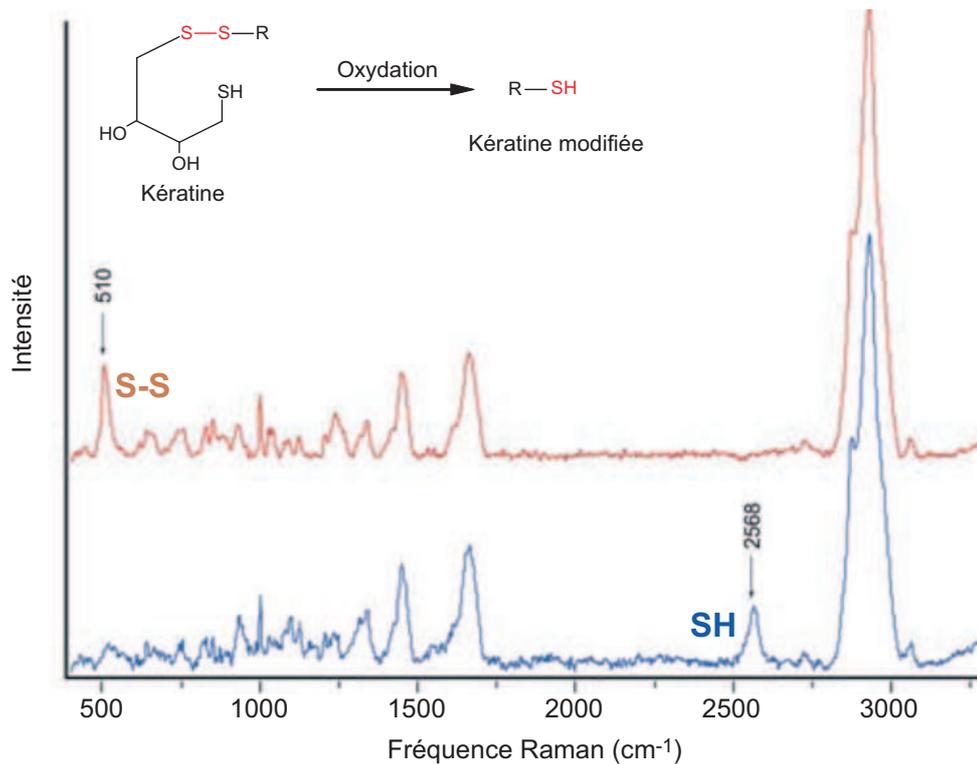


FIG. 5.16 – Spectre Raman du cheveu. (en rouge) cheveu naturel (non traité), (en bleu) cheveu traité. [199]

le cheveu selon la forme voulue. Cette opération amène en face les unes des autres des cystéines qui, à l'origine, étaient éloignées. La deuxième réaction est l'*oxydation* (voir 5.16) qui refait des ponts entre des cystéines qui ne se seraient jamais rencontrées naturellement. Le cheveu prend la forme ondulée imposée.

L'estimation des dégâts induits par les traitements chimiques sur les cheveux humains est très importante pour l'industrie cosmétique. Cette étape constitue le premier pas pour prévenir la détérioration des cheveux et développer de nouveaux produits. Nous avons utilisé l'outil de microscopie CARS pour l'imagerie des cheveux dans une première étape, avec comme perspective de tester différents produits cosmétiques et leur effet sur la structure de la Kératine. En microscopie CARS le cheveu utilisé n'est pas du tout traité, alors que dans le cas des autres techniques utilisées (micro-spectroscopie Raman), le cheveu est dépigmenté chimiquement avant l'analyse pour s'affranchir de la fluorescence parasite. La FIG. 5.17 représente l'image E-CARS d'un cheveu naturel déposé sur une lamelle de microscope. Le contraste est obtenu en excitant la liaison CH_2 à 2845 cm^{-1} . On peut apprécier le fort contraste CARS sur cette bande lipidique. Ces premiers résultats nous encouragent à poursuivre nos investigations pour l'étude plus en détail de la chimie du cheveu.

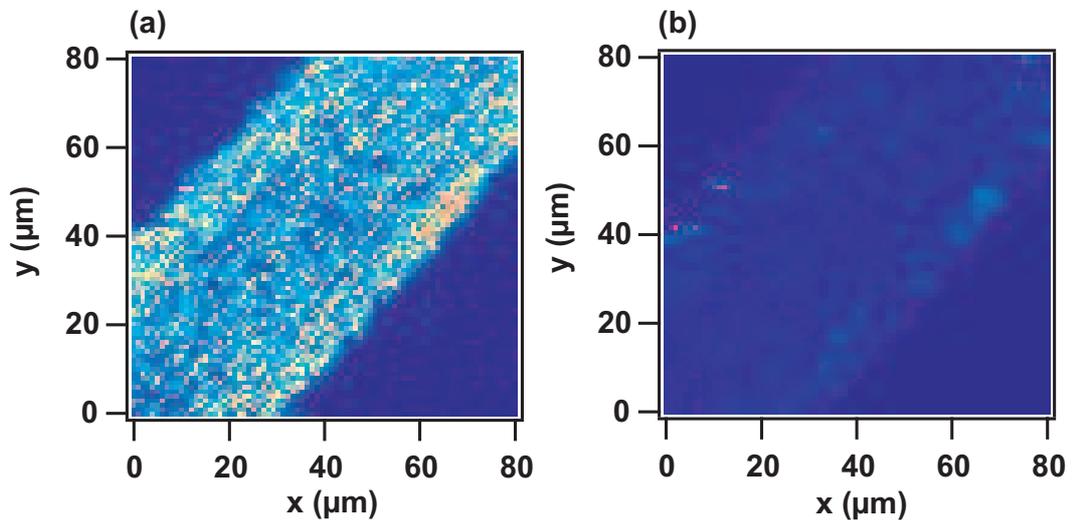


FIG. 5.17 – Images E-CARS du cheveu (Kératine) : (à gauche) à résonance (2845 cm^{-1}), (à droite) à non-résonance (2500 cm^{-1}).

5.3.2.2 Imagerie des tissus (placenta humain)

Dans cette dernière partie de nos travaux, nous avons testé l'outil de microscopie CARS pour l'imagerie de l'utérus, et ceci en collaboration avec l'institut Kolling de recherche médicale à l'université de Sydney (Australie). Des échantillons du lit placentaire humain ont été apportés par le professeur E.Gallery, et ceci dans l'objectif d'établir un diagnostic médical sans avoir recours à aucun marquage. Le Professeur E.Gallery étudie les maladies liées à la grossesse. Certaines de ces maladies notamment celle appelée "*la pré-eclampsie*", conduit à un avortement ou à la mort du fœtus. Dans le cadre de cette étude, des échantillons du lit placentaire humain post-accouchement sont prélevés et étudiés. Ces tissus sont fixés dans une solution de formaline, et certains d'entre eux sont marqués avec différents marqueurs (colorés) qui facilitent la reconnaissance des différentes composantes de ce tissu complexe. Une comparaison entre des images d'échantillons marqués et non marqués observées par la microscopie CARS est rapportée. Cette étude vise à évaluer le potentiel de cette technique comme outil de diagnostic médical.

Le placenta humain

Le placenta humain est un organe fascinant par la complexité de son développement et la diversité de ses fonctions, toutes indispensables au déroulement de la grossesse et à la croissance foetale. Cet organe forme l'interface entre les tissus maternels et le fœtus. Pour les physiologistes, il est à la fois poumon, rein, intestin et système endocrine complexe. Alors que pour les biologistes cellulaires, il réalise un modèle unique de fusion et d'invasion cellulaire limitée et dûment contrôlée. Il constitue à ce titre l'un des rares modèles en biologie humaine riche en terme de diversité de compositions et de fonctions.

Au tout début de la grossesse, il se crée une liaison entre la partie maternelle "*myométrium*", riche en fibres musculaires et vaisseaux sanguins, et la partie foetale "*déciduum*" formant une petite masse cellulaire constituée surtout de cellules trophoblastiques appelées "*cytotrophoblastes*", qui se transforment tout au début de la grossesse en cellules "*syncytiotrophoblastes*" (voir FIG. 5.18). Le syncytiotrophoblaste, très invasif, permet l'ancrage puis l'enfouissement complet du blastocyste (cellules foetales) dans la muqueuse utérine maternelle réalisant ainsi l'implantation [200, 201]. Vers la troisième semaine après la fécondation, la masse foetale est ancrée dans l'utérus maternel et flotte dans la chambre intervillieuse. Cette chambre intervillieuse est irriguée progressivement par le sang maternel.

La communication directe avec les artères spiralées maternelles n'est établie qu'à partir de la huitième semaine de grossesse. Le sujet de recherche du professeur E. Gallery concerne l'étude de la migration des cellules trophoblastiques à ce stade de la grossesse. Ces cellules apparaissent comme l'acteur essentiel du développement du placenta, et jouent un rôle primordial pour la croissance du fœtus car elles lui permettent de se nourrir et de respirer. Un dysfonctionnement de ces cellules conduit à une malformation du fœtus. C'est ce que nous appelons "la *prééclampsie*", qui est une maladie qui semble commencer par un défaut d'invasion des cellules trophoblastiques [203, 204]. Généralement, des parties de tissus du lit placentaire sont prélevées post-accouchement, et imagées pour établir un diagnostic lié à la présence ou non présence de ces cellules au niveau des vaisseaux sanguins.

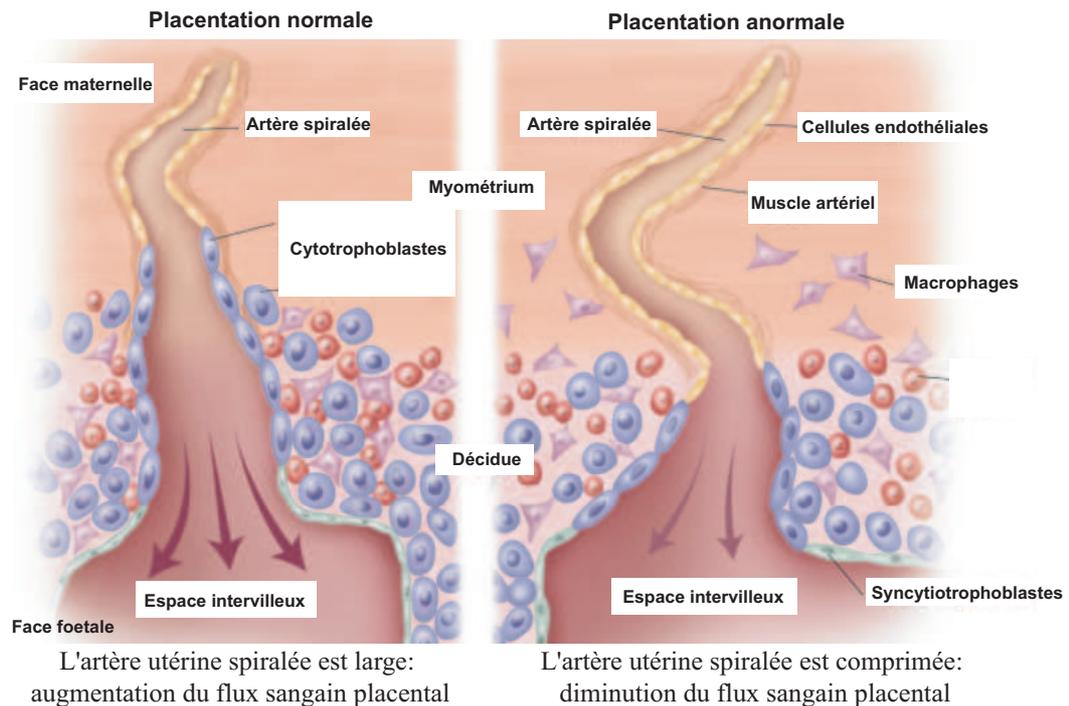


FIG. 5.18 – Schéma du lit placentaire dans le cas normal (à gauche) et anormal (à droite). Le dysfonctionnement des cellules trophoblastiques conduit à une mauvaise invasion du tissu maternel et ainsi à la diminution du flux sanguin nécessaire pour le développement du fœtus [202].

Imagerie du lit placentaire humain

Echantillons marqués :

Les échantillons du lit placentaire sont marqués de façon à différencier les composantes de ce tissu complexe (marqueurs immunologiques). Ces échantillons ont été fixés, découpés en tranche de 4 μm et marqués avec les marqueurs suivants :

- Le premier marqueur est l'*Hématoxyline et Eosine* (H&E), colorant biologique naturel utilisé en histologie pour marquer les différentes composantes cellulaires telles la myéline, les fibres en collagène, les fibres musculaires, et les mitochondries.
- Le deuxième marqueur utilisé est le *CD34*, protéine transmembranaire qui permet de reconnaître généralement les cellules endothéliales qui forment le contour des artères utérines spirélées.
- Le *VGEF* est un autre marqueur de la famille des glycoprotéines, et permet de différencier d'autres types de cellules endothéliales.
- Le dernier marqueur utilisé est le *CK7* qui est un anticorps utilisé pour la reconnaissance des cellules trophoblastiques.

Les différents échantillons ont été préparés à l'institut Kolling de recherche médicale à l'université de Sydney. Les expériences CARS ont été menées en présence de E.Gallery en séjour sabbatique dans notre laboratoire.

La FIG. 5.19 représente des images du tissu placentaire. L'observation par microscopie de transmission permet de distinguer pour chaque marqueur un élément du tissu complexe. Dans la FIG. 5.19(a), le marquage de l'échantillon de placenta de 4 μm d'épaisseur avec le H&E de couleur rose, permet de distinguer une coupe transversale du tissu musculaire constituant la paroi maternelle *myométrium*. La FIG. 5.19(c), permet de distinguer des cellules géantes multi-nucléiques appelées *trophoblastes* marquées avec le *CK7* (en marron). Dans la FIG. 5.19(f), les trophoblastes et les cellules NK lymphocytes (natural killer cells) apparaissent contrastées en raison de marquage avec le *VGEF* (en marron), alors que dans la FIG. 5.19(h) des cellules endothéliales maternelles sont observées autour d'un vaisseau sanguin, marquées avec le *CD34* (en marron).

Les images obtenues par microscopie CARS (FIG. 5.19 b, d, e, g, i), permettent d'observer ces structures, en s'appuyant sur le marquage biologique (marqueurs peu fluorescents comme l'*Haematoxyline*, et contenant des

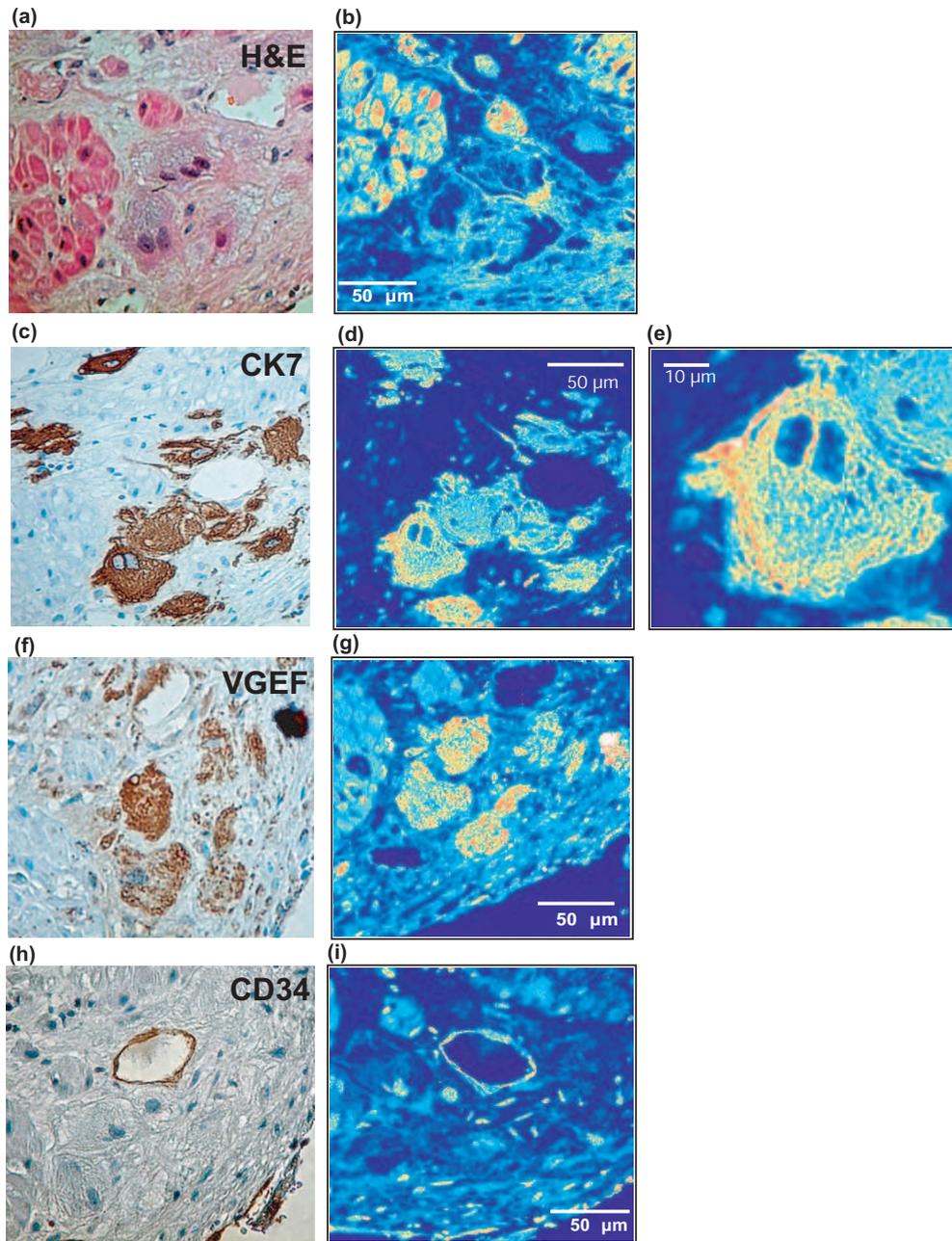


FIG. 5.19 – Images du tissu placentaire marqué d'un sujet "sein". (a, c, f, h) par microscopie de transmission (lampe blanche), (b, d, e, g, i) par microscopie CARS (200 \times 200 pixels, 1 ms/pixel).

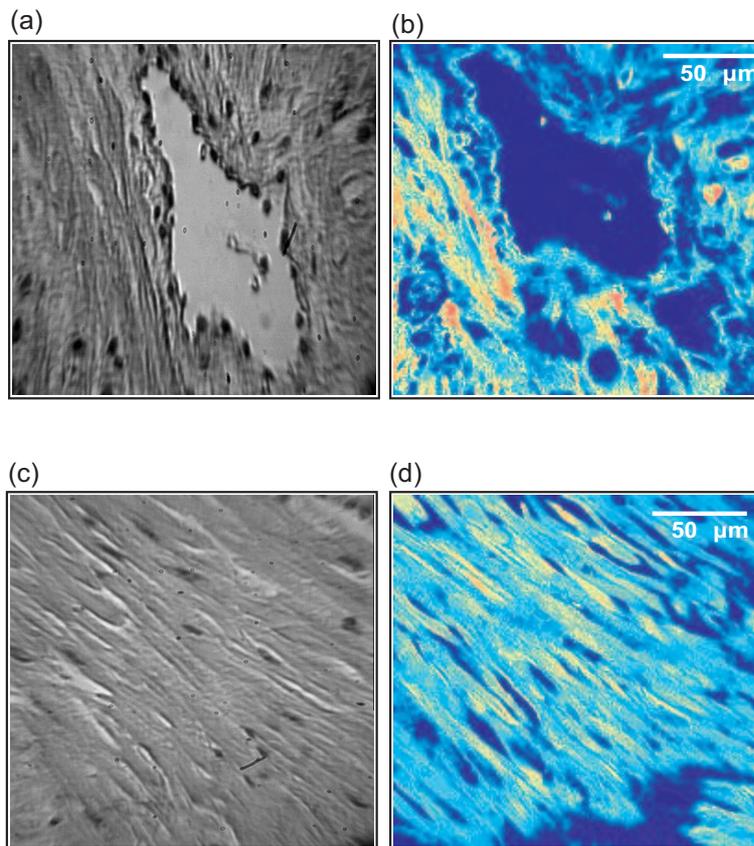


FIG. 5.20 – Images du tissu placentaire marqué d'un sujet "malade". (a, c) par microscopie de transmission (lampe blanche), (b, d) par microscopie CARS (200×200 pixels, 1 ms/pixel).

liaisons CH_2). Le contraste entre les deux techniques est globalement le même et permet d'observer différentes parties et couches du lit placentaire. Selon le diagnostic du professeur E. Gallery, le sujet auquel appartient ce tissu est un sujet "sain". Ce diagnostic s'appuie sur l'observation des images obtenues par les deux techniques. Dans un sujet "sain", les cellules trophoblastiques (FIG. 5.19 e) envahissent les vaisseaux sanguins (FIG. 5.19 h, i), et se mettent tout autour du vaisseau (FIG. 5.19 c, d), en détruisant le tissu musculaire maternel (FIG. 5.19 a, b). Cette propriété permet au fœtus de se nourrir à partir des vaisseaux maternels.

Le deuxième sujet observé est un sujet "malade", le tissu musculaire est assez dense dans les échantillons (voir FIG. 5.20 c, d). Les vaisseaux sanguins

observés dans les FIG. 5.20 (a, b) démontrent que les vaisseaux sont entourés de tissu musculaire. Chez ce sujet, les cellules trophoblastiques n'arrivent pas à pénétrer le tissu musculaire. Différentes raisons sont proposées par la communauté médicale, d'ordres génétiques ou bien physiologiques dépendant des antécédents du sujet lui-même. Néanmoins, pour l'objectif de cette étude, qui est d'utiliser la technique de microscopie CARS pour le diagnostic médical, ces observations permettent de confirmer la propriété de cette technique à imager les liaisons chimiques abondantes dans le tissu ainsi que les marqueurs (on observe, en effet, très bien les zones marquées en CARS, ceci peut venir d'une fluorescence résiduelle des marqueurs en plus du signal CARS). La liaison excitée lors des observations par microscopie CARS, est la liaison CH_2 qui a une fréquence de résonance Raman à 2845 cm^{-1} . Les puissances lasers utilisées sont de l'ordre de 1 mW pour le laser Stokes et 2 mW pour le laser Pompe avec une fréquence de 4 MHz.

Echantillons non-marqués :

Un des avantages de la technique de microscopie CARS est l'imagerie sans marquage. Dans le cas des tissus complexes tels que le lit placentaire, toute les composantes cellulaires et musculaires contiennent des liaisons CH_2 , ce qui rend l'observation un peu plus difficile en l'absence du marquage. Nous n'avons pas eu le temps de faire une étude des spectres Raman de ces tissus, aussi nous nous contenterons ici de garder le contraste CARS sur CH_2 et de

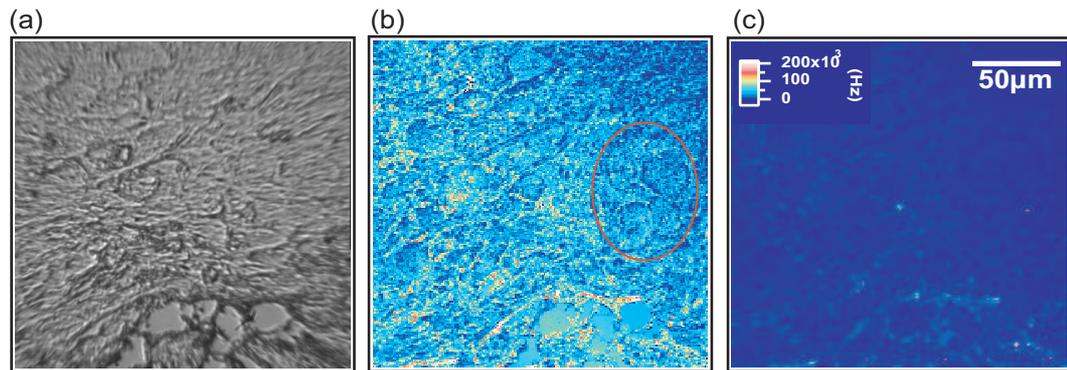


FIG. 5.21 – Images du tissu placentaire non marqué. (a) par microscopie de transmission. (b) par microscopie CARS à résonance de la liaison CH_2 (2845 cm^{-1}). (c) par microscopie CARS à non-résonance de la liaison CH_2 (2600 cm^{-1}). Images CARS (200×200 pixels, 1 ms/pixel)).

distinguer morphologiquement les différentes composantes des échantillons observés.

Le contraste obtenu par la technique de microscopie CARS dans ce cas, est lié à l'excitation des liaisons CH_2 . Ces liaisons ont une fréquence de résonance à 2845 cm^{-1} , ce qui correspond à un laser pompe à 730 nm (13699 cm^{-1}) et un laser Stokes à 922 nm (10854 cm^{-1}). La FIG. 5.21, permet de constater la différence de contraste obtenue entre l'image CARS à résonance (figure 5b) et celle à non-résonance à 2600 cm^{-1} (FIG. 5.21 c) de la liaison CH_2 (laser Stokes à 900 nm). Cette spécificité spectrale unique dans la microscopie CARS permet de distinguer un contraste dans les membranes cellulaires (trophoblastes dans la zone entourée).

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons eu l'occasion de montrer toute la puissance de la microscopie non-linéaire CARS dans le cadre de l'imagerie d'échantillons non-marqués (ou peu), modèles et réels. L'étude préliminaire réalisée sur les systèmes modèles (GUV), a démontré les possibilités de notre technique non seulement en terme d'imagerie, mais également en terme de spécificité et de sensibilité chimique.

Dans le cadre de l'imagerie de la peau et du cheveu, nous avons réalisé un outil de microscopie/spectroscopie pour l'imagerie en profondeur associant résolution optique et sensibilité de détection. Pour l'instant les lipides ont été très largement imagés et même si les résultats sont encourageants, il faudra encore faire la preuve de la fiabilité de la technique pour son utilisation sur des liaisons moins représentées dans les cellules et tissus. Si l'imagerie en l'absence de marquage reste une caractéristique unique de CARS, il se peut que le recours à des marquages peu invasifs (du type deutérium) soit nécessaire pour retrouver une spécificité dans un univers spectral vibrationnel très encombré.

Pour l'imagerie des tissus complexes, la microscopie CARS nous permet de faire des images exploitables et caractéristiques des liaisons chimiques présentes dans l'échantillon. Pour la suite de l'étude, nous proposons de faire des spectres Raman propres à chaque composante cellulaire du lit placentaire. Il sera ainsi possible d'identifier les fréquences vibrationnelles les plus pertinentes. Une piste possible concerne les liaisons $S - S$ (508 cm^{-1}) et $S - H$ (2500 cm^{-1}) dont sont riches les complexes moléculaires ($HLA-G$) contenus dans les cellules trophoblastiques (foetales) [205] et dont la concentration va-

rie lors du développement foetal.

La technique de microscopie CARS a prouvé son efficacité dans l'imagerie des tissu épais [206], avec une profondeur de pénétration allant jusqu'à $100 \mu m$ dans les conditions expérimentales du microscope CARS utilisé à l'Institut Fresnel. Des études sont à prévoir dans des tissus du lit placentaire épais (quelques millimètres). Afin de réduire le temps des diagnostics, sans avoir à marquer les échantillons, ni à les découper en fines tranches.

Conclusion

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont consisté à la mise en place d'un système de microscopie par diffusion Raman cohérente anti-Stokes (CARS). La microscopie CARS est une des techniques les plus récentes de la microscopie. Cette technique, basée sur un effet physique non-linéaire, permet de faire une imagerie spécifique par rapport aux techniques de microscopie optique. Cette technique présente l'avantage d'obtenir un contraste dans l'imagerie relié à la présence des liaisons chimiques. L'excitation de ces liaisons permet de générer un signal cohérent et spécifique à chaque liaison moléculaire.

La majeure partie de notre travail a consisté à mettre en place le microscope CARS, qui est un système assez complexe, contenant différentes parties optiques et électroniques. Des méthodes de synchronisation des impulsions ont été exploitées, ainsi que des mesures d'autocorrélation sur les impulsions laser. Comme dans toute réalisation d'un nouveau prototype, la majeure partie de notre travail a consisté à caractériser spatialement et spectralement le microscope CARS. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé des objets modèles comme des billes de polystyrène placées dans différents milieux d'indices. Des simulations numériques nous ont permis de comprendre comment l'émission CARS se répartissait dans les directions avant (F-CARS) et arrière (E-CARS).

Des expériences de microscopie CARS ont été réalisées dans les domaines biologique et médical. Nous avons présenté un outil d'imagerie capable de faire des images de la peau et du cheveu, avec une bonne résolution spatiale, allant jusqu'à une profondeur de pénétration de l'ordre de cent microns. Un autre atout de la technique CARS est la possibilité de combiner la spectroscopie à l'imagerie. Des perspectives concernant l'étude des effets des produits cosmétiques sur la peau et le cheveu devraient tirer partie de cette propriété.

Dans le domaine de la biologie cellulaire, l'outil de microscopie CARS apporte les mêmes avantages d'imagerie en terme de résolution optique que la microscopie de fluorescence. Ceci dit, la faible efficacité de la diffusion Raman par rapport à la fluorescence reste une limite à dépasser. Plusieurs possibilités sont envisageables. Parmi elles, l'utilisation de molécules ayant une forte signature Raman. Ces molécules sont en cours de développement par nos collaborateurs chimistes⁹. Une autre alternative serait d'augmenter la sensibilité de détection CARS en utilisant des marqueurs peu invasifs comme le deutérium dans le marquage lipidique. Nos expériences ont démontré, que des liaisons CH_2 peuvent être remplacées par des liaisons CD_2 dont la fréquence de résonance Raman se trouve dans une région propre spectralement.

Enfin, la dernière partie de nos travaux reposait sur l'imagerie de tissus humains complexes, comme le lit placentaire. Il est vrai que dans ce cadre, la technique CARS a peu de recul par rapport à l'imagerie de fluorescence. Néanmoins, elle présente de réelles possibilités dans le cadre d'imagerie ciblée de molécules endogènes ayant une signature Raman bien spécifique par rapport aux autres composantes du tissu. Des études sont en cours pour étudier le tissu placentaire par spectroscopie Raman, afin de faciliter l'acquisition d'images CARS spécifiques, et ainsi le diagnostic médical. D'une façon plus générale, ce travail de thèse a démontré l'intérêt de la microscopie CARS en tant que technique émergente présentant des atouts certains par rapport aux autres approches existantes.

⁹O.Maurry, Laboratoire de chimie, ENS-Lyon

Bibliographie

- [1] M. Göppert Mayer, "Über elementarakte mit zwei quantensprüngen," *Annals of Physics*, vol. 9, pp. 273–294, 1931.
- [2] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich, "Generation of optical harmonics," *Physical Review Letters*, vol. 7, pp. 118–119, 1961.
- [3] Y. R. Shen, "Surface-properties probed by 2nd-harmonic and sum-frequency generation," *Nature*, vol. 337, no. 6207, pp. 519–525, 1989.
- [4] A. Tadjeddine, O. Pluchery, A. Le Rille, C. Humbert, M. Buck, A. Peremans, and W. Q. Zheng, "What can we learn from the non-linear optical investigation of the liquid vertical bar solid interface?," *Journal Of Electroanalytical Chemistry*, vol. 473, no. 1-2, pp. 25–33, 1999.
- [5] A. Peremans, Y. Caudano, P. A. Thiry, P. Dumas, W. Q. Zhang, A. Le-Rille, and A. Tadjeddine, "Electronic tuning of dynamical charge transfer at an interface : K doping of c-60/ag(111)," *Physical Review Letters*, vol. 78, no. 15, pp. 2999–3002, 1997.
- [6] K. B. Eisenthal, "Liquid interfaces probed by second-harmonic and sum-frequency spectroscopy," *Chemical Reviews*, vol. 96, no. 4, pp. 1343–1360, 1996.
- [7] W. Denk and D. Piston, "Two-photon molecular excitation in laser scanning microscopy", *Handbook of biological confocal microscopy*. New York : Plenum Press, 2 ed., 1995.
- [8] T. Wilson and C. Sheppard, *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*. Orlando, FL : Academic, 1984.
- [9] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "2-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science*, vol. 248, no. 4951, pp. 73–76, 1990.
- [10] C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Multiphoton fluorescence excitation : New spectral windows for biological nonlinear microscopy," *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 93, no. 20, pp. 10763–10768, 1996.

- [11] E. Kohen and J. G. Hirschberg, *Cell Structure and Function by Microspectrofluoremetry*. San Diego, CA : Academic, 1989.
- [12] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York, Plenum, 1995.
- [13] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Eugene, OR : Molecular Probes, 1996.
- [14] R. Y. Tsien and A. Miyawaki, "Seeing the machinery of live cells," *Science*, vol. 280, no. 5371, pp. 1954–1955, 1998.
- [15] J. Hoyland, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. San Diego, CA : Academic, 1999. p 108.
- [16] P. J. Campagnola and L. M. Loew, "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms," *Nature Biotechnology*, vol. 21, no. 11, pp. 1356–1360, 2003.
- [17] A. M. Pena, T. Boulesteix, T. Dartigalongue, and M. C. Schanne-Klein, "Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens i and iv," *Journal Of The American Chemical Society*, vol. 127, no. 29, pp. 10314–10322, 2005.
- [18] H. J. Humecki, *Practical Guide to Infrared and Microspectroscopy*. New York : Marcel Dekker, 1995.
- [19] G. Turrell and J. Corset, *Raman Microscopy Development and Applications*. San Diego : Academic Press, 1996.
- [20] L. P. Choo-Smith, H. G. M. Edwards, H. P. Endtz, J. M. Kros, F. Heule, H. Barr, J. S. Robinson, H. A. Bruining, and G. J. Puppels, "Medical applications of raman spectroscopy : From proof of principle to clinical implementation," *Biopolymers*, vol. 67, no. 1, pp. 1–9, 2002.
- [21] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, "Scanning coherent anti-stokes raman microscope," *Optics Letters*, vol. 7, no. 8, pp. 350–352, 1982.
- [22] M. D. Duncan, "Molecular discrimination and contrast enhancement using a scanning coherent anti-stokes raman microscope," *Optics Communications*, vol. 50, no. 5, pp. 307–312, 1984.
- [23] A. Zumbusch, G. Holtom, and X. Xie, "Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering," *Physical Review Letters*, vol. 82, pp. 4142–4145, 1999.
- [24] J. X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie, "An epi-detected coherent anti-stokes raman scattering (e-cars) microscope with high spectral resolution and high sensitivity," *Journal Of Physical Chemistry B*, vol. 105, no. 7, pp. 1277–1280, 2001.

- [25] J. X. Cheng, Y. K. Jia, G. F. Zheng, and X. S. Xie, "Laser-scanning coherent anti-stokes raman scattering microscopy and applications to cell biology," *Biophysical Journal*, vol. 83, no. 1, pp. 502–509, 2002.
- [26] M. Muller and J. M. Schins, "Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex cars microscopy," *Journal Of Physical Chemistry B*, vol. 106, no. 14, pp. 3715–3723, 2002.
- [27] J. X. Cheng, L. D. Book, and X. S. Xie, "Polarization coherent anti-stokes raman scattering microscopy," *Optics Letters*, vol. 26, no. 17, pp. 1341–1343, 2001.
- [28] M. Hashimoto and T. Araki, "Molecular vibration imaging in the fingerprint region by use of coherent anti-stokes raman scattering microscopy with a collinear configuration," *Optics Letters*, vol. 25, no. 24, pp. 1768–1770, 2000.
- [29] H. F. Wang, Y. Fu, P. Zickmund, R. Y. Shi, and J. X. Cheng, "Coherent anti-stokes raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues," *Biophysical Journal*, vol. 89, no. 1, pp. 581–591, 2005.
- [30] C. L. Evans, E. O. Potma, M. Puoris haag, D. Cote, C. P. Lin, and X. S. Xie, "Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-stokes raman scattering microscopy," *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 102, no. 46, pp. 16807–16812, 2005.
- [31] J. R. Lakowicz, "*Introduction to Fluorescence*", *Principle of Fluorescence*, vol. Chap.1, pp.3-15. New-York : Plenum Press, 1983.
- [32] M. Minsky, "Microscopy apparatus," *US Patent*, p. 3013467, 1957.
- [33] M. Minsky, "Memoir on inventing the confocal scanning microscope," *Scanning*, vol. 10, no. 4, pp. 128–138, 1988.
- [34] M. Terasaky and M. E. Dailey, *Confocal microscopy of living cells, Handbook of biological confocal microscopy*, vol. Chap19, pp327-346. New York and London : Pawley, J. B., 1995.
- [35] J. G. White, W. B. Amos, and M. Fordham, "An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light-microscopy," *Journal Of Cell Biology*, vol. 105, no. 1, pp. 41–48, 1987.
- [36] D. W. Piston, M. S. Kirby, W. J. Cheng, H. P. and Lederer, and W. W. Webb, "2-photon-excitation fluorescence imaging of 3-dimensional calcium-ion activity," *Applied Optics*, vol. 33, no. 4, pp. 662–669, 1994.
- [37] K. Konig, U. Simon, and K. J. Halhuber, "3d resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser

- scanning microscope,” *Cellular And Molecular Biology*, vol. 42, no. 8, pp. 1181–1194, 1996.
- [38] G. J. Brakenhoff, M. Muller, and R. I. Ghauharali, “Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects,” *Journal Of Microscopy-Oxford*, vol. 183, pp. 140–144, 1996.
- [39] V. E. Centonze and J. G. White, “Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging,” *Biophysical Journal*, vol. 75, no. 4, pp. 2015–2024, 1998.
- [40] J. M. Vroom, K. J. De Grauw, H. C. Gerritsen, D. J. Bradshaw, P. D. Marsh, G. K. Watson, J. J. Birmingham, and C. Allison, “Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy,” *Applied And Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 8, pp. 3502–3511, 1999.
- [41] C. Xu and W. W. Webb, “Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm,” *Journal Of The Optical Society Of America B-Optical Physics*, vol. 13, no. 3, pp. 481–491, 1996.
- [42] K. Konig, T. W. Becker, P. Fischer, I. Riemann, and K. J. Halbhauer, “Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes,” *Optics Letters*, vol. 24, no. 2, pp. 113–115, 1999.
- [43] K. Konig, “Multiphoton microscopy in life sciences,” *Journal Of Microscopy-Oxford*, vol. 200, pp. 83–104, 2000.
- [44] A. Hopt and E. Neher, “Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 80, no. 4, pp. 2029–2036, 2001.
- [45] S. W. Hell, S. Lindek, and E. H. K. Stelzer, “Enhancing the axial resolution in far-field light-microscopy2-photon 4pi confocal fluorescence microscopy,” *Journal Of Modern Optics*, vol. 41, no. 4, pp. 675–681, 1994.
- [46] J. R. Lakowicz, H. Szmajnski, W. J. Lederer, M. S. Kirby, M. L. Johnson, and K. Nowaczyk, “Fluorescence lifetime imaging of intracellular calcium in cos cells using quin-2,” *Cell Calcium*, vol. 15, no. 1, pp. 7–27, 1994.
- [47] T. French, P. T. C. So, D. J. Weaver, T. CoelhoSampaio, E. Gratton, E. W. Voss, and J. Carrero, “Two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy of macrophage-mediated antigen processing,” *Journal Of Microscopy-Oxford*, vol. 185, pp. 339–353, 1997.

- [48] A. Volkmer, V. Subramaniam, D. J. S. Birch, and T. M. Jovin, "One- and two-photon excited fluorescence lifetimes and anisotropy decays of green fluorescent proteins," *Biophysical Journal*, vol. 78, no. 3, pp. 1589–1598, 2000.
- [49] R. Sanders, A. Draaijer, H. C. Gerritsen, P. M. Houpt, and Y. K. Levine, "Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging microscopy," *Analytical Biochemistry*, vol. 227, no. 2, pp. 302–308, 1995.
- [50] H. Szmajcinski and J. R. Lakowicz, "Optical measurements of pH using fluorescence lifetimes and phase-modulation fluorometry," *Analytical Chemistry*, vol. 65, no. 13, pp. 1668–1674, 1993.
- [51] J. R. Lakowicz, H. Szmajcinski, K. Nowaczyk, K. W. Berndt, and M. Johnson, "Fluorescence lifetime imaging," *Analytical Biochemistry*, vol. 202, no. 2, pp. 316–330, 1992.
- [52] S. B. Bambot, G. Rao, M. Romauld, G. M. Carter, J. Sipior, E. Terpetchnig, and J. R. Lakowicz, "Sensing oxygen through skin using a red diode-laser and fluorescence lifetimes," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 10, no. 6-7, pp. 643–652, 1995.
- [53] A. Tannert, S. Tannert, K. Kemnitz, and B. Roder, "Determination of lipid organization in the canalicular lumen of hepg2 cells by fluorescence life times of lipid analogs," *Biophysical Journal*, vol. 82, no. 1, pp. 547A–547A, 2002.
- [54] R. M. Clegg and P. C. Schneider, *Fluorescence lifetime-resolved imaging microscopy : a general description of lifetime-resolved imaging measurements*. In *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*. No. 15-25, New York : Plenum Press, 1996.
- [55] R. Jones, K. Dowling, M. J. Cole, D. Parsons-Karavassilis, M. J. Lever, P. M. W. French, J. D. Hares, and A. K. L. Dymoke-Bradshaw, "Fluorescence lifetime imaging using a diode-pumped all-solid-state laser system," *Electronics Letters*, vol. 35, no. 4, pp. 256–258, 1999.
- [56] K. Dowling, M. J. Dayel, M. J. Lever, P. M. W. French, J. D. Hares, and A. K. L. Dymoke-Bradshaw, "Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical applications," *Optics Letters*, vol. 23, no. 10, pp. 810–812, 1998.
- [57] D. R. James and W. R. Ware, "A fallacy in the interpretation of fluorescence decay parameters," *Chemical Physics Letters*, vol. 120, no. 4-5, pp. 455–459, 1985.
- [58] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York : Plenum Publishers, 1999.

- [59] T. Förster, “Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz,” *Annals of Physics*, vol. 2, pp. 55–75, 1948.
- [60] L. Stryer, “Fluorescence energy-transfer as a spectroscopic ruler,” *Annual Review Of Biochemistry*, vol. 47, pp. 819–846, 1978.
- [61] R. Varma and S. Mayor, “Gpi-anchored proteins are organized in sub-micron domains at the cell surface,” *Nature*, vol. 394, no. 6695, pp. 798–801, 1998.
- [62] S. Jacobson and L. Pillus, “Modifying chromatin and concepts of cancer,” *Current Opinion In Genetics & Development*, vol. 9, no. 2, pp. 175–184, 1999.
- [63] A. S. Verkman, M. Armijo, and K. Fushimi, “Construction and evaluation of a frequency-domain epifluorescence microscope for lifetime and anisotropy decay measurements in subcellular domains,” *Biophysical Chemistry*, vol. 40, no. 1, pp. 117–125, 1991.
- [64] R. Swaminathan, C. P. Hoang, and A. S. Verkman, “Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein gfp-s65t in solution and cells : Cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion,” *Biophysical Journal*, vol. 72, no. 4, pp. 1900–1907, 1997.
- [65] M. J. Dayel, E. F. Y. Hom, and A. S. Verkman, “Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum,” *Biophysical Journal*, vol. 76, no. 5, pp. 2843–2851, 1999.
- [66] A. Partikian, B. Olveczky, R. Swaminathan, Y. X. Li, and A. S. Verkman, “Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix,” *Journal Of Cell Biology*, vol. 140, no. 4, pp. 821–829, 1998.
- [67] E. L. Elson and D. Magde, “Fluorescence correlation spectroscopy. i. conceptual basis and theory,” *Biopolymers*, vol. 13, pp. 1–27, 1974.
- [68] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, and P. Kask, “Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low-background analysis of translational diffusion,” *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, vol. 22, no. 3, pp. 169–175, 1993.
- [69] P. Schwille, F. J. MeyerAlmes, and R. Rigler, “Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution,” *Biophysical Journal*, vol. 72, no. 4, pp. 1878–1886, 1997.
- [70] K. M. Berland, P. T. C. So, and E. Gratton, “Two-photon fluorescence correlation spectroscopy method and application to the intracellular environment,” *Biophysical Journal*, vol. 68, no. 2, pp. 694–701, 1995.

- [71] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, and W. W. Webb, "Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation," *Biophysical Journal*, vol. 77, no. 4, pp. 2251–2265, 1999.
- [72] L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M. Blanchard-Desce, and J. Mertz, "Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy," *Biophysical Journal*, vol. 80, no. 3, pp. 1568–1574, 2001.
- [73] S. Fine and W. P. Hansen, "Optical second harmonic generation in biological systems," *Applied Optics*, vol. 10, pp. 2350–2353, 1971.
- [74] T. F. Heinz, C. K. Chen, D. Richard, and Y. R. Shen, "spectroscopy of molecular monolayers by resonant second-harmonique generation," *Physical Review Letters*, vol. 48, no. 7, pp. 478–481, 1982.
- [75] Y. C. Guo, P. P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin, and R. R. Alfano, "Second-harmonic tomography of tissues," *Optics Letters*, vol. 22, no. 17, pp. 1323–1325, 1997.
- [76] J. Y. Huang and A. Lewis, "Determination of the absolute orientation of the retinylidene chromophore in purple membrane by a 2nd-harmonic interference technique," *Biophysical Journal*, vol. 55, no. 5, pp. 835–842, 1989.
- [77] J. Y. Huang, Z. P. Chen, and A. Lewis, "2nd-harmonic generation in purple membrane-poly(vinyl alcohol) films - probing the dipolar characteristics of the bacteriorhodopsin chromophore in br570 and m412," *Journal Of Physical Chemistry*, vol. 93, no. 8, pp. 3314–3320, 1989.
- [78] O. Bouevitch, A. Lewis, I. Pinevsky, J. P. Wuskell, and L. M. Loew, "Probing membrane-potential with nonlinear optics," *Biophysical Journal*, vol. 65, no. 2, pp. 672–679, 1993.
- [79] G. Peleg, A. Lewis, M. Linial, and L. M. Loew, "Nonlinear optical measurement of membrane potential around single molecules at selected cellular sites," *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 96, no. 12, pp. 6700–6704, 1999.
- [80] P. J. Campagnola, M. D. Wei, A. Lewis, and L. M. Loew, "High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation," *Biophysical Journal*, vol. 77, no. 6, pp. 3341–3349, 1999.
- [81] J. Zyss, J. F. Nicoud, and M. Coquillay, "Chirality and hydrogen-bonding in molecular-crystals for phase-matched 2nd-harmonic generationn-(4-nitrophenyl)-(l)-prolinol (npp)," *Journal Of Chemical Physics*, vol. 81, no. 9, pp. 4160–4167, 1984.

- [82] I. Ben-Oren, G. Peleg, A. Lewis, B. Minke, and L. Loew, "Infrared nonlinear optical measurements of membrane potential in photoreceptor cells," *Biophysical Journal*, vol. 71, no. 3, pp. 1616–1620, 1996.
- [83] S. W. Chu, S. Y. Chen, T. H. Tsai, T. M. Liu, C. Y. Lin, H. J. Tsai, and C. K. Sun, "In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy," *Optics Express*, vol. 11, no. 23, pp. 3093–3099, 2003.
- [84] P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler, "Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues," *Biophysical Journal*, vol. 82, no. 1, pp. 493–508, 2002.
- [85] S. J. Lin, C. Y. Hsiao, Y. Sun, W. Lo, W. C. Lin, G. J. Jan, S. H. Jee, and C. Y. Dong, "Monitoring the thermally induced structural transitions of collagen by use of second-harmonic generation microscopy," *Optics Letters*, vol. 30, no. 6, pp. 622–624, 2005.
- [86] A. Zoumi, X. A. Lu, G. S. Kassab, and B. J. Tromberg, "Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 87, no. 4, pp. 2778–2786, 2004.
- [87] A. T. Yeh, M. J. Hammer-Wilson, D. C. Van Sickle, H. P. Benton, A. Zoumi, B. J. Tromberg, and G. M. Peavy, "Nonlinear optical microscopy of articular cartilage," *Osteoarthritis And Cartilage*, vol. 13, no. 4, pp. 345–352, 2005.
- [88] C. K. Sun, S. W. Chu, S. Y. Chen, T. H. Tsai, T. M. Liu, C. Y. Lin, and H. J. Tsai, "Higher harmonic generation microscopy for developmental biology," *Journal Of Structural Biology*, vol. 147, no. 1, pp. 19–30, 2004.
- [89] L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, R. Barille, P. Vacher, and P. Voisin, "Imaging of ca^{2+} intracellular dynamics with a third-harmonic generation microscope," *Optics Letters*, vol. 26, no. 8, pp. 515–517, 2001.
- [90] A. Zoumi, A. Yeh, and B. J. Tromberg, "Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence," *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 99, no. 17, pp. 11014–11019, 2002.
- [91] S. J. Lin, R. J. Wu, H. Y. Tan, W. Lo, W. C. Lin, T. H. Young, C. J. Hsu, J. S. Chen, S. H. Jee, and C. Y. Dong, "Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy," *Optics Letters*, vol. 30, no. 17, pp. 2275–2277, 2005.

- [92] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg, "Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation," *Applied Physics Letters*, vol. 70, no. 8, pp. 922–924, 1997.
- [93] R. Boyd, *Nonlinear Optics*. New York : Academic, 1992.
- [94] D. Oron, D. Yelin, E. Tal, S. Raz, R. Fachima, and Y. Silberberg, "Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy," *Journal Of Structural Biology*, vol. 147, no. 1, pp. 3–11, 2004.
- [95] M. Muller, J. Squier, K. R. Wilson, and G. J. Brakenhoff, "3d microscopy of transparent objects using third-harmonic generation," *Journal Of Microscopy-Oxford*, vol. 191, pp. 266–274, 1998.
- [96] J. A. Squier, M. Muller, G. J. Brakenhoff, and K. R. Wilson, "Third harmonic generation microscopy," *Optics Express*, vol. 3, no. 9, pp. 315–324, 1998.
- [97] A. C. Millard, P. W. Wiseman, D. N. Fittinghoff, K. R. Wilson, J. A. Squier, and M. Muller, "Third-harmonic generation microscopy by use of a compact, femtosecond fiber laser source," *Applied Optics*, vol. 38, no. 36, pp. 7393–7397, 1999.
- [98] D. Yelin, Y. Silberberg, Y. Barad, and J. S. Patel, "Depth-resolved imaging of nematic liquid crystals by third-harmonic microscopy," *Applied Physics Letters*, vol. 74, no. 21, pp. 3107–3109, 1999.
- [99] D. Yelin, Y. Silberberg, Y. Barad, and J. S. Patel, "Phase-matched third-harmonic generation in a nematic liquid crystal cell," *Physical Review Letters*, vol. 82, no. 15, pp. 3046–3049, 1999.
- [100] D. Yelin and Y. Silberberg, "Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology," *Optics Express*, vol. 5, no. 8, pp. 169–175, 1999.
- [101] S. W. Chu, I. H. Chen, T. M. Liu, P. C. Chen, C. K. Sun, and B. L. Lin, "Multimodal nonlinear spectral microscopy based on a femtosecond cr : forsterite laser," *Optics Letters*, vol. 26, no. 23, pp. 1909–1911, 2001.
- [102] R. Barille, L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, P. Vacher, and T. Ducret, "Visualization of intracellular ca²⁺ dynamics with simultaneous two-photon-excited fluorescence and third-harmonic generation microscopes," *Applied Physics Letters*, vol. 79, no. 24, pp. 4045–4047, 2001.
- [103] D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal, and Y. Silberberg, "Third-harmonic microscopy with a titanium-sapphire laser," *Applied Physics B-Lasers And Optics*, vol. 74, pp. S97–S101, 2002.
- [104] D. Debarre, W. Supatto, E. Farge, B. Moulia, M. C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, "Velocimetric third-harmonic generation microscopy : micrometer-scale quantification of morphogenetic movements

- in unstained embryos,” *Optics Letters*, vol. 29, no. 24, pp. 2881–2883, 2004.
- [105] D. Debarre, W. Supatto, and E. Beaurepaire, “Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy,” *Optics Letters*, vol. 30, no. 16, pp. 2134–2136, 2005.
- [106] W. Supatto, D. Debarre, B. Moulia, E. Brouzes, J. L. Martin, E. Farge, and E. Beaurepaire, “In vivo modulation of morphogenetic movements in drosophila embryos with femtosecond laser pulses,” *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 102, no. 4, pp. 1047–1052, 2005.
- [107] D. Debarre, W. Supatto, A. M. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M. C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, “Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy,” *Nature Methods*, vol. 3, no. 1, pp. 47–53, 2006.
- [108] C. Raman and K. Krishnan, “A new radiation,” *Indian Journal of Physics*, vol. 2, p. 387, 1928.
- [109] K. Kincaid, “Raman spectroscopy enhances in vivo diagnosis,” *Laser Focus World*, vol. 34, no. 10, pp. 61–61, 1998.
- [110] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, “Single molecule detection using surface-enhanced raman scattering (sers),” *Physical Review Letters*, vol. 78, pp. 1667–1670, 1997.
- [111] K. Kneipp, H. Kneipp, R. Manoharan, E. B. Hanlon, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, “Extremely large enhancement factors in surface-enhanced raman scattering for molecules on colloidal gold clusters,” *Applied Spectroscopy*, vol. 52, no. 12, pp. 1493–1497, 1998.
- [112] M. Berjot, J. Marx, and A. J. P. Alix, “Determination of the secondary structure of proteins from the raman amide-i band the reference intensity profiles method,” *Journal Of Raman Spectroscopy*, vol. 18, no. 4, pp. 289–300, 1987.
- [113] K. Kneipp, H. Kneipp, V. B. Kartha, R. Manoharan, G. Deinum, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, “Detection and identification of a single dna base molecule using surface-enhanced raman scattering (sers),” *Physical Review E*, vol. 57, no. 6, pp. R6281–R6284, 1998.
- [114] J. M. Benevides, M. A. Weiss, and G. J. Thomas, “Raman studies of nucleic-acids .41. design of the helix turn helix motif nonlocal effects of quaternary structure in dna recognition investigated by laser raman-spectroscopy,” *Biochemistry*, vol. 30, no. 18, pp. 4381–4388, 1991.

- [115] S. A. Overman and G. J. Thomas, "Novel vibrational assignments for proteins from raman spectra of viruses.," *Biophysical Journal*, vol. 74, no. 2, pp. A29–A29, 1998.
- [116] G. J. Puppels, C. Otto, J. Greve, M. Robertnicoud, D. J. Arndtjovin, and T. M. Jovin, "Raman microspectroscopic study of low-ph-induced changes in dna-structure of polytene chromosomes," *Biochemistry*, vol. 33, no. 11, pp. 3386–3395, 1994.
- [117] G. J. Puppels, H. S. P. Garritsen, G. M. J. Segersnolten, F. F. M. Demul, and J. Greve, "Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes," *Biophysical Journal*, vol. 60, no. 5, pp. 1046–1056, 1991.
- [118] T. C. B. Schut, G. J. Puppels, Y. M. Kraan, J. Greve, L. L. J. VanderMaas, and C. G. Figdor, "Intracellular carotenoid levels measured by raman microspectroscopy : Comparison of lymphocytes from lung cancer patients and healthy individuals," *International Journal Of Cancer*, vol. 74, no. 1, pp. 20–25, 1997.
- [119] J. Ling, S. D. Weitman, M. A. Miller, R. V. Moore, and A. C. Bovik, "Direct raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of a drug," *Applied Optics*, vol. 41, no. 28, pp. 6006–6017, 2002.
- [120] E. B. Hanlon, R. Manoharan, T. W. Koo, K. E. Shafer, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Prospects for in vivo raman spectroscopy," *Physics In Medicine And Biology*, vol. 45, no. 2, pp. R1–R59, 2000.
- [121] P. J. Caspers, G. W. Lucassen, R. Wolthuis, H. A. Bruining, and G. J. Puppels, "In vitro and in vivo raman spectroscopy of human skin," *Biospectroscopy*, vol. 4, no. 5, pp. S31–S39, 1998.
- [122] N. J. Kline and P. J. Treado, "Raman chemical imaging of breast tissue," *Journal Of Raman Spectroscopy*, vol. 28, no. 2-3, p. 119, 1997.
- [123] I. R. Nabiev, H. Morjani, and M. Manfait, "Selective analysis of anti-tumor drug-interaction with living cancer-cells as probed by surface-enhanced raman-spectroscopy," *European Biophysics Journal*, vol. 19, no. 6, pp. 311–316, 1991.
- [124] S. Sharonov, I. Nabiev, I. Chourpa, A. Feofanov, P. Valisa, and M. Manfait, "Confocal 3-dimensional scanning laser raman-sers-fluorescence microprobespectral imaging and high-resolution applications," *Journal Of Raman Spectroscopy*, vol. 25, no. 7-8, pp. 699–707, 1994.
- [125] A. D. Gift, J. Y. Ma, K. S. Haber, B. L. McClain, and D. Ben-Amotz, "Near-infrared raman imaging microscope based on fiber-bundle image

- compression,” *Journal Of Raman Spectroscopy*, vol. 30, no. 9, pp. 757–765, 1999.
- [126] P. D. Maker and R. W. Terhune, “Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength,” *Physical Review*, vol. 137, pp. A801–A818, 1965.
- [127] Y. R. Shen, *The principles of non linear optics*. New York : Wiley, 1984.
- [128] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, “Imaging biological compounds using the cars microscope,” *Proceedings Of The Society Of Photo-Optical Instrumentation Engineers*, vol. 482, pp. 46–52, 1984.
- [129] A. Volkmer, J. X. Cheng, and X. S. Xie, “Vibrational imaging with high sensitivity via epidetected coherent anti-stokes raman scattering microscopy,” *Physical Review Letters*, vol. 8702, no. 2, p. 023901, 2001.
- [130] J. X. Cheng, A. Volkmer, and X. S. Xie, “Theoretical and experimental characterization of coherent anti-stokes raman scattering microscopy,” *Journal Of The Optical Society Of America B-Optical Physics*, vol. 19, no. 6, pp. 1363–1375, 2002.
- [131] A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie, “Time-resolved coherent anti-stokes raman scattering microscopy : Imaging based on raman free induction decay,” *Applied Physics Letters*, vol. 80, no. 9, pp. 1505–1507, 2002.
- [132] N. Dudovich, D. Oron, and Y. Silberberg, “Single-pulse coherently controlled nonlinear raman spectroscopy and microscopy,” *Nature*, vol. 418, pp. 512–514, 2002.
- [133] R. D. Schaller, J. Ziegelbauer, L. F. Lee, L. H. Haber, and R. J. Saykally, “Chemically selective imaging of subcellular structure in human hepatocytes with coherent anti-stokes raman scattering (cars) near-field scanning optical microscopy (nsom),” *Journal Of Physical Chemistry B*, vol. 106, no. 34, pp. 8489–8492, 2002.
- [134] T. Ichimura, N. Hayazawaa, M. Hashimotoa, Y. Inoueya, and S. Kawataa, “Tip-enhanced coherent anti-stokes raman scattering for vibrational nanoimaging,” *Physical Review Letters*, vol. 92, no. 22, pp. 220801–1–220801–1, 2004.
- [135] H. Lotem, R. Lynch, and N. Bloembergen, “Interference between raman resonances in four-wave difference mixing,” *Physical Review A*, vol. 14, no. 5, pp. 1748–1755, 1976.
- [136] T. Hellerer, *CARS-Mikroskopie :Entwicklung und Anwendung*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004.

- [137] G. R. Holtom, B. D. Thrall, B. Y. Chin, H. S. Wiley, and S. D. Colson, "Achieving molecular selectivity in imaging using multiphoton raman spectroscopy techniques," *Traffic*, vol. 2, no. 11, pp. 781–788, 2001.
- [138] X. L. Nan, J. X. Cheng, and X. S. Xie, "Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-stokes raman scattering microscopy," *Journal Of Lipid Research*, vol. 44, no. 11, pp. 2202–2208, 2003.
- [139] S. Pautot, B. J. Frisken, J. X. Cheng, X. S. Xie, and D. A. Weitz, "Spontaneous formation of lipid structures at oil/water/lipid interfaces," *Langmuir*, vol. 19, pp. 10281–10287, 2003.
- [140] J. X. Cheng, S. Pautot, D. A. Weitz, and X. S. Xie, "Ordering of water molecules between phospholipid bilayers visualized by coherent anti-stokes raman scattering microscopy," *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 100, no. 17, pp. 9826–9830, 2003.
- [141] E. O. Potma, W. P. De Boeij, P. J. M. Van Haastert, and D. A. Wiersma, "Real-time visualization of intracellular hydrodynamics in single living cells," *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 98, no. 4, pp. 1577–1582, 2001.
- [142] J. X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie, "Multiplex coherent anti-stokes raman scattering microspectroscopy and study of lipid vesicles," *Journal Of Physical Chemistry B*, vol. 106, no. 34, pp. 8493–8498, 2002.
- [143] E. O. Potma and X. S. Xie, "Detection of single lipid bilayers with coherent anti-stokes raman scattering (cars) microscopy," *Journal Of Raman Spectroscopy*, vol. 34, no. 9, pp. 642–650, 2003.
- [144] F. Légaré, C. L. Evans, F. Ganikhanov, and X. S. Xie, "Towards cars endoscopy," *Optics Express*, vol. 14, no. 10, pp. 4427–4432, 2006.
- [145] X. Nan, W. Y. Yang, and X. S. Xie, "Cars microscopy : Lights up lipids in living cells," *Biophotonics International*, vol. 11, no. 8, pp. 44–47, 2004.
- [146] E. O. Potma and X. S. Xie, "Direct visualization of lipid phase segregation in single lipid bilayers with coherent anti-stokes raman scattering microscopy," *Chemphyschem*, vol. 6, no. 1, pp. 77–79, 2005.
- [147] L. Li, H. F. Wang, and J. X. Cheng, "Quantitative coherent anti-stokes raman scattering imaging of lipid distribution in coexisting domains," *Biophysical Journal*, vol. 89, no. 5, pp. 3480–3490, 2005.

- [148] T. Tahara, B. N. Toleutaev, and H. Hamaguchi, "Picosecond time-resolved multiplex coherent anti-stokes-raman scattering spectroscopy by using a streak camera isomerization dynamics of all-trans and 9-cis retinal in the lowest excited triplet-state," *Journal Of Chemical Physics*, vol. 100, no. 2, pp. 786–796, 1994.
- [149] G. W. H. Wurpel, J. M. Schins, and M. Müller, "Chemical specificity in three-dimensional imaging with multiplex coherent anti-stokes raman scattering microscopy," *Optics Letters*, vol. 27, no. 13, pp. 1093–1095, 2002.
- [150] H. Rinia, M. Bonn, and M. Muller, "Quantitative multiplex cars spectroscopy in congested spectral regions," *Journal Of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 9, pp. 4472–4479, 2006.
- [151] G. W. H. Wurpel, J. M. Schins, and M. Muller, "Direct measurement of chain order in single phospholipid mono- and bilayers with multiplex cars," *Journal Of Physical Chemistry B*, vol. 108, no. 11, pp. 3400–3403, 2004.
- [152] G. W. H. Wurpel, H. A. Rinia, and M. Muller, "Imaging orientational order and lipid density in multilamellar vesicles with multiplex cars microscopy," *Journal Of Microscopy-Oxford*, vol. 218, pp. 37–45, 2005.
- [153] T. Hellerer, A. Schiller, G. Jung, and A. Zumbusch, "Coherent anti-stokes raman scattering (cars) correlation spectroscopy," *Chemphyschem*, vol. 7, pp. 630–633, 2002.
- [154] J. X. Cheng, E. O. Potma, and X. S. Xie, "Coherent anti-stokes raman scattering correlation spectroscopy : Probing dynamical processes with chemical selectivity," *Journal Of Physical Chemistry A*, vol. 106, pp. 8561–8568, 2002.
- [155] Y. Yacoby, R. Fitzgibbon, and B. Lax, "Coherent cancellation of background in 4-wave mixing spectroscopy," *Journal Of Applied Physics*, vol. 51, no. 6, pp. 3072–3077, 1980.
- [156] G. Marowsky and G. Lupke, "Cars-background suppression by phase-controlled nonlinear interferometry," *Applied Physics B-Photophysics And Laser Chemistry*, vol. 51, no. 1, pp. 49–51, 1990.
- [157] C. Vinegoni, J. S. Bredfeldt, D. L. Marks, and S. A. Boppart, "Nonlinear optical contrast enhancement for optical coherence tomography," *Optics Express*, vol. 12, no. 2, pp. 331–341, 2004.
- [158] D. L. Marks and S. A. Boppart, "Nonlinear interferometric vibrational imaging," *Physical Review Letters*, vol. 92, no. 12, p. 123905, 2004.

- [159] C. L. Evans, E. O. Potma, and X. S. N. Xie, “Coherent anti-stokes raman scattering spectral interferometry : determination of the real and imaginary components of nonlinear susceptibility $\chi^{(3)}$ for vibrational microscopy,” *Optics Letters*, vol. 29, no. 24, pp. 2923–2925, 2004.
- [160] M. Greve, B. Bodermann, H. Telle, , P. Baum, and E. Riedle, “High-contrast chemical imaging with gated heterodyne coherent anti-stokes raman scattering microscopy,” *Applied Physics B*, vol. 81, pp. 875–879, 2005.
- [161] E. Potma, C. Evans, and X. Xie, “Heterodyne coherent anti-stokes raman scattering (cars) imaging,” *Optics Letters*, vol. 31, no. 2, pp. 241–243, 2006.
- [162] N. Dudovich, D. Oron, and Y. Silberberg, “Single-pulse coherent anti-stokes raman spectroscopy in the fingerprint spectral region,” *Journal Of Chemical Physics*, vol. 118, no. 20, pp. 9208–9215, 2003.
- [163] D. Oron, N. Dudovich, and Y. Silberberg, “Single-pulse phase-contrast nonlinear raman spectroscopy,” *Physical Review Letters*, vol. 89, no. 27, pp. 1–4, 2002.
- [164] D. Oron, N. Dudovich, and Y. Silberberg, “Femtosecond phase-and-polarization control for background-free coherent anti-stokes raman spectroscopy,” *Physical Review Letters*, vol. 90, no. 21, pp. 1–4, 2003.
- [165] W. Fischer, E. Wachter, M. Armas, and C. Seaton, “Titanium :sapphire laser as an excitation source in two-photon spectroscopy,” *Applied Spectroscopy*, vol. 51, no. 2, pp. 218–226, 1997.
- [166] D. E. Spence, P. N. Kean, and W. Sibbett, “60-fsec pulse generation from a self-mode-locked ti-sapphire laser,” *Optics Letters*, vol. 16, no. 1, pp. 42–44, 1991.
- [167] P. F. Moulton, “Spectroscopic and laser characteristics of ti :al₂o₃,” *Journal of Optical Society of America B*, vol. 3, pp. 125–133, 1986.
- [168] F. Gires and P. Tournois, “Interféromètre utilisables pour la compression d’impulsions lumineuses modulées en fréquence,” *C.R. Acad Paris*, vol. 258, pp. 6112–6115, 1964.
- [169] J. K. Ranka, “Autocorrelation measurement of 6 fs pulses based on the two-photon induced photo-current in a gaasp photodiode,” *Optics Letters*, vol. 22, pp. 1344–1346, 1997.
- [170] A. C. Millard, D. N. Fittinghoff, J. A. Squier, M. Muller, and A. L. Gaeta, “Using gaasp photodiodes to characterize ultrashort pulses under high numerical aperture focusing in microscopy,” *Journal of Microscopy*, vol. 193, pp. 179–181, 1999.

- [171] M. Muller, J. Squier, and G. J. Brakenhoff, "Measurement of femto-second pulses in the focal point of a high-numerical-aperture lens by two-photon absorption," *Optics Letters*, vol. 20, no. 9, pp. 1038–1040, 1995.
- [172] N. Djaker, P. Lenne, and H. Rigneault, "Vibrational imaging by cars microscopy," *Proceedings-SPIE The International Society For Optical Engineering*, vol. 5463, pp. 133–139, 2004.
- [173] J. X. Cheng and X. S. Xie, "Coherent anti-stokes raman scattering microscopy : Instrumentation, theory, and applications," *Journal Of Physical Chemistry B*, vol. 108, no. 3, pp. 827–840, 2004.
- [174] N. Djaker, N. Sandeau, D. Gachet, P. F. Lenne, and H. Rigneault, "Refractive effects in coherent anti-stokes raman scattering (cars) microscopy," *Applied Optics*, vol. 45, no. 24, pp. 7005–7011, 2006.
- [175] T. D. Visser, J. L. Oud, and G. J. Brakenhoff, "Refractive-index and axial distance measurements in 3-d microscopy," *Optik*, vol. 90, no. 1, pp. 17–19, 1992.
- [176] T. D. Visser and J. L. Oud, "Volume measurements in 3-dimensional microscopy," *Scanning*, vol. 16, no. 4, pp. 198–200, 1994.
- [177] H. Jacobsen, P. Hanninen, E. Soini, and S. W. Hell, "Refractive-index-induced aberrations in 2-photon confocal fluorescence microscopy," *Journal Of Microscopy-Oxford*, vol. 176, pp. 226–230, 1994.
- [178] G. J. De Grauw, J. M. Vroom, H. T. M. Van der Voort, and H. C. Gerritsen, "Imaging properties in two-photon excitation microscopy and effects of refractive-index mismatch in thick specimens," *Applied Optics*, vol. 38, no. 28, pp. 5995–6003, 1999.
- [179] A. Diaspro, F. Federici, and M. Robello, "Influence of refractive-index mismatch in high-resolution three-dimensional confocal microscopy," *Applied Optics*, vol. 41, no. 4, pp. 685–690, 2002.
- [180] L. C. Kuypers, W. F. Decraemer, J. J. J. Dirckx, and J. P. Timmermans, "A procedure to determine the correct thickness of an object with confocal microscopy in case of refractive index mismatch," *Journal Of Microscopy-Oxford*, vol. 218, pp. 68–78, 2005.
- [181] S. J. Singer and G. L. Nicolson, "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes," *Science*, vol. 175, pp. 720–731, 1972.
- [182] P. F. Lenne, L. Wawreznieck, H. Rigneault, and D. Marguet, "Confined diffusion in membrane microdomains of living cell explored by fluorescence correlation spectroscopy," *Biophysical Journal*, vol. 86, no. 1, pp. 524A–524A, 2004.

- [183] L. Wawrezynieck, H. Rigneault, D. Marguet, and P. F. Lenne, “Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization,” *Biophysical Journal*, vol. 89, no. 6, pp. 4029–4042, 2005.
- [184] T. Bickel, *Interaction polymères-membranes : une approche locale*. PhD thesis, Université Strabourg I, 2001.
- [185] D. S. Dimitrov and M. I. Angelova, “Lipid swelling and liposome formation mediated by electric-fields,” *Bioelectrochemistry And Bioenergetics*, vol. 19, no. 2, pp. 323–336, 1988.
- [186] M. Angelova, S. Soleau, P. Meleard, J. F. Faucon, and P. Bothorel, “Preparation of giant vesicles by external a.c. electric fields. kinetics and applications.,” *Progress in Colloid and Polymer Science*, vol. 89, pp. 127–131, 1992.
- [187] D. D. Lasic, *LIPOSOMES : from Physics to Applications*. Elsevier, 1993.
- [188] E. J. Dufourc, E. J. Parish, S. Chitrakorn, and I. C. P. Smith, “Structural and dynamical details of cholesterol lipid interaction as revealed by deuterium nmr,” *Biochemistry*, vol. 23, no. 25, pp. 6062–6071, 1984.
- [189] N. Djaker, H. Rigneault, and D. Marguet, “Microscopie par diffusion raman stimulée,” *Medecine et Science*, vol. 22, no. 8-9, pp. 1–6, 2006.
- [190] M. Rajadhyaksha, S. Gonzalez, J. M. Zavislan, R. R. Anderson, and R. H. Webb, “In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin ii : Advances in instrumentation and comparison with histology,” *Journal Of Investigative Dermatology*, vol. 113, no. 3, pp. 293–303, 1999.
- [191] J. G. Fujimoto, “Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging,” *Nature Biotechnology*, vol. 21, no. 11, pp. 1361–1367, 2003.
- [192] B. R. Masters and P. T. C. So, “Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin in vivo,” *Optics Express*, vol. 8, no. 1, pp. 2–10, 2001.
- [193] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, “Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation,” *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 100, no. 12, pp. 7075–7080, 2003.
- [194] L. M. Miller, G. D. Smith, and G. L. Carr, “Synchrotron-based biological microspectroscopy : From the mid-infrared through the far-infrared

- regimes,” *Journal Of Biological Physics*, vol. 29, no. 2-3, pp. 219–230, 2003.
- [195] L. Chrit, C. Hadjur, S. Morel, G. Sockalingum, G. Lebourdon, F. Leroy, and M. Manfait, “In vivo chemical investigation of human skin using a confocal raman fiber optic microprobe,” *Journal Of Biomedical Optics*, vol. 10, no. 4, p. 044007, 2005.
- [196] L. Chrit, P. Bastien, G. D. Sockalingum, D. Batisse, F. Leroy, M. Manfait, and C. Hadjur, “An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal raman fiber-optic microprobe : Assessment of a glycerol-based hydration cream,” *Skin Pharmacology And Physiology*, vol. 19, no. 4, pp. 207–215, 2006.
- [197] site1, “www.nmsl.chem.ccu.edu.tw.”
- [198] J. Kanitakis, “Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin,” *European Journal of Dermatology*, vol. 12, pp. 390–401, 2002.
- [199] site2, “www.jobinyvon.com/usadivisions/raman.”
- [200] J. D. Aplin, “Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation : mechanistic evidence in vivo and in vitro,” *Journal of Cell Science*, vol. 99, pp. 681–692, 1991.
- [201] P. Kaufmann and I. Scheffen, *Neonatal and fetal medicine-physiology and pathophysiology : Placental development*. Orlando :Saunders, 1990.
- [202] C. W. Redman and I. L. Sargent, “Latest advances in understanding prééclampsie,” *Science*, vol. 308, pp. 1592–1594, 2005.
- [203] Y. Zhou, C. H. Damsky, K. Chiu, J. M. Roberts, and S. J. Fisher, “Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cyto-trophoblastes,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 91, pp. 950–960, 1993.
- [204] Y. Zhou, C. H. Damsky, and S. J. Fisher, “reeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. one cause of defective endovascular invasion in this syndrome,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, pp. 2152–2164, 1997.
- [205] C. S. Clements, L. K. Nielsen, L. Kostenko, H. L. Hoare, M. A. Dunstone, E. Moses, K. Freed, A. G. Brooks, J. Rossjohn, and J. McCluskey, “Crystal structure of hla-g : A nonclassical mhc class i molecule expressed at the fetal-maternal interface,” *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 102, pp. 3360–3365, 2005.

- [206] N. Djaker, P. Lenne, D. Marguet, A. Colonna, C. Hadjur, and H. Rigneault, “Coherent anti-stokes raman scattering microscopy (cars) : Instrumentation and applications,” *Nuclear Instruments & Methods*, 2006. accepted.

Résumé

La microscopie par diffusion Raman Cohérente Anti-Stokes (CARS) est une méthode récente d'imagerie dont le contraste provient de l'excitation résonante sélective de vibrations moléculaires intrinsèques d'une liaison ou d'un ensemble de liaisons chimiques. Cette technique présente l'avantage de s'affranchir de tout marqueur fluorescent qui peut être toxique pour un organisme biologique vivant. Elle permet aussi d'avoir une très grande sensibilité et une forte résolution spatiale, comparable à celle de la microscopie confocale. Le travail de cette thèse concerne la réalisation d'un microscope CARS, et sa mise en application à différents domaines de l'imagerie bio-médicale. Des études ont été menées démontrant les potentialités de cet outil, ainsi que sa caractérisation dans le domaine spatiale et spectral.

Mots-clés : Microscopie non-linéaire cohérente, mélange à quatre ondes, diffusion Raman cohérente (CARS), effets réfractifs, imagerie cellulaire, imagerie des tissus biologiques.

Abstract

Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy (CARS) is a new approach for chemical imaging of molecular systems, with high sensitivity, high spatial resolution, and three dimensional sectioning capability, without using fluorophores that are prone to photobleaching. This technique permits to map selectively molecular species, by using vibrational properties of their chemical bounds. CARS is described by a four wave-mixing process, where the signal intensity depends nonlinearly on the incident intensities, and generated in a direction determined by the phase-matching condition. The approach of this work was to realize a CARS microscope, allowing biological systems imaging without any labelling or staining. Studies were undertaken showing the potentialities of this tool, as well as its characterization in the spatial and spectral domain.

Keywords : Nonlinear optical microscopy, four-wave mixing, coherent Raman scattering (CARS), refractive effects, cellular imaging, biological tissues imaging.