



Imagerie moléculaire 3D quantitative des tissus en utilisant la microscopie Raman cohérente sans marquage

Rafael Canonge

► To cite this version:

Rafael Canonge. Imagerie moléculaire 3D quantitative des tissus en utilisant la microscopie Raman cohérente sans marquage. Optique [physics.optics]. Ecole Centrale Marseille, 2017. Français. NNT : 2017ECDM0010 . tel-01798088

HAL Id: tel-01798088

<https://theses.hal.science/tel-01798088>

Submitted on 23 May 2018

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.

École Centrale de Marseille

École Doctorale 352 : Physique et sciences de la matière

Imagerie moléculaire 3D quantitative des
tissus en utilisant la microscopie Raman
cohérente sans marquage

Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'École Centrale de Marseille

Discipline : Optique, photonique et traitement d'image

Présentée par :

Rafaël CANONGE

Jury :

Olivier PIOT	Université de Reims	Rapporteur
Vincent COUDERC	Université de Limoges	Rapporteur
Florian FORMANEK	Centre de recherche L'Oréal, Aulnay-sous-Bois	Examineur
Julien DUBOISSET	Institut Fresnel	Examineur
Hervé RIGNEAULT	Institut Fresnel	Directeur de thèse

Table des matières

Introduction	3
1 La microscopie non linéaire	7
1.1 L'effet Raman	7
1.1.1 La résonnance vibrationnelle	7
1.1.2 La diffusion Raman spontanée	8
1.2 La microscopie Raman cohérente	11
1.2.1 La susceptibilité non linéaire	11
1.2.2 La diffusion Raman cohérente	11
1.2.3 Le processus CARS	12
1.2.4 Le processus SRS	17
1.2.5 La microscopie Raman cohérente	19
1.2.6 Microscopie de fluorescence et de seconde harmonique	21
1.2.7 La microscopie FM-SRS	24
1.3 Montage expérimental	29
1.3.1 Montage optique	30
1.3.2 Microscope	33
1.3.3 Détection des signaux	34
1.4 Conclusion	35
2 Application à l'étude du système digestif humain	37
2.1 Contexte de l'étude et motivations	37
2.1.1 Histologie et histopathologie	37
2.1.2 La microscopie non linéaire pour l'histologie	39
2.2 Matériels et méthodes	42

2.2.1	Échantillons et système digestif	42
2.2.2	Microscopie non linéaire multimodale	43
2.2.3	Traitement des données	45
2.3	Résultats	45
2.3.1	Imagerie du système digestif et première comparaison avec l'histologie	46
2.3.2	Imagerie des noyaux cellulaires	50
2.3.3	Application à l'histologie	53
2.3.4	Vers la détection du cancer	56
2.4	Frequency-Modulated Stimulated Raman Scattering	60
2.4.1	Description du montage FM-SRS	60
2.4.2	Comparaison des modalités FM-SRS et Switch-SRS	61
2.5	Conclusion	68
3	Application au suivi de substances moléculaires actives dans la peau	71
3.1	Contexte et motivations	71
3.1.1	Organisation et composition de la peau humaine	71
3.1.2	L'optique non linéaire pour imager la peau	73
3.2	Matériels et méthodes	76
3.2.1	Échantillons et préparation	76
3.2.2	Installation multimodale et détection	80
3.2.3	Traitement des données	82
3.3	Imagerie CARS <i>in vivo</i>	82
3.3.1	Résultats préliminaires	83
3.3.2	Premières expériences	86
3.3.3	Évolution de la méthode de traitement	91
3.3.4	Étude de l'utilisation de gel de Xanthane comme véhicule	94
3.4	Modalité SRS et FM-SRS	98
3.4.1	Preuve de principe	98
3.4.2	Comparaison CARS FM-SRS dans les plasties	102
3.5	Conclusion	106
	Conclusions et perspectives	109

TABLE DES MATIÈRES

Bibliographie	119
----------------------	------------

Liste des publications

Publiée

1. B. Sarri, R. Canonge et H. Rigneault, “Imager la peau sans marquage par microscopie multiphotonique : un nouvel outil pour la dermatologie et la cosmétique”, *Biologie Cutanée BIP 2016, Editions Matrix, Edité par Marek Haftek* 2017

En préparation

1. R. Canonge, B. Sarri, H. Rigneault, “Background free stimulated Raman scattering using frequency-modulation”

2. R. Canonge, B. Sarri, X. Chen, J.-B. Galey, S. Grégoire, F. Formanek, H. Rigneault, “In vivo percutaneous penetration of active molecule using coherent anti-Stokes Raman Scattering”

3. B. Sarri, R. Canonge, F. Caillol, F. Poizat, M. Giovannini, H. Rigneault, “Label free histology in gastrointestinal tissues using stimulated Raman scattering”

Communications à des conférences

1. B. Sarri ; R.P. Canonge ; X. Audier ; J. Alie ; V. Lavastre ; H. Rigneault, “Discriminating polymorph molecule distributions in pharmaceutical tablets using stimulating Raman scattering”, 2017 *European Conferences on Biomedical Optics (ECBO) meeting*. 25-29 Juin 2017, Munich, Allemagne.

2. R. Canonge ; B. Sarri ; D. Marguet ; F. Poizat ; F. Caillol ; M. Giovannini ; H. Rigneault, “Frequency modulated coherent Raman and multiphoton imaging microscopy : An alternative to histology?”, 2017 *European Conferences on Biomedical Optics (ECBO) meeting*. 25-29 June 2017, Munich, Allemagne.

3. B. Sarri, R. Canonge, Xueqin Chen, Florian Formanek, Sébastien Grégoire, Jean-Baptiste Galey and Hervé Rigneault, “Ex vivo and in vivo quantitative 3D molecular cutaneous imaging in human skin using coherent Raman and two photons microscopy”, *International Society for the imaging of the skin*, 31 mai-3 juin 2016, Lisbonne, Portugal.

4. R. Canonge, B. Sarri, F. Caillol, F. Poizat, M. Giovannini, H. Rigneault, “Multiphoton imaging microscopy : An alternative to histology?”, 2015 *Bio-Nano-Photonics Symposium*. 7-9 septembre 2015, Cardiff, Royaume-Uni.

5. R. Canonge, B. Sarri, F. Caillol, F. Poizat, M. Giovannini, H. Rigneault, “Imagerie non linéaire sans marquage dans les tissus biologiques”, 2016 *OptDiag*. 25-27 mai 2016,

Paris, France.

Introduction

Il est dans la nature de l'être humain de chercher à comprendre le monde qui l'entoure, et à plus forte raison le vivant, dont il fait partie. L'invention du microscope au début du XVII^e siècle a permis d'accéder à l'observation d'objets invisibles à l'œil nu. Au fil du temps, cet outil a constamment été perfectionné, permettant d'étudier des objets de plus en plus petits.

Le développement de la microscopie de fluorescence a constitué une avancée considérable pour l'observation du vivant, utilisant la propriété de certaines molécules à émettre un rayonnement lumineux après avoir absorbé de la lumière. L'utilisation de ces molécules, appelées marqueurs, a permis d'élargir le champ d'application de la microscopie de façon significative. Néanmoins les complexités associées à leur utilisation et leurs effets souvent néfastes sur les systèmes biologiques étudiés peuvent être une contrainte, en particulier pour étudier des systèmes vivants.

Il y a quelques décennies, la découverte des processus d'optique non linéaire ont permis le développement rapide de la microscopie multiphotonique. Les effets non linéaires sont générés par l'interaction d'un champ électromagnétique intense avec la matière, et le développement des lasers à impulsions a permis de rendre ces processus assez efficaces pour être détectés facilement. Il existe plusieurs mécanismes non linéaires, apportant chacun un contraste différent, et ne nécessitant l'utilisation d'aucun marquage. Dans cette thèse nous nous intéresserons aux processus non linéaires d'autofluorescence à deux photons (TPEF), de génération de seconde harmonique (SHG), et Raman cohérent "Cohérent Anti-Stokes Raman Scattering" (CARS) et "Stimulated Raman Scattering" (SRS) qui sont des outils particulièrement efficaces pour imager des tissus biologiques, de part leur spécificité chimique ou structurelle.

Un atout majeur de la microscopie non linéaire réside dans le fait que ces processus ne sont générés qu'au point focal, lorsque l'on concentre la lumière à l'intérieur de l'échantillon. Cette propriété entraîne un sectionnement optique intrinsèque à la microscopie non linéaire et l'utilisation de faisceaux lasers infrarouges permet de réaliser de l'imagerie en profondeur dans des échantillons biologiques.

Néanmoins, le domaine de la microscopie non linéaire est le siège de perfectionnements technologiques constant, que ce soit sur le plan des modalités d'excitation, de celles de la détection des signaux, où encore l'évolution des contrastes utilisés.

Dans cette thèse, nous nous intéresserons aux développements techniques permettant de s'affranchir des signaux parasites pouvant être générés lors des processus CARS et SRS, dans le but de contribuer à l'amélioration des moyens d'imagerie microscopique des tissus biologiques. Nous présenterons dans ce cadre le développement d'une nouvelle méthode de détection SRS basée sur la modulation rapide en fréquence des faisceaux lasers excitateurs.

Nous décrirons l'application de la microscopie multiphotonique sur les tissus humains dans deux domaines que sont l'imagerie biomédicale et le traçage de produits cosmétiques dans la peau. Nous présenterons d'une part les résultats obtenus ayant permis de faire avancer les connaissances dans ces domaines, et d'autre part nous présenterons les innovations techniques mises en place, en décrivant les améliorations apportées par celles-ci. Finalement nous présenterons les perspectives apportées par nos travaux dans chacun de ces domaines.

Organisation du manuscrit

Chapitre 1 Nous exposerons les principes de la microscopie non linéaire. Nous décrirons le phénomène de résonance vibrationnelle et les processus Raman cohérent CARS et SRS, ainsi que la microscopie d'auto-fluorescence à deux photons et la génération de seconde harmonique. Nous décrirons en détail le montage expérimental développé au cours de cette thèse et les améliorations techniques que nous y avons apporté.

Chapitre 2 Dans ce chapitre nous expliquerons comment la microscopie non linéaire peut devenir un outil supplémentaire à la disposition des médecins. Nous nous intéresserons à la détection du cancer dans le système digestif humain, en décrivant comment

les processus non linéaires de TPEF, SHG, CARS, et SRS peuvent fournir une image détaillée des muqueuses gastro-intestinales, faisant apparaître les lipides et les protéines, les noyaux cellulaires, et les fibres de collagène. Nous montrerons que les images obtenues en microscopie multimodale peuvent être utilisées dans le domaine de l'histologie, et contribuer à réduire les durées nécessaires à l'établissement d'un diagnostic. Nous verrons enfin comment la nouvelle méthode SRS modulée en fréquence développée au cours de cette thèse peut constituer une amélioration par la réduction du temps d'acquisition et la diminution de la sensibilité aux mouvements des échantillons.

Chapitre 3 Ce chapitre sera consacré au suivi de substances deutérées dans la peau humaine. Nous montrerons comment les microscopies CARS et SRS peuvent permettre de cibler l'énergie de vibration de la liaison carbone-deutérium au sein d'un tissu biologique afin d'en suivre la progression lors de son absorption dans la peau. Une méthode permettant de retrouver la concentration en glycérol deutéré en tout point dans la peau sera décrite, et nous présenterons des cartes de concentrations en glycérol dans des échantillons de peau excisée provenant de chirurgie, ainsi que dans la peau humaine *in vivo*. Nous montrerons comment la microscopie SRS modulée en fréquence peut améliorer le suivi de molécules actives dans la peau et contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'absorption et de pénétration des produits cosmétiques.

Mon travail de thèse a été réalisé en étroite collaboration avec Barbara Sarri, post doctorante à l'Institut Fresnel. Mon implication principale a été sur le développement de l'instrumentation alors que B. Sarri s'est plus concentrée sur le traitement des données. Nos travaux complémentaires ont permis de conjuguer innovations technologiques et évaluation de leurs applications dans les deux domaines que sont l'histologie et la pénétration de molécules cosmétiques dans la peau. Il est clair que sans notre tandem un tel travail n'aurait pas été possible en trois années seulement. Je présenterai donc dans cette thèse les résultats issus de nos travaux en mentionnant les contributions qui relèvent spécifiquement des traitements de B. Sarri.

Chapitre 1

La microscopie non linéaire

1.1 L'effet Raman

1.1.1 La résonance vibrationnelle

Les liaisons chimiques entre atomes au sein d'une même molécule sont le siège de rotations et de vibrations possédant des énergies quantifiées. On relie chacune de ces énergies à un mode de couplage rovibrationnel dont l'énergie dépend, entre autres, des atomes mis en jeu, ainsi que de la géométrie et de la symétrie de la molécule d'intérêt. Le domaine d'énergie de ces modes correspond au domaine de l'infrarouge moyen (environ 400cm^{-1} à 4000cm^{-1}). Les molécules possèdent un nombre d'énergies de vibrations relié au nombre d'atomes dont elles sont composées, suivant la formule $3N - 6$, N étant le nombre d'atomes de la molécule. Ainsi, par exemple, la molécule d'eau possède trois modes de vibration, illustrés en figure 1.1 .

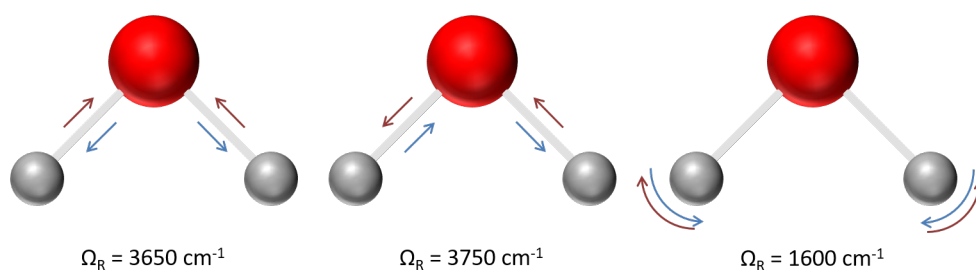


FIGURE 1.1 – Fréquences des modes de vibration de la molécule H_2O

Pour décrire ces modes de vibration, on peut modéliser la liaison entre deux atomes par un oscillateur harmonique en régime forcé soumis à une force périodique $F(t) = F_0 \cos(\omega t)$, que l'on peut relier à une excitation par une onde électromagnétique de fréquence ω . La réponse de l'oscillateur à cette excitation s'écrit ([1])

$$x(\omega) = \frac{\frac{F_0}{m}}{\omega_0^2 - \omega^2 - i2\gamma\omega} \quad (1.1)$$

Avec m la masse et γ le facteur d'amortissement. Généralement $\gamma \ll \omega_0$.

Ainsi, lorsque ω est proche de ω_0 , la réponse du système est amplifiée; c'est le phénomène de résonance.

Les différents modes rovibrationnels d'une molécule peuvent être sondés par spectroscopie d'absorption infrarouge. De plus, chaque liaison chimique possédant sa fréquence de résonance caractéristique, dépendant également de son environnement moléculaire, on peut utiliser cette signature vibrationnelle pour retrouver les liaisons chimiques et remonter ainsi aux différents composants d'un échantillon.

1.1.2 La diffusion Raman spontanée

Il existe une autre méthode que la spectroscopie infrarouge pour sonder les niveaux d'énergie rovibrationnels, qui s'appuie sur la diffusion inélastique de la lumière. C'est la spectroscopie Raman.

Lorsque l'on envoie de la lumière sur une molécule, la majeure partie des photons diffusés par celle-ci sont diffusés "élastiquement" : ils possèdent la même énergie que les photons incidents. C'est la diffusion Rayleigh (voir fig. 1.2).

Néanmoins, une partie des photons diffusés possède une fréquence optique différente de celle de la lumière incidente. Ce phénomène, dû à un échange d'énergie entre la lumière et la molécule, est appelé "effet Raman" et a été observé expérimentalement pour la première fois par Raman et Krishnan en 1928 ([2]) et indépendamment par Mandelstam la même année ([3]).

Pour expliquer ce phénomène, on compare une molécule diatomique à un système de deux masses m_1 et m_2 reliées par un ressort. La position d'équilibre de ce système qui est soumis aux forces coulombiennes ainsi qu'à celles de van der Waals est $x = x_0$. On assimile le mode vibrationnel de la molécule au mode de résonance de l'oscillateur

1.1. L'EFFET RAMAN

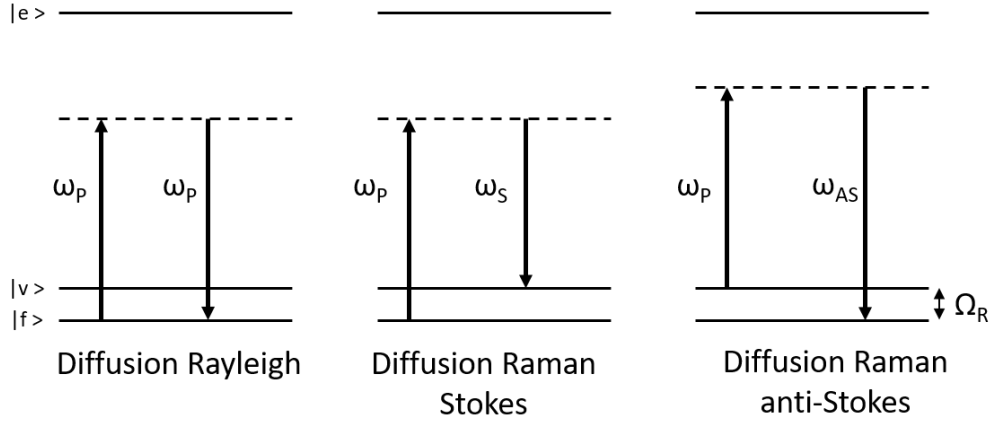


FIGURE 1.2 – Diagrammes de Jablonski des processus de diffusions Rayleigh et Raman spontanée

harmonique à la fréquence Ω_R . On considère également que la polarisabilité de la molécule, la capacité de son nuage électronique à se déformer lorsqu'on applique un champ magnétique, dépend de la distance internucléaire x . Cette distance oscille temporellement à sa fréquence propre de vibration : $x(t) = x_f \cos(\Omega_R t)$. Lorsque l'amplitude des oscillations x_f est faible, on peut appliquer un développement de Taylor autour de la position d'équilibre, ce qui nous donne :

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta x} \right)_0 x(t). \quad (1.2)$$

Lorsqu'on applique un champ électrique $E(t) = E_0 \cos(\omega_P t)$, un moment dipolaire est induit dans la molécule :

$$\vec{p} = \epsilon_0 \alpha(t) \vec{E}(t). \quad (1.3)$$

En remplaçant 1.2 dans 1.3 on obtient :

$$\begin{aligned} p(t) &= \epsilon_0 \left[\alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta x} \right)_0 x_f \cos(\Omega_R t) \right] E_0 \cos(\omega_P t) \\ &= \epsilon_0 \alpha_0 E_0 \cos(\omega_P t) \\ &+ \frac{\epsilon_0 (\delta\alpha/\delta x)_0 E_0 x_f}{2} \cos[(\omega_P - \Omega_R)t] \\ &+ \frac{\epsilon_0 (\delta\alpha/\delta x)_0 E_0 x_f}{2} \cos[(\omega_P + \Omega_R)t] \end{aligned} \quad (1.4)$$

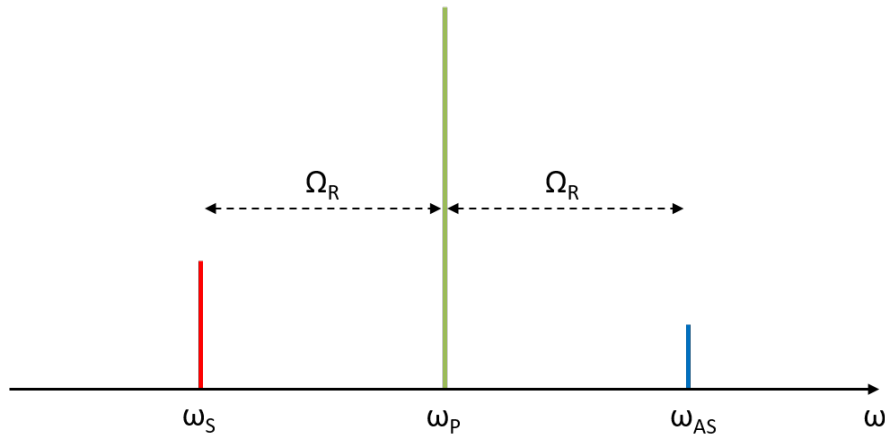


FIGURE 1.3 – Spectre Raman d’une molécule possédant un seul mode de vibration à Ω_R . Le processus Stokes étant plus probable, la raie Stokes est plus intense.

On obtient ainsi trois termes. Le premier décrit la diffusion Rayleigh. Les deux autres termes décrivent respectivement la diffusion Raman Stokes et anti-Stokes. Lors du processus Stokes, les photons diffusés sont décalés vers le rouge : il y a création d’un phonon lorsque la molécule passe de son état fondamental à un niveau vibrationnel (voir fig. 1.2). Inversement, lors du processus anti-Stokes, les photons émis sont décalés vers le bleu : le photon diffusé absorbe un phonon lors du passage de la molécule de son état vibrationnel à son état fondamental (voir fig. 1.2) ([4]) On a ainsi des photons diffusés de trois longueurs d’onde différentes séparées en fréquence par Ω_R (voir fig. 1.3) On s’aperçoit également qu’expérimentalement, l’amplitude de la raie Stokes est supérieure à celle de la raie anti-Stokes. Cela est dû à la différence de population entre le niveau fondamental et le niveau vibrationnel en raison de la distribution de Boltzmann.

En réalité, les diffusions Stokes, et à fortiori anti-Stokes, ont toutes deux une très faible efficacité. En effet, les sections efficaces Raman se situent autour de 10^{-30}cm^2 , c’est-à-dire 10^{14} fois plus faibles que celles de fluorescence par exemple. Les temps d’acquisition d’images en microscopie Raman spontanée sont, de ce fait, élevés. Cela peut prendre jusqu’à plusieurs dizaines de minutes pour une image, ce qui limite grandement les applications possibles grâce à ce type de microscopie.

1.2 La microscopie Raman cohérente

1.2.1 La susceptibilité non linéaire

L'optique non linéaire décrit le comportement de la lumière à l'intérieur d'un milieu dans lequel la polarisation diélectrique ne répond plus linéairement au champ électrique de la lumière. On introduit donc les susceptibilités linéaire et non linéaire pour donner une description macroscopique des phénomènes non linéaires. L'expression générale de la polarisation non linéaire P est donnée par :

$$P = \epsilon_0(\chi^{(1)}E + \chi^{(2)}EE + \chi^{(3)}EEE + \dots) \quad (1.5)$$

où E est le champ électrique incident, ϵ_0 la permittivité du vide et $\chi^{(n)}$ le tenseur de susceptibilité non linéaire d'ordre n . En optique linéaire, le terme d'ordre 1 est très grand devant les autres termes qui sont négligés. Mais dans certains cas, par exemple lorsque le champ électrique est très intense, les termes d'ordres plus élevés doivent être pris en compte. Ces champs intenses (supérieurs à 10^{11}V.m^{-1}) sont en particulier obtenus en utilisant des impulsions lasers ultra-brèves.

1.2.2 La diffusion Raman cohérente

La diffusion Raman cohérente est une méthode qui permet de dépasser les limitations de la diffusion Raman spontanée du fait de son efficacité beaucoup plus importante. En effet le signal Raman cohérent est environ 10^7 fois plus fort que le signal Raman spontané ([4]).

Contrairement à la diffusion spontanée, dans le cadre de la diffusion Raman cohérente, deux faisceaux cohérents de longueurs d'onde différentes sont concentrés sur l'échantillon. Ces deux ondes nommées pompe et Stokes, de fréquences ω_P et ω_S , vont interférer et créer un battement à la fréquence $\Omega = \omega_P - \omega_S$. Lorsque cette différence de fréquence devient égale à la fréquence de résonance de la molécule, $\Omega = \Omega_R$, alors le mode de vibration de la liaison est amplifié. De plus, toutes les liaisons excitées dans le volume focal vont vibrer en phase, ce qui va amplifier la génération du champ de diffusion. Les processus mis en évidence par la diffusion Raman cohérente sont au nombre de quatre, et vont générer des photons à quatre fréquences différentes : (voir fig. 1.4)

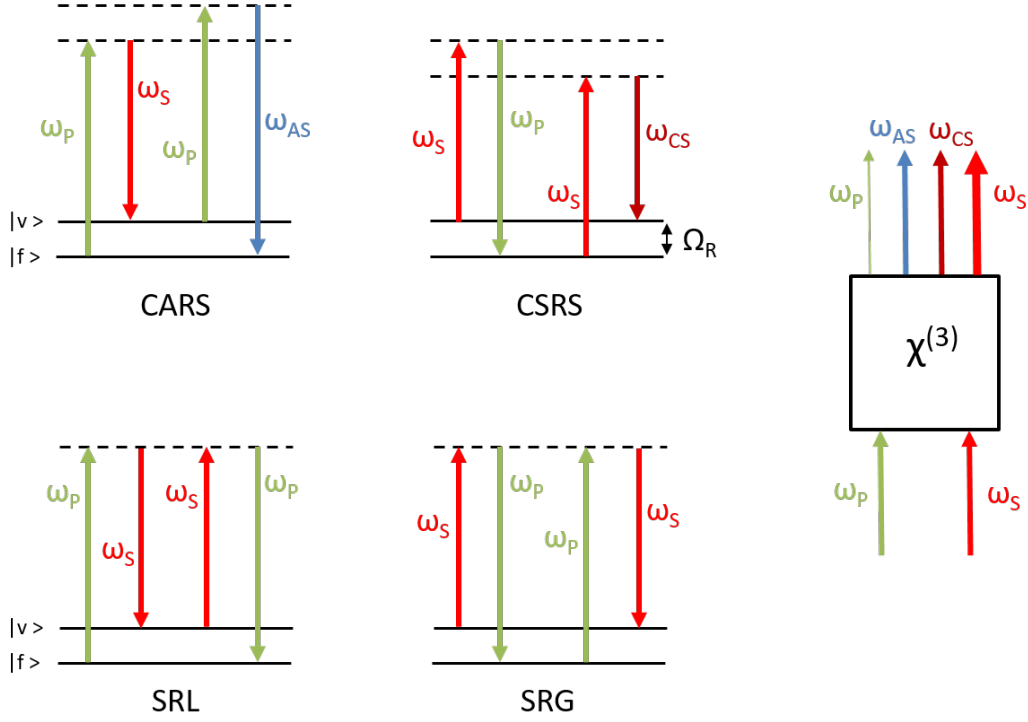


FIGURE 1.4 – Diagrammes d’énergie des quatre processus de diffusion Raman cohérente

- $\omega_P + \Omega_R = 2\omega_P - \omega_S = \omega_{AS}$,
- $\omega_P - \Omega_R = \omega_S$,
- $\omega_S + \Omega_R = \omega_P$,
- $\omega_S - \Omega_R = 2\omega_S - \omega_P = \omega_{CS}$,

Le premier processus appelé Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS) sera détaillé dans la suite. Les deuxième et troisième processus sont respectivement appelés Stimulated Raman Gain (SRG) et Stimulated Raman Loss (SRL). Ils produisent des photons aux longueurs d’onde pompe et Stokes qui vont interférer avec les photons incidents. Enfin le dernier processus est appelé Coherent Stokes Raman Scattering (CSRS), mais son émission se situant dans le domaine de l’infrarouge, il est plus difficile à détecter en raison de la sensibilité des détecteurs, et nous ne nous y intéresserons pas.

1.2.3 Le processus CARS

Le processus CARS fut observé pour la première fois en 1965 par Maker et Terhune ([5]). C’est un processus de mélange à quatre ondes (“four wave mixing” (FWM) en

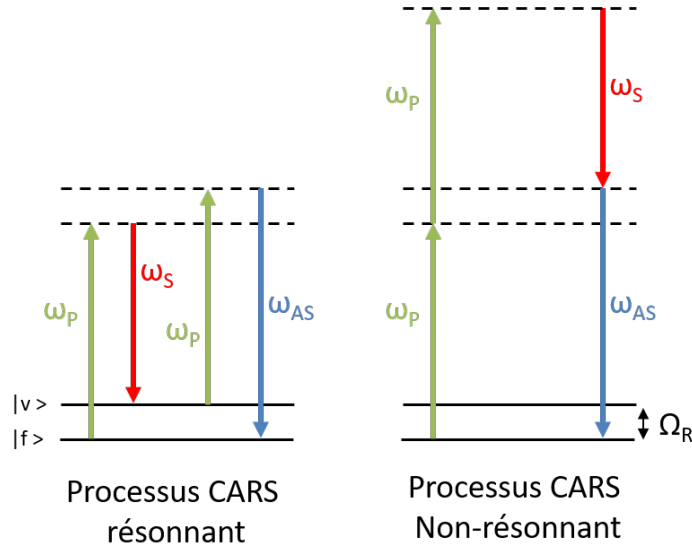


FIGURE 1.5 – Diagrammes d'énergie des contributions résonnante et non résonnante du processus CARS.

anglais) mettant en jeu la susceptibilité électronique d'ordre 3, $\chi^{(3)}$. Le signal CARS est produit par l'interaction des faisceaux pompe et Stokes avec le milieu, comme détaillé sur la figure 1.5. Il est amplifié quand la différence de fréquence entre les faisceaux pompe et Stokes est égale à l'énergie de résonance vibrationnelle de la molécule Ω_R . C'est en changeant la différence d'énergie entre les faisceaux incidents qu'il est possible de sonder le spectre vibrationnel de la molécule.

La génération de l'onde anti-Stokes est donnée par la polarisation non linéaire induite à la fréquence $\omega_{AS} = 2\omega_P - \omega_S$ ([6]) :

$$P(\omega_{AS}) = 3\epsilon_0\chi_{AS}^{(3)}(\omega_{AS})E_P^2E_S^*e^{-ik_{AS}z} \quad (1.6)$$

où E_P et E_S sont les amplitudes des champs pompe et Stokes, et k_{AS} le vecteur d'onde du champ anti-Stokes. Après propagation dans un milieu de longueur L , l'intensité du signal anti-Stokes est donnée par ([6]) :

$$I_{AS}(L) \propto |\chi^{(3)}(\omega_{AS})|^2 I_P^2 I_S \text{sinc}^2\left(\frac{\delta k L}{2}\right) \quad (1.7)$$

avec $\delta\vec{k} = 2\vec{k}_P - \vec{k}_S - \vec{k}_{AS}$. On peut ainsi voir que l'intensité du signal anti-Stokes est proportionnelle à la puissance du faisceau Stokes mais augmente quadratiquement

avec celle du faisceau pompe. De plus, l'intensité sera maximale lorsque $\delta \vec{k} = 0$. C'est la "condition d'accord de phase", qui assure que tout au long de la propagation les champs anti-Stokes émis soient en phase et interfèrent constructivement. Expérimentalement, lorsqu'on utilise des objectifs de focalisation à grande ouverture numérique, les ondes pompe et Stokes arrivent sur l'échantillon suivant plusieurs incidences et la condition d'accord de phase est relaxée.

Contribution non-résonnante du processus CARS

En 1972, après une étude approfondie du phénomène, Levenson et Bloembergen observèrent que lorsque la différence de fréquence $\Omega = \omega_P - \omega_S$ était différente de Ω_R , il y avait toujours génération d'un signal anti-Stokes à la fréquence ω_{AS} ([7]). Ce signal est appelé "CARS non-résonnant" et est émis lors d'un processus de FWM différent de celui du "CARS résonnant" (voir fig. 1.5), qui n'interagit pas avec les modes vibrationnels de la molécule.

La susceptibilité non-linéaire peut alors être décomposée en une partie résonnante et une partie non-résonnante :

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)} \quad (1.8)$$

avec $\chi_{NR}^{(3)}$ pouvant être considérée comme réelle et constante car ne faisant pas intervenir de résonnance ([8] [9]). On peut donc réécrire l'intensité en tenant compte de cette relation :

$$\begin{aligned} I_{AS} &\propto \left| \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)} \right|^2 \\ &\propto \left| \chi_R^{(3)} \right|^2 + \left| \chi_{NR}^{(3)} \right|^2 + 2 \operatorname{Re} \left[\chi_R^{(3)} \chi_{NR}^{(3)*} \right] \\ &\propto \left| \chi_R^{(3)} \right|^2 + \left| \chi_{NR}^{(3)} \right|^2 + 2 \chi_{NR}^{(3)} \operatorname{Re} \left[\chi_R^{(3)} \right]. \end{aligned} \quad (1.9)$$

Ainsi l'intensité du signal CARS provient de la somme des trois contributions différentes de la susceptibilité non linéaire :

- le terme résonnant, qui contient l'information spectrale du mode vibrationnel, et qui peut être associé au pic Raman,

- le terme non résonnant, qui est indépendant de la fréquence,
- le terme d'interférence proportionnelle à la partie réelle de $\chi_R^{(3)}$.

En modélisant la liaison moléculaire par un oscillateur harmonique soumis aux forces des champs électriques incidents pompe et Stokes, et en couplant l'expression de l'amplitude de vibration x avec celle de la polarisation non linéaire anti-Stokes P_{AS} , on peut établir une expression de la susceptibilité non linéaire résonnante $\chi_R^{(3)}$ ([6]) :

$$\chi_R = \frac{a}{(\Omega - \Omega_R) + i\gamma} \quad (1.10)$$

Avec $a = -(2N\epsilon_0/6m\Omega_R)(\delta\alpha/\delta x)_0^2$, où N est la densité de molécules et m la masse réduite $m = m_1m_2/(m_1 + m_2)$.

La figure 1.6 présente les comportements des trois termes de l'intensité, ainsi que l'intensité CARS totale en fonction du décalage à la résonance Raman $\Omega - \Omega_R$. Le terme d'interférence est responsable de la distortion du spectre CARS par rapport au spectre Raman. En effet le maximum d'intensité est décalé vers le bleu, et un creu apparaît à la suite du pic. Le spectre CARS, contrairement au spectre Raman, est donc asymétrique, et le pic de résonance ne se situe pas à Ω_R .

Pourtant le processus CARS reste un outil spectroscopique performant; il apporte

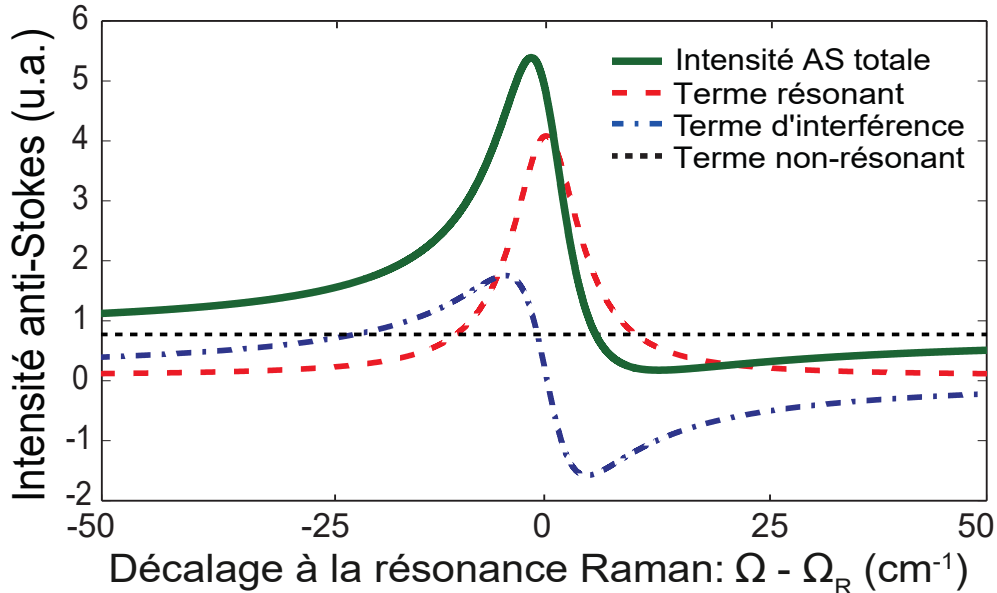


FIGURE 1.6 – Intensité théorique du signal CARS (signal anti-Stokes AS). Détail des contributions des termes résonnant, non résonnant, et du terme d'interférence.

les mêmes informations que la spectroscopie Raman mais avec une quantité de signal bien plus importante due au caractère cohérent du processus. Ainsi la réduction considérable des temps d'acquisition permet d'utiliser cette technique pour des applications en microscopie.

L'effet non résonnant intervient également dans le cadre de l'imagerie CARS, dans laquelle seul un mode de vibration est sondé. Le signal CARS non résonnant nuit à l'acquisition d'un signal résonnant en ajoutant un bruit de fond plus ou moins intense selon le milieu, et exclut la possibilité d'une étude quantitative par microscopie CARS. Plusieurs méthodes ont néanmoins été développées afin de s'affranchir ou de réduire considérablement le fond non résonnant du processus CARS. Nous décrivons brièvement dans la suite quelques-unes des méthodes les plus utilisées.

La méthode polarimétrique (P-CARS) repose sur la propriété de dépolarisation de la lumière diffusée par les vibrations moléculaires et le fait que les tenseurs $\chi_R^{(3)}$ et $\chi_{NR}^{(3)}$ agissent sur le rayonnement anti-Stokes de façon différente. Cette méthode a été développée en spectroscopie CARS en 1976 par Song et al. ([10]) et appliquée à la microscopie CARS par Cheng et al. en 2002 ([11]). Dans la pratique, un angle est appliqué entre les polarisations linéaires des faisceaux pompe et Stokes, ce qui agit sur les polarisations des champs anti-Stokes résonnant et non résonnant. Un analyseur placé après l'objectif de collection permet de bloquer le signal non résonnant.

La méthode hétérodyne, ou interférométrique, s'appuie sur le déphasage entre les champs anti-Stokes résonnant et non résonnant induit par la résonance vibrationnelle. Lorsque le signal anti-Stokes est mêlé à un champ extérieur oscillant cohérent de même longueur d'onde, il est possible de remonter aux parties réelle et imaginaire du champ CARS, en modulant la phase entre le signal anti-Stokes et le champ oscillant. Cette méthode a d'abord été introduite pour la spectroscopie CARS en 1980 ([12] [13]), puis en microscopie CARS à l'aide d'un oscillateur local généré hors de l'échantillon ([14] [15] [16] [17]).

La méthode temporelle, ou T-CARS, introduite en 1980 en spectroscopie ([18]) fut adaptée à la microscopie par Volkmer et al. ([19]). Les processus CARS résonnant et non résonnant ont un temps de décohérence différent en raison de leur origine physique différente. Le principe de cette méthode est d'appliquer un délai temporel entre l'impulsion sonde et les impulsions pompe et Stokes, à la fois supérieur au temps de

cohérence du processus non résonnant et inférieur à celui du processus résonnant. La contribution non résonnante est ainsi fortement atténuée.

La méthode basée sur l'accord de phase permet de réduire le fond non résonnant provenant du volume entourant des petits objets dont on désire faire l'étude. Dans un milieu peu diffusant, la condition d'accord de phase n'est pas respectée dans la direction de réflexion (vers l'arrière), sauf pour des objets de taille inférieure à la longueur d'onde selon l'axe optique ([20] [21]). Il est donc possible de détecter le signal CARS résonnant provenant de ces petits objets en collection arrière sans détecter la contribution non résonnante du milieu environnant. On peut noter que dans des milieux fortement diffusants, la contribution non résonnante est rétro-diffusée et cette méthode n'est plus valable. Il est également possible d'atténuer le signal non résonnant pour l'observation de petits objets en filtrant le signal CARS dans la direction de transmission, en détectant seulement les hautes fréquences spatiales grâce à une géométrie de collection annulaire ([22] [23]).

Nous décrivons dans la partie suivante le processus SRS (pour "Stimulated Raman Scattering") qui permet de sonder les modes vibrationnels Raman sans fond non résonnant.

1.2.4 Le processus SRS

Les processus Stimulated Raman Gain (SRG) et Stimulated Raman Loss (SRL) (voir 1.2.2) sont habituellement regroupés sous le nom Stimulated Raman Scattering (SRS) et ont été observés pour la première fois en 1692 par Woodbury et Ng ([24]), mais n'ont pas été identifiés. L'origine de ce rayonnement fut vérifiée expérimentalement par Eckhardt et Woodbury quelques mois plus tard ([25]). Cette technique permet, au même titre que CARS, de cibler une signature Raman vibrationnelle. Cependant, en raison de son caractère cohérent, elle permet, comme CARS, d'obtenir un signal beaucoup plus intense que le Raman spontané.

Le processus SRS est basé sur la détection d'une variation d'intensité dans le faisceau pompe ou Stokes après interaction avec un milieu. A l'instar du processus CARS, on peut exprimer les termes de la polarisation non linéaire associés aux processus SRL et SRG en fonction de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois correspondante ([6]) :

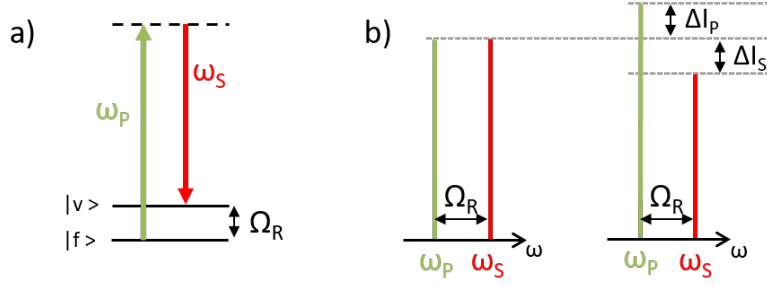


FIGURE 1.7 – a) Diagramme d'énergie du processus SRS. b) Représentation dans le domaine spectral du transfert d'énergie dû au processus SRS. L'amplitude du faisceau Stokes est augmentée, tandis que l'amplitude du faisceau pompe est déplétée.

$$P(\omega_P) = 6\epsilon_0\chi_R^{(3)}(\omega_P) |E_S|^2 E_P e^{-ik_P z} \quad (1.11)$$

$$P(\omega_S) = 6\epsilon_0\chi_R^{(3)}(\omega_S) |E_P|^2 E_S e^{-ik_S z} \quad (1.12)$$

Les polarisations générées dans le processus SRS sont aux mêmes fréquences que celles des champs incidents. Les champs électriques non linéaires $E_P^{(3)}$ et $E_S^{(3)}$ induits par ces polarisations vont alors interférer avec les champs électriques incidents et entraîner des variations d'intensité des faisceaux pompes et Stokes ([6]) :

$$I_P^{SRL} \propto |E_P|^2 - 2 |E_P E_P^{(3)}| \quad (1.13)$$

$$I_S^{SRG} \propto |E_S|^2 + 2 |E_S E_S^{(3)}| \quad (1.14)$$

On voit ainsi que le faisceau pompe subit une déplétion, c'est le SRL, alors qu'un gain est appliqué à l'intensité du faisceau Stokes, c'est le SRG.

On peut également schématiser le processus SRS par un transfert de photons, donc d'énergie, d'un faisceau à l'autre (voir fig. 1.7). Le mécanisme en jeu est quasiment le même que pour la diffusion Raman spontanée, mais cette fois-ci la désexcitation à partir du niveau virtuel se fait de manière stimulée. On a donc une perte d'énergie dans le faisceau pompe et un gain dans le faisceau Stokes.

On peut montrer que le signal SRS est proportionnel à la partie imaginaire de la susceptibilité non linéaire $Im(\chi^{(3)})$ ([26]), et est exempt de la contribution non réson-

nante du processus non linéaire, contenue dans la partie réelle de $\chi^{(3)}$. L'absence de fond non résonnant constitue un avantage fondamental par rapport au processus CARS, notamment en imagerie, et implique qu'il n'y ait pas de décalage du pic de résonnance par rapport au spectre Raman.

De plus, la susceptibilité non linéaire résonnante $\chi_R^{(3)}$ étant proportionnelle à la densité de molécules résonnantes (1.10), le signal SRS dépend linéairement de la concentration, contrairement au signal CARS, qui en dépend de façon quadratique. Cette propriété permet donc de mener des études quantitatives grâce à la mesure du signal SRS.

1.2.5 La microscopie Raman cohérente

Les techniques CARS et SRS sont de puissants outils dans le domaine de la microscopie. En effet, couplées à des lasers impulsionnels et des détecteurs performants, la collection du signal CARS et SRS est efficace et la mise en place d'une plate-forme d'imagerie microscopique multimodale est possible. Nous avons vu que les champs incidents mis en jeu devaient être très élevés afin de produire suffisamment de photons pour être détectés. Cette caractéristique fait des processus Raman cohérent des techniques intrinsèquement confocales; en effet, seul le volume focal est source de signal dans l'échantillon. Cette propriété permet d'obtenir une imagerie non linéaire tridimensionnelle lorsque que le point focal est scanné dans l'échantillon. Comme nous l'avons également vu dans la partie précédente, l'efficacité des processus Raman cohérent diminue grandement les temps d'acquisition requis dans les échantillons et contribue de façon essentielle à l'utilisation de ceux-ci pour la microscopie, notamment dans des milieux biologiques. Enfin, ces techniques permettent de cibler n'importe quelle liaison moléculaire présente dans l'échantillon étudié. Elles présentent donc deux avantages : la sélectivité chimique ainsi que la non nécessité de marquage ou traitement du milieu.

La microscopie CARS

La première utilisation de la diffusion Raman cohérente combinée à la microscopie fut menée par Duncan et al. en 1982 ([27]), grâce au développement des sources lasers impulsionnelles ainsi que de l'électronique. Les auteurs ont couplé deux lasers picosecondes dans le visible en configuration non-colinéaire. Mais l'utilisation de lumière visible produisait un fort signal non résonnant. En 1999, en utilisant cette fois des la-

sers dans l'infrarouge proche en configuration colinéaire, et en les focalisant grâce à des objectifs à forte ouverture numérique, Zumbusch et al ([28]) améliorent l'efficacité du microscope CARS de manière significative (en améliorant le rapport signal sur bruit). L'utilisation de l'infrarouge présente l'avantage de limiter l'échauffement et la détérioration des échantillons biologiques et d'augmenter la profondeur de pénétration dans les tissus. Le signal CARS peut être collecté en transmission, à travers l'échantillon, dans le sens de propagation des faisceaux : c'est la détection Forward. La détection du signal CARS en réflexion dans la direction opposée est également possible, c'est la détection Epi ([20] [21]). Elle est très utile lorsque l'échantillon étudié est très diffusant ou trop épais pour être traversé par la lumière.

Comme nous l'avons expliqué en partie 1.2.3, le signal CARS est sujet au bruit non-résonnant, et il est difficile de le distinguer du signal résonnant, particulièrement quand celui-ci est faible. Nous avons décrit précédemment plusieurs méthodes permettant de réduire le fond non résonnant. Elles sont toutes cependant assez lourdes à mettre en œuvre et souvent associées à une perte de signal CARS.

La microscopie SRS

Dans cette thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement à la microscopie SRS, dont le processus ne produit pas de fond non-résonnant. De plus, comme nous l'avons vu en 1.2.4, le spectre SRS n'est pas déformé comme le spectre CARS. Si la spectroscopie SRS a débuté avec des lasers femtosecondes ([29]), Freudiger et al. ([30]), Nandakumar et al. ([31]) et Oseki et al. ([32]) ont proposé un microscope SRS avec des lasers picosecondes, avec un taux de répétition élevé de 80MHz, qui est bien adapté aux applications en biologie du fait des puissances crêtes de moindre intensités et du fort taux de répétition qui permet un balayage rapide.

Nous avons vu que le signal du processus CARS est produit à une longueur d'onde différente de celles des deux lasers pompe et Stokes. Il est donc simple de filtrer spectralement ce signal afin de le mesurer à l'aide de détecteurs. Mais dans le cadre de la microscopie SRS, le signal est produit à la fréquence des lasers, et on ne peut donc pas le mesurer de la même façon. Le principe de détection du signal SRS repose sur la mesure de la variation d'énergie des faisceaux excitateurs : la perte d'énergie du faisceau pompe ΔI_P ou bien le gain d'énergie du faisceau Stokes ΔI_S . Afin de détecter cette variation

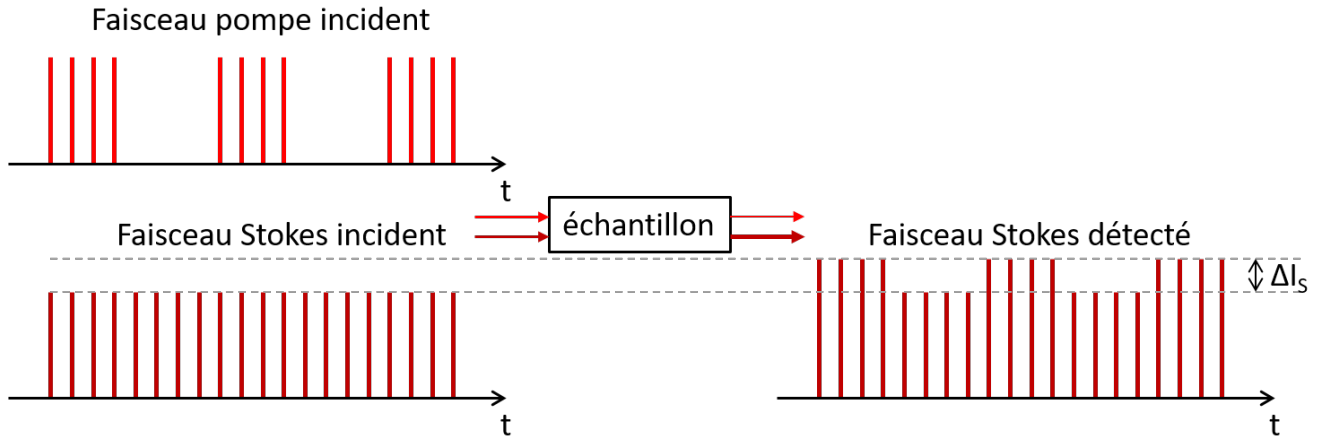


FIGURE 1.8 – Schéma de détection du processus SRS lors de l'interaction entre les faisceaux pompe et Stokes. Dans cet exemple le faisceau pompe est modulé. Les variations d'intensité dues au transfert d'énergie entre les faisceaux sont mesurées grâce à une détection synchrone.

d'énergie, on module l'intensité d'un des faisceaux excitateurs à la fréquence f . De cette façon, l'intensité de l'autre faisceau sera également modulée lorsqu'un mode Raman sera excité. Cette modulation peut être mesurée à l'aide d'une détection synchrone (voir fig. 1.8). De plus, en choisissant une fréquence de modulation f supérieure à 1MHz , le bruit du laser ainsi que le bruit électronique sont considérablement réduits ([30] [31]).

En 2009, Oseki et al. montrent dans une étude que lorsque le bruit du système de détection SRS est limité par le bruit de photon (shot noise), alors la sensibilité est identique à celle de la détection du signal CARS ([32]). De plus, de la même manière que pour la microscopie CARS, le signal SRS peut être acquis dans la direction Forward pour des échantillons fins, mais peut également être détecté en Epi, grâce à un système que nous décrirons plus loin.

Finalement la microscopie SRS est un outil puissant qui permet de s'affranchir du bruit non résonnant d'un échantillon tout en conservant la spécificité chimique et une dépendance linéaire avec la concentration, permettant des applications étendues dans des systèmes biologiques.

1.2.6 Microscopie de fluorescence et de seconde harmonique

Dans le cadre d'études sur des échantillons biologiques dans lequel nous nous plaçons, les informations obtenues grâce au Raman cohérent vont être complétées par des

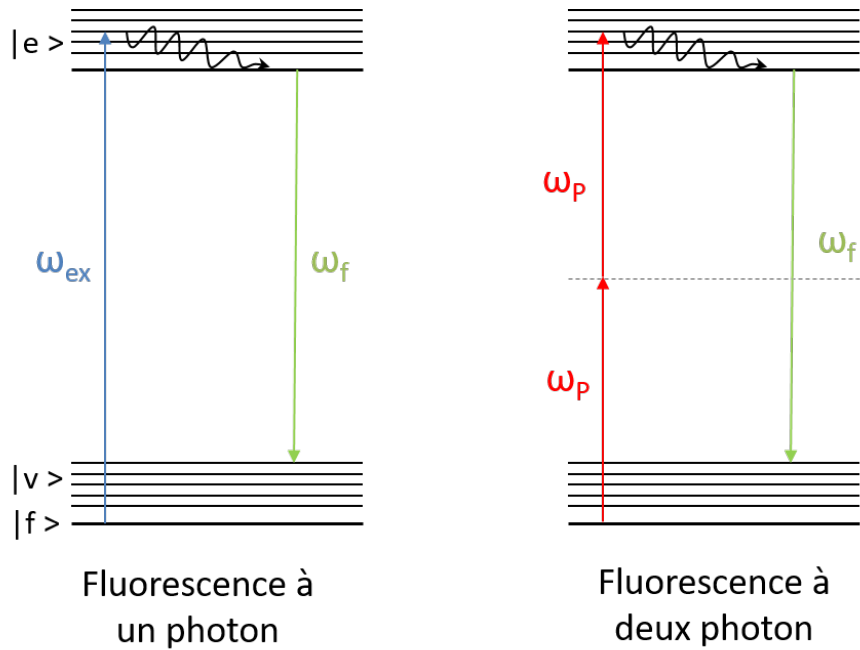


FIGURE 1.9 – Diagrammes d'énergie des processus de fluorescence par absorption d'un et deux photons.

images obtenues avec les contrastes d'auto-fluorescence ainsi que de génération de seconde harmonique. Ce panel de techniques permettra ainsi de réaliser une imagerie dite multimodale et ceci sans aucun marquage.

La microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est la technique la plus utilisée en imagerie biologique. La molécule étudiée est excitée par une lumière incidente, et après absorption de photons, va être désexcitée par relaxation non radiative puis émettre un photon de fluorescence de longueur d'onde inférieure à celle d'excitation ; la fig 1.9 schématise les processus de fluorescence à un et deux photons.

La fluorescence à deux photons, ou “two photons excitation fluorescence” (TPEF) en anglais, est basée sur l'absorption simultanée de deux photons et fut mise en évidence en 1961 par Kaiser et Garret ([33]). Elle possède de nombreux avantages par rapport à la fluorescence monophotonique. Premièrement, les photons impliqués dans la TPEF sont des photons infrarouges. Ils sont moins énergétiques et dégradent peu l'échantillon en comparaison des sources visibles ou ultraviolettes utilisées en fluorescence à un pho-

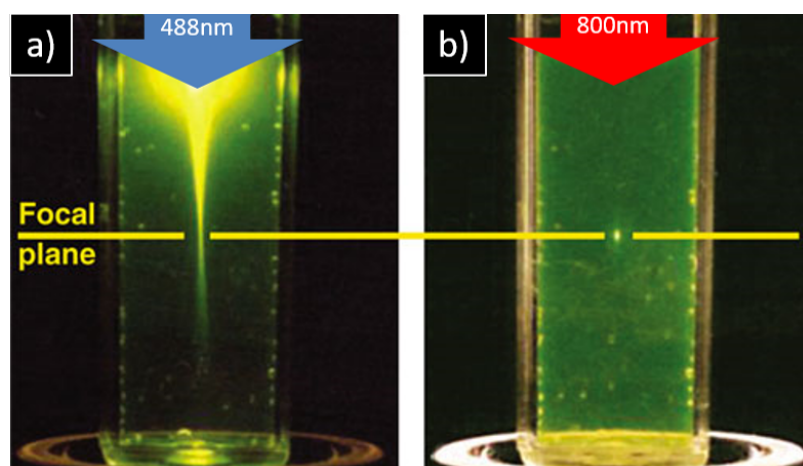


FIGURE 1.10 – Comparaison des fluorescences à un et deux photons (image adaptée de ([34])).

ton. De plus, la profondeur de pénétration dans les tissus biologiques est grandement améliorée.

La TPEF requiert également des densités d'énergies plus élevées en raison de son caractère non linéaire ainsi que l'utilisation de photons d'énergies plus faibles. Ainsi, le processus n'a lieu qu'au point focal, et de la même manière que les processus CARS et SRS, il permet de scanner l'échantillon en trois dimensions grâce à l'utilisation d'un microscope à balayage laser. En comparaison, la fluorescence par absorption d'un seul photon a lieu également hors du plan de focalisation, ce qui réduit la résolution spatiale et entraîne une plus forte détérioration de l'échantillon (voir fig. 1.10).

La microscopie de génération de seconde harmonique

La génération de seconde harmonique, ou “Second Harmonic Generation” (SHG) en anglais est un phénomène non linéaire de doublage de fréquence par une molécule non centrosymétrique. Ce processus a été observé en 1961 par Franken et al. ([35]) et a été utilisé pour l'observation de tissus biologiques pour la première fois en 1971 par Fine et al. ([36]). Il est depuis largement utilisé dans différentes applications, notamment en microscopie.

Le processus de SHG a lieu lorsqu'on applique un champ optique intense sur un milieu qui ne possède pas de centre d'inversion. Une interaction non linéaire a alors lieu et génère des photons au double de la fréquence du faisceau incident (voir fig. 1.11). Ce processus est complémentaire de la TPEF car il utilise les mêmes sources d'excita-

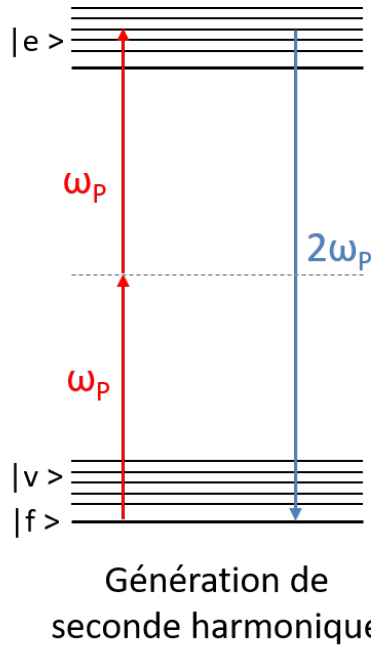


FIGURE 1.11 – Diagramme d'énergie du processus de génération de seconde harmonique.

tion infrarouge, mais contrairement à la fluorescence, il n'y a pas absorption de photon mais diffusion, ce qui implique qu'il n'y a pas de dommages provoqués par l'absorption d'énergie (dans la pratique les endommagements par échauffement persistent à cause d'autres processus d'absorption à un ou à deux photons). De plus, le phénomène étant instantané, les photons émis sont en phase avec le faisceau incident, et vérifient la condition d'accord de phase (similaire à 1.2.3). Enfin, la détection du signal SHG est simple à différencier car il possède exactement le double de la fréquence d'excitation.

La microscopie SHG est donc particulièrement utile pour compléter les outils déjà disponibles pour l'imagerie des tissus biologiques, permettant de mettre en évidence des structures particulières de membranes ou de fibres de collagènes par exemple ([37]).

1.2.7 La microscopie FM-SRS

Bien que, contrairement au signal CARS, le signal SRS ne soit pas bruité par un fond non-résonnant (voir 1.2.4), plusieurs artefacts peuvent influencer sur la mesure et se mêler au "vrai" signal. Les trois principaux effets non linéaires impactant le signal sont la modulation de phase croisée (XPM), l'absorption à deux photons (TPA), et l'effet de lentille thermique (TL). En effet, ces effets n'ayant lieu qu'en la présence des deux faisceaux ex-

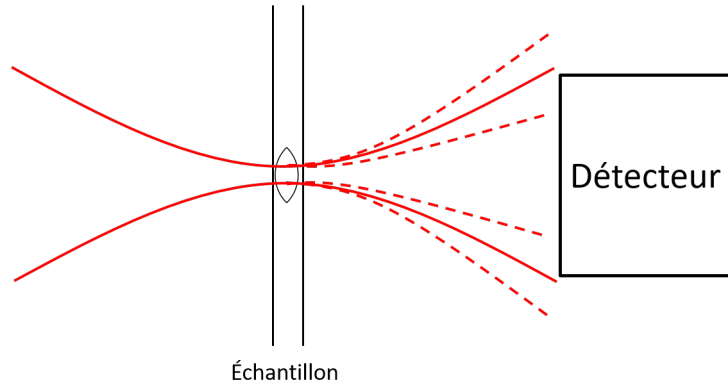


FIGURE 1.12 – Schéma de l'effet de lentille causé par la modification de l'indice optique dans l'échantillon. Lorsque la divergence du faisceau sortant augmente, l'intensité détectée diminue, et inversement. Cette modification de l'intensité est interprétée comme un gain ou une perte de signal par le système de détection.

citateurs, ils ont donc une influence sur la variation de signal mesuré, indiscernable de la variation provoquée par le processus SRS seul.

La modulation de phase croisée est un phénomène non linéaire dépendant de $\chi^{(3)}$ qui modifie l'indice de réfraction par effet Kerr ([4] [38]). Cette variation d'indice est proportionnelle à l'intensité des faisceaux incidents et modifie la divergence de ceux-ci. La quantité de lumière collectée varie à la fréquence de modulation et est donc interprétée comme un gain ou une perte lors de la détection (voir fig. 1.12). L'effet de lentille thermique repose sur le même principe. L'absorption d'une partie de l'énergie des faisceaux incidents provoque un échauffement de l'échantillon et modifie localement l'indice optique, créant, de ce fait, un effet de lentille ([39]). Il modifie ainsi la proportion de faisceaux collectés de la même façon que l'XPM (voir fig. 1.12). Cependant, il est généralement décalé en phase de $\frac{\pi}{4}$ par rapport au XPM du fait des constantes thermiques ([40]).

Enfin, l'absorption à deux photons découle de l'absorption simultanée d'un photon Stokes et d'un photon pompe, qui n'a donc lieu qu'en présence des deux faisceaux. Cela va induire une déplétion du faisceau détecté et créer un offset sur le signal SRS (voir fig. 1.13) ([40] [41]). L'absorption à deux photons est instantanée et arrive en phase avec le XPM.

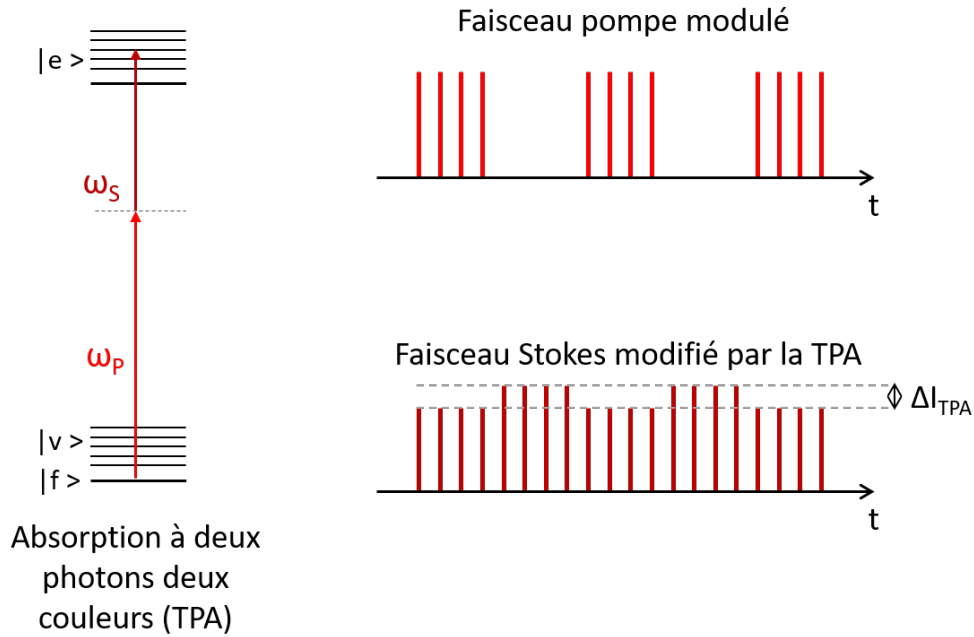


FIGURE 1.13 – Schéma de l'effet de l'absorption à deux photons deux couleurs. L'intensité du faisceaux Stokes diminue en présence du faisceau pompe modulé. Cela induit un décalage sur le signal SRS.

Principe de détection FM-SRS

Dans le but de nous affranchir des artefacts de microscopie SRS (XPM, absorption à deux photons, lentille thermique), nous avons développé une instrumentation basée sur l'utilisation de trois faisceaux lasers picosecondes. Dans cette configuration, un laser à 1031,2nm est utilisé comme faisceau Stokes dans le processus SRS. Deux autres faisceaux générés dans des oscillateurs paramétriques optiques (OPO) pompés à 515,6nm (laser à 1031,2nm doublé en fréquence) sont utilisés comme faisceaux pompes, nous les nommons “pompe 1” et “pompe 2” dans la suite. Nous pouvons régler leur longueur d'onde entre 700nm et 1000nm environ.

Le principe de cette méthode est de réaliser une modulation en fréquence du signal SRS en mettant en place une alternance des deux faisceaux pompes à différentes longueurs d'onde. Pour ce faire, les intensités des faisceaux pompe 1 et pompe 2 sont modulées en opposition de phase temporelle, comme présenté sur la figure 1.14. Lorsque l'intensité du faisceau pompe 1 est au maximum, l'intensité du faisceau pompe 2 est nulle, et inversement. Un processus SRS va être généré alternativement par chacune des

1.2. LA MICROSCOPIE RAMAN COHÉRENTE

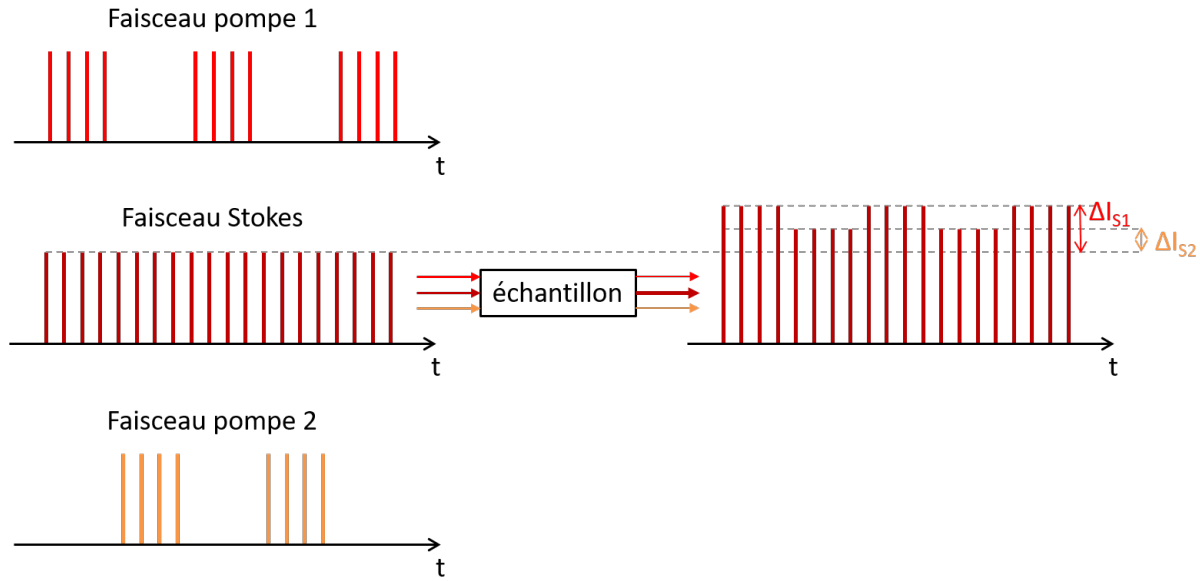


FIGURE 1.14 – Schéma de principe de la configuration FM-SRS. Les deux faisceaux pompes sont modulés temporellement en opposition de phase. Le signal SRS mesuré par la détection synchrone est donc égal à $\Delta I_{FM} = \Delta I_{S1} - \Delta I_{S2}$.

combinaisons pompe-Stokes dans l'échantillon, ce qui va entraîner une déplétion des faisceaux pompes, ainsi qu'une amplification du faisceau Stokes. ΔI_{S1} représente le signal SRS engendré par l'interaction pompe1-Stokes, alors que ΔI_{S2} représente le signal SRS engendré par l'interaction pompe2-Stokes. La figure 1.15 présente les diagrammes d'énergies correspondants à ces deux interactions, chacune permettant de sonder un niveau vibrationnel différent. De la même manière que pour la microscopie SRS, nous utilisons une détection synchrone afin de mesurer les variations d'intensité du faisceau Stokes. L'amplitude de ces variations dépend de l'intensité relative des deux processus SRS générés, et le signal mesuré est $\Delta I_{FM} = \Delta I_{S1} - \Delta I_{S2}$. Cette méthode permet donc de mesurer la différence d'intensité de deux pics de résonance Raman. Il est intéressant de noter que pour deux processus SRS ayant la même intensité $\Delta I_{S1} = \Delta I_{S2}$ et donc le signal mesuré est nul.

Cette méthode de détection est appelée FM-SRS pour "Frequency Modulated Stimulated Raman Scattering", et se rapproche de la microscopie SRGOLD mise en œuvre par P. Berto au cours de sa thèse ([6]), basée sur l'utilisation de trois faisceaux lasers grâce à l'exploitation du faisceau Idler de l'OPO. La différence fondamentale entre FM-SRS et

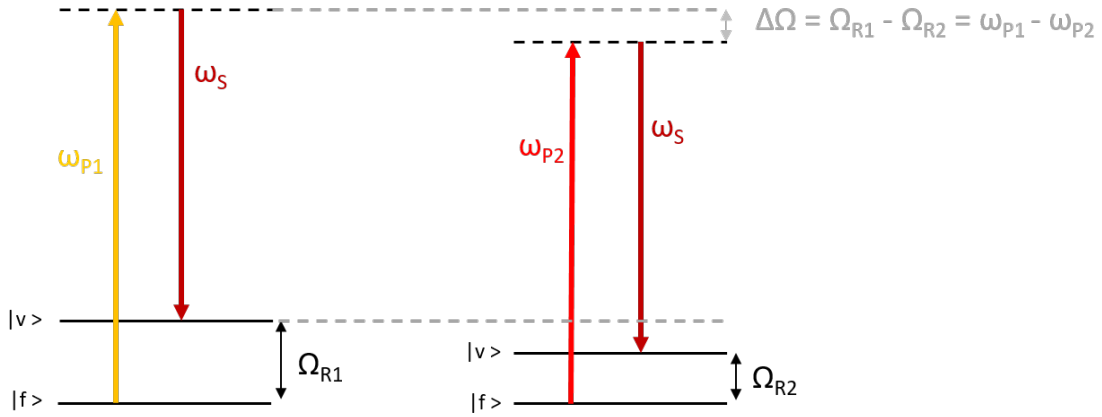


FIGURE 1.15 – Diagrammes d'énergie des processus SRS dans le cadre de la méthode FM-SRS. Deux énergies vibrationnelles différentes sont ciblées par les deux lasers pompes.

SRGLOD réside dans le fait que la longueur d'onde du faisceau Idler est directement reliée à la longueur d'onde du faisceau “principal” de l'OPO. Dans notre modalité FM-SRS les longueurs d'onde, et donc les modes de vibrations sondés, sont totalement libres. Une étude théorique a également été publiée en 2012 par Popov et al. ([42]) et compare la microscopie SRS par modulation d'amplitude (AM-SRS) à la microscopie SRS par modulation de fréquence, établissant que seule la modulation de fréquence s'affranchit de tous les artefacts de microscopie. En effet, dans le processus SRS, ceux-ci ont pour origine l'éclairement discontinu de l'échantillon par le faisceau modulé. Dans la modalité FM-SRS, lorsque les intensités des faisceaux pompe 1 et pompe 2 sont égales, l'éclairement sur l'échantillon est constant, et les effets non linéaires d'XPM, de lentille thermique, ainsi que TPA sont annulés.

Enfin, l'utilisation de deux OPOs rend la modalité FM-SRS très polyvalente. Il est possible d'accorder les deux fréquences pompe de manière à mesurer la différence de signal SRS entre deux points donnés du spectre Raman d'un échantillon. En conséquence, on peut faire des études ratiométriques entre deux raies Raman (cette méthode sera détaillée au chapitre 2), ou bien étudier une résonnance isolée et s'affranchir de tout fond non résonnant : on se place alors à la fois à la résonnance et hors résonnance, dans le but de faire la différence entre le maximum et le minimum de la raie Raman. Cette méthode fera l'objet du chapitre 3. La figure 1.16 illustre l'exemple de l'étude du glycérol deutéré. Le pic principal du spectre SRS correspond à l'énergie vibration-

1.3. MONTAGE EXPÉRIMENTAL

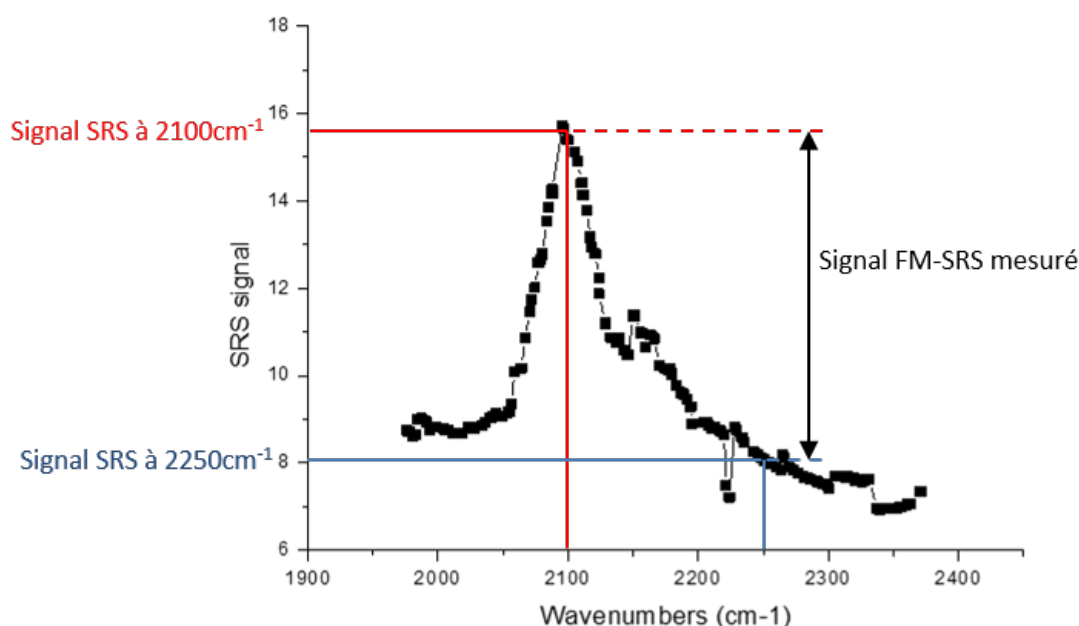


FIGURE 1.16 – Spectre SRS de glycérol deutéré pur. Le pic de résonnance de la liaison C-D se situe à 2100 cm^{-1} .

nelle de la liaison moléculaire carbone-deutérium (C-D) à 2100cm^{-1} . Il est possible de se placer en résonnance à 2100cm^{-1} avec le faisceau pompe 1 et hors résonnance à 2250cm^{-1} avec le faisceau pompe 2, afin de mesurer la différence de signal entre les deux processus SRS. Nous nous affranchissons ainsi de tout signal parasite.

La microscopie FM-SRS présente donc une amélioration importante, notamment pour des applications biologiques, où le fort signal non résonnant ainsi que la diffusion importante du milieu ne permettent pas une utilisation optimale des techniques CARS et SRS seules. Nous verrons plus en détails dans les chapitres 2 et 3 les améliorations apportées par cette méthode dans le cadre de différentes applications.

1.3 Montage expérimental

Dans cette partie nous allons décrire le montage expérimental de microscopie multimodale entièrement conçu et utilisé au cours de cette thèse.

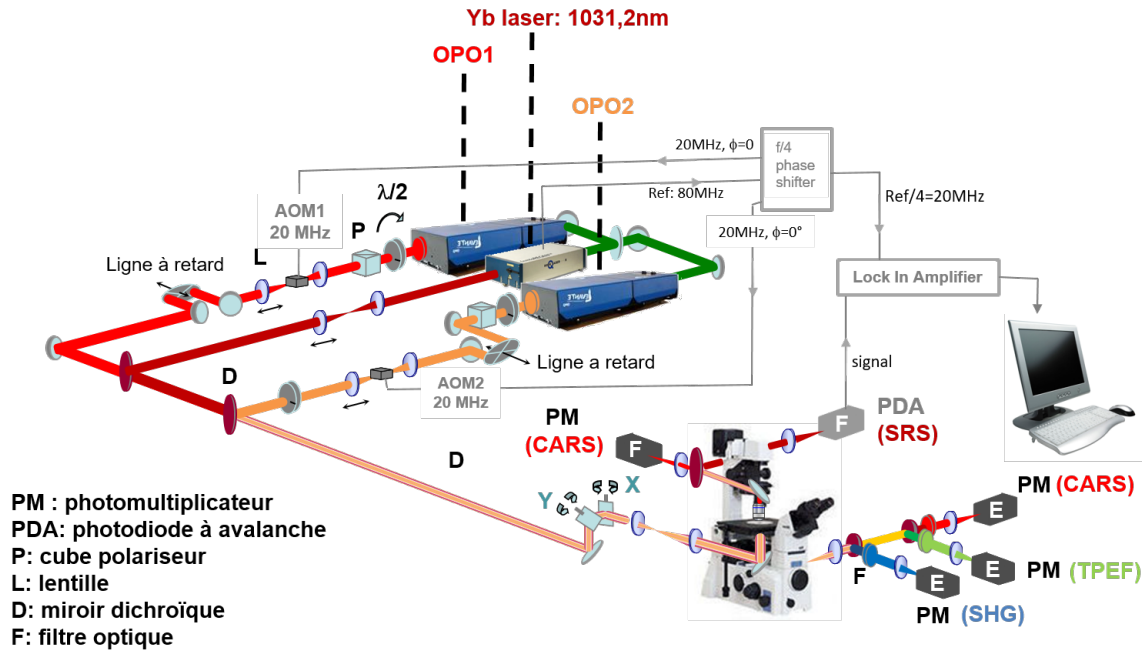


FIGURE 1.17 – Schéma du montage optique multimodal.

1.3.1 Montage optique

La figure 1.17 décrit schématiquement les éléments constituant le montage optique, le microscope, ainsi que le système de détection. Un laser fibré Ytterbium ((Emerald Engine) fourni des impulsions d'une durée de deux picosecondes avec un taux de répétition de 80MHz. Il délivre un faisceau à 1031,2nm de puissance 1W ainsi qu'un faisceau doublé en fréquence à 515,6nm de puissance 7W permettant le pompage optique de deux Oscillateurs Paramétriques Optique (OPO). Un miroir semi-réfléchissant permet d'envoyer 3.5W en entrée de chacun des deux OPOs. Un OPO utilise un cristal non linéaire, ici du triborate de lithium (LBO), afin de convertir un rayonnement pompe de fréquence ω_P en deux rayonnements "Signal" et "Idler" complémentaires de fréquences accordables ω_S et ω_{Id} telles que $\omega_P = \omega_S + \omega_{Id}$. Pour chacun des OPOs, nous utilisons un seul des deux rayonnements émis (le faisceau dit Signal) que nous nommons "faisceau OPO1" et "faisceau OPO2" dans la suite. Ceux-ci sont accordables en longueur d'onde entre 700nm et 1000nm environ. La puissance en sortie de chaque OPO varie entre 700 et 900mW selon la longueur d'onde.

Une lame demi-onde couplée à un analyseur est disposée en sortie de chaque OPO afin de contrôler à la fois la puissance et la polarisation de sortie. Les faisceaux sont

1.3. MONTAGE EXPÉRIMENTAL

ensuite focalisés dans des modulateurs acousto-optiques (AOM) (AA opto electronic, MT250 A0-5-800). Un modulateur acousto-optique est composé d'un oscillateur piézo-électrique relié à un matériau (par exemple du verre ou un cristal de quartz), dans lequel il va créer des ondes sonores par vibration. Ces ondes sonores vont créer des zones de compression et de dilatation qui vont changer localement l'indice de réfraction du milieu et créer un réseau de diffraction. Les AOMs sont alignés de façon à transmettre environ 80% de la puissance du faisceau dans l'ordre 1 de diffraction, qui est utilisé pour la suite de l'alignement. Un signal de modulation à une fréquence de 20MHz est envoyé par un diviseur de fréquence à l'AOM, entraînant l'émission de l'onde acoustique et l'apparition du réseau de diffraction de façon périodique.

Dans les faits, deux impulsions lasers sont transmises toutes les quatre impulsions. La puissance est ainsi divisée par deux et la périodicité du signal passe de 80MHz à 20 MHz.

Alignement des AOMs

Le bon alignement des AOMs est essentiel. Premièrement, la focalisation à l'intérieur du cristal doit être optimale, afin que la taille du faisceau à l'intérieur du réseau de diffraction soit minimale. Lorsque ce n'est pas le cas, la modulation n'est pas homogène sur l'ensemble du front d'onde, ce qui réduit le signal SRS. Deuxièmement, l'efficacité de diffraction sur l'ordre 1 doit être maximale afin de ne pas perdre de puissance laser inutilement. Enfin, la stabilité de l'AOM doit être élevée, car la modulation est extrêmement sensible aux mouvements, même de très faible amplitude.

Il est également important de régler la phase temporelle du signal de modulation de sorte que la "porte temporelle" entraîne une modulation propre du signal, c'est-à-dire que les impulsions transmises ne soient pas altérées. Nous utilisons pour cela une photo-diode ultra-rapide nous permettant de détecter les impulsions séparément, et une interface informatique nous permet de régler la phase délivrée par le diviseur de fréquence pour afficher une modulation franche des impulsions lumineuses. La figure 1.18 montre le signal obtenu lors de la mesure des impulsions lumineuses après modulation pour deux phases différentes. Pour un choix "idéal" les impulsions transmises sont identiques et l'intensité des impulsions "coupées" est quasi nulle. Pour une phase mal choisie, la modulation n'est pas nette, trois impulsions d'intensités différentes sont transmises par l'AOM.

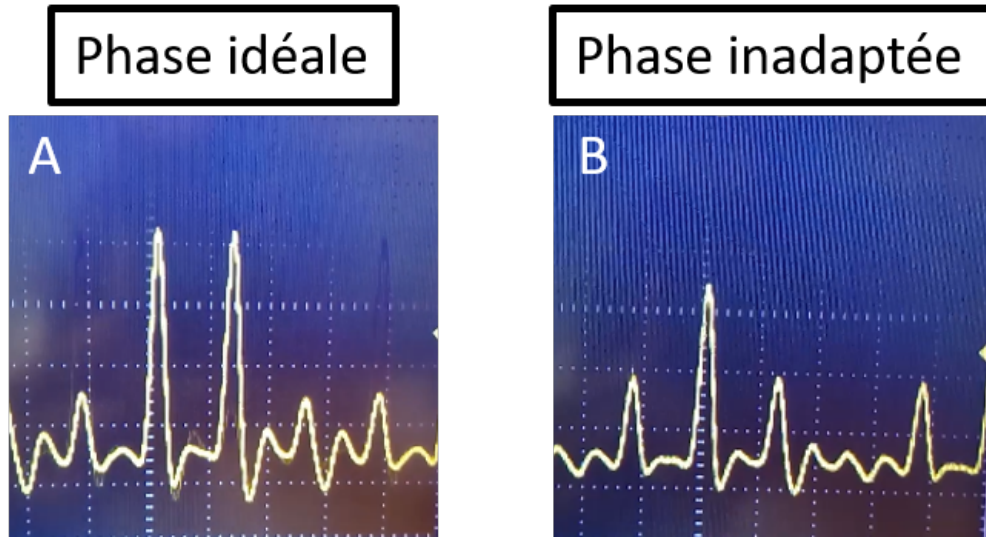


FIGURE 1.18 – Mesure des impulsions d'un faisceau modulé vu à l'oscilloscope. A) Modulation idéale lorsque la phase est bien ajustée. B) Modulation obtenue pour un mauvais choix de phase.

Le faisceau divergent diffracté dans l'ordre 1 est ensuite recollimaté puis dirigé vers une ligne à retard, composée d'un catadioptré positionné sur un rail linéaire. Celle-ci permet de modifier finement la longueur du trajet optique sur une distance de quelques dizaines de centimètres. Comme nous l'avons décrit précédemment, la génération des processus CARS et SRS met en jeu plusieurs photons de longueurs d'onde différentes, ce qui implique que les impulsions lasers provenant de faisceaux différents doivent être parfaitement synchronisées dans le temps et dans l'espace sur l'échantillon. Il est donc essentiel que les trajets optiques des différents faisceaux mis en jeu soient strictement identiques. De plus, le rail de la ligne à retard doit être parfaitement parallèle au faisceau incident afin de ne pas modifier l'alignement de celui-ci lors du réglage.

Ensuite, les faisceaux OPO1 et OPO2 passent chacun à travers un télescope. Ces télescopes nous permettent d'ajuster la divergence des faisceaux afin de maximiser leur recouvrement spatial sur l'échantillon. Nous ajustons les télescopes directement grâce à l'optimisation du signal CARS sur un échantillon d'huile donnant un fort signal.

Le faisceau à 1031,2nm issu du laser fibré Ytterbium n'étant pas modulé, son chemin optique est simplement constitué d'un télescope permettant de contrôler la divergence et conserver un faisceau collimaté.

Les trois faisceaux OPO1, OPO2, et 1031,2nm sont ensuite recombinaés grâce à des

1.3. MONTAGE EXPÉRIMENTAL

miroirs dichroïques avant d'être dirigés vers la partie microscopie du montage. Les faisceaux OPO1 et OPO2 sont d'abord recombinaisonnés entre eux par le biais de miroirs dichroïques accordables angulairement (Semrock, Versachrome[®]). Comme nous le détaillerons dans la suite, nous ciblons des énergies de vibration différentes selon les échantillons étudiés, et nous utilisons des longueurs d'onde différentes pour les faisceaux OPO1 et OPO2. Ainsi, nous avons mis en place un système de supports aimantés pour les miroirs dichroïques afin de pouvoir rapidement remplacer les miroirs de recombinaisonnés en fonction des longueurs d'onde utilisées. Une fois que les faisceaux OPO1 et OPO2 sont superposés, un miroir dichroïque passe-bas à 950nm permet de les recombinaisonner avec le faisceau à 1031,2nm.

1.3.2 Microscope

La partie microscope du montage s'articule autour d'un corps de microscope commercial Nikon Eclipse Ti-U. L'ensemble des faisceaux est d'abord dirigé vers un couple de miroirs galvanométriques (6200H, Cambridge Technology) d'une surface d'environ 0,5cm². Ces miroirs sont reliés à l'ordinateur par un tableau servomoteur et vont permettre de parcourir l'échantillon très rapidement afin d'acquérir des images. Un télescope permet de faire l'image de ces miroirs sur la pupille de l'objectif de focalisation (Nikon x40 à immersion dans l'eau, ouverture numérique 1,15) afin d'optimiser la surface d'éclairement sur celui-ci. Cet objectif est placé sur un nanopositionneur (Pifoc PI) contrôlé par l'ordinateur permettant de régler la hauteur de l'objectif de manière très précise sur une plage de 200 μ m, afin de contrôler la profondeur du point focal à l'intérieur de l'échantillon.

L'échantillon est lui-même placé sur une platine de translation motorisée contrôlée par ordinateur (Marzhauser Wetzlar Scan 1M 120 * 100), permettant de déplacer l'échantillon dans les directions x et y sur plusieurs centimètres.

Un miroir dichroïque est situé en amont de l'objectif de focalisation, permettant de réfléchir les faisceaux excitateurs OPO1, OPO2, et à 1031,2nm vers l'échantillon, et transmettre les rayonnements de TPEF, SHG, et CARS, réfléchis au niveau de l'échantillon, vers la détection Epi. Dans le cadre de nos expériences, la longueur d'onde des faisceaux OPO1 et OPO2 varie d'environ 790nm à 850nm, et les longueurs d'onde des signaux non linéaires détectés sont comprises entre 395nm et 720nm approximative-

ment. Nous utilisons donc un miroir dichroïque passe-bas à 750nm.

Les faisceaux excitateurs ainsi que les signaux non linéaires émis en direction Forward sont collectés par un objectif de collection (Nikon Fluor x60 à immersion dans l'eau, distance de travail 2mm, ouverture numérique 1). Un télescope placé après l'objectif permet de recollimater les faisceaux et de les envoyer vers la partie détection Forward.

1.3.3 Détection des signaux

La partie détection du montage est divisée en trois parties : la détection des signaux CARS, SHG, et TPEF en réflexion et en transmission, et la détection synchrone SRS. Elles sont représentées schématiquement sur la figure 1.17.

La détection Epi est composée de trois détecteurs de type compteurs de photons. Le signal non linéaire transmis par le miroir dichroïque passe par un filtre passe-bas à 750nm afin de bloquer toute la lumière résiduelle des lasers. Ensuite un miroir dichroïque passe-haut à 450nm réfléchit le signal SHG (émis autour de 400nm) qui est filtré optiquement puis collecté avec un détecteur Hamamatsu H10582-01. Un miroir dichroïque passe-haut à 600nm permet de réfléchir le signal de fluorescence filtré et collecté par un détecteur Hamamatsu H10582-01. Le signal CARS est, quant à lui, collecté par un détecteur Hamamatsu H7421-50 ultra-sensible optimisé pour le proche infra-rouge.

En direction Forward une seule ligne de détection est installée, pouvant mesurer le signal SHG, TPEF ou CARS selon le besoin, en changeant les filtres optiques utilisés.

Les signaux mesurés sont récupérés par une carte d'acquisition National Instrument multifonction (USB X Series). La durée minimale entre deux acquisitions est de $2\mu s$ lorsque plusieurs voies de détection sont utilisées. L'interface avec l'utilisateur se fait par un programme Lab-View développé par Patrick Ferrand ([43]), permettant de configurer les caractéristiques techniques telles que le temps d'acquisition par pixel ainsi que la résolution des images, et d'automatiser les mesures de spectres et de scans en trois dimensions.

Détection synchrone

La détection du signal SRS s'appuie sur un système conçu par APE GmbH pour notre montage expérimental, constitué d'une photodiode APE optimisée pour 1031,2nm et d'un amplificateur à détection synchrone à 20 MHz. Le rayonnement transmis à travers l'échantillon est filtré spectralement pour garder le faisceau à 1031,2nm qui est envoyé sur la photodiode reliée à l'amplificateur. Celui-ci reçoit un signal de référence provenant directement du taux de répétition des lasers mais divisé en fréquence d'un facteur 4 (passant de 80MHz à 20MHz), afin d'extraire l'amplitude de modulation à 20MHz. Un logiciel d'interface avec la détection synchrone permet de régler la phase électronique de référence et ainsi optimiser la détection du signal SRS.

Dans le cadre de la modalité FM-SRS, il est essentiel que les modulations des deux faisceaux pompes soient en parfaite opposition de phase temporelle. Ce déphasage est mesuré grâce à une photodiode ultra-rapide permettant d'afficher les impulsions sur l'oscilloscope, et ainsi vérifier que l'alternance entre les impulsions pompe 1 et pompe 2 est idéale. Lorsque ce n'est pas le cas, l'ajustement est réalisé en changeant la longueur des câbles coaxiaux apportant le signal de modulation aux AOMs. En effet, le diviseur de fréquence n'est pas équipé d'un réglage de phase temporelle entre les modulations qu'il délivre. Il serait possible d'ajuster ce déphasage en déplaçant physiquement les AOMs sur la table optique mais cette solution serait trop lourde expérimentalement.

1.4 Conclusion

Dans cette partie nous avons détaillé les outils théoriques permettant de comprendre la résonance vibrationnelle et l'origine des processus non-linéaires, et comment retirer de l'information de leur observation. Nous nous intéressons particulièrement dans ce travail aux processus de TPEF, SHG, CARS et SRS. Ils sont particulièrement pertinents dans le cadre de la microscopie, car aucun marquage spécifique n'est requis, et le sectionnement spatial inhérent à ces contrastes fournit un outil puissant pour l'observation des tissus biologiques.

Nous avons décrit le montage expérimental multimodal complexe développé tout au long de cette thèse dans le but de rendre compte du travail de développement qui a été réalisé en parallèle des résultats présentés dans la suite. Les chapitres 2 et 3 présentent

les travaux effectués dans deux domaines applicatifs distincts, donnant un aperçu de la polyvalence de la microscopie non linéaire pour l'imagerie des tissus.

Chapitre 2

Application à l'étude du système digestif humain

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à l'utilisation des contrastes non linéaires dans le domaine médical, plus précisément pour la détection du cancer dans le système digestif humain. Ce projet se place dans le cadre d'une collaboration avec le groupe d'endoscopistes de Marc Giovannini à l'institut Paoli Calmette à Marseille, spécialisé en cancérologie.

2.1 Contexte de l'étude et motivations

2.1.1 Histologie et histopathologie

L'histologie désigne l'étude des tissus biologiques. Son but est de mieux connaître la structure des tissus et comprendre leur fonctionnement. Elle se fait principalement à l'aide d'un microscope sur des prélèvements pouvant provenir de toute partie du corps.

Le principe de l'histopathologie est d'identifier des anomalies et de reconnaître une pathologie grâce aux informations recueillies par l'histologie. Elle est pratiquée par un anatomopathologiste qui va établir un diagnostic à partir d'échantillons préparés.

Dans le cadre du système digestif, la préparation histologique utilisée habituellement est le traitement HES (pour Hématoxyline, Eosine, et Safran). Cette technique est composée de plusieurs étapes (fig. 2.1) et peut durer plusieurs heures, jours ou même semaines pour de gros échantillons. En effet, la fixation dans le formol, indispensable,

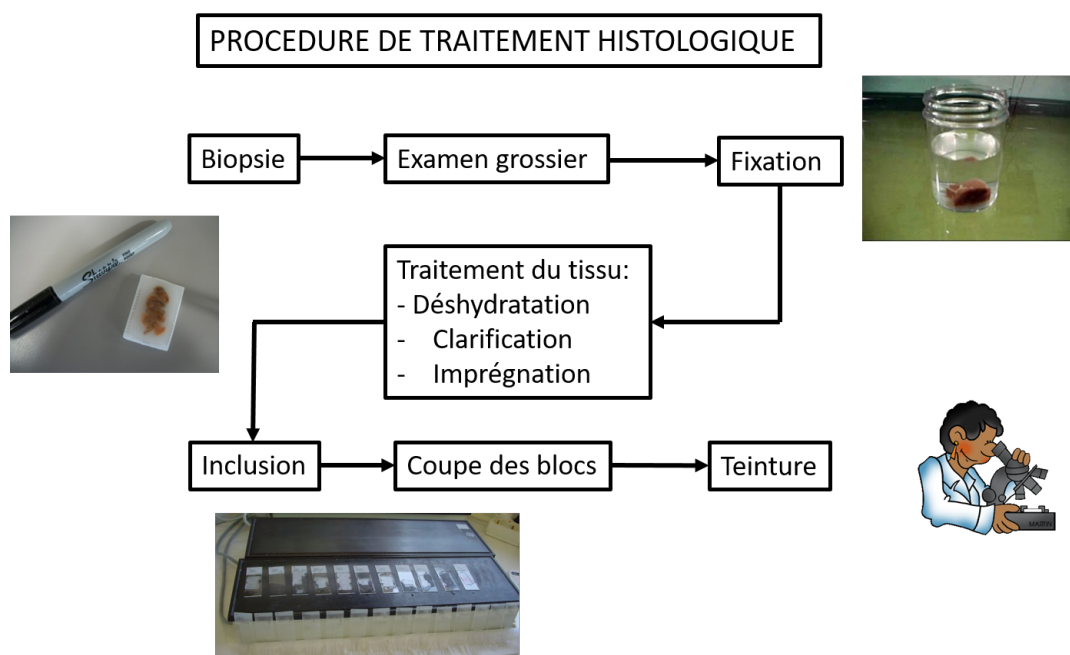


FIGURE 2.1 – Schéma récapitulatif de la procédure de traitement hitologique.

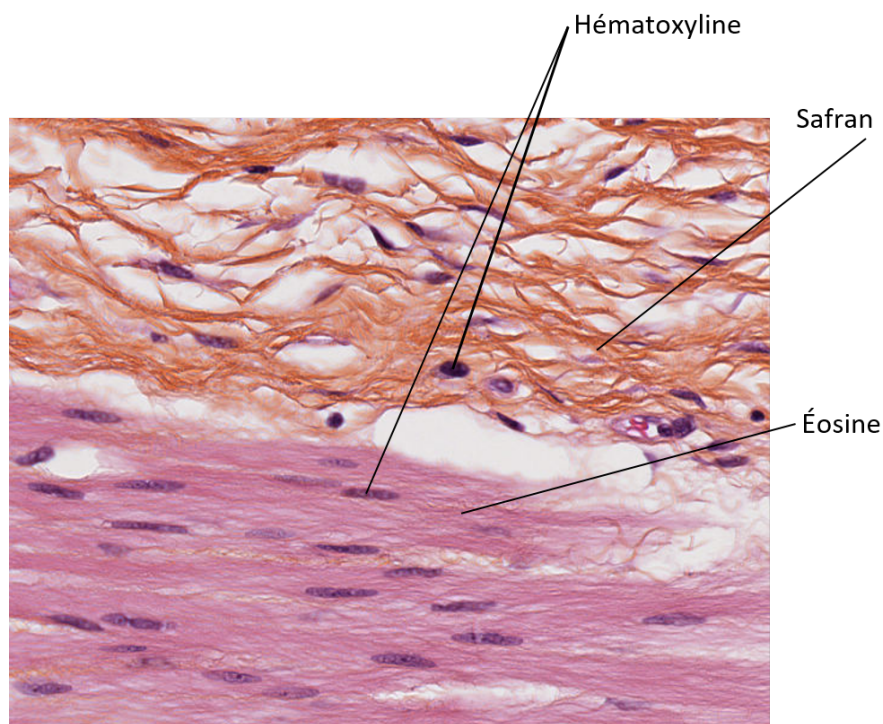


FIGURE 2.2 – Exemple d'image histologique obtenue en teinture HES. Les noyaux sont teintés en violet avec l'hématoxyline, le cytoplasme et les fibres musculaires sont teintés en rose par l'éosine, et le collagène et les tissus conjonctifs sont teintés en orange par le safran.

2.1. CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET MOTIVATIONS

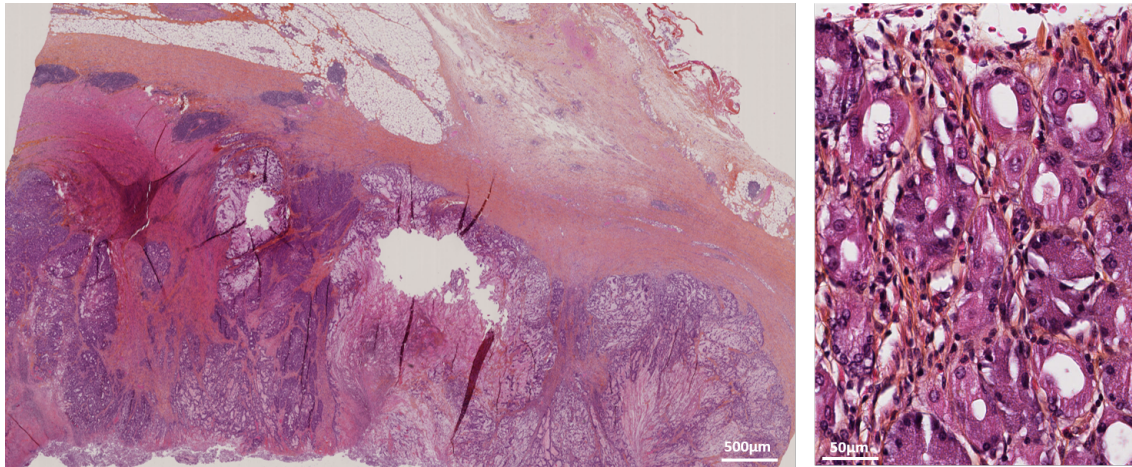


FIGURE 2.3 – Exemple d'image histologique obtenue en fin de traitement HES. La taille de l'image de gauche est de 4x6mm. L'image de droite montre une zone de 300x400µm afin d'apprécier la résolution

est l'étape la plus longue de ce processus et le temps nécessaire est proportionnel à la taille de l'échantillon. Cette technique porte le nom des trois colorants utilisés pour teinter l'échantillon. Chacun de ces colorants va mettre en évidence un des éléments composant le tissu (Fig. 2.2) : l'hématoxyline permet de colorer les noyaux cellulaires en violet, l'éosine colore le cytoplasme et les fibres musculaires en rose, et enfin le safran fait apparaître le collagène et les tissus conjonctifs en orange. Les échantillons sont ensuite observés au microscope par l'anatomopathologiste qui a donc accès à la composition de l'échantillon ainsi qu'à sa structure avec une résolution de l'ordre du micromètre. Les informations subcellulaires telles que les noyaux et le cytoplasme sont fondamentales pour l'étude de l'échantillon, et le diagnostic ne peut être réalisé sans ces données essentielles. La figure 2.3 présente un exemple d'image obtenue par ce procédé. La taille des images obtenues (plusieurs millimètres) permet également d'avoir accès à la structure macroscopique qui est un élément clé dans le diagnostic du cancer.

2.1.2 La microscopie non linéaire pour l'histologie

Depuis plusieurs années, l'imagerie non linéaire connaît un élan dans son application au domaine biomédical([34]), notamment pour l'histologie. En effet les multiples possibilités ouvertes par les différents contrastes font de la microscopie multiphotonique un outil puissant pour l'imagerie des tissus biologiques.

En 2003, Zipfel et al. ([44]) ont obtenu des images de qualité histologique dans des tissus non marqués pour la première fois en utilisant la génération de seconde harmonique combinée à de l'auto-fluorescence à deux et trois photons. Ils ont pu visualiser la morphologie des tissus et le métabolisme des cellules, permettant de faire état de l'avancement de maladies telles que le cancer ou la maladie d'Alzheimer. D'autres applications ont été faites notamment sur la détection du cancer, avec des études sur l'angiogénèse ([45]), sur la migration cellulaire dans les tumeurs ([46]), ou encore l'étude de l'organisation du collagène autour des tumeurs dans le cadre du cancer du sein ([47]).

La microscopie multiphotonique présente également l'avantage de nécessiter un temps d'acquisition de l'ordre de la minute, très court en comparaison des délais requis pour les traitements histologique classiques. Cela permet ainsi d'adapter ces technologies à une application endoscopique comme l'ont fait par exemple Williams et al. en 2010 ([48]).

Pourtant les contrastes non linéaires SHG et TPEF utilisés sont incapables de faire apparaître les noyaux cellulaires, qui constituent une information essentielle en histologie. C'est l'utilisation récente de processus multiphotoniques Raman cohérent qui a fortement contribué au développement de l'imagerie microscopique pour l'histologie, en apportant la possibilité de mettre en évidence les noyaux dans les tissus biologiques. En 2013, Ji et al. ([49]) ont utilisé la microscopie SRS pour imager des tumeurs au cerveau *in vivo* chez des souris. Ils ont réalisé des images du cerveau en microscopie SRS durant la chirurgie et détecté des marges cancéreuses indétectables avec les méthodes habituelles utilisées en opération, en utilisant les signatures vibrationnelles des lipides et des protéines. D'autres travaux ont rapidement suivi, démontrant la possibilité d'obtenir l'image de l'ADN ([50]), et permettant de révéler la présence de tumeurs dans des échantillons de cerveau humain avec un très bon accord par rapport aux résultats d'histologie HES ([51] [52]). En 2017 Orringer et al. ont réussi à obtenir des images SRS en salle opératoire grâce à un système transportable contenant un microscope et des lasers fibrés ([53]).

Dans cette thèse nous avons mis en application ces techniques de microscopie multiphotonique dans le cadre de l'étude des tissus gastro-intestinaux humains. L'imagerie Raman cohérent CARS et SRS constitue un enjeu majeur dans certaines situations où

2.1. CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET MOTIVATIONS

un gain de temps peut sauver des vies. Par exemple, lors d'une intervention chirurgicale dans le péritoine, la détection d'une métastase péritonéale entraîne l'arrêt immédiat de l'opération et un traitement de chimiothérapie chez le patient, sous peine d'entraîner un décès probable en cas de prolongement de l'opération (dans un cas de non détection). L'imagerie Raman cohérent rapide pourrait être un outil clé pour sonder la cavité péritoine durant une opération.

D'une manière plus générale, la possibilité d'imager en temps réel les muqueuses digestives pourrait réduire considérablement le nombre et la durée d'opération. Une intervention nécessite habituellement le prélèvement d'une biopsie puis un traitement histologique, conduisant parfois à une opération plusieurs jours plus tard. Un diagnostic immédiat durant une endoscopie pourrait réduire le temps entre les deux opérations.

Nous développerons dans ce chapitre comment nous avons utilisé la microscopie non linéaire pour imager le système digestif humain, puis comment nous nous sommes intéressé à la caractérisation du cancer dans des échantillons non marqués, en particulier grâce à l'imagerie SRS. Enfin, nous présenterons le développement d'une nouvelle technique de détection SRS modulée en fréquence permettant d'améliorer la vitesse d'acquisition des images Raman cohérentes.

Caractérisation des signaux non linéaires

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, les différents contrastes non linéaires permettent d'obtenir des informations structurales et moléculaires sur les échantillons biologiques.

La génération de seconde harmonique permet de visualiser les protéines de collagène, non centrosymétriques, qui jouent un rôle important dans l'architecture des tissus. C'est également un des principaux éléments mis en évidence par l'histologie classique.

La fluorescence à deux photons (TPEF) nous permet quant à elle d'identifier une grande partie des protéines, notamment les protéines membranaires et cytoplasmiques. Elle donne ainsi accès à la structure globale de l'échantillon.

Les processus CARS et SRS peuvent quant à eux être accordés à une certaine vibration correspondant à une espèce chimique à identifier. Nous détaillerons dans ce chapitre une utilisation du contraste CARS pour cibler les lipides, puis une utilisation des processus CARS et SRS nous permettant d'obtenir l'image des protéines membranaires

ainsi que celle des noyaux cellulaires.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Échantillons et système digestif

Dans le cadre de la collaboration avec l'équipe d'endoscopistes de l'institut Paoli Calmette, les échantillons étudiés proviennent du système digestif humain. Nous avons pu travailler sur différents types d'échantillons :

- Des biopsies non marquées fixées dans le formol dans lesquelles nous avons prélevé des coupes d'environ 1mm d'épaisseur que nous avons ensuite montées entre deux lamelles. Ces échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur pendant plusieurs semaines.
- Des coupes non marquées fixées dans le formol, séchées selon le même processus que pour le traitement HES, montées entre lame et lamelle, adjacentes à des coupes recevant le traitement histologique HES. Ces coupes ont une épaisseur de 10 à 30 μm et sont gardées à -20°C, elles ne sont utilisées qu'une seule fois.
- Des coupes cryogénisées non fixées, non marquées, montées entre lame et lamelle, cette fois encore adjacentes à des coupes recevant le traitement HES. Elles ont une épaisseur de 10 à 30 μm . Ces coupes sont gardées à -80°C et ne sont utilisées qu'une seule fois. La majorité des résultats présentés dans ce chapitre ont été acquis sur ce type d'échantillon.

Structure du système digestif

L'appareil digestif humain est composé de plusieurs éléments agencés pour la plupart de façon linéaire (fig. 2.4a). Il a pour fonction de faire transiter les aliments ingérés à travers différents compartiments qui vont transformer cette nourriture en nutriments puis rejeter le contenu inutilisé. La majorité des éléments du système digestif possèdent une structure en strates détaillée en figure 2.4b. Cette structure commune nous permet de travailler de la même façon sur des échantillons provenant de diverses parties du tube digestif.

Le diagnostic étant basé sur une reconnaissance visuelle par l'anatomopathologiste, il est essentiel d'être capable d'identifier ces strates dans l'échantillon étudié.

2.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

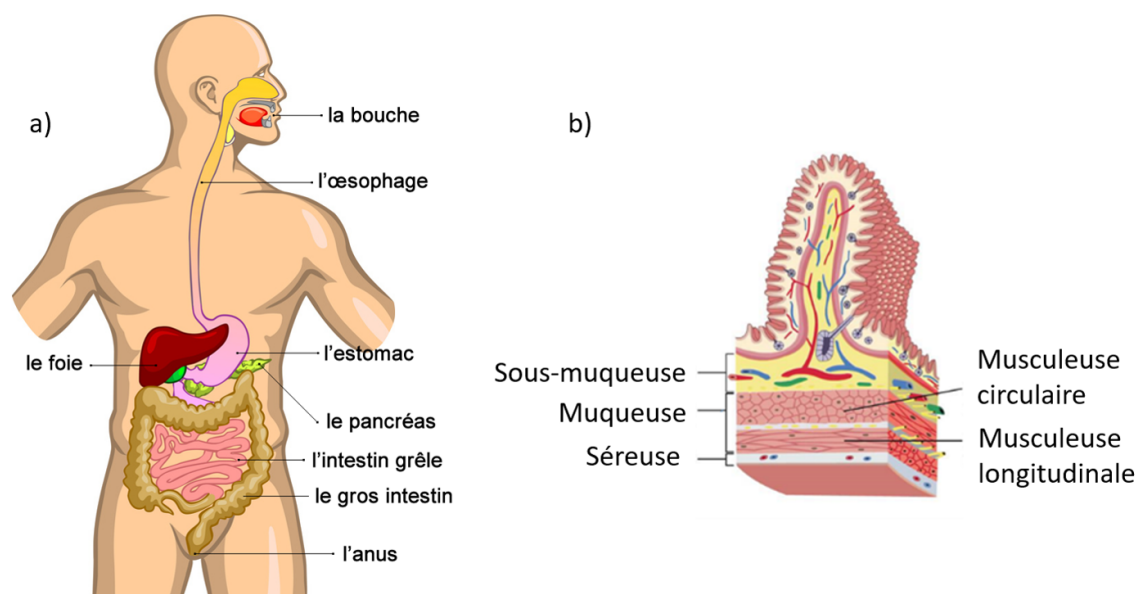


FIGURE 2.4 – a) Schéma du système digestif humain. b) Schéma de la structure en couches de la paroi du tube digestif.

2.2.2 Microscopie non linéaire multimodale

Pour imager les différents échantillons dont nous disposons, nous avons utilisé le montage expérimental décrit en 1.3. Pour générer les signaux CARS et SRS, le faisceau Stokes est fixé à 1031,2nm. Les faisceaux pompes issus des OPOs sont réglés à 797,3nm et 792nm. Cela nous permet de cibler respectivement les liaisons CH_2 dans les molécules lipidiques à 2845cm^{-1} et les liaisons CH_3 dans les protéines à 2930cm^{-1} ([50]). La figure 2.5 présente les spectres SRS de l'albumine de sérum bovin (en bleu) correspondant au signal des protéines, et de l'acide oléique (en vert) correspondant au signal des lipides. Les signaux CARS ainsi générés à 650nm et 643nm sont filtrés à l'aide d'un filtre passe-bande et envoyés sur un détecteur.

Le processus d'auto-fluorescence à deux photons (TPEF) va être engendré à la fois par le faisceau Stokes et les faisceaux pompes. Le signal généré se situe entre 500nm et 600nm. Le signal est réfléchi à l'aide d'un miroir dichroïque et filtré par un filtre passe-bande, puis détecté par un compteur de photons.

Enfin le signal SHG est principalement généré par les faisceaux à 797,3nm et 792nm, et se situe donc entre 395nm et 400nm. Il est également détecté par un compteur de

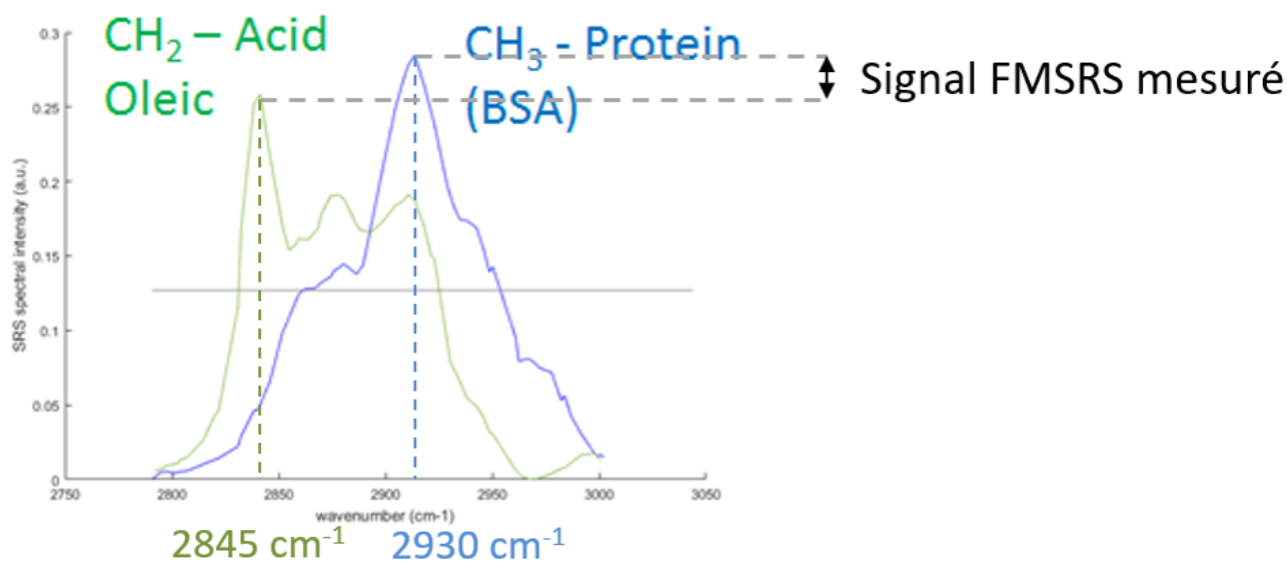


FIGURE 2.5 – En bleu le spectre SRS de la protéine d’albumine de sérum bovin (BSA). Le pic le plus fort à 2930cm^{-1} correspond à l’énergie de vibration des liaisons CH_3 . En vert le spectre d’acide oléique, un acide gras. Le pic de plus forte intensité à 2845cm^{-1} correspond à l’énergie de vibration des liaisons CH_2 .

photons.

La puissance de chacun des faisceaux est réglée entre 50 et 100mW en entrée du microscope. Le taux de transmission entre l’entrée du microscope et l’échantillon a été mesuré à environ 60%, ce qui correspond à la transmission de l’objectif Nikon x40 à immersion dans l’eau, d’ouverture numérique 1,15 que nous utilisons. Cela correspond à une puissance totale d’environ 60 à 120mW au point focal dans l’échantillon. De plus, l’utilisation de faisceaux infrarouges permet de limiter l’échauffement et la photo-dégradation du tissu étudié.

Des miroirs galvanométriques nous permettent de déplacer le point focal dans un plan, de profondeur fixée, à l’intérieur de l’échantillon et d’imager un champ de $100 \times 100 \mu\text{m}$. Une platine de translation permet quant à elle de réaliser une mosaïque d’images de 100×100 micromètres adjacentes et rend possible l’agrandissement du champ d’image-rie jusqu’à plusieurs millimètres.

En raison de leur variation d’épaisseur, la direction de collection du signal peut être différente d’un échantillon à un autre. En effet, la profondeur de pénétration des lasers dans les échantillons biologiques est au maximum de 150 à $200 \mu\text{m}$. Dans le cas des échantillons épais, le signal ne peut donc pas être collecté en direction Forward ; les

2.3. RÉSULTATS

faisceaux sont donc focalisés par un objectif à immersion d'ouverture numérique 1,15, puis les signaux non-linéaires sont collectés en direction Epi (voir 1.2.5).

Dans le cas des échantillons de type coupes fines, une partie des photons issus des processus non linéaires peuvent être collectés en direction Forward par un deuxième objectif à immersion d'ouverture numérique 1.

Les photons provenant des processus CARS, SRS, TPEF et SHG sont détectés au même moment. Plusieurs images provenant de différents canaux sont donc enregistrées lors d'un même balayage de l'échantillon.

2.2.3 Traitement des données

Les images ainsi acquises sont ensuite superposées avec différentes couleurs grâce au logiciel Image J. Par un jeu de seuils sur les données des différents canaux, nous sommes capables de faire disparaître le bruit de chacune des image et obtenir une image multimodale faisant apparaître les informations “utiles” provenant des différents processus non-linéaires (2.6).

Un traitement supplémentaire est appliqué dans la cadre des mosaïques d'images. Deux images adjacentes sont acquises avec un recouvrement d'environ 10% entre elles, et sont superposées grâce à un programme MATLAB écrit par Naveen Balla. Les jonctions sont ensuite “lissées” par un traitement réalisé par B. Sarri utilisant la transformée de Fourier à l'aide du logiciel Image J.

Ce traitement permet d'obtenir des mosaïques d'images d'une taille totale de plusieurs centaines de micromètres, voire quelques millimètres. L'obtention d'images de grande taille est indispensable pour une analyse histologique, car il est essentiel que le médecin ait accès à la structure globale de l'échantillon, en plus des informations sur la composition de celui-ci.

2.3 Résultats

Dans cette partie nous allons présenter les différents résultats obtenus sur les échantillons de système digestif humain. Nous allons d'abord comparer les images de microscopie multimodale dans des tissus sains aux images d'histologie HES, puis nous nous

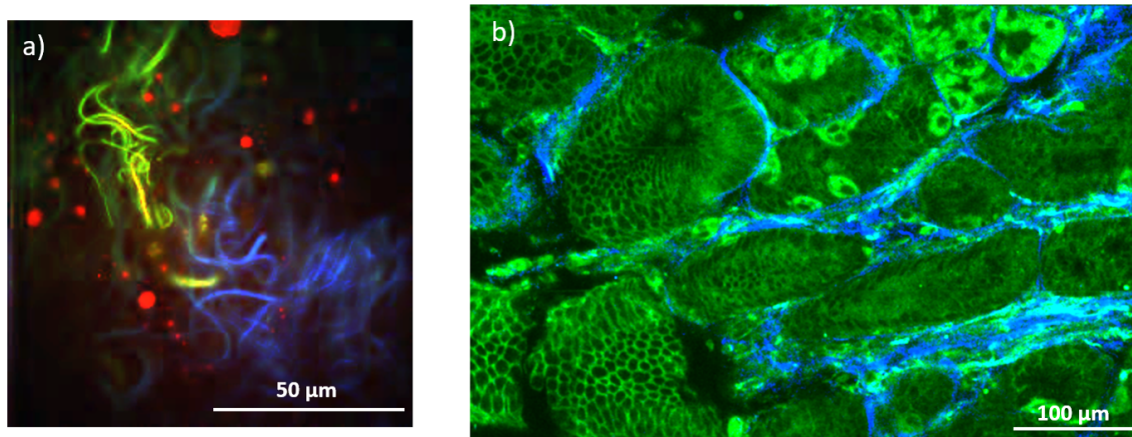


FIGURE 2.6 – a) Image non linéaire multimodale d'un échantillon de colon de type biopsie. Taille : $100 \times 100 \mu m$, résolution : 250×250 points, temps d'acquisition par pixel : $40 \mu s$ avec une répétition de 5 acquisitions sur l'image b) Mosaïque d'images non linéaires dans un échantillon d'estomac de type biopsie. Taille totale : $0.3 \times 0.5 mm$, caractéristiques des éléments de la mosaïque : taille : $100 \times 100 \mu m$, résolution : 250×50 points, temps d'acquisition par pixel : $40 \mu s$. En rouge le signal CARS à $2845 cm^{-1}$, en vert le signal de TPEF, en bleu le signal SHG.

intéresserons à la caractérisation du cancer, notamment en présentant un moyen d'obtenir l'image des noyaux cellulaires.

2.3.1 Imagerie du système digestif et première comparaison avec l'histologie

Comme nous l'avons décrit en 2.2.1, la plupart des éléments du système digestif sont organisés en strates. Chacune de ces strates est composée d'éléments différents possédant une signature particulière en imagerie non linéaire.

La figure 2.7 compare l'imagerie non linéaire avec l'histologie HES classique dans les différentes strates du tube digestif. Les images multimodales ont été obtenues sur des échantillons de types biopsies en direction Epi. La résolution de ces images est de 200×200 points avec un temps d'acquisition par pixel de $40 \mu s$, et un moyennage sur 3 images. Elles sont issues de "stacks" d'images de $100 \mu m$ de profondeur, avec un pas de $2 \mu m$, ce qui nous permet d'imager un cube de $100 \mu m^2$ en quatre minutes.

La première strate, correspondant à la partie interne du tube digestif, est la muqueuse. Elle est composée majoritairement de cellules épithéliales, et on la reconnaît essentiellement à sa structure. Elle est formée d'un ensemble de villosités aisément re-

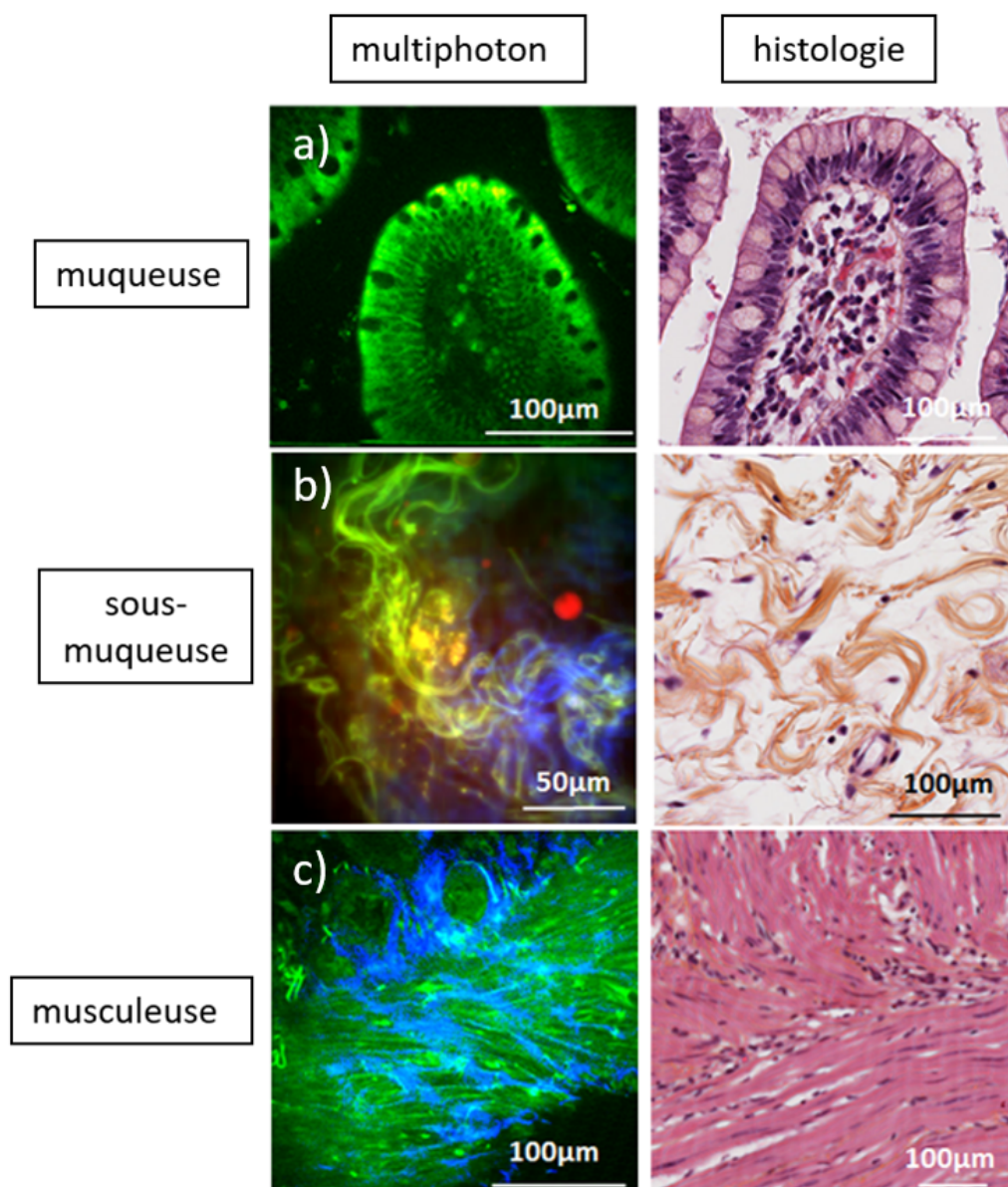


FIGURE 2.7 – Tableau comparatif des images multimodales et histologiques dans différentes couches de la paroi du système digestif. Caractéristiques des images multimodales, acquises dans des échantillons de type biopsie : taille : $100 \times 100 \mu m$, résolution : 200×200 points, temps d'acquisition par pixel : $40 \mu s$ avec une répétition de 4 acquisitions sur l'image. En rouge le signal CARS à 2845 cm^{-1} , en vert le signal de TPEF, en bleu le signal SHG. Les images histologiques sont traitées avec les colorants HES.

connaissables dans un tissu sain, en comparaison des autres couches. Ces villosités présentent une zone creuse au centre et sont entourées d'une mince couche de collagène. La figure 2.7 a) montre une image de muqueuse du colon. On observe du signal de TPEF nous permettant de bien voir la structure.

La sous-muqueuse vient ensuite, séparée de la muqueuse par une fine couche de tissus musculaires appelée musculaire-muqueuse. La sous muqueuse est formée de tissus conjonctifs et de fibres de collagène. La structure en amas fibreux de faible densité est facilement identifiable, comme on peut le voir sur (2.7 b). Ces fibres donnent donc du signal par les processus SHG et TPEF essentiellement. Des gouttes lipidiques peuvent aussi être présentes dans cette couche et visibles en CARS à 2845cm^{-1} .

La musculuse (2.7 c) est composée de fibres musculaires, ainsi que de fibres de collagène. La particularité de cette couche est la densité de fibres qui en fait une structure très ordonnée. Ici encore on peut établir la localisation d'un échantillon dans cette couche principalement grâce aux informations structurelles recueillies.

Comme présenté en 1.3, la platine de translation permet l'acquisition automatique d'images adjacentes. Cela permet d'obtenir des matrices d'images multimodales de quelques millimètres de côté, et ainsi obtenir une information sur la structure globale de l'échantillon. La figure 2.8 présente des mosaïques d'images obtenues grâce à l'utilisation de la platine de translation. Chaque image est accompagnée d'une partie zoomée. La résolution des images composant la matrice est de 200×200 points, avec un temps d'acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images. Le recouvrement entre deux images est de $10\mu\text{m}$, la taille d'une image étant $100 \times 100\mu\text{m}$. Le temps d'acquisition total pour une image de 1mm^2 , soit 11×11 images, est de 17min pour une mosaïque à une profondeur fixe.

Lors de l'acquisition de ces images, chacun des trois signaux est enregistré indépendamment des autres. Par la suite nous traitons les trois images indépendamment les unes des autres. Les différents signaux sont ensuite rassemblés sur une même image, avec le signal TPEF codé en vert, le signal SHG en bleu, et le signal CARS à 2845cm^{-1} en rouge.

La figure 2.8 présente des mosaïques d'images enregistrées dans plusieurs zones du système digestif. Pour les images acquises dans un échantillon de colon, on reconnaît la structure caractéristique de la muqueuse de cette partie du système digestif. Dans les images de pancréas, la structure est plus dense, avec des amas de fibres de collagène en

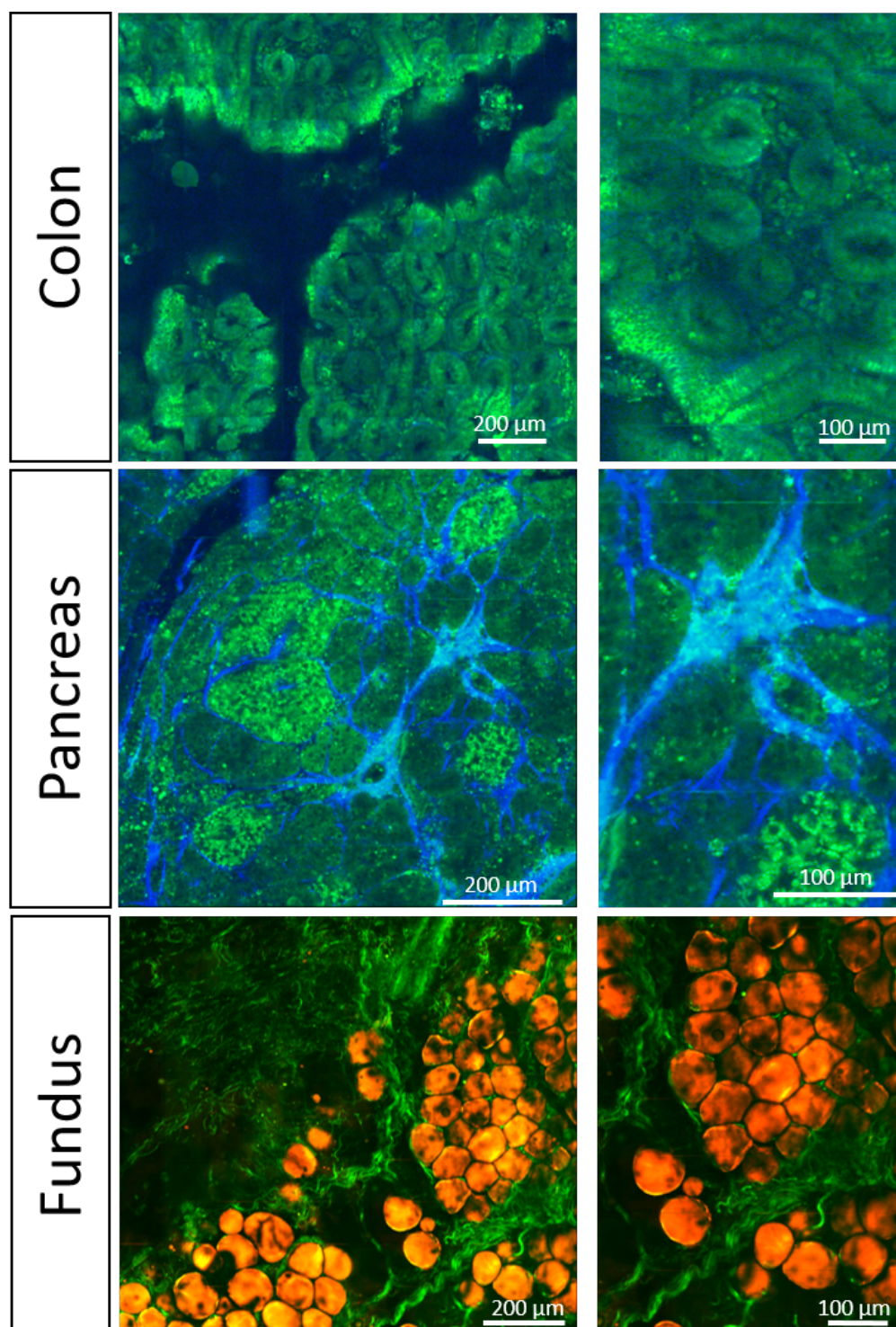


FIGURE 2.8 – Mosaïques d’images multimodales pour diverses parties du système digestif (colon, pancréas et fundus). Les échantillons imagés sont issus de coupes non marquées. En rouge le signal CARS à 2845cm^{-1} , en vert le signal de TPEF, en bleu le signal SHG. Chaque mosaïque est accompagné d’une partie zoomée.

bleu qui sont spécifiques de la structure du pancréas. Enfin les images dans le fundus montrent un troisième type de structure visible dans le système digestif. Ici il s'agit de la séreuse composée en grande partie de cellules adipeuses visibles en CARS à 2845cm^{-1} .

Pour chacune des différentes zones on constate que la provenance de l'échantillon peut être retrouvée grâce à la structure et à la composition de celui-ci : le collagène ainsi que les zones contenant des lipides sont ciblés, et le signal provenant des protéines permet d'identifier les structures cellulaires. Néanmoins lors de la détection de tissus cancéreux, une information est essentielle au diagnostic de l'anatomopathologiste : le nombre et la localisation des noyaux cellulaires. En effet, dans un échantillon cancéreux, les noyaux prolifèrent dans le tissu.

Or les noyaux ne sont pas visibles si on utilise seulement les contrastes présentés ici. Dans le but de pouvoir comparer le diagnostic par imagerie non linéaire avec l'histologie, il nous est indispensable d'être capables de cibler et mettre en évidence les noyaux.

2.3.2 Imagerie des noyaux cellulaires

En 2015 le groupe de X. Sunney Xie a proposé une méthode pour mettre en évidence les noyaux cellulaires qui consiste à soustraire le signal SRS obtenu à 2845cm^{-1} au signal SRS obtenu à 2930cm^{-1} ([50]). Nous avons mis en œuvre une méthode similaire afin d'obtenir l'image des noyaux et tenter de rivaliser avec les images d'histologie HES classique.

Modalité Switch-SRS

L'utilisation de trois faisceaux lasers nous permet de mettre en place une configuration permettant d'alterner entre deux processus SRS sondant deux énergies vibrationnelles différentes. Pour cibler les liaisons vibrationnelles à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} , les deux faisceaux faisant office de faisceau pompe dans le processus SRS et provenant des deux oscillateurs paramétriques optiques (OPO) sont réglés à 797,3nm et 792nm respectivement, et sont couplés au faisceaux Stokes à 1031,2nm.

Comme décrit en 1.3, notre montage optique nous permet d'envoyer ces trois faisceaux en même temps sur l'échantillon. Les OPOs sont équipés d'obturateurs mécaniques que l'on peut contrôler par ordinateur. Pour mettre en pratique l'alternance des processus SRS à deux longueurs d'onde différentes, nous avons adapté le programme

2.3. RÉSULTATS

d'acquisition pour que les obturateurs soient activés entre l'acquisition de deux images consécutives : le faisceau sortant du premier OPO, que nous appelons faisceau OPO1 est libre, alors que le faisceau sortant de l'autre OPO (OPO2) est bloqué grâce à l'obturateur, et le faisceau à 1031,2nm éclaire constamment l'échantillon. Lorsque l'acquisition d'une image est terminée, l'obturateur du faisceau OPO1 est fermé, et l'ouverture du faisceau OPO2 est activée, puis nous imasons la même zone de l'échantillon une deuxième fois.

Ainsi l'échantillon n'est éclairé que par deux faisceaux en permanence, et nous enregistrons les signaux SRS à deux énergies vibrationnelles différentes (2845cm^{-1} et 2930cm^{-1}) pour chacune des zones d'intérêt. Nous calculons ensuite la différence des images SRS brutes $2930\text{cm}^{-1} - 2845\text{cm}^{-1}$. Cette étape repose sur une condition fondamentale : l'équilibrage de l'efficacité des processus SRS. En effet, comme nous utilisons deux faisceaux pompes différents, il est important de vérifier que les deux combinaisons de faisceaux Stokes-OPO1 et Stokes-OPO2 interagissent de manière identique avec l'échantillon. Pour cela, nous avons mis en place une procédure qui consiste à mesurer le signal SRS à la même énergie de vibration et dans le même échantillon pour chacune des combinaisons pompe-Stokes. Nous équilibrons ensuite le signal obtenu en modifiant la divergence des faisceaux pompes, leur polarisation, et enfin leur puissance. Cette méthode que nous nommons "Switch-SRS" permet donc de considérer les deux faisceaux pompes comme un seul et même faisceau dont nous changerions la longueur d'onde de façon quasi-instantanée (en pratique en quelques millisecondes correspondant au temps d'obturation mécanique).

L'image obtenue en faisant directement la différence des deux images SRS fait apparaître les noyaux cellulaires, et le signal SRS à 2845cm^{-1} fait apparaître les structures lipidiques de l'échantillon telles que le cytoplasme. La technique Switch-SRS permet donc d'obtenir l'ensemble des informations biologiques dont a besoin l'histologie.

Le gain de temps offert par cette méthode par rapport à l'utilisation d'un seul faisceau pompe dont nous changerions la longueur d'onde n'est pas significatif, étant donné que dans les deux cas nous devons imager l'échantillon à deux énergies de vibration différentes afin d'obtenir le signal des noyaux. L'avantage essentiel de cette technique réside dans sa faible sensibilité aux mouvements lents des échantillons. En effet dans le cadre d'échantillon de type lame, aussi bien que pour les échantillons de type biopsies, le réchauffement dû au temps passé à température ambiante et à l'énergie des lasers infrarouges absorbée par l'échantillon, ainsi que le dessèchement de celui-ci, peuvent

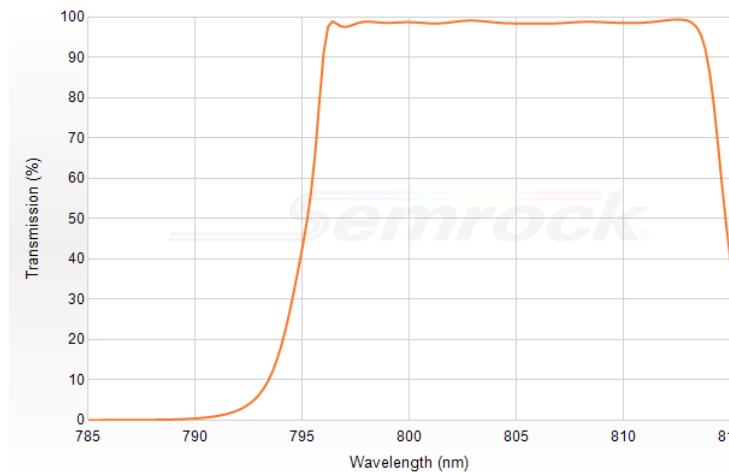


FIGURE 2.9 – Spectre de transmission de filtre optique passe-bande versachrome utilisé à 60° .

causer une faible déformation des structures. Cette déformation a lieu à des échelles de temps de l'ordre de quelques minutes, il nous est donc impossible d'acquérir les images SRS à deux énergies vibrationnelles différentes à plusieurs dizaines de minutes d'intervalle, ce qui serait le cas en utilisant seulement deux faisceaux dont on changerait la longueur d'ondes entre deux scans. De plus, le temps d'acquisition est plus faible car aucun changement de longueur d'onde n'est requis.

Remarque

L'utilisation de deux longueurs d'onde proches l'une de l'autre (797,3nm et 792nm) rend complexe la recombinaison des faisceaux. L'utilisation d'un miroir semi-réfléchissant étant impossible du fait de la perte de puissance, nous avons opté pour l'utilisation d'un miroir dichroïque accordable angulairement (Semrock, Versachrome[®]). Celui-ci est un filtre passe-bande caractérisé par des coupures très nettes à ses bornes. Il nous permet donc d'avoir une transmission à 95% du faisceau OPO1 à 797,3nm et une réflexion à 95% pour le faisceau OPO2 à 792nm (2.9).

La contrainte de l'utilisation d'un tel filtre est que l'angle d'utilisation dépend de la longueur d'onde de coupure. Ainsi, nous devons utiliser ce filtre avec un angle d'incidence de 60° , ce qui entraîne des modifications sur le trajet optique ainsi qu'une difficulté supplémentaire lors de l'alignement.

2.3. RÉSULTATS

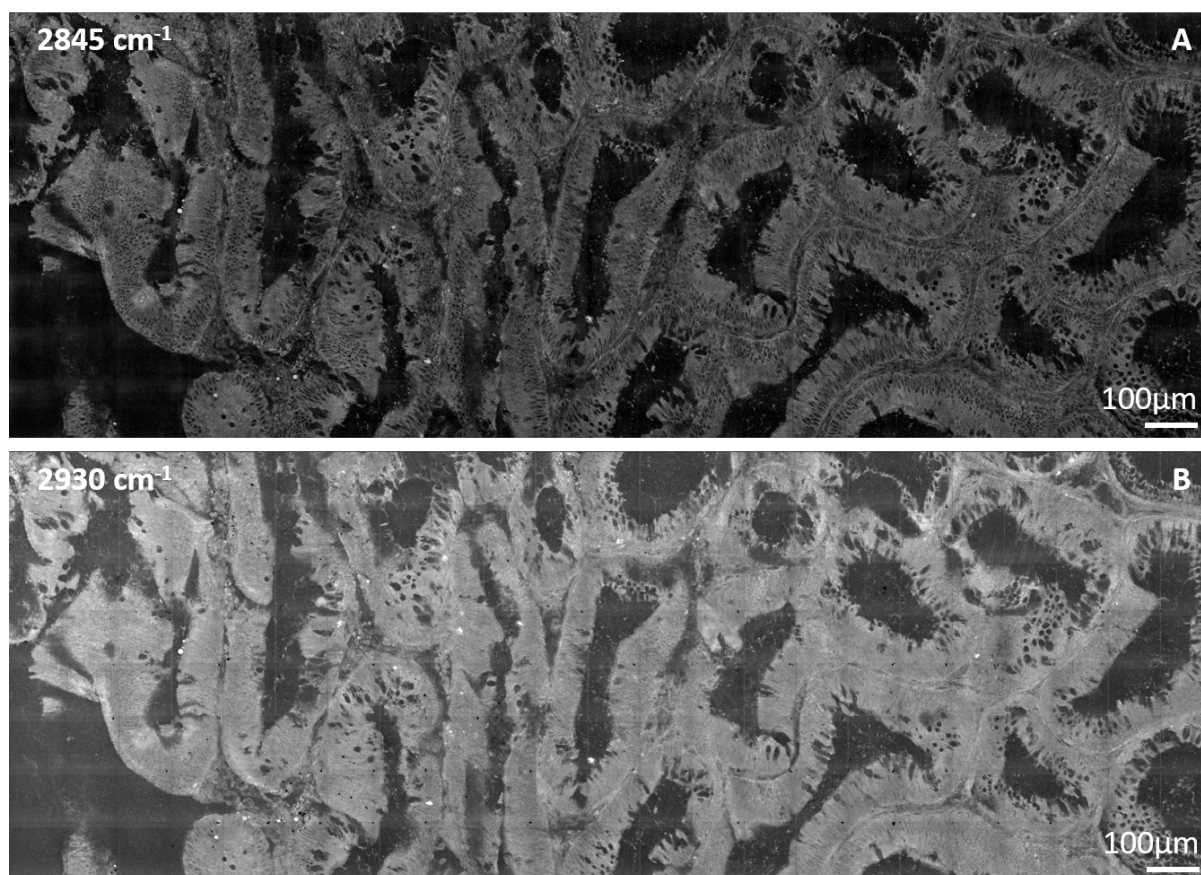


FIGURE 2.10 – Mosaiques d’images multimodales d’un échantillon de colon sain de type lame cryogénisée, d’épaisseur $30\mu\text{m}$. La résolution des images de $100\times 100\mu\text{m}$ composant la matrice est de $200\times 200\text{pts}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images. A) signal SRS à 2845cm^{-1} . B) signal SRS à 2930cm^{-1} .

2.3.3 Application à l’histologie

La figure 2.10 présente les images SRS à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} d’un échantillon de muqueuse du colon de type lame cryogénisée d’une épaisseur de $30\mu\text{m}$.

La figure 2.11 montre l’image obtenue lorsque l’on soustrait l’image à 2845cm^{-1} à celle à 2930cm^{-1} ainsi que la supersposition du signal SRS à 2845cm^{-1} (en vert) et la différence des signaux (en bleu). La résolution est de 200×200 points pour chaque image de la mosaïque mesurant $100\times 100\mu\text{m}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$ et un moyennage sur 5 images. Les signaux SRS sont acquis en direction Forward grâce à la technique Switch-SRS et le signal SHG est acquis dans le même temps en direction Epi. La taille totale de l’image est de $2\times 1\text{mm}$ avec un temps d’acquisition de 40min au total.

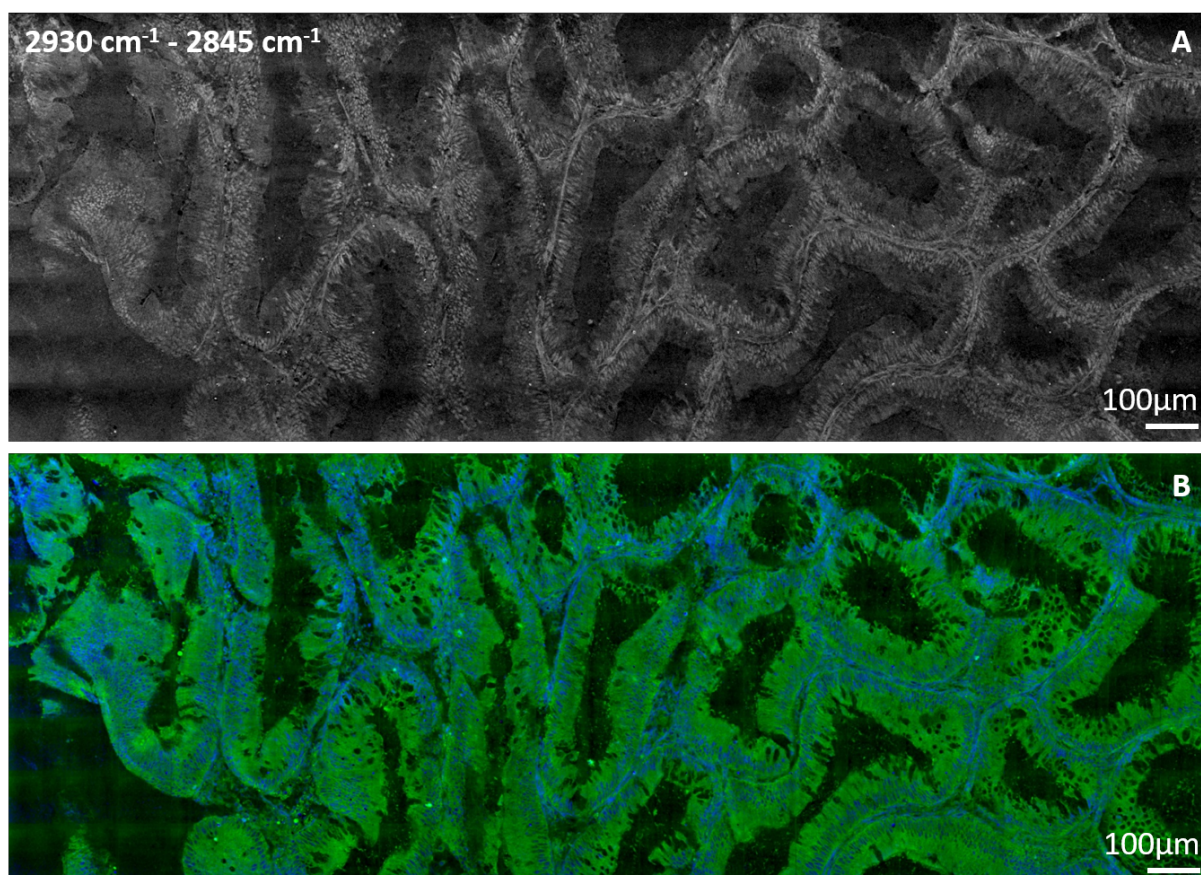


FIGURE 2.11 – Mosaïques d’images multimodales d’un échantillon de colon sain de type lame cryogénisée, d’épaisseur $30\mu\text{m}$. La résolution des images de $100\times 100\mu\text{m}$ composant la matrice est de $200\times 200\text{pts}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images. A) soustraction des images SRS fig. 2.10B - fig. 2.10A. B) superposition de l’image SRS 2845cm^{-1} en vert et l’image A en bleu.

2.3. RÉSULTATS

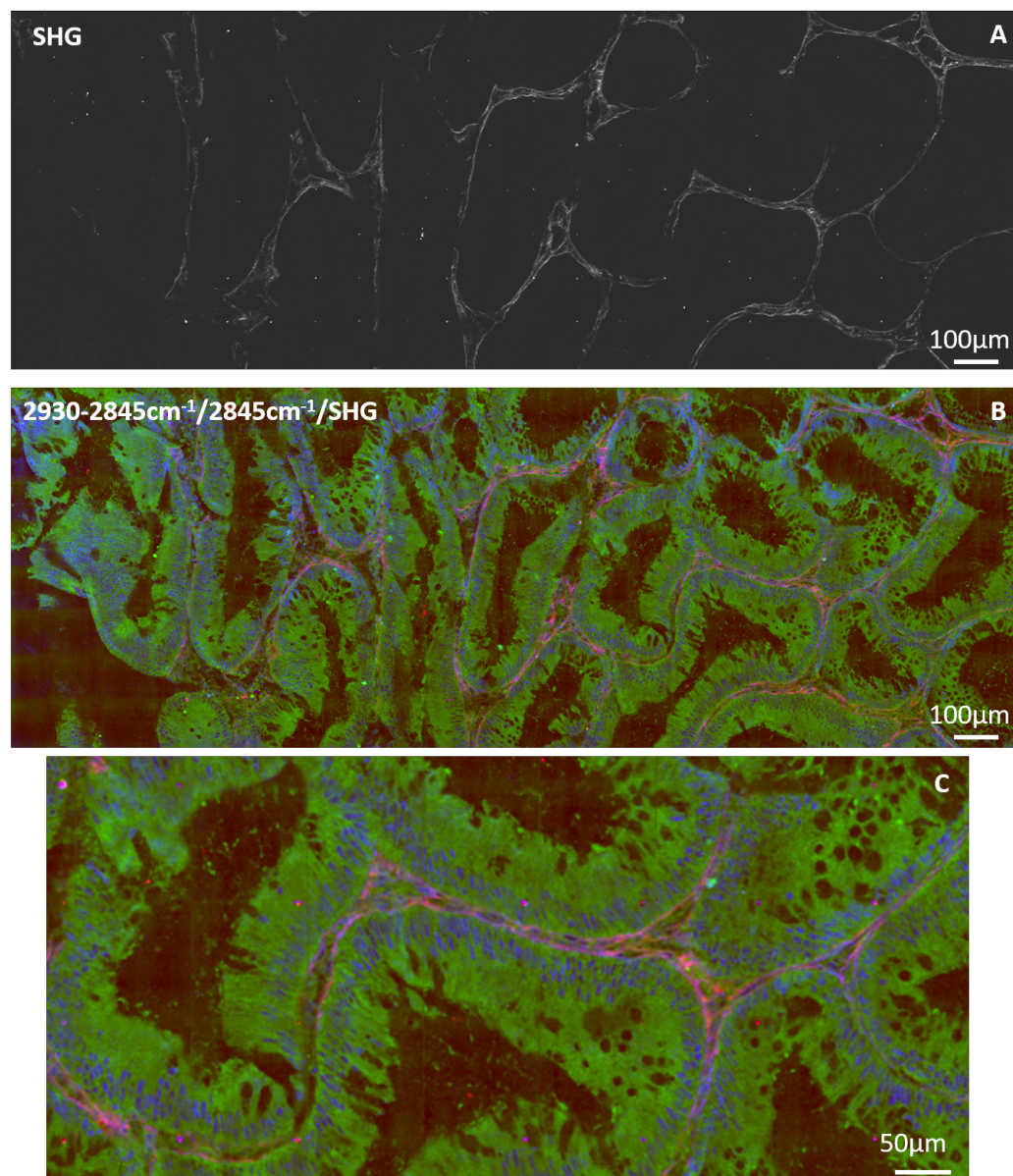


FIGURE 2.12 – Mosaïques d’images multimodales d’un échantillon de colon sain de type lame cryogénisée, d’épaisseur $30\mu\text{m}$. La résolution des images de $100\times 100\mu\text{m}$ composant la matrice est de $200\times 200\text{pts}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images. A) image SHG des fibres de collagène. B) image composée : signal SRS à 2845cm^{-1} en vert, image de soustraction en bleu, et image SHG en rouge. C) zoom de l’image B.

On distingue clairement les noyaux, apparaissant au cœur des zones sombres de l'image à 2845cm^{-1} montrant les protéines formant la structure globale de l'échantillon. On remarque également que la soustraction fait apparaître des structures en fibres. Cette technique ne fait donc pas apparaître seulement les noyaux, et il est indispensable d'être capable d'identifier tous les éléments mis en évidence. Nous faisons donc l'hypothèse que ce sont des fibres de collagène qui apparaissent lors de la soustraction des signaux SRS $2930\text{cm}^{-1} - 2845\text{cm}^{-1}$. En effet le collagène présente une signature protéique à 2930cm^{-1} . La figure 2.12 montre le signal SHG de la même zone de l'échantillon. En comparant les figures 2.11A et 2.12A on peut en conclure que notre hypothèse est vérifiée : les fibres collagéniques sont mises en lumière grâce à la technique de soustraction des images SRS en plus des noyaux cellulaires. Notre hypothèse a également été soumise à l'avis de l'anatomopathologiste avec qui nous collaborons et confirmée par celle-ci.

Enfin, la figure 2.12 montre la supersposition de l'ensemble des images avec en vert le signal SRS à 2845cm^{-1} , en bleu la signature des noyaux et en rouge le signal SHG pour le collagène. C'est ce type d'image que nous proposons à l'anatomopathologiste pour comparaison avec les images d'histologie colorées HES.

2.3.4 Vers la détection du cancer

Le cancer est une maladie complexe caractérisée par la prolifération cellulaire dans un tissu biologique. Son dépistage précoce est important car il permet d'endiguer son évolution de façon plus efficace. Ce dépistage ne peut se faire que par un examen anatomopathologique, et nécessite donc une biopsie et un traitement souvent lourd comme nous l'avons décrit en 2.1. La motivation de notre projet est d'utiliser l'imagerie non linéaire afin de réduire le temps nécessaire au diagnostic. Nous nous concentrerons ici sur l'aspect structurel des échantillons imagés ainsi que la mise en évidence des noyaux pour permettre à l'anatomopathologiste de délivrer son diagnostic, bien que l'analyse complète d'un échantillon repose sur un grand nombre de critères.

Les figures 2.13, 2.14, et 2.15 présentent les images obtenues grâce aux différents contrastes sur un échantillon de muqueuse de colon cancéreux de type lame d'une épaisseur de $30\mu\text{m}$. La taille totale de la zone imagée est de $1.2 \times 1.2\text{mm}$. Les images assemblées ont une taille de $100 \times 100\mu\text{m}$ et une résolution de $200 \times 200\text{pts}$. Le temps

2.3. RÉSULTATS

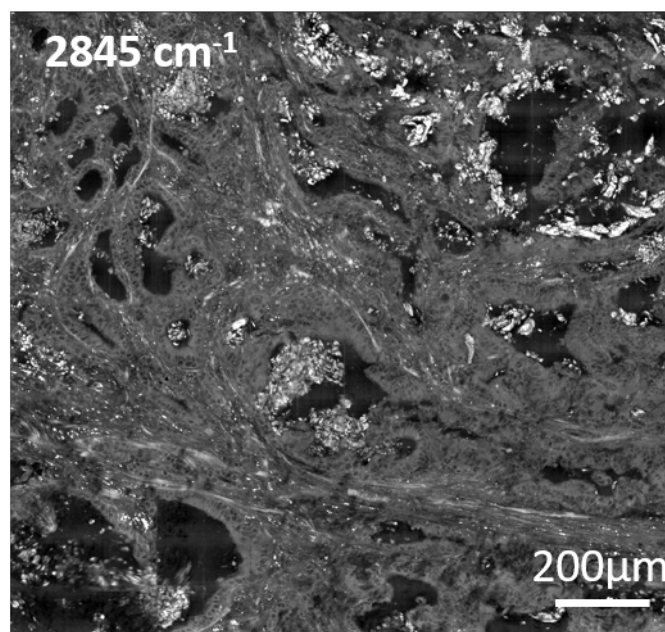


FIGURE 2.13 – Mosaïques d’images d’un échantillon de colon cancéreux de type lame cryogénique présentant le signal SRS à 2845cm^{-1} . La résolution des images de $100\times 100\mu\text{m}$ composant les matrices est de $200\times 200\text{pts}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images.

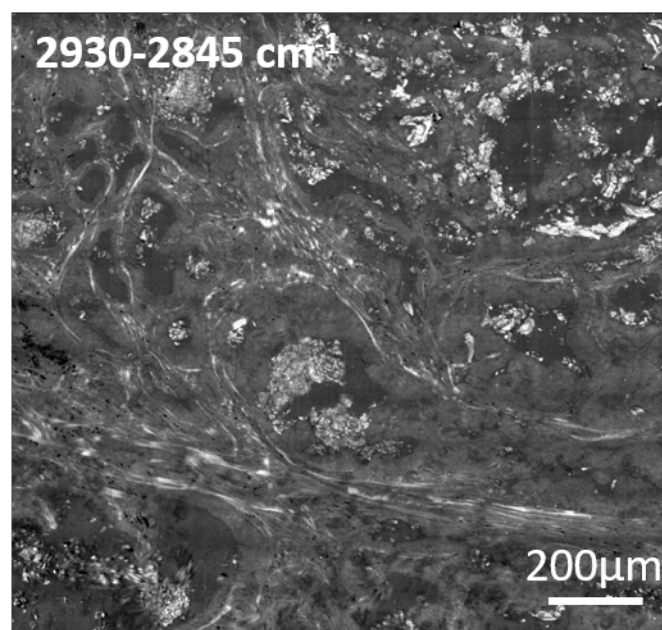


FIGURE 2.14 – Mosaïques d’images d’un échantillon de colon cancéreux de type lame cryogénique présentant la soustraction des images SRS 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} . La résolution des images de $100\times 100\mu\text{m}$ composant les matrices est de $200\times 200\text{points}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images.

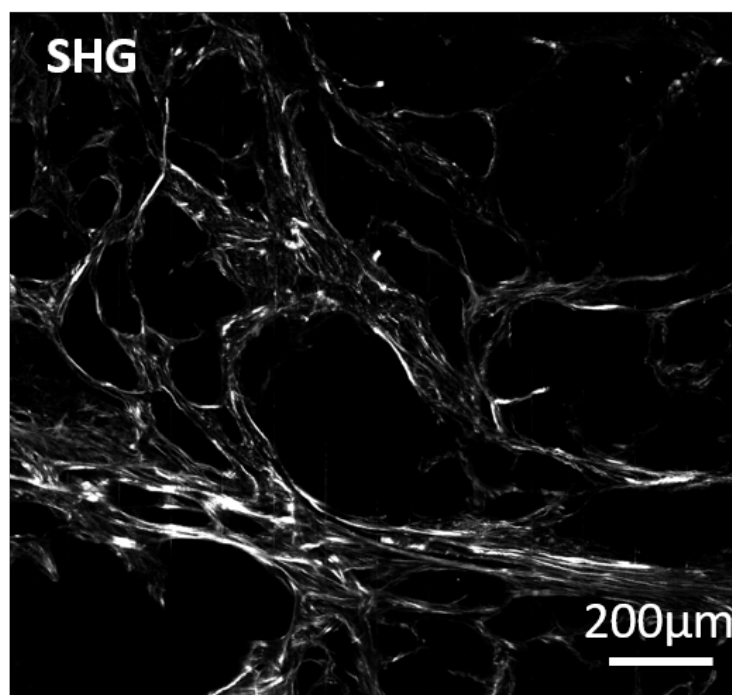


FIGURE 2.15 – Mosaïques d’images d’un échantillon de colon cancéreux de type lame cryogénique présentant le signal SHG. La résolution des images de $100 \times 100 \mu\text{m}$ composant les matrices est de 200×200 points, avec un temps d’acquisition par pixel de $40 \mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images.

2.3. RÉSULTATS

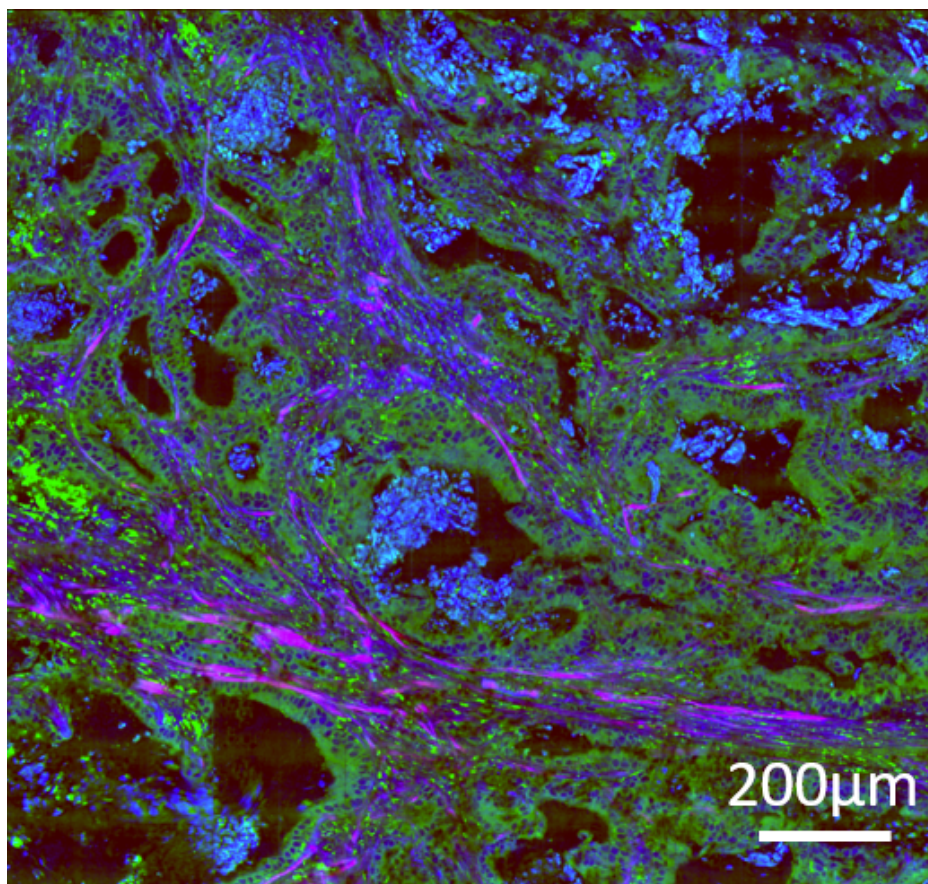


FIGURE 2.16 – Mosaïques d’images d’un échantillon de colon cancéreux de type lame cryogénique présentant la superposition du signal SRS à 2845cm^{-1} en vert, du signal SHG en rouge, et de la soustraction des images SRS obtenues à 2930cm^{-1} et 2845cm^{-1} en bleu. La résolution des images de $100\times 100\mu\text{m}$ composant les matrices est de $200\times 200\text{pts}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images.

d’acquisition par pixel est de $40\mu\text{s}$ et nous faisons un moyennage sur 5 images.

La figure 2.16 montre la superposition des différentes images avec en vert le signal SRS à 2845cm^{-1} des protéines, en bleu la signature des noyaux et en rouge le signal SHG des fibres de collagène. On constate que les structures connues de la muqueuse du colon ne sont pas reconnaissables sur cette image. C’est un indice de la destructuration entraînée par le cancer présent dans cet échantillon. Nous observons aussi une densité de noyaux importante qui peut-être caractéristique de la prolifération cellulaire au sein du tissu.

Cette technique offre donc un gain de temps considérable par rapport à l’histologie classique tout en apportant des informations comparables concernant la structure et

la composition des échantillons. De plus, le caractère non-invasif des contrastes non linéaires peut en faire un outil extrêmement puissant dans le cadre d'un examen *in vivo*, qui permettrait d'éviter une intervention chirurgicale, indispensable aujourd'hui pour examiner les tissus. Néanmoins, malgré la robustesse de la technique Switch-SRS décrite dans cette partie, l'imagerie dans des milieux vivants doit s'accomoder de mouvements qui peuvent être bien plus forts que dans le cadre de nos expériences, pour des échelles de temps inférieures à la seconde, et pour lesquels la technique Switch-SRS ne peut pas assurer de stabilité suffisante. Nous avons donc travaillé sur une solution à ce problème grâce à la polyvalence de la technique de Stimulated Raman Scattering, et mis en place une technique que nous allons décrire dans la partie suivante.

2.4 Frequency-Modulated Stimulated Raman Scattering

Nous avons décrit en 1.14 un schéma de détection permettant de nous affranchir des artefacts de microscopie SRS en alternant entre les différents faisceaux lasers sur un même pixel à une fréquence de 20MHz. Nous présentons ici une application de cette technique du "Frequency-Modulated Stimulated Raman Scattering" (FM-SRS) pour l'imagerie du système digestif.

En effet, nous avons vu précédemment que les mouvements de l'échantillon pouvaient être problématiques si ceux-ci avaient lieu dans une échelle de temps inférieure à la seconde. De plus, en utilisant la technique Switch-SRS décrite dans la partie 2.3.2, il est nécessaire d'obtenir deux images SRS afin de pouvoir observer les noyaux. Nous avons donc travaillé à la fois à trouver une solution au problème de mouvement et à réduire le temps d'acquisition pour les images multimodales.

2.4.1 Description du montage FM-SRS

La technique FM-SRS utilise trois faisceaux lasers différents : un faisceau Stokes à 1031nm, et deux faisceaux pompes, provenant des deux OPOs du système, à 797,3nm et 792nm. Cette configuration permet de cibler deux liaisons vibrationnelles différentes, aux énergies de 2845cm^{-1} et de 2930cm^{-1} , ce qui correspond respectivement aux liaisons CH_2 dans les lipides et aux liaisons CH_3 dans les protéines.

Chacun des deux faisceaux pompes va être modulé à l'aide d'un modulateur acousto-optique de telle sorte que la moitié des pulses lasers seulement vont être transmis par celui-ci et envoyés sur l'échantillon. En pratique, nous coupons de cette façon deux pulses sur quatre afin d'obtenir une fréquence de modulation de 20MHz, le taux de répétition original des lasers étant de 80MHz.

L'aménagement fondamental mis en place dans cette configuration est la mise en opposition de phase temporelle des deux faisceaux pompes : lorsque les pulses lasers du faisceau OPO1 sont transmis par l'AOM1, alors l'AOM2 coupe les pulses du faisceau OPO2. Nous obtenons donc une alternance permanente sur l'échantillon entre les faisceaux pompes à 797,3nm et 792nm à 20MHz. Le faisceau Stokes à 1031,2nm n'est pas modulé, et interagit ainsi à tour de rôle avec les deux faisceaux pompes au sein de l'échantillon.

De cette façon, l'échantillon est en permanence le siège de processus Raman à 2845cm^{-1} ou à 2930cm^{-1} . Nous ne sommes donc plus dans le cas de la détection SRS classique où un processus Raman cohérent à lieu de façon modulée, mais dans un cas où deux processus Raman stimulés ont lieu en alternance dans le temps. Le signal modulé qui va être mesuré par la détection synchrone sera ainsi directement la différence entre les intensités des processus SRS à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} comme le détaille la figure 2.5. Or c'est cette différence de signal qui nous intéresse.

La technique FM-SRS permet donc d'obtenir l'image des noyaux en un seul balayage de l'échantillon, mais sans donner l'accès aux images SRS à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} . L'alternance entre les deux énergies de vibration des liaisons qui nous intéressent se fait à l'échelle de la microseconde, et les mouvements rapides de l'échantillon ne sont donc plus un facteur limitant.

2.4.2 Comparaison des modalités FM-SRS et Switch-SRS

La figure 2.17 montre un exemple d'image obtenue grâce à la modalité FM-SRS dans un échantillon de pancréas de type lame d'une épaisseur de $30\mu\text{m}$ ainsi qu'une image issue de la soustraction des images SRS à 2930cm^{-1} et 2845cm^{-1} de la même zone du même échantillon. Les zones d'intérêts dans le cadre de cette comparaison sont les zones non fibreuses. On peut voir que le nombre et la position des noyaux sont les mêmes dans les deux images, ce qui confirme le fait que la modalité FM-SRS nous

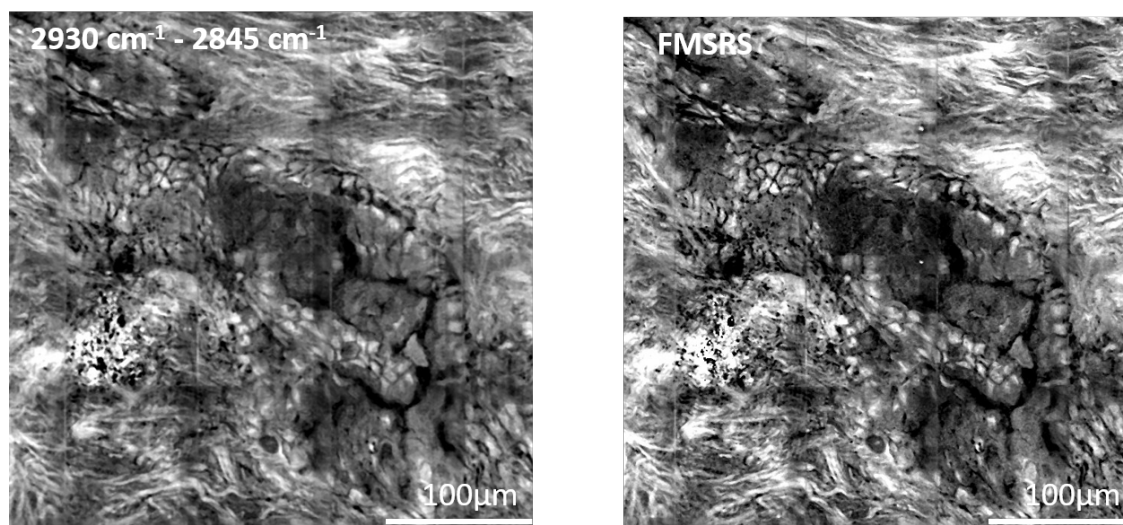


FIGURE 2.17 – Mosaïques d’images d’un échantillon de colon de type lame cryogénique. La résolution des images de $100 \times 100 \mu\text{m}$ composant les matrices est de 200×200 pts, avec un temps d’acquisition par pixel de $40 \mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images. L’image de gauche est la différence des signaux SRS enregistrés à 2930cm^{-1} et 2845cm^{-1} . L’image de droite est le signal provenant de la même zone enregistré en modalité FM-SRS.

fournit les mêmes informations que la soustraction des deux images SRS 2930cm^{-1} et 2845cm^{-1} .

L’avantage de l’acquisition d’images en modalité FM-SRS est, d’une part, la plus faible sensibilité aux mouvements de l’échantillon, quels qu’ils soient. On remarque d’ailleurs sur la figure 2.17 que l’image en modalité FM-SRS est un peu plus contrastée, probablement en conséquence de cet avantage.

D’autre part, en comparaison du processus de soustraction de deux images SRS différentes, le temps d’acquisition est divisé par deux : en effet, l’acquisition se faisant pixel par pixel, et l’image des noyaux étant obtenue directement par ce procédé, une seule image est requise pour obtenir le signal des noyaux et des fibres de collagène. Ce gain de temps est un atout essentiel dans le cadre d’un diagnostic rapide, notamment sur des tissus frais, qui peuvent être utilisés plus longtemps avant que la nécrose empêche l’étude de l’échantillon.

La figure 2.18 présente une superposition de l’image FM-SRS en bleu, l’image SHG en rouge et l’image SRS à 2845cm^{-1} en vert, obtenues dans un échantillon de colon cancéreux de type lame cryogénisée d’une épaisseur de $30 \mu\text{m}$. Nous comparons ce résultat à celui obtenu dans le même échantillon grâce à la modalité Switch-SRS présenté

2.4. FREQUENCY-MODULATED STIMULATED RAMAN SCATTERING

précédemment. La comparaison de ces deux images confirme que l'image des noyaux en FM-SRS est identique à celle obtenue en imagerie Switch-SRS.

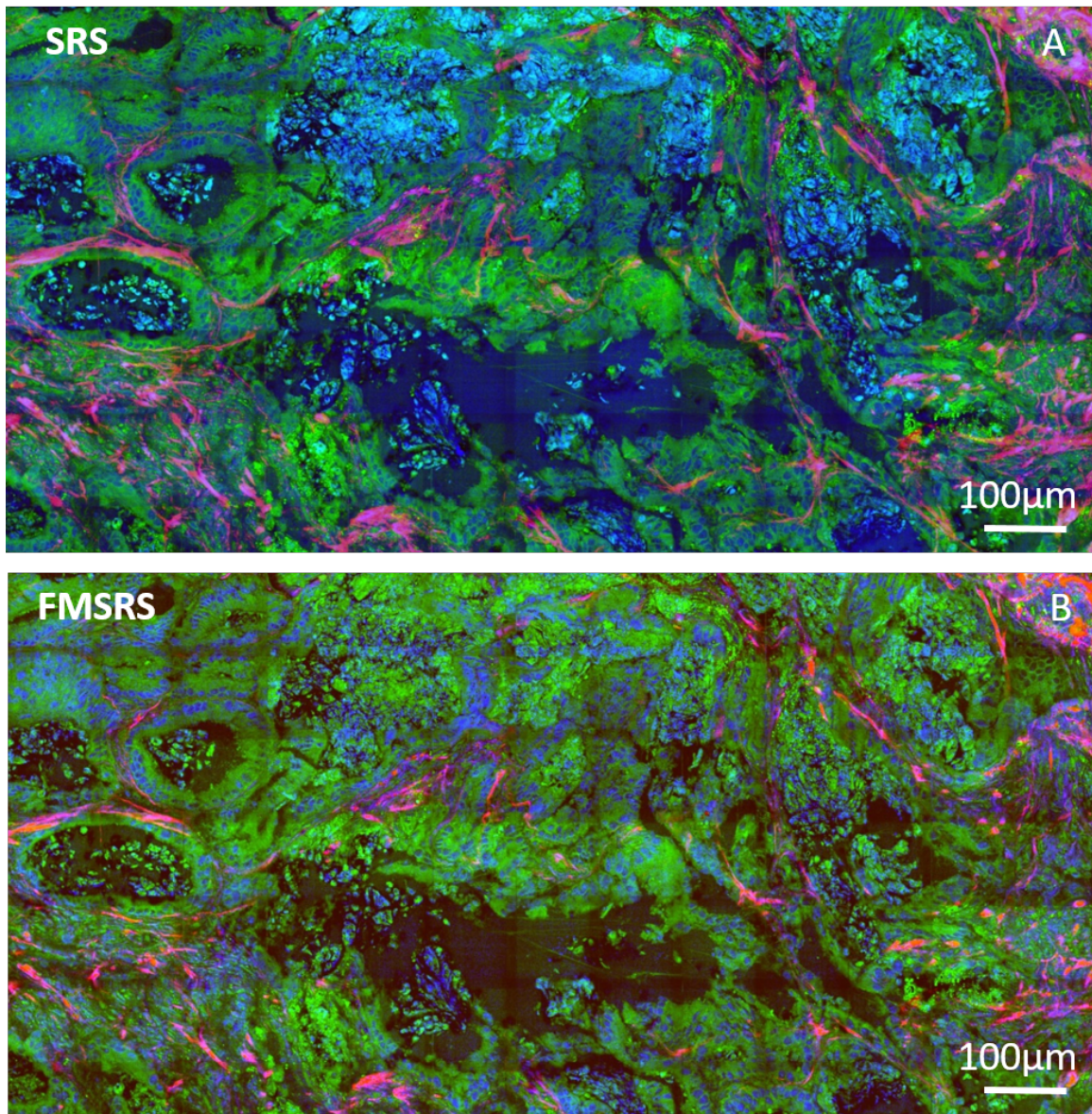


FIGURE 2.18 – A : Superposition de mosaïques d'images obtenues dans la modalité Switch-SRS dans un échantillon de colon cancéreux de type lame cryogénique. En vert le signal SRS à 2845cm^{-1} , en bleu la différence des signaux SRS enregistrés à 2930cm^{-1} et 2845cm^{-1} , et en rouge le signal SHG. B : Superposition des images obtenues en modalité FM-SRS sur la même zone du même échantillon. En vert le signal SRS à 2845cm^{-1} , en bleu le signal FM-SRS, et en rouge le signal SHG. La taille totale de la zone est de $1.2 \times 0.6\text{mm}$. La résolution des images de $100 \times 100\mu\text{m}$ composant les matrices est de $200 \times 200\text{pts}$, avec un temps d'acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images.

Pourtant la méthode FM-SRS ne permet pas d'obtenir une image SRS à 2845cm^{-1} . Cela est pénalisant pour la reconstruction des images multimodales, car nous ne pouvons pas faire apparaître le signal des liaisons lipidiques apportant une information structurale essentielle pour l'histologie. Il nous faut donc effectuer un deuxième balayage de l'échantillon en modalité SRS classique à 2845cm^{-1} afin d'obtenir ce signal, mais nous perdons dans ce cas les bénéfices de la modalité FM-SRS. Nous avons donc cherché à obtenir un signal similaire au signal SRS 2845cm^{-1} qui puisse être enregistré en même temps que le signal FM-SRS.

Acquisition du signal protéique

Nous avons vu en 1.3.3 que le système de détection construit autour du microscope nous permet d'acquérir lors d'un même scan les signaux SRS, CARS, TPEF, et SHG. Dans le but de trouver une alternative au signal SRS à 2845cm^{-1} , nous avons exploré la possibilité d'utiliser le signal CARS à 2845cm^{-1} . En réalité nous faisons cette étude avec le signal CARS généré à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} simultanément. Nous montrerons dans la suite que le signal CARS à 2845cm^{-1} est quasiment équivalent au signal CARS combiné.

La figure 2.19 montre les images acquises sur un échantillon de colon de type lame cryogénique d'une épaisseur de $20\mu\text{m}$ en SRS à 2845cm^{-1} ainsi qu'en CARS associé à la modalité FM-SRS. Les images C et D présentes quant à elles des parties zoomées afin de mieux comparer ces deux méthodes. La première constatation que nous pouvons faire est que les structures membranaires sont bien retrouvées dans les deux cas ; l'utilité principale de cette composante des images multimodales est conservée. Ensuite la différence principale entre les deux images est le remplissage des zones contenant les noyaux : les zones vides dans l'image SRS à 2845cm^{-1} sont remplies dans l'image CARS, bien que les contours soient toujours visibles.

La figure 2.20 présente une superposition des signaux FM-SRS en bleu, SHG en rouge, et CARS 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} en vert, pour le même échantillon que la figure 2.18 dans le but de pouvoir comparer au mieux les différents résultats. Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, les positions des noyaux dans l'image CARS ne sont pas vides, ainsi lors de la superposition des images, le contraste entre l'image FM-SRS en bleu, affichant les noyaux et l'image CARS en vert est amoindri. Nous nous trouvons donc face à deux méthodes qui apportent chacune des avantages différents.

2.4. FREQUENCY-MODULATED STIMULATED RAMAN SCATTERING

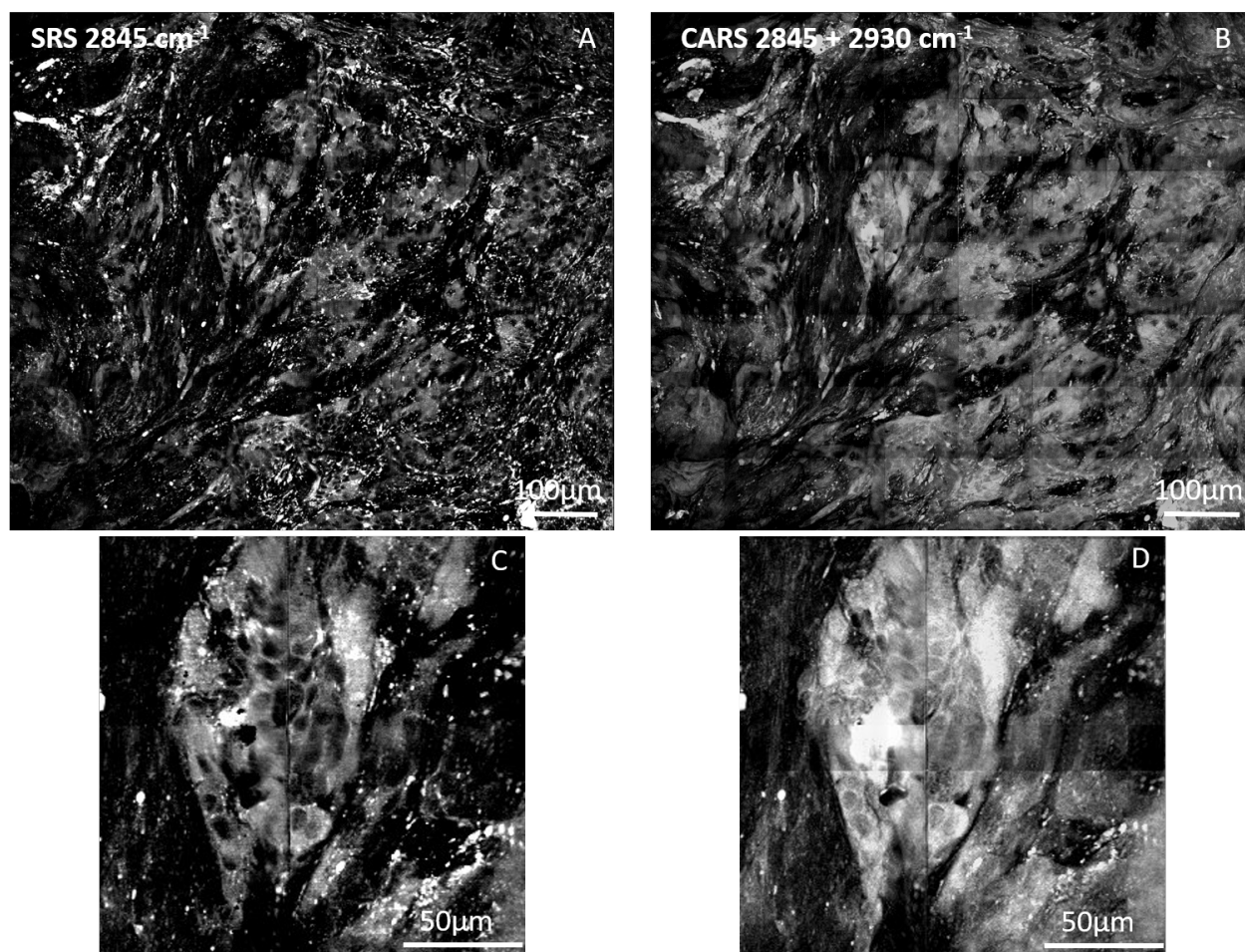


FIGURE 2.19 – Mosaiques d’images d’un échantillon de colon sain de type lame cryogénique. La résolution des images de $100 \times 100 \mu\text{m}$ composant les matrices est de $200 \times 200 \text{pts}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40 \mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images. A : image du signal SRS à 2845cm^{-1} . B : image du signal CARS à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} . Les images C et D présentent la même partie zoomée des images A et B.

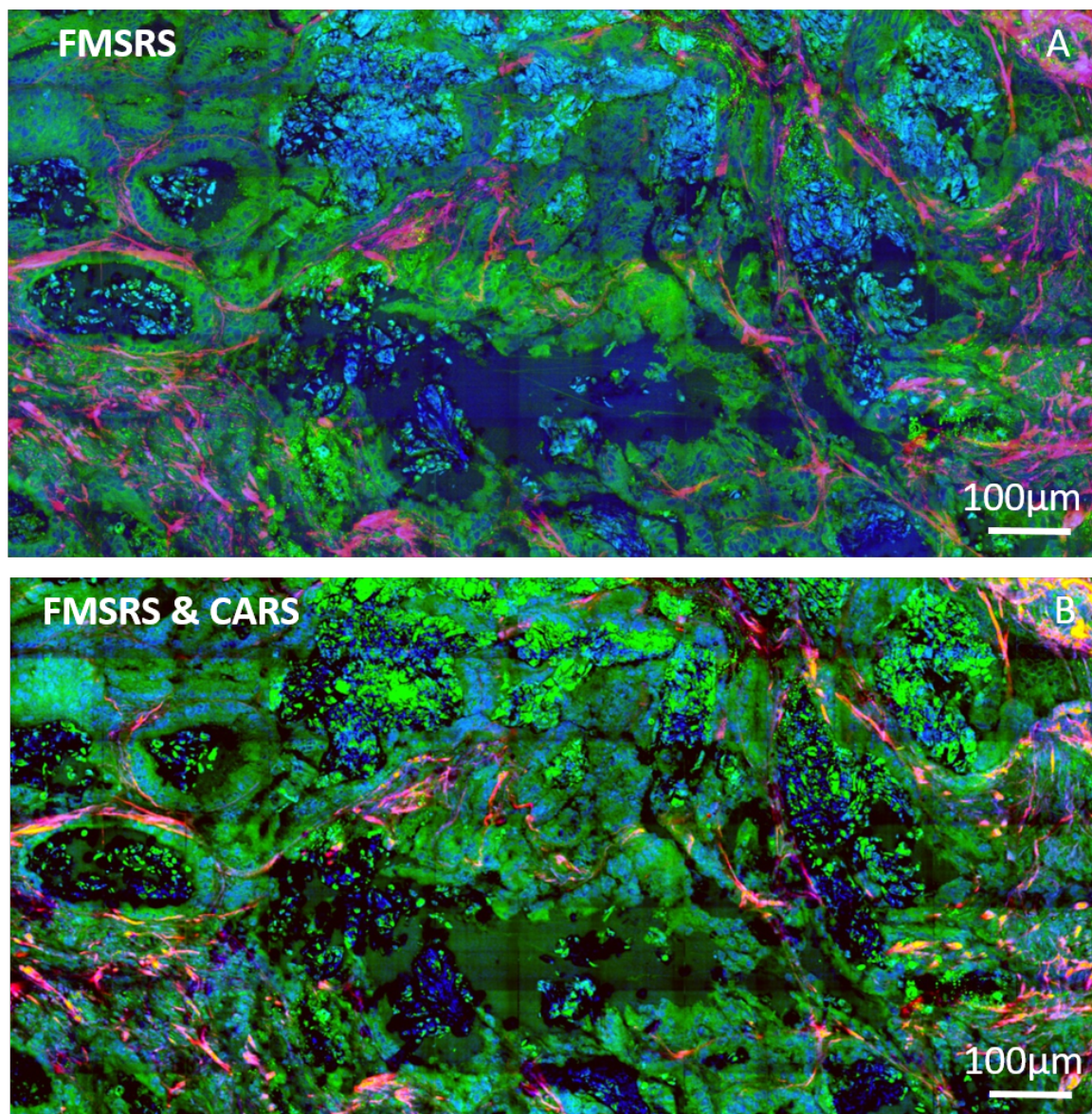


FIGURE 2.20 – Comparaison des superpositions de mosaïques d’images obtenues dans la modalité FM-SRS pour l’échantillon de la figure 2.18. A : En vert le signal SRS seul à 2845cm^{-1} , en bleu le signal FM-SRS, et en rouge le signal SHG. B : En vert le signal CARS à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} , en bleu le signal FM-SRS, et en rouge le signal SHG. La taille totale de la zone est de $1.2 \times 0.6\text{mm}$. La résolution des images de $100 \times 100\mu\text{m}$ composant les matrices est de $200 \times 200\text{pts}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 5 images.

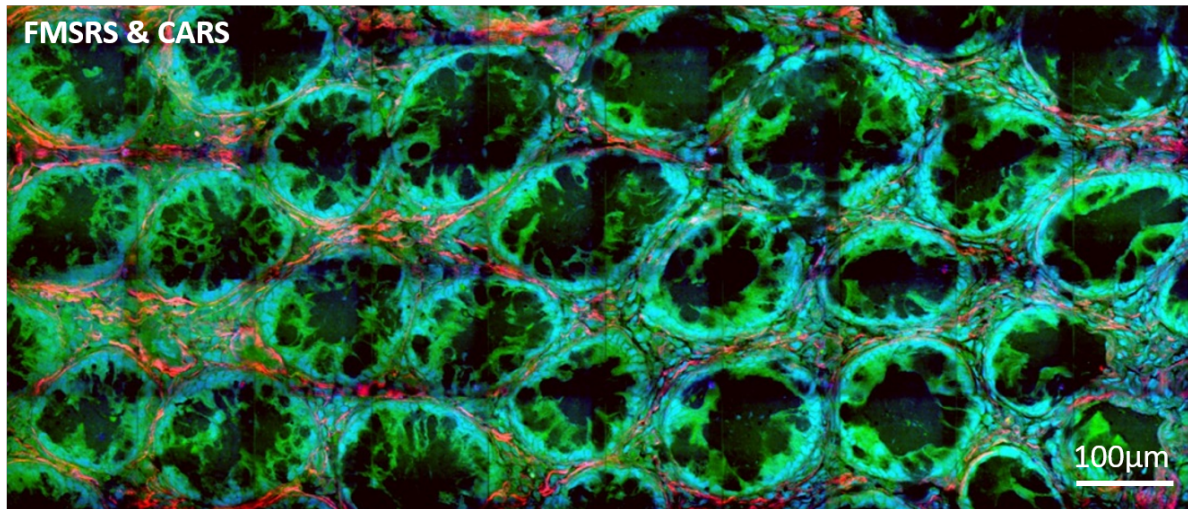


FIGURE 2.21 – Mosaïques d’images non linéaires obtenues dans la modalité FM-SRS dans un échantillon de colon sain. En vert le signal CARS à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} , en bleu le signal FM-SRS, et en rouge le signal SHG. La résolution des images de $100\times 100\mu\text{m}$ composant les matrices est de $200\times 200\text{pts}$, avec un temps d’acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 4 images.

La méthode Switch-SRS requiert l’acquisition de deux images consécutives à deux longueurs d’onde pompes différentes, avec un délai de quelques secondes entre l’acquisition du signal aux deux énergies pour un même pixel. Cette méthode présente l’avantage d’offrir un très bon contraste entre les différents éléments imagés (noyaux cellulaires, protéines, et collagène), mais n’est viable que dans le cadre de mouvements lents et faibles de l’échantillon, probablement incompatible avec de l’imagerie *in vivo*. La méthode FM-SRS ne nécessite qu’une seule image, et est particulièrement peu sensible aux mouvements de l’échantillon, ce qui en fait une candidate tout indiquée pour des futures applications *in vivo*. Néanmoins, il faut lui adjoindre une image supplémentaire pour identifier le cytoplasme des cellules. Nous avons montré qu’une image satisfaisante pouvait être obtenue en utilisant une image CARS acquise simultanément avec l’image FM-SRS. La figure 2.21 donne un dernier exemple d’image d’un échantillon de colon sain, où l’on reconnaît aisément la structure de la muqueuse, et dans lequel les noyaux cellulaires apparaissent clairement.

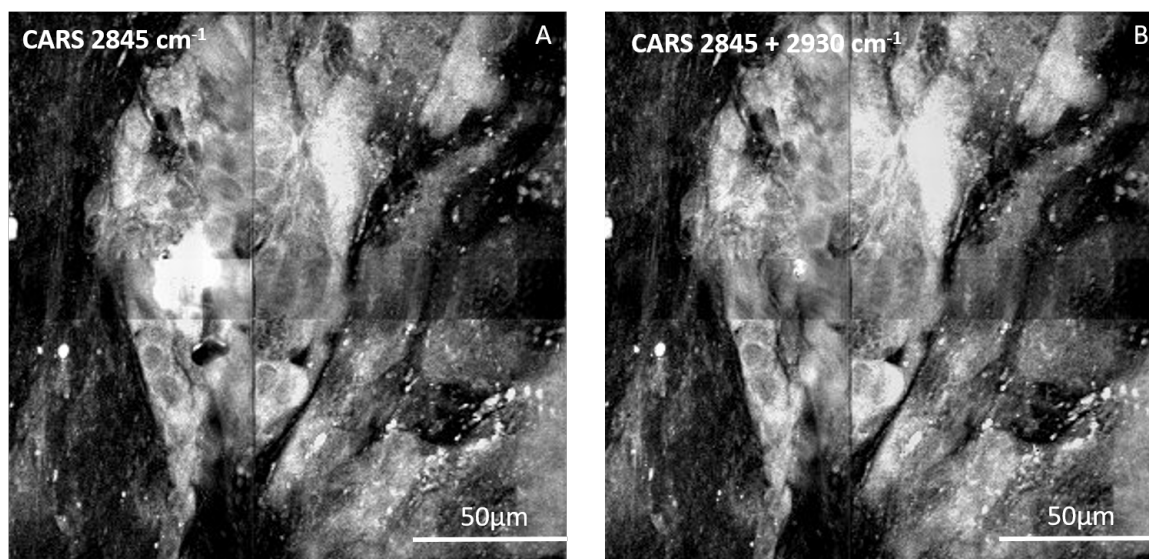


FIGURE 2.22 – comparaison des signaux CARS 2845cm^{-1} seul (A) et CARS 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} dans l'échantillon de la figure 2.19 (B).

Remarque

Dans le but de trouver une alternative au signal SRS à 2845cm^{-1} , nous avons étudié la possibilité d'utiliser le signal CARS à 2845cm^{-1} seul ou bien le signal CARS des contributions à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} ajoutées. La figure 2.22 présente les images CARS acquises sur un même échantillon de colon, aux énergies de 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} d'un côté, ainsi qu'à l'énergie de 2845cm^{-1} de l'autre. Bien que l'image A semble un peu plus contrastée que l'image B, nous avons donc décidé de conserver le signal CARS à 2845cm^{-1} et 2930cm^{-1} ne nécessitant pas de filtrage spectral délicat supplémentaire dans la partie détection lors de l'acquisition en modalité FM-SRS.

2.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons utilisé la microscopie non linéaire pour obtenir des images colorées dans des échantillons biologiques non marqués du système digestif humain. Les différents contrastes utilisés, SHG, TPEF, CARS et SRS nous ont permis de retrouver la structure des muqueuses avec une résolution subcellulaire et de mettre en évidence les différents éléments biologiques : le collagène, les protéines, les lipides, ainsi que les noyaux cellulaires. Les images obtenues ont été comparées aux images

2.5. CONCLUSION

d'histologie HES afin d'apprécier leur similarité.

Nous avons également développé une méthode de détection SRS modulée en fréquence, permettant d'alterner entre les énergies de vibration moléculaire correspondant aux liaisons CH_2 lipidiques et CH_3 protéiques afin d'obtenir l'image des noyaux de façon beaucoup plus rapide. Néanmoins, cette méthode ne permet pas de conserver les images SRS à ces deux énergies. Cela nous a contraints à diminuer le contraste de nos images en utilisant le signal CARS pour remplacer le signal SRS des lipides.

He et al. ([54]) ont montré en décembre 2016 qu'il est possible d'obtenir un signal SRS modulé en fréquence tout en conservant le signal à chacune des énergies en utilisant un système de détection synchrone perfectionné sensible en phase. Bien que cette approche ait été mise en place dans la modalité "spectral focusing SRS" ([55]), elle est adaptable à notre régime picoseconde utilisant trois faisceaux. Nous projetons d'évaluer cette approche prochainement.

Chapitre 3

Application au suivi de substances moléculaires actives dans la peau

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'utilisation des contrastes CARS et SRS pour le suivi de substances cosmétiques dans la peau, dans le but de visualiser et de comprendre les mécanismes de pénétration et d'absorption transcutanés. Ce projet a lieu dans le cadre d'une collaboration avec le pôle recherche de L'Oréal à Aulnay-sous-bois.

Ma contribution dans le cadre de ces travaux s'est concentrée sur la partie expérimentale, le développement de l'instrumentation et l'acquisition des données. Le développement des programmes de traitement de ces données ainsi que la mise en image des résultats que je présente ici est le fruit du travail parallèle de B. Sarri.

3.1 Contexte et motivations

3.1.1 Organisation et composition de la peau humaine

La peau est l'organe humain le plus volumineux. Il couvre toute la surface du corps et assume le rôle de barrière naturelle contre les agressions extérieures. La peau est donc sujette à de multiples détériorations et maladies que nous essayons de prévenir ou guérir grâce à des produits cosmétiques ou pharmacologiques. L'application de produits de type "crème" ou "lotion" à même la peau est une des solutions les plus répandues. Ainsi, les recherches sur l'absorption de substances moléculaires actives par la peau sont importantes pour comprendre les voies de pénétration et les mécanismes d'interaction

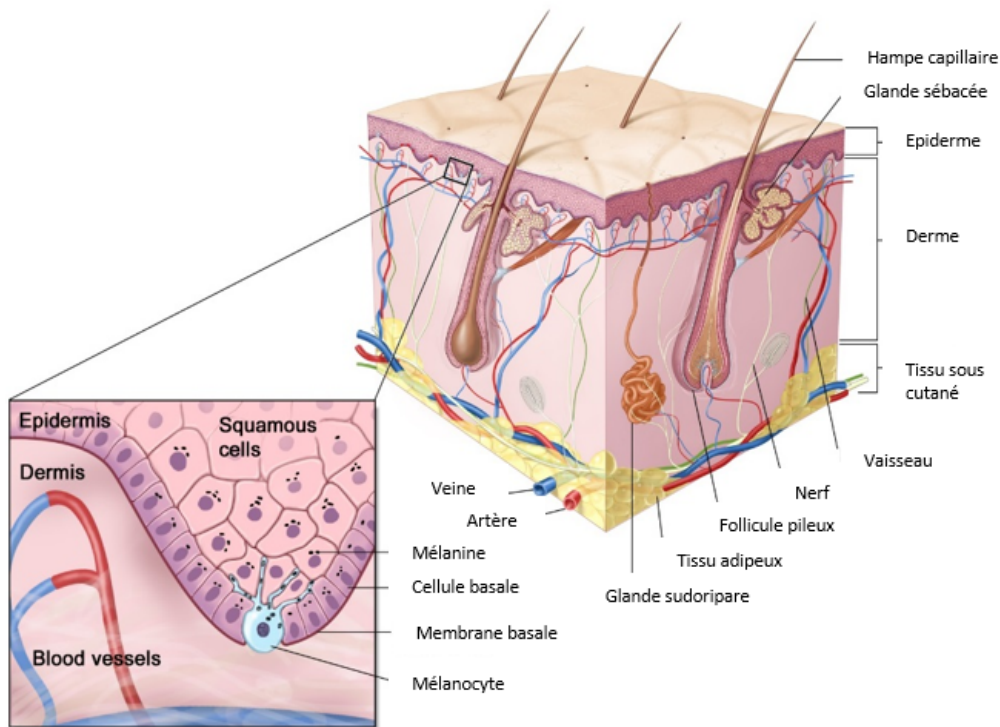


FIGURE 3.1 – Schéma structurel de la peau humaine présentant les trois strates principales de la peau que sont l'épiderme, le derme, et le tissu sous-cutané. La jonction derme/épiderme est agrandie afin de montrer la présence des mélanocytes, qui en raison de leur forte absorption, peuvent générer du signal parasite en profondeur.

des produits actifs avec les différentes strates de la peau. L'imagerie tridimensionnelle grâce à la microscopie non linéaire est donc un outil tout à fait adapté à ces recherches, et nous allons détailler son utilisation dans ce chapitre.

Organisation de la peau

La peau est une interface très structurée et organisée en différentes strates. Trois couches principales peuvent être identifiées : l'épiderme, le derme, et le tissu sous-cutané. La figure 3.1 présente la topographie et l'organisation de la peau en profondeur.

L'épiderme est la mince couche superficielle, c'est elle qui est en contact avec l'extérieur. Elle est elle-même stratifiée, composée de cellules épithéliales qui se renouvellent rapidement pour permettre une réparation efficace. Le derme est une couche plus épaisse entre l'épiderme et le tissu sous-cutané qui contient la plupart des éléments de la peau, comme les follicules pileux, les glandes sébacées et sudoripares (produisant

3.1. CONTEXTE ET MOTIVATIONS

respectivement le sébum et la sueur), ainsi que les vaisseaux lymphatiques, sanguins, et les nerfs. Enfin le tissu sous-cutané contient des tissus adipeux et assure la jonction entre la peau et les muscles.

Dans ce chapitre nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'épiderme, et à l'absorption de substances moléculaires à travers celui-ci, sur une échelle de quelques dizaines de micromètres seulement. Nous allons donc décrire plus en détails sa structure.

L'épiderme

L'épiderme est donc la couche superficielle de la peau et il se renouvelle continuellement. C'est un tissu épithélial (constitué de cellules jointives) qui produit des kératinocytes (les cellules de la peau) au niveau de la membrane basale. Ces kératinocytes vont se différencier au cours de leur progression vers la face externe de l'épiderme. En effet, on peut identifier quatre types de morphologie des kératinocytes à l'intérieur de l'épiderme qui forment autant de strates (voir fig. 3.2) : le stratum basale, où les kératinocytes sont formées, le stratum spinosum, le stratum granulosum, et le stratum corneum. Au fil de leur vie cellulaire, les kératinocytes vont prendre une forme de plus en plus plate et large, puis perdre leur noyaux, adhérer les unes aux autres, et finir par se transformer en cellules dites mortes mais biochimiquement actives : les cornéocytes ([56]). Leur libération lors de la destruction des attaches intercornéocytaires est appelée la desquamation. La durée complète de ce processus est d'environ quarante à soixante jours et permet à l'ensemble des cellules de l'épiderme de se renouveler régulièrement tout au long de la vie de l'individu ([57]).

3.1.2 L'optique non linéaire pour imager la peau

Nos travaux dans le cadre de cette thèse ont pour but d'arriver à observer l'absorption et la pénétration d'une substance appliquée sur la peau grâce aux outils d'optique non linéaire dont nous disposons. Pour cela, nous allons utiliser l'auto-fluorescence à deux photons (TPEF) et les contrastes Raman stimulé CARS et SRS. La TPEF nous permettra d'obtenir une image des structures de la peau, afin de repérer la profondeur et donc la couche dans laquelle se situe l'image, grâce aux caractéristiques morphologiques des différentes strates de l'épiderme (voir 3.2).

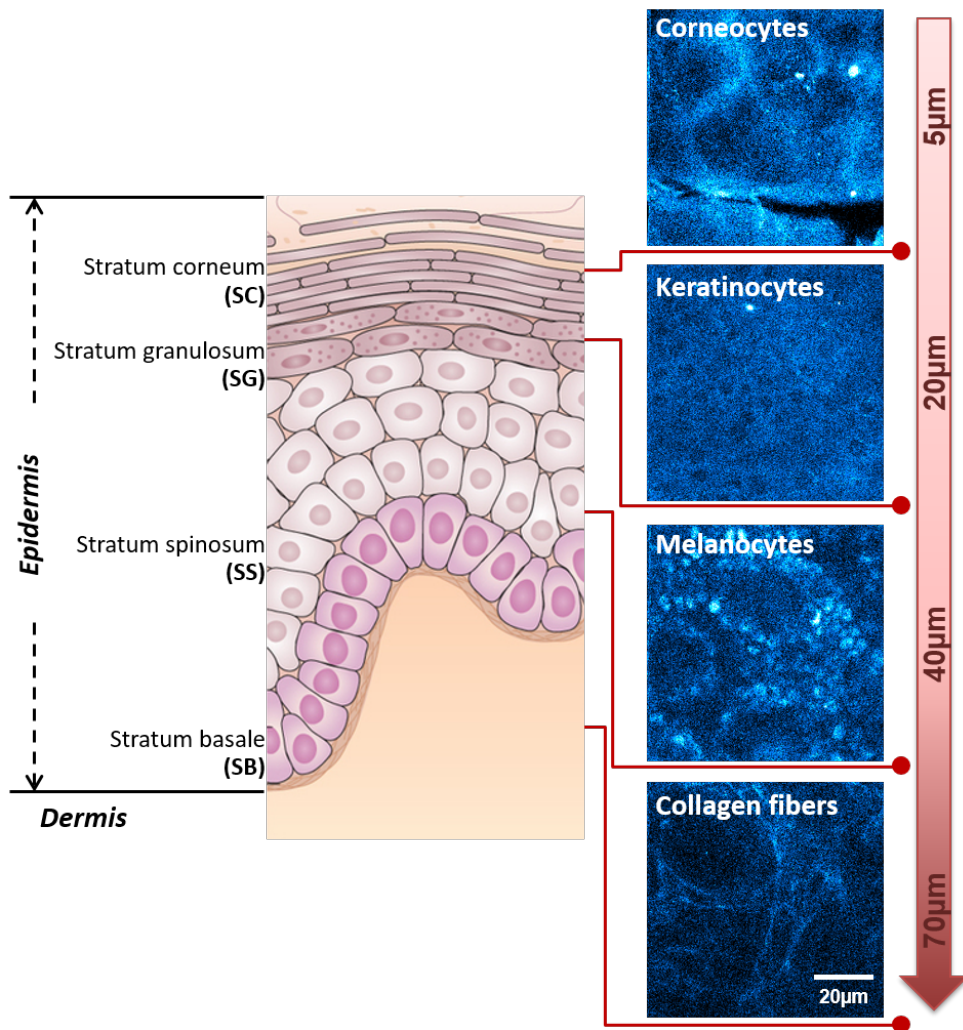


FIGURE 3.2 – Schéma de la structure de l'épiderme. Des images d'auto-fluorescence à deux photons (TPEF) acquises dans un échantillon de peau abdominale provenant de chirurgie sont associées à chacune des quatre strates de l'épiderme. Ces images présentent les éléments et structures caractéristiques en microscopie non linéaire de chacune des couches. Image adaptée de [58].

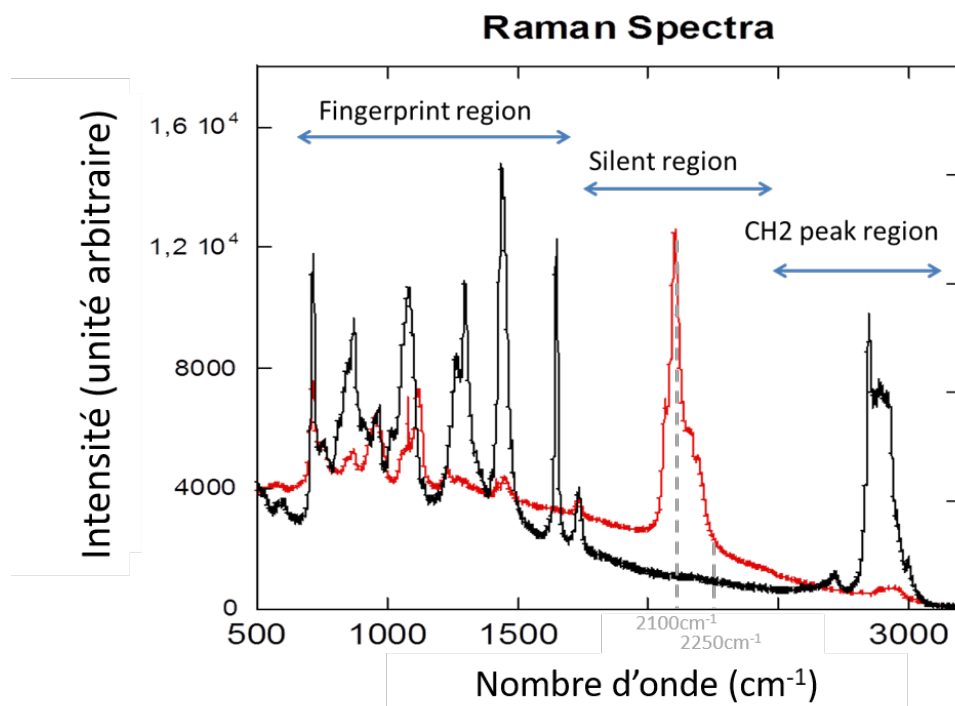


FIGURE 3.3 – Spectre Raman spontané d’une goutte séchée de phospholipide DOPC en noir et DPPCd62 deutéré en rouge. Les phospholipides contiennent une molécule de glycérol. Les nombres d’ondes indiqués en gris correspondent aux énergies sondées grâce aux contrastes Raman cohérent dans nos expériences (2100cm^{-1} pour la résonance de la liaison CD et 2250cm^{-1} pour le signal hors résonance). Image adaptée de [59].

Les processus CARS et SRS vont quant à eux nous permettre de suivre les molécules ciblées dans la peau. Nous utilisons dans nos expériences des molécules deutérées dans lesquelles une partie des atomes d’hydrogène a été remplacée par des atomes de deutérium. En effet, l’énergie de vibration de la liaison carbone-deutérium (C-D) se situe autour de 2100cm^{-1} , dans la zone silencieuse du spectre Raman des échantillons biologiques. La figure 3.3 issue de ([59]) présente les spectres Raman spontané des phospholipides dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) en noir et dipalmitoylphosphatidylcholine deutéré (DPPCd62) en bleu et illustre l’isolement de l’énergie de vibration de la liaison C-D dans les tissus.

De plus, afin d’obtenir la distribution du produit dans la peau sans artefacts, nous allons nous placer à deux énergies différentes et acquérir deux images : une image en résonance à 2100cm^{-1} et une image hors résonance à 2250cm^{-1} (3.3). Nous allons ensuite soustraire ces deux images pour obtenir le signal dû uniquement au processus

CARS ou SRS résonnant de la liaisons C-D du produit tracé.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Échantillons et préparation

Dans le cadre de nos études sur la pénétration d'actifs dans la peau, nous avons majoritairement réalisé deux types d'expérience : des expériences sur plasties, et des expériences *in vivo*. Celles-ci s'inscrivent dans la continuité des travaux de Xueqin Chen qui a débuté cette collaboration avec L'Oréal ([60]).

Les plasties sont des échantillons de peau humaine provenant de chirurgie de l'abdomen pour la plupart. Ils ne contiennent ni poils ni grains de beauté, sont décontaminés avec de la bétadine, et débarassés de la graisse sous-cutanée. Ils sont conservés au congélateur à -20°C après réception et jusqu'à utilisation. Les échantillons sont circulaires, d'un diamètre d'environ 4cm, et d'une épaisseur d'environ 500 μ m (fig. 3.4 b).

Préparation des plasties

Pour pouvoir les imager sur le microscope, les plasties sont d'abord décongelées à température ambiante, puis étirées et fixées sur un support en liège ou en plastique (cellule de Frantz) permettant de conserver l'échantillon hydraté pendant toute la durée de l'expérience (fig. 3.4 b et c). Dans les deux cas de l'eau distillée ou une solution de PBS (tampon phosphate salin) est en contact avec la partie interne de la peau pour assurer cette hydratation. Sur la partie externe, le produit dont on veut étudier la pénétration est appliqué et un séparateur adhésif ainsi qu'une lamelle de verre sont ajoutés au dessus pour permettre l'utilisation d'objectifs à immersion. La quantité de produit appliquée varie de quelques microlitres pour les études en dose finie à plusieurs dizaines de microlitres pour les études en dose infinie : une dose infinie correspond à la présence continue de produit à la surface de l'échantillon pendant toute la durée de l'expérience.

Lorsque nous réalisons des expériences sur la même plastie pendant 24h, l'échantillon est entreposé au réfrigérateur à environ 4°C entre deux sessions de microscopie. En effet, d'une part, laisser l'échantillon à température ambiante entraînerait une nécrose trop rapide des tissus, et d'autre part nous voulons conserver un comportement

3.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

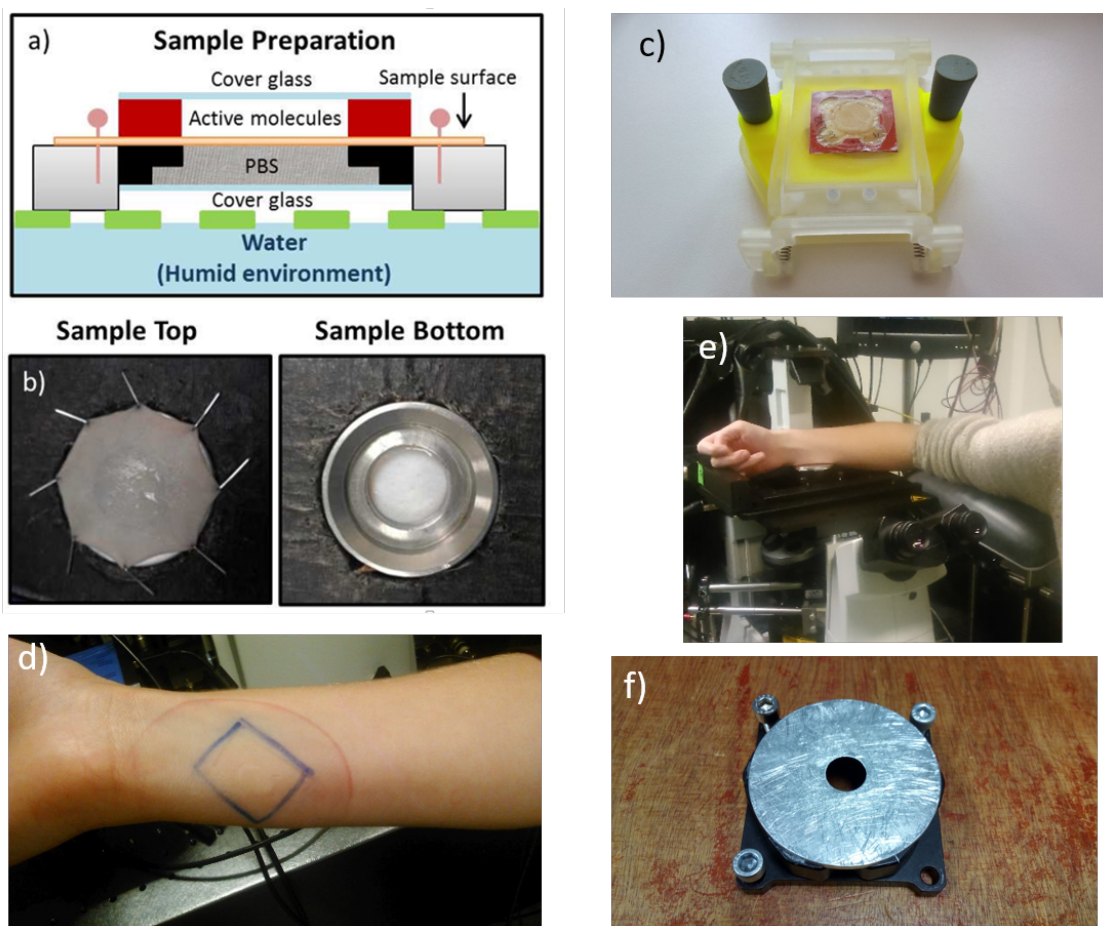


FIGURE 3.4 – Préparation des échantillons. a) Schéma descriptif du support permettant de fixer les plasties. La solution de PBS sur la face interne permet d’hydrater la peau, et le produit étudié est placé sur la face externe (adapté de [58]). b) Photographie des faces externe (à gauche) et interne (à droite) d’une plastie placée sur le support en liège. c) Photographie d’une plastie placée sur la cellule de Franz. La solutions de PBS est dans une cavité à l’intérieur du dispositif. d) Photographie de la zone étudiée pour les expériences *in vivo*. e) Photographie de l’installation requise pour l’imagerie du bras *in vivo*. f) Photographie du support métallique utilisé dans les expériences *in vivo*.

des plasties identique pendant toute la durée de l'expérience (même lorsque nous ne faisons pas de mesures sur l'échantillon), c'est pourquoi nous ne remplaçons pas l'échantillon à -20°C.

Préparation *in vivo*

Pour les expériences *in vivo*, nous nous concentrons sur une zone de l'avant-bras comme présenté en figure 3.4 d), c'est un des endroits du corps où l'épiderme est le plus fin. La peau doit être nettoyée soigneusement avant car les petites poussières et impuretés absorbantes présentes sur la peau sont facilement brûlées par le laser, même à faibles puissances. Cela peut entraîner un fort signal parasite, ainsi que des brûlures de la peau adjacente. De plus, il est nécessaire que la zone étudiée soit dépourvue de poils de couleur sombre, car ils absorbent fortement la lumière.

Nous utilisons un support en métal avec un trou d'environ 1,5cm de diamètre (fig. 3.4 f) sur lequel nous fixons une lamelle de verre. La molécule active est appliquée sur la zone de peau étudiée puis le support est fixé au bras grâce à un séparateur adhésif. Une pièce métallique aimantée complémentaire du support est vissée à la platine de translation du microscope. Un support repose-bras d'hôpital de type gouttière est fixé sur la table d'expérience à côté du microscope pour permettre au sujet de poser son bras pendant une longue période (fig. 3.4 e). Une fois positionné sur le repose-bras, le sujet rassemble les deux parties métalliques aimantées se trouvant sur son bras et sur le microscope afin que le système soit complètement fixé à la platine de translation. L'imagerie par balayage laser et par déplacement mécanique de la platine peut alors commencer.

Remarque

Les expériences sont réalisées en conditions occlusives. Cela signifie que le produit est déposé sur la peau et un séparateur et une lamelle de verre isole le système. La peau n'est pas en contact avec l'air extérieur au cours de nos expériences.

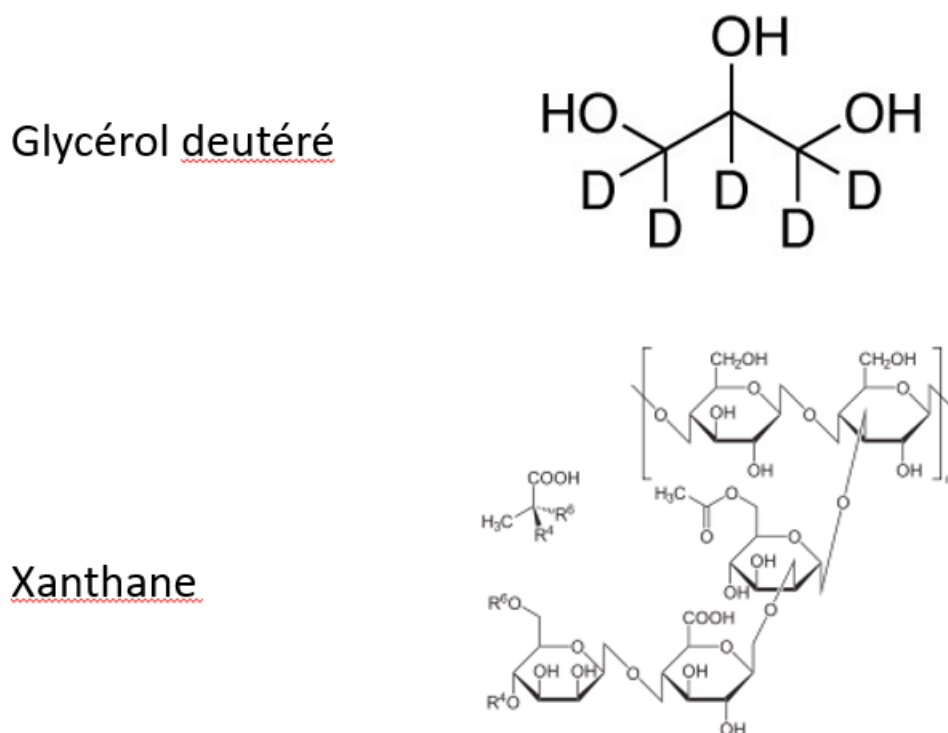


FIGURE 3.5 – Formules chimiques du glycérol deutéré et du gel de xanthane.

Molécules actives utilisées

Les expériences que nous allons présenter dans ce chapitre ont été réalisées avec du glycérol deutéré à différentes concentrations. Le glycérol est le composant principal de la plupart des crèmes cosmétiques destinées à des applications cutanées, car il permet d'hydrater la peau tout en incorporant le principe actif (souvent dosé à quelques pourcents). Lors de nos expériences, le glycérol a été dilué dans deux véhicules différents non deutéré : l'eau et un gel de xanthane. Des solutions de différentes concentrations sont préparées avant les expériences et conservées au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation. La figure 3.5 présente les formules chimiques des différents produits utilisés. Toutes les expériences *in vivo* sont réalisées sur un sujet féminin caucasien âgé de 30 ans.

3.2.2 Installation multimodale et détection

Avec le montage expérimental décrit en 1.3, on utilise le faisceau Stokes à 1031,2nm et les deux faisceaux pompes OPO1 et OPO2 à 837nm et 847,6nm. On cible ainsi les liaisons vibrationnelles à 2250cm^{-1} et 2100cm^{-1} respectivement. Les signaux CARS générés à 704nm (2250cm^{-1}) et 719nm (2100cm^{-1}) sont filtrés avec un filtre passe-bande et récupérés sur le détecteur dédié fonctionnant en régime de comptage de photon. Le signal de TPEF est généré dans le même temps grâce à l'ensemble des faisceaux, et récupéré lui aussi après filtrage grâce à un autre détecteur fonctionnant également en régime de comptage de photons.

Comme les plasties et l'avant-bras sont trop épais pour que la lumière les traverse, l'ensemble de la détection est faite en direction Epi. Les faisceaux excitateurs sont envoyés sur l'échantillon en étant réfléchis par un miroir dichroïque permettant aux photons de longueur d'onde inférieure à 750nm (les signaux CARS et TPEF) d'être transmis et détectés. Nous utilisons un objectif à immersion dans l'eau d'ouverture numérique 1,15 pour focaliser les faisceaux excitateurs sur l'échantillon et récupérer les photons issus des processus non linéaires CARS, SRS et TPEF, qui sont transmis ensuite par le miroir dichroïque et filtrés dans la partie détection Epi du montage (voir fig. 3.6).

Détection Epi SRS

La collection du signal SRS en direction Epi est nécessaire. En effet, les photons détectés lors du processus SRS sont les photons Stokes diffusés par l'échantillon. Pour des échantillons fins, la majorité des photons Stokes est diffusée vers l'avant et est quasi colinéaire aux faisceaux excitateurs. Il est donc aisé de collecter ces photons dans la direction Forward et d'obtenir un signal correct en raison du grand nombre de photons collectés. Lorsque l'échantillon est épais, les photons Stokes sont diffusés dans toutes les directions et nous en collectons une fraction en direction Epi à l'aide de l'objectif de focalisation.

La figure 3.6 présente un schéma descriptif du montage dans la modalité de détection Epi SRS. Après être réfléchis par les miroirs galvanométriques, les faisceaux pompes et Stokes incidents sont réfléchis par un miroir dichroïque à 750nm pour être ensuite dirigés vers l'objectif de focalisation. La modification apportée pour la détection SRS en

3.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

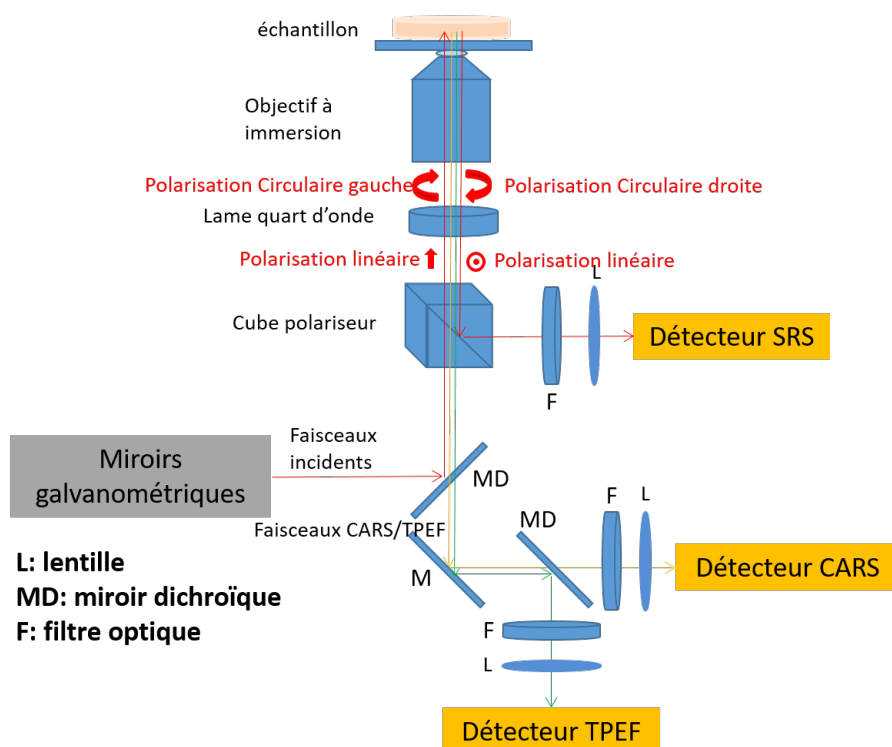


FIGURE 3.6 – Schéma descriptif de la modalité de détection Epi SRS.

direction Epi réside dans l'ajout d'un cube polariseur couplé à une lame quart d'onde. En effet, nous nous servons ici du fait qu'une lumière polarisée circulairement change de sens de rotation lorsqu'elle est réfléchiée. Les faisceaux excitateurs, de polarisation rectiligne, sont totalement transmis à travers le cube polariseur puis la polarisation linéaire est changée en polarisation circulaire gauche en passant au travers de la lame quart d'onde. Une partie de la lumière est ensuite réfléchiée par l'échantillon après interaction avec celui-ci : la polarisation devient circulaire droite. Lorsque les faisceaux pompe et Stokes de polarisation circulaire droite sont de nouveau transmis à travers la lame quart d'onde, leur polarisation redevient rectiligne mais perpendiculaire à celle des faisceaux incidents. Les photons ayant interagit avec l'échantillon sont donc réfléchiés par le cube polariseur puis filtrés spectralement pour ne garder que les photons Stokes qui sont collectés par la photodiode à avalanche couplée à la détection synchrone.

Le signal SRS détecté dépend donc en grande partie de la quantité de lumière réfléchiée par l'échantillon après interaction. Un échantillon de peau caucasienne sera donc plus favorable que celui d'une peau plus pigmentée.

Remarque

Les photons provenant des processus CARS et TPEF ne sont pas réfléchis par l'échantillon mais émis par celui-ci. Ils sont par ailleurs peu impactés par le système de détection SRS et une quantité suffisante est transmise à travers le cube polarisant pour y être ensuite détectée comme décrit précédemment. La modalité que nous avons mis en place permet donc de collecter les signaux SRS, CARS et TPEF de façon simultanée, bien que la quantité de photons CARS et TPEF soit amoindrie par la présence du système de détection SRS.

La puissance des faisceaux incidents sur les échantillons est réglée entre 50mW et 100mW (selon les échantillons). Les miroirs galvanométriques ainsi que le moteur piézoélectrique (déplacement de l'objectif suivant z) nous permettent de déplacer le point focal à l'intérieur de l'échantillon dans une zone cubique d'environ $100\mu\text{m}$ de côté. La platine de translation permet par ailleurs de déplacer l'échantillon afin d'en étudier différentes zones. Dans le cadre des expériences *in vivo*, la platine de translation peut être utilisée sur quelques millimètres seulement sans que l'on ait à bouger l'avant-bras du sujet.

3.2.3 Traitement des données

Le but de nos expériences est d'arriver à suivre l'absorption et la pénétration des composants moléculaires actifs étudiés à l'intérieur des échantillons. Nous cherchons à faire apparaître le produit ciblé en créant des cartes de concentration à partir des données collectées sous forme d'images en profondeur dans les échantillons.

Nous utilisons un programme MATLAB développé par Barbara Sarri durant le déroulement du travail de thèse pour créer et afficher ces cartes. Le processus de traitement varie selon le type d'expérience ainsi que le type d'échantillon étudié. Celui-ci sera décrit dans la suite pour les différentes expériences réalisées.

3.3 Imagerie CARS *in vivo*

Dans cette partie, nous allons décrire tout d'abord les premiers résultats obtenus par Xueqin Chen ([60]) lors du commencement du projet afin d'inscrire nos expériences

dans la continuité de celui-ci. Nous présenterons ensuite nos résultats en ayant pour fil directeur les innovations et progressions en terme de technologie et de traitement pour arriver à un meilleur suivi des actifs moléculaires dans la peau et une meilleure interprétation des données.

3.3.1 Résultats préliminaires

Les premières expériences sur le suivi de molécule dans la peau menées par Xueqin Chen lors de sa thèse ont été réalisées sur des échantillons de type plastie, ainsi que sur des échantillons de type peau reconstruite (Episkin) ([61] et [62]).

La figure 3.7 issue de ([60]) présente une description des différentes données acquises et des traitements apportés afin d'obtenir des informations sur la pénétration des produits et la concentration en profondeur dans les échantillons. Deux images CARS (b) sont obtenues à partir de la plastie (a) : une image en résonnance de la liaison C-D ($I_R(x, y)$) et une image hors résonnance ($I_{NR}(x, y)$). Le signal CARS normalisé ($I_N(x, y)$) (c) est donné par :

$$I_N(x, y) = \frac{I_R(x, y) - I_{NR}(x, y)}{I_{NR}(x, y)}. \quad (3.1)$$

Les valeurs sont ensuite confrontées à une courbe de calibration (d). Cette courbe est obtenue en mesurant le signal obtenu dans les mêmes conditions expérimentales en solution et avec des concentrations connues. Cette courbe permet ainsi d'associer à chaque pixel une concentration, retrouvée à partir de la courbe. Ceci mène à l'établissement d'une carte des concentrations (e) qui nous permet de suivre la façon dont le produit est réparti à travers la peau.

Le signal de fluorescence acquis dans le même temps a pour utilité d'apporter une visibilité sur la structure de la peau ; ceci permet dans un premier temps de se repérer dans les couches de l'épiderme grâce à la morphologie de la peau, et dans un deuxième temps de voir en quels points la pénétration se fait le plus efficacement.

L'acquisition d'images hyperspectrales (g) permet également d'obtenir un spectre CARS en chaque point afin de confirmer la présence du produit deutéré actif dans les zones ciblées.

La figure 3.8 présente des résultats obtenus grâce à cette méthode dans des échantillons de type plasties. Trois produits ont été imagés : l'anti-âge LR2412, du glycérol

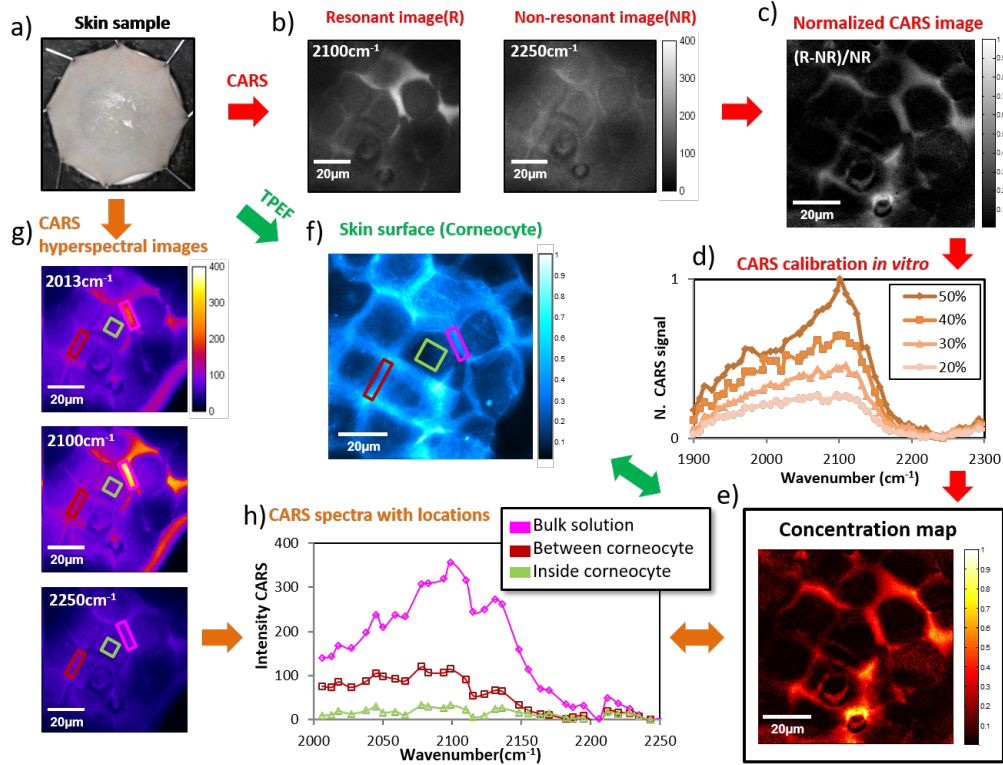


FIGURE 3.7 – Schéma récapitulatif des différentes étapes permettant l'obtention des cartes de concentration. a) Mise en place de l'échantillon. b) Acquisition des images CARS résonnantes et non résonnantes. c) Normalisation du signal. d) Établissement d'une courbe de calibration en fonction de la concentration. e) Création d'une carte de concentration en reliant le signal normalisé à la courbe de calibration. f) Acquisition du signal TPEF pour avoir accès à la morphologie de l'échantillon. g) Acquisition d'images hyperspectrales dans l'échantillon afin d'obtenir les spectres des différents composants h) afin de confirmer la présence du produit deutéré. Figure adaptée de [60].



85

deuté, ainsi que de l'eau deutérée. On peut voir que grâce au signal de TPEF la morphologie de l'échantillon est bien retrouvée et permet de reconnaître la strate de l'épiderme concernée. On peut voir également que la concentration diminue fortement en fonction de la profondeur, en pénétrant en surface entre les cornéocytes pour le glycérol et LR2412, alors que la pénétration est plus homogène pour l'eau. Ce phénomène est dû au caractère hydrophile ou hydrophobe des différents produits.

3.3.2 Premières expériences

Dans la continuité des résultats présentés précédemment, nous avons réalisé des expériences *in vivo* dans des conditions expérimentales similaires. Ces expériences ont pour but d'obtenir des résultats comparables aux expériences sur plasties afin de pouvoir les comparer et mieux comprendre les mécanismes de l'absorption dans la peau vivante.

Les expériences ont toutes été réalisées sur le même sujet d'étude dans une zone de l'avant-bras proche du poignet (sujet féminin caucasien âgé de 30 ans).

Expériences préalables

Dans la partie précédente nous avons expliqué la méthode permettant d'obtenir des cartes de concentration en produit deutéré dans la peau. Nous utilisons ici la même méthode transposée aux expériences *in vivo*. Pour établir une courbe de calibration, nous avons établi des spectre CARS dans du glycérol pour différentes concentrations dans l'eau allant de 5 à 100% massique. La figure 3.9 présente les spectres ainsi que la courbe de calibration obtenue en mesurant pour chaque concentration la valeur résonnante (au niveau du pic le plus grand à 2100cm^{-1}) moins la valeur non résonnante (à 2250cm^{-1}), le tout divisé par la valeur non résonnante (3.3.1) et normalisé à 1 pour la valeur à 50% de glycérol. Le profil oscillant des spectres est dû aux variations de la puissance lors du changement de longueur d'onde.

Cette courbe sera utilisée afin de retrouver la valeur de la concentration en glycérol deutéré en chaque pixel des images obtenues.

Configuration expérimentale : Switch-CARS, Switch-SRS

Afin d'obtenir les deux images qui nous intéressent, à savoir en résonnance et hors résonnance, nous utilisons la modalité Switch décrite en 2.3.2 permettant d'alterner

3.3. IMAGERIE CARS *IN VIVO*

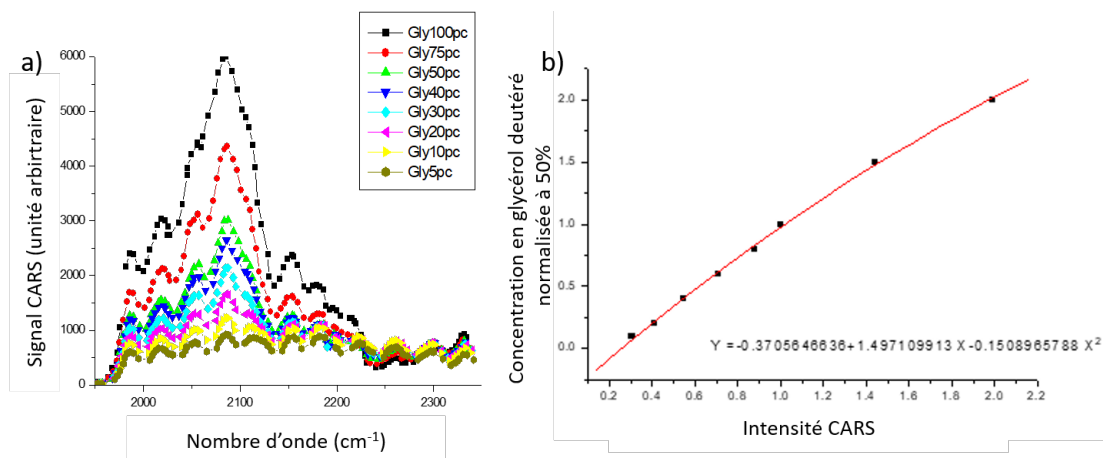


FIGURE 3.9 – a) Spectre CARS du glycérol deutéré pour différentes concentrations. GlyXXpc : glycérol de concentration XX% massique dilué dans l'eau. b) Courbe de calibration associant la concentration au signal CARS mesuré.

entre les deux faisceaux lasers pompes entre chaque image, pendant que le faisceau Stokes éclaire l'échantillon en permanence.

La mise en place de cette modalité a été un élément clé des expériences *in vivo*. En effet, les expériences de Xueqin Chen présentées dans la partie précédentes ont été réalisées sur des échantillons de type plasties, donc étirés et fixés sur un support solide. Ces conditions expérimentales permettaient de scanner l'échantillon une fois pour une liaison vibrationnelle, puis de changer la longueur d'onde d'un des lasers et recommencer le scan de la même zone en sondant une autre liaison vibrationnelle, sans mouvement de l'échantillon. Ce procédé n'était pas possible lors d'une expérience *in vivo*, car bien que le sujet et le bras restent immobiles, et que le bras soit fixé au support métallique grâce à un adhésif, des mouvements incontrôlés et involontaires sont inévitables. Bien qu'ils soient de faible amplitude, les mouvements durant un scan de plusieurs minutes ou dizaines de minutes peuvent rendre impossible la construction du signal normalisé obtenu en soustrayant une image à l'autre.

La modalité Switch-CARS permet d'obtenir deux images consécutives de la même zone de l'échantillon à seulement quelques secondes d'intervalle. Ainsi même dans le cas d'un mouvement régulier sur toute la durée d'un scan, cette méthode permet de calculer le signal CARS normalisé en tout point de la zone imagée (3.10).

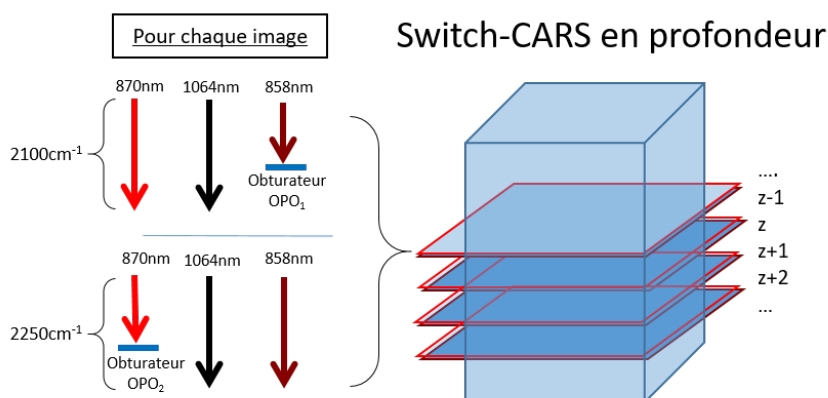


FIGURE 3.10 – Schéma de principe de la modalité Switch-CARS.

Remarque

Ces expériences ont été réalisées au mois d'avril 2016, et le laser permettant le pompage optique des OPOs ainsi que fournissant le faisceau Stokes est un laser néodyme YAG délivrant des impulsions d'une durée de 5ps. Ce laser a été remplacé durant ce travail de thèse par un laser Ytterbium délivrant des impulsions de 2ps et permettant d'améliorer significativement la qualité des signaux CARS et SRS. Néanmoins les résultats figurant dans la partie suivante et obtenus avec les impulsions de 5ps de durée constituent une étape essentielle dans la démarche d'amélioration que nous avons eu au cours de cette thèse.

Le faisceaux Stokes est à 1064nm. Pour cibler la liaisons C-D à 2100cm^{-1} le faisceau pompe provenant de l'OPO1 est réglé à 869,7nm. L'autre faisceau est réglé à 858,5nm afin de générer un processus CARS non résonnant à 2250cm^{-1} . Le système de détection Epi SRS (3.2.2) n'étant pas installé lors de ces premières expériences *in vivo*, les signaux CARS et TPEF ne sont pas perturbés et les conditions expérimentales sont très proches de celles des résultats sur plastie obtenus par Xueqin Chen (3.3.1).

Premiers résultats

La figure 3.11 présente un exemple d'imagerie *in vivo* après application de $30\mu\text{L}$ de glycérol deutéré à 50% massique dans l'eau sur la peau. La puissance des faisceaux excitateurs est réglée à 50mW en entrée de microscope. L'objectif utilisé est un objectif

3.3. IMAGERIE CARS *IN VIVO*

Nikon à immersion dans l'eau de grossissement x40 et d'ouverture numérique 1,15. La figure ?? a montre plusieurs images TPEF, où l'on peut reconnaître les différentes strates de la peau en profondeur grâce à la morphologie de l'échantillon. La figure ?? c montre une image de carte de concentration obtenue en appliquant la formule de normalisation 3.1 aux signaux CARS résonnant et non résonnant obtenus à la même position (?? b). La concentration est normalisée sur le signal obtenu dans le réservoir de glycérol deutéré à la surface de la peau (pour $z < 0$). On observe sur la figure ?? c des concentrations supérieures à 1, correspondant à des concentrations de glycérol supérieures à celle du produit déposé en surface. On peut l'expliquer en considérant la peau comme un solvant inhomogène dans lequel le coefficient de partage du glycérol entre l'eau et la peau varie dans l'espace. Ainsi, le glycérol aura tendance à pénétrer plus rapidement en certains points et atteindre une concentration plus forte dans la peau que dans l'eau. La figure ?? d présente la concentration moyenne des pixels d'une image en glycérol deutéré en fonction de la profondeur dans la peau. On voit que la concentration diminue en fonction de la profondeur. De plus, l'utilisation du scan de TPEF permet de mettre en évidence les différentes strates de l'épiderme et on constate que les variations de la courbe changent en fonction de la couche traversée.

La mise en place de la configuration Switch-CARS a permis d'adapter avec succès la méthode d'imagerie de la peau aux expériences *in vivo*, et des résultats similaires avec ceux obtenus sur plasties ont pu être mis en évidence. Nous sommes ainsi capables d'observer la pénétration du produit à travers l'épiderme jusqu'à quelques dizaines de micromètres de profondeur. Cette étude a également montré que les échantillons de peau chirurgicaux sont fortement similaires à la peau humaine *in vivo* et constituent donc un très bon objet d'étude permettant de faire des expériences pré-vivo.

Dans le but de faire une étude plus approfondie de la pénétration d'actifs dans la peau, nous avons effectué une étude de l'évolution de la concentration en fonction de la profondeur et au cours du temps. Pour ces expériences, nous avons appliqué 30 μ L de glycérol deutéré dilué dans l'eau sur l'avant-bras du sujet à une concentration de 50%. Nous avons ensuite imagé la zone enduite au cours du temps, et nous avons appliqué la méthode décrite ci-dessus afin d'obtenir des cartes de concentration. La figure 3.12 présente les courbes de concentration en fonction de la profondeur obtenues en calculant la concentration moyenne d'une image à une profondeur donnée. Les différentes courbes rouges ont été obtenues à des temps après application allant de 15 minutes à 4h

20 minutes. Sur chaque graphique, la courbe noire sert de référence, et a été obtenue en effectuant la même expérience dans la peau sans glycérol deutéré : elle présente donc la soustraction des signaux CARS à 2100cm^{-1} - 2250cm^{-1} , divisée par le signal non résonnant à 2250cm^{-1} . Cela montre la limite de l'approche Switch-CARS, car on attendrais un signal nul lorsque aucun produit deutéré n'est déposé sur la peau. Cela est dû au fait que les signaux sont mesurés à des temps différents et affectés d'un bruit différents, et en même temps que le signal CARS n'est pas constant spectralement dans la peau ($I_{\text{CARS}}(2100\text{cm}^{-1}) \neq I_{\text{CARS}}(2250\text{cm}^{-1})$). Nous utilisons cette courbe comme référence du minimum de signal, correspondant à l'absence de glycérol.

La concentration moyenne diminue en fonction de la profondeur et tend à rejoindre la courbe de référence à une profondeur de plusieurs dizaines de micromètres. On peut également voir que la concentration moyenne en glycérol deutéré rejoint la courbe de référence au cours du temps. Nous pouvons en déduire que le glycérol imprègne rapi-

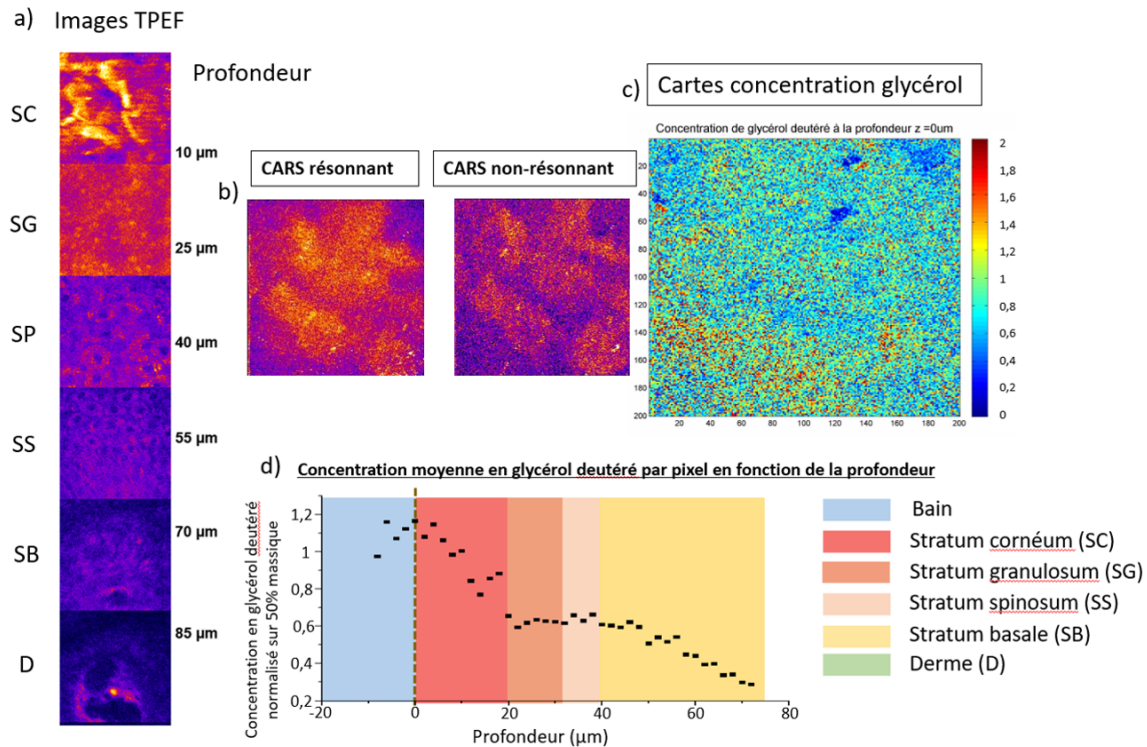


FIGURE 3.11 – Récapitulatif des premiers résultats d'expérience *in vivo*. a) Images de TPEF à différentes profondeurs dans la peau. b) Image CARS résonnante et non résonnante de la même zone. c) Carte de concentration en glycérol deutéré. d) Courbe de la concentration moyenne par pixel en fonction de la profondeur. La concentration est normalisée sur la valeur mesurée dans le réservoir ($z < 0$) de glycérol deutéré à 50% massique dans l'eau.

dement la peau puis se dissipe progressivement en plusieurs heures après application.

3.3.3 Évolution de la méthode de traitement

Dans une démarche d'amélioration des performances du montage expérimental nous avons remplacé le laser néodyme YAG délivrant des impulsions laser d'une durée de 5ps permettant de pomper optiquement les OPOs et fournissant le faisceau Stokes à 1064nm par un laser fibré Ytterbium Emerald Engine délivrant des impulsions de 2ps à 1031,2nm. Ainsi, pour une puissance moyenne des faisceaux d'excitation identiques, et sur le même échantillon, l'intensité mesurée pour les différents processus non linéaires augmente d'un facteur cinq environ.

Équilibrage des faisceaux

Pourtant cette amélioration de l'amplitude des signaux entraîne une nouvelle difficulté : l'équilibrage de l'efficacité entre les différentes combinaisons de faisceaux qui sondent les signaux résonnants et non résonnants. En effet, par construction, la méthode Switch-CARS développée pour contrer les mouvements de l'échantillon, entraîne l'utilisation de trois faisceaux laser combinés en deux paires afin de sonder deux énergies différentes : l'énergie de vibration de la liaison C-D (à 2100cm^{-1}), et l'énergie dite hors résonnance (à 2250cm^{-1}) permettant de mesurer l'impact du bruit. Ces deux intensités sont ensuite soustraites afin de calculer le signal provenant exclusivement de la liaison vibrationnelle C-D.

Lors de ce raisonnement nous faisons un postulat implicite, celui que les deux faisceaux pompes issus des OPOs se comportent exactement de la même manière. On considère que pour une même énergie et une même longueur d'onde, les deux paires de faisceaux vont donner strictement le même signal. Or nous nous sommes aperçu avec l'augmentation significative du signal CARS, en particulier celle du signal non résonnant, que les conditions expérimentales ne vérifient pas toujours ce postulat.

En effet, l'efficacité du processus CARS dépend d'une multitude de facteurs, notamment la polarisation entre les faisceaux mis en jeu, ainsi que la divergence et leur recouvrement spatio-temporel. Il est donc essentiel avant chaque expérience de vérifier et faire en sorte que les deux lasers pompes aient un impact identique lors des processus non linéaires. Nous mesurons donc le signal à la même énergie vibrationnelle pour les

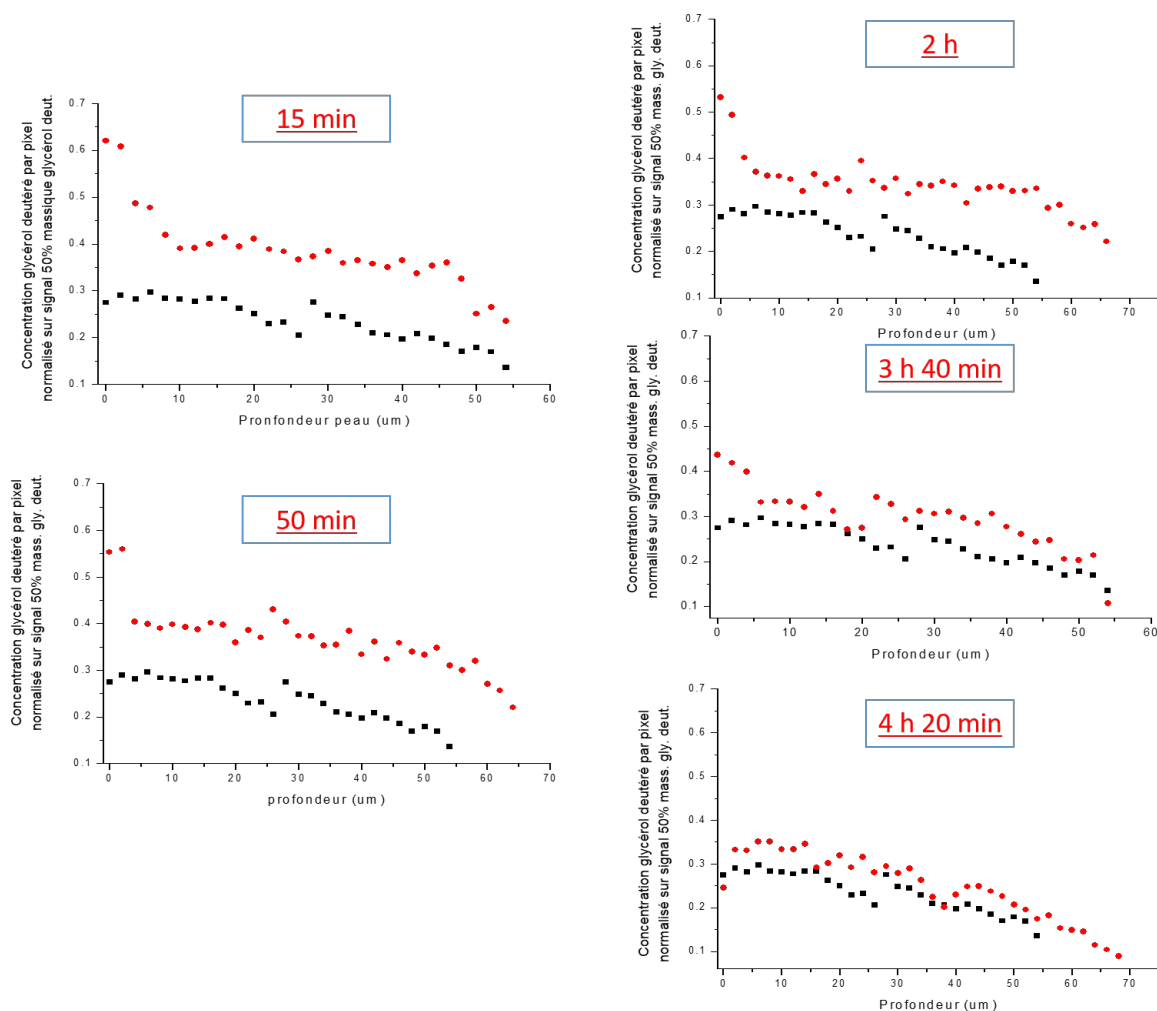


FIGURE 3.12 – Courbes de la concentration moyenne en glycérol deutéré dilué dans l'eau à 50% en fonction de la profondeur et au cours du temps, jusqu'à à 4h 20min après application. Conditions expérimentales : 30 μ L de glycérol deutéré appliqués à t=0. Les images ont été acquises avec une résolution de 200x200pts, avec un temps d'acquisition de 40 μ s par pixel, avec un moyennage sur 4 images. Les images ont été acquises pour des profondeurs de 0 à 60 μ m environ, avec un pas de mesure de 2 μ m.

deux combinaisons de faisceaux pompe-Stokes issus des deux OPOs et dans un même échantillon. Nous avons tout d'abord mis en place des télescopes permettant d'agir sur la divergence des lasers afin d'optimiser le recouvrement entre les faisceaux pompe et Stokes. Ensuite, nous avons mis en place un système permettant de contrôler l'état de polarisation des différents faisceaux afin d'optimiser le signal CARS généré ([11] [63]). Enfin les puissances des faisceaux pompes sont réglées de sorte à obtenir le même signal CARS pour les deux paires de faisceaux et à la même énergie vibrationnelle : l'équilibre des efficacités prévaut sur l'égalité des puissances moyennes utilisées.

Éfficacité de détection moléculaire

Nous introduisons également une nouvelle notion : l'efficacité de détection moléculaire (EDM). En effet, plus on se place en profondeur dans l'échantillon, plus la diffusion est forte, et plus la quantité de signal collecté est faible. L'efficacité de détection dépend donc de la profondeur et du caractère diffusant de l'échantillon, et seule la concentration mesurée en surface de l'échantillon à l'aide des signaux CARS peut être comparée à la courbe de concentration obtenue en solution. Nous définissons l'efficacité de détection moléculaire (EDM) comme le signal CARS non résonnant normalisé dans la peau sans produit actif, afin d'éviter tout biais potentiel induit par la présence de produit deutéré. La courbe de la figure 3.13a) présente l'EDM obtenue dans un échantillon représentatif, nous utiliserons cette courbe dans la suite pour les traitements.

Pour connaître la concentration de produit deutéré en tout point de l'échantillon, nous calculons donc la différence de signal $\Delta I(z) = I_R(z) - I_{NR}(z)$ que nous divisons par EDM(z), où $I_R(z)$ et $I_{NR}(z)$ sont les signaux CARS résonnant (2100cm^{-1}) et non résonnant (2250^{-1}) obtenus en fonction de la profondeur dans l'échantillon. Enfin nous relierons cette grandeur à la concentration grâce à un point de l'échantillon pour lequel nous connaissons la concentration, nommée S_0 . Nous choisissons ce point à l'intérieur d'une ride de la peau où le produit que nous avons appliqué est présent, la concentration est alors définie par :

$$C(x, y, z) = C_0 \frac{\Delta I(x, y, z)}{EDM(z) * S_0} \quad (3.2)$$

où C_0 est la concentration du produit appliqué en surface de l'échantillon. Cette dernière étape n'est possible qu'à la condition où le signal CARS est directement propor-

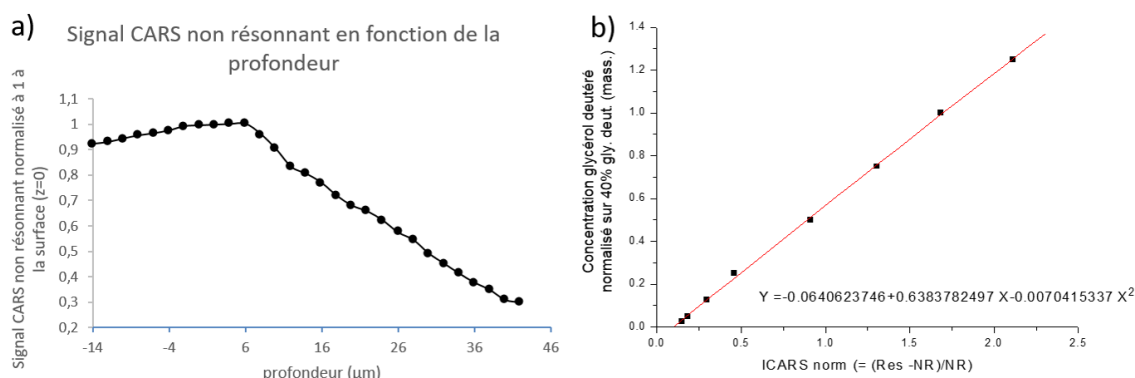


FIGURE 3.13 – a) Courbe de référence (EDM) du signal CARS non résonnant dans la peau sans application de produit. chaque point est issue de la moyenne de l'ensemble des pixels de l'image à une profondeur donnée. Les images ont été acquises avec une résolution de 200x200pts, un temps d'acquisition de 40μs par pixel et un moyennage sur 4 images. Un image est acquise tous les 2μm sur une profondeur totale d'environ 60μm. Le signal CARS non résonnant est normalisé à la surface de la peau (z=0). b) Courbe de calibration associant la concentration en glycérol deutéré au signal CARS mesuré (normalisé pour une concentration de 40% massique dans l'eau).

tionnel à la concentration en produit. La figure 3.13b) présente la courbe de calibration obtenue dans des solutions de glycérol deutéré à différentes concentrations massiques dans l'eau. Cette courbe montre que la condition de proportionnalité est vérifié expérimentalement, en raison de la forte contribution du signal non résonnant.

3.3.4 Étude de l'utilisation de gel de Xanthane comme véhicule

Dans cette partie, nous comparons la pénétration de glycérol deutéré concentré à 40% dans la peau pour deux véhicules différents. Dans le premier cas le glycérol est dilué dans de l'eau, dans le deuxième il est dilué dans un gel de xanthane (3.5). L'expérience est réalisé sur l'avant-bras, dans une zone proche du poignet, car l'épiderme y est particulièrement fin. 30μL de produit sont appliqués sur la zone, puis la peau est massée pendant trois minutes et laissée à l'air libre pendant deux minutes avant d'être fixée sur la pièce en métal et positionnée sur le microscope (3.4). La suite de l'expérience est donc réalisée en condition occlusive. La puissance est de 70mW pour chaque faisceau à l'entrée du microscope.

La figure 3.14 présente des cartes de concentration (x,z) à différentes durées après application pour du glycérol deutéré à 40% massique dans de l'eau. Ces cartes sont obtenues en projetant le cube de données (x,y,z) sur le plan (x,z) uniquement (intégration

3.3. IMAGERIE CARS *IN VIVO*

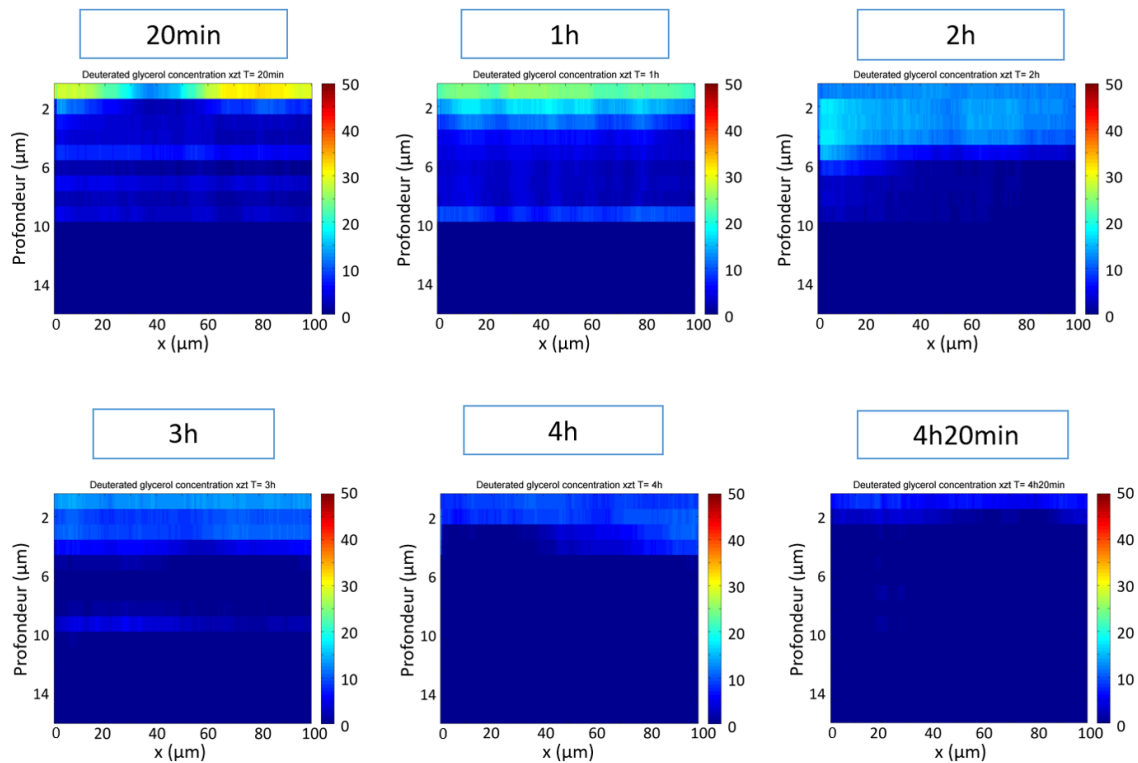


FIGURE 3.14 – Cartes de concentrations (x,z) en glycérol deutéré en fonction de la profondeur au cours du temps. Échantillon de peau *in vivo* avec application de glycérol deutéré à 40% dilué dans de l'eau. Les cubes d'images (x,y,z) ont été acquis avec une résolution de 200x200pts, un temps d'acquisition de 40 μ s par pixel, avec un moyennage sur 4 images. Les images ont été acquises pour des profondeurs de 0 à 20 μ m environ, avec un pas de mesure de 2 μ m. Échelle de concentration : % de glycérol deutéré.

suivant y). Pour tous les points ayant le même x , on calcule la moyenne de la valeur des pixels suivant y . Cette méthode permet d'avoir un regard global sur la pénétration dans la peau en fonction de la profondeur.

Ces cartes montrent que la pénétration du glycérol se fait majoritairement en surface ; aucune trace du produit n'est décelée au delà d'une quinzaine de micromètres. Ce constat permet également de vérifier que la correction apportée par l'efficacité de détection moléculaire est très importante. La précédente méthode de traitement des images entraînait une amplification des artefacts en profondeur : le signal non résonnant étant de plus en plus faible avec la profondeur, sa présence au dénominateur dans la formule de calcul de concentration amplifiait fortement le signal. Le produit deutéré est donc majoritairement diffusé dans les 15 à 20 premiers micromètres après la surface.

De plus, on constate que la diffusion est immédiate, et que le glycérol commence à

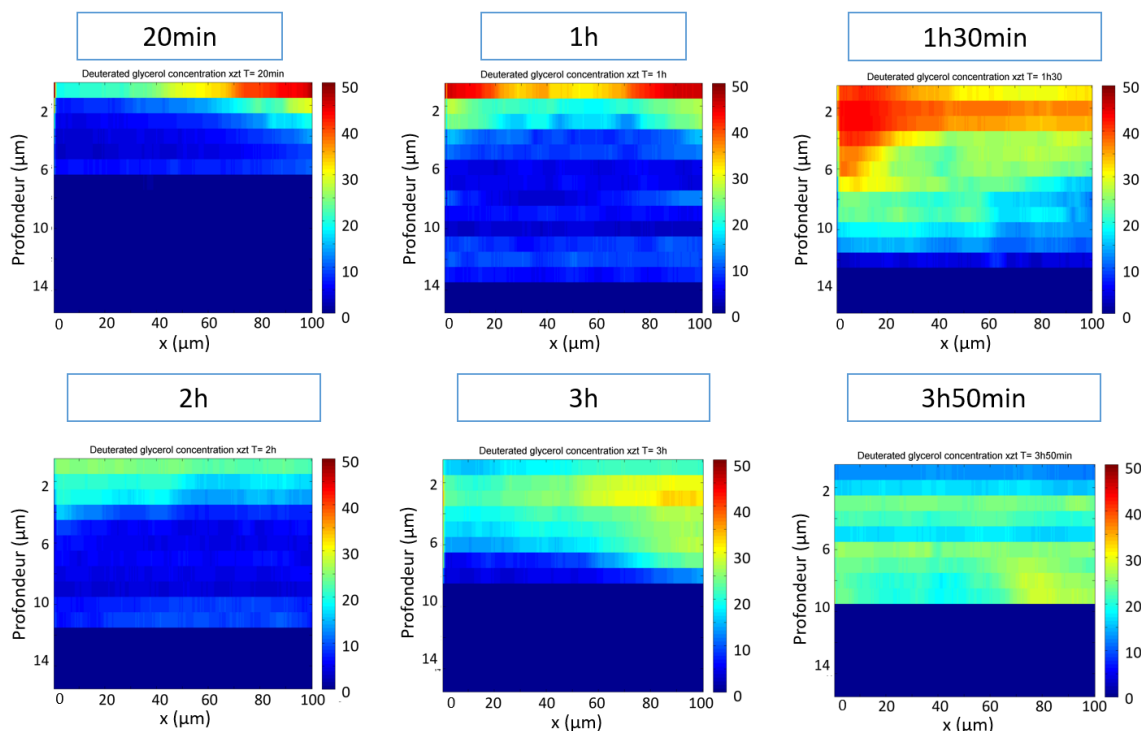


FIGURE 3.15 – Cartes de concentrations (x,z) en glycérol deutéré en fonction de la profondeur au cours du temps. Échantillon de peau *in vivo* avec application de glycérol deutéré à 40% dilué dans du gel de xanthane. Les cubes d'images (x,y,z) ont été acquis avec une résolution de 200×200 pts, avec un temps d'acquisition de $40 \mu s$ par pixel, avec un moyennage sur 4 images. Les images ont été acquises pour des profondeurs de 0 à $20 \mu m$ environ, avec un pas de mesure de $2 \mu m$. Échelle de concentration : % de glycérol deutéré.

se dissiper au delà de quelques heures. Au bout de 4h20 il ne reste quasiment plus de produit.

La figure 3.15 présente des cartes de concentration (x,z) pour du glycérol à 40% dans du gel de Xanthane. On constate immédiatement que la concentration en glycérol deutéré est globalement plus élevée. De plus, la pénétration se fait de façon plus lente : au bout de 3h50 il n'y a pas eu dissipation complète du produit, dont on peut voir la présence en profondeur.

Le xanthane permet de conserver une fine couche de produit à la surface de la peau, comme le montre la figure 3.16 a. Cette couche agit comme un réservoir qui permet de ralentir la dissipation du produit, et assure la diffusion du produit de façon continue pendant plusieurs heures même après une application ponctuelle. Nous pouvons ainsi en déduire que l'utilisation du xanthane comme véhicule pour le glycérol permet une

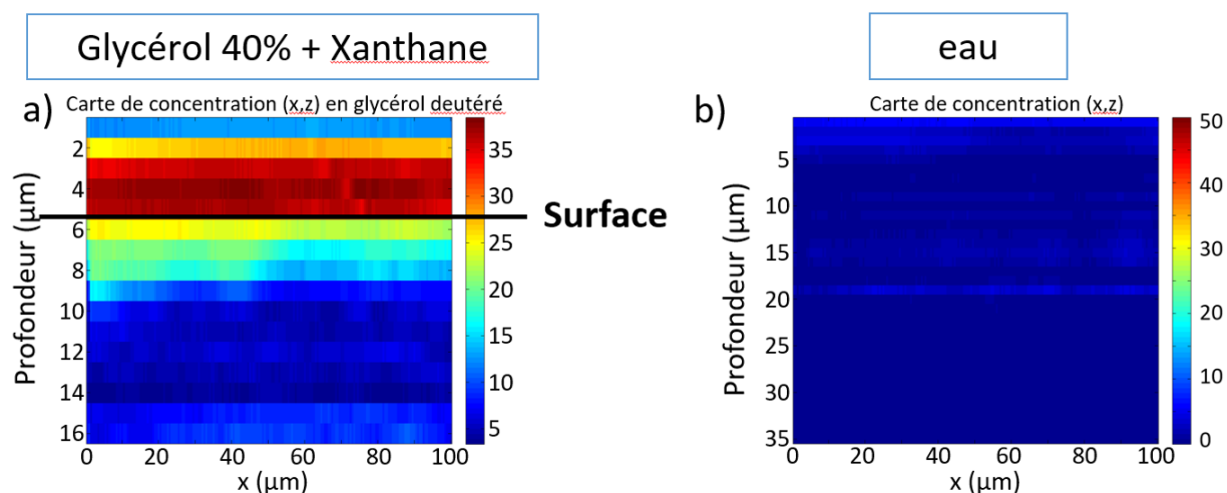


FIGURE 3.16 – a) Carte de concentration (x,z) en glycérol deutéré dans la peau 2 heures après application. L'acquisition a été faite autour de la surface avec un pas de $2\mu\text{m}$. b) Carte de concentration (x,z) sur un échantillon de peau *in vivo* sans glycérol deutéré.

diffusion plus continue dans le temps, entraînant une efficacité prolongée du produit par rapport à l'eau pour les mêmes conditions d'application.

Remarque

Afin de s'assurer que les zones de faibles concentrations ne sont pas dues à des artefacts, nous avons reproduit les expériences dans la peau en appliquant simplement de l'eau en surface, sans glycérol deutéré (3.16 b). Le signal obtenu est inférieur à une concentration théorique d'environ 8% (0,2 sur l'échelle normée pour 40% de glycérol), les artefacts dans la peau sont donc assez faibles pour ne pas impacter les concentrations mesurées dans le cadre de l'application de glycérol à 40% visibles présentées précédemment. Une partie de ce signal parasite provient du bruit électronique provenant des appareils électroniques. Néanmoins la majorité du signal parasite est engendrée par des éléments fortement absorbant à l'intérieur de la peau qui vont brûler au point focal, ce qui explique que le bruit ne soit pas homogène : on observe du signal parasite seulement à certaines profondeurs.

3.4 Modalité SRS et FM-SRS

Dans cette partie, nous présentons des résultats obtenus dans la modalité Epi SRS et Epi FM-SRS, dans le but de les comparer aux résultats CARS sur les mêmes échantillons.

3.4.1 Preuve de principe

L'utilisation de la technique de Raman stimulé (1.2.4) permet de s'affranchir du signal provenant des processus CARS non résonnants. Nous avons donc mis en place un système permettant de détecter le signal SRS en direction Epi afin d'imager la peau grâce à cette technique (3.2.2).

En effet, la méthode switch-CARS présentée précédemment permettant d'obtenir la concentration à partir de la soustraction entre le signal CARS résonnant et non résonnant est efficace pour de fortes concentrations, mais elle est limitée dans le cadre de faibles concentrations et du mouvement résiduel de l'échantillon durant la mesure (plateau de la Fig. 3.12). La figure 3.17 présente la courbe des signaux CARS résonnant et non résonnant en fonction de la concentration en glycérol deutéré dans l'eau. La relation entre le signal CARS résonnant et la concentration n'est plus linéaire lorsqu'on s'approche des faibles concentrations. De plus, le signal CARS non résonnant augmente et devient supérieur au signal résonnant lorsque l'on s'approche de zéro. Ce comportement est dû au fait que le signal CARS à 2250cm^{-1} dans l'eau est plus fort que le signal à 2100cm^{-1} .

La figure 3.18 présente les courbes des signaux SRS aux énergies résonnante et non résonnante ainsi que le signal FM-SRS en fonction de la concentration en glycérol deutéré dans l'eau. On constate sur la figure de droite qu'il existe une relation linéaire entre le signal FM-SRS et la concentration en glycérol deutéré dans la limite de petites concentrations. En revanche, le signal SRS n'est pas directement proportionnel à la concentration, probablement en raison des différents artefacts décrits en 1.14 qui varient fortement à faible concentration avec la proportion glycérol-solvant.

La technique FM-SRS permet de s'affranchir quasiment totalement des artefacts influant sur la mesure SRS, notamment dans des milieux non homogènes comme la peau. Afin de vérifier l'impact positif de cette méthode, nous avons réalisé une expérience dans un milieu inhomogène simple, un échantillon de papier optique Thorlabs. La fi-

3.4. MODALITÉ SRS ET FM-SRS

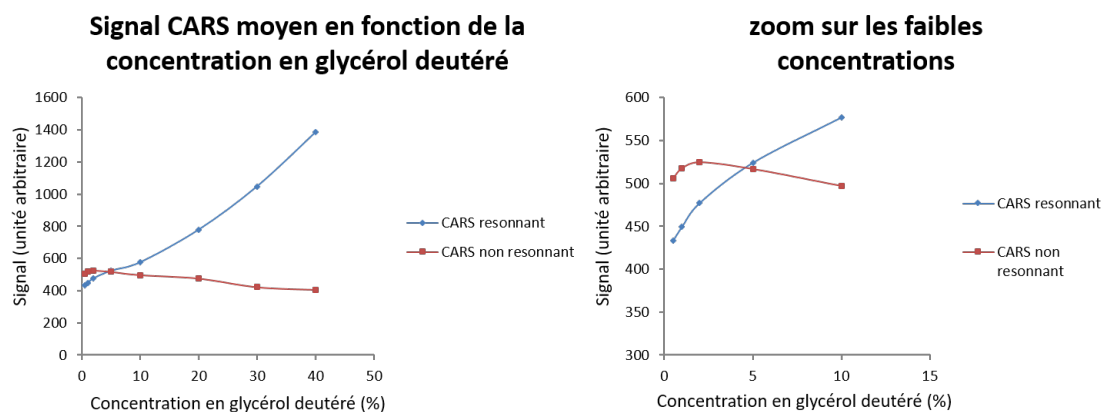


FIGURE 3.17 – Courbes du signal CARS en fonction de la concentration en glycérol deutéré dilué dans l'eau. La courbe bleue présente le signal CARS obtenu à 2100cm^{-1} , la courbe rouge le signal CARS à 2250cm^{-1} . Les images ont été acquises en solution avec une résolution de 100×100 pts, et un temps d'acquisition de $40\mu\text{s}$ par pixel, avec un moyennage sur 10 images.

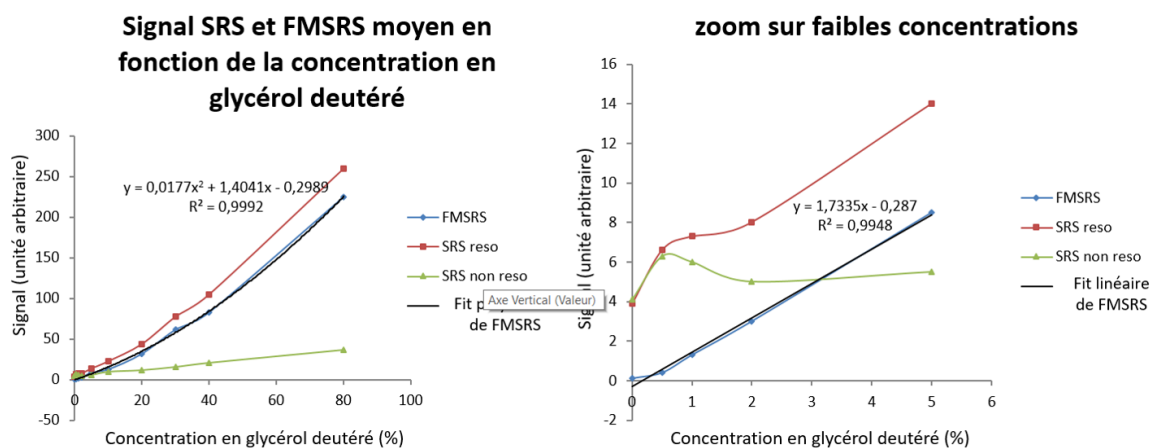


FIGURE 3.18 – Courbes du signal SRS et FM-SRS en fonction de la concentration en glycérol deutéré. La courbe rouge présente le signal SRS obtenu à 2100cm^{-1} , la courbe verte le signal SRS à 2250cm^{-1} , et la courbe bleue le signal FM-SRS. Les images ont été acquises en solution avec une résolution de 100×100 pts, et un temps d'acquisition de $40\mu\text{s}$ par pixel, avec un moyennage sur 10 images.

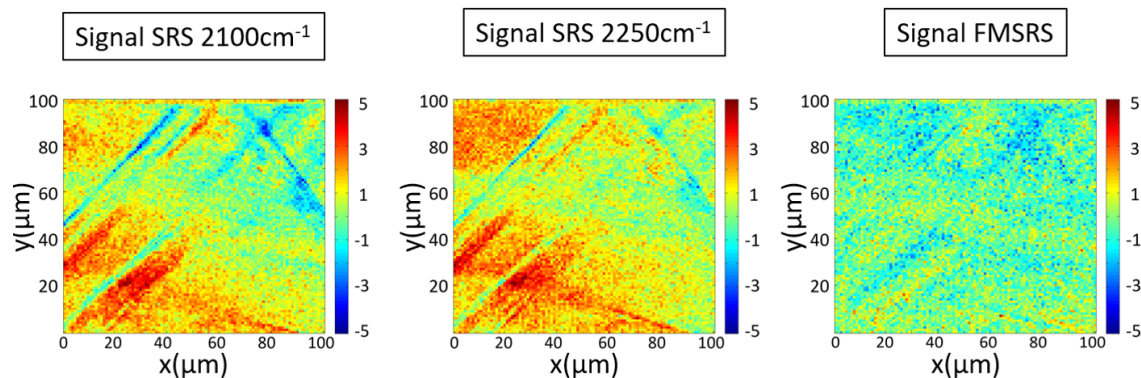


FIGURE 3.19 – Cartes de concentration en glycérol deutéré dans les modalités SRS résonnant (2100cm^{-1}), SRS non résonnant (2250cm^{-1}), et FM-SRS. Échantillon : eau non deutérée dans un morceau de papier optique Thorlabs. La résolution des images de $100 \times 100 \mu\text{m}$ est de $200 \times 200 \text{pts}$, avec un temps d'acquisition par pixel de $40 \mu\text{s}$, et un moyennage sur 4 images. Échelle de concentration : % de glycérol deutéré.

gure 3.19 présente les images obtenues en modalité SRS aux énergies de 2100cm^{-1} , 2250cm^{-1} , et FM-SRS entre ces deux énergies, pour un échantillon de papier Thorlabs avec de l'eau. Nous attendons donc un signal nul sur l'ensemble de l'image. Pourtant, les images SRS présentent des structures d'une intensité comparables à du signal dans du glycérol à 5%. En revanche, le signal issu de la différence entre les deux signaux SRS permet de réduire significativement ces structures, comme on peut le voir sur l'image de droite.

Des tests ont été ensuite réalisés avec du glycérol deutéré dilués dans l'eau à 40% et à 10% massique. La figure 3.20 montre des images SRS et FM-SRS acquises à la même position dans l'échantillon afin de comparer les contrastes. Une goutte d'environ $5 \mu\text{L}$ est déposée sur un morceau de papier optique puis scellée entre deux lamelles de verre. Le papier optique étant particulièrement fin, les données ont été mesurées en transmission, et donc en direction Forward. Les puissances lasers utilisées ont été réglées à 100mW en entrée de microscope. Les images 3.20 a, b et c, comparent les signaux SRS et FM-SRS pour du glycérol à 40%. On peut voir que les zones identifiées comme contenant du produit sont identiques entre le signal FM-SRS et le signal SRS à l'énergie de résonance de la liaison C-D. Pourtant, ces images montrent que le signal SRS est plus fort que le signal FM-SRS, car la mesure est perturbée par les artefacts précédemment décrits, comme le montre l'image acquise à l'énergie non résonnante. La technique FM-SRS apporte donc

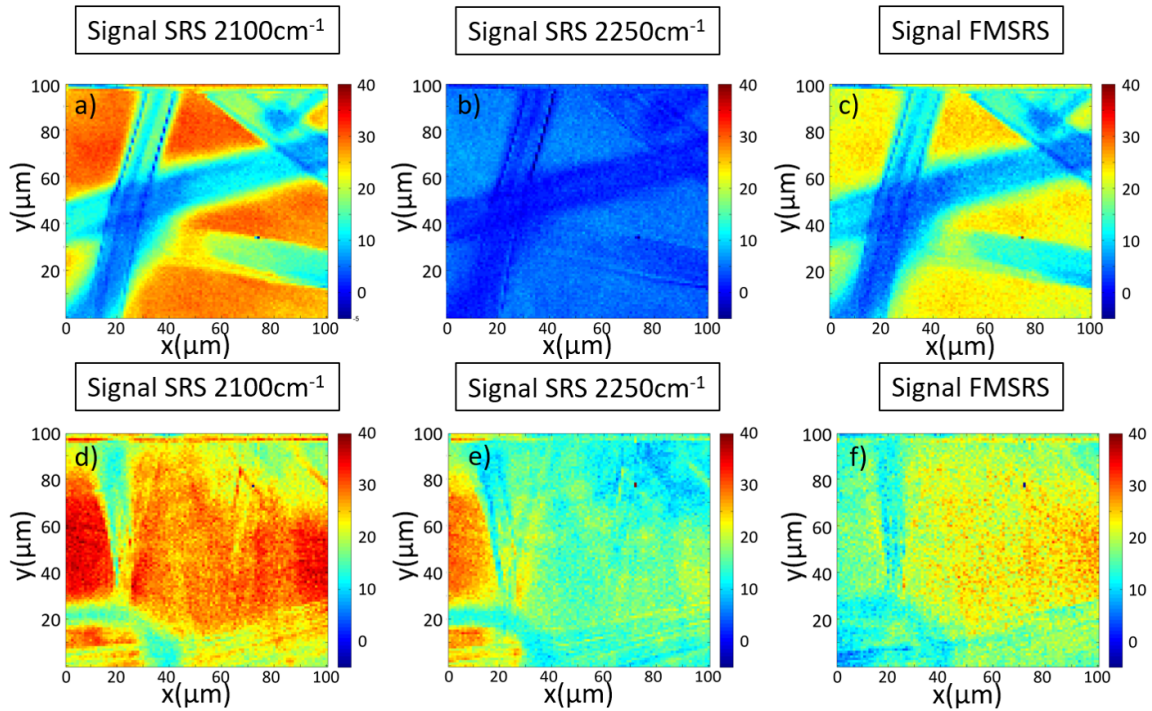


FIGURE 3.20 – Cartes de concentration en glycérol deutéré dans les modalités SRS résonnant (2100cm^{-1}), SRS non résonnant (2250cm^{-1}), et FM-SRS. Echantillon : glycérol deutérée 40% (a, b, c) et 10% (d, e, f) dans un échantillon de papier optique Thorlabs. La résolution des images de $100\times 100\mu\text{m}$ est de $200\times 200\text{pts}$, avec un temps d'acquisition par pixel de $40\mu\text{s}$, et un moyennage sur 4 images. Échelle de concentration : % de glycérol deutéré.

une fiabilité supérieure pour la valeur de concentration mesurée. Les images 3.20 d, e et f comparent les mêmes signaux pour du glycérol concentré à 10%. Alors que les valeurs de signal mises en jeu sont plus faibles, l'influence du signal dû aux artefacts de microscopie est plus forte. Si on étudie attentivement la zone la plus à gauche de l'image, on peut voir que l'image SRS résonnante suggère la présence de glycérol deutéré à environ 10% dans cette zone. Or, l'image 3.20 e montre que cette zone donne également un fort signal hors résonance. Il s'agit donc un signal parasite. L'image 3.20 f FM-SRS permet de s'affranchir de ces artefacts et de donner la distribution réelle de glycérol deutéré dans l'échantillon.

Un autre avantage de la modalité FM-SRS est l'insensibilité aux mouvements de l'échantillon, même rapides, comme nous l'avons déjà décrit en 2.4. En effet la détection synchrone donne directement la différence de signal entre la longueur d'onde résonnante et non résonnante, et ceci à une fréquence de 20MHz. La modalité FM-SRS

est plus adaptée à l'imagerie *in vivo*, pour laquelle des mouvements de l'échantillon sont inévitables. De plus, la technique SRS bénéficie d'un signal non résonnant moins fort que pour la technique CARS et est insensible aux artefacts de microscopie pouvant avoir lieu en microscopie CARS ou SRS classique.

3.4.2 Comparaison CARS FM-SRS dans les plasties

Conditions expérimentales

Nous avons réalisé une série d'expériences afin de comparer les cartes de concentration obtenues grâce aux techniques CARS et FM-SRS. Ces expériences ont été réalisées sur des échantillons de type plasties. Nous avons appliqué du glycérol deutéré dilué dans de l'eau dans des concentrations allant de 40% à 5%. La plastie est fixée sur un support selon le protocole décrit en 3.2.1. On applique 40 μ L de produit sur l'échantillon puis celui-ci est placé à 4°C pendant 24h. Nous cherchons ainsi nous placer dans un état d'équilibre. L'échantillon est ensuite placé sur le microscope pour être imagé et les puissances laser sont réglées à 100mW sur chaque faisceau.

Méthode de traitement du signal SRS

La détection du processus SRS ou FM-SRS est plus complexe que la détection du processus CARS. L'utilisation de l'EDM (3.3.3) lors de l'analyse du signal CARS dans la peau n'est pas transposable à l'étude du signal SRS. En effet, comme nous détectons les faibles variations d'intensité du faisceau Stokes, plusieurs facteurs interviennent dans l'évaluation de la perte de signal en fonction de la profondeur. La diffusion par le milieu hétérogène du faisceau Stokes détecté ensuite, mais également la capacité de réflexion de l'échantillon sur la surface et en fonction de la profondeur ainsi que la diffusion des faisceaux pompes qui intervient également dans l'efficacité même du processus dans l'échantillon. Cependant nous constatons que le signal SRS dans un échantillon ne contenant pas de produit deutéré est quasi-nul. Le signal SRS non résonnant reste donc très faible en comparaison du signal CARS non résonnant et est en pratique inutilisable pour renormaliser le signal SRS comme nous l'avons fait en CARS.

Nous avons donc fait le choix d'utiliser les données SRS sans traitement correctif.

La figure 3.21 montre les cartes de concentration (x,z) obtenues sur une plastie avec

3.4. MODALITÉ SRS ET FM-SRS

de l'eau, sans glycérol deutéré, ainsi que la courbe du signal moyen en fonction de la profondeur pour chacune des modalités de détection. Cette expérience a pour but d'évaluer le bruit sur les mesures de concentration dans les plasties.

La figure 3.21 a montre les résultats obtenus pour la mesure CARS. L'échelle de concentration est ajustée sur le signal du glycérol à 40%. On constate que le signal CARS dû au bruit est équivalent à une concentration d'environ 8% de glycérol, ce qui constitue donc la limite de l'imagerie CARS dans la peau. Pour pouvoir suivre des concentrations plus faibles, nous devons nous tourner vers une autre méthode.

La figure 3.21 b montre la carte de concentration obtenue grâce à la modalité Epi FM-SRS. Bien que les valeurs ne soient pas exprimées en concentration, l'échelle a été ajustée sur le signal obtenu en FM-SRS sur une solution de glycérol deutéré à 40%. On constate que le signal FM-SRS dans un milieu sans produit deutéré est très faible et peut afficher des valeurs négatives, de l'ordre de 10% du signal maximum en valeur absolue, c'est-à-dire l'équivalent d'environ 4 à 5% de glycérol deutéré. Contrairement au signal CARS, les artefacts apparaissent essentiellement en profondeur, dus à des éléments à forte absorption, qui "brûlent" et produisent du signal parasite : le signal des éléments brûlés est aléatoire, ce qui peut conduire à un signal FM-SRS négatif. De plus, la distribution du signal en CARS est proche des distributions obtenues lors de l'application de produits deutérés. La technique FM-SRS semble permettre une étude plus fiable pour l'application de produits de faible concentration.

La figure 3.22 présente les résultats obtenus pour les expériences sur plasties avec différentes concentrations en glycérol deutéré. Pour chaque concentration les résultats CARS et FM-SRS sont juxtaposés. Les figures centrales présentent les cartes de concentrations (x,z), avec pour chaque modalité une échelle commune entre les concentrations afin de pouvoir comparer les différentes valeurs. Chaque carte est accompagnée d'une courbe affichant la valeur moyenne des pixels d'une image en fonction de la profondeur.

D'une manière générale les signaux mesurés en CARS ou en FM-SRS diminuent bien avec la concentration. Pour une concentration de 20%, les résultats sont similaires pour les deux techniques. Pour une concentration de 10% il semble d'après le signal CARS que le glycérol ait pénétré en profondeur, alors que pour le signal FM-SRS on retrouve du glycérol majoritairement en surface. Cela montre que le fond non résonnant CARS induit en erreur sur la pénétration du glycérol, c'est la limite de la sensibilité CARS.

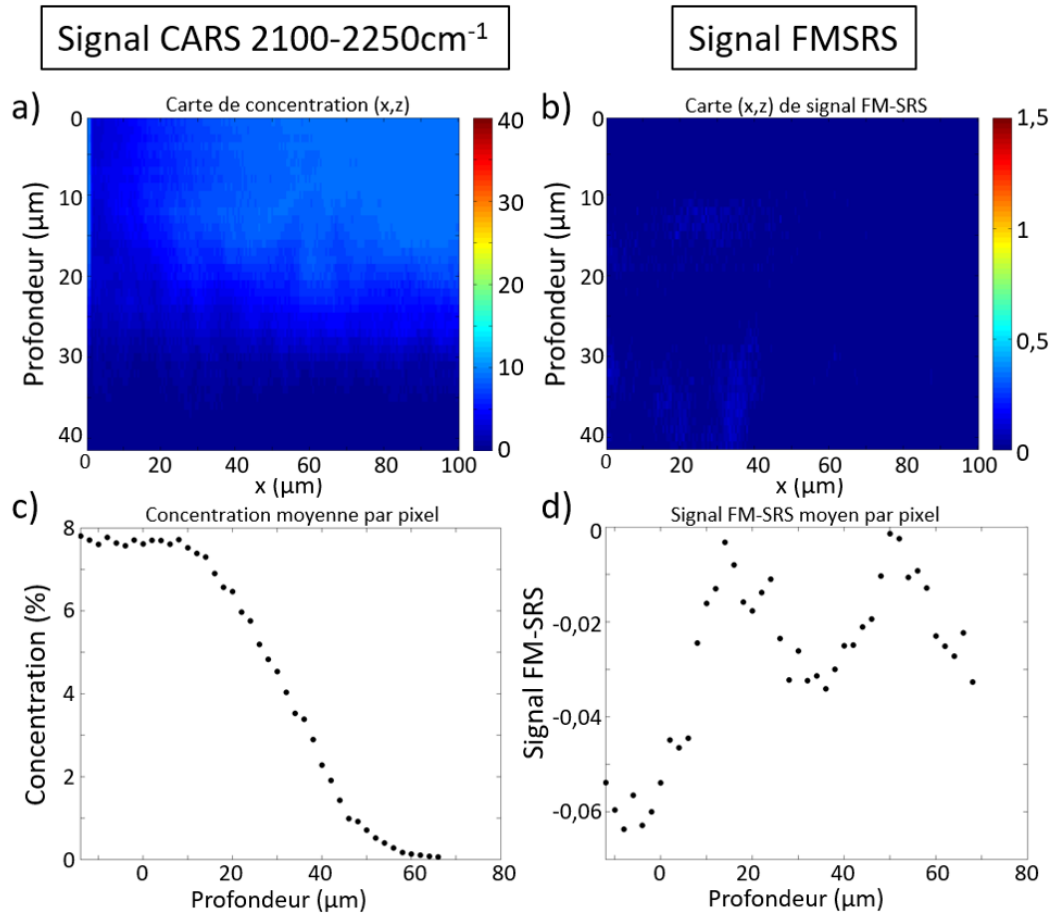


FIGURE 3.21 – Etude comparative du bruit de mesure dans les échantillons de type plastique entre les techniques CARS et FM-SRS. a) Carte de concentration (x,z) pour de l'eau (sans glycérol deutéré) appliquée sur la peau en modalité CARS. b) Carte de signal FM-SRS (x,z), l'échelle est ajustée sur le signal FM-SRS dans du glycérol deutéré à 40%. c) Courbe de la concentration moyenne artéfactuelle obtenue en fonction de la profondeur. d) Courbe du signal FM-SRS moyen en fonction de la profondeur. Échantillon : plastique avec de l'eau non deutéré. Les images volumique (x,y,z) ont été acquises avec une résolution de 200x200pts, avec un temps d'acquisition de 40μs par pixel, avec un moyennage sur 4 images. Les images ont été acquises pour des profondeurs de 0 à 20μm environ, avec un pas de mesure de 2μm.

3.4. MODALITÉ SRS ET FM-SRS

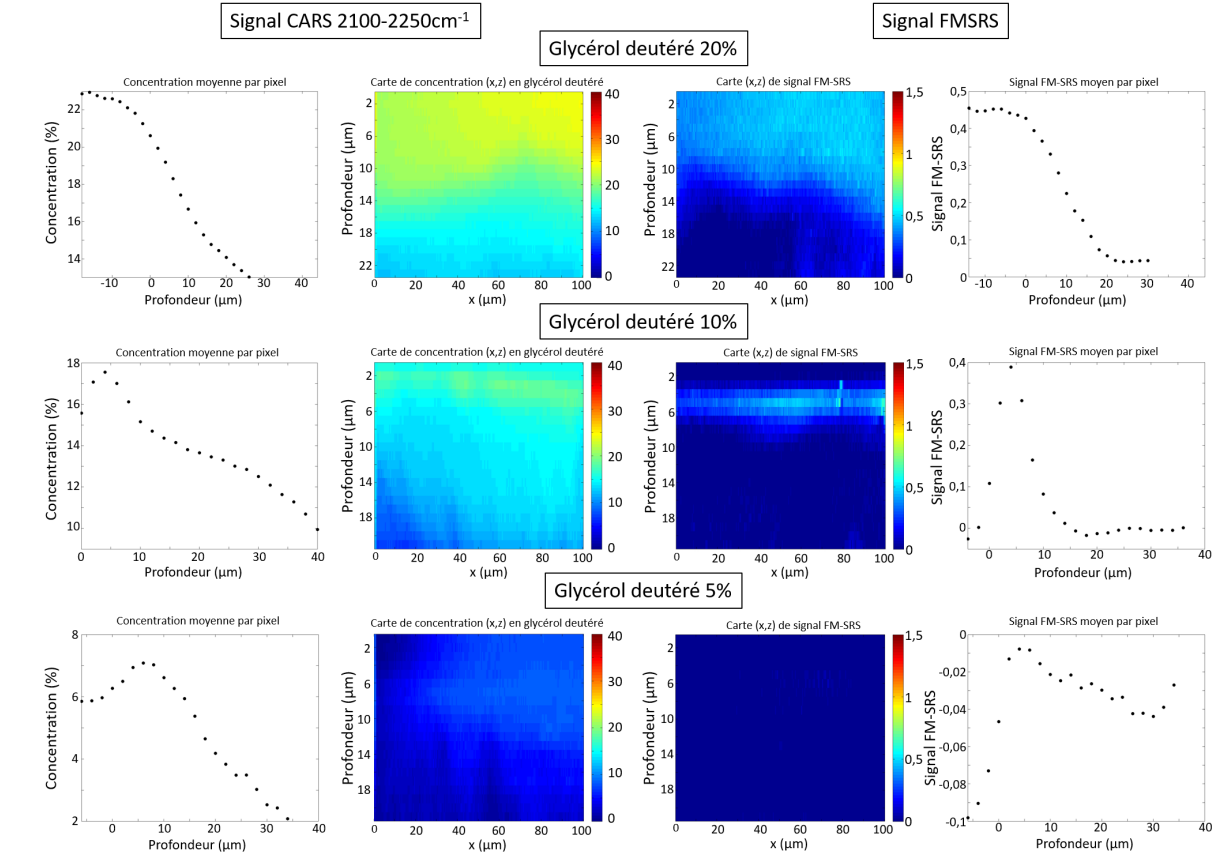


FIGURE 3.22 – Étude comparative des techniques CARS et FM-SRS dans un échantillon de type plastie après application de glycérol deutéré en différentes concentrations. Les figures centrales présentent les cartes (x,z) de concentration en glycérol deutéré dans la modalité CARS (à gauche) ou du signal mesuré dans la modalité FM-SRS (à droite). Les cartes (x,z) se focalisent sur la pénétration en présentant seulement le signal entre 0 et $20\mu\text{m}$ de profondeur environ. Des courbes de la concentration moyenne en fonction de la profondeur sont associées aux cartes de concentration CARS et les cartes de signal FM-SRS sont accompagnées des courbes du signal FM-SRS moyen par pixel en fonction de la profondeur. Ces courbes présentent les résultats sur toute la profondeur d'acquisition. Les images volumiques (x,y,z) ont été acquises avec une résolution de $200 \times 200 \text{pts}$, avec un temps d'acquisition de $40\mu\text{s}$ par pixel, avec un moyennage sur 4 images. Les images ont été acquises sur une profondeur de $50\mu\text{m}$ environ, avec un pas de mesure de $2\mu\text{m}$.

Nous avons également vu sur la figure 3.21 que le signal CARS parasite est de l'ordre du signal résonnant de 10% de glycérol. Enfin pour une concentration de 5% le signal CARS n'est pas exploitable car trop faible par rapport au signal de référence. Le signal FM-SRS est quand à lui quasiment nul, ce qui montre que nous sommes à la limite de détection du glycérol deutéré pour la modalité FM-SRS

La faible pénétration est probablement liée au type d'échantillon. En effet, bien que les échantillons de peau provenant de chirurgie soient structurellement très proches de la peau *in vivo*, il est probable que les mécanismes d'absorption ayant lieu dans ce dernier cas ne soient pas observables sur les plasties.

3.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons démontré l'utilité des techniques de microscopie non linéaire CARS, SRS et TPEF pour le suivi de substances dans la peau. En nous plaçant dans la continuité d'une étude précédente ([58]), nous avons pu étendre le champ d'application des ces techniques et réussi à obtenir des images de la pénétration du glycérol deutéré à l'intérieur de l'épiderme humain dans des conditions *in vivo*. Grâce à ces résultats, nous avons pu comparer l'utilisation de deux véhicules pour l'application de glycérol deutéré : l'eau et le xanthane.

En utilisant les codes développés par Barbara Sarri lors de cette thèse, nous avons pu construire des cartes de concentration dans la peau et apporter une meilleure fiabilité des mesures, notamment en profondeur, grâce à l'introduction de l'efficacité de détection moléculaire.

Par la suite nous avons développé une méthode d'imagerie permettant de nous affranchir de la quasi-totalité des artefacts de mesure : le Frequency Modulated Stimulated Raman Scattering (FM-SRS). Cette modalité est basée sur l'utilisation de trois faisceaux lasers différents et permet de sonder deux énergies de vibrations moléculaire de façon alternée à la fréquence de 20 MHz. Un dispositif de détection du processus FM-SRS en direction Epi a également été mis en place afin de permettre l'imagerie d'échantillons épais. Ce développement instrumental nous a permis de continuer nos recherches en améliorant la sensibilité de nos mesures et permettant ainsi de détecter des concentrations plus faibles dans la peau sur des échantillons de plastie.

3.5. CONCLUSION

Une suite logique à ces expériences voudrait que l'on applique la modalité FM-SRS à l'imagerie *in vivo*. On pourrait également se diriger vers la détection de concentrations de plus en plus faibles ou bien la détection d'autres produits deutérés afin de faire une étude comparative de l'absorption de différentes substance actives.

Enfin les multiples possibilités de l'imagerie Epi FM-SRS grâce à la sélectivité chimique de la méthode, la faible sensibilité aux artefacts ou bien aux mouvements d'échantillons, ou encore les faibles temps d'acquisition, ouvrent également la voie à une multitude d'autres applications comme par exemple l'analyse de la pénétration dans la peau et les tissus de produits pharmaceutiques.

Conclusions et perspectives

Mon travail a été de mettre en place une instrumentation de microscopie multiphotonique permettant d'améliorer le signal des contrastes CARS et SRS dans des milieux complexes comme les tissus et la peau où les signaux parasites sont très importants. Un point fort de mon travail a été de mettre en place les modalités Switch-CARS et FM-SRS qui permettent de sonder séquentiellement ou en temps réel la différence des signaux CARS ou SRS associés à deux liaisons vibrationnelles. Utilisant un système laser original et une opto-électronique dédiée, ces nouvelles modalités permettent d'aborder un ensemble de questions biologiques, cosmétiques ou pharmaceutiques où un suivi ratiométrique de deux liaisons vibrationnelles est utile.

Dans une première application, nous avons montré comment la microscopie non linéaire pouvait devenir un outil pour l'histologie, dans le cadre de la détection du cancer dans le système digestif humain. Les contrastes TPEF, SHG, et CARS/SRS ont été utilisés pour faire apparaître les différents composants des tissus gastriques étudiés : le collagène, les lipides et les protéines. L'image des noyaux cellulaires a pu être obtenue grâce à la combinaison des images SRS aux énergies de vibrations des liaisons CH_2 lipidiques à 2845cm^{-1} et des liaisons CH_3 protéiques à 2930cm^{-1} . Nous avons montré que la microscopie non linéaire donne également accès aux informations morphologiques de l'échantillon, qui, combinées à sa composition, fournissent des images de qualité histologique, qui peuvent constituer un outil supplémentaire dans les mains de l'anatomopathologiste chargé de délivrer un diagnostic médical. Nous avons également présenté les résultats obtenus grâce au développement de la microscopie FMSRS, et nous avons vu que celle-ci permettait de réduire le temps d'acquisition des images en plus d'apporter une plus faible sensibilité aux mouvements des échantillons.

Pour la suite, il serait intéressant de mener une étude sur un grand nombre d'échantillons afin d'établir si les images obtenues en microscopie non linéaire sont suffisantes pour qu'un diagnostic valable soit établi par l'anatomopathologiste. À plus long terme, l'utilisation d'un système de microscopie non linéaire compact pourrait être mis à l'épreuve en conditions opératoires afin de mesurer l'apport de l'imagerie multimodale rapide sur la durée et la réussite des opérations chirurgicales. Un autre aspect à étudier est celui de l'implémentation de ces techniques en endoscopie. Notre groupe à l'Institut Fresnel travaille activement sur ce sujet et des premières images CARS ont pu être obtenues récemment en endoscopie utilisant une fibre optique creuse dédiée ([64] [65]).

Dans une deuxième application de la technologie multiphotonique développée, nous avons étudié le suivi de molécules deutérées dans la peau humaine grâce à la microscopie Raman cohérent. En nous basant sur des expériences réalisées sur des échantillons de peau humaine, nous avons étendu le domaine d'application en réalisant des expériences sur la peau *in vivo* de l'avant-bras. Nous avons montré que la microscopie CARS permettait d'établir des cartes de concentration en glycérol deutéré dans la peau, jusqu'à quelques dizaines de micromètres de profondeur, et ce jusqu'à une concentration minimale d'environ 10 à 20%. La limite de sensibilité en concentration est en grande partie due au fort signal non résonnant mesuré dans la peau. La comparaison entre deux types de véhicules pour le glycérol deutéré, tels que l'eau et le gel de xanthane, a pu être étudiée, montrant que le xanthane permettait une pénétration plus homogène dans le temps que l'eau. Le développement de la microscopie FM-SRS nous a permis de nous affranchir du bruit non résonnant ainsi que des artefacts de microscopie. Nous avons amélioré notre sensibilité en concentration jusqu'à 5% et réussi à mesurer l'absorption de glycérol deutéré dans des échantillons de peau excisée. Ceci nous a permis d'établir que l'absorption dans la peau excisée reste fortement limitée et que le produit reste majoritairement en surface. Ces résultats mettent en évidence le rôle du métabolisme dans les échantillons *in vivo* par rapport aux échantillons *ex vivo*.

La prochaine étape de ces expériences serait l'étude de l'absorption dans la peau *in vivo* à l'aide de la microscopie FM-SRS, afin de mieux appréhender les mécanismes d'absorption dans la peau vivante. Le suivi de produits différents est également une piste que nous avons déjà commencé à considérer, afin de comparer la pénétration de

3.5. CONCLUSION

différentes molécules.

Bibliographie

- [1] Richard P. Feynman, Robert B. Leighton, Matthew Sands, and E. M. Hafner. The Feynman Lectures on Physics ; Vol. I. *American Journal of Physics*, 33(9) :750–752, sep 1965.
- [2] C V Raman and F R S [Plate. A new radiation*. *Indian J. Phys*, 2 :387–398, 1928.
- [3] G S Landsberg and L I Mandelstam. New phenomenon in scattering of light (preliminary report). *Journal of the Russian Physico-Chemical Society, Physics Section*, 60 :335, 1928.
- [4] Robert W. Boyd. *Nonlinear optics*. Academic Press, 2003.
- [5] 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*, 137(3A) :A801–A818, feb 1965.
- [6] Pascal Berto. Microscopie et spectroscopie de phase. Développements en diffusion Raman cohérente (CRS) et en thermo-plasmonique. [http ://www.theses.fr](http://www.theses.fr), jan 2013.
- [7] M. D. Levenson, C. Flytzanis, and N. Bloembergen. Interference of Resonant and Nonresonant Three-Wave Mixing in Diamond. *Physical Review B*, 6(10) :3962–3965, nov 1972.
- [8] M. D. Levenson and N. Bloembergen. Dispersion of the nonlinear optical susceptibility tensor in centrosymmetric media. *Physical Review B*, 10(10) :4447–4463, nov 1974.
- [9] Haim Lotem, R. T. Lynch, and N. Bloembergen. Interference between Raman resonances in four-wave difference mixing. *Physical Review A*, 14(5) :1748–1755, nov 1976.

- [10] JJ Song, GL Eesley, and MD Levenson. Background suppression in coherent Raman spectroscopy. *Applied Physics Letters*, 1976.
- [11] JX Cheng, LD Book, and XS Xie. Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics letters*, 2001.
- [12] Y. Yacoby, R. Fitzgibbon, and B. Lax. Coherent cancellation of background in four wave mixing spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, 51(6) :3072–3077, jun 1980.
- [13] G. Marowsky and G. Lüpke. CARS-Background suppression by phase-controlled nonlinear interferometry. *Applied Physics B Photophysics and Laser Chemistry*, 51(1) :49–51, jul 1990.
- [14] Daniel L. Marks, Claudio Vinegoni, Jeremy S. Bredfeldt, and Stephen A. Boppart. Interferometric differentiation between resonant coherent anti-Stokes Raman scattering and nonresonant four wave mixing processes. *Applied Physics Letters*, 85(23) :5787–5789, dec 2004.
- [15] Claudio Vinegoni, Jeremy S. Bredfeldt, Daniel L. Marks, and Stephen A. Boppart. Nonlinear optical contrast enhancement for optical coherence tomography. *Optics Express*, 12(2) :331, jan 2004.
- [16] Conor L. Evans, Eric O. Potma, and X. Sunney 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*, 29(24) :2923, dec 2004.
- [17] Eric O. Potma, Conor L. Evans, and X. Sunney Xie. Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging. *Optics Letters*, 31(2) :241, jan 2006.
- [18] Francois M. Kamga and Mark G. Sceats. Pulse-sequenced coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy : a method for suppression of the nonresonant background. *Optics Letters*, 5(3) :126, mar 1980.
- [19] A Volkmer, LD Book, and XS Xie. Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy : Imaging based on Raman free induction decay. *Applied Physics Letters*, 2002.
- [20] A Volkmer, JX Cheng, and XS Xie. Vibrational imaging with high sensitivity via epidetected coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Physical Review Letters*, 2001.

- [21] J Cheng, A Volkmer, and LD Book. An epi-detected coherent anti-Stokes Raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity. *The Journal of Physical*, 2001.
- [22] Jian Lin, Fake Lu, Haifeng Wang, Wei Zheng, Colin JR Sheppard, and Zhiwei Huang. Improved contrast radially polarized coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy using annular aperture detection. *Applied Physics Letters*, 95(13) :133703, sep 2009.
- [23] Jian Lin, Fake Lu, Wei Zheng, and Zhiwei Huang. Annular aperture-detected coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy for high contrast vibrational imaging. *Applied Physics Letters*, 97(8) :083701, aug 2010.
- [24] EJ Woodbury and WK Ng. Ruby laser operation in near IR. *Proceedings of the Institute of Radio Engineers*, 1962.
- [25] G Eckhardt, RW Hellwarth, FJ McClung, and SE Schwarz. Stimulated Raman scattering from organic liquids. *Physical Review Letters*, 1962.
- [26] Ji-Xin. Cheng and Xiaoliang Sunney. Xie. *Coherent Raman Scattering Microscopy*. CRC Press, 2016.
- [27] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. *Optics Letters*, 7(8) :350, aug 1982.
- [28] A Zumbusch, GR Holtom, and XS Xie. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering. *Physical review letters*, 1999.
- [29] E Ploetz, S Laimgruber, and S Berner. Femtosecond stimulated Raman microscopy. *Applied Physics B* :, 2007.
- [30] CW Freudiger, W Min, BG Saar, S Lu, and GR Holtom. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. 2008.
- [31] P Nandakumar, A Kovalev, and A Volkmer. Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy. *New Journal of Physics*, 2009.
- [32] Y Ozeki, F Dake, S Kajiyama, K Fukui, and K Itoh. Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy. *Optics express*, 2009.
- [33] W. Kaiser and C. G. B. Garrett. Two-Photon Excitation in $\text{Ca F}_2 : \text{Eu}^{2+}$. *Physical Review Letters*, 7(6) :229–231, sep 1961.

- [34] WR Zipfel, RM Williams, and WW Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*, 2003.
- [35] PA Franken, AE Hill, CW Peters, and G Weinreich. Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters*, 1961.
- [36] S Fine and WP Hansen. Optical second harmonic generation in biological systems. *Applied optics*, 1971.
- [37] WR Zipfel, RM Williams, and R Christie. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proceedings of the*, 2003.
- [38] K Ekvall, P Van der Meulen, and C Dhollande. Cross phase modulation artifact in liquid phase transient absorption spectroscopy. *Journal of applied*, 2000.
- [39] RD Snook and RD Lowe. Thermal lens spectrometry. A review. *Analyst*, 1995.
- [40] P Berto, ER Andresen, and H Rigneault. Background-free stimulated Raman spectroscopy and microscopy. *Physical review letters*, 2014.
- [41] D Fu, T Ye, TE Matthews, BJ Chen, and G Yurtserver. High-resolution in vivo imaging of blood vessels without labeling. *Optics*, 2007.
- [42] K. I. Popov, A. F. Pegoraro, A. Stolow, and L. Ramunno. Image formation in CARS and SRS : effect of an inhomogeneous nonresonant background medium. *Optics Letters*, 37(4) :473, feb 2012.
- [43] Patrick Ferrand. GPScan.VI : A general-purpose LabVIEW program for scanning imaging or any application requiring synchronous analog voltage generation and data acquisition. *Computer Physics Communications*, 192 :342—347, 2015.
- [44] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, Richard Christie, Alexander Yu Nikitin, Bradley T Hyman, and Watt 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*, 100(12) :7075–80, jun 2003.
- [45] Donald M McDonald and Peter L Choyke. Imaging of angiogenesis : from microscope to clinic. *Nature Medicine*, 9(6) :713–725, jun 2003.
- [46] Katarina Wolf, Irina Mazo, Harry Leung, Katharina Engelke, Ulrich H. von Andrian, Elena I. Deryugina, Alex Y. Strongin, Eva-B. Bröcker, and Peter Friedl. Compensa-

- tion mechanism in tumor cell migration. *The Journal of Cell Biology*, 160(2) :267–277, jan 2003.
- [47] Paolo P Provenzano, Kevin W Eliceiri, Jay M Campbell, David R Inman, John G White, and Patricia J Keely. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine*, 4(1) :38, dec 2006.
- [48] Rebecca M Williams, Andrea Flesken-Nikitin, Lora Hedrick Ellenson, Denise C. Connolly, Thomas C. Hamilton, Alexander Yu. Nikitin, and Warren R Zipfel. Strategies for High Resolution Imaging of Epithelial Ovarian Cancer by Laparoscopic Nonlinear Microscopy. *Translational Oncology*, 3(3) :181–194, jun 2010.
- [49] Minbiao Ji, Daniel A Orringer, Christian W Freudiger, Shakti Ramkissoon, Xiaohui Liu, Darryl Lau, Alexandra J Golby, Isaiah Norton, Marika Hayashi, Nathalie Y R Agar, Geoffrey S Young, Cathie Spino, Sandro Santagata, Sandra Camelo-Piragua, Keith L Ligon, Oren Sagher, and X Sunney Xie. Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy. *Science translational medicine*, 5(201) :201ra119, sep 2013.
- [50] Fa-Ke Lu, Srinjan Basu, Vivien Igras, Mai P Hoang, Minbiao Ji, Dan Fu, Gary R Holtom, Victor A Neel, Christian W Freudiger, David E Fisher, and X Sunney Xie. Label-free DNA imaging in vivo with stimulated Raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(37) :11624–11629, sep 2015.
- [51] Minbiao Ji, Spencer Lewis, Sandra Camelo-Piragua, Shakti H Ramkissoon, Matija Snuderl, Sriram Veneti, Amanda Fisher-Hubbard, Mia Garrard, Dan Fu, Anthony C Wang, Jason A Heth, Cormac O Maher, Nader Sanai, Timothy D Johnson, Christian W Freudiger, Oren Sagher, Xiaoliang Sunney Xie, and Daniel A Orringer. Detection of human brain tumor infiltration with quantitative stimulated Raman scattering microscopy. *Science translational medicine*, 7(309) :309ra163, oct 2015.
- [52] Todd Hollon, Spencer Lewis, Christian W. Freudiger, X. Sunney Xie, and Daniel A. Orringer. Improving the accuracy of brain tumor surgery via Raman-based technology. *Neurosurgical Focus*, 40(3) :E9, mar 2016.
- [53] Daniel A. Orringer, Balaji Pandian, Yashar S. Niknafs, Todd C. Hollon, Julianne Boyle, Spencer Lewis, Mia Garrard, Shawn L. Hervey-Jumper, Hugh J. L. Garton, Cormac O. Maher, Jason A. Heth, Oren Sagher, D. Andrew Wilkinson, Matija Snuderl, Sriram Veneti, Shakti H. Ramkissoon, Kathryn A. McFadden, Amanda

- Fisher-Hubbard, Andrew P. Lieberman, Timothy D. Johnson, X. Sunney Xie, Jay K. Trautman, Christian W. Freudiger, and Sandra Camelo-Piragua. Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy. *Nature Biomedical Engineering*, 1(2) :0027, feb 2017.
- [54] Ruoyu He, Yongkui Xu, Lili Zhang, Shenghong Ma, Xu Wang, Dan Ye, and Minbiao Ji. Dual-phase stimulated Raman scattering microscopy for real-time two-color imaging. *Optica*, 4(1) :44, jan 2017.
- [55] Esben Ravn Andresen, Pascal Berto, and Hervé Rigneault. Stimulated Raman scattering microscopy by spectral focusing and fiber-generated soliton as Stokes pulse. *Optics letters*, 36(13) :2387–2389, 2011.
- [56] Ruth K. Freinkel and David. Woodley. *The biology of the skin*. Parthenon Pub. Group, 2001.
- [57] KENNETH M. HALPRIN. Epidermal "Turnover Time" a re-examination. *British Journal of Dermatology*, 86(1) :14–19, jan 1972.
- [58] Xueqin Chen. Human skin investigations using nonlinear spectroscopy and microscopy. <http://www.theses.fr>, dec 2014.
- [59] Barbara Sarri. Spectrin-lipid interactions and their effect on the membrane mechanical properties. *University of Exeter*, 2014.
- [60] Xueqin Chen, Sébastien Grégoire, Florian Formanek, Jean-Baptiste Galey, and Hervé Rigneault. Quantitative 3D molecular cutaneous absorption in human skin using label free nonlinear microscopy. *Journal of Controlled Release*, 200 :78–86, feb 2015.
- [61] Françoise Bernerd, Claire Marionnet, and Christine Duval. Solar ultraviolet radiation induces biological alterations in human skin in vitro : Relevance of a well-balanced UVA/UVB protection. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 78(7) :15, 2012.
- [62] Merali. Human skin to replace animal tests. *New Scientist*, 195(2614) :14, jul 2007.
- [63] Michiel Müller and Andreas Zumbusch. Coherent anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *ChemPhysChem*, 8(15) :2156–2170, oct 2007.

- [64] Alberto Lombardini. *Nonlinear optical endoscopy with micro-structured photonic crystal fibers*. PhD thesis, Aix-Marseille Université, 2016.
- [65] Alberto Lombardini, Vasyl Mytskaniuk, Siddharth Sivankutty, Esben Ravn Andersen, Xueqin Chen, Jérôme Wenger, Marc Fabert, Nicolas Joly, Frédéric Louradour, Alexandre Kudlinski, and Hervé Rigneault. High-resolution multimodal flexible coherent Raman endoscope. *arXiv preprint arXiv :1708.04149*, 2017.

