



HAL
open science

Développement de la microspectroscopie Brillouin pour l'analyse de microcultures cellulaires 3D

Pierre Bouvet

► **To cite this version:**

Pierre Bouvet. Développement de la microspectroscopie Brillouin pour l'analyse de microcultures cellulaires 3D. Physique [physics]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10227 . tel-04611786

HAL Id: tel-04611786

<https://theses.hal.science/tel-04611786>

Submitted on 14 Jun 2024

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.



THÈSE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale 52
Physique et Astrophysique (PHAST)

Discipline : Physique

Soutenue publiquement le 23/11/2023, par :
Pierre Bouvet

Développement de la microspectroscopie
Brillouin pour l'analyse de microcultures
cellulaires 3D

Devant le jury composé de :

Mr. Baritoux, Jean-Charles

Ingénieur-Chercheur CEA, CEA Grenoble

Mme. Brasselet, Sophie

Directrice de Recherches CNRS, Institut Fresnel

Mr. Dehoux, Thomas

Chercheur CNRS, Institut Lumière et Matière (ILM)

Mme. Foret, Marie

Professeure, Université de Montpellier

Mr. Motto-Ros, Vincent

Maître de Conférence, Université Claude-Bernard Lyon 1

Mme. Nicolas, Alice

Directrice de Recherche CNRS, Laboratoire des
Technologies de la Microélectronique (LTM)

Co-encadrant

Rapporteure

Directeur de thèse

Rapporteure

Examineur

Présidente

*A ce qui est et ceux qui sont
Tout particulièrement à ceux qui ont été auprès de moi*

Abstract

Confocal Brillouin microspectroscopy is a non-invasive and label-free technique enabling the characterization of mechanical properties of samples at sub-micrometric scales. Over the past decades, this technique has seen significant development in biology, thanks to the introduction of the confocal VIPA spectrometer.

The use of this instrument offers practical advantages, notably by reducing spectrum acquisition times compared to previous instruments, thereby accelerating measurements. This reduction in acquisition time has extended Brillouin microspectroscopy to biology, where rapid measurements are paramount due to phototoxicity, sample complexity, and short evolutionary timescales.

However, in these systems, confocality is achieved by coupling the VIPA spectrograph to the microscope using a single-mode fiber. The resulting instrument proves challenging to align in practice, unstable over time, and sometimes too slow for analyzing certain biological processes.

This manuscript presents the coupling of the VIPA spectrograph to the microscope using a multimode fiber. As three-dimensional cellular assemblies represent the most realistic models of *in vivo* cell growth conditions, we choose to apply the resulting instrument to the study of these samples. This choice prompts us to opt for spatial resolutions much higher than the incident light's wavelength, allowing us to leverage the compromise between confocality and brightness to optimize the instrument.

The manuscript therefore introduces a novel approach to the VIPA spectrometer that addresses the following three aspects :

- Simplifying optical alignment.

-
- Enhancing device stability.
 - Increasing measurement speed.

By exploring these aspects, we present a strategy that optimizes the VIPA spectrometer's performance in studying 3D multicellular assemblies, thus facilitating the study of these biological samples through Brillouin microspectroscopy. The system resulting from this approach will be experimentally used to monitor the morphogenesis of hollow cell assemblies, both qualitatively by tracking the formation of the empty space inside the assembly and quantitatively by studying the mechanical properties of the cells surrounding the cavity.

Résumé

La microspectroscopie Brillouin confocale est une technique non invasive et sans marquage qui permet la caractérisation des propriétés mécaniques des échantillons à des échelles sub-micrométriques. Au cours des dernières décennies, cette technique s'est rapidement développée, grâce à l'introduction du spectromètre VIPA confocal.

L'utilisation de cet instrument offre des avantages pratiques, notamment en réduisant les temps d'acquisition des spectres par rapport aux instruments antérieurs, et en accélérant ainsi les mesures. Cette réduction du temps d'acquisition a ainsi permis à la microspectroscopie Brillouin de s'étendre à la biologie où les problématiques de phototoxicité, complexité des échantillons et temps caractéristiques d'évolutions courts imposent des mesures rapides.

Cependant, dans ces systèmes, la confocalité est obtenue en couplant le spectrographe VIPA au microscope à l'aide d'une fibre monomode. Cette technologie s'avère alors difficile à aligner en pratique, instable dans le temps et parfois, encore trop lent pour l'analyse de certains processus biologiques.

Dans ce manuscrit, nous présentons ainsi le couplage du spectrographe VIPA au microscope par une fibre multimode. Parce que les amas cellulaires en trois dimensions sont considérés comme les modèles les plus réalistes aujourd'hui des conditions de croissance des cellules *in vivo*, nous choisissons d'appliquer l'instrument résultant à l'étude de ces amas. Ce choix nous invite alors à choisir des résolutions spatiales supérieures à la longueur d'onde de la lumière incidente, et nous permet donc de profiter du compromis entre confocalité et luminosité pour optimiser l'instrument.

Ce manuscrit présente alors une nouvelle approche du spectromètre VIPA qui suit les trois axes suivant :

-
- Simplifier l'alignement de l'instrument optique.
 - Accroître la stabilité du dispositif dans le temps.
 - Augmenter la vitesse des mesures.

En explorant ces aspects, nous présentons une stratégie qui permet d'optimiser les performances du spectromètre VIPA dans l'étude d'amas cellulaire et permet ainsi de faciliter les études de ces échantillons biologiques par microspectroscopie Brillouin. Le système résultant de cette approche sera alors utilisé expérimentalement pour suivre la morphogénèse d'amas cellulaires creux, à la fois de manière qualitative, en suivant l'apparition du creux, et quantitative, en étudiant les propriétés mécaniques des cellules entourant le creux.

Remerciements

Un projet, peu importe sa nature, se construit autour d'un acteur, qui en prendra généralement la responsabilité et le mérite. En limitant à cet acteur, la reconnaissance du projet cependant, on néglige, et parfois trop facilement, la complexité du cadre dans lequel le projet s'est réalisé et la myriade d'individus, dont les participations cruciales lui ont permis d'aboutir. Ces participations doivent être reconnues et saluées à leur propre valeur. Elles définissent en effet le terreau et le tuteur ayant permis au projet de croître et de fleurir. Dans cet esprit, et en m'excusant au préalable de ne pas pouvoir saluer ici individuellement, tous ceux qui m'ont permis cette thèse et qui par leurs actions, ont participé à son succès, j'aimerais remercier conjointement, l'ensemble des individus ayant croisé mon chemin et m'ayant permis cette aventure.

Dans l'immense ensemble d'êtres se reconnaissant dans cette salutation, je dois tout d'abord saluer mes parents. Chaque choix qu'ils ont fait, chaque mot d'encouragement, chaque seconde passée à m'aider à m'épanouir dans ma vocation de comprendre le monde, se retrouve ici couronnée. Ce document autant que les résultats qu'il présente apporte pour moi une preuve de leur succès et de leur valeur en tant que personnes autant qu'en tant que parents car ce manuscrit est le reflet de milliers d'heures de travail que seule la vocation trouvée peut permettre. Merci donc à mes parents de m'avoir accompagné et soutenu durant toutes ces années.

Dans la continuité de leur engagement, je salue aussi ma sœur, une personne courageuse et formidable qui prouve aussi, par son acharnement à couronner de succès le parcours académique menant à sa vocation, sa valeur en tant qu'être. Son abnégation face à la charge, sa droiture et son dévouement à la justice font d'elle un exemple à suivre. Savoir que de telles personnes existent, font de tels choix, acceptent de faire face aux obstacles qu'ils amènent inévitablement, et les surmontent toujours, est un appui moral d'une valeur inestimable dans

l'aventure particulièrement éreintante d'une thèse doctorale.

L'engagement de ma famille proche s'étend également à ma famille élargie, que je veux ici aussi saluer. Leurs actions ont sans doute été plus discrètes et donc leur rôle dans ce travail, moins visible, mais il n'en a pas moins été présent. Il est difficile de reconnaître l'impact d'une conversation, d'un mot, ou même d'un regard, porté par un proche, sur une décision que l'on prend. Il n'en reste pas moins ubuesque de l'ignorer. Je vous remercie donc tous d'avoir su me donner cette confiance en ma capacité à atteindre mes objectifs, sans laquelle ce doctorat n'aurait potentiellement pas existé.

Cette aide silencieuse que je reconnais ici pour ma famille élargie, je la reconnais également pour tous mes amis, croisés aux cours des ans, qui ont accompagné mon évolution, rendue celle-ci plus intéressante à vivre, et permis plus concrètement ici, de réussir ce travail. Leur amitié représente un appui, car savoir qu'un semblable ayant partagé avec nous une épreuve de vie, croit en nous au point de considérer normal la réussite d'une thèse, est un cadeau dont la valeur indescriptible rend la réalisation de ce travail non pas moins difficile, mais moins impossible.

Cette normalité apparente de l'aventure du doctorat se retrouve également dans l'attitude des collègues qui ont accompagné mon travail. Leurs expertises éloignées du thème de mon travail ne les a pas empêché d'approuver silencieusement son déroulement et aboutissement. Profiter de ce regard sur mon évolution a été une chance dont je voudrais les remercier.

Enfin, je veux tout particulièrement remercier mon directeur de thèse et mon encadrant d'avoir accepté et de m'accompagner, et de m'encadrer au cours de ces trois années. J'espère que ce travail aura permis de répondre convenablement aux attentes qui motivaient le sujet qu'ils m'ont proposé pour cette thèse. A défaut, il m'aura permis de répondre à mon attente principale : me permettre de mettre mon intelligence et mon temps au service de mes semblables, dans l'espoir de mieux comprendre ce qui est, de ce que l'on peut en faire, et surtout, de partager cette connaissance.

Table des matières

Abstract	v
Résumé	vii
Remerciements	ix
Sommaire	xiii
Table des figures	xvii
Liste des tableaux	xix
Glossaire	xxi
I Thèse	1
Introduction	3
1 Microspectroscopie Brillouin	7
1.1 Interaction entre une onde mécanique et une onde lumineuse	8
1.1.1 Physique de la propagation de la lumière dans un milieu	8
1.1.2 Onde mécanique et indice optique	9
1.2 Géométrie de mesure et ondes mécaniques	10
1.2.1 Direction de propagation de l'onde mécanique	10
1.2.2 Conservation des moments	11
1.3 Diffusion de la lumière par une onde mécanique	13
1.3.1 Effet de la fréquence de l'onde mécanique	13
1.3.2 Effet de l'atténuation du milieu	14
1.3.3 Intensité de l'onde diffractée	17

1.4	Microspectroscopie	18
1.5	Interprétation de la spectroscopie Brillouin	19
1.5.1	Module Mécanique	19
1.5.2	Spectroscopies Raman et Brillouin	21
1.5.3	Ordres de grandeurs en spectroscopie Brillouin	23
1.6	Intérêt en Biologie	24
1.7	Besoins d'un spectromètre Brillouin	25
1.7.1	Laser	25
1.7.2	Spectromètre	27
1.8	Conclusion du chapitre	29
2	Utilisation du Spectromètre VIPA avec sources étendues	31
2.1	Étendue et fibres optiques	33
2.2	Spectromètre VIPA	34
2.3	Transmission d'étendue dans un spectromètre VIPA	39
2.4	Accroissement expérimental de la luminosité d'un spectrographe VIPA par utilisation de sources à large étendue	43
2.5	Modélisation du spectrographe pour sources étendues	45
2.6	Dimensionnement d'une configuration sans courbures	52
2.7	Conclusion du chapitre	55
3	Stabilisation du Spectromètre VIPA et traitement des courbes	57
3.1	Instabilités du laser	58
3.2	Instabilités du spectrographe VIPA	64
3.3	Échelle en fréquence du spectre d'interférence d'un spectromètre VIPA stabilisé	68
3.4	Traitement des spectres d'un spectromètre VIPA en présence de rayonnement élastique	72
3.5	Caractérisation de la stabilité de l'instrument	78
3.6	Conclusion du chapitre	81
4	Dimensionnement du microscope confocal en imagerie Brillouin confocale	83
4.1	Résolution axiale en microscopie confocale	85
4.2	Puissance couplée en microscopie confocale et intérêt dans les spectromètres Brillouin fibrés	90
4.3	Caractérisation d'un spectromètre VIPA dimensionné par sa résolution spatiale	94

4.4	Identification de la morphologie d'amas cellulaires	99
4.5	Étude de la morphogénèse d'amas cellulaires par microscopie Brillouin	101
4.5.1	Impact de l'illumination sur le développement des amas	102
4.5.2	Etude qualitative de la morphogénèse d'amas creux	105
4.5.3	Étude quantitative de l'évolution des propriétés mécaniques des cel- lules d'un amas creux durant sa morphogénèse	106
4.6	Conclusion du chapitre	109
5	Conclusion et Perspectives	111
5.1	Modélisation de la transmission de puissance dans un spectromètre VIPA . .	113
5.2	Analyse par phaseurs d'une Lorentzienne	116
5.3	Spectromètre VIPA à double dispersion	120
	Bibliographie	136
II	Annexes	137
A	Détails de calculs	139
A.1	Différence de chemin optique	139
A.2	Détail du calcul d'angle entre le faisceau d'illumination et de collection . . .	140
A.3	Calcul de l'angle solide couplé dans le VIPA	141
A.4	Equation paramétrique des isofréquences d'un spectromètre VIPA à deux axes de dispersion	143
A.5	Redressement des courbures des isofréquences	144
A.6	Divergence maximale permise pour une courbure inférieure à un seuil	145
A.7	Estimation de la puissance transmise en configuration confocale	146
A.8	Estimation de la largeur d'une Lorentzienne	147
B	Éléments de description de la spectroscopie Brillouin en Physique Quan- tique	149

Table des figures

1.1	Réflexion d'un faisceau à l'interface entre deux milieux.	11
1.2	Analogie entre le comportement d'une onde mécanique dans un amas cellulaire et un système masse-ressort.	14
1.3	Ondes élastiques atténuées à différents degrés et spectres associés. a) Echelle d'intensité unique pour chaque distribution d'intensité. b) Echelle d'intensité normalisée pour l'ensemble des pics élastiques.	16
1.4	Modélisation de l'élargissement d'un pic en microspectroscopie Brillouin avec et sans considération du spectre angulaire.	20
1.5	Simulation du spectre Brillouin théorique de l'eau en l'absence de diffusion élastique.	24
1.6	Illustration des caractéristiques nécessaires pour le laser en spectroscopie Brillouin.	27
1.7	Illustration des caractéristiques nécessaires pour le spectromètre en spectroscopie Brillouin.	28
2.1	Représentation de deux faisceaux de même étendue.	34
2.2	Représentation schématique d'un étalon VIPA.	36
2.3	Schéma de principe du fonctionnement d'un spectromètre VIPA et des paramètres attendant à sa modélisation.	37
2.4	Illustration du couplage d'un faisceau dans un VIPA, paramétrisation de l'étendue couplée et application numérique pour une source de luminance uniforme sur le faisceau.	40
2.5	Représentation schématique d'un angle solide et équivalence dans l'hypothèse des petits angles.	41
2.6	Évaluation expérimentale du gain en luminosité d'un spectromètre VIPA fibré pour différentes fibres optiques utilisées.	44

2.7	Schéma d'un faisceau incident dans un VIPA avec paramétrisation cartésienne de l'angle d'incidence.	46
2.8	Fonction de déphasage d'un VIPA et définition des isofréquences.	48
2.9	Redressement du spectre d'un faisceau de large étendue par un spectromètre VIPA.	51
2.10	Schéma explicitant le lien entre la divergence d'un faisceau plan et la courbure observée sur le spectre de ce faisceau par un spectromètre VIPA.	53
2.11	Schéma du spectromètre VIPA conçu et utilisé au cours de cette thèse. . . .	53
3.1	Principe de la stabilisation en fréquence d'une diode laser par mesure de la température ambiante.	61
3.2	Évolution de la consigne de courant de la diode laser et de la température ambiante.	63
3.3	Instabilité du spectrographe VIPA et réaligement naïf de spectres d'eau ultrapure thermalisée pris à différents jours avec le même instrument.	65
3.4	Correction des instabilités du spectrographe VIPA observés sur des spectres d'eau ultrapure thermalisée pris à différents jours avec le même instrument. .	67
3.5	Illustration des équations établies pour définir l'échelle pixel-fréquence d'un ensemble de courbes.	70
3.6	Illustration d'un spectre où le pic élastique est mal éteint.	74
3.7	Intérêt d'une fonction de fit avec ligne de base non constante.	75
3.8	Qualité du fit d'une lorentzienne sur un spectromètre VIPA fibré par fibre multimode	75
3.9	Comparaison des précisions de fit d'un pic Brillouin avec et sans prise en compte de la ligne de base.	76
3.10	Stabilité du spectrographe VIPA à temps court et long.	79
4.1	Schéma d'un microscope.	84
4.2	Volume illuminé en configuration confocale.	86
4.3	Illustration de l'apparition de la tâche d'Airy dans un microscope.	88
4.4	Comparatif des résolutions de microscopes confocaux pour différents objectifs et différentes ouvertures, à 780 nm.	89
4.5	Couplage de la puissance d'un signal issu d'un point source dans un microscope confocal en fonction de la taille de l'ouverture pour une ouverture sphérique. .	92

4.6	Couplage de l'intensité d'un signal issu d'un point source dans un microscope confocal en fonction de sa résolution axiale.	93
4.7	Analyse de la fidélité du spectromètre VIPA sur un échantillon d'eau thermalisé.	96
4.8	Écart type des mesures de décalage en fréquence et largeur des pics Brillouin pour différents temps d'exposition.	97
4.9	Exemples d'images en champ clair d'amas creux et pleins.	99
4.10	Images Brillouin d'amas cellulaires creux et pleins.	101
4.11	Schéma du protocole suivi pour mesurer l'impact de l'illumination sur la croissance d'amas cellulaires.	104
4.12	Comparaison de la prolifération des cellules d'un amas cellulaires illuminés et non illuminés par un laser à 15mW.	105
4.13	Étude qualitative de la croissance de neuf acini par microspectroscopie Brillouin.	107
4.14	Étude quantitative des variations de décalage en fréquence et largeur de pics Brillouin des cellules d'amas cellulaires pendant leur morphogénèse.	108
4.15	Étude quantitative des variations de propriété mécanique lors de la croissance de neuf acini par microspectroscopie Brillouin.	109
5.1	Comparaison des transformées discrètes et continues d'une fonction Lorentzienne.	119
5.2	Schéma d'un spectromètre VIPA avec lentille de focalisation dans le VIPA sphérique.	120
5.3	Preuve de concept d'un spectromètre VIPA à deux axes de dispersion et utilisation pour la décomposition en fréquence spatiale d'un signal.	121
A.1	Schéma de la différence de chemin optique dans une cavité optique.	139

Liste des tableaux

3.1	Tableau comparatif des précisions sur l'estimation de la relation pixel-fréquence d'un spectromètre VIPA pour différentes estimations de cette relation.	71
3.2	Tableau comparatif des extinctions du pic élastique par différentes méthodes proposées dans la littérature	77
3.3	Tableau comparatif des précisions spectrales de divers spectromètres Brillouin extraites de l'étude d'Antonacci <i>et al.</i> [1] (haut). Résultats de notre approche (bas).	81

Glossaire

Apodization : Ajout d'un filtre spatial dans le domaine de Fourier d'un composant optique pour modifier sa fonction d'étalement.

BLT : Tangente de perte Brillouin (Brillouin Loss Tangent).

Diffraction : Altération d'une onde du fait de son interaction avec un obstacle entraînant une redistribution de son intensité dans une (ou plusieurs) direction(s) privilégiée(s).

Diffusion : Altération de la direction de propagation d'une onde aléatoire du fait de son interaction avec les constituantes du milieu dans lequel elle se propage.

Electrique (champ) : Propriété de l'espace caractérisée par la présence d'une force d'attraction ou de répulsion sur une particule chargée électriquement.

Facteur de Qualité : Dans un système amorti, grandeur caractéristique de l'amortissement. Dans un oscillateur harmonique amorti, il se définit comme le rapport de la pulsation de résonance par la largeur spectrale du pic de résonance.

Fonction d'étalement (PSF) : Réponse d'un instrument de mesure à un Dirac (Point Spread Function en anglais).

Fréquence : Nombre de répétitions d'un motif par seconde. Inverse de la période

Distance entre deux modes d'interférence (FSR) : Distance exprimée en fréquence ou longueur d'onde, entre deux modes d'interférence constructive pour une même onde, d'un interféromètre (Free Spectral Range en anglais).

Impédance : Rapport pour une onde d'une cause par un effet décrivant un milieu de propagation de l'onde. Ce rapport s'exprime en général comme le rapport d'un champ extensif par un champ intensif (rapport d'un champ électrique par un champ magnétique, rapport

d'une pression par une vitesse, rapport d'une force par une déformation ...), et est utilisé dans ce manuscrit pour uniformiser la compréhension des divers phénomènes ondulatoires rencontrés

Indice Optique : Coefficient propre à un milieu et y décrivant la vitesse de propagation de la lumière.

Isotrope (Matériau) : Propriété d'un matériau présentant des propriétés mécaniques homogènes suivant toutes ses directions.

Lorentzienne : Fonction caractéristique de la densité de probabilité d'une distribution de Cauchy, définie par une fonction de type $L(x) = 1/(1 + x^2)$.

Magnétique (champ) : Propriété de l'espace caractérisée par la déviation d'une particule chargée électriquement en mouvement.

Microspectroscopie : Spectroscopie appliquée à l'échelle microscopique.

Monochromatique : Caractéristique d'une onde dont le spectre se réduit à un Dirac, qui ne se compose que d'une seule fréquence.

Onde : Variation d'une grandeur physique, pouvant se propager spatialement et/ou temporellement.

Période : Temps entre deux motifs identiques d'une onde.

Polarisation : Orientation du champ électrique.

Pouvoir de résolution : Écart minimal entre deux composantes fréquentielles qu'un spectromètre est capable de différencier.

Pulsation : Fréquence angulaire, produit de la fréquence par le périmètre du cercle unité (2π).

Réflexion : Ré-émission d'une onde à une interface entre milieux dans la direction symétrique à la direction d'incidence par rapport à la normale à l'interface.

Signal : Quantité mesurable porteuse d'information.

Spectrographe : Appareil permettant l'obtention d'un spectre.

Spectroscope : Appareil composé d'une source lumineuse et d'un spectrographe.

Spectroscopie : Analyse du spectre de la lumière.

Spectroscopie Brillouin : Spectroscopie analysant l'onde diffractée par une onde mécanique à l'échelle de groupe molécules.

Spectroscopie Raman : Spectroscopie analysant l'onde diffractée par une onde mécanique à une échelle intramoléculaire.

Vecteur d'onde : Analogue à la pulsation pour une fréquence spatiale. Vecteur orienté dans la direction avec le sens de propagation d'une onde, présentant un module inversement proportionnel à la longueur d'onde.

VIPA : (Virtually Imaged Phase Array) Réseau virtuel d'images déphasées d'une source lumineuse.

V (nombre) : (V-number en anglais) Nombre caractérisant le nombre de modes transportés par un guide d'onde optique.

Première partie

Thèse

Introduction

Au cours des dernières décennies, l'observation du monde vivant a mis en évidence l'importance des propriétés mécaniques dans le développement de cellules et d'amas cellulaires [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Toutefois, concilier une observation mécanique à haute résolution spatiale avec une mesure peu invasive sur des échantillons biologiques constitue un défi à relever. Pour répondre à cette problématique, des techniques innovantes sont nécessaires, et c'est dans ce contexte que nous nous penchons sur l'une d'elles : la microspectroscopie Brillouin, une approche totalement optique permettant de mesurer les propriétés mécaniques à l'échelle microscopique.

La diffusion Brillouin est un phénomène physique qui décrit la diffusion inélastique de la lumière par une onde mécanique. L'effet se comprend comme un phénomène analogue à l'effet Doppler, amenant le spectre de l'onde mécanique à se retrouver dans celui de la lumière diffusée. Le spectre de l'onde mécanique est lié aux propriétés mécaniques de l'échantillon. Ainsi, en regardant la lumière diffusée d'un échantillon, nous pouvons remonter jusqu'aux propriétés mécaniques du matériau.

L'utilisation de la spectroscopie Brillouin présente cependant deux défis : les fréquences des ondes mécaniques sont beaucoup plus faibles que celles des ondes lumineuses et l'intensité de la lumière diffusée par diffusion Brillouin est très faible. Ainsi, le spectromètre Brillouin doit nécessairement être capable de différencier des pics spectraux très rapprochés (on parle alors de grand "pouvoir de résolution") et être très lumineux (nous parlerons ici "d'efficacité").

L'un des instruments les plus répandus, répondant à ces contraintes, est le tandem Fabry-Pérot, commercialisé par J. Sandercock [9]. Ce dispositif utilise des étalons de Fabry-Pérot dont l'épaisseur est variée pour "analyser" la densité spectrale de puissance du signal en observant successivement des bandes spectrales étroites (de l'ordre de la dizaine de MHz)

du signal. Ce type d'instrument présente l'inconvénient majeur de scanner physiquement le spectre, ce qui rend en pratique ses temps de mesure longs (de l'ordre de la seconde à la dizaine de secondes).

En 2008, un nouveau spectromètre s'est présenté comme alternative au tandem Fabry-Pérot pour la spectroscopie Brillouin : le spectromètre VIPA (pour "Virtually Imaged Phased Array" ou "Réseau virtuel de sources déphasées") [10]. Contrairement au tandem Fabry-Pérot, ce spectromètre réalise la mesure d'un spectre en une seule acquisition, en reprenant le principe du spectromètre à réseau de diffraction : disperser les composantes spectrales d'un faisceau en angle. Cependant, dans le cas du spectromètre à VIPA, la dispersion est beaucoup plus importante et permet d'atteindre des résolutions spectrales beaucoup plus élevées. Cette amélioration considérable des performances permet ainsi des analyses plus rapides des mêmes spectres Brillouin. Cette rapidité a ainsi entraîné un regain d'intérêt pour la spectroscopie Brillouin dans le domaine de la biologie[11, 12, 13].

Cet instrument innovant présente cependant plusieurs défauts qui limitent son déploiement pour les analyses biologiques. L'instrument est déjà difficile à réaliser, ce qui impose bien souvent à l'expérimentateur d'être spécialisé dans l'alignement optique[14]. Cet alignement optique est de plus assez fin et s'avère peu stable dans le temps. Les études faites grâce à la spectroscopie Brillouin sont donc limitées en temps d'acquisition. Cela limite d'une part le suivi dans le temps d'un phénomène biologique, mais cela limite aussi le nombre d'échantillons analysables sur une campagne de mesure, et donc restreint les études statistiques. Enfin, les implémentations de l'instrument demandent encore régulièrement des temps d'intégration de plusieurs centaines de millisecondes[15, 16], empêchant l'étude de phénomènes plus rapides.

Nous proposons donc dans cette thèse d'aborder l'optimisation et la stabilisation du spectromètre VIPA pour la spectroscopie Brillouin.

Il est aujourd'hui établi que les cultures cellulaires tridimensionnelles placent les cellules dans des conditions de croissance beaucoup plus réalistes que les cultures cellulaires planes [17], nous nous proposerons de construire ce manuscrit vers l'application de la technique à l'analyse d'amas cellulaires. Cette application donne un intérêt particulier aux développements qui seront présentés, car nous manquons aujourd'hui de techniques fiables, précises et non

invasives pour l'analyse mécanique de ces échantillons.

Nous présenterons les travaux de cette thèse en commençant par revenir sur ce qu'est la spectroscopie Brillouin en chapitre 1. Cette présentation se fera en restant dans le cadre donné par la physique classique. Nous présenterons ainsi le phénomène physique de la diffusion Brillouin et comment il se peut s'utiliser dans le contexte de microspectroscopie envisagé. Nous caractériserons alors ce phénomène et irons jusqu'à modéliser un spectre Brillouin dans un échantillon d'eau. En se basant sur ces valeurs, nous en déduirons des caractéristiques minimales pour le spectromètre utilisé dans la spectroscopie Brillouin, et situerons le spectromètre VIPA par rapport à ces valeurs.

Dans le chapitre 2, nous nous intéresserons alors au spectromètre VIPA, et présenterons une nouvelle approche de l'instrument, où nous choisirons de remplacer la source par un faisceau étendu. Cette approche nous permettra d'envisager l'utilisation de spectromètres VIPA fibrés par fibre multimode, une implémentation de l'instrument intéressante du point de vue de la facilité d'alignement, de la stabilité mécanique du couplage et de la luminosité potentielle de l'instrument.

Dans le chapitre 3, nous nous intéresserons alors à la stabilité de l'ensemble, et développerons de nouvelles méthodes pour garantir un fonctionnement stable dans le temps. Ces développements nous amèneront à établir pour la première fois à notre connaissance, des valeurs de références pour la stabilité de l'instrument.

Nous étudierons alors l'utilisation de la spectroscopie Brillouin dans l'étude d'amas cellulaires dans le chapitre 4, un échantillon où les propriétés mécaniques jouent un rôle clé dans le développement et l'organisation des structures. Nous reviendrons pour cela sur l'utilisation du spectromètre VIPA en microscopie confocale et reprendrons la théorie de cette discipline pour optimiser la configuration de l'instrument. Cela nous amènera à revoir la manière dont les spectromètres VIPA sont dimensionnés, en mettant la luminosité de la configuration au cœur du dimensionnement. Ces développements nous amèneront alors à présenter notre configuration : l'une des plus stables et des plus rapides aujourd'hui pour l'application de la microspectroscopie Brillouin à la biologie. Nous l'appliquerons enfin à l'étude d'un type d'amas cellulaire particulier : les organoïdes, en identifiant leur morphologie, une opération qui aurait autrement nécessité soit l'expertise d'un chercheur, soit un marquage fluorescent.

Les travaux de cette thèse aboutiront ainsi au premier spectromètre VIPA fibré par fibre multimode pour la spectroscopie Brillouin, expérimentalement stable sur plusieurs semaines, présentant des précisions spectrales et spatiales similaires à celles rencontrées dans l'état de l'art, mais des temps d'acquisition parmi les plus rapides pour les applications présentées. En se basant sur les résultats de cette thèse, nous proposerons enfin des perspectives pour ce travail.

Le cœur du travail présenté dans ce manuscrit est donc l'utilisation en biologie, de la diffusion Brillouin. La littérature propose de nombreuses descriptions de ce phénomène, mais la compréhension de ces descriptions demande souvent un bagage en électromagnétisme assez conséquent, troublant ainsi notre compréhension du principe physique. Dans ce manuscrit, nous proposons d'approcher le phénomène de manière plus intuitive, en repartant du caractère ondulatoire de la lumière. Cette compréhension de la lumière est la plus intuitive au regard des phénomènes que nous pouvons tous observer. Cette nature permet également de déduire l'existence d'une diffusion de la lumière sur les ondes mécaniques très simplement, et de présenter plus simplement les modèles que propose la littérature de la diffraction Brillouin. Intéressons-nous donc maintenant à cette description.

Chapitre 1

Microspectroscopie Brillouin

La spectroscopie Brillouin permet d'étudier des propriétés mécaniques d'un échantillon sans rien utiliser d'autre que de la lumière. Deux explications, l'une basée sur la physique quantique (présentée en Annexe B) et l'autre sur la physique classique permettent de présenter ce phénomène à la base de cette technique. Nous resterons dans ce chapitre, sur une description classique, en considérant la lumière comme une onde électromagnétique, reprenant ainsi l'approche proposée par Maxwell en 1864[18]. Le fil conducteur de ce chapitre sera donc la physique des ondes. En particulier, nous baserons notre approche sur la notion d'impédance, une grandeur très souvent utilisée pour caractériser la propagation d'une onde dans un milieu, sur laquelle nous baserons une présentation complète de la spectroscopie Brillouin.

Ce chapitre s'intéressera dans un premier temps à la manière dont se propage la lumière et, plus particulièrement, à sa réflexion. Cela soulignera l'importance de la géométrie de mesure dans la sélection d'un vecteur d'onde pour une onde mécanique. Nous montrerons alors que le spectre de l'onde mécanique modifie l'onde lumineuse diffusée et nous nous intéresserons alors à la réponse mécanique spectrale du milieu. Dans un contexte de microscopie, l'illumination est un faisceau lumineux focalisé. Nous nous intéresserons à l'effet de cette focalisation sur le spectre du signal diffusé. Enfin, nous présenterons les aspects pratiques de la technique, d'une part ce qu'elle dit physiquement du milieu et, d'autre part, ce à quoi nous attendre en biologie en termes d'ordres de grandeur sur les signaux. Ce chapitre se terminera par une analyse de la technologie qui visera à présenter son intérêt en biologie.

1.1 Interaction entre une onde mécanique et une onde lumineuse

1.1.1 Physique de la propagation de la lumière dans un milieu

La lumière peut être décrite comme une onde qui se propage à travers un milieu. En général, ce milieu a un impact sur sa propagation. Pour décrire cet effet, nous utilisons la notion d'impédance lumineuse, également connue sous le nom d'impédance électromagnétique. L'impédance lumineuse est une grandeur qui caractérise la propagation d'une onde lumineuse dans un milieu spécifique. En général, l'impédance est définie comme le rapport entre un effet et sa cause. Dans le cas de la lumière, étant une onde électromagnétique, son impédance, notée Z_{EM} , représente le rapport entre le champ électrique et le champ magnétique de l'onde.

Cette approche se précise en matière de propriétés électromagnétiques des matériaux grâce aux équations de Maxwell. En posant μ la perméabilité magnétique, ε la permittivité électrique et σ la conductivité électrique, nous arrivons à la définition scalaire de l'impédance électromagnétique :

$$Z_{EM} = \frac{\vec{E}}{\vec{H}} = \sqrt{\frac{j\omega\mu}{\sigma + j\omega\varepsilon}} \quad (1.1)$$

En règle générale, la lumière se propage dans des milieux où la conductivité électrique est négligeable : l'air, le verre, le plastique. Ces matériaux sont appelés diélectriques. Ils nous permettent de considérablement simplifier l'équation précédente en faisant intervenir Z_0 , l'impédance électromagnétique du vide :

$$Z_{EM}^* = \sqrt{\frac{\mu}{\varepsilon}} = \sqrt{\frac{\mu_0}{\varepsilon_0}} \sqrt{\frac{\mu_r}{\varepsilon_r}} = Z_0 \sqrt{\frac{\mu_r}{\varepsilon_r}} \quad (1.2)$$

où μ_0 et ε_0 sont les perméabilité magnétique et permittivité électrique du vide et μ_r et ε_r les perméabilités magnétiques relatives et permittivité électrique relative du milieu de propagation.

L'indice optique exprime le rapport de la vitesse de la lumière dans le vide, à la vitesse de phase de la lumière : $n = c_0/c_n$. Sa définition en électromagnétisme $n = \sqrt{\mu_r\varepsilon_r}$, nous invite

à établir un lien avec l'impédance électromagnétique :

$$n = \frac{Z_{EM}^*}{Z_0} \varepsilon_r = \frac{Z_0}{Z_{EM}^*} \mu_r \quad (1.3)$$

Étant donné que pour toute onde, une réflexion n'intervient que si et seulement si l'impédance caractéristique du milieu de propagation change, une modification de l'indice de réfraction dans le milieu de propagation d'une onde lumineuse résultera en une modification de sa propagation. Voyons maintenant comment lier les propriétés d'une onde mécanique à ces variations d'indice.

1.1.2 Onde mécanique et indice optique

Les changements d'indice de réfraction se produisent lorsque la densité d'un matériau varie, pour une composition donnée. Ce phénomène est exprimé par l'équation de Lorentz-Lorenz ¹ :

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = \frac{4\pi}{3} N \alpha \quad (1.4)$$

Ici, N désigne la densité de molécules par unité de volume et α représente la polarisabilité moyenne des molécules. Étant donné que la densité de molécules est directement liée à la densité volumique locale du matériau (par la masse moyenne des molécules), les variations de densité volumique entraînent des fluctuations de l'indice optique. Une onde mécanique, étant une onde de densité, elle peut donc être comprise comme une onde d'indice optique ².

En pratique, lorsqu'un matériau se trouve à une température supérieure au zéro absolu, il est soumis à l'agitation thermique. Cette agitation se manifeste comme un mouvement spontané et désordonné de la matière, créant ainsi un continuum d'ondes mécaniques. Pour des échelles de longueurs d'ondes élevées (de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres), nous pouvons considérer que ce continuum d'ondes mécaniques peut se décomposer en ondes mécaniques de fréquences, longueurs d'onde et directions aléatoires. Lorsque la lumière se propage dans ce matériau, elle interagit de manière cohérente avec ces ondes, via les variations de polarisabilité du milieu associées aux ondes mécaniques, entraînant un phénomène de diffusion lumineuse : la diffusion Brillouin. Cette diffusion est alors caractérisée de spontanée. Dans certains cas, il peut être préférable de ne pas utiliser cette diffusion spontanée, et d'induire

1. Cette relation est équivalente à l'équation de Clausius-Mossotti, qui implique la permittivité électrique

2. Notons que cela n'est vrai que pour des ondes de compression, ce que nous regarderons dans notre approche. Pour une onde de cisaillement, la lumière est dépolarisée et donc le phénomène se complexifie.

délibérément une onde mécanique dans le milieu pour observer une diffusion contrôlée. Cette approche est connue sous le nom de diffusion stimulée. En spectroscopie Brillouin, ces deux approches sont utilisées : la spectroscopie Brillouin spontanée [19, 20] et la spectroscopie Brillouin stimulée [21, 22].

Dans la suite de ce chapitre, nous nous concentrerons exclusivement sur la diffusion Brillouin spontanée, avec l'objectif de déduire de cette observation, une compréhension au moins partielle de la mécanique de l'amas. Pour parvenir à cette compréhension mécanique, nous devons limiter notre étude à une onde mécanique spécifique. Cela nous amène à nous intéresser maintenant aux méthodes permettant d'isoler une seule onde mécanique à partir du continuum d'ondes mécaniques présentes dans le matériau.

1.2 Géométrie de mesure et ondes mécaniques

1.2.1 Direction de propagation de l'onde mécanique

En spectroscopie Brillouin, le milieu observé est constitué d'ondes mécaniques de diverses fréquences, longueurs d'onde et directions. Lorsqu'une onde lumineuse interagit avec ces ondes mécaniques, une géométrie de diffusion bien précise apparaît. Cette géométrie impose la direction de diffusion du rayon diffusé, de manière analogue au cas où une onde lumineuse est réfléchi à l'interface entre deux matériaux. La Figure 1.1a présente cette configuration : à l'interface entre un matériau d'indice optique n_1 et un matériau d'indice optique n_2 , le faisceau lumineux se réfléchit dans le plan du rayon incident et de la normale à la surface, de manière symétrique à la normale à la surface. Cette symétrie est ici représentée en notant θ_1 l'angle d'incidence du rayon incident par rapport à la normale : cet angle définit aussi l'angle entre la normale et le rayon diffusé.

Cette analogie nous permet de constater une symétrie, mais pour une onde mécanique plane, son explication diffère. Dans ce cas, l'onde incidente est diffusée dans toutes les directions, mais leur somme implique l'existence d'une seule direction de propagation pour le vecteur de puissance de l'onde diffusée³. La Figure 1.1b schématise alors le mécanisme de diffusion par une onde mécanique : l'onde lumineuse incidente arrive avec un angle θ_1 sur l'onde mécanique

3. En toute rigueur nous devrions donc parler de "diffraction" Brillouin. Nous nous référerons cependant à la "diffusion" Brillouin pour tout ce manuscrit dans un souci de cohérence avec le manuscrit original de Léon Brillouin et l'usage dans le milieu.

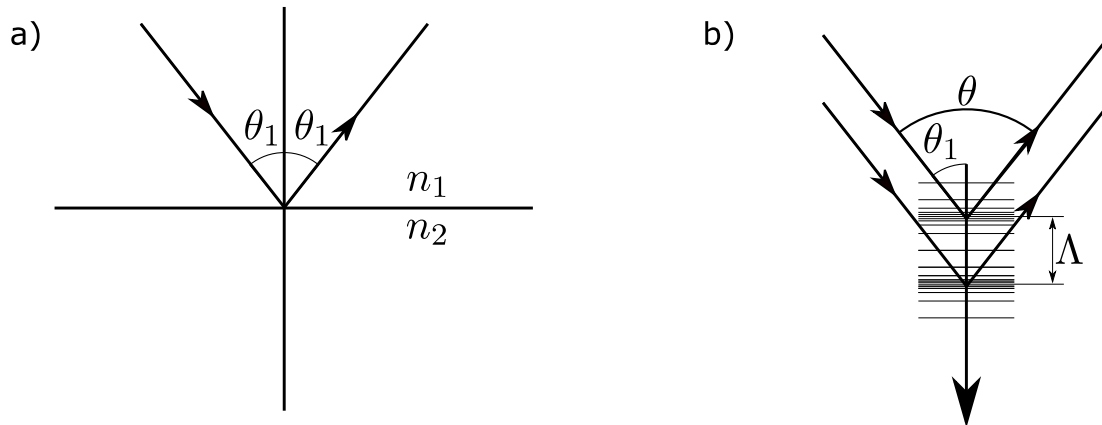


FIGURE 1.1 – Réflexion d'un faisceau à l'interface entre deux milieux. a) Cas d'une interface entre deux milieux d'indice optique n_1 et n_2 . b) Cas de la réflexion sur une onde mécanique de longueur d'onde Λ schématisée par des lignes horizontales.

de longueur d'onde Λ . Une diffusion de cette onde incidente intervient par la présence de l'onde mécanique, entraînant un rayon diffusé dans le plan défini par la direction de l'onde lumineuse incidente et de la direction de propagation de l'onde mécanique. Dans ce plan, l'angle θ entre l'onde incidente et l'onde diffusée est déterminé uniquement par leurs caractéristiques respectives.

Nous voyons donc qu'il est possible de définir une seule direction de propagation pour l'onde mécanique en fixant la géométrie d'illumination et de collection. Cela implique qu'il est possible de "sélectionner" une onde mécanique et donc d'étudier les propriétés mécaniques suivant une direction donnée, de l'échantillon induisant la diffusion de la lumière. Cette compréhension du phénomène nous amène à le mettre en équation. Commençons donc par reprendre l'approche illustratrice de cette partie de manière analytique.

1.2.2 Conservation des moments

Pour rendre l'explication précédente plus analytique, il est intéressant d'établir une analogie entre la configuration représentée en figure 1.1b et le phénomène de diffraction par un assemblage périodique, tel que celui rencontré lors de la diffraction d'une onde lumineuse par un cristal. Cette analogie permet d'établir une loi similaire à la loi de Bragg pour la diffraction

dans un cristal à la spectroscopie Brillouin⁴ :

$$2\Lambda \cos \theta_1 = m\Lambda = 2\Lambda \cos (\theta/2) \quad (1.5)$$

ici, Λ ne représente plus la distance réticulaire, mais plutôt la longueur d'onde de l'onde mécanique observée, θ_1 est l'angle entre le rayon incident et la direction de propagation de l'onde mécanique (analogue à la normale aux plans interréticulaires), m est un entier et λ est la longueur d'onde de l'onde lumineuse incidente. L'angle θ représente l'angle entre le rayon incident et le rayon diffusé.

Comme l'onde mécanique est supposée ici harmonique, m doit être égal à 1. Ainsi, pour une onde mécanique statique, l'équation 1.5 devient :

$$2 \left| \vec{k}_0 \right| \cos (\theta/2) = |\vec{q}| \quad (1.6)$$

ici, \vec{k}_0 représente le vecteur d'onde de l'onde lumineuse et \vec{q} est le vecteur d'onde de l'onde mécanique. Rappelons qu'un vecteur d'onde \vec{k} est lié à une longueur d'onde λ par son module : $|\vec{k}| = 2\pi/\lambda$.

Note : Parfois, l'angle θ est défini non pas en fonction de la géométrie, mais comme l'angle entre les vecteurs d'onde incidents et diffusés, ce qui s'écrit $\theta' = \pi - \theta$. Cette différence conduit à une réécriture de l'équation 1.6 où le cosinus est remplacé par un sinus, forme la plus souvent rencontrée dans la littérature portant sur la spectroscopie Brillouin.

Pour une onde mécanique dynamique, rien n'impose la conservation du moment entre l'onde lumineuse incidente et réfléchi. Ainsi, l'expression 1.6 se généralise sous la forme suivante :

$$|\vec{q}| = \left| \vec{k}_s - \vec{k}_0 \right| \quad (1.7)$$

En pratique, k_s et k_0 sont du même ordre de grandeur en spectroscopie Brillouin. Nous approchons l'équation 1.7 par l'équation 1.6.

Nous avons établi que la géométrie d'observation dictait la direction de propagation de l'onde

4. Cette loi est obtenue en définissant un déphasage entre les ondes diffractées à différents plans, multiple de 2π . Cette logique se retrouvera à plusieurs reprises dans la thèse, et un calcul général sera présenté en Annexe A.1.

mécanique et avons défini le vecteur d'onde de cette onde mécanique dans cette section. Nous avons donc abordé le phénomène de diffusion Brillouin du point de vue spatial. Intéressons-nous maintenant à l'aspect temporel du phénomène.

1.3 Diffusion de la lumière par une onde mécanique

1.3.1 Effet de la fréquence de l'onde mécanique

Une onde mécanique ou lumineuse peut se définir à travers une équation d'onde qui couple un caractère spatial et un caractère temporel, à travers le vecteur d'onde et la fréquence de l'onde. La section précédente abordait l'aspect spatial de cette onde, cette section sera dédiée à l'aspect temporel. Intéressons-nous donc à la fréquence des ondes lumineuses et mécaniques en jeu dans la diffusion Brillouin.

Schématiquement, nous sommes dans une configuration où une onde présentant une certaine fréquence est diffusée par une onde d'une autre fréquence. L'effet attendu sur l'onde diffusée est donc l'effet Doppler-Fizeau : la fréquence de l'onde diffusée sera la somme des fréquences des deux ondes. Le sens de propagation apparaît aussi dans cet effet : si l'objet s'éloigne, la fréquence de l'onde diffusée diminue de la fréquence de l'onde mécanique, mais s'il s'approche, elle augmente. Ainsi, en posant ν_i la fréquence de l'onde lumineuse incidente et f la fréquence de l'onde mécanique, nous pourrions ainsi exprimer la fréquence ν_s de l'onde diffusée comme :

$$\nu_s = \nu_i \pm f = \nu_i \pm V_\varphi/\Lambda \quad (1.8)$$

où V_φ définit la vitesse de phase de l'onde mécanique : $V_\varphi = f\Lambda$.

En combinant alors les équations 1.6 et 1.8, nous arrivons à :

$$\omega_s - \omega_i = \pm 2\pi f = \pm V_\varphi |\vec{q}| = \pm 2 \left| \vec{k}_0 \right| \cos(\theta/2) V_\varphi \quad (1.9)$$

où ω_i et ω_s définissent les pulsations associées aux fréquences respectives des ondes incidentes et diffusées. Ce phénomène induit donc deux décalages en fréquence de la lumière diffusée par rapport à la lumière incidente : un décalage vers les fréquences plus faibles, et un décalage vers les fréquences plus élevées. Nous appelons le pic spectral associé au décalage vers les fréquences les plus faibles pic Stokes Brillouin. De la même manière, le pic spectral associé

au décalage vers les fréquences les plus élevées est nommé pic anti-Stokes Brillouin.

Ainsi, le spectre de l'onde lumineuse diffusée contient le spectre des ondes mécaniques qui se propagent dans le milieu.

1.3.2 Effet de l'atténuation du milieu

Le spectre de l'onde mécanique n'est en pratique que la réponse du milieu à une onde mécanique. Cette réponse est très bien modélisée par celle d'un oscillateur harmonique amorti[23, 24]. Il existe plusieurs exemples d'oscillateurs harmoniques amortis, la figure 1.2 présente ainsi le mouvement d'un système masse-ressort, schématisé en figure 1.2a et la propagation d'une onde mécanique dans un amas cellulaire, schématisé en figure 1.2b.

Tout oscillateur harmonique amorti peut être décrit de la même manière, par une même forme d'équation différentielle. Nous rappelons à titre d'exemple l'équation différentielle du système masse-ressort amorti schématisé en figure 1.2a, où le ressort présente une rigidité k , l'amortisseur présente un coefficient d'amortissement b et la masse vaut m , et qui s'obtient par l'application du principe fondamental de la dynamique :

$$m\ddot{h} + b\dot{h} + kh = 0 \quad (1.10)$$

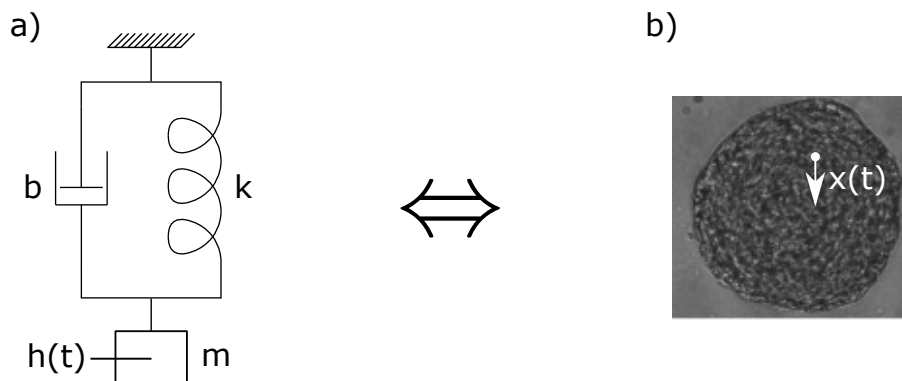


FIGURE 1.2 – Analogie entre le comportement d'une onde mécanique dans un amas cellulaire et un système masse-ressort en accord avec la modélisation proposée par Bottani *et al.*[24]. a) système masse-ressort, b) amas biologique.

L'équation différentielle d'un oscillateur harmonique pour une grandeur x , prend la forme générique suivante :

$$\ddot{x} + \frac{\omega_0}{Q}\dot{x} + \omega_0^2 x = 0 \quad (1.11)$$

où ω_0 définit la fréquence propre (ou fréquence de résonance) de l'assemblage et Q son facteur de qualité⁵.

Ainsi, la fonction de transfert de l'oscillateur et donc le spectre des ondes mécaniques s'écrira :

$$F_{\omega_0, Q}(\omega) = \frac{1}{1 + j(1/Q)(\omega/\omega_0) - (\omega/\omega_0)^2} \quad (1.12)$$

Note : Ce spectre est défini par deux grandeurs : ω_0 et Q qui sont en toute rigueur dépendante de la longueur d'onde de l'onde mécanique. En spectroscopie Brillouin, nous fixons la longueur d'onde de l'onde mécanique par la géométrie d'observation et la longueur d'onde d'illumination. Par conséquent, la pulsation de résonance ω_0 et le facteur de qualité Q qui sont observés sont en toute rigueur définie à la longueur d'onde du laser choisi et pour la géométrie d'observation retenue.

Cette fonction de transfert se retrouvera donc logiquement dans celle du champ électrique de l'onde lumineuse diffusée. Pratiquement cependant, nous ne regardons pas le champ électrique en tant que tel, mais son intensité, définie via le vecteur de Poynting $\vec{\mathcal{P}} = \vec{E} \times \vec{H}$. Dans les milieux de propagation de l'onde lumineuse supposés diélectriques, linéaires, homogènes et isotropes, une hypothèse que nous faisons pour tous les milieux de propagation de l'onde lumineuse observée, ce vecteur est proportionnel au module du champ électrique au carré et donc :

$$I = |\vec{\mathcal{P}}| \propto |\vec{E}|^2 \quad (1.13)$$

Cela implique que nous ne verrons pas $F(\omega)$ sur le spectre de l'onde diffusée, mais $|F(\omega)|^2$, qui prend la forme suivante :

$$S_{\omega_0, \Gamma}(\omega) \propto \frac{1}{(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + (\Gamma\omega)^2} = \frac{1}{(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + \left(\frac{\omega_0\omega}{Q}\right)^2} \quad (1.14)$$

où nous définissons $\Gamma = \omega_0/Q$ comme la largeur à mi-hauteur du pic spectral autour de la pulsation de résonance ω_0 .

5. Pour le système masse ressort, la fréquence de résonance est ainsi définie par $\omega_0 = \sqrt{k/m}$ et le facteur de qualité $Q = \sqrt{km}/b$. Pour le circuit RLC, la fréquence de résonance s'écrit $\omega_0 = 1/\sqrt{CL}$ et le facteur de qualité $Q = \sqrt{L/C}/R$.

La Figure 1.3 illustre ainsi quelques spectres d'ondes mécaniques atténués à différents degrés. Nous verrons à la fin de ce chapitre, que dans les échantillons biologiques, ces ondes mécaniques présentent à nos longueurs d'onde, des pulsations propres autour de 5 GHz, mais des atténuations différentes. Sur la figure 1.3, nous choisissons ainsi des atténuations, caractérisées par la largeur à mi-hauteur des pics, allant de 100 MHz à 500 MHz. Cette figure a pour but d'illustrer l'effet de l'atténuation sur les pics : plus la largeur à mi-hauteur est élevée et plus l'amplitude du pic à la fréquence de résonance est faible. Par analogie avec l'oscillateur harmonique, nous pouvons interpréter cette observation en établissant que plus le facteur de qualité est élevé donc plus la largeur est faible, et moins le milieu atténue l'onde acoustique.

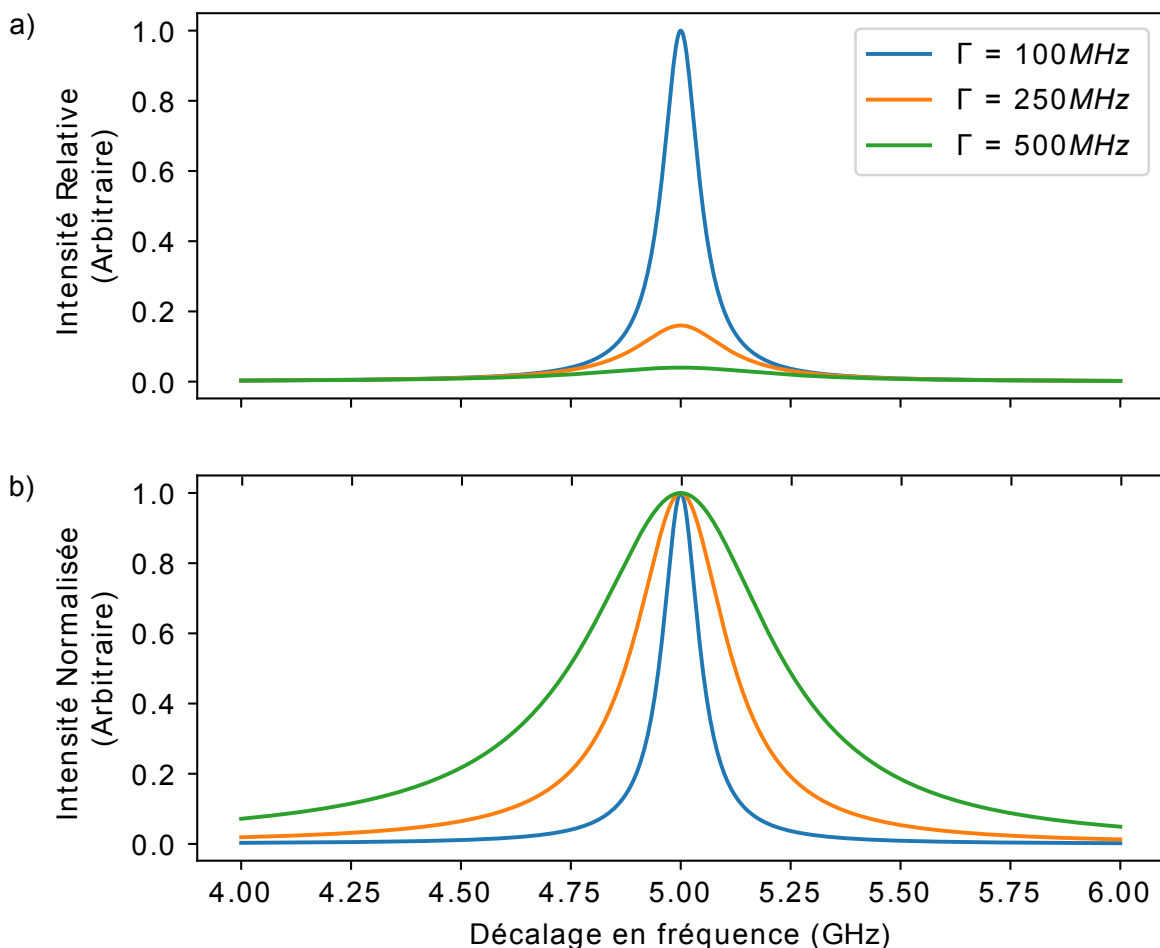


FIGURE 1.3 – Ondes élastiques atténuées à différents degrés et spectres associés. a) Echelle d'intensité unique pour chaque distribution d'intensité. b) Echelle d'intensité normalisée pour l'ensemble des pics élastiques.

Nous pouvons à présent comprendre que sur le spectre de diffusion de l'onde lumineuse diffusée, deux informations pourront être extraites pour caractériser l'onde mécanique observée,

et donc caractériser mécaniquement l'échantillon observé :

- Le décalage en fréquence par rapport à l'onde incidente, qui est lié comme nous l'avons vu à la vitesse de phase de l'onde mécanique dans le milieu
- La largeur des pics de résonance, qui est liée à l'action atténuante du milieu sur l'onde mécanique

L'amplitude de l'onde mécanique semble également être un paramètre intéressant à observer, cependant nous ne le retenons pas, en pratique, dans nos études. Voyons maintenant pourquoi.

1.3.3 Intensité de l'onde diffractée

Pour finaliser notre analyse de l'effet qu'aura une onde mécanique sur l'onde diffusée par diffusion Brillouin, nous devons maintenant nous intéresser à l'intensité du pic diffusé. Cette intensité s'écrit théoriquement [25, 26, 27] :

$$I = I_0 V_s \pi^2 kT \frac{\epsilon^4 |p_{12}|}{\lambda_0^4 \rho \nu_L^2} \quad (1.15)$$

avec I_0 et λ_0 respectivement l'intensité et la longueur d'onde de l'onde lumineuse incidente, V_s le volume diffusant l'onde lumineuse, kT l'énergie thermique du phonon, ϵ la constante diélectrique, p_{ij} les coefficients élasto-optiques de Pockels et ρ la densité volumique du matériau.

D'autres paramètres, tels que la nature du matériau, influent également sur l'intensité des pics Brillouin. Il est donc rare d'utiliser l'intensité des pics Brillouin en spectroscopie Brillouin, et nous ne nous intéresserons pas à ce paramètre dans l'analyse des échantillons.

Cependant, l'intensité des pics Brillouin présente un intérêt particulier lors du dimensionnement du spectromètre. En effet, cette intensité est souvent faible par rapport à l'intensité des pics élastiques, ce qui nécessite de s'assurer que le spectromètre soit capable de détecter les pics Brillouin. Le rapport d'intensité entre l'intensité du pic élastique et celle du pic inélastique dépend de nombreux facteurs, mais il est possible de lui définir une borne inférieure en utilisant le coefficient de Landau-Placzek [28, 29]. Ce coefficient mesure le rapport d'intensité entre le rayonnement élastique résultant de la diffusion Rayleigh dans le matériau, et le rayonnement inélastique issu de la diffusion Brillouin. Il minimise donc le rapport

expérimental observé entre le pic élastique et le pic Brillouin, en négligeant en particulier les réflexions sur toutes les optiques du système. Ce rapport reste cependant très grand, ce qui signifie que même en négligeant les diverses réflexions sur les optiques, l'intensité du rayonnement élastique restera bien plus intense que celle du rayonnement inélastique sur un spectre Brillouin.

Pour utiliser ce rapport dans le dimensionnement du spectromètre, nous devons alors pouvoir établir des ordres de grandeur pour les spectres Brillouin attendus. En particulier, nous devons savoir quels sont les décalages en fréquence attendus et quel est l'ordre de grandeur de la largeur des pics Brillouin. Cela nous demande donc de passer de cette analyse très théorique du phénomène à un modèle dérivé de notre développement. Pour établir ce modèle, commençons par revenir sur ce qui est mesuré en spectroscopie Brillouin.

1.4 Microspectroscopie

En microscopie, la lumière est focalisée pour observer des objets à une petite échelle. La microspectroscopie définissant l'alliance entre la spectroscopie et la microscopie, nous allons donc observer le spectre d'une lumière focalisée diffractée par un échantillon. Cela implique que nous n'observons plus une seule direction de propagation de l'onde mécanique, mais un ensemble de directions. Ces directions sont représentées en figure 1.4a. L'illumination a un ensemble d'angle θ_i , décomposés sur la figure en angle avec l'axe de focalisation de la lumière $\theta_{a,i}$ et en angle avec un axe orthogonal à l'axe de propagation de la lumière $\theta_{t,i}$. La collection est, de manière similaire, définie par un ensemble d'angle θ_c , décomposés sur la figure en angle avec l'axe de collection de la lumière $\theta_{a,c}$ et en angle avec un axe orthogonal à l'axe de collection de la lumière $\theta_{t,c}$.

Cette pluralité d'angles de collection et d'illumination, induit un élargissement des pics de diffraction Brillouin[30]. L'approche proposée dans la littérature fait cependant l'hypothèse d'un faisceau à spectre angulaire uniforme, ce qui n'est en pratique jamais vérifié. En négligeant ce spectre angulaire, les estimations d'élargissement des pics faits par la littérature sont donc vraisemblablement surestimés. En effet, l'hypothèse de la littérature implique que les géométries où les angles entre l'illumination et la collection sont les plus grands, soient sur-représentées, amenant à une surestimation de l'épaississement des pics.

Nous proposons donc ici d'affiner cette analyse, en prenant en compte le spectre angulaire $A(\theta_{t,i}, \theta_{a,i})$ du signal incident dans le calcul de l'élargissement des spectres. En utilisant alors l'équation 1.14 pour modéliser le spectre attendu, nous aurons, en suivant les notations de la figure 1.4, un signal réel de la forme :

$$S_{real}(\omega) = \int_{-\frac{\Theta}{2}}^{\frac{\Theta}{2}} \int_{-\pi}^{\pi} \int_{-\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}} \int_{-\pi}^{\pi} A(\theta_{t,i}, \theta_{a,i}) S_{\omega_s(\theta), \Gamma_s}(\omega) d\theta_{a,i} d\theta_{t,i} d\theta_{a,c} d\theta_{t,c} \quad (1.16)$$

Où Θ est défini par l'ouverture numérique de l'optique de collection $NA_c = n \sin \Theta$ avec n l'indice optique moyen de l'échantillon.

En utilisant l'équation 1.9, nous pouvons poser $\omega_s(\theta) = \omega_{s,0} \cos \theta/2$, avec θ défini comme fonction de $\theta_{a,i}$, $\theta_{t,i}$, $\theta_{a,c}$ et $\theta_{t,c}$, suivant la notation de la figure 1.4a (voir annexe A.2). Il est alors possible de simuler l'élargissement du spectre en prenant en compte la nature du faisceau incident. La figure 1.4b compare ainsi deux approches de la forme du faisceau : un faisceau à spectre angulaire uniforme, et un faisceau à spectre angulaire Gaussien (définissant un rayon Gaussien), dans une géométrie de rétrodiffusion ($\theta = 0^\circ$). Nous remarquons alors que la prise en compte du spectre angulaire du signal réduit l'effet prédit dans [30]. Cette remarque prendra toute son importance dans l'approche en imagerie que nous proposons ici à la spectroscopie Brillouin.

Notons finalement qu'en microscopie, l'ouverture numérique des optiques détermine la résolution spatiale. Par conséquent, en microspectroscopie Brillouin, nous pouvons déjà prédire l'existence d'un compromis entre résolution spatiale et spectrale. Notons aussi qu'ici l'échantillon était supposé isotrope. Gardons cependant à l'esprit que cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée, et que ces différences mécaniques viendront complexifier l'étude et remettre en question l'utilisation d'objectifs à large ouverture.

1.5 Interprétation de la spectroscopie Brillouin

1.5.1 Module Mécanique

Dans la géométrie d'observation généralement utilisée en spectroscopie Brillouin, et en particulier dans mes travaux : la rétrodiffusion, nous ne pouvons qu'observer des ondes longitudinales (en opposition aux ondes transverses). Étant donné que nous observons à la fois

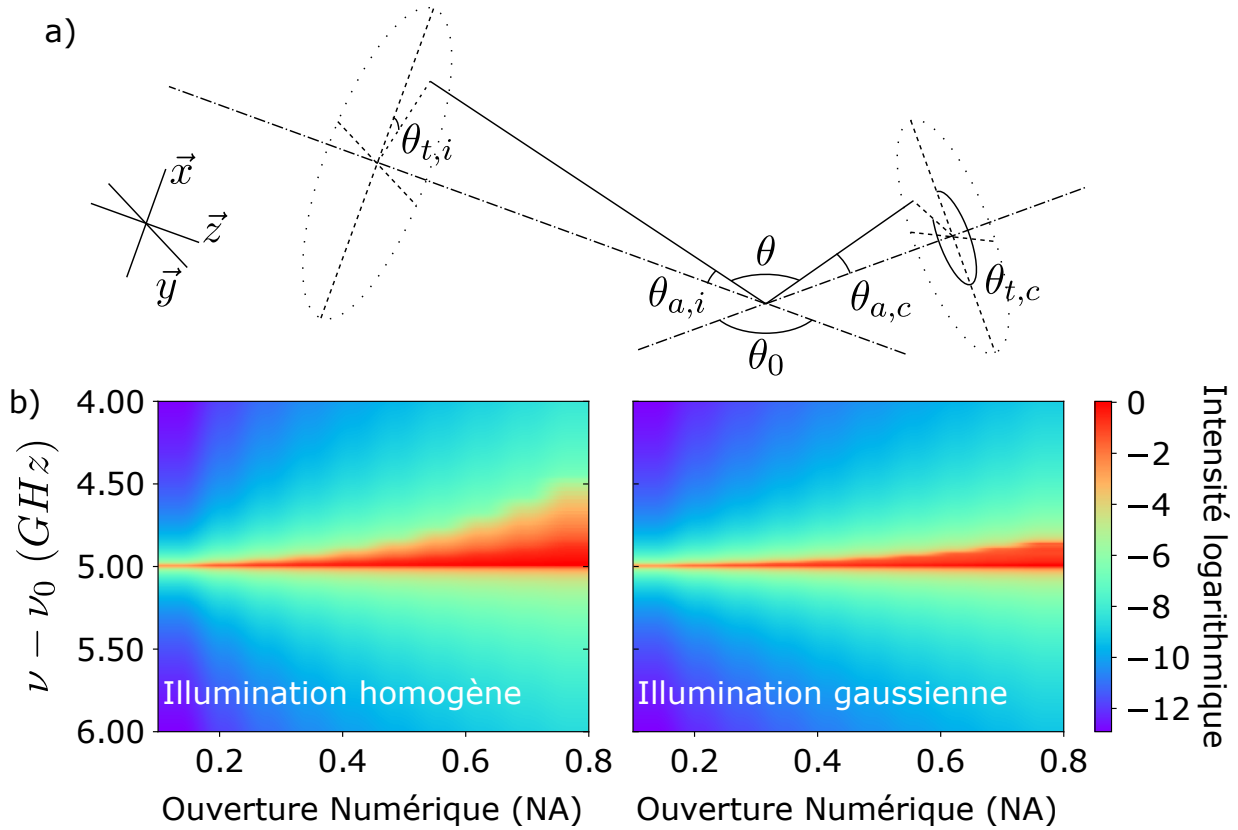


FIGURE 1.4 – a) Géométrie de la microspectroscopie. Les indices correspondent à : a - axial, t - transverse, i - illumination, c - collection, 0 - géométrie en configuration par faisceaux. b) Comparaison de l'élargissement des pics spectraux pour une illumination présentant (gauche) un spectre angulaire homogène et (droite) un spectre angulaire Gaussien. La position du pic est définie arbitrairement à 5 GHz et sa largeur à mi-hauteur à 10 MHz pour permettre une visualisation claire de l'élargissement du pic dû à l'ouverture numérique des optiques utilisées. L'échantillonnage spectral est défini à 1 MHz.

la vitesse de cette onde longitudinale et son atténuation, nous avons accès à un *module physique* propre au matériau observé, c'est-à-dire à un paramètre dictant la propagation d'une onde mécanique dans le milieu observé. Ce module peut donc être compris comme une "impédance mécanique", c'est-à-dire le rapport d'une grandeur extensive, ici la contrainte, par une grandeur intensive, ici la déformation. Ce module mécanique est noté par convention : M , et est défini pour une onde mécanique de pulsation ω_s et atténuation Γ_s , par :

$$M(\omega_s) = \frac{\sigma_L}{\varepsilon_L} = \frac{\rho}{|\bar{q}|^2} \omega_s^2 + i \frac{\rho}{|\bar{q}|^2} \omega_s \Gamma_s \quad (1.17)$$

Ce module $M(\omega_s)$ régissant la propagation d'une onde longitudinale, se nomme "*Module longitudinal*". Il s'agit d'un nombre complexe dont la partie réelle est directement liée à la vitesse de l'onde longitudinale dans le milieu, et la partie imaginaire à l'atténuation de celle-ci.

Le module longitudinal est une propriété intrinsèque des milieux qui seront observés et il nous permet de donner un autre sens au facteur de qualité. En reprenant la relation 1.14 et les notations adoptées pour le spectre de l'onde diffusée, nous avons :

$$Q(\omega_s) = \frac{\omega_s}{\Gamma_s} = \frac{\text{Re}(M(\omega_s))}{\text{Im}(M(\omega_s))} \quad (1.18)$$

Le facteur de qualité est donc non seulement un lien entre la largeur d'un pic spectral et sa position moyenne, mais aussi un rapport entre la partie réelle et imaginaire du module longitudinal, et ainsi un paramètre mécanique intrinsèque des milieux. Nous remarquons, en reprenant l'équation 1.17, que l'expression de ce paramètre est en soi indépendant du vecteur d'onde de l'onde mécanique q et de la densité du milieu observé ρ . Cela n'empêche pas sa valeur de varier en fonction de la fréquence de l'onde mécanique mais il est particulièrement intéressant car sa valeur est accessible facilement (par le rapport de la largeur du pic de diffusion Brillouin par son décalage fréquentiel), et a un sens purement mécanique, indépendant des propriétés optiques ou de la densité du milieu. En général, l'inverse de ce paramètre est utilisé pour caractériser les milieux, sous le nom de *Tangente de Perte Brillouin* (ou BLT en anglais pour *Brillouin Loss Tangent*), qui se définit comme :

$$BLT(\omega_s) = \frac{1}{Q(\omega_s)} = \frac{\Gamma_s}{\omega_s} = \frac{\text{Im}(M(\omega_s))}{\text{Re}(M(\omega_s))} \quad (1.19)$$

La spectroscopie Brillouin est donc en apparence très similaire à la spectroscopie Raman : dans les deux cas nous regardons le spectre du signal diffusé, dans les deux cas une onde induit un décalage en fréquence que nous observons sur une onde diffusée. Cependant, les deux techniques diffèrent par la nature de ce qui est observé : en spectroscopie Brillouin, nous ne regardons pas la composition chimique de l'échantillon, mais plutôt l'une de ses propriétés mécaniques (le module longitudinal). Étant donné que la spectroscopie Raman est plus largement développée que la spectroscopie Brillouin, il est pertinent de comparer ces deux techniques afin de comprendre leurs similarités et leurs différences, avant de finaliser cette section en présentant des ordres de grandeurs pour la spectroscopie Brillouin.

1.5.2 Spectroscopies Raman et Brillouin

Le développement fait pour la spectroscopie Brillouin peut également expliquer la spectroscopie Raman. Ces deux techniques diffèrent en effet sur un seul point : les supports de l'onde mécanique observée, ou dit autrement, la nature des éléments vibrants.

En spectroscopie Raman, nous observons des vibrations d'atomes dans les molécules. Les fréquences des vibrations alors en jeu sont relativement élevées : en général de 200 cm^{-1} à 5000 cm^{-1} , soit en termes fréquentiels : de 6 THz à 150 THz. En spectroscopie Brillouin, ce sont des mouvements entre molécules que l'on observe. Les fréquences sont donc beaucoup plus faibles : de l'ordre de la dizaine de GHz.

Dans les deux cas, un spectre est collecté, et la compréhension de ce spectre passe par les étapes décrites dans ce chapitre. L'interprétation du spectre par contre diffère fortement : en spectroscopie Raman, un grand nombre de liaisons atomiques sont observées, entraînant la présence d'un grand nombre de pics dans le spectre diffusé. Ces pics correspondent à tous les états vibratoires actifs en Raman, et en particulier, aux vibrations entre liaisons chimiques. En spectroscopie Brillouin, un seul pic sera le plus souvent visible : celui de la vibration haute fréquence se propageant dans un milieu localement quasi-isotrope. Ainsi, là où la spectroscopie Raman amène une information essentiellement chimique (les liaisons entre atomes dans une molécule), la spectroscopie Brillouin amène une information purement mécanique (la propagation d'une onde mécanique à une échelle microscopique).

Cette différence de support d'onde induit des différences sur le déplacement d'une particule par rapport à sa voisine. En spectroscopie Raman, deux atomes ou plus bougent en phase, le reste des particules de l'échantillon bouge de manière indépendante : on parle de régime vibratoire (ou de phonon) optique. En spectroscopie Brillouin, un grand nombre de particules se déplacent en phase, car il s'agit d'un mouvement entre molécules : on parle de régime vibratoire (ou de phonon) acoustique.

Ces différences expliquent que nous ne puissions pas observer un signal obtenu par diffusion Raman de la même manière que nous observons un signal obtenu par diffusion Brillouin. Les différences d'instruments en particulier pourquoi la spectroscopie Raman est beaucoup plus répandue aujourd'hui que la spectroscopie Brillouin. Afin de clarifier les contraintes liées à l'observation de spectres Brillouin, nous allons maintenant simuler un spectre Brillouin pertinent pour notre étude : celui de l'eau, en reprenant les résultats présentés dans ce chapitre.

1.5.3 Ordres de grandeurs en spectroscopie Brillouin

Dans ce travail, nous appliquerons la spectroscopie à des échantillons d'origine biologique. En biologie, l'eau est le composant majoritaire, et donc les propriétés mécaniques des échantillons sont très proches de celles de l'eau. Le spectre de l'eau obtenu dans une géométrie de rétrodiffusion ($\theta = 0^\circ$), avec un laser proche infrarouge ($\lambda = 780$ nm par exemple), se caractérise théoriquement par un décalage en fréquence correspondant à la vitesse du son dans l'eau, soit environ $V_\varphi \approx 1520$ m/s. Connaissant l'indice optique de l'eau (1.33), cela amènerait à un décalage en fréquence, en accord avec l'équation 1.9, de :

$$\nu_{eau,th} = \frac{2n}{\lambda} V_\varphi = 5.18 \text{ GHz} \quad (1.20)$$

De même, la largeur d'un pic Brillouin d'eau peut s'estimer à travers le modèle de l'oscillateur harmonique amorti. Dans ce modèle[24] le facteur de qualité et donc la largeur à mi-hauteur des pics spectraux dépendent de la viscosité longitudinale de l'eau prise à la fréquence d'observation ($\eta(\omega_B)$), et de la densité de l'eau ($\rho \approx 10^6$ g.m⁻³)

$$Q_{eau,th} = \frac{\rho V_\varphi}{\eta(\omega_B) |\vec{q}|} \quad (1.21)$$

La valeur de la viscosité longitudinale de l'eau aux fréquences utilisées amène alors à des largeurs de pics de l'ordre de 300 MHz – 400 MHz pour l'eau [31, 32]. La figure 1.5 illustre le spectre attendu pour les valeurs spécifiées pour l'eau. On y voit deux pics apparaître à un décalage en fréquence pris par rapport au laser de 5.182 GHz, suivant le calcul précédent. Ces deux pics correspondent aux pics Stokes (décalage en fréquence vers les plus basses fréquences) et anti-Stokes (décalage en fréquence vers les plus hautes fréquences) Brillouin, dues au sens de propagation de l'onde mécanique suivant l'axe d'observation. Dans cette figure, la largeur des pics est de 300 MHz, suivant les estimations présentées ci-dessus.

Cette partie finalise la présentation du phénomène de diffusion Brillouin. Notons que ce phénomène physique est fondamental dans le sens où il apparaît naturellement, dans tous les matériaux. Cela nous encourage à vouloir l'utiliser dans l'étude des matériaux, et en particulier, dans l'étude des matériaux biologiques. Pour ce type d'échantillon en effet, la possibilité de mesurer sans contraintes, les propriétés mécaniques d'échantillons à des échelles sub-micrométriques, est une perspective très attirante. Dressons donc à présent un rapide bilan des avantages de la technologie pour la biologie.

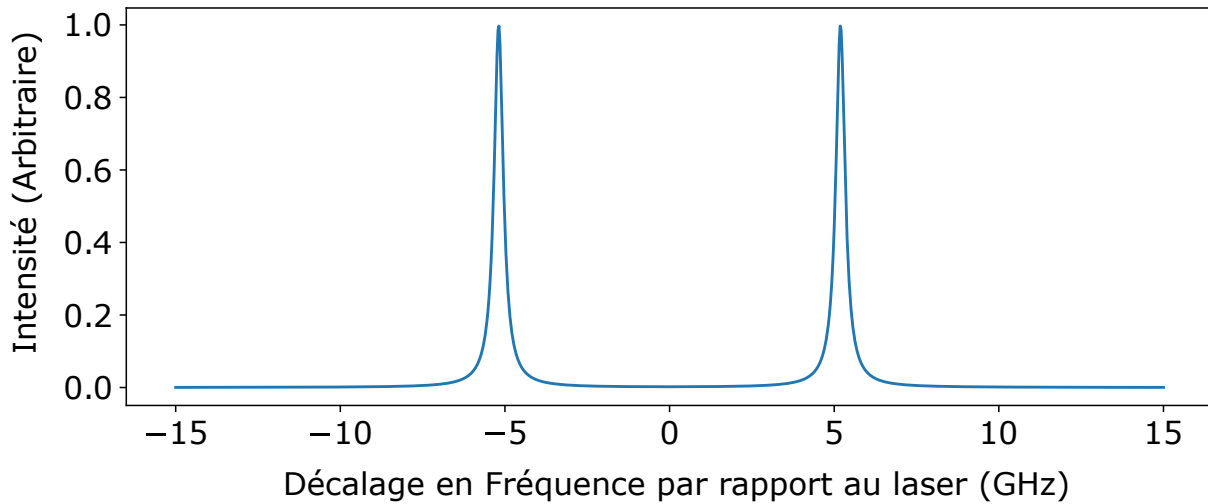


FIGURE 1.5 – Simulation du spectre Brillouin théorique de l'eau en l'absence de diffusion élastique. Le spectre est un spectre de décalage en fréquence avec des pics de diffusion Brillouin situés aux valeurs théoriques calculées.

1.6 Intérêt en Biologie

Au terme de ce premier chapitre dédié à la spectroscopie Brillouin, nous pouvons décrire ce domaine comme l'analyse d'une onde mécanique dans un milieu, sans nécessiter de marquage ni de contact direct avec l'échantillon. Pratiquement, la spectroscopie Brillouin permet de caractériser un milieu en mesurant certaines de ses propriétés intrinsèques sans altérer celui-ci. Cette particularité en fait une technologie d'analyse adaptée aux échantillons sensibles, notamment pour l'étude des échantillons biologiques vivants.

Compatibilité de la technique avec des échantillons biologiques Étant donné que tout échantillon vivant peut mourir, tous les échantillons d'intérêt dans ce travail sont fragiles. La spectroscopie Brillouin présente l'avantage de ne demander d'interactions avec ces échantillons qu'à travers la lumière. Ainsi, en choisissant des niveaux d'illumination faibles, il nous est possible d'examiner des échantillons biologiques sans les endommager. La technique peut également être utilisée non seulement en laboratoire, mais aussi sur le terrain, comme l'ont montré certaines études en ophtalmologie[33, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. De plus, elle est compatible avec des mesures en milieu contrôlé, comme dans un incubateur, ce qui réduit encore davantage l'impact de la mesure sur l'échantillon.

Compatibilité de la technique avec d'autres analyses optiques La spectroscopie Brillouin utilise une gamme de fréquences très étroite, ce qui lui permet de s'intégrer facilement à d'autres techniques d'imagerie comme la fluorescence, la spectroscopie Raman, ou

l'imagerie de phase, facilitant ainsi les analyses complémentaires.

Résolution spatiale En ce qui concerne la résolution spatiale de la technique, deux limites principales sont à considérer : la longueur d'onde de la lumière utilisée, qui est soumise à la limite de diffusion, et la distance caractéristique d'atténuation des ondes acoustiques dans l'échantillon. Généralement, pour les échantillons biologiques, les hétérogénéités viscoélastiques permettent de négliger l'atténuation de l'onde mécanique par rapport à la limite de diffusion[40]. Cela implique qu'en utilisant une lumière visible, la résolution spatiale maximale sera d'environ 500 nm, rendant possible l'imagerie mécanique intracellulaire sans marquage.

Mesure de propriétés mécaniques sans contact Outre la possibilité d'imager, la spectroscopie Brillouin permet de caractériser les propriétés mécaniques de l'échantillon dans la direction de propagation de l'onde mécanique. Comme cette mesure est basée sur l'observation de l'onde mécanique, aucun contact direct n'est nécessaire, rendant possible l'extraction de mesures de propriétés mécaniques dans des amas cellulaires, ce qui serait autrement presque impossible.

Coût de mesure Étant donné qu'aucun marqueur n'est nécessaire, le coût d'une mesure se limite à l'instrument de mesure lui-même, éliminant ainsi les dépenses liées aux marqueurs et aux manipulations nécessaires pour les introduire dans les échantillons. Cela rend la spectroscopie Brillouin plus économique et efficace pour de nombreuses applications.

La spectroscopie Brillouin a donc un intérêt certain dans l'étude d'amas cellulaires et plus précisément, dans l'étude de leurs propriétés mécaniques. Nous allons donc maintenant nous intéresser aux besoins instrumentaux qui découlent de cet intérêt.

1.7 Besoins d'un spectromètre Brillouin

1.7.1 Laser

Pour obtenir un spectre Brillouin, des conditions nécessaires sur les instruments de mesure peuvent être établies à partir de la présentation du phénomène faite précédemment. Nous proposons ici de commencer par le choix du laser, qui est prédominant. Ce choix se résume à trois paramètres :

- La longueur d'onde du laser
- La largeur du pic d'émission du laser
- Le niveau d'émission spontanée amplifiée du laser (ASE)

Dans un contexte biologique, la longueur d'onde du laser privilégiée se situe dans une "fenêtre spectrale biologique", située entre 700 nm et 1000 nm [41]. Cette fenêtre permet de limiter l'absorption de la lumière à la fois par les protéines, les lipides et par l'eau et donc minimise la phototoxicité. Dans ce travail, nous avons donc choisi un laser à 780 nm, qui présente l'avantage de pouvoir être absorbé par une cellule de Rubidium, qui peut ainsi servir de filtre à la lumière renvoyée élastiquement par l'échantillon[42].

La figure 1.6 schématise l'importance des besoins en largeur de pic et d'ASE du laser. En figure 1.6a, un spectre Brillouin obtenu avec un laser présentant une largeur de pic trop importante, et un ASE nul est modélisée. Nous voyons que les pics Brillouin sont "noyés" dans le pic laser et donc il sera difficile de les utiliser. En figure 1.6b, la largeur du pic laser est maintenant réduite pour ne pas affecter les pics Brillouin mais le niveau d'ASE simulé est maintenant trop haut. Nous voyons qu'ici aussi, il sera difficile d'extraire les pics Brillouin et de les analyser. La figure 1.6c présente finalement un laser acceptable pour l'étude des pics Brillouin, présentant un niveau d'ASE compatible avec l'intensité des pics Brillouin et une largeur de pic permettant de les observer.

Pour un échantillon biologique, la section 1.5.3 prévoit un décalage de l'ordre de 5 GHz. Pour pouvoir observer le spectre de la lumière diffractée par diffraction Brillouin, nous devons donc avoir :

$$I_{laser}(5 \text{ GHz}) \ll I_{Brillouin} \quad (1.22)$$

avec $I_{laser}(\nu)$ l'intensité du laser défini à une fréquence ν de son maximum, et $I_{Brillouin}$ l'intensité maximale du pic Brillouin.

En première approche, l'intensité du pic Brillouin d'un échantillon biologique peut être estimée via le coefficient de Landau-Placzek, qui donne le ratio de l'intensité du pic Brillouin par celle du rayonnement Rayleigh issu uniquement de l'échantillon observé [26]. Techniquement, nous pouvons le voir comme un cas parfait où l'échantillon ne diffuse pas la lumière et où aucune réflexion sur les composants optiques ne se retrouve dans le signal. Ce coeffi-

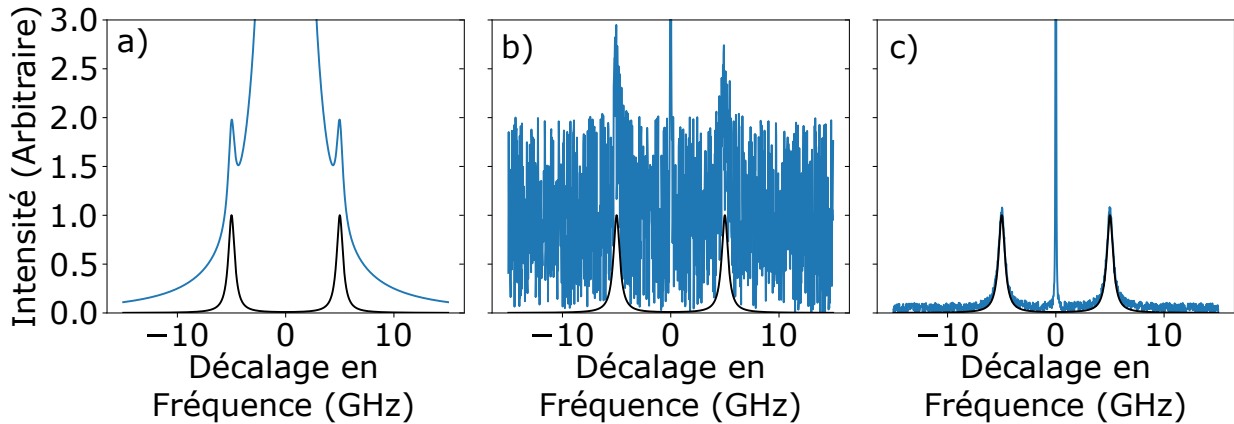


FIGURE 1.6 – Illustration des caractéristiques nécessaires pour le laser en spectroscopie Brillouin. Sur les trois figures, le signal observé est le signal optimal, où la seule source de bruit vient du laser. a) Laser trop large pour observer correctement les pics Brillouin. b) Laser trop bruité (ASE) pour observer correctement les pics Brillouin. c) Laser avec un niveau de bruit (ASE) et une largeur assez faible pour l’observation de pics Brillouin.

cient pour l’eau, est de l’ordre de 0.01[29], soit $I_{laser}(0) = 200I_{Brillouin}$. En admettant que la condition 1.22 soit vérifiée pour $I_{laser}(5 \text{ GHz}) < 10I_{Brillouin}$, cela impose une extinction du laser à 5 GHz de $10 \log 1/2000 = -33 \text{ dB}$. Si le laser présente une distribution spectrale Lorentzienne, notre dimensionnement implique une largeur de pic inférieure à 200 MHz et un niveau d’ASE inférieur à -33 dB .

A 780 nm, la seule source de rayonnement laser accessible aujourd’hui, est le laser diode. Les lasers diode présentent usuellement des largeurs de pic inférieures 1 MHz et des niveaux d’ASE rarement supérieures à 40 dB. Cela veut donc dire que pour notre implémentation, nous devons prévoir un étage de filtrage de l’ASE pour notre laser. Nous reviendrons sur ce filtrage en chapitre 3.

Après avoir établi les besoins de l’illumination, nous pouvons maintenant nous tourner vers les besoins du spectrographe que nous utiliserons pour obtenir les spectres Brillouin.

1.7.2 Spectromètre

L’instrument de mesure sera, comme dit en introduction de ce chapitre, défini par son contraste. Ce contraste s’obtient via la fonction d’étalement de l’instrument, ou Point Spread Function (PSF) en anglais, à travers le pouvoir de résolution \mathcal{R}_0 . Cette grandeur définit la distance minimale entre deux pics spectraux pour que la réponse de l’instrument permette de les différencier. La figure 1.7 donne une description schématique de ce paramètre. En

figure 1.7a et b, nous simulons la réponse d'un spectromètre (en bleu) à un spectre Brillouin (en noir). En figure 1.7a, le pouvoir de résolution du spectromètre est trop faible, et il est difficile d'identifier correctement les deux pics Brillouin observés. En figure 1.7b maintenant, le pouvoir de résolution est plus important, et nous voyons clairement se détacher les deux pics Brillouin sur la simulation du spectre renvoyé par le spectromètre.

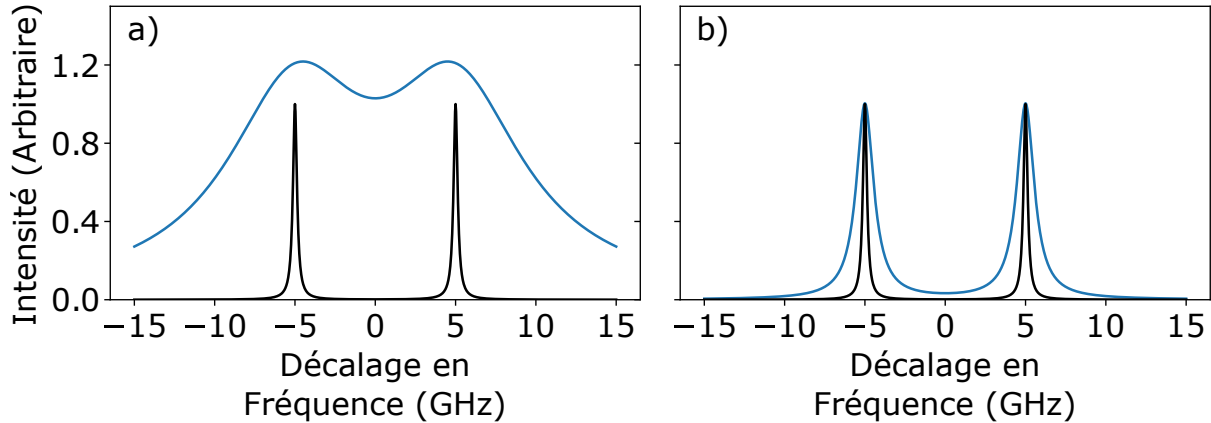


FIGURE 1.7 – Illustration des caractéristiques nécessaires pour le spectromètre en spectroscopie Brillouin. Sur les deux figures, le signal observé est le signal optimal, sans aucun bruit. a) Pouvoir de résolution trop faible : les pics ne peuvent pas être identifiés indépendamment l'un de l'autre b) Pouvoir de résolution suffisant : les pics peuvent être différenciés.

Le pouvoir de résolution se définit généralement aux fréquences d'intérêt en spectroscopie Brillouin, comme :

$$\mathcal{R}_0 = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} \approx \frac{\nu}{\Delta\nu} \quad (1.23)$$

Où λ (respectivement ν) définit la longueur d'onde (respectivement la fréquence) autour de laquelle le pouvoir de résolution est défini et $\Delta\lambda$ (respectivement $\Delta\nu$) la largeur à mi-hauteur en longueur d'onde (respectivement en fréquence) d'un pic spectral. Notons que l'approximation est ici valide car les largeurs de pics en jeu comparées à la fréquence ou longueur d'onde moyenne des signaux sont négligeables.

Les ordres de grandeurs définis en 1.5.3 prévoient l'apparition, sur notre spectre, de deux pics, séparés tous deux d'environ 5 GHz de la fréquence du laser $\nu_0 = c_0/(780 \cdot 10^{-9})$. Le pouvoir de résolution minimal du spectromètre en l'absence de pic élastique, devra donc être de $\mathcal{R}_{0,min} = \nu_0/10^{10} \approx 4 \cdot 10^3$. Cette valeur est une limite basse au pouvoir de résolution attendu pour l'instrument. En particulier, si la largeur des pics Brillouin doit être mesurée, un pouvoir de résolution supérieur à $4 \cdot 10^3$ sera nécessaire. Notons que ce dimen-

sionnement part du principe que le pic spectral du laser a une largeur nulle. En pratique, un pouvoir de résolution bien supérieur à 4.10^3 est donc nécessaire en spectroscopie Brillouin.

En général, nous choisissons d'utiliser des spectrographes "VIPA" (pour "Virtually Imaged Phased Array" ou Réseau de sources virtuelles déphasées) pour ce type d'analyse. Un spectromètre VIPA présente un pouvoir de résolution usuel de l'ordre de $\mathcal{R}_0 \approx 7.10^5$. L'utilisation de ce type d'instrument est donc cohérente avec les échantillons que nous souhaitons observer. L'optimisation de cette classe d'instrument représentera donc le cœur de ce manuscrit.

1.8 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons donné une description à la fois simple et complète de la microspectroscopie Brillouin, en mettant l'accent sur son application en biologie. Nous avons ici poussé l'analyse du phénomène jusqu'à établir des simulations pour étudier les réponses attendues pour les échantillons d'intérêt dans cette thèse, à savoir les amas cellulaires. À l'issue de ces simulations, nous avons pu établir que le spectrographe VIPA était adapté pour observer les spectres issus de ces amas. L'intérêt de cet instrument et son impact dans l'application de la spectroscopie Brillouin à la biologie sont indéniables. Cependant, les implémentations de ce type d'appareil sont souvent assez limitées et nous nous proposerons donc, dans le prochain chapitre, d'explorer une de ses potentielles améliorations : l'utilisation d'une fibre optique multimode pour le couplage d'un faisceau lumineux vers cet instrument.

Chapitre 2

Utilisation du Spectromètre VIPA avec sources étendues

Le premier chapitre a introduit la spectroscopie Brillouin dans son ensemble : les origines de la diffusion Brillouin, sa modélisation, la forme des spectres et les besoins en termes d'équipements pour observer ce phénomène. Nous avons ainsi vu que le spectromètre VIPA était un instrument capable d'obtenir ces spectres. L'utilisation de cet instrument est bien établi dans la littérature, en particulier dans son implémentation fibrée, sous la forme d'un spectromètre VIPA fibré par une fibre monomode [43, 44, 14]. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons au fibrage de l'instrument par les fibres optiques multimodes.

Cette approche présente un intérêt pratique car le couplage d'un signal dans une fibre multimode est souvent plus aisé que dans une fibre monomode. L'intérêt est également théorique, en termes de flux lumineux, car le nombre de modes d'une fibre multimode est lié à l'étendue du faisceau qu'elle transporte. Ainsi, l'utilisation d'une fibre multimode permettra d'accroître le flux lumineux Φ transporté, défini comme le produit de la luminance de la source L par son étendue géométrique G :

$$\Phi = LG \tag{2.1}$$

avec le flux lumineux Φ donné en W , la luminance L en $W.m^{-2}.sr^{-1}$ et l'étendue G en $m^2.sr$. Ainsi, l'utilisation d'une fibre multimode, amenant à l'utilisation de faisceaux de plus grande étendue que les signaux issus de fibres monomode, semble intéressante pour accroître de manière simple la luminosité de l'instrument. Cette idée est cependant mise en défaut dans la littérature, à travers l'étude de Meng et al. [45] où les auteurs estiment les paramètres d'un spectromètre VIPA nécessaires à la transmission optimale d'un faisceau issu d'une fibre

multimode. Ces estimations amènent alors à conclure à l'inefficacité du spectrographe VIPA fibré par fibre multimode.

Notons que le résultat présenté dans l'étude fait l'hypothèse d'un couplage total du signal[45]. Or l'utilisation de sources à large étendue dans les spectromètres VIPA est déjà rapportée dans la littérature, à travers un couplage de la lumière dans le spectromètre via un diaphragme confocal [46, 45, 47, 48, 42, 49, 50, 51], ou une fente [52, 53], sans que l'hypothèse de couplage optimal ne soit considérée. Dans ce chapitre, nous partirons donc du principe que le couplage n'est pas optimal et que seule une partie du signal est couplée. Dans cette approche, nous quantifierons rigoureusement les pertes induites par l'utilisation d'une source étendue, et en particulier, d'une fibre multimode, dans un spectromètre VIPA. Cela nous amènera alors à revoir la conclusion de la littérature et à envisager l'utilisation de ce type de source.

L'utilisation de fibres multimodes, ou de manière équivalente, de sources à large étendue, dans les spectromètres VIPA soulève également la question de la réponse de l'instrument. Rien n'assure en effet que l'instrument se comporte pareillement lorsque fibré par une fibre monomode ou multimode.

Ce chapitre commencera donc par un bref rappel de l'étendue géométrique d'un faisceau lumineux et en particulier le lien qui existe entre l'étendue d'un faisceau issu d'une fibre optique et le nombre de modes qu'elle porte. Nous reviendrons alors sur le fonctionnement schématique d'un spectromètre VIPA, et en particulier sur son architecture. Celle-ci nous permettra de comprendre pourquoi à première vue, l'utilisation d'une source étendue pose problème dans ce type d'instrument. Nous quantifierons alors le couplage de l'étendue dans un VIPA en fonction de l'étendue de la source, nous amenant à revoir la conclusion de Meng et al. sur l'utilisation de fibres multimodes dans les spectromètres VIPA. Suivra alors une étude expérimentale montrant le comportement réel d'un spectromètre VIPA lorsque des sources de différentes étendues sont utilisées. Cette étude mettra en lumière un comportement de l'instrument différent de celui d'un spectromètre VIPA couplé à une fibre monomode. Cette observation nous amènera alors à modifier la modélisation du spectromètre VIPA et à la généraliser pour notre cas.

2.1 Étendue et fibres optiques

La quantité d'espace occupé par un faisceau lumineux ne peut pas, comme pour un objet solide, s'exprimer sous la forme d'un volume, car la lumière a une nature propagative. Nous devons ainsi nous ramener à ce qui définit l'espace occupé par un faisceau lumineux : la surface de la source du faisceau et sa divergence. De cette notion découle l'expression de l'étendue géométrique G d'un faisceau, définie comme le produit de la surface de la source du faisceau S par son angle solide Ω [54] : $G = S\Omega$. Dans le cas particulier d'un faisceau issu d'une source plane et d'ouverture homogène sur sa surface, l'angle solide peut s'exprimer en fonction l'ouverture numérique NA [55] de la source : $\Omega = \pi NA^2/n^2$, avec n l'indice optique du milieu dans lequel est définie l'ouverture du faisceau. L'étendue géométrique prend ainsi la forme suivante, pour un faisceau d'ouverture numérique NA , se propageant dans un milieu d'indice n , issu d'une source plane de surface S :

$$G = n^2 S \Omega = \pi S N A^2 \quad (2.2)$$

Cette approche peut se généraliser à tout faisceau, via un calcul intégral d'étendues infinitésimales sur la taille du faisceau. C'est ce que nous ferons dans la suite de ce chapitre.

Pratiquement, l'étendue lie ainsi la surface d'un faisceau à son ouverture et donc pour une étendue donnée, il existera plusieurs configurations de faisceaux présentant des divergences et des surfaces différentes. C'est ce qu'illustre la figure 2.1 : en figure 2.1a, le faisceau présente une grande surface, mais une faible divergence alors qu'en figure 2.1b, la surface du faisceau est plus faible et sa divergence plus grande. Il en résulte que les deux faisceaux présentent des surfaces et divergences différentes, mais ont, malgré leurs différences, une même étendue géométrique.

Dans un système sans pertes, ce lien est très intéressant, car l'étendue est alors conservative. Cela amène à la possibilité de dimensionner un système optique en fonction de l'étendue du faisceau. En fonction des besoins dans le système optique, nous pouvons alors faire varier la divergence du faisceau via sa taille, en utilisant par exemple un télescope. En particulier, dans le cas de systèmes optiques fibrés, cela permet de dimensionner le système en fonction du nombre de modes de la fibre optique. En effet l'étendue d'une fibre optique, G , est liée à son paramètre de fibre V_{nb} (V-number en anglais)[56], lui-même lié au nombre M de modes

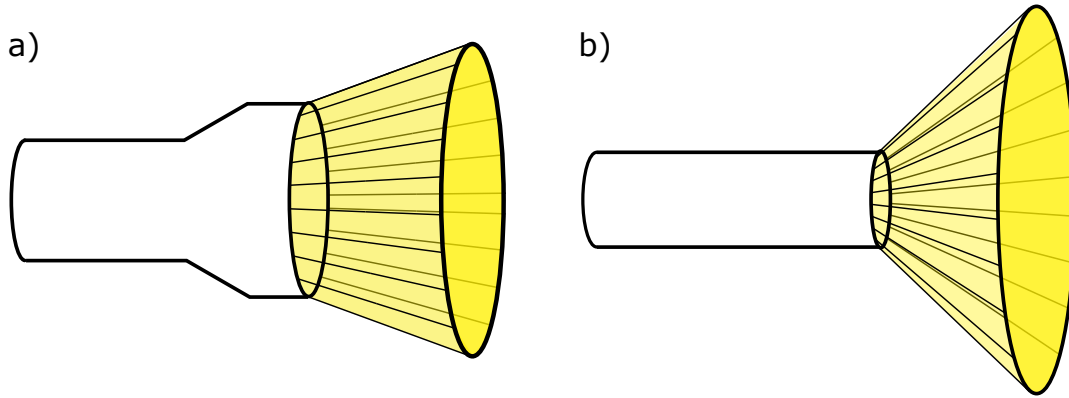


FIGURE 2.1 – Représentation de deux faisceaux de même étendue. Le faisceau de gauche (a) a une surface d'émission quatre fois plus grande que le faisceau de droite (b), mais une ouverture deux fois plus faible, de sorte que, malgré la différence entre les deux faisceaux, leur étendue est identique.

propres supportés par la fibre :

$$V_{nb} = \frac{2\pi}{\lambda} a \sqrt{n_c^2 - n_r^2} = \frac{2\pi}{\lambda} a NA = \frac{2}{\lambda} \sqrt{G} \approx \sqrt{2M} \quad (2.3)$$

avec a le rayon du cœur de la fibre, NA son ouverture numérique définie par les indices optiques du cœur et du revêtement de la fibre optique n_c et n_r : $NA = \sqrt{n_c^2 - n_r^2}$ et G l'étendue de la fibre optique. Ainsi, pour tous les systèmes optiques fibrés, plus la fibre optique couplée au système optique pourra transporter de modes, et plus le système optique sera théoriquement lumineux. Cette idée indique qu'un spectromètre VIPA couplé à une fibre optique multimode est plus lumineux qu'un spectromètre VIPA couplé à une fibre mono-mode. Avant de nous intéresser à cette proposition, revenons cependant sur le fonctionnement d'un spectromètre VIPA, et illustrons la limite que présente l'étendue sur ce système.

2.2 Spectromètre VIPA

Le spectromètre VIPA est un instrument dérivé des premiers systèmes à VIPA qui étaient initialement utilisés pour le démultiplexage de signaux [57, 58, 59, 60, 61]. Nous entendons ici, par "démultiplexage de signal", la distribution d'un seul signal monochromatique entre plusieurs utilisateurs. Dans un démultiplexeur à VIPA, la distribution du signal monochromatique intervient par une dispersion du même signal, dans plusieurs directions. Dans ce même système, si un signal polychromatique est cependant utilisé, alors la distribution du signal sur plusieurs directions se généralise en une dispersion en fréquence du signal, sur plusieurs directions.

Les systèmes à VIPA viennent ainsi en pratique décomposer le spectre du signal, et donc agissent comme des spectromètres. Cela introduit le concept de "spectromètres VIPA", un instrument apparu au milieu des années 2000, notamment pour des applications liées à l'utilisation de lasers femtosecondes à peigne spectral ("femtosecond laser frequency comb" en anglais) [62, 63]. Par la suite, le développement de ces spectromètres s'est progressivement étendu à d'autres applications de spectroscopie : la spectroscopie Brillouin en 2008 [10], la spectroscopie en gaz en 2012 [64], et plus récemment l'astronomie en 2020 [65]. En particulier, dans le contexte de la spectroscopie Brillouin, ces instruments sont venus remplacer progressivement les tandems de Fabry-Pérot dans les applications biologiques. Cette transition a donné lieu à une renaissance de la spectroscopie Brillouin en biologie, réduisant les temps d'acquisition usuels de 1 s – 100 s à 100 ms – 10 s, en fonction de la précision spectrale souhaitée [16].

Le spectromètre VIPA est un instrument basé sur l'utilisation du VIPA, dont l'acronyme signifie en anglais : "Virtually Imaged Phased Array" ou, par une traduction littérale en français : "Réseau virtuel de sources déphasées". Ce nom décrit le rôle de l'instrument : permettre à une source d'être démultipliée dans l'espace, avec pour chaque source "virtuelle", un déphasage différent.

L'obtention de cet effet est schématisé en figure 2.2, où l'architecture d'un VIPA est illustrée. Le VIPA est constitué de deux miroirs : un premier miroir totalement réfléchissant, de réflectance r_1 et un second miroir partiellement réfléchissant, de réflectance r_2 . Une région du premier miroir, la "fenêtre d'entrée", est laissée sans couche réfléchissante, permettant à un faisceau d'être totalement transmis dans la cavité. Celui-ci va se refléter successivement sur le premier et second miroir, amenant à un comportement similaire à celui d'un Fabry-Pérot [66]. Le second miroir du VIPA étant partiellement réfléchissant, à chaque réflexion, une partie du faisceau est transmise avec un déphasage, induisant des interférences. Ces parties de faisceaux transmises sont représentées en figure 2.2 et sont prolongées vers la gauche pour indiquer la présence d'un point source équivalent pour chaque faisceau transmis. En pratique, nous nous retrouvons donc bien avec une série de sources virtuelles du faisceau focalisé dans le VIPA.

Le décalage entre les sources virtuelles dans le VIPA dépend ainsi de la position relative

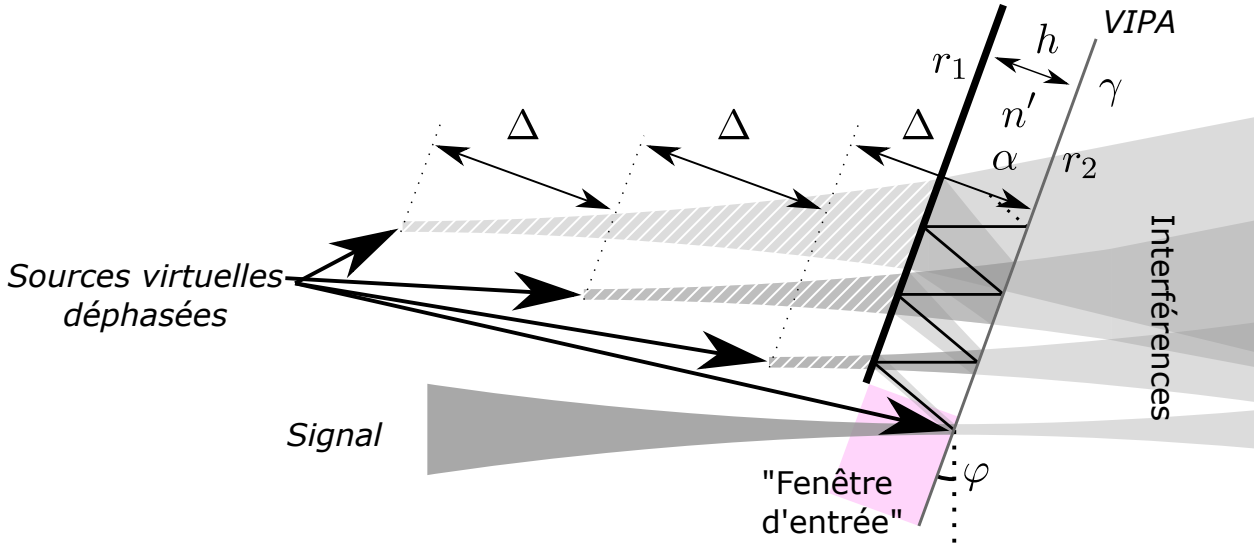


FIGURE 2.2 – Représentation schématique d'un étalon VIPA.

des deux miroirs l'un à l'autre. Dans la géométrie usuelle du VIPA, les deux miroirs sont parallèles. Cela implique que, suivant une direction de propagation, le déphasage entre deux faisceaux sortant du VIPA, ou deux sources virtuelles, est fixe. C'est cette configuration qui est reprise en figure 2.2. Nous avons ainsi représenté un décalage Δ constant entre chaque source virtuelle.

Notons alors que le déphasage induit par le VIPA sur les sources virtuelles change avec l'angle du rayon lumineux, c'est-à-dire, avec les fréquences spatiales du faisceau. Grâce à ce déphasage, nous obtiendrons une interférence constructive en sortie de VIPA si et seulement si les différentes sources virtuelles induisant ces interférences sont en phase. Étant donné que cette interférence constructive n'apparaît que pour une longueur d'onde donnée, le VIPA agit comme un filtre spectral sur chaque direction du signal dans le champ lointain. Pour reprendre les termes de l'optique de Fourier [67], le VIPA est donc un filtre spectral de la transformée de Fourier spatiale du faisceau lumineux.

Dans sa forme mathématique la plus simple, la fonction de transfert du VIPA \mathcal{H}_{VIPA} pourra s'exprimer comme la convolution d'un peigne de Dirac en fréquence spatiale et spectrale du signal $\Sigma\delta_{k_x, k_y, \lambda}$ par une réponse impulsionnelle que nous noterons ici \mathcal{H}_I :

$$\mathcal{H}_{VIPA}(signal) = \Sigma\delta_{k_x, k_y, \lambda}(signal) * \mathcal{H}_I \quad (2.4)$$

Cette expression montre qu'il est possible d'obtenir le spectre d'un faisceau en le décompo-

sant en fréquences spatiales, c'est-à-dire en faisceaux unidirectionnels. Cela donne l'idée du spectromètre VIPA où le faisceau injecté est focalisé dans le VIPA : la puissance du faisceau est ainsi distribuée sur un plus grand nombre de fréquences spatiales. Le VIPA agissant comme un filtre spectral pour une fréquence spatiale donnée, dont la longueur d'onde transmise dépend de la fréquence spatiale choisie, nous obtiendrons ainsi un appareil pouvant résoudre un continuum de longueur d'onde.

La figure 2.3 vient schématiser cette idée : le faisceau est focalisé dans le VIPA. Étant donné qu'à chaque direction de propagation, une seule longueur d'onde induira des interférences constructives, chaque direction de propagation du faisceau sera attribuée à une longueur d'onde, schématisée en figure 2.3 par une couleur. Ces directions de propagation peuvent alors être converties en positions en venant les focaliser sur un détecteur. Ce détecteur verra alors apparaître le spectre du signal sous forme d'un spectre d'interférence où chaque longueur d'onde apparaît en un point différent.

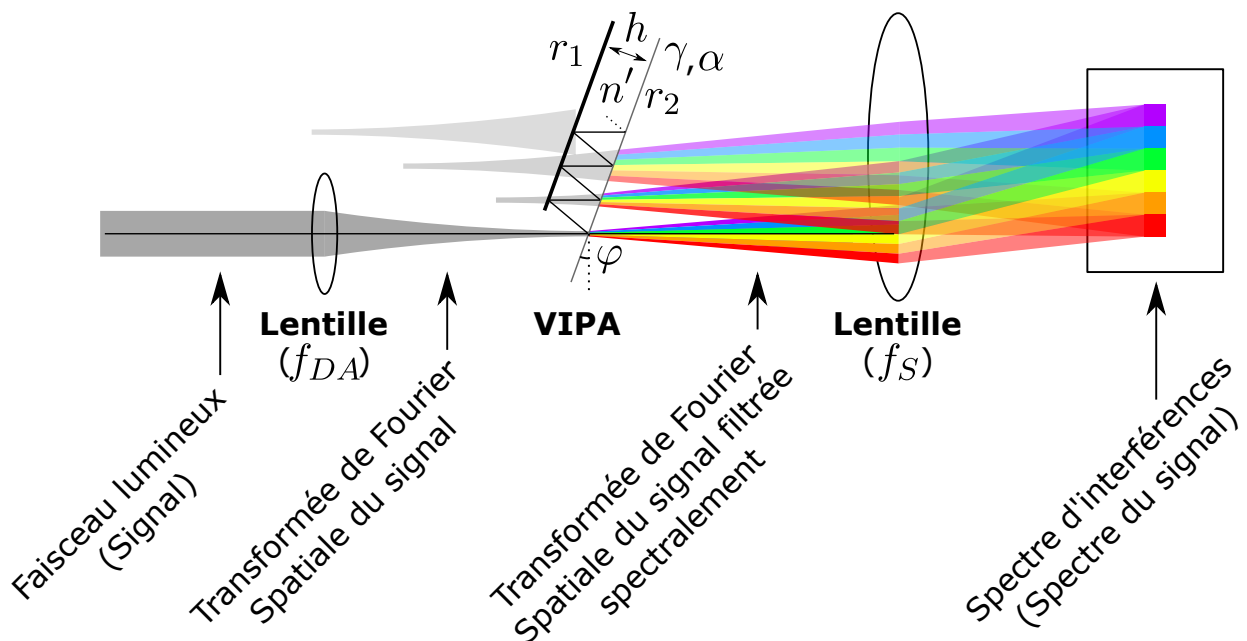


FIGURE 2.3 – Schéma de principe du fonctionnement d'un spectromètre VIPA et des paramètres attendant à sa modélisation.

En reprenant ainsi la présentation du spectromètre VIPA, l'instrument sera constitué de trois éléments principaux :

- Un composant optique pour générer une distribution d'angle sur le faisceau à analyser (une lentille en figure 2.3).

- Le VIPA, créant les déphasages entre les sources virtuelles et agissant comme un filtre en fréquences spatiales et en fréquence spectrale.
- Un composant optique pour focaliser les rayons d'une même direction en un point (une lentille en figure 2.3), entraînant ainsi l'apparition d'un spectre d'interférence sur le détecteur.

En pratique, il sera donc possible d'ajuster trois paramètres principaux sur un spectromètre VIPA :

- La focale de la lentille créant la distribution en angle, notée f_{DA} .
- L'angle d'inclinaison du VIPA par rapport à l'axe optique du signal, noté φ .
- La focale de la lentille de focalisation sur le détecteur, notée f_S .

S'ajoutent à ces paramètres les paramètres propres du VIPA, qu'il est donc impossible à ajuster une fois le VIPA choisi, à savoir :

- Le matériau entre les miroirs, et en particulier, son indice optique n_{VIPA} et son coefficient d'absorption α .
- L'épaisseur du VIPA h .
- Les réflectivités des miroirs avant r_1 et arrière r_2 .

La "fenêtre d'entrée" du VIPA est définie en fonction de l'épaisseur du VIPA et de son angle d'inclinaison. Il en résulte que le faisceau incident ne devra pas avoir une trop grande surface au niveau de la fenêtre d'entrée, ou sa transmission sera réduite. Dit d'une autre manière, donnée une surface de faisceau à la fenêtre d'entrée, il faudra ajuster l'inclinaison du VIPA pour y faire passer tout le faisceau. C'est en se basant sur cette idée que l'étude de Meng et al. [45] avance l'impossibilité d'utiliser une fibre multimode dans un spectromètre VIPA, en forçant l'optimalité de la configuration et en déduisant un angle d'inclinaison minimal du VIPA qui n'est pas compatible avec la spectroscopie Brillouin.

En reprenant cependant la notion d'étendue, nous comprenons que cette approche est incomplète. Il est en effet possible de réduire la taille du faisceau en augmentant sa divergence, et donc il est peut-être possible d'injecter tout le faisceau d'une fibre multimode dans un VIPA par cette stratégie. La question de la transmission d'un faisceau issu d'une fibre multimode dans un VIPA est donc plus complexe qu'un seul ajustement de l'angle d'inclinaison du VIPA. L'étude doit en effet se concentrer sur la proportion maximale de l'aire du faisceau

qu'il sera possible de coupler avec une fibre multimode. En d'autres termes, il faut quantifier le couplage d'étendue dans un VIPA donnée l'étendue d'un faisceau.

2.3 Transmission d'étendue dans un spectromètre VIPA

En reprenant le schéma du VIPA présenté en figure 2.2, nous voyons que la divergence du faisceau est aussi limitante que la surface du faisceau dans l'estimation de son couplage dans le VIPA, donnée une inclinaison du composant. Cela implique donc une limite sur l'étendue maximale couplée dans le VIPA donnés un angle d'inclinaison et une étendue de faisceau.

Pour quantifier cette étendue couplée, nous allons décomposer le faisceau en rayons. Dans notre approche, nous allons ensuite calculer la quantité de rayons couplés pour une étendue initiale de faisceau donnée. Cela nous permettra alors de remonter à un rendement de couplage d'étendue. Pour ce faire, remarquons que ni la divergence ni le point d'intersection entre le second miroir du VIPA et le rayon ne sont des conditions suffisantes au couplage du faisceau. Cela résulte en deux limites sur le couplage du faisceau : le point d'intersection entre le faisceau et le second miroir du VIPA et la divergence du faisceau.

Les figures 2.4a et b viennent illustrer ces deux limites. En figure 2.4a deux faisceaux de divergences différentes intersectent le second miroir du VIPA à des positions différentes. En fonction de cette position, les rayons sont couplés (représentés en vert) ou non (représentés en rouge) dans le VIPA. Si maintenant un point d'intersection avec le second miroir est fixé, la figure 2.4b établit une condition sur la divergence du faisceau pour garantir un couplage dans le VIPA, les faisceaux n'étant couplés que si leur direction de propagation est dans la zone verte. La figure 2.4c reprend cette analyse en traçant sur le profil transversal du faisceau, la partie couplée en vert, et non couplée, en rouge. La transmission d'un faisceau intervient donc ici comme une fonction de la divergence β du faisceau et d'un angle $\theta(x)$ défini pour toute position x sur le second miroir du VIPA.

Note : Dans un soucis de normalisation de l'écriture des variables qui seront utilisées dans cette section, toute variable prise dans le VIPA et soumise à son indice, sera augmentée d'un prime. L'angle d'inclinaison du VIPA φ deviendra donc φ' et l'angle $\theta(x)$ deviendra $\theta'(x')$.

Avant d'établir l'expression de l'angle $\theta'(x')$, notons que nous définissons l'angle d'inclinaison

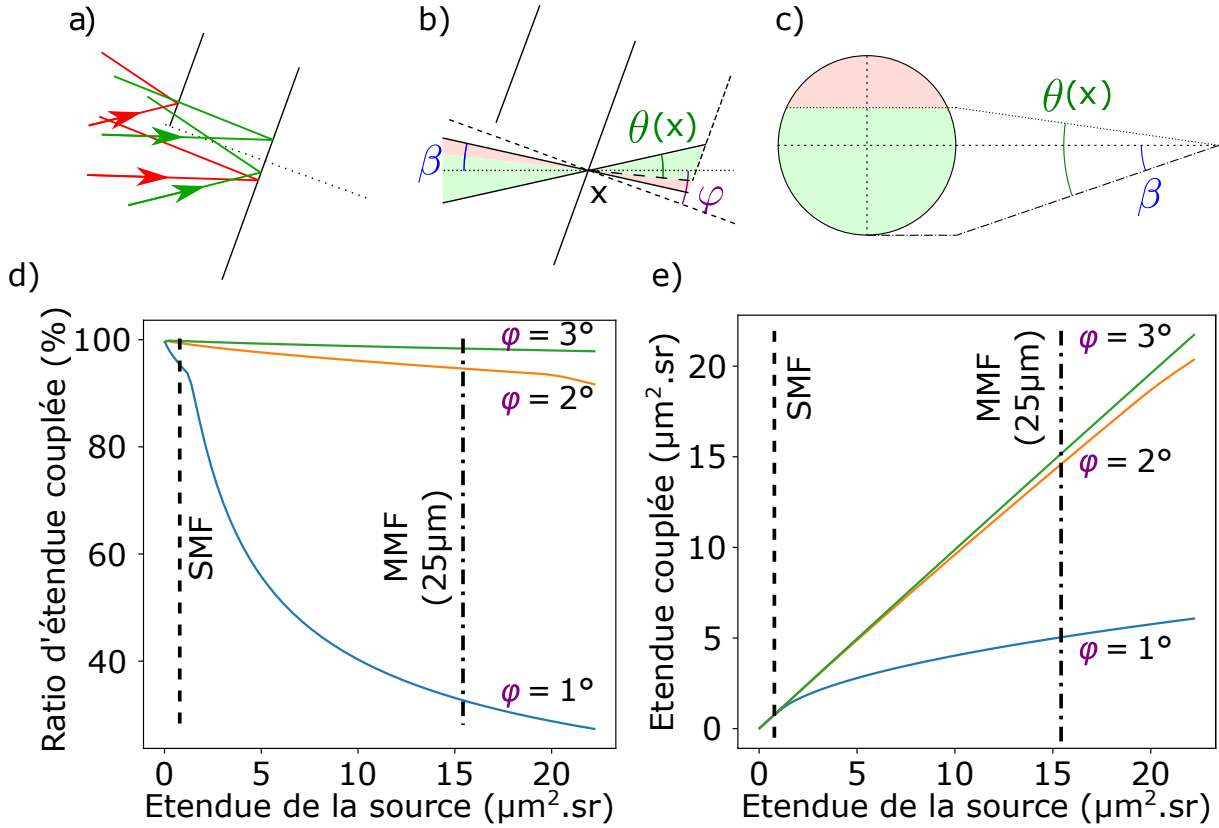


FIGURE 2.4 – Illustration du couplage d'un faisceau dans un VIPA, paramétrisation de l'étendue couplée et application numérique pour une source de luminance uniforme sur le faisceau. a) Deux rayons d'inclinaisons différentes sont (en vert) ou non (en rouge) couplés suivant leur point d'intersection avec le second miroir du VIPA. b) Donné un point d'intersection entre un ensemble de rayons et le second miroir du VIPA, seuls les rayons présentant une divergence dans l'aire verte, caractérisée par l'angle $\theta(x)$ sont couplés. c) Schéma de l'aire du faisceau focalisé sur le point indiqué sur la figure b, la partie verte (respectivement rouge) correspond à la portion du faisceau couplée (respectivement non couplée). d) Ratio d'étendue couplée dans un VIPA pour un signal de luminance uniforme en fonction de l'étendue de la source et pour différentes inclinaisons du VIPA. e) Étendue absolue couplée dans un VIPA en fonction de l'étendue de la source et pour différentes inclinaisons du VIPA. L'étendue de deux fibres optiques fonctionnant à 780 nm : l'une monomode (SMF) et l'autre multimode (MMF) présentant un cœur de $25\mu\text{m}$ de diamètre et une ouverture numérique de 0.1 sont ajoutées sur les figures d et e.

du VIPA par rapport à la direction de propagation du faisceau et considérons une symétrie du faisceau en sortie de VIPA par rapport à cet axe. Par conséquent, l'angle d'inclinaison du VIPA agira comme une limite haute à la divergence du faisceau. Deux cas sont donc à différencier suivant la divergence du faisceau relative à l'inclinaison du VIPA, pour établir l'expression de $\theta'(x')$:

$$\begin{cases} \theta'(x') = \min \left(2\beta', \beta' + \varphi' - \arctan \left(\frac{|x'|}{h} \right) \right), & \text{si } \beta' \leq \varphi' \\ \theta'(x') = 2\varphi' - \arctan \left(\frac{|x'|}{h} \right), & \text{si } \beta' > \varphi' \end{cases} \quad (2.5)$$

Pour maintenant passer d'une condition sur le couplage d'un faisceau au calcul de l'étendue couplée dans le VIPA, nous devons calculer l'angle solide couplé, pour une position de focalisation du faisceau sur le plan arrière du VIPA $\Omega_A(x')$ donnée. La figure 2.5a donne une représentation de ce qu'est un angle solide : l'aire projetée sur une sphère de rayon unitaire par un cône de base arbitraire dont l'apex coïncide avec le centre de la sphère. Dans l'hypothèse des petits angles, la courbure de la sphère peut être négligée et donc le calcul de l'aire peut se simplifier en considérant l'aire du faisceau sur un plan : c'est ce que représente la figure 2.5b.

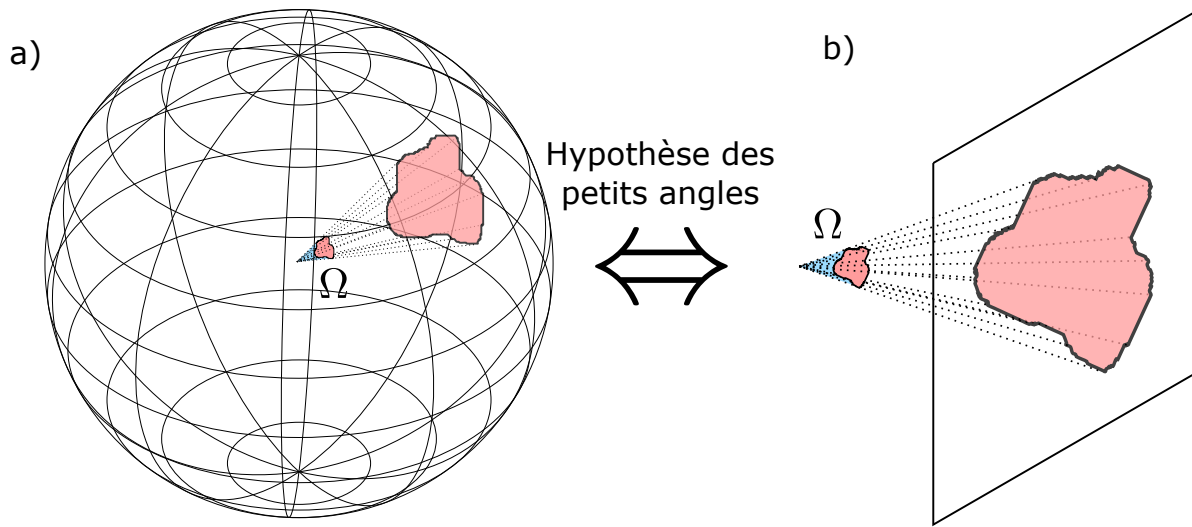


FIGURE 2.5 – Représentation schématique d'un angle solide et équivalence dans l'hypothèse des petits angles. a) Schéma des paramètres définissant un angle solide. b) Approximation de la valeur de l'angle solide dans l'hypothèse des petits angles.

Dans l'hypothèse des petits angles, le rapport de l'aire verte en figure 2.4c sur l'aire du cercle dessiné par le faisceau sera alors le même que celui de l'angle solide couplé sur l'angle solide du faisceau focalisé au point x . Cela amène alors à l'expression de l'angle solide $\Omega_A(x')$ (voir Annexe A.3) :

$$\Omega_A(x') = (1 - \cos \beta') \left[\pi - 2 \arcsin \frac{\tan^2(\beta' - \theta'(x'))}{\tan^2 \beta'} - \sin \left(2 \arcsin \frac{\tan^2(\beta' - \theta'(x'))}{\tan^2 \beta'} \right) \right] \quad (2.6)$$

L'étendue couplée sera alors l'intégrale de toutes les étendues infinitésimales composant le faisceau. Si le plan de phase du faisceau est sphérique¹ de rayon $R/\cos \varphi'$, cette étendue sera

1. Cette formule s'applique en réalité à tout rayon ovoïde dont l'un des axes directeurs est celui de la fenêtre d'entrée du VIPA, par considération des invariances du problème.

alors l'intégrale pour les positions x' sur le second miroir du VIPA, allant de $-R/\cos \varphi'$ à $+R/\cos \varphi'$ des faisceaux se focalisant à cette ordonnée x' . Pratiquement, l'intégrale s'effectue donc sur le produit d'une aire égale à $2\sqrt{(R/\cos \varphi')^2 - x'^2} \cdot dx'$ (par le théorème de Pythagore) et de l'angle solide $\Omega_A(x')$ à cette ordonnée. En prenant en compte l'indice de réfraction du VIPA cela donne :

$$G^{(c)} = n_{VIPA}^2 \int_{-\frac{R(\beta')}{\cos \varphi'}}^{\frac{R(\beta')}{\cos \varphi'}} \Omega_A(x') 2\sqrt{(R/\cos \varphi')^2 - x'^2} dx' \quad (2.7)$$

Notons que le diamètre du faisceau sur le second miroir du VIPA dépend de la divergence du faisceau β' . Ces deux paramètres sont en effet liés par l'étendue du faisceau, via la conservation de l'étendue, ainsi que présenté en section 2.1. Cette étendue peut au choix s'exprimer en utilisant les paramètres en espace libre R et β ou dans le VIPA via les paramètres associés $R/\cos \varphi'$ et β' définis par la relation de Snell-Descartes. La conservation de l'étendue permet alors d'exprimer cette étendue à travers l'étendue initiale du faisceau, caractérisée par un diamètre \emptyset et une ouverture numérique NA :

$$G_{faisceau} = \pi R^2 n_{VIPA}^2 \sin^2 \beta = \pi R^2 \sin^2 \beta' = \pi \frac{\emptyset^2}{4} NA^2 \quad (2.8)$$

Afin de maximiser la dispersion du VIPA, il est généralement choisi de fixer $\beta' = \varphi'$, c'est-à-dire une divergence de faisceau égale à l'inclinaison du VIPA. En prenant cette hypothèse, nous traçons sur la figure 2.4d le ratio de l'étendue couplée dans le VIPA sur l'étendue de la source, en fonction de l'étendue de la source et pour différents angles d'inclinaison du VIPA. Dans le contexte de cette figure, nous choisissons un VIPA présentant une épaisseur de 3.37 mm^2 .

Sur la figure 2.4d, nous observons ainsi que plus l'étendue de la source augmente, et plus le couplage est mauvais. Cela confirme donc notre première intuition : augmenter l'étendue du faisceau analysé affecte bien la transmission globale de l'instrument. Cependant, cela ne devient vraiment limitant que pour les très petites inclinaisons de VIPA. Pour les inclinaisons usuelles, soit environ 2° , les pertes de couplage du faisceau dans le VIPA sont négligeables. En particulier, en comparant deux types de sources amenant des faisceaux d'étendues différentes : une fibre monomode et une fibre multimode de $25 \mu\text{m}$ de diamètre et de 0.1 d'ouverture numérique, le couplage de la fibre multimode est de 95% de l'étendue

2. Cette épaisseur donne un écart fréquentiel entre deux ordres d'interférence constructifs de 1 cm^{-1} , ce qui correspond au VIPA utilisé dans cette thèse.

contre 99% pour la fibre monomode. Les pertes qui sont donc théoriquement attendues sont négligeables. L'analyse de Meng et al. [45] est donc correcte sur le fond, mais sa conclusion ne l'est pas : les fibres multimodes peuvent bien être utilisées dans les spectromètres VIPA.

La figure 2.4e montre alors l'intérêt d'utiliser une fibre multimode dans un spectromètre VIPA. Sur cette figure, l'étendue couplée est représentée en valeur absolue et en fonction de l'étendue du faisceau analysé. Ce que l'on voit est que plus l'étendue de la source augmente, plus l'étendue couplée augmente, et cela même pour les petits angles. Par conséquent, en reprenant l'équation 2.1, plus l'étendue du faisceau analysé augmente et plus l'instrument sera lumineux. Il en découle qu'il est non seulement possible d'utiliser des fibres multimodes dans des spectromètres VIPA mais aussi intéressant, car cela rend l'instrument plus lumineux.

Ce résultat est théorique. Nous allons maintenant nous intéresser à une étude expérimentale de la luminosité d'un spectromètre VIPA en fonction de l'étendue du faisceau analysé.

2.4 Accroissement expérimental de la luminosité d'un spectrographe VIPA par utilisation de sources à large étendue

Nous avons établi en section 2.3 que la luminosité d'un spectromètre VIPA croit théoriquement avec l'étendue de la source utilisée. Dans cette section, nous allons donc réaliser des mesures expérimentales pour juger de cette conclusion. La conclusion tirée de la section 2.3 part du principe que nous utilisons une source lumineuse de luminance constante. Cela est techniquement difficile à réaliser. Nous allons donc ici simuler une source de luminance constante en focalisant la lumière d'une lampe. En utilisant alors des fibres optiques de différentes étendues, nous pourrions étudier au moins qualitativement la conclusion faite en section précédente.

La figure 2.6a schématise le montage réalisé. Nous choisissons ici d'utiliser une lampe xénon que nous viendrons filtrer autour de 765 nm car elle présente un pic d'émission à 765.5 nm sur lequel nous souhaitons centrer notre mesure. Elle jouera le rôle de la source de luminance constante. Cette source ayant une taille physique de quelques mm, nous plaçons une lentille devant la source afin de focaliser une partie des rayons sur une surface d'environ 0.5 mm.

Un porte-fibre est placé au point de focalisation de la lentille, sur une monture permettant des ajustements suivant les 3 directions de l'espace. Une fibre optique monomode est alors placée sur le porte-fibre qui est ensuite ajusté pour maximiser le signal collecté par la fibre. Plusieurs fibres optiques d'étendue et donc de nombre de modes différents sont alors utilisées pour simuler des sources d'étendues variables à luminance presque constante.

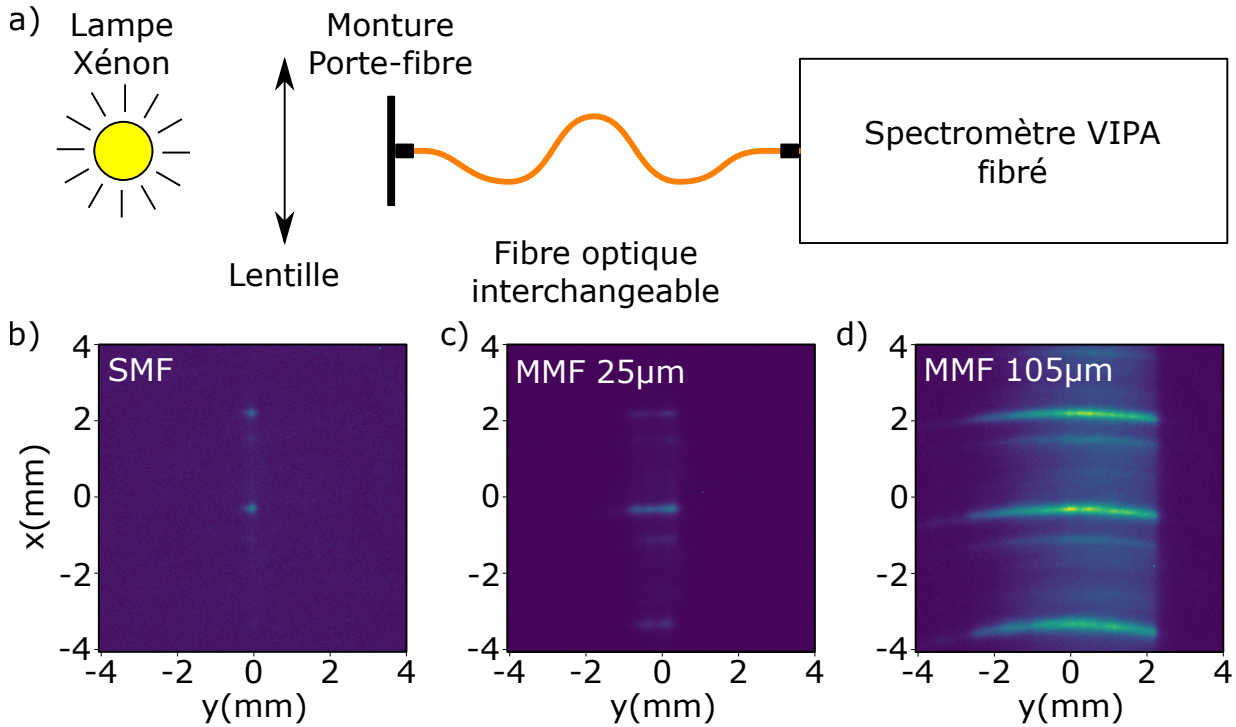


FIGURE 2.6 – Évaluation expérimentale du gain en luminosité d'un spectromètre VIPA fibré pour différentes fibres optiques utilisées. a) Schéma du montage. b) Figure d'interférence obtenue en effectuant la mesure schématisée en a) avec une fibre monomode avec un temps d'intégration de 1 s. c) Figure d'interférence obtenue en effectuant la mesure schématisée en a) avec une fibre multimode de $25\mu\text{m}$ de diamètre de cœur et ouverture numérique de 0.1 avec un temps d'intégration de 1 s. d) Figure d'interférence obtenue en effectuant la mesure schématisée en a) avec une fibre multimode de $105\mu\text{m}$ de diamètre de cœur et ouverture numérique de 0.22 avec un temps d'intégration de 1 s.

La figure 2.6b montre le spectre d'interférence collecté par le spectromètre pour une fibre optique monomode (Thorlabs P1-780Y-FC-2). Des points lumineux apparaissent, correspondant aux pics spectraux d'émissions de la lampe. La figure 2.6c montre ensuite le spectre d'interférence collecté par le spectromètre pour une fibre optique multimode transportant environ 50 modes (Thorlabs M67L02, fibre optique multimode de $25\mu\text{m}$ de cœur et ouverture numérique de 0.1). Des lignes lumineuses apparaissent ici, ces lignes semblent droites et correspondent ici aussi aux pics d'émission de la lampe. Ces lignes peuvent être considérées comme un étalement en largeur sur le détecteur du spectre obtenu par l'utilisation

de la fibre monomode. Notons que le niveau de signal semble plus intense sur cette figure que sur la figure 2.6b correspondant au spectre obtenu par l'utilisation de la fibre monomode.

La figure 2.6d montre enfin le spectre d'interférence collecté par le spectromètre pour une fibre optique multimode transportant environ 4500 modes (Thorlabs M43L02, fibre optique multimode de $105\mu m$ de cœur et ouverture numérique de 0.22). Des courbures lumineuses apparaissent ici. Le centre de ces courbes suit le même profil que celui présenté en figure 2.6c. Nous en déduisons donc que le spectre observé est le même, mais les raies d'interférences sont maintenant courbes. Cela nous amène à considérer que l'étendue de la fibre agit comme un étalement courbé en largeur sur le détecteur du spectre obtenu grâce à la fibre monomode. Notons que le niveau de signal semble être ici plus intense que sur les figures 2.6b et c, ce qui suggère bien une luminosité du spectromètre croissante avec l'étendue de la source.

Expérimentalement, la conclusion apportée par la section 2.3 est donc vérifiée : la luminosité du spectromètre VIPA augmente bien avec l'étendue de la source. Cependant, cela n'est pas le seul effet : les spectres se courbent aussi avec l'augmentation de l'étendue. Notons que la littérature n'a jamais prévu de traiter ces courbures dans un spectromètre VIPA, car elle ne les observe en pratique jamais dans des spectromètres VIPA. Il en résulte que nous avons donc bien un appareil en apparence plus lumineux, mais qui en l'état, ne peut être utilisé.

Afin de comparer les niveaux de signal sur les spectres obtenus, nous devons ramener les trois images, à un spectre unidimensionnel sans courbures. Cela demande que nous revenions sur le modèle du VIPA.

2.5 Modélisation du spectrographe pour sources étendues

La section 2.4 montre que l'utilisation de fibres multimode dans un spectrographe VIPA induit des courbures des isofréquences. Ce comportement, qui peut être rattaché à celui observé dans les spectromètre VIPA utilisés pour la spectroscopie Brillouin par balayage linéaire (line-scan Brillouin spectroscopy) [52, 53, 68], est ici le paramètre limitant. En pratique, ce sont effectivement ces courbures qui empêchent l'utilisation de fibres multimodes à large cœur dans les spectromètres VIPA. Nous allons dans cette section revenir sur la

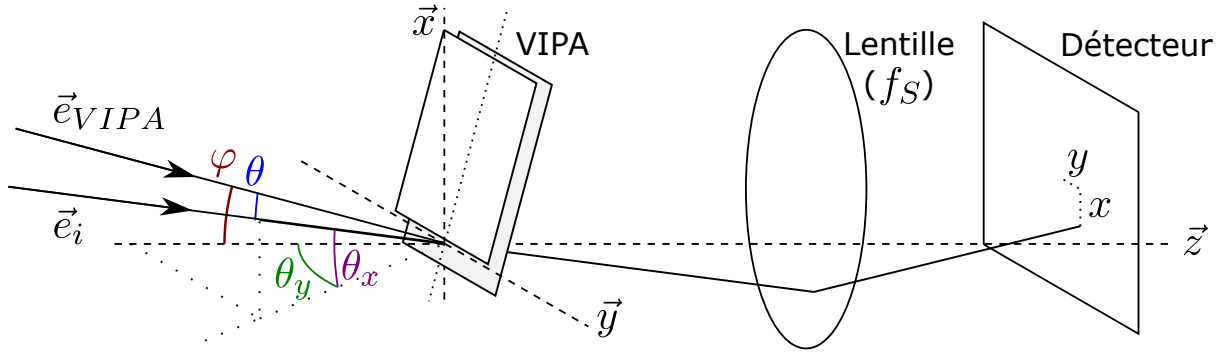


FIGURE 2.7 – Schéma d'un faisceau incident dans un VIPA avec paramétrisation cartésienne de l'angle d'incidence. Le faisceau \vec{e}_i est ainsi incident avec un angle θ avec la normale \vec{e}_{VIPA} , qui se décompose en angles θ_x et θ_y suivant la direction de dispersion du VIPA et l'axe de sa fenêtre respectivement.

modélisation de l'instrument afin de comprendre ces courbures, modéliser leur forme et les corriger. Nous repartirons pour cela des modèles établis de l'étalon de Fabry-Pérot [66], dont le fonctionnement est très proche de celui du VIPA, et du spectromètre VIPA [69, 70, 71].

Avant de présenter le modèle mathématique du VIPA, nous pouvons déjà revenir sur ce qu'implique l'utilisation de sources à large étendue dans un spectrographe VIPA. En repartant du développement de la section 2.1, nous savons que l'étendue est proportionnelle au produit de la surface d'un faisceau par le carré de sa divergence. Un faisceau de grande étendue sera donc un faisceau qui présentera soit une grande surface, soit une grande divergence, soit les deux. En pratique, les optiques utilisées ont des tailles finies, la taille du faisceau est donc forcément limitée par la taille des optiques utilisées. Il en résulte qu'un faisceau de grande étendue amènera le plus souvent à un faisceau de grande divergence.

La divergence du faisceau est donc la notion centrale de cette section. Nous allons ici la paramétrer en suivant le schéma donné en figure 2.7, en décomposant le faisceau en un ensemble de rayons. Chaque rayon est orienté suivant un vecteur directeur unitaire \vec{e}_i , comme schématisé en figure 2.7. La divergence de ce rayon peut alors être prise soit par rapport au vecteur normal au VIPA \vec{e}_{VIPA} , via l'angle θ , soit par rapport à la direction de propagation du faisceau \vec{z} , via les angles θ_x et θ_y .

L'utilisation de l'angle θ est intéressante si nous ne nous intéressons qu'à l'effet du VIPA sur un seul faisceau. Dans ce cas, la situation est identique à celle rencontrée dans la modélisation d'un Fabry-Pérot [66] : le faisceau va se refléter successivement entre les deux

miroirs et à chaque réflexion, une partie du faisceau sera transmise. Entre deux parties de faisceau transmises par réflexions successives, une différence de marche optique apparaîtra, qui s'écrira : $\Delta\mathcal{S} = 2n'h \cos \theta'$. Cette différence de marche induira alors un déphasage δ entre ces faisceaux défini comme [66] :

$$\delta = k\Delta\mathcal{S} = \frac{2\pi}{\lambda} 2n'h \cos \theta' \quad (2.9)$$

Une interférence constructive apparaissant lorsque $\delta = 2m\pi$, où m est un entier définissant l'ordre d'interférence, nous aurons alors :

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} 2n'h \cos \theta' = 2m\pi \quad (2.10)$$

Dans la seconde caractérisation de la divergence, avec les angles θ_x et θ_y , nous ne nous intéressons plus à l'effet du VIPA sur un seul rayon mais à son effet sur l'ensemble du faisceau. Etant donné que le VIPA ne vient pas modifier la direction des faisceaux, dans cette approche, les angles θ_x et θ_y peuvent être facilement reliés à une position sur le détecteur (x, y) , via la focale de la lentille sphérique située derrière le VIPA :

$$\begin{cases} \theta_x = \arctan x/f_S \\ \theta_y = \arctan y/f_S \end{cases} \quad (2.11)$$

L'effet du VIPA sur chaque rayon individuel, défini par une divergence θ prise par rapport au vecteur normal au VIPA, peut alors être réécrit en fonction de la nouvelle expression de la divergence (θ_x, θ_y) . Pour ce faire, il suffira d'explicitier le vecteur normal au VIPA \vec{e}_{VIPA} et le vecteur d'un faisceau \vec{e}_i , dans le repère orthonormé $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$:

$$\begin{cases} \vec{e}_{VIPA} = (-\sin \varphi, 0, \cos \varphi) \\ \vec{e}_i = (\sin \theta_x, \sin \theta_y, \sqrt{1 - \sin^2 \theta_x - \sin^2 \theta_y}) \end{cases} \quad (2.12)$$

Suivant alors la géométrie de la figure 2.7, l'angle θ s'obtiendra par le produit scalaire \cdot entre \vec{e}_i et \vec{e}_{VIPA} : $\cos \theta = \vec{e}_i \cdot \vec{e}_{VIPA}$, amenant à une réécriture du déphasage qui cette fois-ci ne sera plus fonction de l'angle du rayon observé, mais de la position résultante sur le détecteur. En reprenant ici l'ajout d'une apostrophe dans la notation des grandeurs définies à l'intérieur du VIPA, et donc soumises à son indice optique, établies en section 2.3, nous obtenons par

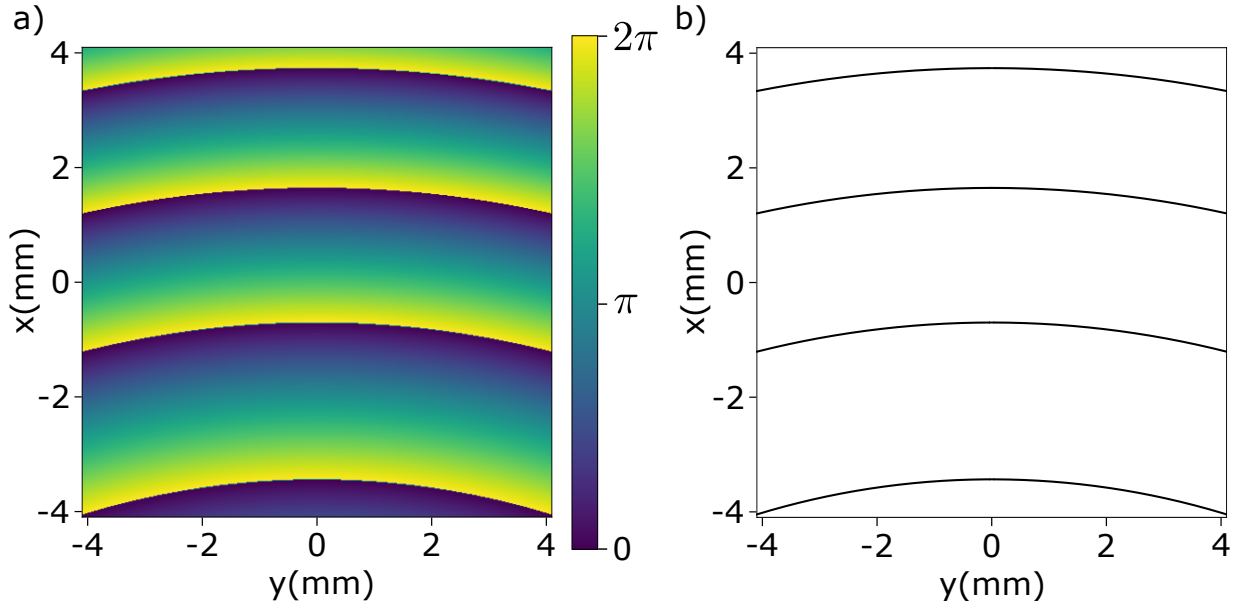


FIGURE 2.8 – Déphasage modélisé pour un spectromètre VIPA classique (VIPA solide en silice, de 3.37 mm d'épaisseur, incliné de 2° , focale de la lentille de focalisation sur le détecteur : 500 mm, détecteur de 8.192 mm par 8.192 mm). a) Figure de déphasage pour un signal monochromatique de 780 nm, issu de l'équation 2.13. b) Isofréquences des différents modes visibles à la fréquence $\nu_0 = c_0/780$ nm obtenues par l'application de l'équation 2.14

la loi de Snell-Descartes [71] :

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \sin^2 \theta_x - \sin^2 \theta_y} - \sin \varphi \sin \theta_x \right]^2 - 1 + n'^2} \quad (2.13)$$

Les interférences constructives apparaissent lorsque le déphasage est un multiple entier de 2π . La figure 2.8a montre ainsi le déphasage δ modulo 2π attendu sur un détecteur usuel (8.192 mm par 8.192 mm), pour un faisceau monochromatique de longueur d'onde de 780 nm et un VIPA d'épaisseur 3.37 mm, incliné à 2° . Sur cette figure, les interférences constructives apparaissent ainsi clairement aux lieux de discontinuité. Ces lieux de discontinuité étant courbes, cette modélisation vient expliquer la forme du spectre observée en section 2.4.

Nous pouvons ici souligner que si les lieux d'interférence constructive sont courbes, c'est que la loi de dispersion n'est plus unidimensionnelle, comme classiquement rencontrée dans les spectromètres VIPA fibrés par fibre monomode, mais bien bidimensionnelle. Il en résulte que le spectromètre VIPA possède non pas un mais bien deux axes de dispersions de la lumière. Au delà de permettre le traitement de spectres issus de source à large étendue, cette modélisation ouvre aussi la voie à l'utilisation de VIPA standards pour des applications où deux axes de dispersion sont nécessaires, en particulier pour la spectroscopie Brillouin en angle

(angle-resolved Brillouin spectroscopy) [51]. Nous reviendrons plus en détail sur ce point dans les perspectives de cette thèse.

En revenant à la figure d'interférence que nous observons en figure 2.8, nous pouvons interpréter physiquement les interférences constructives comme les *isofréquences* d'un ordre d'interférence du VIPA. Les lieux identifiés définissent effectivement l'ensemble des points du détecteur pour lesquels un signal monochromatique induira une interférence constructive à un ordre d'interférence donné du VIPA. En reprenant le modèle présenté ci-dessus, nous pouvons remonter à la forme de ces isofréquences. En exprimant les positions x et y sur le détecteur dans l'approximation des petits angles, nous obtenons que toutes les coordonnées des points d'une isofréquence (x, y) suivent une loi hyperboloïde de la forme (voir Annexe A.4) :

$$y^2 + ax^2 + bx = c \quad (2.14)$$

avec

$$\begin{cases} a = -1 - \tan^2 \varphi \\ b = \frac{f_S \tan \varphi}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2} \\ c = f_S^2 \left(1 - \frac{1}{\cos^2 \varphi} \left(\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2\right)\right) \end{cases} \quad (2.15)$$

Cette équation est utilisée pour obtenir la figure 2.8b, représentant les isofréquences de la figure 2.8a pour les paramètres donnés plus haut. Elle donne également accès à deux méthodes pour relier le spectre d'interférence 2D observé à un spectre 1D :

- Nous pouvons redresser les courbures en nous basant sur la mesure d'une isofréquence, et obtenir un signal 1D en sommant les colonnes. Dans ce signal, les canaux du signal définissent donc les lignes du détecteur et la valeur collectée dans chacun de ces canaux sera la somme des intensités collectées sur cette ligne. Cette approche nous permettra d'obtenir un spectre satisfaisant autour de l'isofréquence choisie, donc pour des décalages en fréquence faibles. Cependant, plus les décalages en fréquences seront élevés et plus les erreurs sur la courbure seront grandes, résultant en un élargissement artificiel des pics observés. Dans le contexte de la spectroscopie Brillouin pour l'analyse d'échantillons biologiques, les spectres ressemblent tous à celui de l'eau [72, 73] et donc cette approche est pertinente. Cette approche est la solution la plus simple pour venir traiter le spectre Brillouin d'un échantillon biologique amené au spectrographe VIPA via une fibre multimode.

- Il est également possible d’identifier une isofréquence en partant de la connaissance de sa longueur d’onde. En faisant alors un fit sur les paramètres intervenant dans l’expression de a , b et c présentés sur le système d’équation 2.15, nous pouvons établir une carte 2D des fréquences du signal entraînant l’apparition d’isofréquences. En réalignant alors tous les points sur une même échelle en fréquence, nous pouvons remonter à un spectre 1D du signal. Cette approche nous donne l’avantage de redresser l’ensemble du spectre et non plus une seule région de celui-ci, et donc de ne plus être limité aux applications où de faibles décalages en fréquence sont attendus.

Le spectre de la lampe xénon étant étalé sur plusieurs nm, la figure 2.9b reprend la seconde méthode pour redresser le spectre de cette lampe présenté en figure 2.6d. Ce redressement s’obtient en venant reconnaître les isofréquences correspondant au pic d’émission à 765.5 nm sur la figure 2.6d. La figure 2.9a montre cette identification : les isofréquences sont ici fittées et tracées en rouge. Les paramètres obtenus sont alors l’ordre d’interférence m , l’épaisseur du VIPA h , l’indice de réfraction dans le VIPA n' et l’angle d’inclinaison du VIPA φ . La valeur retournée pour chacun de ces paramètres n’est pas une mesure physique de leur valeur car ils sont nécessairement liés. Leur valeur nous donne néanmoins un moyen d’obtenir une carte 2D des fréquences amenant à des interférences constructives. Cette carte nous permet alors de redresser la figure 2.6d pour donner la figure 2.9b.

La figure 2.9c récapitule l’étude expérimentale de la luminosité d’un spectromètre VIPA en fonction de l’étendue de la source. Elle représente les images 2.6b, 2.6c et 2.9b, sommées suivant l’axe y pour obtenir un spectre 1D. Le niveau de signal observé pour une fibre optique de $25\mu m$ de diamètre et 0.1 d’ouverture numérique est ainsi plus de 3.5 fois plus important que pour une fibre optique monomode, pour un même niveau de bruit. Le niveau de signal observé pour une fibre optique de $105\mu m$ de diamètre et 0.22 d’ouverture numérique est quant à lui plus de 34 fois plus important que pour une fibre optique monomode, toujours pour le même niveau de bruit. Les valeurs théoriques attendues étant respectivement de 24 et 640 (voir figure 2.4) pour les paramètres utilisés ici, nous voyons cependant que nous sommes loin de la théorie. Ces écarts peuvent s’expliquer par le fait que notre approche théorique est trop approximative. Par ailleurs, la source n’est pas vraiment à luminance constante, et l’alignement n’est optimisé que pour la fibre monomode. Le spectromètre n’est pas modifié et donc le couplage dans le VIPA n’est pas optimal pour chacune des fibres. Nous pensons que ces raisons expliquent aussi les quelques différences observées entre les spectres, en par-

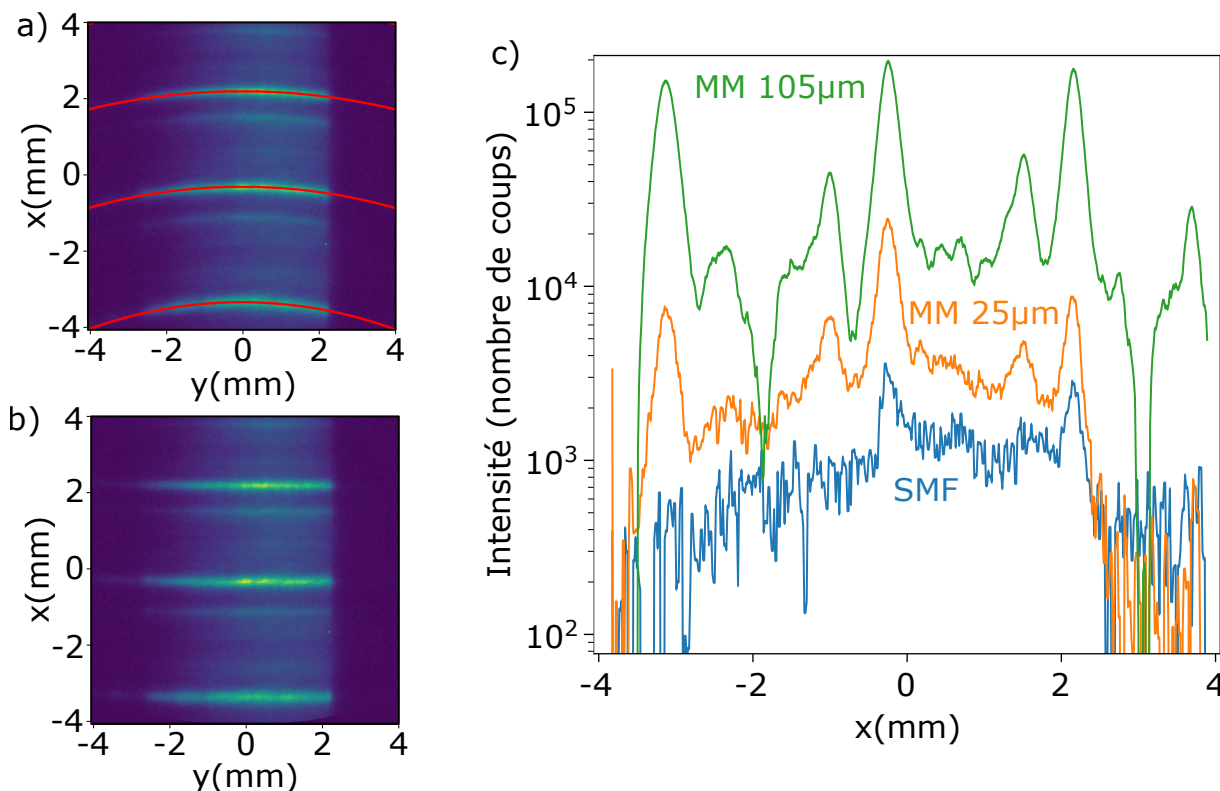


FIGURE 2.9 – Redressement du spectre d'un faisceau de large étendue par un spectromètre VIPA. a) Spectre obtenu avec un faisceau issu d'une fibre optique multimode de $105\mu\text{m}$ de diamètre de cœur et de 0.22 d'ouverture numérique. Les isofréquences fittings sont représentées en ligne rouge. b) Spectre de la figure a redressé. c) Comparaison des intensités entre les spectres obtenus des différentes sources.

ticulier les creux observés à -3 mm et 2 mm sur le tracé correspondant à la fibre de $105\mu\text{m}$.

Qualitativement cependant, nous retrouvons un gain de niveau de signal qui, même s'il est plus faible que celui attendu, n'est pas négligeable. Cela vient donc supporter le résultat théorique de la section 2.3 et montre en tous cas qu'il est intéressant d'utiliser une fibre optique multimode dans un spectromètre VIPA, et ce parfois même sans avoir à en optimiser les paramètres.

Notons également que les pics observés sur la figure 2.9c semblent tous avoir la même forme : aucun pic ne semble être étalé. Cela vient ici confirmer que notre modèle corrige de manière satisfaisante les courbures. Cela nous permet donc d'utiliser des fibres multimodes dans des spectromètres VIPA.

En conclusion de cette section, il est possible d'utiliser un spectrographe VIPA fibré par fibre multimode dans un spectromètre VIPA, et cela présente un double intérêt : pour la

stabilité globale du système optique et pour la luminosité de l'instrument. Cette approche peut également être dimensionnée pour fournir des spectres d'interférence similaires à ceux obtenus pour un spectromètre VIPA standard (fibré par fibre optique monomode). Nous choisirons ainsi cette approche pour la suite de ce manuscrit, et nous attarderons dans la section suivante sur son dimensionnement.

2.6 Dimensionnement d'une configuration sans courbures

Pour ne pas observer de courbures des spectres d'interférences, nous pouvons reprendre le modèle développé en section précédente et fixer un seuil de courbure maximale des lieux d'interférences constructives. La figure 2.10 schématise cette idée. Nous savons maintenant que c'est la divergence du faisceau suivant l'axe de la fenêtre du VIPA θ_y qui induit des courbures. Ces courbures ont une largeur δy suivant y mais également une hauteur δx suivant l'axe x , l'axe de dispersion du VIPA. Il en résulte que la courbure peut en pratique se caractériser par sa hauteur δx suivant l'axe x . Au centre de la courbure, δx peut se comprendre comme une valeur de décalage en longueur d'onde $\delta \lambda$. Il vient donc que nous pouvons relier la largeur δy de la courbure à un écart en fréquence $\delta \lambda$, ce qui implique une relation d'équivalence entre la divergence du faisceau suivant l'axe y noté θ_y et l'écart en fréquence $\delta \lambda$.

Cette relation d'équivalence peut être utilisée pour, donné un décalage en fréquence $\delta \lambda$, établir une limite sur θ_y , en revenant à l'équation 2.13 (voir annexe A.6) :

$$\theta_y \leq \arccos \left[\frac{1}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta \lambda} \right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) + 1 - n'^2} \right] \quad (2.16)$$

Cette équation, combinée au principe de conservation de l'étendue, nous permet alors de définir une taille minimale de faisceau et donc un moyen de dimensionner chaque composant du spectromètre, tel que représenté en figure 2.11, en fixant l'angle d'inclinaison du VIPA.

Ce dimensionnement se fait selon la procédure suivante :

1. Choisir une valeur de distribution angulaire sur le détecteur. Généralement, cette valeur peut être estimée en choisissant une résolution spectrale et en estimant la valeur de la focale de la lentille sphérique située après le VIPA, généralement comprise entre 500 mm et 2 m.

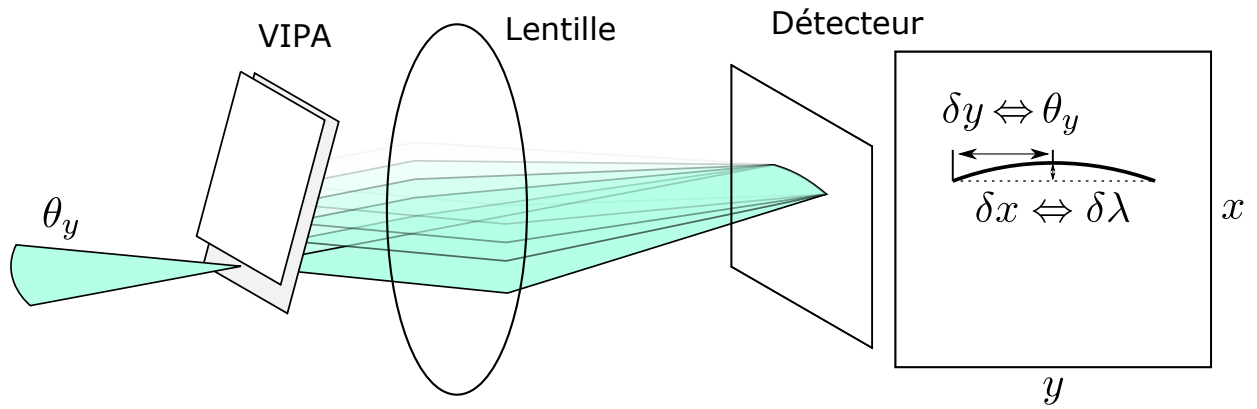


FIGURE 2.10 – Schéma explicitant le lien entre la divergence d'un faisceau plan et la courbure observée sur le spectre de ce faisceau par un spectromètre VIPA.

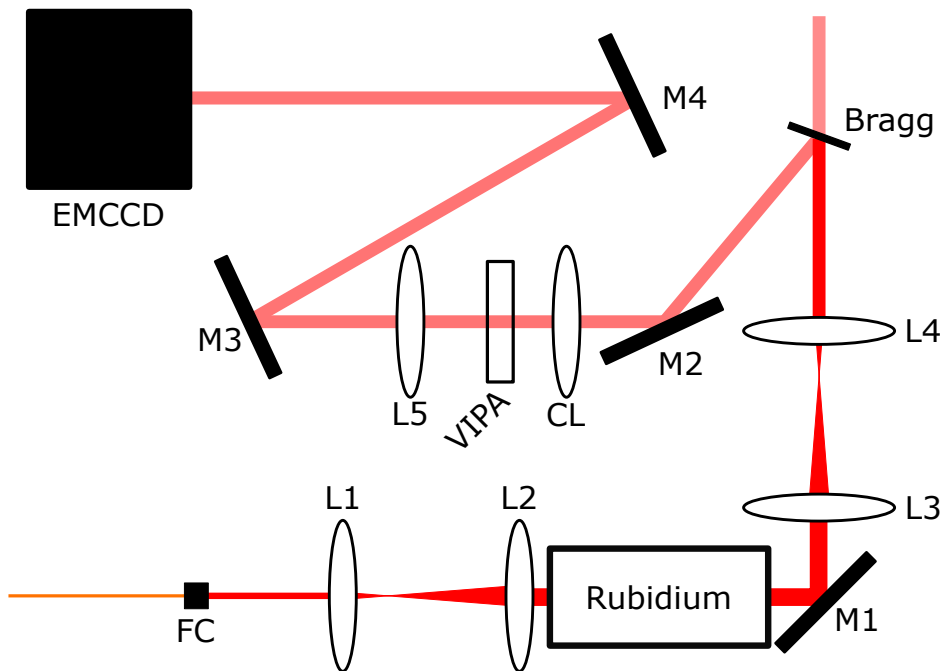


FIGURE 2.11 – Schéma du spectromètre VIPA conçu et utilisé au cours de cette thèse.

2. Déduire de la valeur de distribution angulaire l'angle d'inclinaison du VIPA, via [71] :

$$\frac{d\theta}{d\lambda} \approx -\frac{2 [n'^2 - \sin^2(\varphi)]}{\lambda \sin(2\varphi)} \quad (2.17)$$

3. Donnée cette valeur d'inclinaison, obtenir l'angle de divergence suivant y maximal permis pour le faisceau afin de négliger les courbures, à l'aide de l'équation 2.16
4. En appliquant le principe de conservation de l'étendue, déterminer la taille du faisceau minimale avant la lentille cylindrique. En déduire la magnification minimale de la fibre optique avant la lentille cylindrique.
5. En soulignant que le couplage est optimal lorsque l'angle d'inclinaison du VIPA est égal à la divergence selon x du faisceau après la lentille cylindrique, choisir une lentille de collimation du faisceau en sortie de fibre et une lentille cylindrique de focalisation dans le VIPA respectant les critères de divergence établis au point 3)
6. En veillant à éclairer tout le détecteur, choisir la lentille sphérique située après le VIPA. Notons qu'à cette étape, la distribution angulaire définie au point 1) devient une valeur de résolution spectrale pouvant être exprimée en $\text{MHz} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ou en $\text{MHz} \cdot \text{pixel}^{-1}$

Dans notre implémentation, deux éléments viennent complexifier l'approche : l'ajout d'une cellule de Rubidium et d'un filtre de Bragg. Ces deux éléments ajoutent pratiquement des contraintes de tailles de faisceau, qui s'ajoutent à celles listées ci-dessus. Nous proposons donc ci-après un compromis permettant un bon fonctionnement des éléments, en limitant l'empiètement du spectromètre :

- Angle d'inclinaison du VIPA : 2°
- Source : Fibre multimode de $25\mu\text{m}$ de diamètre de cœur et d'ouverture numérique de 0.1 (représentée en orange sur la figure 2.11)
- Focale du Collimateur de la fibre ("FC" sur la figure 2.11) : 18.4 mm
- Focale de la lentille cylindrique ("CL" sur la figure 2.11) : 200 mm
- Focale de la lentille sphérique située après le VIPA (notée "L5" sur la figure 2.11) : 500 mm
- Cellule de Rubidium ("Rubidium" sur la figure 2.11) : diamètre 19 mm
- Lentille de mise en forme du faisceau avant la cellule de Rubidium ("L1" et "L2" sur la figure 2.11) : 35 mm et 150 mm

- Filtre de Bragg (noté "Bragg" sur la figure 2.11) : diamètre 4 mm
- Lentille de mise en forme du faisceau après la cellule de Rubidium ("L3" et "L4" sur la figure 2.11) : 35 mm et 150 mm

2.7 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons abordé la question de l'utilisation de sources à large étendue dans les spectromètres VIPA. Nous avons mis en lumière l'intérêt théorique d'augmenter l'étendue de la source en terme de luminosité d'instrument. Nous avons alors démontré par un calcul d'étendue couplée que cette approche permet bien, dans les cas usuels, d'augmenter l'étendue analysée par le spectromètre et donc la luminosité de l'instrument, venant ainsi compléter l'étude de la littérature, et justifiant l'utilisation de fibres optiques multimodes dans les spectromètres VIPA. Nous avons ensuite validé expérimentalement notre analyse en effectuant des mesures sur une source Xénon avec plusieurs fibres optiques d'étendues différentes. Cette expérience a par ailleurs révélé une limite au modèle établi du spectromètre VIPA qui nous a amené à l'élargir pour les sources à large étendue. Ce travail nous a alors permis de montrer qu'il était possible de résoudre les spectres issus de ces sources et que, ce faisant, nous retrouvions les mêmes informations spectrales. Le système que nous présentons étant plus lumineux que ce que propose l'état de l'art, nous nous sommes penchés sur la question de son dimensionnement pour qu'il retourne néanmoins des spectres similaires à ceux présentés dans l'état de l'art. Nous avons alors débouché à un protocole de dimensionnement du spectromètre complet qui, pour une résolution spectrale désirée, nous guide dans la réalisation d'un instrument plus lumineux que l'état de l'art, mais retournant les mêmes spectres.

Chapitre 3

Stabilisation du Spectromètre VIPA et traitement des courbes

La spectroscopie Brillouin est basée sur un phénomène où l'intensité de la lumière diffusée est extrêmement faible. Afin de maintenir des niveaux de signal acceptables, il est donc nécessaire d'utiliser des temps de mesure significatifs, qui varient de quelques dizaines de millisecondes [74] à plusieurs centaines de millisecondes [75, 16]. Dans le cas de l'imagerie Brillouin, ces temps de mesure sont multipliés par le nombre de points observés, qui peut varier de quelques centaines à plusieurs milliers, résultant en un temps total de mesure allant de quelques dizaines de secondes à une heure. La question de la stabilité de l'instrument de mesure en imagerie Brillouin devient donc essentielle. Dans le cadre de cette thèse, nous utilisons un spectromètre VIPA. À notre connaissance, aucune étude n'a caractérisé la stabilité de ce type d'instrument ni proposé de méthodes de stabilisation. Ainsi, ce chapitre se concentrera sur deux objectifs : identifier les sources d'instabilité et les corriger. L'objectif final de ce chapitre sera de fournir des valeurs de référence de stabilité pour un spectromètre VIPA.

Lors d'une mesure Brillouin, les instabilités peuvent être attribuées à deux sources indépendantes : l'instabilité du signal mesuré, imputable aux instabilités en fréquence de la source de lumière utilisée, et l'instabilité de l'instrument de mesure lui-même. Dans notre cas, la source de lumière est une diode laser.

La littérature propose une méthode pour stabiliser la fréquence de la diode laser : le "verrouillage en fréquence" du laser. Cette méthode consiste à diviser le faisceau laser en deux et

à centrer la fréquence de l'un des faisceaux sur la fréquence d'absorption d'un filtre de Notch. Cela nécessite donc l'utilisation de filtres de Notch, qui aujourd'hui prennent la forme soit d'une transition atomique [75, 68, 53], soit d'un étalon de Fabry-Pérot [76]. Cette approche présente toutefois un inconvénient majeur : le signal doit être divisé et les deux signaux obtenus doivent alors soit passer dans la même cellule de Rubidium, soit dans deux cellules distinctes. Cela complique le montage, entraîne une perte du signal, et nous impose une utilisation suboptimale de la cellule. Cette limitation est particulièrement contraignante lorsque la puissance initiale du laser est faible, ou que celui-ci doit être filtré pour affiner son spectre autour d'une seule fréquence, comme dans notre cas. Afin de résoudre ce problème, nous introduirons donc une nouvelle méthode permettant de stabiliser une diode laser. Par la suite, nous nous pencherons sur les instabilités spécifiques au spectromètre VIPA. Nous chercherons ainsi à les expliquer en nous ramenant au modèle établi en chapitre 2. Nous réviserons alors les méthodes de traitement des spectres du spectromètre VIPA, notamment l'établissement de l'échelle en fréquence du signal à partir du spectre de diffusion enregistré par le détecteur. En nous intéressant alors aux limites expérimentales rencontrées, nous présenterons une nouvelle approche du traitement des pics du spectre du signal.

Dans ce chapitre, les méthodes développées seront ainsi caractérisées par deux paramètres :

- L'exactitude : l'écart des valeurs observées aux valeurs théoriques attendues
- La stabilité : les variations dans les temps des valeurs observées

Nous concluons ce chapitre par une analyse expérimentale de notre dispositif en suivant la mesure de différents échantillons de calibration, et nous établirons une liste de valeurs de références pour la stabilité de cet instrument et ses caractéristiques réelles.

3.1 Instabilités du laser

L'utilisation de diodes laser à une longueur d'onde de 780 nm est courante dans la littérature pour les applications de spectroscopie Brillouin en milieu biologique [42, 77, 38, 75, 39]. Ce choix présente l'avantage de minimiser les effets phototoxiques, et permet l'utilisation d'une cellule de Rubidium pour filtrer le rayonnement élastique, comme mentionné en chapitre 1. Toutefois, pour que la cellule de Rubidium puisse filtrer le rayonnement élastique, il est crucial que la fréquence de la diode laser corresponde à la fréquence d'absorption de la cellule. Par conséquent, la stabilité en fréquence de la diode laser devient un élément critique. Malheureusement, dans les conditions expérimentales, cette stabilité n'est pas toujours garantie.

La littérature mentionne la présence d'instabilité du laser [78, 79, 42, 38, 80, 81, 15, 13, 82, 83] et propose parfois des valeurs caractéristiques de ces instabilités : Shao *et al.* [81] observent ainsi une instabilité de laser de ± 300 MHz sur 5 minutes, tandis que Ballmann *et al.* [84] rapportent eux des variations de l'ordre de 5 MHz aux temps longs. Il est donc clair que ces variations dépendent des lasers employés, et des conditions expérimentales de mesure. Dans notre étude, nous utilisons une diode laser Eagle Yard EYP-DFB-0780-00050-1500-BFW11-0005. Dans un contexte expérimental, donc dans un laboratoire non thermalisé, la valeur d'instabilité observée est de l'ordre de 1 GHz/h. Cette valeur intervient comme une dérive : elle affecte au temps long la fréquence du laser. Aux temps courts, donc aux échelles de temps utiles pour l'acquisition d'une mesure, les instabilités sont négligeables.

La dérive du laser doit alors être comparée à la largeur caractéristique du pic d'absorption de la cellule de Rubidium, qui est d'environ 500 MHz. Pour une dérive de 1 GHz/h, cela autorise un temps caractéristique de mesures sans réajustement des paramètres de la diode, de l'ordre de la dizaine de minutes.

Le fonctionnement des diodes laser ne sera pas détaillé ici, car la littérature a déjà couvert ce sujet [85, 86]. Soulignons cependant qu'étant à la base un semiconducteur, une diode laser est naturellement sensible à la température et à l'intensité qui la traverse. La stabilisation de la fréquence de la diode laser passera donc par la correction de sa température et de son intensité [87].

En nous basant sur l'observation de l'instabilité de la diode laser mentionnée, nous partirons du principe que l'ajustement du courant ou de la température n'est pas parfait. Étant donné le niveau technologique actuel des générateurs de courant, nous sommes portés à considérer que la régulation de la température est le principal facteur à l'origine de ces instabilités. Dans cette hypothèse, une dépendance partielle de la température de la diode par rapport à la température ambiante existerait.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à relier la température ambiante à l'intensité traversant le laser données une température de consigne et une fréquence d'émission. Pour garantir la fréquence du laser, nous nous inspirerons de l'approche de la spectroscopie d'absorption saturée de l'isotope 85 du Rubidium. La spectroscopie d'absorption vise à dé-

finir les fréquences auxquelles des atomes passent d'un état de base à un état excité en les illuminant avec un faisceau dont la longueur d'onde est maîtrisée et réglable. En pratique, cela implique de faire varier la fréquence d'un laser et de mesurer l'atténuation induite sur son intensité par une cellule remplie d'atomes d'intérêt. En effectuant alors un balayage en fréquence du laser, nous pouvons extraire le spectre d'absorption de la cellule et en déduire les fréquences de transition des atomes, correspondant aux pics d'absorption de la cellule.

Dans notre cas, notre approche sera différente, car nous partirons de la connaissance des fréquences de transition du Rubidium 85 [88], et nous les choisirons comme références. Nous ne chercherons donc pas à extraire un spectre d'absorption de la cellule, mais au contraire à extraire les paramètres du laser permettant de maximiser l'absorption par la cellule, donnée une température ambiante.

La figure 3.1a illustre la configuration expérimentale d'un banc de spectroscopie d'absorption saturée d'une cellule de Rubidium : un laser piloté en courant et température émet un rayon qui traverse la cellule de Rubidium et dont l'intensité est mesurée en sortie. Cette intensité est enregistrée par l'ordinateur qui pilote le laser. Dans notre approche, et pour vérifier notre hypothèse, nous ajoutons à ce banc une sonde de température, notée T2 sur la figure 3.1a, qui mesurera la température ambiante.

La fréquence de la diode laser dépend à la fois de sa température et du courant qui la traverse. Cela entraîne l'existence de différentes combinaisons de températures et de courants qui conduisent à la même fréquence d'émission du laser. En d'autres termes, si la température de la diode change, il est théoriquement possible de compenser les variations de fréquence en ajustant le courant. Sur cette idée, nous fixons une température de consigne de la diode laser, et faisons varier l'intensité traversant la diode pour retrouver la valeur d'intensité correspondant à la fréquence de transition du Rubidium 85.

La figure 3.1b montre ainsi le déroulement classique d'une mesure des paramètres du laser : l'intensité traversant la diode laser est balayée autour de la fréquence de transition du Rubidium pour une température de consigne donnée. À chaque valeur d'intensité, une mesure de

2. Nous sommes ici centrés sur la transition électronique principale de l'isotope 85 du Rubidium, correspondant à la transition électronique $^{85}\text{Rb } F_g = 3 \rightarrow F_e$, mais nous pouvons également commencer à voir la transition située à 3 GHz de la transition principale, correspondante à la transition électronique $^{85}\text{Rb } F_g = 2 \rightarrow F_e$, autour des points 0, 50 et 100 [88, 89, 90]

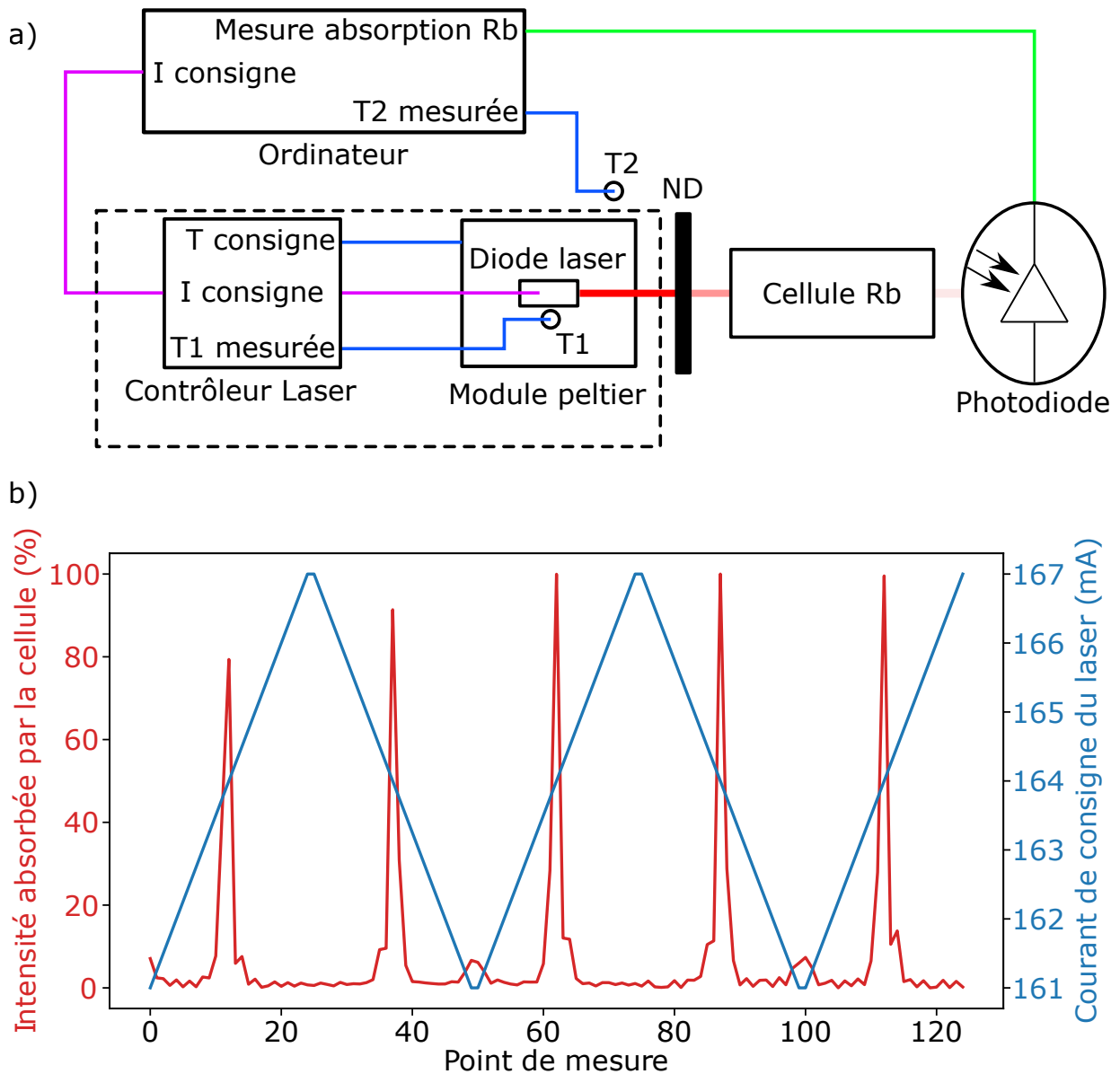


FIGURE 3.1 – Principe de la stabilisation en fréquence d’une diode laser par mesure de la température ambiante. a) Schéma de principe du montage. b) Pics d’absorption de la cellule de Rubidium obtenus en faisant varier l’intensité de la diode laser ².

l’intensité lumineuse captée par la photodiode est effectuée. En superposant les deux tracés, nous pouvons alors remonter à la valeur d’intensité maximisant l’absorption de la cellule de Rubidium, c’est-à-dire la valeur d’intensité assurant une fréquence de la diode laser égale à la fréquence de transition du Rubidium 85. Dans le cas de la figure 3.1b, cette intensité est égale à 164 mA.

La figure 3.1b nous permet aussi d’estimer l’équivalent, en termes de fréquences, d’une unité de courant traversant la diode. Nous voyons en effet autour des points 0, 50 et 100, un nouveau pic d’absorption apparaître. Ce pic correspond à une seconde transition de la cellule,

située à environ 3.5 GHz de la transition principale, sur laquelle nous sommes centrés. En considérant que l'intensité de la diode affecte de manière linéaire la fréquence du laser, il en résulte que 1 mA de variation correspond à environ 1 GHz de décalage en fréquence de la fréquence d'émission de la diode laser.

Notons que cette mesure peut facilement s'automatiser. Il devient ainsi possible de suivre l'intensité du laser garantissant la fréquence d'émission voulue, dans le temps. En parallèle, il nous suffit alors de mesurer la température à la sonde T2 pour suivre dans le temps la température ambiante de la pièce. La figure 3.2a présente le tracé de l'intensité du laser assurant la fréquence cherchée dans le temps et l'évolution de la température ambiante dans le temps, sur un même graphe. Une corrélation entre la température ambiante et l'intensité du laser pour la longueur d'onde cible apparaît alors clairement. Cela va donc dans le sens de notre hypothèse de départ : la température du laser n'est pas assez bien stabilisée.

La figure 3.2b change la présentation de la figure 3.2a en enlevant le paramètre de temps et en traçant l'intensité du laser assurant la fréquence cherchée au laser donnée une température de consigne en fonction de la température ambiante. La relation peut alors facilement s'approcher par une relation linéaire (droite violette).

Cette relation linéaire empirique nous permet alors de lier l'intensité de consigne du laser et la température ambiante mesurée pour garantir une fréquence d'émission de la diode. Cette relation est ici présentée sur une plage de 3° C : la plage de variation empirique de la température du laboratoire. Il en résulte que le laser obtenu est stable en fréquence dans le temps, dans le laboratoire où il est utilisé, et ce, sans perte de puissance du laser.

En pratique, cette solution nous a permis d'obtenir, après une calibration de la relation linéaire sur un week-end entier, un laser présentant une stabilité caractérisée par une dérive inférieure à 250 MHz/mois en condition expérimentale³. Cette valeur est obtenue en utilisant le laser tous les jours de la semaine pendant un mois, en gardant la même relation liant intensité du laser et température ambiante, et en vérifiant que sur aucune des mesures faites, le laser n'était sorti de la bande d'absorption du Rubidium.

3. Aucune mesure continue de plus d'un mois permettant de remonter à la stabilité du laser n'a été effectuée sur cette thèse

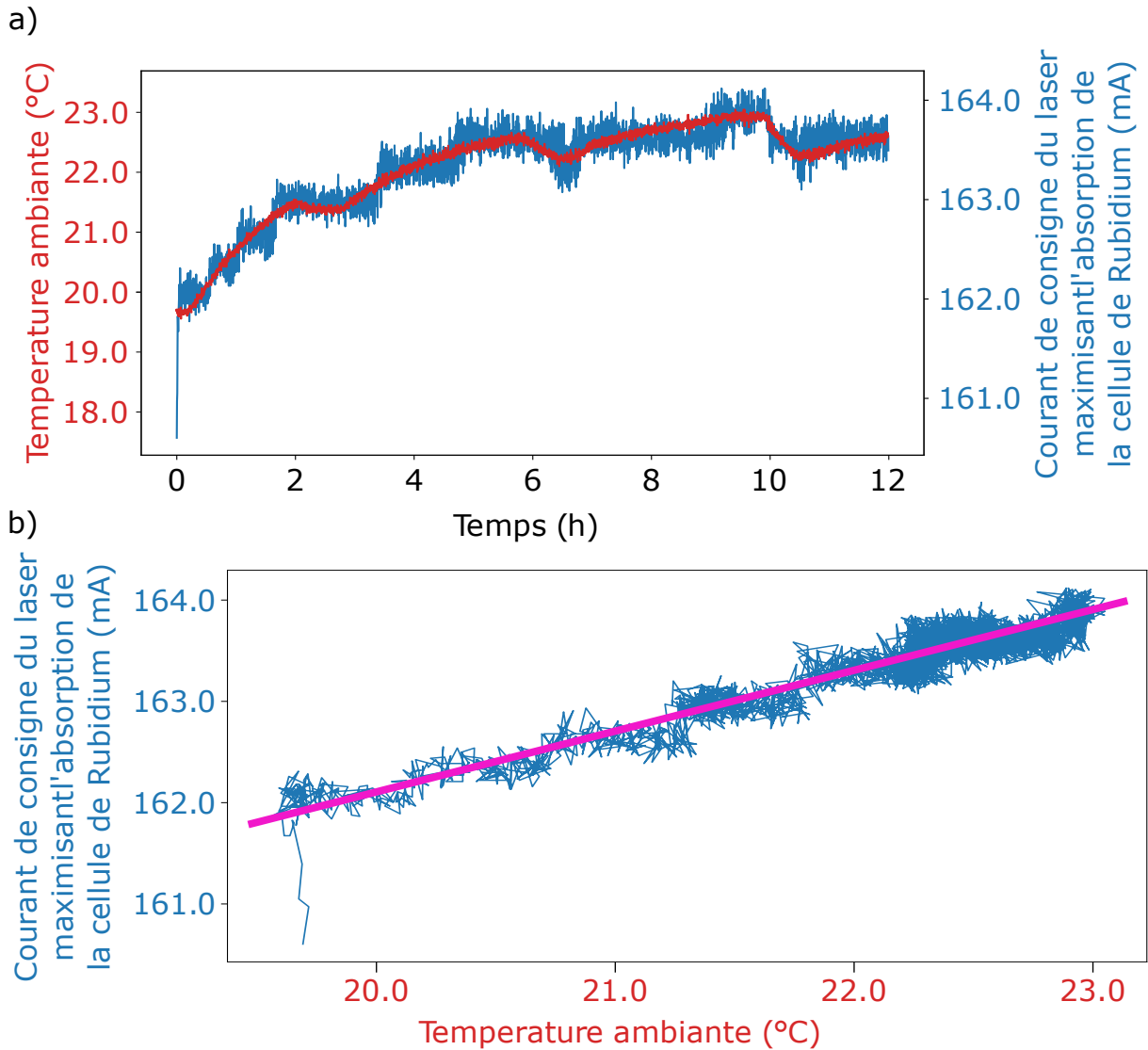


FIGURE 3.2 – Évolution de la consigne de courant de la diode laser et de la température ambiante. a) Mesures indépendantes de l’intensité d’alimentation de la diode laser assurant la fréquence voulue et de la température ambiante. b) Tracé de l’intensité d’alimentation de la diode laser en fonction de la température ambiante

Cette implémentation présente donc plusieurs intérêts :

- Elle permet de stabiliser un laser sans perdre de puissance, à l’inverse du verrouillage en fréquence
- Elle se base sur une mesure de la température ambiante, une mesure assez facile à mettre en œuvre, et à moindre coût
- Elle est spécifique au laser choisi et peut facilement être recalculée, ce qui est particulièrement intéressant pour prendre en compte le vieillissement du laser.

À l’issue de cette partie, nous avons donc la certitude de pouvoir obtenir le même spectre Brillouin, donné un échantillon de calibration. En observant ce spectre, nous pouvons alors

étudier l'instabilité du spectromètre. Cette section nous invite à présent à juger de la stabilité d'un spectromètre VIPA.

3.2 Instabilités du spectrographe VIPA

Nous venons de voir en première section que le spectre Brillouin d'un échantillon de calibration peut maintenant être considéré comme stable dans le temps. Or cela n'implique pas que le niveau de signal du spectre reste constant dans le temps. Ce niveau de signal est en pratique défini par deux paramètres principaux dans le spectromètre VIPA fibré : la puissance du laser et la qualité du couplage du signal dans la fibre optique. En considérant la puissance du laser constante, nous ne dépendrons donc en principe que de la qualité de couplage du signal dans la fibre optique reliée au spectrographe VIPA. Remarquons alors que le chapitre 2, en montrant la possibilité d'utiliser une fibre de plus gros cœur, propose également de faciliter ce couplage du signal dans la fibre. Ainsi, l'utilisation d'un spectromètre VIPA fibré par fibre multimode, et non plus monomode, représente également une avancée en termes de stabilité du dispositif.

En considérant que le signal parvenant au spectromètre est essentiellement indépendant du temps, nous pouvons regarder comment les spectres d'interférence renvoyés par le spectromètre varient dans le temps. Pour ce faire, nous imagerons un échantillon de calibration à différents jours. Dans notre cas, nous choisissons l'eau comme échantillon de calibration. La fréquence mesurée dépendant cependant de la température de notre échantillon, nous imagerons ici un échantillon d'eau thermalisé à 37° C. La figure 3.3a montre ainsi différents spectres d'interférence d'un échantillon d'eau ultrapure thermalisée, normalisés en amplitude. Ces spectres sont tous mesurés par le spectromètre VIPA fibré par une fibre multimode de 25 μ m présenté en fin de chapitre 2. Ces spectres sont ramenés à des spectres d'une seule dimension suivant la méthode également présentée au chapitre 2. Notons que pour l'obtention de tous ces spectres, aucune modification du spectromètre n'a été entreprise, ni au niveau des paramètres du spectrographe, ni au niveau de la focalisation du signal dans la fibre optique.

Nous observons clairement des variations : les spectres semblent se décaler les uns par rapport aux autres. La figure 3.3b représente l'écart en pixel du dernier pic anti-Stokes des spectres (correspondants aux points bleus sur la figure 3.3a et du premier pic Stokes des spectres (correspondants aux points rouges sur la figure 3.3a. Nous voyons que le décalage des spectres

ne s'explique pas par un décalage physique des spectres sur le détecteur, car l'écart en pixel entre deux pics n'est pas constant, comme le montre la figure 3.3b. Nous avons ainsi besoin de revenir à la théorie développée en chapitre 2 pour comprendre le mécanisme derrière ces variations.

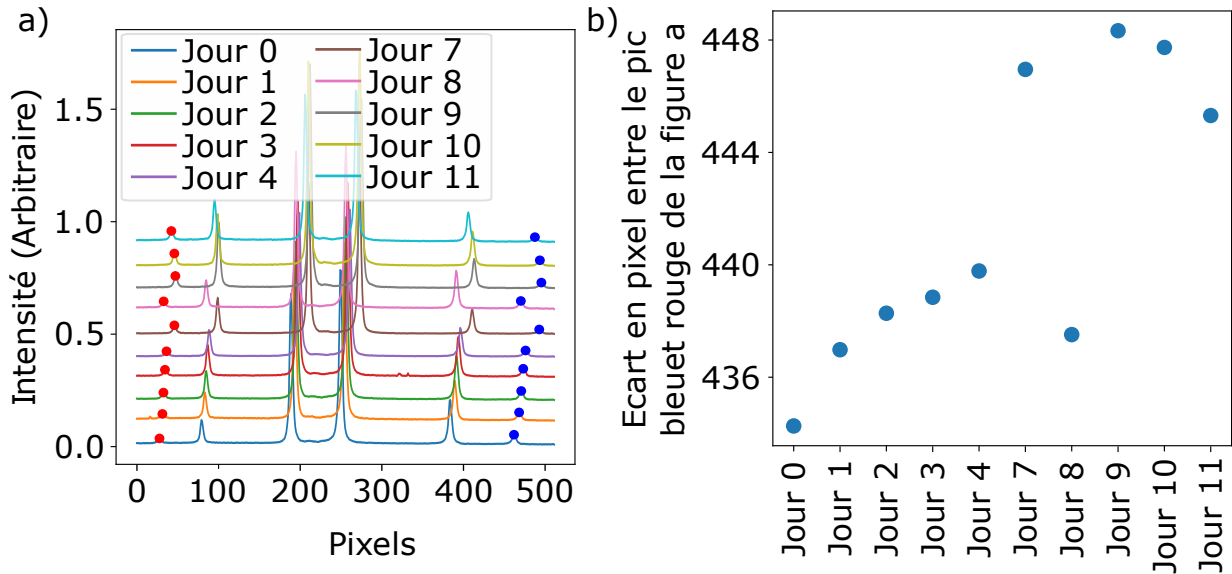


FIGURE 3.3 – Instabilité du spectrographe VIPA et réaligement naïf de spectres d'eau ultrapure thermalisée pris à différents jours avec le même instrument. a) Spectre d'un échantillon d'eau ultrapure thermalisée obtenu sur deux semaines de mesures successives : les spectres semblent avoir "bougés" sur le détecteur. b) Écarts en pixel du premier pic Stokes Brillouin de l'eau (pic rouge) et du dernier pic anti-Stokes Brillouin de l'eau (pic bleu) visible sur le détecteur en fonction du jour de mesure.

Avant de nous replonger dans la modélisation du VIPA, notons que la littérature n'a jamais traité ce problème directement, mais qu'une piste d'explication peut être trouvée dans l'étude de Shirasaki [58]. Dans cette étude, l'auteur montre que la longueur d'onde transmise par le spectromètre VIPA à un point du détecteur change avec la température du VIPA. L'explication avancée est alors que l'épaisseur du VIPA change avec la température. Une solution à ce problème est alors proposée dans ce même article : ajouter de chaque côté du VIPA deux épaisseurs d'un matériau transparent présentant un coefficient de dilatation thermique supérieur à celui du matériau composant le VIPA.

Notons qu'en pratique la température ne fait pas seulement varier l'épaisseur du VIPA, mais aussi l'indice optique du matériau qui le compose. Ces deux effets se caractérisent par deux paramètres : un coefficient de variation d'indice optique dû aux changements de température pour la silice fondue valant $8.10^{-6}K^{-1}$ [91], et un coefficient de dilatation thermique de

l'ordre de $5.10^{-7}K^{-1}$ [92]. Les variations de température estimées dans notre spectromètre sont de l'ordre de $50^\circ C$, car la cellule de Rubidium que nous utilisons est chauffée à $80^\circ C$ et se trouve dans le spectromètre. En reprenant le développement de Hu *et al.* [71], cela amène à une variation de la FSR de $0.2 \text{ MHz}/^\circ C$ à 780 nm . En reprenant les ordres de grandeur des fluctuations de température attendues, cela induira donc des variations de l'ordre de 10 MHz sur le FSR de l'instrument, pour la plage de température considérée. Nous considérerons par la suite que ces erreurs sur la valeur de la FSR sont négligeables : ils représentent en effet un écart de l'ordre de 0.03% de la valeur théorique.

Notons que les variations estimées ici sont du même ordre de grandeur que celles prédites par Shirasaki [58]. Ici cependant, nous n'interpréterons pas ces variations en termes de fréquences transmises dans un système de démultiplexage, mais nous analyserons les effets sur l'équation 2.13. Reprenons cette équation :

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \sin^2 \theta_x - \sin^2 \theta_y} - \sin \varphi \sin \theta_x \right]^2 - 1 + n'^2} \quad (3.1)$$

En effectuant alors des développements limités au premier ordre, et en nous attachant sur les ordres de grandeur en jeu, nous pouvons alors écrire :

$$\left\{ \begin{array}{l} \sqrt{\kappa + (n' + \Delta n')^2} \approx \sqrt{\kappa + n'^2} + \Delta n' \frac{n'}{\sqrt{\kappa + n'^2}} \approx \sqrt{\kappa + n'^2} \\ \frac{1}{\lambda + \Delta \lambda} \approx \lambda - \Delta \lambda \\ \lambda - \Delta \lambda \approx \nu + \Delta \nu \end{array} \right. \quad (3.2)$$

Cela amène aux équivalences suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \delta(n + \Delta n, h, \lambda) \equiv \delta(n, h, \lambda) \\ \delta(n, h + \Delta h, \lambda) \equiv \delta(n, h, \lambda + \Delta \lambda) \equiv \delta(n, h, \nu + \Delta \nu) \end{array} \right. \quad (3.3)$$

L'erreur induite par ces équivalences dépendra directement de l'amplitude des variations relatives $\Delta n/n$ et $\Delta h/h$. Dans notre cas, pour des variations de température de l'ordre de $50^\circ C$, les erreurs que nous faisons par notre approximation ramenée à leur valeur en fréquence, seront inférieures au MHz. Les précisions observées sur un spectromètre VIPA étant toujours supérieures à ce seuil, nous considérerons les erreurs induites par les équivalences de l'équation 3.3 négligeables ici. Par conséquent, nous pouvons considérer que l'effet de la température sur le spectromètre VIPA est un effet de "translation" de tout le spectre en

fréquence.

En clair, nous proposons donc ici de modéliser les instabilités expérimentales observées, par un décalage de tout le spectre en fréquence. Cette approche est innovante, car elle part du principe que la dispersion angulaire du VIPA reste constante, et que nous pourrions donc établir une unique relation pixel-fréquence à un ensemble de courbes, prises avec une même configuration de l'instrument, mais à des moments, et donc à des températures de VIPA, différentes.

La figure 3.4 vient ainsi appliquer cette idée. Une conversion de l'échelle en pixel en échelle en fréquence est réalisée, en suivant la méthode proposée dans la littérature [72], en notant que notre VIPA présente une distance fréquentielle entre deux ordres d'interférence successifs (Free Spectral Range en anglais, FSR pour la suite de ce manuscrit), de 300.6 GHz. En utilisant cette échelle en fréquence, tous les spectres sont ainsi réalignés pour faire correspondre leurs pics. De la même manière que la figure 3.3b montrait les écarts en pixels entre les pics Stokes et anti-Stokes les plus éloignés sur le détecteur, la figure 3.4b montre les écarts en fréquence entre ces pics. Les écarts observés ici sont compris entre 69.15 GHz et 69.7 GHz.

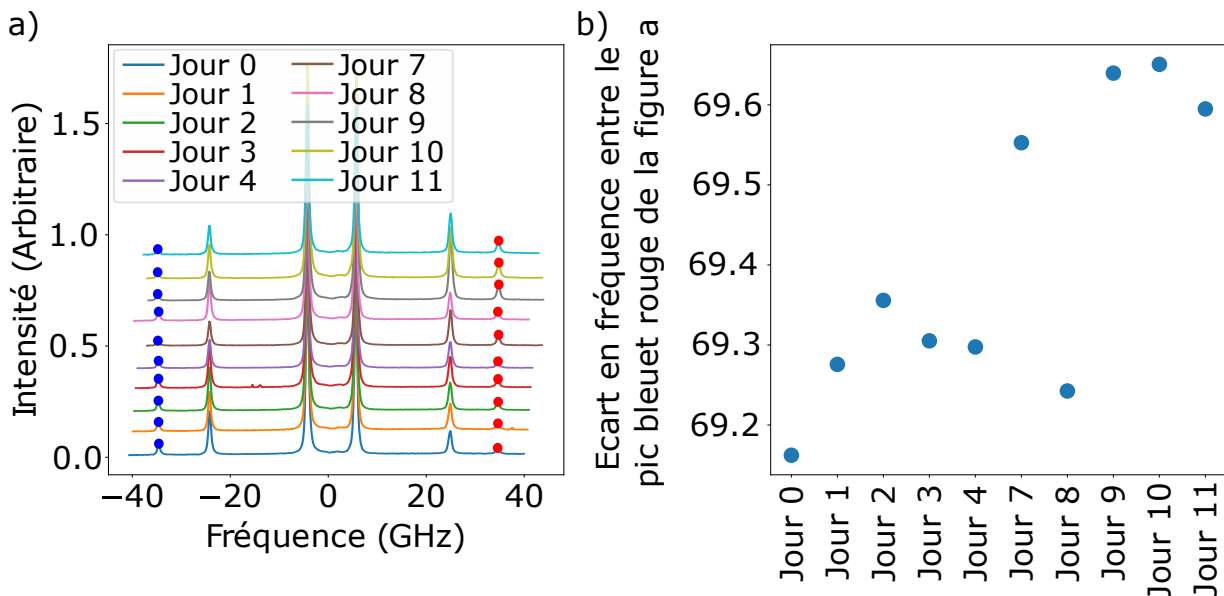


FIGURE 3.4 – Correction des instabilités du spectrographe VIPA observés sur des spectres d'eau ultrapure thermalisée pris à différents jours avec le même instrument. a) Spectres de la figure 3.3a réalignés sur une échelle en fréquence. b) Écarts en fréquence du premier pic Stokes Brillouin de l'eau (pic rouge) et du dernier pic anti-Stokes Brillouin de l'eau (pic bleu) visible sur le détecteur en fonction du jour de mesure.

Notre méthode semble replacer correctement tous les pics Brillouin à la même position en pixel. Afin de caractériser plus précisément la fidélité de notre approche, il convient de noter que nous devrions observer un décalage de fréquence entre le premier pic Stokes Brillouin et le dernier pic anti-Stokes Brillouin égal à deux fois le FSR du VIPA plus deux fois le décalage de fréquence attendu pour l'eau, car nous regardons un échantillon d'eau ici. À partir des résultats présentés dans le chapitre 1, cela correspondrait à une valeur de 70,3 GHz, ou 70,08 GHz en prenant en compte l'effet de l'ouverture numérique de l'objectif à travers l'étude d'Antonacci *et al.* [30]. Cependant, dans nos observations, la moyenne du décalage de fréquence est de 69,4 GHz.

Bien que cette erreur soit faible (environ 1% de la valeur attendue), elle existe et représente une source d'erreur potentielle au moment d'extraire les propriétés des spectres. Au regard de la démarche adoptée pour établir l'échelle en fréquence, elle peut s'expliquer par le fait qu'une seule courbe est utilisée pour établir cette relation. À notre connaissance, nous sommes les premiers à quantifier la justesse de la relation pixel-fréquence, et nous ne connaissons pas d'étude antérieure ayant estimé l'impact de ces variations sur l'extraction des données. Notons que nous nous trouvons cependant maintenant dans une configuration nouvelle : notre échelle de fréquence est la même pour un ensemble de courbes. Il en résulte que nous pouvons à présent établir cette échelle de fréquence non plus en nous basant sur une seule courbe, comme le propose la littérature, et comme nous l'avons fait ici, mais un ensemble de courbes.

L'intérêt de cette approche est triple : l'erreur sur l'échelle en fréquence devrait être réduite, la formule analytique que l'on vient d'adapter devrait pouvoir être adaptée pour se rapprocher du modèle théorique, et nous n'aurions plus à calculer une nouvelle échelle en fréquence pour chaque courbe, ce qui ultimement résulterait en un gain de temps de traitement. Voyons maintenant la mise en place concrète de cette approche.

3.3 Échelle en fréquence du spectre d'interférence d'un spectromètre VIPA stabilisé

La figure renvoyée par un spectrographe VIPA en réponse à un faisceau lumineux est un motif d'interférence capturé par un détecteur de type EMCCD. Pour remonter au spectre en fréquence du faisceau, et ainsi en extraire ses caractéristiques, il est nécessaire d'établir

une relation entre l'échelle en fréquence du signal et l'échelle en pixel du motif d'interférence capturé par le détecteur. Dans la littérature, deux approches sont décrites pour établir cette relation : l'utilisation du spectre d'un échantillon de calibration comme référence [83, 39], ou l'approximation de la relation analytique entre l'échelle de pixel et l'échelle de fréquence [78, 72, 14]. Dans la section précédente, nous avons constaté que la deuxième option nous permettait d'établir une seule relation entre pixels-fréquences pour un ensemble de courbes, en ne connaissant que le FSR du VIPA. Notre approche se distingue cependant de l'état de l'art par la possibilité d'utiliser un grand nombre d'échantillons pour établir cette relation. Dans cette section, nous allons présenter une nouvelle méthode pour venir établir cette relation.

Notre méthode se base sur le fait que pour un spectromètre VIPA donné, si aucun paramètre du spectromètre n'est touché mis à part la température du VIPA, toutes les courbes présenteront la même relation pixel-fréquence modulo une valeur constante sur l'échelle en fréquence. Cette valeur constante ne dépendra que de la température, ou de manière équivalente, du moment où la courbe a été enregistrée. En pratique, la relation pixel-fréquence pourra prendre la forme suivante :

$$f_i(pixel) = f_0(pixel) + C(T) = f_0(pixel) + C(t) \quad (3.4)$$

avec f_i la relation pixel-fréquence attribuée à un spectre i , f_0 une relation pixel-fréquence de référence pour l'ensemble des courbes d'une acquisition et C un offset en fréquence dépendant de la température du VIPA, ou de manière équivalente, du moment où le spectre a été obtenu.

En repartant alors de l'approche présentée par Wu *et al.*[72], à savoir : reconnaître la position de pics sur le détecteur, et connaissant la distance fréquentielle entre deux modes successifs (le Free Spectral Range en anglais, ou FSR) du VIPA, remonter à un problème matriciel permettant de définir la relation pixel-fréquence comme un polynôme d'ordre 2, nous pouvons maintenant décrire une nouvelle approche pour établir la relation f_0 .

Notons pour cela que cette relation doit vérifier deux conditions :

- Le décalage en fréquence entre deux pics successifs correspondant à la même longueur d'onde, mais obtenus entre deux ordres successifs, est égal au FSR
- Deux spectres pris d'un même échantillon doivent retourner le même spectre en fré-

quence, en particulier des décalages en fréquences entre pics Stokes et Anti-Stokes identiques. En faisant une série d'acquisitions sur un échantillon de calibration, nous pouvons donc lier les décalages en fréquence observés sur les différentes courbes entre eux.

La figure 3.5 donne une représentation des relations qui découlent de ces conditions. Deux spectres d'un échantillon d'eau pris à une semaine d'intervalle sont extraits de la figure 3.4a. En accord avec le premier point mentionné, les écarts entre deux pics de même fréquence, mais d'ordres adjacents doivent être égaux à une FSR. Ces écarts sur l'échelle en pixel sont indiqués sur la figure 3.5a par une double flèche. En accord alors avec le deuxième point, les écarts fréquentiels entre deux pics d'un même ordre et d'un même échantillon, correspondant à un Stokes Brillouin et un anti-Stokes Brillouin, doivent être égaux. Ces écarts sur l'échelle en pixel sont indiqués sur la figure 3.5b par une double flèche bleue pour le spectre correspondant à l'échantillon d'eau pris à jour 0 et en marron pour celui pris à jour 7. Enfin, en accord avec le troisième point, les doubles flèches bleues et marrons doivent donner un écart en fréquence identique.

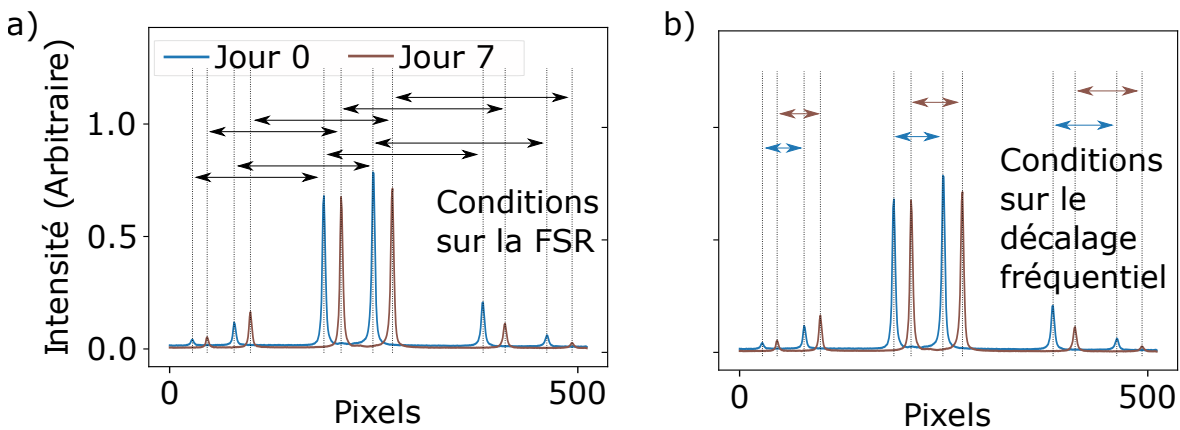


FIGURE 3.5 – Illustration des équations établies pour définir l'échelle pixel-fréquence d'un ensemble de courbes. a) La distance fréquentielle entre deux pics reliés par une double flèche doit être égale à un FSR. b) La distance fréquentielle entre deux pics reliés par une double flèche doit être égale. Notons que ces relations s'appliquent ici aux deux courbes représentées, prises respectivement à deux jours différents.

L'intérêt de ce système est de démultiplier le nombre de pics en utilisant plus de courbes. En reprenant la figure 3.5, nous passons par exemple d'un système de 7 équations à un système de 17 équations en n'ajoutant qu'une seule courbe à notre étude.

En pratique, si l'inclinaison du VIPA entraîne l'apparition de k ordres d'interférence sur le détecteur, et qu'un nombre n de spectre d'un même échantillon sont enregistrés pour cette configuration du spectrographe, nous pourrions établir un système de $4kn - 2n - k$ équations. Le système d'équations peut donc devenir très rapidement important, nous permettant alors de réduire l'erreur commise sur la relation pixel-fréquence. Ce nombre important de courbes peut également servir à estimer la relation pixel-fréquence par un polynôme de degré supérieur à 2. Afin de caractériser le gain de cette méthode, nous pouvons reprendre l'approche de la section précédente, en calculant l'écart en fréquence entre le premier pic Stokes Brillouin visible sur le détecteur et le dernier pic anti-Stokes Brillouin, et en comparant cette valeur à la valeur théorique attendue pour un spectre d'eau pris avec un VIPA présentant une FSR de 30 GHz.

Le tableau 3.1 résume les résultats de cette étude. Nous rapportons ici l'écart fréquentiel moyen entre le premier pic Stokes et le dernier pic anti-Stokes visible sur le détecteur pour différents nombres de courbes et différents ordres de polynôme pour interpoler la relation pixel-fréquence. Nous constatons que notre approche permet d'augmenter la précision de l'échelle en fréquence de manière significative, en l'occurrence ici, d'un facteur 8. Il est également intéressant de noter que l'utilisation d'une relation polynomiale d'ordre supérieur à 3 ne semble pas améliorer significativement la précision de l'échelle en fréquence. Il est par contre important de souligner que nous n'avons utilisé que des relations polynomiales pour approximer la relation pixel-fréquence. Rien n'impose cette limite à notre méthode, et nous examinerons dans les perspectives de cette thèse d'autres possibilités. Enfin, notre approche a permis d'estimer l'échelle en fréquence une seule fois pour les 10 courbes présentées, alors que l'état de l'art aurait effectué dix estimations séparées. Par conséquent, nous avons considérablement amélioré la rapidité de notre traitement en plus d'avoir amélioré son résultat.

	1 courbe Ordre 2 ⁴	10 courbes Ordre 2	10 courbes Ordre 3	10 courbes Ordre 4	10 courbes Ordre 5
Écart en fréquence	69.4 GHz	70.16 GHz	70.12 GHz	70.13 GHz	70.12 GHz
Écart à la théorie	0.97%	0.11%	0.057%	0.071%	0.057%

TABLE 3.1 – Tableau comparatif des précisions sur l'estimation de la relation pixel-fréquence d'un spectromètre VIPA pour différentes estimations de cette relation.

À l'issue de cette section, nous avons obtenu une nouvelle méthode pour établir l'échelle en

fréquence du spectrographe VIPA qui assure une stabilité de l'instrument. Cette méthode établie, nous pouvons maintenant poursuivre notre démonstration en nous intéressant cette fois-ci à l'extraction des informations des pics spectraux observés.

3.4 Traitement des spectres d'un spectromètre VIPA en présence de rayonnement élastique

En spectroscopie Brillouin, le principal défi rencontré est le faible niveau de signal Brillouin par rapport au niveau de signal du pic élastique. De nombreuses solutions physiques à ce problème sont présentées dans la littérature pour éteindre ce pic élastique. Nous trouvons ainsi des dispositifs faisant recours à des cellules d'absorption [93, 42, 94, 15, 95, 96, 51, 68], des étalons en réflexion [81], des interféromètres de Michelson [97], des systèmes d'interférence dans des lames de verre [98] ou encore des résonateurs optiques [99]. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser une cellule de Rubidium pour filtrer le signal diffusé de manière élastique. Ce choix induit des extinctions du pic élastique de l'ordre de 50 dB [42], donc généralement adapté à l'étude d'amas cellulaires.

En pratique cependant, il arrive que ces amas deviennent très diffusants. Dans ce cas, le rapport d'intensité du signal élastique sur le signal Brillouin devient très grand. Cela nous amène alors à revenir à l'étude faite en section 1.7 et concrètement, à redéfinir une valeur d'extinction minimale pour le spectromètre. Cette valeur étant souvent plus importante que celle d'un spectromètre VIPA classique, la littérature propose une variété de solutions : l'ajout d'une seconde cellule de gaz [95], la modification de la réponse indicielle du spectromètre par apodization [100], l'ajout de nouveaux éléments dispersifs dans le spectrographe VIPA [101], ou encore le renoncement pur et simple au spectromètre VIPA, au profit d'un instrument présentant naturellement un plus grand contraste : le tandem Fabry-Pérot [102, 103]. Dans cette section, nous présentons une nouvelle approche du problème : accepter la présence du pic élastique et venir modifier la manière dont nous extrayons les informations du spectre renvoyé par le spectromètre VIPA.

Pour mettre en place ce nouveau traitement, nous devons revenir à la réponse percussionnelle (Point Spread Function en anglais et PSF pour la suite du manuscrit) du spectromètre

à un signal lumineux. En reprenant alors la littérature [61], cette PSF devrait être une Lorentzienne, de la forme suivante :

$$\mathcal{L}_{\nu_0, \Gamma}(\nu) = \frac{(\Gamma/2)^2}{(\nu - \nu_0)^2 + (\Gamma/2)^2} \quad (3.5)$$

avec Γ la largeur à mi-hauteur de la fonction et ν_0 la position de son maximum. Notons que dans cette expression, la fonction a été normalisée en amplitude.

Le spectre obtenu en sortie de VIPA est alors la convolution de cette réponse indicielle par le spectre du signal. Le spectre du signal est composé de deux types de pics : un pic élastique, présentant le même spectre que celui du laser, une Lorentzienne, et les pics Brillouin dont nous avons défini la forme en section 1.4. La forme finale du spectre Brillouin que nous observerons sera donc une convolution de la Lorentzienne issue de la PSF du spectromètre par la somme de spectres d'oscillateurs harmoniques issus du signal Brillouin et la Lorentzienne du laser.

La figure 3.6a montre le spectre attendu lorsque le laser est complètement atténué, tandis que la figure 3.6b représente un cas où cela ne se produit pas. On remarque alors que les pics Brillouin n'ont pas la même forme dans les deux cas. Cela pose un problème pour extraire les données correctement. Dans nos expériences, nous obtenons souvent des spectres similaires à celui présenté dans la figure 3.6c. En effet, les échantillons biologiques sont très diffusants, et donc une plus grande quantité de rayonnement diffusé élastiquement atteindra le spectrographe. Le pic élastique résultant sur nos spectres étant une convolution de plusieurs fonctions Lorentzienne (celle du VIPA et celle du Laser), multipliées par le spectre d'absorption de la cellule de gaz, cela résultera en cette forme caractéristique d'un pic dans lequel apparaît un creux. Dans ces cas, nous pouvons alors remettre en question la précision que nous apportera la méthode classique de traitement des spectres.

En nous plongeant dans la méthode présentée par l'état de l'art, nous constatons que le problème vient de l'hypothèse qui est faite sur la ligne de base du pic Brillouin : l'état de l'art n'a à notre connaissance jamais proposé de la voir autrement que comme constante. Notre idée est donc d'ajuster cette ligne de base pour qu'elle corresponde au pic élastique réel.

Notons que la largeur de bande de la cellule de gaz et la forme de son pic d'absorption,

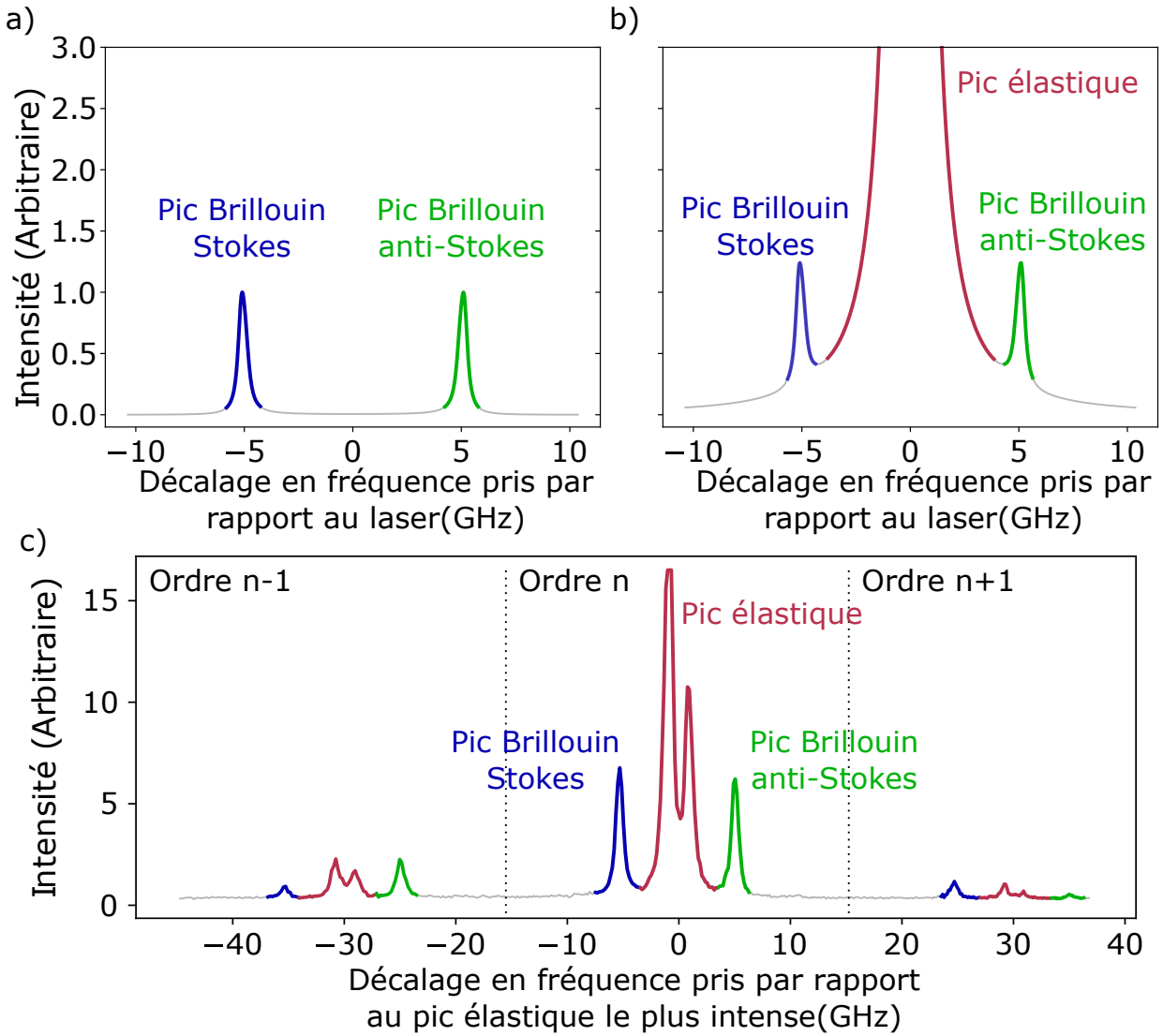


FIGURE 3.6 – Illustration d'un spectre où le pic élastique est mal éteint.

une Gaussienne, entraînent une forme du pic élastique au voisinage du pic Brillouin essentiellement identique à la forme d'une Lorentzienne. Étant donné que nous ne cherchons pas à éliminer complètement le pic élastique sur l'ensemble du spectre, mais seulement dans la région proche du pic Brillouin, nous pouvons donc considérer que le pic élastique reste une Lorentzienne, centrée en 0, de largeur la largeur de la PSF du spectrographe et d'amplitude l'intensité du rayonnement élastique avant filtrage. Autour du pic Brillouin, nous pouvons alors approcher le pic par une droite, ce qui revient à effectuer un développement de Taylor à l'ordre 1 du pic élastique autour du pic Brillouin. Ainsi, la fonction de fit proposée ne correspond plus strictement à une Lorentzienne, mais à la somme d'une Lorentzienne et d'une droite :

$$\mathcal{L}_{\nu_0, \Gamma}(\nu) = A \frac{(\Gamma/2)^2}{(\nu - \nu_0)^2 + (\Gamma/2)^2} + ax + b \quad (3.6)$$

La figure 3.7 illustre la différence entre l'approche classique, considérant une ligne de base

pour le fit du pic Brillouin constante, et notre approche, considérant une ligne de base pour le fit du pic Brillouin linéaire. Nous voyons ainsi clairement que sur cet exemple, notre approche est plus fidèle au spectre simulé.

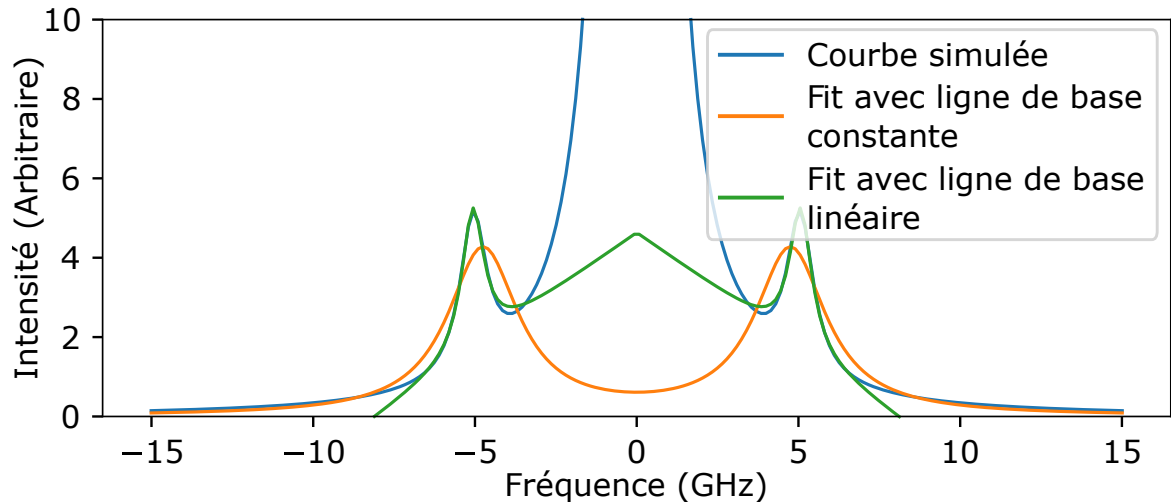


FIGURE 3.7 – Intérêt d'une fonction de fit avec ligne de base non constante. Spectre simulé (en bleu) d'un signal Brillouin où la composante élastique est prédominante, sur lesquels nous venons fitter deux fonctions Lorentzienne (en orange), en suivant ainsi l'état de l'art, et la somme de deux fonctions Lorentzienne présentant une ligne de base linéaire (en vert).

La figure 3.8 présente le fit d'un spectre expérimental obtenu avec notre instrument sur un échantillon d'eau ultrapure thermalisée. Cette figure montre que notre approche fonctionne non seulement dans le cas de spectres simulés mais aussi et surtout pour des spectres réels.

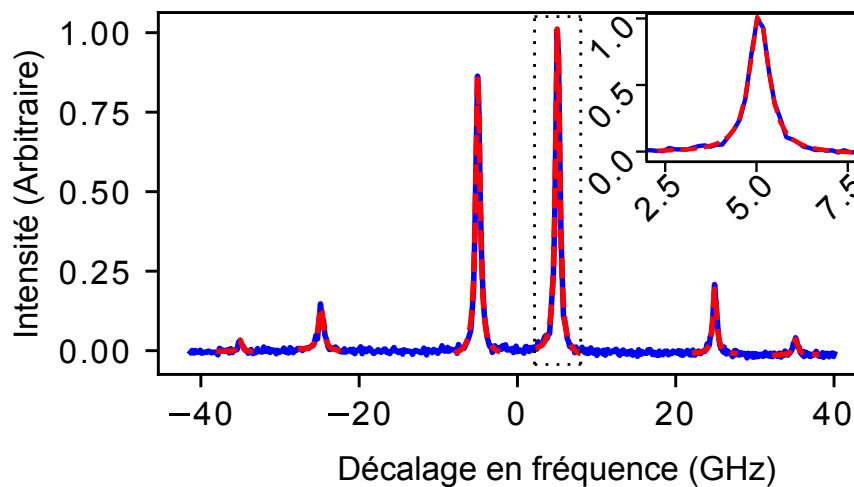


FIGURE 3.8 – Qualité du fit d'une lorentzienne sur un spectromètre VIPA fibré par fibre multimode

La figure 3.9 quantifie l'apport de cette nouvelle méthode. Nous simulons ici des séries de

spectres d'eau présentant différents rapports d'intensité du pic élastique sur l'intensité des pics Brillouin. Nous supposons que chacun de ces spectres a été obtenu avec un objectif d'ouverture 0.65. L'élargissement des spectres est ainsi pris en compte, en suivant Antonacci *et al.* [30]. Nous supposons également que notre spectromètre VIPA présente un pouvoir de résolution de $\mathcal{R}_0 = 7.6.10^5$, une valeur usuelle pour ce type d'instrument, choisi pour que la largeur à mi-hauteur de la PSF du spectrographe soit de 500 MHz. Chaque spectre est fitté avec la méthode de l'état de l'art et la méthode présentée ici.

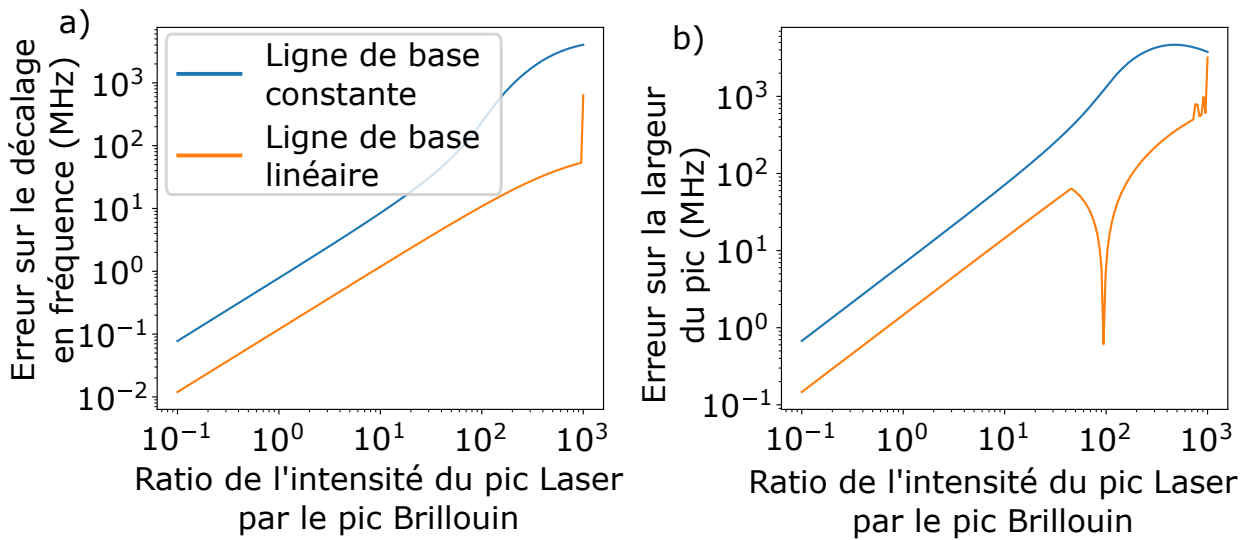


FIGURE 3.9 – Comparaison des précisions de fit d'un pic Brillouin avec et sans prise en compte de la ligne de base. a) Comparaison des précisions d'un fit classique et d'un fit avec ligne de base non constante sur le décalage en fréquence. b) Comparaison des précisions d'un fit classique et d'un fit avec ligne de base non constante sur la largeur de pic.

La figure 3.9a donne ainsi l'erreur faite sur le décalage en fréquence par rapport à un spectre sans rayonnement élastique, en l'absence de bruit sur les courbes⁵, et en fonction du rapport d'intensité du pic élastique sur le pic Brillouin. Cette figure montre qu'à précision donnée, notre méthode permet l'utilisation de spectres présentant un rapport d'intensité 6 à 22 fois plus importante que la méthode de l'état de l'art. Nous pouvons alors interpréter cet effet comme une extinction virtuelle du pic élastique à 5 GHz. Dans ce cas, notre méthode résulte en une extinction efficace du laser de 13 dB supérieur au spectromètre VIPA, soit environ 43 dB. La figure 3.9b suit le même raisonnement pour la largeur du pic. Nous trouvons ainsi une extinction virtuelle allant jusqu'à 11 dB, résultant en une extinction efficace du spectromètre VIPA d'environ 41 dB

5. Cette caractéristique explique pourquoi les deux méthodes ne convergent en apparence pas vers la même valeur. Lorsqu'un bruit est introduit, les deux méthodes convergent bien vers une précision dictée par le ratio signal à bruit.

Notre méthode nous permet donc d'améliorer l'extinction efficace de l'instrument de plus de 10 dB, sans modifier le système. Cette valeur est à mettre en relation avec les autres modes d'extinction. Le tableau 3.2 donne ainsi les ordres de grandeur retrouvés dans la littérature pour les différentes méthodes mentionnées en début de section. Nous voyons ainsi que l'extinction effective apportée par notre méthode reste faible devant les méthodes existantes. Cependant, elle ne modifie en rien le spectromètre et n'affecte que peu le traitement pour un gain qui, même s'il est faible comparé aux autres méthodes, a le mérite d'exister.

Méthode de filtrage	Spectromètres à plusieurs VIPA [101]	Apodization [100]	Utilisation d'un étalon comme filtre de Notch [81]
Extinction	25 dB par VIPA ajouté	40 dB	10 dB par réflexion sur l'étalon ⁶
Méthode de filtrage	Utilisation d'une lame de verre [98]	Interféromètre de Michelson [97]	Cellule de gaz [76]
Extinction	50 dB	35 dB	50 dB

TABLE 3.2 – Tableau comparatif des extinctions du pic élastique par différentes méthodes proposées dans la littérature

Avant de clore cette section, notons que la section précédente et celle-ci introduisent de fait un nouvel algorithme de traitement des spectres d'interférence retournés par un spectrographe VIPA. L'application de cet algorithme nous amène à la question de sa complexité algorithmique et au temps de calcul associé. La littérature ne propose qu'une seule valeur de référence pour ce traitement : 10 ms avec l'utilisation d'un GPU [53]. Notre méthode nous donne, elle, une vitesse de 10 ms par spectre, avec un CPU (Intel Core i7-10850H). Notre méthode n'est donc pas seulement plus précise, elle est également aussi rapide que l'état de l'art, avec un instrument de calcul moins performant.

En conclusion, les résultats de la section précédente et de celle-ci nous amènent à un instrument plus stable, plus précis et plus adapté à l'étude d'échantillons biologiques, sans complexifier l'instrument, et en gardant une vitesse de traitement égale à ce que propose l'état de l'art.

Nous pouvons maintenant nous pencher sur la caractérisation expérimentale de l'instrument,

6. Mais perte d'environ 7% de transmission par réflexion

et en particulier sa stabilité.

3.5 Caractérisation de la stabilité de l'instrument

Ce chapitre a débuté en établissant une nouvelle valeur de référence pour la stabilité d'un laser diode η_{laser} en conditions expérimentales. Cette valeur s'exprime en longueur d'onde du laser par unité de temps, ou en décalage en fréquence du laser par unité de temps et en suivant les résultats présentés en section 3.1, vérifie :

$$\eta_{laser} < 500 \text{ MHz/mois} \quad (3.7)$$

Nous avons ensuite montré en section 3.3 qu'il était possible d'établir un unique axe en fréquence pour un ensemble de courbes prises avec un spectrographe VIPA donné. En utilisant alors ce même axe de fréquence et la méthode de traitement présentée en section précédente, nous pouvons étudier un même échantillon de calibration et regarder l'évolution de ses propriétés mesurées. Sur l'étude la plus longue réalisée sur cette thèse, soit 12 jours de mesures consécutifs, nous avons pu établir une fidélité de la mesure à $\pm 11 \text{ MHz}$ sur le décalage en fréquence. Cette approche nous permet alors d'établir un temps caractéristique de stabilités d'instrument τ_{VIPA} minimal de :

$$\tau_{VIPA} \geq 12 \text{ jours} \quad (3.8)$$

Notons que cette borne est obtenue en considérant la plus longue expérience continue effectuée sur cette thèse, et demanderait donc une étude plus poussée pour quantifier avec précision les dérives de l'instrument, et ses temps caractéristiques de stabilités. Il est probable que la stabilité effective de l'instrument soit bien supérieure à cette valeur.

À partir de cette stabilité, nous pouvons alors nous intéresser au premier critère de fidélité du spectromètre : le passage d'une échelle en pixel au passage à une échelle en fréquence. Nous avons présenté en section 3.3, un estimateur de ce paramètre en quantifiant l'exactitude commise en observant la distance fréquentielle entre deux pics dont le décalage est connu. Nous avons en l'occurrence choisi un pic Stokes Brillouin et un pic anti-Stokes Brillouin sur un spectre obtenu sur un échantillon d'eau ultrapure, espacés de deux ordres. L'estimateur est alors la distance relative entre ces deux pics à la valeur théorique. En reprenant ici

ce critère, et en le notant $\varepsilon_{pixel-frequence}$, nous pouvons établir la référence suivante sur la relation pixel-fréquence :

$$\varepsilon_{pixel-frequence} < 0.15\% \quad (3.9)$$

Grâce à notre approche de traitement, nous avons également amélioré l'extinction effective de notre instrument. L'extinction d'un spectromètre VIPA standard est d'environ -30 dB à 5 GHz [101, 100]. En venant y ajouter les 50 dB d'extinction fournis par la cellule de Rubidium et en suivant les calculs présentés dans la section 3.4, nous obtenons une extinction effective à 5 GHz, notée $e_{5\text{GHz},eff}$:

$$e_{5\text{GHz},eff} = -90 \text{ dB} \quad (3.10)$$

Pour conclure cette caractérisation de l'instrument, nous devons maintenant quantifier l'exactitude de la mesure. Pour ce faire, nous utilisons deux échantillons tests : de l'eau ultrapure thermalisée et une cuvette de polystyrène thermalisée.

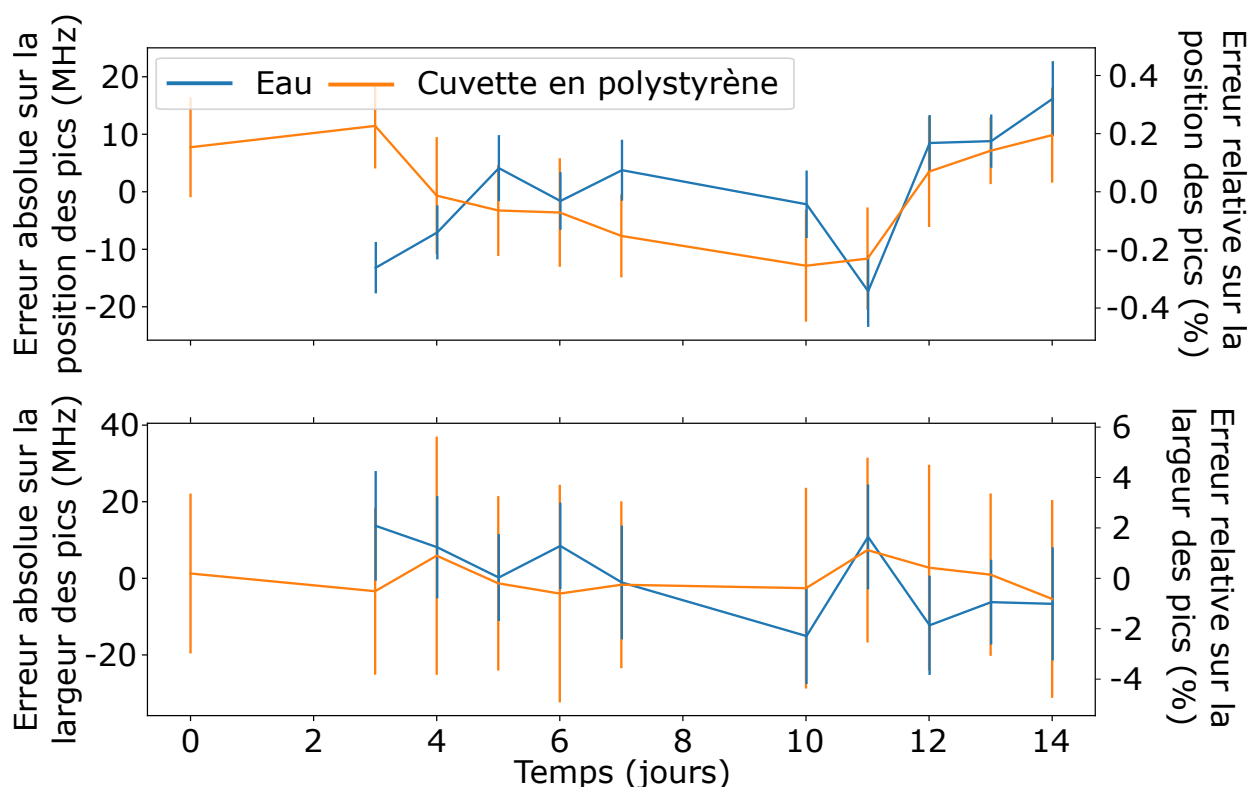


FIGURE 3.10 – Stabilité du spectrographe VIPA à temps court et long. En bleu : mesure d'un échantillon d'eau. En orange : mesure d'un échantillon de polystyrène. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type sur 50 mesures d'un échantillon. L'axe d'erreur relative correspond à l'erreur relative faite par rapport à la moyenne des valeurs enregistrées pour l'eau. La courbe du haut montre les écarts à la moyenne faits en décalage en fréquence et la courbe du bas, les écarts à la moyenne faits en largeur de pic. Pour le premier jour de mesure, se reporter à⁸.

La figure 3.10 donne le résultat de cette étude. Chaque échantillon est mesuré 50 fois par jour pendant 10 jours sur 12 jours consécutifs (deux semaines de mesures sauf les week-ends). Chaque mesure se fait avec un temps d'intégration de 100 ms, nous permettant d'atteindre un rapport signal à bruit supérieur à 20 dB, comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Un unique axe de fréquence est alors établi pour les 1000 spectres issus de cette étude. Pour chaque spectre, une valeur de décalage en fréquence et de largeur de pic est extraite. L'évolution de la moyenne de ces valeurs est représentée en trait plein, en bleu pour l'eau et en orange pour la cuvette. L'écart-type des 50 spectres d'un même échantillon pris sur une journée apparaît sous la forme d'une barre d'erreur. Un second axe vertical est alors ajouté pour illustrer l'erreur relative faite sur les mesures d'eau, prise par rapport à la moyenne de tous les spectres recueillis pour cet échantillon (soit 450 mesures). Notons que ces erreurs relatives sont très légèrement différentes des valeurs relatives pour la cuvette. Cependant, ces écarts sont négligeables face aux variations observées et nous pouvons sans trop d'erreurs, considérer que l'axe de droite s'applique également pour les valeurs tirées des mesures sur la cuvette. Nous obtenons alors une fidélité sur le décalage en fréquence de chaque mesure individuelle des échantillons de calibration $\varepsilon_{\Delta\nu,abs,jour}$ en moyenne égale à :

$$\varepsilon_{\Delta\nu,abs,jour} < 5 \text{ MHz} \quad (3.11)$$

et une fidélité sur la largeur des pics de chaque mesure individuelle des échantillons de calibration $\varepsilon_{\Delta\Gamma}$ en moyenne égale à :

$$\varepsilon_{\Delta\Gamma,abs,jour} < 20 \text{ MHz} \quad (3.12)$$

Soit en valeur relative pour le décalage en fréquence $\varepsilon_{\Delta\nu,rel,jour}$ et en largeur de pic $\varepsilon_{\Delta\Gamma,rel,jour}$:

$$\begin{cases} \varepsilon_{\Delta\nu,rel,jour} < 0.2\% \\ \varepsilon_{\Delta\Gamma,rel,jour} < 3\% \end{cases} \quad (3.13)$$

Et de la même manière, sur deux semaines de mesure, nous obtenons des fidélités absolues (respectivement relative) de décalage en fréquence $\varepsilon_{\Delta\nu,abs,semaine}$ (respectivement $\varepsilon_{\Delta\nu,rel,semaine}$)

8. Le premier jour de mesure de l'échantillon d'eau n'est pas inclus, car la valeur moyenne obtenue sur le shift indique qu'une erreur a été commise sur l'échantillon mesuré (≈ 5.4 GHz contre ≈ 5.1 GHz attendu et observé sur les autres jours de mesure).

et de largeur de pic $\varepsilon_{\Delta\Gamma,abs,semaine}$ (respectivement $\varepsilon_{\Delta\nu,abs,semaine}$) de :

$$\begin{cases} \varepsilon_{\Delta\nu,abs,semaine} = 11 \text{ MHz} \\ \varepsilon_{\Delta\nu,rel,semaine} = 0.4\% \\ \varepsilon_{\Delta\Gamma,abs,semaine} = 16 \text{ MHz} \\ \varepsilon_{\Delta\Gamma,rel,semaine} = 3\% \end{cases} \quad (3.14)$$

Pour remettre ces valeurs en contexte, nous proposons ici de reprendre le comparatif présenté par Antonacci *et al.* [1], que nous rapportons en tableau 3.3. Différentes configurations de spectromètres Brillouin sont comparées. Dans le cadre de notre étude, nous nous limiterons à l'étude des précisions sur le décalage en fréquence.

Technique utilisée pour collecter un spectre Brillouin	Exactitude sur le décalage en fréquence des pics
Diffusion Brillouin Stimulée (SBS) [104, 105, 106]	12 MHz
Diffusion Brillouin pulsée (ISBS) [107, 108]	0.4 MHz
Spectromètre VIPA confocal [109, 110, 44, 111, 112, 74, 75, 38]	8 – 16 MHz
Line-Scan [52]	10 MHz
Tandem Fabry-Pérot Confocal [103, 113]	< 10 MHz
Notre approche (court terme \approx 1 heure)	5 MHz
Notre approche (long terme \approx 10 jours)	11 MHz

TABLE 3.3 – Tableau comparatif des précisions spectrales de divers spectromètres Brillouin extraites de l'étude d'Antonacci *et al.*[1] (haut). Résultats de notre approche (bas).

Sur le court terme, notre spectromètre se comporte comme un spectromètre VIPA confocal. Ce comportement est attendu, car, comme nous le développerons dans le prochain chapitre, notre instrument est techniquement un spectromètre VIPA confocal. Sur le long terme, ses performances deviennent légèrement moins bonnes que celles des spectromètres VIPA confocaux, et que l'ensemble des techniques présentées dans ce tableau. Ce défaut apparent doit cependant être contrasté, car aucune des techniques présentées dans le tableau ne permet de faire des mesures sur une dizaine de jours sans calibration.

3.6 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons exploré la question de la stabilité d'un spectromètre VIPA, un sujet qui n'avait, à notre connaissance, jamais été abordé dans la littérature. Nous avons identifié deux sources d'instabilité : le laser, qui entraîne des fluctuations du signal, et le spectrographe, qui provoque des instabilités lors du traitement des données. Étant donné

que notre système utilise une diode laser, nous avons d'abord présenté une méthode de stabilisation de la diode laser sans nécessiter de mesure directe, ce qui nous a permis d'obtenir une stabilité suffisante sur au moins un mois.

Ensuite, nous nous sommes penchés sur le spectrographe VIPA et avons constaté que son instabilité pouvait être corrigée par un traitement approprié. Nous avons alors développé ce traitement, en venant d'abord travailler sur la relation entre le spectre d'interférence obtenu par le VIPA et le spectre fréquentiel du signal. Nous avons ensuite présenté une nouvelle approche pour l'extraction des données contenues dans les spectres Brillouin, améliorant l'extinction effective de notre dispositif. Comparé à l'état de l'art, notre traitement s'est révélé non seulement plus performant, mais également plus rapide.

En dernière partie de ce chapitre, nous avons caractérisé la stabilité de notre instrument, fournissant ainsi, pour la première fois à notre connaissance, des valeurs de référence de stabilité pour un spectromètre VIPA.

Chapitre 4

Dimensionnement du microscope confocal en imagerie Brillouin confocale

La microspectroscopie Brillouin est une technique prometteuse en biologie, car elle permet d'obtenir des informations mécaniques à partir de mesures optiques. Cependant, son utilité est limitée par le faible niveau de signal du phénomène de diffusion Brillouin et par l'efficacité des instruments de mesure. Dans le chapitre précédent, nous avons examiné ces deux paramètres et étudié le spectrographe VIPA fibré par fibre multimode, une version plus lumineuse du spectrographe VIPA fibré par fibre monomode, afin d'observer les spectres de diffusion Brillouin. Cependant, l'un des problèmes de ces spectrographes est leur stabilité limitée dans le temps, ce qui nous a conduits à étudier et corriger les principales sources d'instabilité dans le chapitre précédent.

Ce chapitre se concentre sur l'application de notre dispositif à l'analyse des amas cellulaires. Les amas cellulaires sont des agrégats de cellules organisées en boules dont la taille dépend du nombre de cellules présentes. Dans ce chapitre, nous examinerons des amas issus de lignées cellulaires dont les cellules présentent des diamètres typiques de 10 à 20 microns. Dans notre cas, les amas observés comporteront environ un millier de cellules, ce qui conduira à une taille finale d'amas d'environ 100 microns. Pour simplifier nos mesures, nous nous concentrerons sur un plan médian de l'amas et l'étudierons en utilisant la technique d'*imagerie Brillouin*. Nous choisirons alors une échelle de mesure nous permettant d'identifier les cellules unitaires.

L'imagerie Brillouin repose sur l'utilisation d'un système d'imagerie et d'un spectrographe capable de résoudre les spectres obtenus. Dans notre cas, le spectrographe utilisé sera le

spectrographe VIPA fibré par fibre multimode, ce qui signifie que le système d'imagerie sera connecté au spectrographe par une fibre multimode. Afin de comprendre l'impact de ce changement, nous devons revenir sur les contraintes du système d'imagerie. Ces contraintes sont liées à l'échelle spatiale à laquelle nous souhaitons effectuer les mesures. Dans la littérature, la spectroscopie Brillouin est principalement utilisée pour étudier le lien potentiel entre les propriétés mécaniques et biologiques à différentes échelles : subcellulaire [111, 114, 115], cellulaires [116, 117, 118, 83] et multicellulaire [119, 43, 82, 120, 95]. Pratiquement, l'échelle spatiale est fixée par la résolution spatiale du système d'imagerie, qui dépend de deux facteurs : la manière dont l'échantillon est illuminé et la manière dont le signal est collecté. Dans notre contexte, nous ne nous intéresserons qu'à des amas cellulaires volumiques.

Au regard de nos besoins, soit une résolution spatiale de l'ordre de 5 microns, nous sommes invités à utiliser le microscope comme système d'imagerie. Un microscope moderne est composé, comme le montre la figure 4.1 de deux éléments : un objectif pour collecter un signal provenant d'un échantillon et une lentille de tube (respectivement un oculaire) pour focaliser le plan focal de l'objectif sur le détecteur (respectivement pour envoyer le plan focal à l'infini et ainsi permettre une observation à l'œil nu).

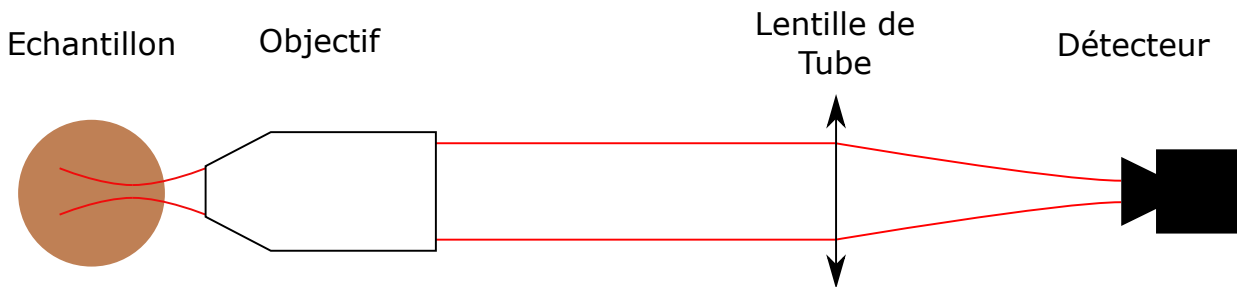


FIGURE 4.1 – Schéma d'un microscope moderne composé d'un objectif et d'une lentille de tube.

Cependant, dans cette configuration, seule l'illumination contraint le volume observé, et la détection ne modifie pas ce volume. Afin de contraindre le volume d'observation, il est nécessaire de passer à un système dit *confocal*, dans lequel le détecteur présente une taille très limitée. Cela permet de supprimer la lumière en dehors du plan focal et ainsi de réduire le volume d'observation. Plus la taille du détecteur est petite, plus le volume d'observation est réduit et plus la résolution spatiale est élevée. Dans le cas d'un détecteur de taille nulle, la résolution spatiale théorique atteint la limite de diffraction d_{lim} , définie par le critère de Rayleigh, qui dépend de l'ouverture de l'objectif NA et de la longueur d'onde de la lumière

utilisée λ :

$$d_{lim} = 1.22 \frac{\lambda}{2NA} \quad (4.1)$$

Il est important de noter que la limite de diffraction dépend de l'ouverture de l'objectif, mais pas de la taille du détecteur. Par conséquent, la résolution spatiale dépend de deux paramètres : l'ouverture de l'objectif, qui détermine la limite de diffraction, et la taille du détecteur, qui situe la résolution spatiale par rapport à cette limite de diffraction. Cela nous amène à envisager différentes configurations de taille de détecteur et d'ouverture d'objectif pour obtenir une résolution spatiale donnée. Cette observation constitue l'idée centrale de ce chapitre : démontrer qu'en contexte d'imagerie confocale Brillouin, la configuration optimale du système d'imagerie n'est pas toujours une configuration amenant à la limite de diffraction.

Par conséquent, le dimensionnement du système d'imagerie confocal est au cœur de ce chapitre. Pour approcher ce dimensionnement, nous partirons du dimensionnement d'un système confocal en fonction de la résolution spatiale. Dans le but d'optimiser cette approche, nous étudierons également la puissance transmise, mettant ainsi en évidence le compromis entre la puissance transmise et la résolution spatiale. Nous présenterons ensuite une nouvelle approche de la microspectroscopie confocale Brillouin qui ne compromet pas la fidélité des mesures tout en accélérant le processus d'acquisition des données. Nous présenterons alors la première application qualitative de cette approche en biologie, qui consistera à identifier les amas cellulaires par leur morphologie sur une image Brillouin. Cette analyse nous conduira enfin à la première application quantitative de notre approche : l'étude mécanique du développement d'amas cellulaires creux.

4.1 Résolution axiale en microscopie confocale

La microscopie confocale est un type de microscopie où la résolution spatiale d'un microscope est définie par l'utilisation d'un filtre spatial [121]. Ce filtre spatial est obtenu en pratique soit avec une ouverture de géométrie donnée, soit avec une fibre optique [122]. L'ajout de cet élément, qu'il s'agisse d'une ouverture ou d'une fibre optique, réduit l'impact des faisceaux lumineux provenant des plans en dehors du plan focal, ce qui détermine un volume d'observation distinct de celui sans filtre. La théorie de la microscopie confocale se fonde sur le calcul de la réponse percussionnelle du système (point spread function en anglais ou PSF

pour le reste du manuscrit). Cette réponse caractérise la forme du volume collecté. Ce calcul peut soit s'effectuer théoriquement[123], en considérant tous les points de l'espace objet, et en calculant leur intensité observée à travers l'ouverture, soit expérimentalement [124], en observant l'intensité d'une particule fluorescente placée à différents points de l'espace.

La figure 4.2 donne une représentation du volume illuminé en configuration confocale, obtenue par l'utilisation du software *PSFLab*, version 3.5, un logiciel développé sur la base des résultats de l'article de Nasse *et al.*[123]. Cette figure représente le volume illuminé dans une hypothèse de géométrie cylindrique. Nous représentons ici un plan médian de l'illumination, et traçons cette illumination en fonction des variables r pour le rayon et z pour l'axe optique. Le calcul de la PSF d'un système confocal est en pratique rarement effectué. En effet, si le système confocal utilise une faible taille de détecteur, alors cette PSF est essentiellement définie par une Gaussienne. Si au contraire la taille de détecteur grandit, nous nous limitons alors à la taille caractéristique du volume suivant l'axe d'observation. Cette taille correspond généralement à la largeur à mi-hauteur de la distribution d'intensité du volume illuminé, le long de l'axe optique. Nous nommons cette largeur à mi-hauteur $FWHM_{conf}$ en figure 4.2.

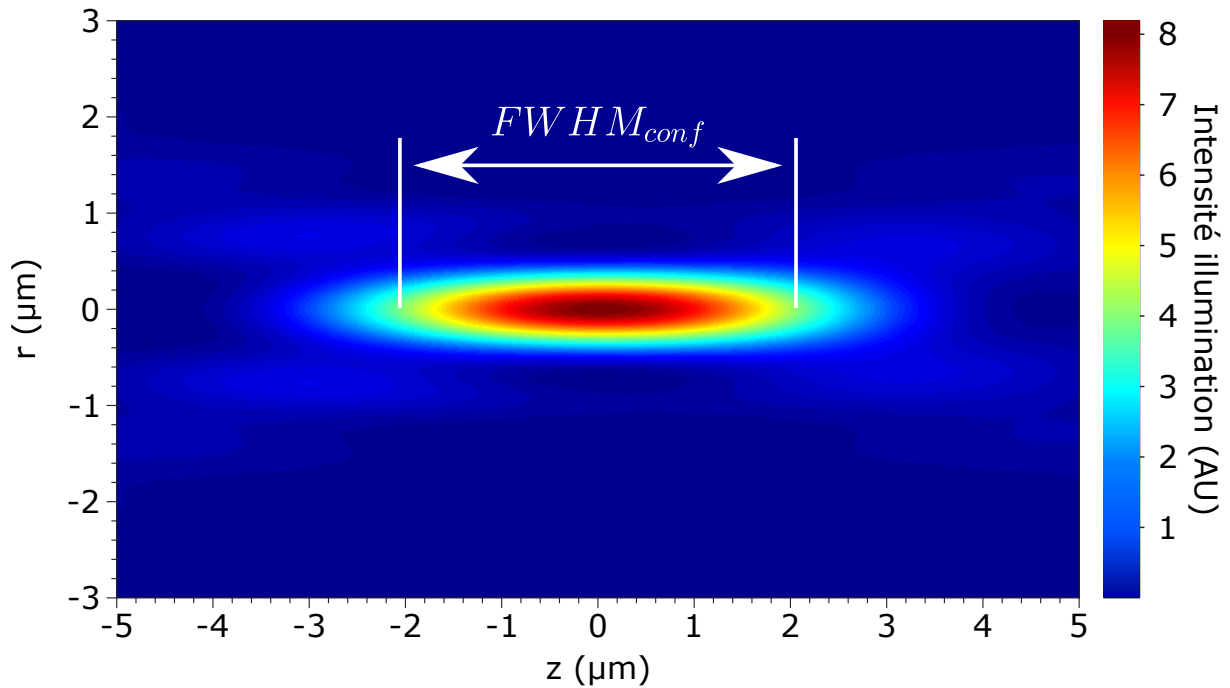


FIGURE 4.2 – Volume illuminé en configuration confocale.

L'évaluation de la résolution axiale d'un système confocal est un problème déjà traité dans la littérature pour une ouverture circulaire [125, 126]. Elle dépend en pratique de la taille

relative de l'ouverture à la tâche de diffraction, nommée "tâche d'Airy" et qui sera exprimée en termes d'unité d'Airy AU . Une formule analytique simple, dérivée des calculs complexes de volume, permet d'approcher cette résolution axiale par une fonction de l'ouverture numérique NA de l'objectif, et de la taille de l'ouverture $d_{ouverture}$, prise relativement à celle de la figure de diffraction. Pour des tailles d'ouvertures de l'ordre de la tâche d'Airy, la résolution axiale s'approche par :

$$FWHM_{conf} = 0.67 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \sqrt[3]{1 + 1.47 \left(\frac{d_{ouverture}}{AU} \right)^3} \quad (4.2)$$

avec n l'indice de réfraction du milieu observé.

Dans la littérature, le dimensionnement d'un microscope confocal, tout au moins pour la microspectroscopie Brillouin, n'utilise que l'ouverture numérique de l'objectif comme degré de liberté. Or, en reprenant l'équation 4.2, nous voyons un deuxième degré de liberté apparaître : le ratio de la taille de détecteur sur la taille d'une unité d'Airy. Nous pouvons donc utiliser ce deuxième degré de liberté pour proposer un nouveau dimensionnement du microscope confocal.

La figure 4.3a schématise le lien entre la diffraction du faisceau lumineux sur la pupille de l'objectif et l'apparition de la tâche de diffraction, sur laquelle est indiquée la grandeur correspondante à une unité d'Airy. Nous voyons alors que géométriquement, la tâche d'Airy se caractérise par un angle de divergence θ du front d'onde diffracté, focalisé par la lentille de tube de focale f_{TL} sur le détecteur. La figure obtenue est une figure de diffraction.

La figure 4.3b est une simulation d'une figure de diffraction usuelle. Nous avons ici indiqué ce que représente une unité d'Airy (Airy Unit en anglais ou AU). En analysant le schéma de la figure 4.3a, nous obtenons une écriture du diamètre de la tâche d'Airy AU :

$$AU = 2 * f_{TL} \tan \theta \quad (4.3)$$

avec $\theta \approx \sin \theta \approx \tan \theta$ (dans l'approximation des petits angles) et $\sin \theta \approx 1.22\lambda/d_{objectif}$ par le critère de Rayleigh. Dans cette dernière expression, $d_{objectif}$ définit la taille de la pupille

de l'objectif¹. On obtient alors :

$$AU \approx 2 * 1.22 \frac{f_{TL}\lambda}{d_{objectif}} = 1.22 \frac{f_{TL}\lambda M_{objectif}}{NA f_{TL,constructeur}} \quad (4.4)$$

avec $M_{objectif}$ la magnification de l'objectif et $f_{TL,constructeur}$ la distance focale de la lentille de tube du constructeur de l'objectif.

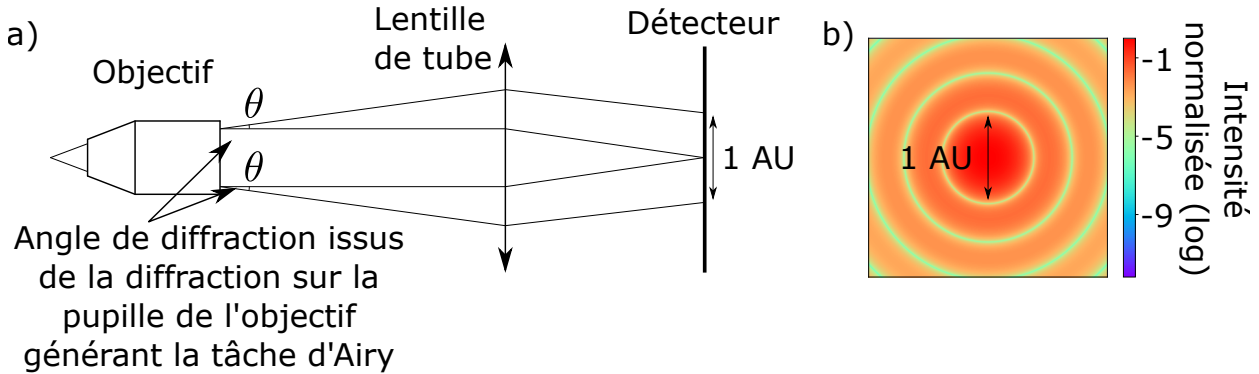


FIGURE 4.3 – Illustration de l'apparition de la tâche d'Airy dans un microscope. a) La pupille de taille finie de l'objectif induit une diffraction qui résulte en l'apparition d'une figure d'interférence. b) Répartition de l'intensité lumineuse sur une tâche d'Airy de dimension arbitraire.

Ainsi, la résolution axiale du microscope dépendra de l'ouverture de l'objectif, et du rapport de la taille du détecteur sur l'unité d'Airy :

$$\frac{d_{ouverture}}{AU} = \frac{d_{ouverture} NA f_{TL,constructeur}}{1.22 f_{TL}\lambda M_{objectif}} \quad (4.5)$$

Notons alors que trois degrés de liberté se détachent dans le dimensionnement de la résolution axiale du microscope $FWHM_{conf}$ par l'équation 4.2 :

- Le choix de l'objectif, qui dictera l'ouverture numérique de l'objectif NA , la focale de la lentille de tube du constructeur $f_{TL,constructeur}$ et la magnification de l'objectif $M_{objectif}$
- Le choix de la lentille de tube f_{TL}
- Le choix de la taille physique de l'ouverture $d_{ouverture}$

Notons alors qu'il est pertinent, au regard de l'équation 4.5, d'introduire une nouvelle va-

1. La pupille d'un objectif est liée à sa distance focale $f_{objectif}$ et à son ouverture numérique NA : $d_{objectif} = 2NAf_{objectif}$. La distance focale de l'objectif est déterminée par la magnification de l'objectif $M_{objectif}$ et la distance focale de la lentille de tube du constructeur de l'objectif $f_{TL,constructeur}$: $f_{objectif} = f_{TL,constructeur}/M_{objectif}$

riable $ratio = d_{ouverture}/f_{TL}$ pour réunir les deux derniers degrés de liberté utilisables dans le dimensionnement.

La figure 4.4 compare la résolution axiale de différentes configurations du microscope confocal, au sens de la largeur à mi-hauteur $FWHM_{conf}$ donnée par l'équation 4.2, en faisant ainsi intervenir les trois degrés de liberté : l'objectif choisi, la lentille de tube et la taille du détecteur. Ces deux derniers paramètres sont réunis en la grandeur $ratio$. Dans cette figure, nous comparons les résolutions pour différents objectifs qui imageront dans l'air (nous avons utilisé la série LMPLN-IR/LCPLN-IR d'Olympus en tant qu'exemple). Cette figure montre qu'une même résolution axiale est atteignable par différents objectifs, en choisissant judicieusement la lentille de tube et le diamètre de l'ouverture. Notons en particulier que si la taille de l'ouverture est fixée, la limite de diffraction d'un objectif, obtenue pour de très petites ouvertures, peut être théoriquement atteinte en choisissant un objectif de plus grande ouverture et en ajustant la distance focale de la lentille de tube.

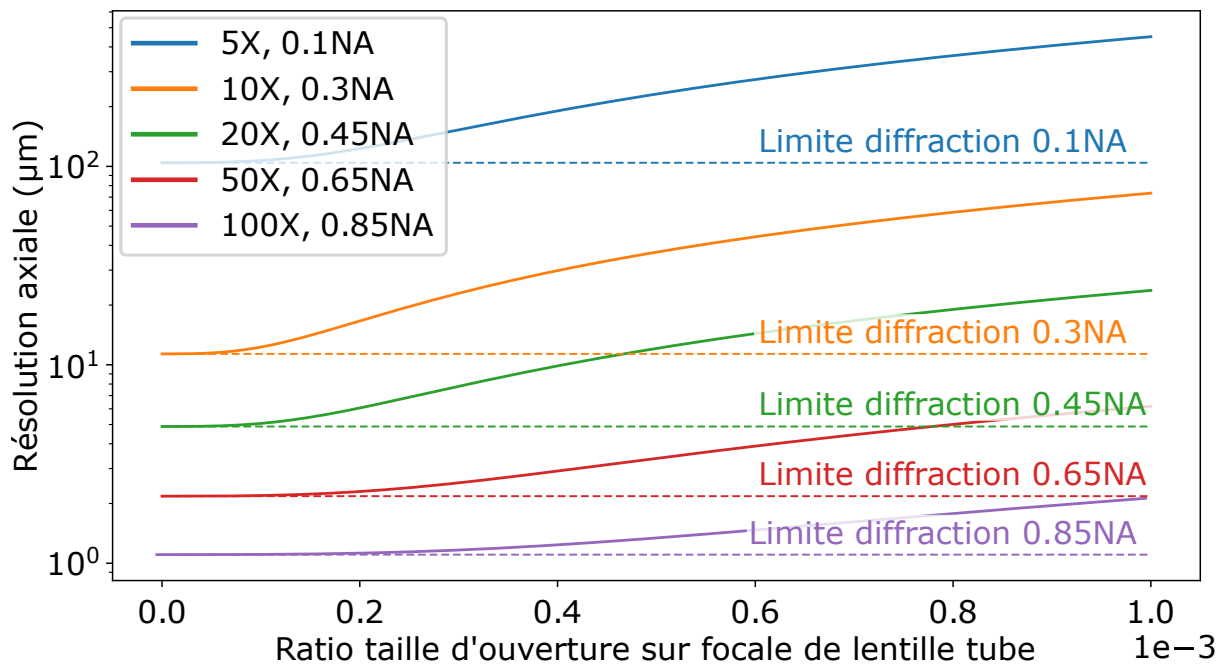


FIGURE 4.4 – Comparatif des résolutions de microscopes confocaux pour différents objectifs et différentes ouvertures, à 780 nm.

Au terme de ce développement, nous avons donc une nouvelle approche du dimensionnement d'un système d'imagerie confocal pour la microspectroscopie confocale Brillouin. Ce système nous donne 3 degrés de liberté indépendants :

- L'objectif

- La lentille de tube
- La taille du détecteur (ou la taille de la fibre optique)

Donnée une fibre optique, nous aurons donc la possibilité de choisir indépendamment, pour une résolution axiale souhaitée, l'objectif et la lentille tube. Ces différentes configurations étant essentiellement équivalentes du point de vue de la résolution spatiale, nous pouvons maintenant nous intéresser à leur intérêt en termes de puissance lumineuse couplée.

4.2 Puissance couplée en microscopie confocale et intérêt dans les spectromètres Brillouin fibrés

Nous avons constaté qu'il est possible de dimensionner la résolution spatiale d'un microscope confocal en utilisant trois degrés de liberté : l'objectif, la focale de la lentille de tube et la taille du détecteur. Maintenant, nous souhaitons guider le choix de ces composants en prenant en compte l'impact de ces degrés de liberté sur la puissance lumineuse couplée à travers le détecteur, qui, dans notre cas, sera une fibre optique.

La puissance lumineuse couplée est définie par une intégrale sur le volume de l'espace objet du produit du profil d'illumination et de la réponse percussionnelle de l'instrument. Étant donné que ce calcul est trop complexe pour être traité dans ce manuscrit, nous présentons en Annexe A.7 un raisonnement visant à le simplifier. Ce raisonnement aboutit à deux conclusions :

- La puissance couplée dépend uniquement du rapport de la taille du détecteur à la tâche de diffraction, et à la distribution d'intensité de l'illumination. Elle ne dépend en particulier pas du volume éclairé.
- La prise en compte de la distribution d'intensité de l'illumination complexifie l'étude. Si elle est négligée, et qu'une distribution d'intensité d'illumination homogène est choisie, alors le modèle surévaluera la puissance couplée pour les faibles tailles d'ouvertures.

L'approche usuelle en microspectroscopie Brillouin étant d'utiliser de très petits détecteurs, le modèle que nous développerons dans cette partie aura pour but d'évaluer l'intérêt d'utiliser de plus grands détecteurs. Au regard des deux points ci-dessus, nous pouvons donc choisir

de considérer un modèle très simple, où l'illumination est considérée homogène. Par ce choix nous sous-estimerons donc sciemment les gains en termes de puissance couplée qu'apportent l'utilisation de grands détecteurs.

Dans notre approche, le détecteur sera une fibre optique. La géométrie du détecteur sera donc circulaire. Nous modéliserons donc ici la puissance couplée à travers un détecteur circulaire par l'intégrale de la tâche de diffraction sur sa surface. Cette puissance s'écrit :

$$P(v_d) = P_0 \int_0^{v_d} \left[\frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right]^2 2\pi\nu d\nu = 1 - J_0^2(v_d) - J_1^2(v_d) \quad (4.6)$$

avec P_0 la puissance du signal collecté, J_0 et J_1 les fonctions de Bessel de première espèce et d'ordres respectifs 0 et 1 et v_d la taille de détecteur exprimé en unités d'Airy, en reprenant la définition de cette grandeur donnée en équation 4.4.

La figure 4.5 est un tracé de $P(v_d)$ en fonction de la taille de l'ouverture v_d . Il apparaît que la puissance du signal couplé croît avec v_d . En pratique, v_d se calcule en effectuant le rapport de la taille physique du détecteur, que nous considérerons dans notre cas être le cœur de la fibre, par l'unité d'Airy, donnée en équation 4.4. Par conséquent, l'optimisation de la puissance du signal collecté passe par l'augmentation de v_d , ce qui se traduit soit par l'augmentation de la taille physique du détecteur (ce qui revient à choisir une fibre de plus gros cœur) à unité d'Airy donnée, soit par la diminution de la tâche d'Airy à taille de détecteur donnée.

Ainsi, pour optimiser la configuration du système d'imagerie confocal en termes de puissance couplée, nous devons essayer de maximiser la taille du détecteur. Afin de clarifier cette idée, la figure 4.6 donne, pour différents objectifs, et pour une gamme de taille d'ouverture, l'estimation de la puissance couplée en fonction de la résolution axiale. Les limites de diffraction des objectifs sont tracées en pointillés. Cette figure met en lumière l'existence de différentes configurations identiques du point de vue de leur résolution axiale, mais où l'une des configurations est beaucoup plus avantageuse du point de vue de l'intensité collectée.

Cette figure confirme que la configuration optimale, du point de vue de la puissance couplée, d'un système d'imagerie confocal pour une résolution spatiale donnée, passera par le choix d'un objectif de grande ouverture et d'une grande taille de détecteur.

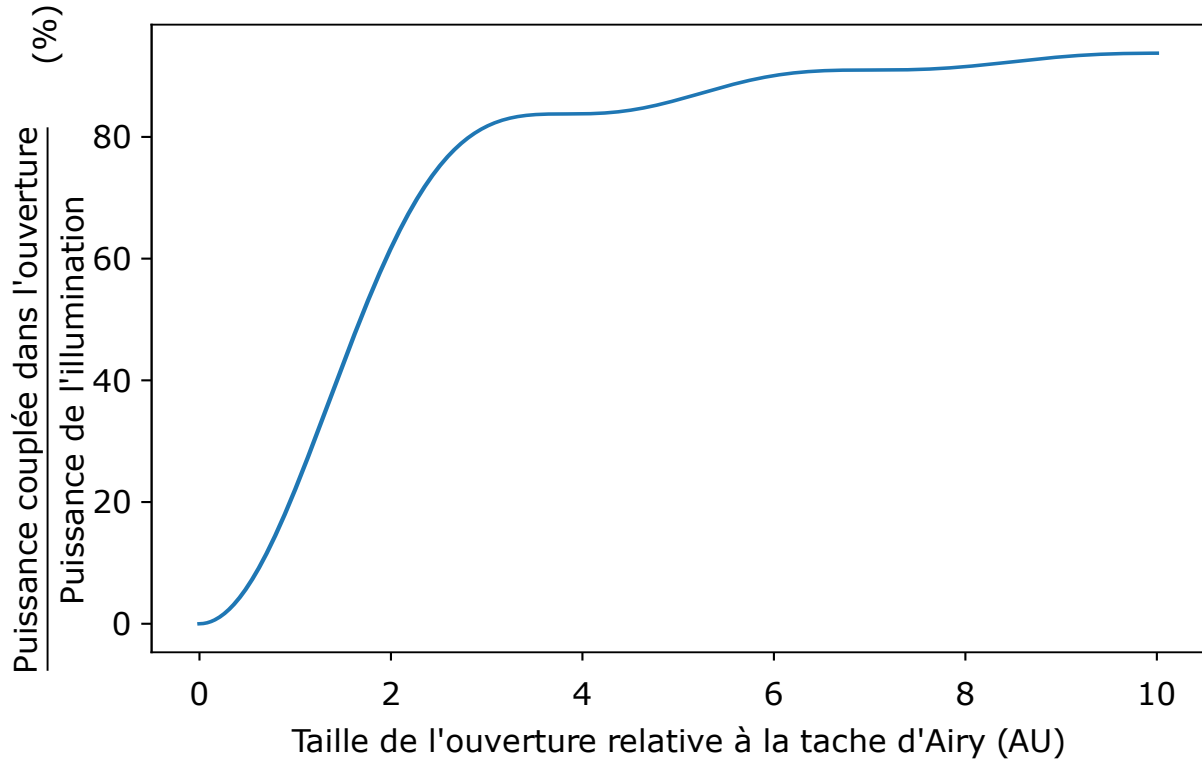


FIGURE 4.5 – Couplage de la puissance d’un signal issu d’un point source dans un microscope confocal en fonction de la taille de l’ouverture pour une ouverture sphérique.

Cependant, le choix d’un objectif à grande ouverture numérique entraîne l’élargissement des pics, comme nous l’avons expliqué dans la section 1.4. Un compromis existe donc entre la quantité de signal souhaitée et la résolution spectrale pour une résolution axiale donnée. Ce compromis est particulièrement limitant lorsque l’on veut s’intéresser à la largeur des pics de diffraction Brillouin. Dans ce cas, notre approche reste applicable du moment que l’anisotropie de l’échantillon est négligeable. Si l’anisotropie n’est pas négligeable, l’élargissement des pics ne sera pas uniforme et il sera impossible de remonter à la largeur réelle du pic Brillouin initial. Notons que si l’anisotropie est effectivement négligeable, le traitement présenté dans le chapitre 3 nous permettra d’obtenir une mesure relative d’échantillons entre eux, mais non pas une mesure absolue de la largeur du pic. Dans ce dernier cas, un traitement plus complexe doit être appliqué, ce qui sera discuté dans les perspectives de cette thèse.

En pratique, les spectromètres Brillouin utilisent souvent une fibre optique pour relier le microscope confocal et le spectrographe. Ce choix impose une nouvelle condition à notre étude : le couplage dans la fibre. Cette étude est déjà présente dans la littérature [127] et montre que le paramètre de fibre² entre en compétition avec l’accroissement de la taille relative

2. Cette grandeur a été introduite en chapitre 2. Elle se définit comme le produit du module du vecteur

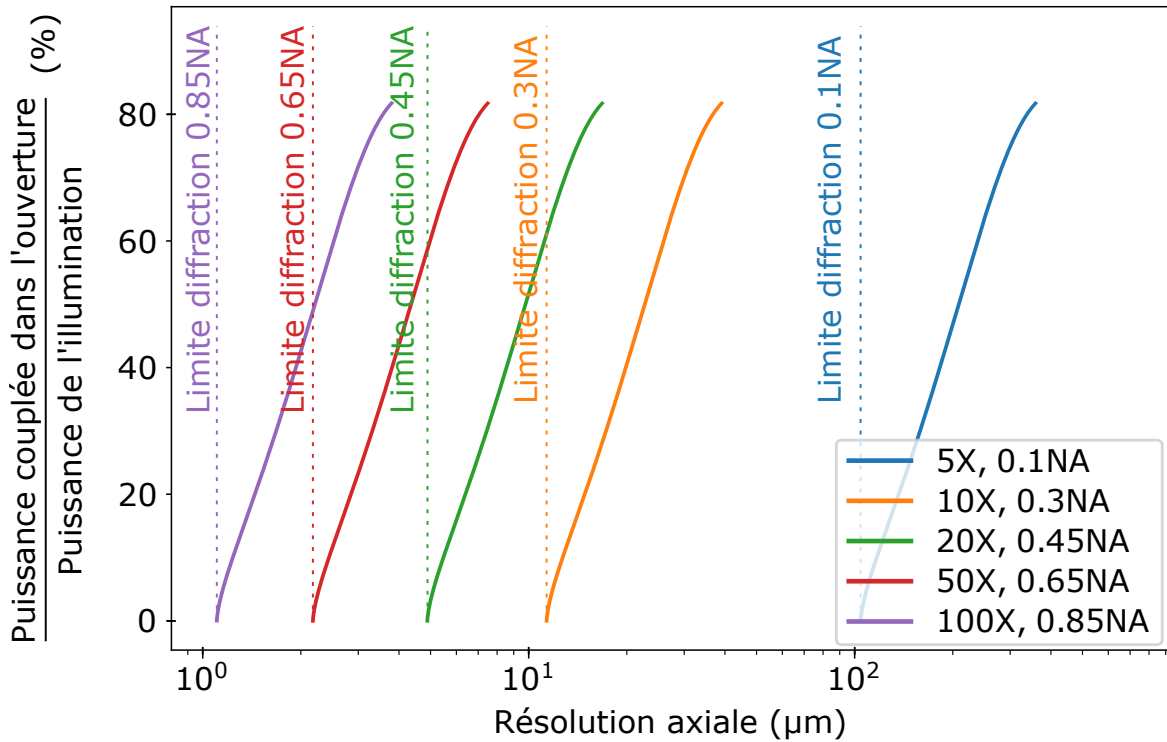


FIGURE 4.6 – Couplage de l'intensité d'un signal issu d'un point source dans un microscope confocal en fonction de sa résolution axiale. Notons que nous n'avons tracé nos courbes que pour des tailles d'ouvertures permettant de faire l'approximation présentée en [126], à savoir des ouvertures de taille inférieure à $3AU$.

d'ouverture. En pratique, pour une fibre optique donnée, il existe un maximum de couplage correspondant à une taille d'ouverture. Cela peut se comprendre schématiquement en soulignant qu'une fibre optique a une ouverture finie, et donc une étendue finie. Le diamètre de la tâche de diffraction, ou l'unité d'Airy, étant fixé par le choix de l'objectif, il en résulte que pour de très petites ouvertures, la divergence du faisceau nécessaire pour atteindre le bon ratio entre taille d'ouverture et tâche de diffraction devient très grande. Cela se traduit alors en une condition d'étendue minimale pour le faisceau. Lorsque cette étendue dépasse celle de la fibre optique, une partie du signal est nécessairement perdu, par le principe de conservation de l'étendue. Dans ce cas, il est nécessaire de choisir une fibre optique de plus grande étendue, c'est-à-dire une fibre optique transportant plus de modes (par l'équation 2.3). Dans le cas où le faisceau est analysé par un spectromètre VIPA, cela suppose donc la possibilité d'analyser le faisceau grâce à un spectrographe VIPA fibré par fibre multimode, ce que nous avons montré possibles au chapitre 2.

En conclusion, nous avons démontré que le dimensionnement du système d'imagerie d'un

d'onde, du rayon de la fibre et de son ouverture numérique. Une présentation plus complète de ce paramètre peut être trouvée dans [56]

spectromètre VIPA pour la microspectroscopie Brillouin confocale peut être réalisé en se basant sur la résolution axiale, comme nous l'avons discuté dans la section précédente. Cette approche consiste à utiliser des objectifs à grande ouverture numérique et des détecteurs de grande taille (ce qui pour un spectrographe fibré revient à utiliser des fibres optiques de grand cœur) pour optimiser la puissance du signal collecté. Cependant, cela rend l'utilisation d'une fibre optique multimode nécessaire. Ainsi, l'approche de dimensionnement que nous avons proposée dans cette section et la section précédente suppose l'utilisation d'un instrument couplé à une fibre multimode, tel qu'un spectrographe VIPA. Dans le chapitre 2, nous avons démontré qu'un tel instrument était réalisable et fonctionnel. Il est important de noter que bien que cet instrument repose sur les mêmes principes de base, il diffère des instruments présentés dans l'état de l'art. Par conséquent, nous pouvons maintenant évaluer ses performances réelles en effectuant des mesures sur un échantillon de calibration.

4.3 Caractérisation d'un spectromètre VIPA dimensionné par sa résolution spatiale

Le compromis entre la résolution axiale et la transmission de puissance en microscopie confocale établie par les deux premières sections de ce chapitre nous invite à revoir le dimensionnement du spectromètre VIPA pour l'étude du spectre Brillouin. Cette approche peut être présentée en un dimensionnement du système d'imagerie par sa résolution axiale, avec le but d'optimiser le couplage de puissance dans le spectrographe VIPA. Dans cette section, nous choisissons de dimensionner notre système pour obtenir une résolution axiale de l'ordre de $5\mu m$, soit une taille inférieure à la taille d'une cellule.

Pour obtenir une résolution axiale d'environ $5\mu m$, la figure 4.6 suggère un choix entre deux options : utiliser un objectif de 20x avec limite de diffraction ou un objectif de 50x ou 100x avec une grande taille de détecteur. Pour minimiser l'élargissement des pics du signal causé par l'ouverture numérique de l'objectif, nous choisirons un objectif de 50x. Le rapport entre l'ouverture et la focale de la lentille de tube peut alors varier entre 0 et 8.10^{-4} pour notre résolution cible, en reprenant la figure 4.4. Si nous choisissons de coupler le faisceau dans une fibre optique monomode, alors nous nous retrouverons avec une taille de cœur d'environ $5\mu m$. En suivant alors notre raisonnement, cette taille de cœur forcera l'utilisation d'une lentille de tube de focale comprise entre 6.25 mm, pour garantir un ratio inférieur à 8.10^{-4}

et 7.7 mm pour ne pas perdre de signal [128]. Au-delà de la difficulté à obtenir ces optiques, ce choix contraindra à la fois l'alignement du système optique et sa stabilité.

Pour toutes ces raisons, nous choisirons donc ici une fibre optique multimode présentant un cœur de $25\mu\text{m}$ de diamètre, fibre pour laquelle nous avons déjà établi dans les précédents chapitres la compatibilité avec le spectrographe VIPA. La focale minimale de la lentille de tube, déterminée par la valeur maximale souhaitée du ratio, est de 30 mm^3 . À la lumière de cette limite, nous choisissons une lentille tube de 50 mm de focale. En reprenant alors les figures 4.4 et 4.6, nous nous attendons alors à obtenir une résolution axiale de l'ordre de $3\mu\text{m}$ et un ratio d'intensité couplé de l'ordre de 50% de l'illumination, en considérant un point source. Pour compléter le spectromètre, nous utiliserons ici le spectrographe présenté en chapitre 2 de ce manuscrit, avec le dimensionnement présenté en section 2.6.

L'étude d'Antonacci *et al.* [30] prévoit que l'ouverture numérique de l'objectif affecte et la largeur des pics, et leur position sur le détecteur. Son étude propose une évaluation du déplacement relatif des pics en fonction de l'ouverture de l'objectif de collection. En prenant alors en compte le décalage des pics dû à l'élargissement des spectres, et en le corrigeant grâce aux prévisions de l'étude d'Antonacci *et al.*[30], nous pouvons juger de la justesse de notre système, en imageant un échantillon de calibration.

En fin de chapitre 3, nous avons présenté une étude de la stabilité du spectrographe. Cette étude partait du principe que le signal observé était invariant dans le temps, et cela était obtenu en imageant un échantillon d'eau thermalisée à 37°C . À ce moment, nous ne nous étions intéressés qu'à la stabilité de l'instrument, et donc nous n'avions pas commenté les valeurs retournées. La figure 4.7 reprend ainsi cette étude, mais sous une autre forme. En figure 4.7a, les spectres individuels sont présentés, sur l'échelle en fréquence obtenue par la méthode présentée en chapitre 3. Sur ces spectres, deux régions hachurées représentent les points où le niveau de signal peut être négligé, et où il est donc possible d'étudier le bruit, pour en déduire une mesure du rapport signal à bruit. En figure 4.7b et 4.7c, nous traçons les distributions des valeurs de décalage en fréquence et largeur des pics de l'eau, retournés au terme de l'application du traitement présenté en chapitre 3.

3. La limite haute n'est pas calculée, car elle est bien au-delà des tailles envisageables dans un système confocal

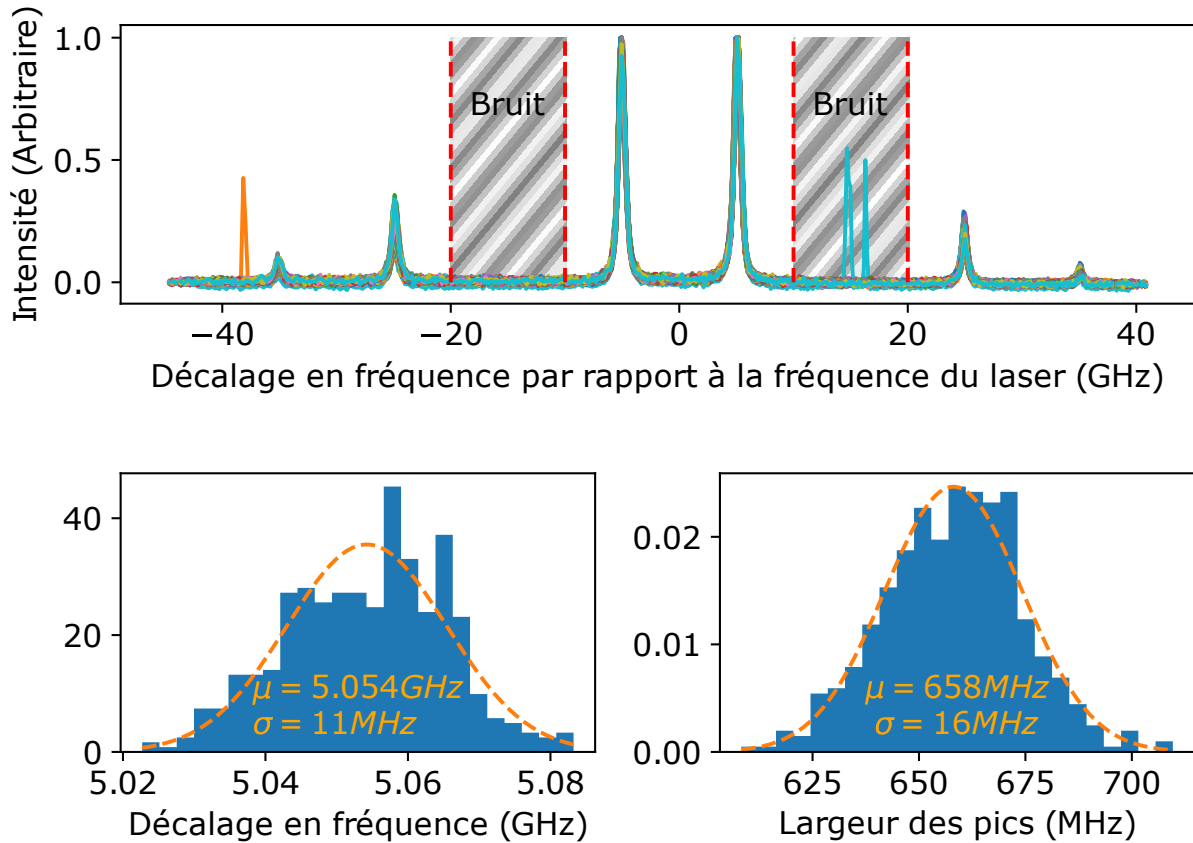


FIGURE 4.7 – Analyse de la fidélité du spectromètre VIPA sur un échantillon d'eau thermalisé. a) Spectres obtenus, ramenés à un unique axe en fréquence en suivant la méthode décrite en chapitre 3. L'estimation du bruit sur les signaux se fait sur les régions hachurées. Les spectres ont tous été normalisés pour présenter un niveau moyen de bruit nul et une intensité maximale unitaire. b) Mesures des décalages en fréquences (points bleus) et valeur moyenne des 50 mesures (ligne pleine rouge).

La valeur du décalage en fréquence de l'eau retournée est de $5.054 \text{ GHz} \pm 11 \text{ MHz}$. À notre ouverture numérique, l'étude d'Antonacci *et al.* prévoit un décalage des pics de 1.015% [30]. La valeur corrigée que nous observons est donc de $5.14 \text{ GHz} \pm 11 \text{ MHz}$. La valeur théorique attendue après les calculs du chapitre 1 est de 5.18 GHz . Cela représente une erreur entre la valeur mesurée et la valeur théorique de moins de 1%. En considérant que la valeur théorique correspond bien à l'échantillon que nous observons, la justesse de notre instrument est donc de 40 MHz , une valeur acceptable qui finit de caractériser l'exactitude de notre spectromètre.

Concernant la rapidité du dispositif, il est en général conseillé de choisir, dans un instrument confocal, une taille de détecteur comprise entre 0.5 AU et 1 AU pour obtenir le meilleur compromis entre résolution spatiale et niveau de signal. En comparant alors notre configuration à cette approche "classique", nous devrions collecter entre 5 et 10 fois plus de signal en reprenant la figure 4.5. Ce niveau de signal se traduira alors en un plus grand ratio signal

à bruit (Signal to Noise ratio en anglais ou SNR), et donc en une plus grande précision de mesure. Ainsi, nous pouvons interpréter cette rapidité sous la forme d'un temps d'acquisition à précision donnée. Afin de caractériser cette vitesse, nous poussons l'analyse de la fidélité de la mesure d'un échantillon d'eau, en effectuant cette fois-ci une série de mesure sur de l'eau thermalisée, à différents temps d'intégration, allant de 1 ms à 1 s. À chaque temps d'intégration, 50 spectres sont acquis et traités, et un écart-type sur les valeurs extraites (décalage en fréquence et largeur des pics) est alors dégagé. Cet écart type sera dans cette approche l'estimateur de l'erreur commise sur les mesures. La figure 4.8 illustre cette étude : chaque point correspond à l'écart type sur les 50 mesures des décalages en fréquence et largeurs de pics des pics Brillouin de l'échantillon d'eau thermalisée observée. Dans l'hypothèse où le bruit de photon est prédominant, nous sommes supposés retrouver un écart-type proportionnel à la racine carrée du temps d'acquisition. Sur la figure 4.8, cela devrait donc entraîner l'apparition d'une droite de coefficient directeur $a = -0.5$. Cette droite est fittée sur nos données, et le résultat nous permet d'affirmer que nous sommes bien en régime de bruit de photon, jusqu'à des temps de 10ms.

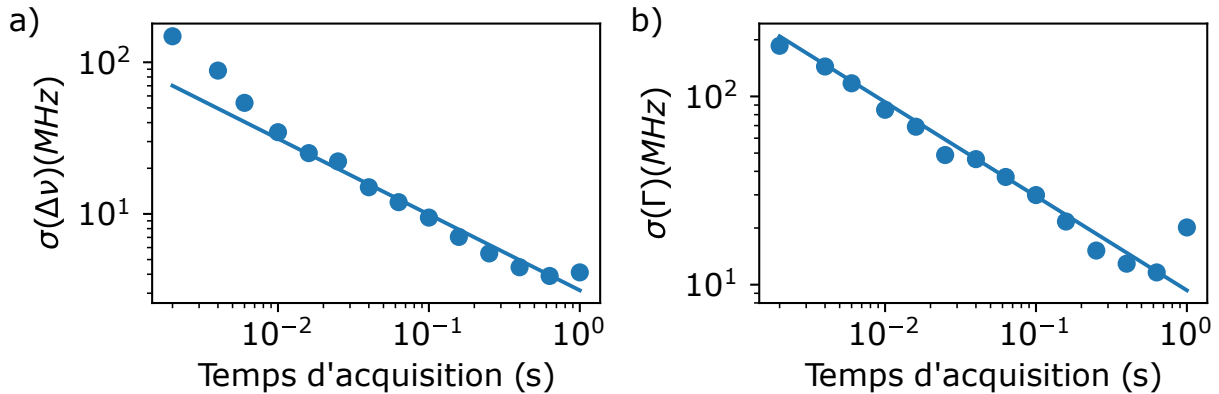


FIGURE 4.8 – Écart type des mesures de décalage en fréquence et largeur des pics Brillouin pour différents temps d'exposition. a) Écart type sur le décalage en fréquence des pics. b) Écart type sur la mesure de la largeur des pics

Dans cette hypothèse, le niveau de signal à bruit est indépendant du détecteur, car le bruit de détecteur peut être négligé devant le bruit de photon. Dans notre configuration, nous obtenons une précision de 10 MHz sur le décalage en fréquence d'un échantillon d'eau ultrapure en 50 ms. Il est difficile de positionner rigoureusement cette valeur à l'état de l'art du fait du trop grand nombre de paramètres à prendre en considération. Cependant, cette valeur est dans les temps d'acquisition les plus courts que nous rencontrons dans la littérature. À

titre d'exemple, nous rappelons ici quelques valeurs représentatives des ordres de grandeur retrouvés pour des spectromètres VIPA dans la littérature :

- Scarcelli et Yun [119] : 200ms - 1s
- Edrei *et al.* [129] : 100ms
- Schlusser *et al.* [75] : 500ms
- Correa *et al.* [130] : 1s - 4s
- Zhang *et al.* [39] : 50ms

Les temps d'exposition rapportés dans la littérature varient considérablement, et notre approche se distingue comme l'une des plus rapides. En examinant cependant de plus près les études existantes pour comprendre la provenance des différences de vitesse constatées, nous observons qu'aucune d'entre elles ne donne de valeur pour le ratio de taille du détecteur sur taille de tâche de diffraction. En estimant cette taille à partir des descriptions des microscopes confocaux utilisés, une grande diversité apparaît, avec dans certains cas, des tailles de détecteur calculées inférieures à 0.5 AU : la limite où la résolution axiale cesse d'augmenter. Nous sommes ainsi amenés à constater que le dimensionnement du microscope confocal n'est pas un paramètre de dimensionnement dans les études utilisant la microspectroscopie Brillouin confocale. Cela conduit directement à une perte de luminosité des instruments, et donc à des temps d'exposition longs.

Le temps de mesure représente un critère fondamental dans l'analyse biologique, car il influence directement l'applicabilité des techniques d'analyse, la biologie étudiant des systèmes en mouvement permanent. Lorsque la spectroscopie Brillouin est ainsi envisagée pour remplacer des techniques d'analyse établies, ces longs temps d'expositions deviennent limitants voire prohibitifs pour certaines applications en biologie. Dans le cadre de cette thèse, nous cherchons à imager des échantillons relativement massifs, pour lesquels la résolution spatiale peut être dégradée. L'application de l'approche que nous présentons à travers ce chapitre permet donc en pratique d'accélérer nos mesures, et ainsi d'étudier des phénomènes soit très rapides, soit de manière statistiquement plus intéressante que ne le permettait l'approche de l'état de l'art. Nous allons à présent donner un exemple d'application concret de notre dispositif, et imager la morphologie d'amas cellulaires par microspectroscopie Brillouin.

4.4 Identification de la morphologie d'amas cellulaires

Au cours des précédents chapitres et sections, nous avons montré comment dimensionner des spectromètres Brillouin fiables, stables et rapides, en partant d'une résolution axiale souhaitée. Cette démarche présente un intérêt particulier dans les études où les hétérogénéités de signal Brillouin apparaissent sur des échelles plusieurs fois supérieures à la longueur d'onde du laser utilisé. La morphologie des amas cellulaires fait partie de ces applications et présente un grand intérêt en biologie, en particulier sur un type d'amas cellulaire particulier : l'organoïde creux (amas acinaires ou ductaux). L'organoïde creux est un amas cellulaire où les cellules sont organisées autour d'une région vidée de cellule, généralement constitué de cellules épithéliales, rencontré en particulier dans les glandes. Sa morphologie très particulière est nécessaire pour sa fonction, et une modification de cette morphologie indique souvent l'apparition d'une pathologie. Ce type d'échantillon est ainsi particulièrement étudié dans la carcinogenèse des cellules dont ils dérivent [131, 132, 133, 134].

Aujourd'hui, l'identification *in vitro* d'une de ces structures se fait généralement par un expert, sur la base d'une image en champ clair. A titre d'exemple, nous donnons en figure 4.9, trois images d'amas de lignées différentes : H6C7 (lignée de cellules de pancréas saines), WPE1-NB26 (lignée de cellule de prostate cancéreuses), RWPE1 (lignée de cellules de prostate saines). Ces amas peuvent acquérir une structure creuse au cours de leur croissance, et un oeil expert reconnaît une structure creuse en figure 4.9a. Pour ce qui est des amas de la figure 4.9b et c, il semblerait que les amas soient pleins. Notons que ces estimations nécessitent tout de fois une expertise pour l'identification de morphologies d'amas par une image en champ clair que le grand public n'a pas.

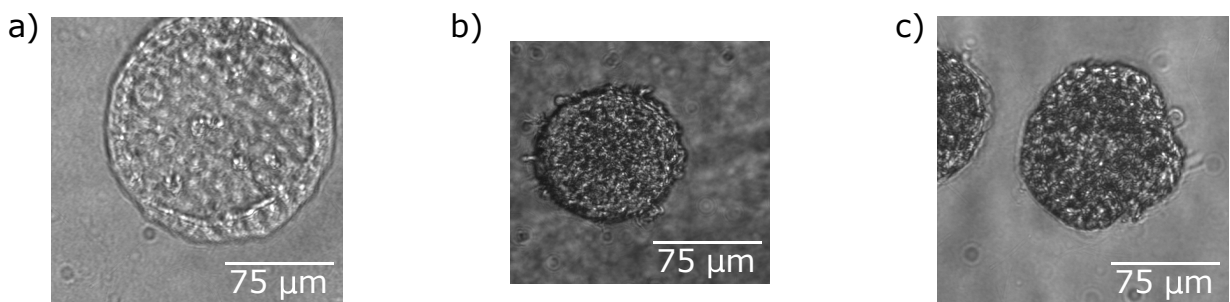


FIGURE 4.9 – Exemples d'images en champ clair d'amas creux et pleins. a) Organoïde ductal (amas creux) de pancréas (lignée H6C7) fixé. b) Tumoroïde (amas plein) de pancréas (lignée WPE1-NB26) vivant. c) Organoïde acinaire (amas creux) de prostate (lignée RWPE1) vivant.

En figure 4.9a, un expert arrive à reconnaître et à identifier correctement la présence d'une couronne de cellules au plan focal de l'objectif, et la présence d'autres cellules à des plans situés soit au dessus, soit en dessous du plan focal. Pour les figures 4.9b et c, cela est moins marqué et l'expert conclura donc que la figure 4.9a correspond à un amas creux alors que les figures 4.9b et c correspondent à des amas pleins. L'identification de l'expert se base sur l'existence, au plan focal, sur l'absence de cellules dans l'amas. Cette information morphologique peut également être obtenue en marquant les cellules puis en observant l'amas par fluorescence [132], mais suppose de devoir marquer les amas et donc de potentiellement affecter leur développement. Ce marquage suppose également une étape supplémentaire de manipulation des amas.

La spectroscopie Brillouin semble capable d'obtenir ces informations sans marquage et sans contact. En effet, il est possible de reconnaître la présence de cellules dans un milieu donné en observant ses propriétés mécaniques [83, 135, 82, 136, 137]. Ainsi, cette technique semble adaptée à l'obtention de cartes morphologiques d'amas. Afin de l'implémenter, nous avons choisi de dimensionner notre système en prenant une résolution spatiale en accord avec les échelles présentées en figure 4.9a, soit environ $5\mu m$. L'appareil a ensuite servi à imager plusieurs centaines d'amas, dont ceux présentés en figure 4.9. Chaque image d'amas est obtenue par un balayage de points au plan focal de l'objectif. Pour chaque point de mesure, un spectre Brillouin est obtenu et traité. De ce traitement, deux paramètres sont extraits : le décalage en fréquence et la largeur des pics. Ainsi, il est possible de reconstituer deux images : une image du décalage en fréquence et une image de la largeur des pics. La figure 4.10 présente ainsi les images Brillouin obtenues pour les amas présentés en figure 4.9.

Nous voyons que l'amas identifié comme creux par l'expert en figure 4.9a apparaît sur l'image du décalage en fréquence (figure 4.10a) comme creux. L'image de la largeur des pics (figure 4.10d) est un peu plus bruitée mais montre aussi la présence du creux. L'amas de la figure 4.9b apparaît quant à lui plein, tant sur l'image du décalage en fréquence (figure 4.10b) que sur l'image en largeur de pic (figure 4.10e), plein. Cependant, pour l'amas de la figure 4.9c, l'identification de l'expert est mise en défaut par l'étude Brillouin qui montre la présence d'un creux tant sur la figure des décalages en fréquence (figure 4.10c) que sur la figure des largeurs de pics (figure 4.10f).

Cette étude illustre la capacité de la spectroscopie Brillouin à identifier de manière fiable,

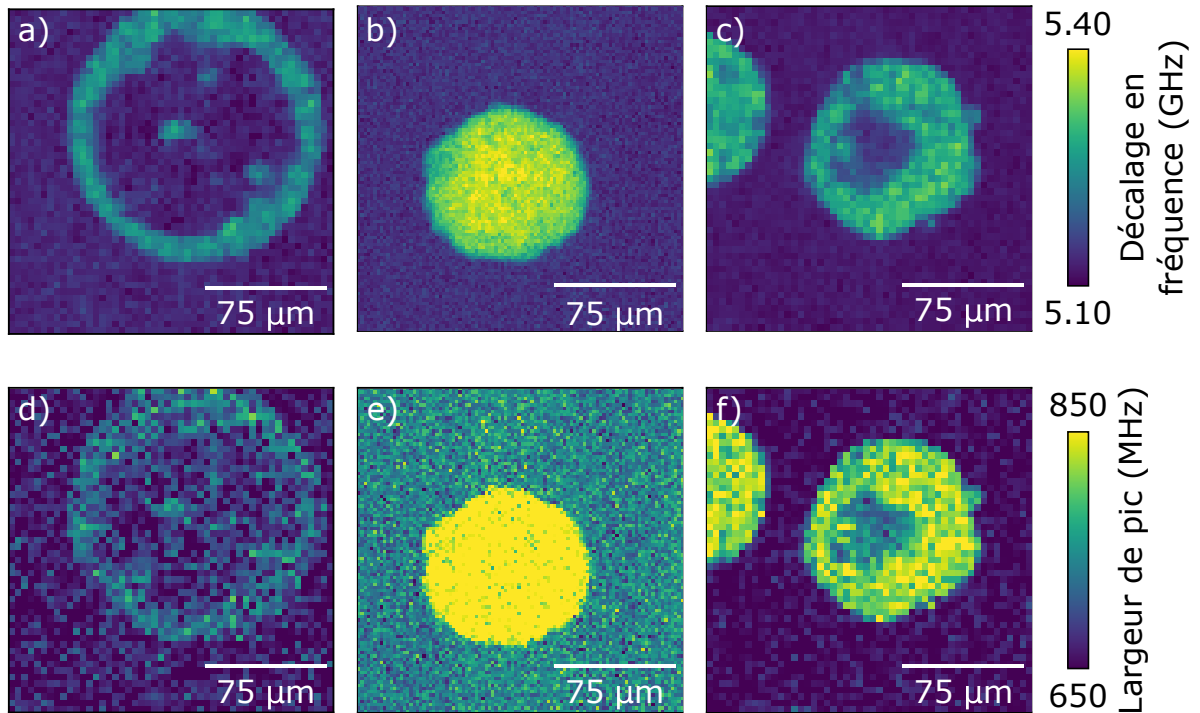


FIGURE 4.10 – Images Brillouin d’amas cellulaires creux et pleins. a), b) et c) : images obtenus par la mesure du décalage en fréquence des pics Brillouin. d), e) et f) : images obtenues par la mesure de la largeur des pics Brillouin. a) et d) : Acinus (amas creux) de pancréas (lignée H6C7) fixé. b) et e) Tumoröide (amas plein) de pancréas (lignée WPE1-NB26) vivant. c) et f) Acinus (amas creux) de prostate (lignée RWPE1) vivant.

la morphologie des amas cellulaires. Cette approche n’utilise cependant que le contraste mécanique retourné et reste qualitative. Dans une démarche quantitative maintenant, nous pouvons à présent observer et donner du sens aux valeurs retournées par la spectroscopie Brillouin. Dans cette section, nous avons démontré qu’il était possible d’imager des amas pleins ou creux, et d’en déduire leur morphologie. Dans la continuité de cette étude, nous allons maintenant nous pencher sur la morphogénèse de ces amas, et en particulier deux paramètres d’intérêt :

- L’apparition du creux dans l’amas au cours de son développement.
- L’évolution des propriétés mécaniques des cellules de l’amas au cours de son développement.

4.5 Étude de la morphogénèse d’amas cellulaires par microspectroscopie Brillouin

À l’issue de la section précédente, nous savons que nous pouvons identifier un creux au cœur d’un amas formé, en utilisant l’imagerie Brillouin. L’approche de la section précédente montre

que nous pouvons utiliser cette technique à un instant donné et de manière qualitative pour reconnaître sur le plan médian d'un amas cellulaire des zones avec présence et absence de cellules. Dans cette section, nous élargirons les applications de notre dispositif à un suivi de croissance dans le temps. Dans la continuité de la section précédente, nous nous intéresserons ici à la morphogénèse des amas creux identifiés en section précédente. Cette étude se fera en deux temps : nous reprendrons d'abord une approche qualitative, pour observer la formation de la structure creuse, puis nous nous quantifierons l'évolution des propriétés mécaniques des cellules durant la morphogénèse.

L'apparition d'un creux dans un amas cellulaire est un phénomène remarquable dont la compréhension présente un intérêt en biologie durant la phase de morphogénèse et la phase éventuelle de carcinogénèse. Durant la phase de morphogénèse, l'apparition du lumen est aujourd'hui expliquée par deux processus parallèles : une polarisation des cellules qui induisent l'apparition d'une région creuse [138], et l'apoptose des cellules à l'intérieur de l'amas [139, 140, 141]. Ces deux mécanismes sont observés, mais mal compris, et résultent tous deux en une apparition d'un creux au centre de l'amas. L'apparition de ce creux est primordiale au bon fonctionnement de l'amas, et sa disparition est corrélée, comme évoquée en section précédente, à la carcinogénèse de l'amas. Mesurer son apparition et son évolution présente donc un intérêt en recherche médicale, en particulier pour évaluer l'efficacité des traitements contre le cancer.

Dans cette section, nous proposerons d'utiliser la spectroscopie Brillouin pour analyser cette morphologie, regarder son apparition et éventuellement sa disparition. Usuellement, les creux dans les amas commencent à devenir détectables par un expert à jour 8. Nous proposons donc ici de mesurer la morphologie de ces amas sur plusieurs jours consécutifs. Notons alors que cette étude n'est possible que si l'instrument utilisé est stable sur la durée envisagée. Cette section est donc un exemple concret de l'intérêt des développements du chapitre 3.

4.5.1 Impact de l'illumination sur le développement des amas

La mesure de la morphogénèse des amas soulève la question de l'impact de l'illumination sur leur croissance. La phototoxicité de l'illumination est une question récurrente dans la littérature [41, 105] qui amène souvent à choisir une illumination dans les "fenêtres biologiques"

(biological window en anglais). Dans notre cas, cela a dicté, comme nous l'avons évoqué en chapitre 1, le choix d'un laser à 780 nm, un choix qui minimise les chances d'induire une phototoxicité par notre mesure [74]. Cependant cela n'assure pas l'absence d'effet sur le développement de l'amas, des phénomènes complexes tels que la photobiomodulation ayant déjà démontré empiriquement la présence d'effets de l'illumination sur le comportement *in vivo* de cellules et de tissus [142].

Afin donc de nous assurer de l'absence d'impact de notre approche dans la croissance d'amas, nous choisissons dans un premier temps d'effectuer une étude de la croissance d'amas cellulaires soumis ou non à une illumination. Nous choisissons pour cette étude deux niveaux d'illumination : une illumination à "faible" puissance, la puissance du laser étant inférieure à 1 mW et une illumination à "forte" puissance, la puissance du laser mesurée étant de 15 mW au niveau de l'échantillon.

L'idée de cette étude est alors de répondre aux questions suivantes :

- L'illumination à un temps donné affecte-t-elle durablement la croissance d'un amas cellulaire ?
- L'illumination sur les premiers jours a-t-elle un impact durable sur la croissance des amas cellulaires ?
- L'illumination quotidienne des amas a-t-elle un impact sur leur croissance ?
- L'illumination quotidienne n'affecte-t-elle pas la croissance des amas ?

La figure 4.11 schématise le protocole de mesure suivi pour l'analyse de l'illumination :

- Les amas sont cultivés avec deux marqueurs : un marqueur d'apoptose (CellEvent) et un marqueur de prolifération cellulaire (LyzoTracker). Ces deux marqueurs nous permettent de suivre par des mesures de fluorescence, l'évolution du développement des amas.
- Au premier jour, 10 amas sont illuminés avec un laser de 15mW, et 10 amas avec un laser de 1 mW
- Le second jour, 10 nouveaux amas sont illuminés avec un laser de 15 mW et 10 nouveaux amas avec un laser de 1mW. 10 des 20 amas de la veille sont également illuminés, 5 amas ayant été illuminés à 15 mW, et 5 amas avec un faible puissance laser.

- Le troisième jour, 20 nouveaux amas sont illuminés comme la veille, et les 10 amas du premier jour suivi à jour 2 sont illuminés. 10 amas de jour 2 sont également choisis pour être suivis et illuminés, comme à jour 2.
- Pour les autres jours de l'étude, la même logique est appliquée.
- A chaque jour, une image en champ clair est prise de tous les amas illuminés aux jours présents et précédents.
- A chaque jour, une image de fluorescence est prise de tous les amas illuminés aux jours présents et précédents.

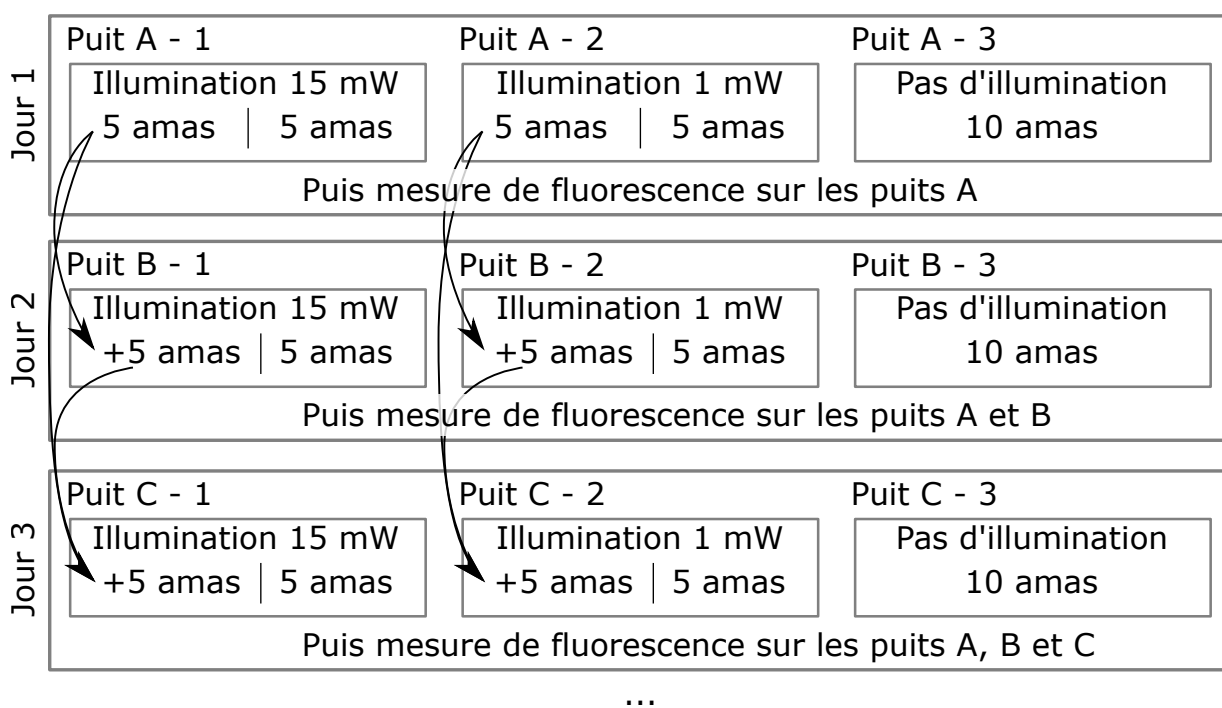


FIGURE 4.11 – Schéma du protocole suivi pour mesurer l'impact de l'illumination sur la croissance d'amas cellulaires.

La figure 4.12 montre les images de fluorescence de la même région du puits ayant reçu la plus forte illumination (15mW) sur le plus long temps (illumination quotidienne pendant 8 jours) obtenu au premier jour de la mesure (jour 1) et au dernier jour de l'observation (jour 8). Les amas entourés en jaune correspondent aux amas ayant été illuminés. La figure prise à la fin de croissance ne montre aucune différence notable entre la taille et l'intensité de fluorescence du signal. Notons également que les amas présentaient deux fluorophores : un fluorophore de prolifération (canal rouge) et un fluorophore d'apoptose (canal vert). L'illumination n'induit donc pas de mort par apoptose des cellules, ce qui suggère que l'effet de l'illumination puisse être négligé sur cette lignée cellulaire, et à la longueur et à la puissance

que nous utilisons dans nos mesures.

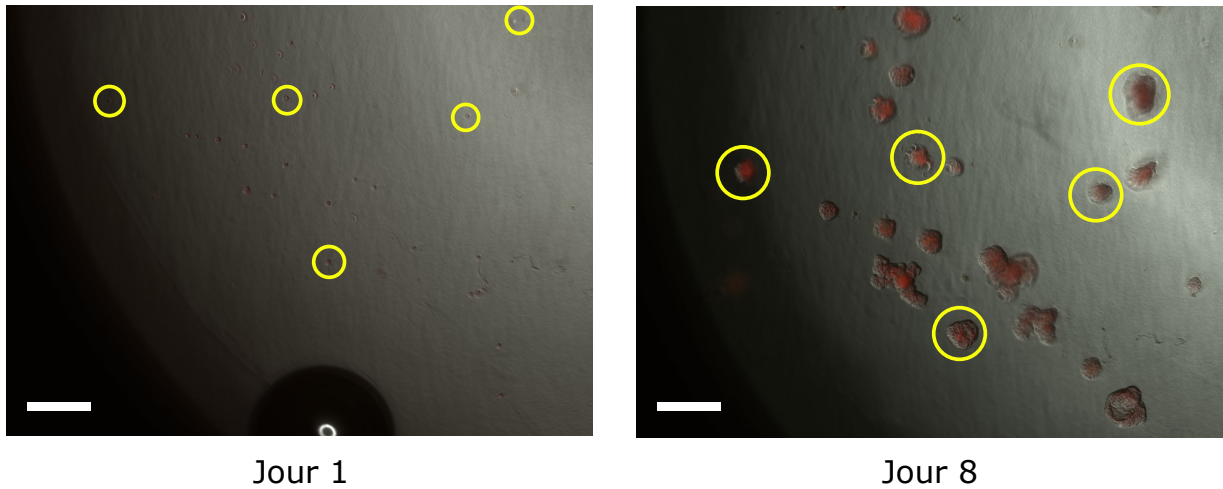


FIGURE 4.12 – Comparaison de la prolifération des cellules d'un amas cellulaires illuminés et non illuminés par un laser à 15mW. Barre d'échelle : $200\mu m$

Notons finalement que la lignée H6C7 forme des amas expérimentalement très sensibles aux conditions de cultures. Nous considérerons donc pour la suite de cette section que ce résultat est suffisant pour négliger l'influence de l'illumination sur des mesures de croissance d'amas où le développement vers une structure creuse à bien lieu.

4.5.2 Etude qualitative de la morphogénèse d'amas creux

Après nous être convaincu que la mesure n'entraînait pas de modifications majeures sur le développement des amas, et que la morphologie des amas pouvait être étudiée à travers la microspectroscopie Brillouin, nous pouvons maintenant étudier la morphogénèse d'amas cellulaires par microspectroscopie Brillouin. Pour ce faire, nous choisissons une lignée expérimentalement plus robuste aux conditions de mesure que la lignée H6C7 : la lignée RWPE-1, issue de cellules prélevées sur une prostate humaine. Dans cette étude, les cellules ont été implantées sur une couche de Matrigel, dans un milieu de culture adapté contenant lui aussi du Matrigel. Elles ont ensuite été placées dans un incubateur à microscope, réglé à $37^\circ C$, 100% d'humidité et 5% de CO_2 . Les mesures ont ensuite été faites sur une série de 9 amas, quatre jour après le dépôt des cellules dans leur milieu, afin de choisir des amas viables. Chaque mesure a consisté en une image de 2500 pixels, correspondant à une région de $200\mu m$ sur $200\mu m$ échantillonné avec un pas de $4\mu m$ sur $4\mu m$.

La figure 4.13 donne les images issues des décalages en fréquence des 9 amas choisis lors de l'étude, sur les 5 jours d'étude. Chaque image est normalisée pour maximiser le contraste et mettre en avant l'apparition des régions creuses de l'amas. A l'opposé de l'étude présentée en section précédente, nous observons donc ici un phénomène dynamique et effectuons cette observation sans marqueurs ni contact avec l'échantillon. Nous remarquons dans cette étude que les amas se développent bien, rejoignant ainsi la conclusion de l'étude de l'impact de l'illumination sur leur développement. Nous remarquons ensuite que les amas se creusent progressivement durant leur phase de développement. Ce résultat suggère une apparition de l'espace luminal par organisation cellulaire et non pas apoptose. En effet, l'espace luminal apparaît sur nos images Brillouin à partir de jour 4, soit avant que l'amas ait atteint sa taille maximale. Ainsi, nous pouvons supposer que les cellules sont encore dans une phase de prolifération au moment de l'apparition du creux, et donc qu'elles s'organisent autour du creux formé, et ne le colonisent pas pour ensuite être détruites par apoptose. Ce résultat vient corroborer la littérature sur la morphogénèse des amas cellulaires creux, et met au cœur de l'étude l'organisation cellulaire et non plus l'apoptose. Cette observation donne ainsi son importance à l'étude morphologique de l'amas au cours de sa morphogénèse, et donc probablement au cours de sa carcinogénèse. Il serait cependant intéressant de confirmer ces résultats en les comparant avec une analyse des marqueurs d'apoptose.

4.5.3 Étude quantitative de l'évolution des propriétés mécaniques des cellules d'un amas creux durant sa morphogénèse

La microspectroscopie Brillouin présente un intérêt dans l'étude de morphologie d'amas de taille micrométrique mais elle reste une technique d'imagerie basée sur un contraste mécanique. Nous poursuivons maintenant l'analyse de manière quantitative cette fois-ci. Pour cela, nous nous intéresserons aux valeurs extraites des spectres Brillouin.

Pour chaque spectre obtenu à chaque point des images Brillouin, nous extrayons ainsi une valeur de décalage en fréquence et une valeur de largeur à mi-hauteur. Ces valeurs nous donnent des images similaires à celles présentées en figure 4.13. Sur ces images, nous appliquons ensuite un algorithme que nous avons créé pour venir isoler les régions d'intérêt. Deux régions sont ainsi reconnues : l'amas et le milieu. Un seuillage est alors appliqué sur la région de l'amas pour venir isoler les pixels associés au creux dans l'amas et les pixels associés aux

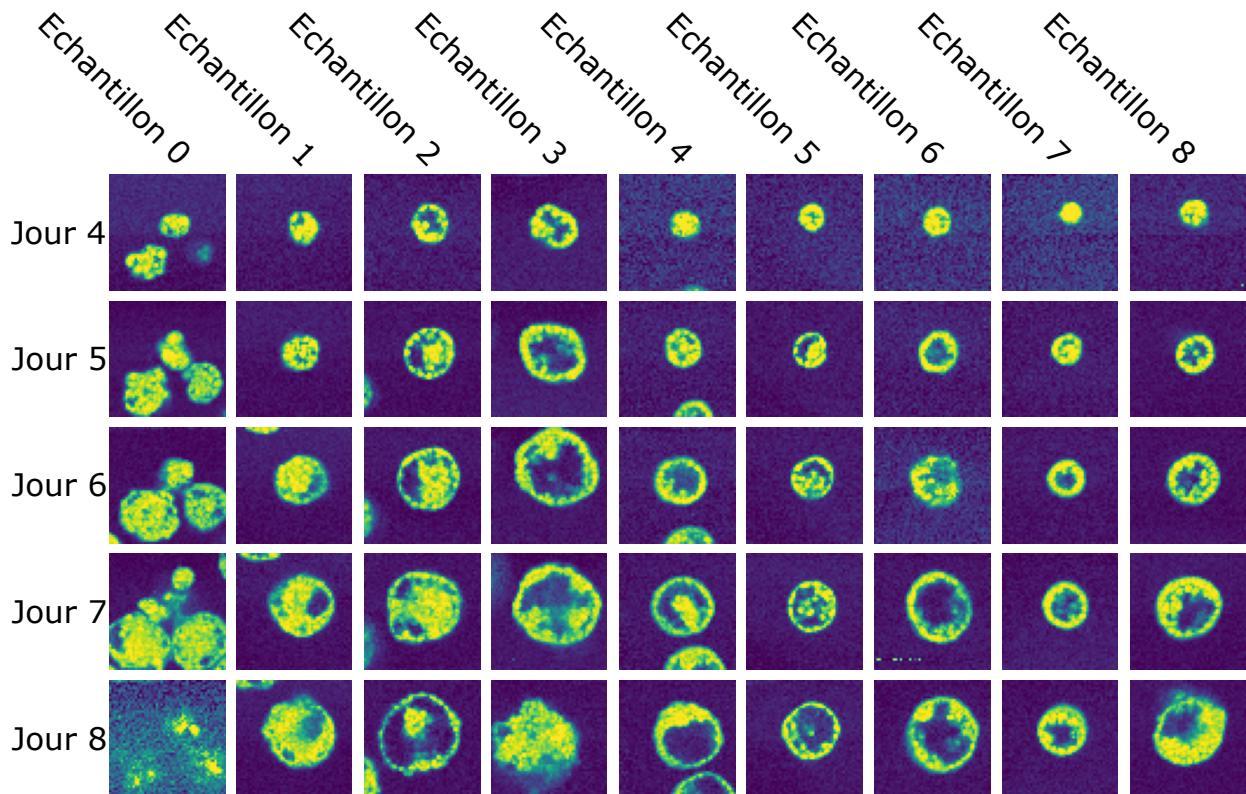


FIGURE 4.13 – Étude qualitative de la croissance de neuf acini par microspectroscopie Brillouin. Chaque image correspond à une cartographie de $200\mu m$ par $200\mu m$, échantillonnée à un pas de $4\mu m$ par $4\mu m$, résultant donc en une image de 50 pixels par 50 pixels.

cellules de l'amas. Chaque point de mesure est ainsi associé à une région d'intérêt, et il est alors possible d'extraire des distributions des valeurs mesurées pour chaque région d'intérêt, et pour chaque jour de mesure.

La figure 4.14 montre l'étude de la région d'intérêt attenante aux cellules de l'amas. Chaque couleur est associé à l'un des 9 amas observés. Les points correspondent à la moyenne des valeurs enregistrées pour la région d'intérêt et la barre d'erreur correspond à l'écart-type sur ces valeurs. La ligne noire illustre l'évolution de la moyenne sur tous les amas, des valeurs de décalage en fréquence et de largeur de pics observées. Nous voyons ainsi que le décalage en fréquence et la largeur des pics semble croître avec le jour de développement. Ces deux évolutions nous amènent à la conclusion que les propriétés des cellules évoluent au cours de la formation de l'amas.

Pour interpréter ces évolutions, nous pouvons revenir sur la théorie derrière la microspectroscopie Brillouin présentée en chapitre 1. Au regard de ce développement, ces évolutions de propriétés peuvent être imputées soit à un changement de densité et d'indice de réfraction

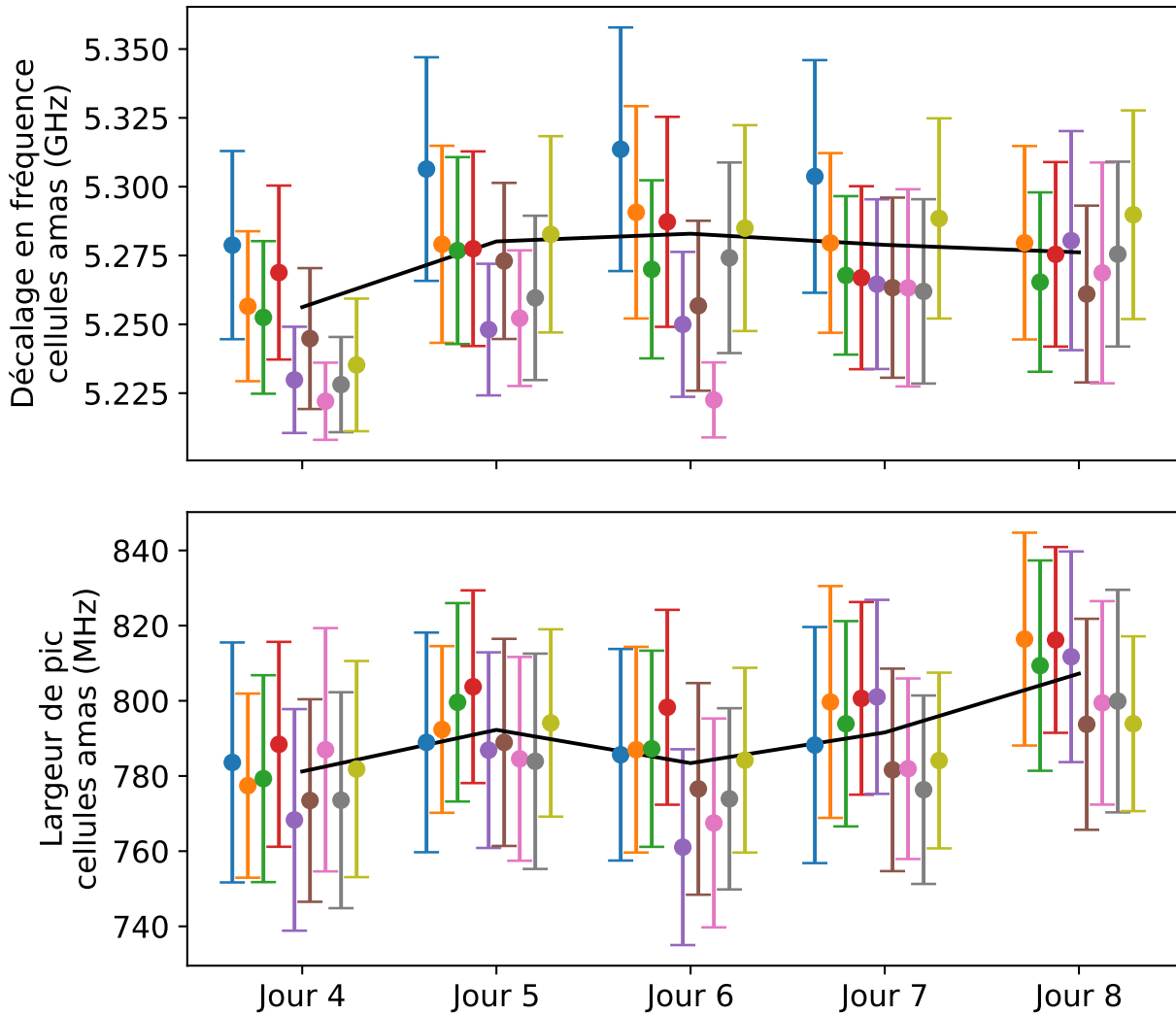


FIGURE 4.14 – Étude quantitative des variations de décalage en fréquence et largeur de pics Brillouin des cellules d'amas cellulaires pendant leur morphogénèse.

des cellules de l'amas, soit à un changement de leurs propriétés mécaniques. Afin donc de clarifier la cause de ces changements, nous utiliserons une autre représentation des données : la tangente de perte Brillouin (BLT), définie en équation 1.19. Cette grandeur est l'inverse du facteur de qualité du module longitudinal. Il est souvent appelé "frottement interne" et ne dépend que de la mécanique du milieu.

La figure 4.15 illustre ainsi cette étude. Les moyennes des tangente de perte Brillouin sont représentés par les points, et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type sur les mesures. Comme pour la figure 4.14, la ligne noire indique la moyenne sur tous les points de mesure associés aux cellules. La figure 4.15 montre elle aussi une évolution des propriétés mesurées dans le temps. Cette évolution est très corrélée à l'évolution observée sur la largeur des pics en figure 4.14. Cela indique que la cause des évolutions observées est d'une

part imputable aux variations de propriétés mécaniques et d'autre part, qu'elle est majoritairement due aux fluctuations de viscosité des cellules au cours du développement de l'amas.

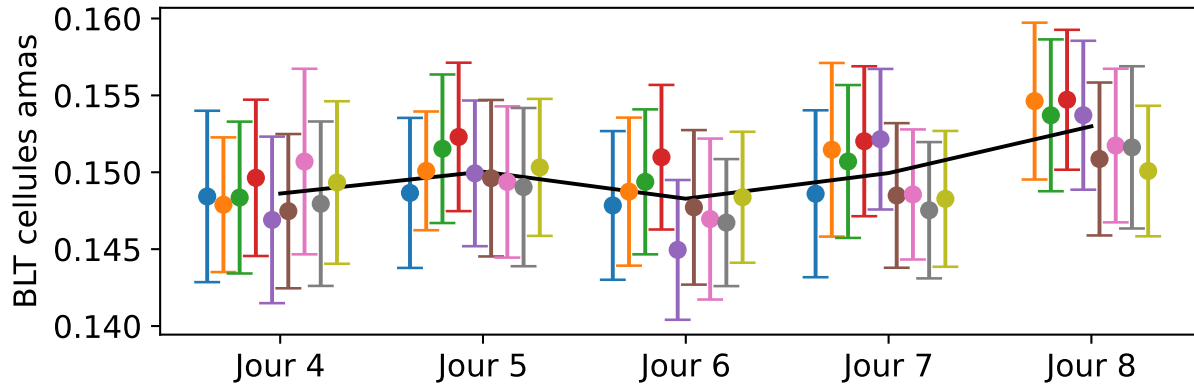


FIGURE 4.15 – Étude quantitative des variations de propriété mécanique lors de la croissance de neuf acini par microspectroscopie Brillouin. Les points correspondent aux valeurs moyennes de décalage en fréquence et largeur de pics et les barres aux écart-types sur ces valeurs.

Notre étude suggère que l'apparition d'un creux dans un amas intervient à un stade où l'amas continue de se développer et au cours de cette morphogénèse, une évolution des propriétés mécaniques de l'ensemble est visible.

4.6 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons repris l'approche de la spectroscopie Brillouin confocale et avons montré qu'un dimensionnement adéquat des spectromètres permettait d'accroître de manière significative l'intensité lumineuse d'un spectromètre Brillouin, et ce sans modifier ni la résolution spatiale ni la puissance du laser d'illumination. Cette approche s'avère en pratique fiable et s'affiche parmi les plus performantes en termes de temps d'acquisition, au regard de l'état de l'art. Cette approche présente enfin un intérêt en biologie où elle permet de remplacer la microscopie confocale par fluorescence pour des analyses de morphologie. Elle s'avère également utile pour le suivi des évolutions mécaniques d'amas lors de leur développement.

Au cours du suivi de cette morphogénèse, nos mesures ont suggéré l'existence d'une organisation cellulaire précédant la différenciation des amas par apoptose. Ce résultat est intéressant,

car s'il était corroboré par une étude de l'apoptose par fluorescence, il mettrait en avant la primauté temporelle du processus d'organisation cellulaire sur le processus de différenciation par mort cellulaire programmée. Une telle découverte pourrait avoir des implications significatives non seulement pour la compréhension de la morphogenèse, mais également pour la compréhension de la carcinogenèse de ces amas.

Ce chapitre vient conclure la nouvelle approche de l'imagerie Brillouin que nous avons implémentée dans cette thèse. Le système résultant des développements théoriques et expérimentaux présentés dans ce travail est ainsi théoriquement et expérimentalement plus lumineux, plus stable, plus rapide et aussi précis que ce que propose l'état de l'art.

Chapitre 5

Conclusion et Perspectives

Le présent travail de thèse a visé à optimiser le spectromètre VIPA pour l'analyse d'amas cellulaires tridimensionnels par spectroscopie Brillouin. Cet objectif a été réalisé en revisitant l'instrument de mesure, en examinant chacune des décisions ayant abouti à sa conception, et en les remettant en question d'un point de vue à la fois théorique et expérimental.

Nous avons débuté la présentation de ce travail en proposant une description simple, mais complète de ce qu'est la spectroscopie Brillouin. En nous basant sur cette description, nous avons alors pu établir l'adéquation du spectrographe VIPA dans l'obtention des spectres Brillouin.

Contrairement à l'utilisation traditionnelle de fibres monomodes dans ce type d'instrument, nous avons ensuite proposé de coupler le spectrographe VIPA à une fibre multimode, en proposant ainsi d'accroître la luminosité de l'instrument tout en améliorant sa stabilité et sa facilité d'alignement. Ce choix a cependant fait paraître deux grandes interrogations concernant l'efficacité du dispositif, et sa réponse percussive. Ces deux aspects ont alors été traités séparément et ont amené à la conclusion qu'il était possible et intéressant de coupler des spectrographes VIPA à des fibres multimodes.

Cette conclusion, alliée aux avantages que proposait cette nouvelle approche de l'instrument, nous a amenés à réaliser expérimentalement le dispositif. Nous avons alors constaté que la stabilité de l'instrument posait problème. En étudiant minutieusement les sources d'instabilité, nous en avons identifié deux grandes sources : le laser et le spectrographe. La stabilisation d'une diode laser étant généralement difficile à implémenter, nous en avons proposé

une nouvelle approche, en avançant un lien entre la température ambiante et la fréquence d'émission du laser. Cela nous a permis de proposer une nouvelle méthode de stabilisation du laser, basée sur une simple mesure de température. Cette méthode a permis d'atteindre des stabilités de l'ordre de 500 MHz par mois pour un coût et une complexité contenue. Cela nous a permis d'aborder le problème de stabilité du spectrographe. Plutôt que de proposer une stabilisation physique de l'instrument, nous avons proposé une correction numérique, apparaissant au moment du traitement des données. Cette approche nous a ainsi amenés à une nouvelle méthode de traitement des spectres permettant des stabilités d'instruments de l'ordre de la semaine, pour des précisions de mesures comparables à celles observées dans l'état de l'art.

L'instrument résultant étant capable de retourner de manière stable et avec une grande exactitude les caractéristiques des spectres Brillouin, nous nous sommes alors intéressés à la manière dont nous pouvions imager les échantillons. En accord avec nos besoins et dans la continuité de ce que proposait la littérature, nous avons repris la théorie de la microscopie confocale, et choisi d'aborder le dimensionnement du microscope confocal à travers la résolution spatiale attendue. Cette approche est ainsi venue compléter celle de l'état de l'art, en soulignant l'existence d'un compromis sur la résolution spatiale et la puissance du signal collecté faisant intervenir la taille du détecteur et l'ouverture de l'objectif. En profitant alors de ce compromis, nous avons établi une nouvelle approche du dimensionnement de l'instrument, proposant d'optimiser la puissance collectée à résolution spatiale donnée, en choisissant des objectifs de plus grandes ouvertures et des tailles de détecteurs adaptées. Cette approche nous a ainsi permis de développer l'un des spectromètres les plus rapides pour la spectroscopie Brillouin à ce jour, instrument dont nous avons confirmé le bon fonctionnement sur une étude expérimentale du développement d'organoïdes. Cette étude a mis en avant une potentielle organisation cellulaire primant sur la différenciation des amas par apoptose. Ce résultat, qui n'est que préliminaire et demande encore confirmation, montre cependant un exemple concret de l'utilité de ce dispositif. Cette étude a ainsi confirmé la rapidité, la stabilité et l'adéquation de l'instrument à l'observation de la morphologie d'amas cellulaires.

En conclusion, nous avons implémenté un spectromètre VIPA fiable, stable et plus lumineux que les implémentations proposées auparavant. Cette avancée ouvre de nouvelles perspectives pour l'utilisation du spectromètre VIPA dans l'analyse d'échantillons biologiques par

spectroscopie Brillouin, et offre, par la stabilité de l'instrument présent, la possibilité à la technologie de se démocratiser en biologie.

Clôtureons maintenant cette thèse en proposant trois continuations possibles de ce travail à travers l'approfondissement de la compréhension du spectromètre VIPA, l'établissement d'une nouvelle méthode de traitement des courbes et l'introduction d'un nouveau type d'instrument : le spectromètre VIPA à double axe de dispersion.

5.1 Modélisation de la transmission de puissance dans un spectromètre VIPA

Nous avons généralisé en chapitre 2 le modèle du spectromètre VIPA pour des sources étendues, en repartant des modèles présentés dans la littérature [143, 69, 70, 144, 71, 145]. Cette approche nous a permis de généraliser le spectromètre VIPA et de proposer des implémentations de ce spectromètre où la source soit une fibre multimode. Le modèle que nous avons cependant établi ne s'est pas intéressé à l'efficacité de l'instrument, définie ici comme la proportion de l'énergie lumineuse apportée par la source qui se retrouvera sur le détecteur. Expérimentalement, ce ratio est souvent compris entre 50% et 80% [101, 146]. Or, en calculant les efficacité théoriques prédites par les modèles établis, nous observons des efficacités bien supérieures, proche de 100% [147]. Ce décalage entre le modèle et l'expérience remet en question la validité du modèle et donc l'utilisation qui en est faite à la fois dans la littérature et dans cette thèse. Dans cette section, nous proposons donc d'identifier et de corriger le modèle pour que l'efficacité théorique du spectromètre VIPA soit cohérente avec celle observée.

Nous repartirons du modèle le plus complet du spectromètre VIPA présenté dans la littérature [71], où l'instrument est globalement abordé dans le cadre de l'optique de Fourier. Dans ce cadre, un rayon peut être défini par deux angles décrivant sa direction suivant les deux vecteurs directeurs du plan orthogonal à la direction de propagation de l'ensemble du faisceau. En suivant la représentation de cette configuration donnée en figure 2.7, nous noterons ici ces vecteurs \vec{x} et \vec{y} , et le vecteur de la direction de propagation du faisceau \vec{z} . Si le VIPA se résume à deux miroirs parallèles dans du vide, l'amplitude du champ électrique de ce faisceau sur le plan du détecteur s'écrira alors comme la somme des sources virtuelles déphasées, normalisées en amplitude par les réflectivités des miroirs. En reprenant ainsi les

notations de la figure 2.3, cette amplitude transmise s'écrira alors :

$$A^{(t)}(\theta_x, \theta_y) = (1 - r_2) \sum_{n=0}^{+\infty} (r_1 r_2 e^{i\delta(\theta_x, \theta_y)})^n A^{(0)}(\theta_x, \theta_y) \quad (5.1)$$

$$= \frac{1 - r_2}{1 - r_1 r_2 e^{i\delta(\theta_x, \theta_y)}} A^{(0)}(\theta_x, \theta_y) \quad (5.2)$$

Soit une transmission d'intensité :

$$\mathcal{T} = \frac{I^{(t)}(\theta_x, \theta_y)}{I^{(0)}(\theta_x, \theta_y)} = \left| \frac{A^{(t)}(\theta_x, \theta_y)}{A^{(0)}(\theta_x, \theta_y)} \right|^2 = \frac{1 - r_2^2}{1 + (r_1 r_2)^2 - 2r_1 r_2 \cos \delta} \quad (5.3)$$

En intégrant alors cette équation pour le déphasage induit par les sources virtuelles du VIPA δ dans $[-\pi, \pi]$, nous obtenons : $\mathcal{T} = (1 - r_2^2)/(1 - r_1^2 r_2^2)$. L'état de l'art s'arrête ici dans la modélisation de l'instrument. En évaluant alors cette transmissivité pour un VIPA usuel, présentant des réflectivités $r_1 \approx 1$ et $r_2 \approx 0.95$, nous devrions atteindre des efficacités de l'ordre de 100%, ce qui n'est expérimentalement jamais observé.

Ce modèle n'est donc pas satisfaisant du point de vue énergétique. Nous proposons de l'améliorer en prenant en compte le coefficient d'absorption α du matériau composant le VIPA. L'absorption dans la silice fondue étant de l'ordre de $10\text{dB}/\text{km}$, nous aurons $\alpha \approx 9.10^{-4}\text{m}^{-1}$. Nous écrivons alors l'amplitude transmise suivante :

$$A^{(t)}(\theta_x, \theta_y) = \frac{1 - r_2}{1 - r_1 r_2 e^{i\delta - \alpha h / \cos \theta'}} \quad (5.4)$$

avec θ' l'angle entre le faisceau et la normale du VIPA pris dans le VIPA.

Cette première modification amène à l'écriture de l'intensité transmise suivante :

$$\mathcal{T} = \frac{1 - r_2^2}{1 + (r_1 r_2)^2 e^{-2\alpha h / \cos \theta'} - 2r_1 r_2 \cos \delta e^{-\alpha h / \cos \theta'}} \quad (5.5)$$

En intégrant alors comme précédemment, cette équation pour δ dans $[-\pi, \pi]$, nous obtenons : $\mathcal{T} = (1 - r_2^2)/(1 - r_1^2 r_2^2 e^{-2\alpha h / \cos(\theta')})$. Nous pouvons alors approcher $\cos \theta'$ par 1, dans l'approximation des petits angles, et pour les valeurs usuelles du VIPA ($h = 3.37\text{ mm}$, $r_1 \approx 1$ et $r_2 \approx 0.95$), nous obtenons $\mathcal{T} = 0.99997$. La prise en compte de l'absorption du matériau composant le VIPA a donc un effet négligeable qui ne permet pas d'expliquer les écarts entre les transmissivités théoriques et expérimentales du VIPA.

Nous devons en conclure que ce sont les défauts de surface du VIPA, les hétérogénéités dans le coating des miroirs et les erreurs de parallélisme qui induisent les pertes observées expérimentalement. Cette conclusion rejoint celle émise par Chabbal en 1958 [148] pour la transmission des étalons de Fabry-Pérot. Nous proposons ici de les modéliser de manière plus simple que l'étude mentionnée, en considérant qu'à chaque réflexion, une partie du faisceau est perdue sur les aspérités de surface. Ainsi, seule une partie du faisceau γ sera transmise à chaque rencontre avec le second miroir du VIPA. Ce nouveau paramètre prend la forme d'un facteur compris entre 0 et 1, et amène à l'expression de l'amplitude du champ électrique suivant :

$$A^{(t)}(\theta_x, \theta_y) = \frac{\gamma(1 - r_2)}{1 - r_1 r_2 e^{i\delta}} \quad (5.6)$$

En découle alors l'expression de l'intensité de l'onde électromagnétique, proportionnelle au carré du module du champ électrique :

$$\mathcal{I} \parallel = \frac{\gamma^2(1 - r_2^2)}{1 + (r_1 r_2)^2 - 2r_1 r_2 \cos \delta} \quad (5.7)$$

Cette approche nous donne un moyen de juger les qualités de surface en fonction des transmissivités expérimentales observées. Ainsi, pour des valeurs de γ supérieures à 0.8 et des réflectivités des miroirs allant de 0.9 à 1, nous obtenons des transmissivités allant de 64% à 100%. Ces valeurs sont cohérentes avec celles observées dans la littérature [101, 146] et semblent raisonnables. Cela nous permet de suggérer une piste pour expliquer les écarts entre le modèle et l'expérience qui proviendraient des imperfections du VIPA.

Ce modèle nous amène à établir que le VIPA est un instrument qui n'induit théoriquement pas de pertes de puissance. Cela entraîne que pour le pouvoir de résolution d'un spectromètre VIPA, soit de l'ordre de $5 \cdot 10^5$, aucun appareil ne pourra être plus lumineux que cet instrument, du moment que les surfaces du VIPA sont sans défaut. Des mesures expérimentales manquent pour établir la justesse de ce modèle, cependant au regard des études sur les Fabry-Pérot, les conclusions que ce modèle apportent semblent cohérentes.

Notons que ce modèle nous permet également de justifier la forme de la PSF de l'instrument. Les pics n'étant visibles qu'en cas d'interférences constructives, lorsque δ est multiple entier de 2π , en effectuant un développement limité en δ de l'intensité à l'ordre 2 autour de $\delta = 0$,

nous obtenons :

$$I^{(t)} = I_0 \frac{\gamma^2(1 - r_2)^2}{1 + (r_1 r_2)^2 - 2r_1 r_2 (1 + \delta'^2/2)} \quad (5.8)$$

avec $\delta' = [(\delta + \pi)/(2\pi)] - \pi$, nous permettant d'obtenir une valeur entre $-\pi$ et π . Nous reconnaissons alors une Lorentzienne en δ . En reprenant alors l'expression de δ proposée en équation 2.13, nous voyons que δ est proportionnel à λ donc la PSF du spectromètre VIPA sera une Lorentzienne en longueur d'onde.

Les modèles établis dans la littérature sont donc bien cohérents avec les observations expérimentales, du moment que les imperfections du VIPA sont prises en compte, ce qui résulte essentiellement en le modèle ici présenté. Sous réserve que ce modèle soit validé expérimentalement, nous pourrions alors établir qu'aucun spectrographe ne pourrait théoriquement surpasser la luminosité du VIPA donné son pouvoir de résolution, un résultat très intéressant pour l'instrumentation en spectroscopie.

5.2 Analyse par phaseurs d'une Lorentzienne

Nous avons présenté en chapitre 3 une nouvelle méthode de traitement pour les spectres Brillouin. Cette méthode se base sur une nouvelle estimation de la relation pixel-fréquence et sur une modification de la fonction de fit utilisée pour extraire les données. Bien que les résultats de ces deux méthodes soient bons, tant sur la précision obtenue que sur la rapidité de traitement, ils restent cependant basés sur un fit. L'utilisation d'un fit dans le traitement de données présente en général deux défauts :

- Nous devons estimer la valeur des paramètres initiaux pour le fit. Dans le meilleur des cas, ces paramètres initiaux peuvent être estimés indépendamment de l'utilisateur, ils sont alors potentiellement loin de la valeur réelle. Dans le pire des cas, ils sont entrés par l'utilisateur et le traitement devient alors dépendant de l'utilisateur.
- Une fois les paramètres initiaux entrés, l'idée de l'algorithme est de faire une régression sur l'erreur, ce qui introduit alors la question de la fonction d'erreur et le problème du temps de calcul, car la régression est lente.

Dans la littérature, nous trouvons cependant une approche innovante du traitement : l'analyse par phaseurs [149]. Le principe de cette étude est de ne plus utiliser un fit, mais de reconnaître dans la transformée de Fourier du signal, la transformée de Fourier de la forme

de fonction que nous voulons reconnaître. En suivant les raisonnements faits au chapitre 3, cette fonction est une Lorentzienne.

L'application de cette méthode permettrait donc de ne plus être dépendant de l'utilisateur et de ne pas avoir de régression à faire. La méthode semble donc très avantageuse. Elle reste cependant limitée sur deux aspects dans la littérature [149] :

- On considère dans cette étude que la discrétisation du signal est infinie
- On ne choisit qu'une seule fréquence pour extraire les propriétés de la Lorentzienne alors que nous avons techniquement accès à plusieurs évaluations de la transformée de Fourier du signal, pour plusieurs fréquences de la transformée.

Dans cette section, nous allons approfondir l'étude en prenant en compte la discrétisation du signal et en considérant l'ensemble des fréquences accessibles.

Commençons donc par rappeler la transformée de Fourier d'une Lorentzienne. Dans le cas donné ici, nous choisirons une Lorentzienne normalisée, comme précédemment, en amplitude, centrée en x_0 et présentant une largeur Γ :

$$\mathcal{F} [\mathcal{L}_{x_0, \Gamma}] (\nu) = \frac{\Gamma \pi}{2} \exp [2i\pi x_0 \nu - \Gamma \pi |\nu|] \quad (5.9)$$

Il en découle la possibilité d'identifier la position du centre de la Lorentzienne et sa largeur en observant uniquement sa transformée de Fourier :

$$\begin{cases} \Gamma = -\ln \{2/(\Gamma \pi) |\mathcal{F} [\mathcal{L}_{x_0, \Gamma}] (\nu)|\} / (\pi |\nu|) \\ x_0 = \varphi [\mathcal{F} [\mathcal{L}_{x_0, \Gamma}] (\nu)] / (2\pi \nu) \end{cases} \quad (5.10)$$

Notons que dans le cas réel, les signaux observés ne seront pas continus, mais discrets. La transformée de Fourier de ce signal discrétisé pourra donc être exprimée comme une approximation par la méthode des rectangles de la transformée de Fourier continue, soit :

$$\mathcal{F} [\mathcal{L}_{x_0, \Gamma}] (k) \approx \sum_n \mathcal{L}_{x_0, \Gamma} (x_n) \exp -2i\pi k x_n \Delta x \approx FFT [\mathcal{L}_{x_0, \Gamma}] (\nu) \Delta x \quad (5.11)$$

avec *FFT* l'algorithme de la transformée de Fourier rapide. Notons ici que nous avons gardé le paramètre ν pour exprimer les fréquences, car nous choisissons de convertir les fréquences numériques, retournées par une FFT classique, en un axe de fréquence "réel", c'est-à-dire,

un axe de fréquence prenant en compte la discrétisation du signal.

Sous réserve que cette approximation soit exacte, nous pourrions alors identifier les paramètres de la courbe dans le module et la phase des composantes fréquentielles retournées.

La figure 5.1 présente une Lorentzienne arbitraire et normalisée. Pour rapprocher cette courbe à celles qui ont été présentées dans ce manuscrit, nous la situerons à une abscisse $x_0 = 5$, et lui donnerons une largeur $\Gamma = 1$. Si l'unité de l'axe des abscisses est en GHz, cela correspondra approximativement au pic Brillouin de l'eau pris sur échelle en fréquence centrée sur celle du laser. Nous observons la fonction sur une fenêtre de largeur $w_s = 5$ avec un pas de discrétisation de $\Delta x = 0.15$. Ici encore, ces valeurs correspondent grossièrement aux conditions expérimentales de notre instrument. La figure 5.1a trace le pic et la figure 5.1b compare la transformée de Fourier théorique de ce pic (donnée par l'équation 5.9) et la transformée de Fourier approchée par la méthode des rectangles (donnée par l'équation 5.11). Remarquons que les deux transformées semblent partager la même enveloppe, mais que la périodisation du signal semble différente entre la transformée de Fourier discrète et la transformée de Fourier continue.

Cette différence est déterministe, et il est donc possible de l'exprimer analytiquement. Cette fonction n'a pu être établie dans cette thèse, mais il est possible et intéressant de le faire. En effet, si cette relation est établie, alors cette nouvelle approche de l'estimation des paramètres d'une Lorentzienne sera par nature :

- Plus rapide qu'un fit, car elle se basera sur l'utilisation d'une transformée de Fourier discrète, qui peut être obtenue par l'algorithme FFT.
- Indépendante de l'utilisateur, en effet elle ne demandera aucun paramètre initial, à l'inverse du fit.
- Plus précise car elle donnera non pas une seule estimation des paramètres, mais un ensemble d'estimations, correspondant aux fréquences de la transformée de Fourier discrète. En particulier, elle permettra d'estimer les paramètres de la fonction aux basses fréquences. Ceci est intéressant, car l'enveloppe de la transformée de Fourier de la Lorentzienne est une exponentielle décroissante avec les fréquences. Ainsi, dans l'hypothèse d'un bruit blanc, l'estimation des paramètres de la Lorentzienne sera d'autant moins sensible au bruit que la fréquence à laquelle ses paramètres seront estimés sera faible.

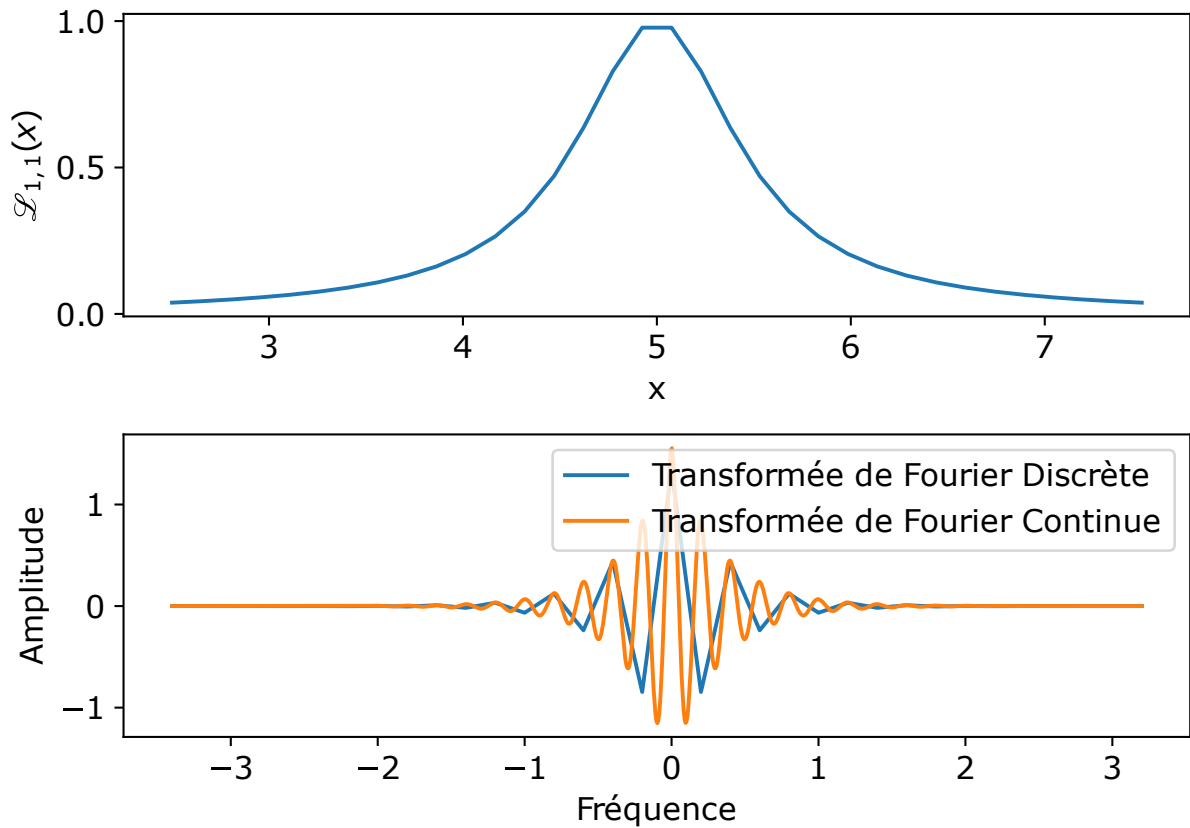


FIGURE 5.1 – Comparaison des transformées discrètes et continues d'une fonction Lorentzienne. a) Lorentzienne reprenant les paramètres attendus pour un pic Brillouin d'eau observé via un spectromètre VIPA classique. b) Comparaison des transformées de Fourier continues de la version continue et discrète d'une Lorentzienne reprenant les paramètres d'un pic Brillouin d'eau.

Il serait intéressant de développer cette méthode qui pourrait présenter une avancée dans le traitement de ce type de courbe, pour les spectromètres VIPA, mais également dans d'autres disciplines où des formes de courbes Lorentziennes apparaissent du fait de l'observation de phénomènes aléatoires suivant des lois de Cauchy (nous pouvons en particulier penser à la résonance magnétique nucléaire).

Notons enfin que cette méthode reste fondamentalement une transformée de Fourier discrète, une transformée linéaire. Ce point est là aussi intéressant quand l'on se rappelle que le signal observé en microspectroscopie Brillouin, à travers un spectromètre VIPA, est la convolution d'une Lorentzienne par une intégrale de fonctions (voir chapitre 1). Notre approche conservant la linéarité, elle peut être déclinée pour prendre en compte l'élargissement des spectres dû à l'ouverture numérique de l'objectif et donc pallier le principal défaut des méthodes traditionnelles de résolutions de spectres Brillouin : le fait que l'on ne puisse pas prendre en

compte l'effet de l'ouverture numérique dans le traitement des données.

5.3 Spectromètre VIPA à double dispersion

Les développements du chapitre 2 ont mis en évidence l'apparition de courbures sur les fronts d'interférences constructives des amas. Nous avons alors examiné deux approches pour résoudre ce problème : la correction numérique de ces courbures et le dimensionnement du spectromètre pour les éliminer. Une troisième option est envisageable, et nous l'étudierons dans cette section : utiliser ces courbures à notre avantage.

Nous avons établi que ces courbures intervenaient parce que la divergence du faisceau était trop importante. Dans l'optique de Fourier, cette divergence est en réalité l'image de la fréquence spatiale du signal, et nous pouvons proposer de voir le spectromètre de cette manière. La figure 5.2 propose une représentation du spectrographe VIPA présenté en détail au chapitre 2, où les flèches rouges indiquent la présence de plans en relation d'image avec la source du faisceau ou en relation d'image avec la transformée de Fourier spatiale du faisceau. Nous remarquons que le détecteur est dans l'espace de Fourier. Ainsi, lorsque nous observons le spectre d'interférence obtenu sur le détecteur, nous visualisons à la fois une distribution spectrale du signal, et une distribution en fréquences spatiales du signal.

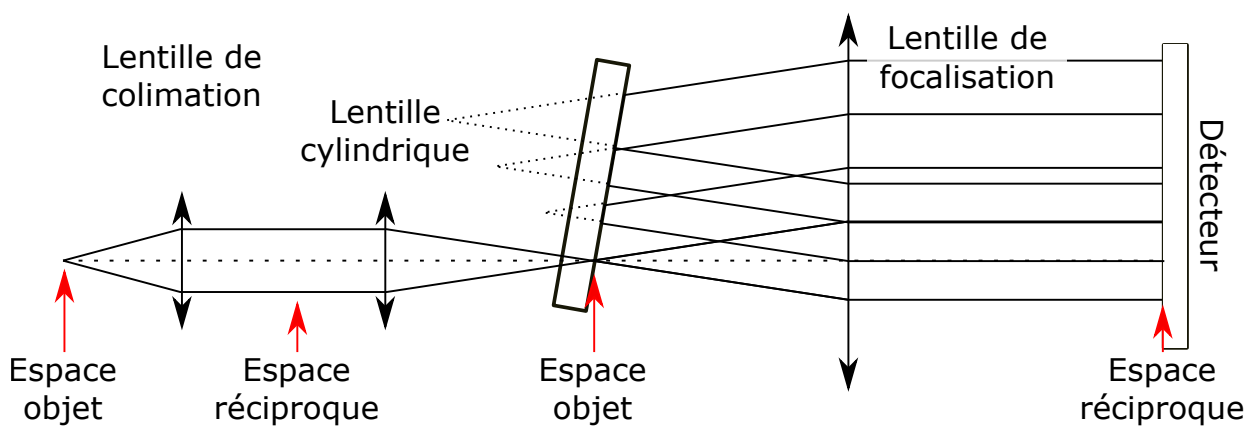


FIGURE 5.2 – Schéma d'un spectromètre VIPA avec lentille de focalisation dans le VIPA sphérique.

Dans le cas où la lentille cylindrique serait remplacée par une lentille sphérique, nous obtiendrions sur le détecteur une image des composantes fréquentielles spatiales du signal induisant des interférences constructives à une longueur d'onde définie. En clair, il serait possible de

différencier les directions de collections du signal sur le détecteur, en utilisant le VIPA comme un élément de dispersion spectral non plus unidimensionnel, mais bidimensionnel.

La figure 5.3 illustre ainsi une potentielle application à cette vision du VIPA. Le signal est collecté via un angle solide représenté en figure 5.3a par un objectif qui renvoie un faisceau correspondant à la transformée de Fourier spatiale du faisceau. Cette transformée de Fourier spatiale correspond en pratique à une décomposition en fréquences spatiales du faisceau, qui peut être paramétrée en une longitude θ et une latitude φ . Si ce faisceau est alors directement focalisé dans le VIPA, c'est-à-dire si une relation d'image existe entre le second miroir du VIPA et l'objet, nous pourrons associer en toute rigueur chaque point du détecteur à un doublet (*longitude, latitude*), ou, pour reprendre nos notations, (θ, φ) . C'est ce qui est schématisé en figure 5.3b. Si le détecteur est maintenant situé au plan focal de la lentille sphérique de focalisation schématisée en figure 5.2, alors chaque lieu d'interférence constructive observée sur le détecteur sera associé à un doublet (θ, φ) . Notons alors que la figure d'interférence du signal, et plus particulièrement la relation pixel-fréquence, ne dépend que des paramètres du spectromètre.

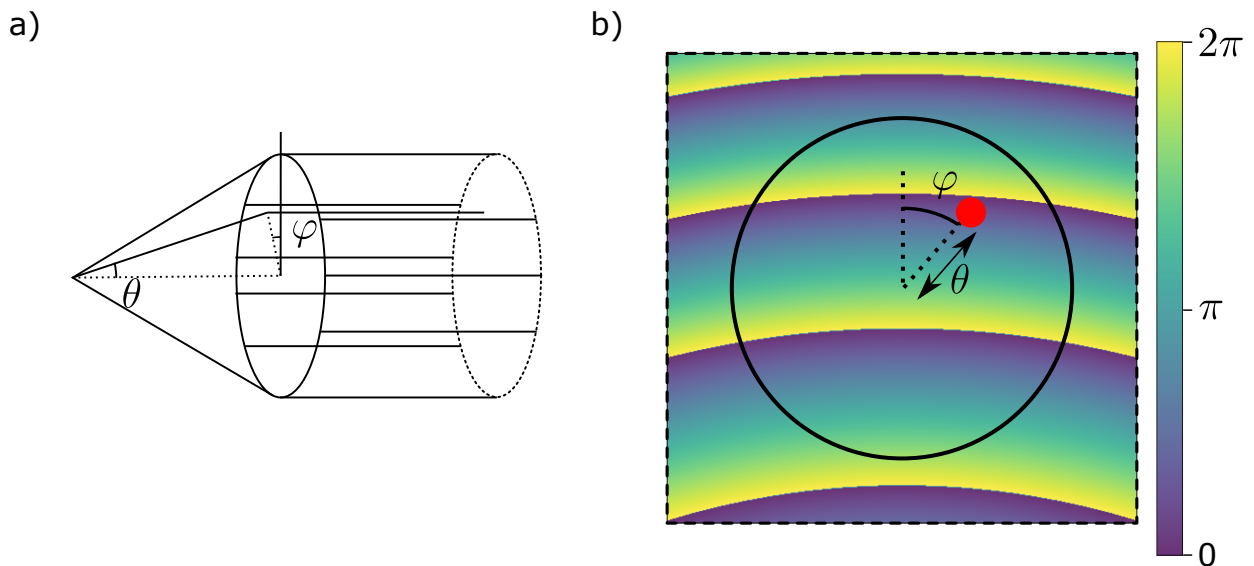


FIGURE 5.3 – Preuve de concept d'un spectromètre VIPA à deux axes de dispersion et utilisation pour la décomposition en fréquence spatiale d'un signal.

Cette approche de l'instrument présente deux intérêts :

- Soit l'échantillon est isotrope, auquel cas l'élargissement des pics par le processus décrit en chapitre 1 est ici beaucoup moins important, car l'intégrale 1.16 ne s'effectue

plus que sur l'illumination

- Soit l'échantillon est anisotrope, auquel cas nous pouvons directement mesurer l'anisotropie, en rappelant que la direction de collection est liée à la direction de l'onde mécanique.

Notons enfin que dans cette implémentation, le signal est discrétisé sur un détecteur plan. Il en découle une discrétisation du signal sur un nombre de pixels beaucoup plus élevé, qui, au regard de l'étude portée par Török *et al.* [150], laisse entrevoir une meilleure résolution spectrale.

Cette nouvelle architecture d'instrument représente la perspective la plus intéressante de cette thèse, car elle place la spectroscopie Brillouin en tant que technique, au cœur d'un domaine émergent et prometteur : l'étude de l'anisotropie à l'échelle microscopique dans les échantillons biologiques [51].

Bibliographie

- [1] Giuseppe Antonacci, Timon Beck, Alberto Bilenca, Jürgen Czarske, Kareem Elsayad, Jochen Guck, Kyoo Hyun Kim, Benedikt Krug, Francesca Palombo, Robert Prevedel, and Giuliano Scarcelli. Recent progress and current opinions in Brillouin microscopy for life science applications. *Biophysical Reviews*, 12 :615–624, 2020.
- [2] G. Bao and S. Suresh. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*, 2(11), November 2003.
- [3] Matthew J. Paszek, Nastaran Zahir, Kandice R. Johnson, Johnathon N. Lakins, Gabriela I. Rozenberg, Amit Gefen, Cynthia A. Reinhart-King, Susan S. Margulies, Micah Dembo, David Boettiger, Daniel A. Hammer, and Valerie M. Weaver. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3) :241–254, September 2005.
- [4] Shelly R. Peyton and Andrew J. Putnam. Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *Journal of Cellular Physiology*, 204(1) :198–209, July 2005.
- [5] Milan Makale. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Research Part C : Embryo Today : Reviews*, 81(4) :329–343, December 2007.
- [6] Parth Patwari and Richard T. Lee. Mechanical Control of Tissue Morphogenesis. *Circulation Research*, 103(3) :234–243, August 2008.
- [7] D. Ambrosi, S. Pezzuto, D. Riccobelli, T. Stylianopoulos, and P. Ciarletta. Solid Tumors Are Poroelastic Solids with a Chemo-mechanical Feedback on Growth. *Journal of Elasticity*, 129(1-2) :107–124, December 2017.
- [8] Max Urbanczyk, Shannon L. Layland, and Katja Schenke-Layland. The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues. *Matrix Biology*, 85–86, January 2020.
- [9] John Sandercock. Table Stable - Optical Instruments. <http://www.tablestable.com/en/products/list/1/>, January 2024.

- [10] Giuliano Scarcelli, Pilhan Kim, and Seok Hyun Yun. Cross-axis cascading of spectral dispersion. *Optics Letters*, 33(24) :2979, December 2008.
- [11] Francesca Palombo and Daniele Fioretto. Brillouin Light Scattering : Applications in Biomedical Sciences. *Chemical Reviews*, 119(13), 2019.
- [12] Kareem Elsayad, Silvia Polakova, and Juraj Gregan. Probing Mechanical Properties in Biology Using Brillouin Microscopy. *Trends in Cell Biology*, 29(8), August 2019.
- [13] Christine Poon, Joshua Chou, Michael Cortie, and Irina Kabakova. Brillouin imaging for studies of micromechanics in biology and biomedicine : From current state-of-the-art to future clinical translation. *Journal of Physics : Photonics*, 3(1), December 2020.
- [14] Jitao Zhang and Giuliano Scarcelli. Mapping mechanical properties of biological materials via an add-on Brillouin module to confocal microscopes. *Nature Protocols*, 16(2) :1251–1275, February 2021.
- [15] Zachary Coker, Maria Troyanova-Wood, Andrew J. Traverso, Talgat Yakupov, Zhandos N. Utegulov, and Vladislav V. Yakovlev. Assessing performance of modern Brillouin spectrometers. *Optics Express*, 26(3) :2400, February 2018.
- [16] Guqi Yan, Antony Bazir, Jeremie Margueritat, and Thomas Dehoux. Evaluation of commercial virtually imaged phase array and Fabry-Pérot based Brillouin spectrometers for applications to biology. *Biomedical Optics Express*, 11(12), 2020.
- [17] Caleb Jensen and Yong Teng. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, March 2020.
- [18] James Clerk Maxwell. A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 155(January) :459–512, 1864.
- [19] Léon Brillouin. Diffusion de la lumière et des rayons X par un corps transparent homogène. *Annales de Physique*, 9(17), April 1922.
- [20] Leonid Issaakovitch Mandelstam. Light Scattering by inhomogeneous media. *Zhurnal Russian Fizicheskoi Khimii*, 58 :381, 1926.
- [21] R Y Chiao, C H Townes, and B P Stoicheff. Stimulated Brillouin scattering and coherent generation of intense hypersonic waves. *Physical Review Letters*, 12(21) :592–595, 1964.
- [22] Y. R. Shen and N. Bloembergen. Theory of Stimulated Brillouin and Raman Scattering. *Physical Review*, 137(6A) :A1787–A1805, March 1965.

-
- [23] C. J. Montrose, V. A. Solov'yev, and T. A. Litovitz. Brillouin Scattering and Relaxation in Liquids. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 43(1), 1968.
- [24] Carlo E. Bottani and Daniele Fioretto. Brillouin scattering of phonons in complex materials. *Advances in Physics : X*, 3(1) :1467281, January 2018.
- [25] D. Heiman, D. S. Hamilton, and R. W. Hellwarth. Brillouin scattering measurements on optical glasses. *Physical Review B*, 19(12) :6583–6592, June 1979.
- [26] L.D. Landau and E.M. Lifshitz. Electrodynamics of Continuous Media -Volume 8 of Theoretical Physics, 1984.
- [27] Immanuel L. Fabelinskii. *Molecular Scattering of Light*. Springer New York, Boston, MA, 1968.
- [28] L D Landau and G Placzek. Struktur der unverschobenen Streulinie. *Z Phys Sowjetunion*, 5 :172–173, 1934.
- [29] Herman Z. Cummins and Robert W. Gammon. Rayleigh and Brillouin Scattering in Liquids : The Landau—Placzek Ratio. *The Journal of Chemical Physics*, 44(7) :2785–2796, April 1966.
- [30] Giuseppe Antonacci, Matthew R. Foreman, Carl Paterson, and Peter Török. Spectral broadening in Brillouin imaging. *Applied Physics Letters*, 103(22), November 2013.
- [31] J Ostwald, W Pazold, and O. Weis. High-resolution Brillouin spectroscopy of water. *Applied Physics*, 13(4) :351–356, August 1977.
- [32] D. P. Eastman, A. Hollinger, J. Kenemuth, and D. H. Rank. Temperature coefficient of hypersonic sound and relaxation parameters for some liquids. *The Journal of Chemical Physics*, 50(4) :1567–1581, 1969.
- [33] Sheldon T Bailey, M D Twa, J C Gump, M Venkiteshwar, M A Bullimore, and R Sooryakumar. Light-Scattering Study of the Normal Human Eye Lens : Elastic Properties and Age Dependence. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 57(12) :2910–2917, December 2010.
- [34] Giuliano Scarcelli, Pilhan Kim, and Seok Hyun Yun. In Vivo Measurement of Age-Related Stiffening in the Crystalline Lens by Brillouin Optical Microscopy. *Biophysical Journal*, 101(6), September 2011.
- [35] Giuliano Scarcelli and Seok Hyun Yun. In vivo Brillouin optical microscopy of the human eye. *Optics Express*, 20(8), April 2012.

- [36] Giuliano Scarcelli, Sebastien Besner, Roberto Pineda, and Seok Hyun Yun. Biomechanical Characterization of Keratoconus Corneas Ex Vivo With Brillouin Microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(7), July 2014.
- [37] Giuliano Scarcelli, William J. Polacheck, Hadi T. Nia, Kripa Patel, Alan J. Grodzinsky, Roger D. Kamm, and Seok Hyun Yun. Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by Brillouin microscopy. *Nature Methods*, 2015.
- [38] Sebastien Besner, Giuliano Scarcelli, Roberto Pineda, and Seok Hyun Yun. In vivo brillouin analysis of the aging crystalline lens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(13) :5093–5100, October 2016.
- [39] Hongyuan Zhang, Lara Asroui, J. Bradley Randleman, and Giuliano Scarcelli. Motion-tracking Brillouin microscopy for in-vivo corneal biomechanics mapping. *Biomedical Optics Express*, 13(12) :6196, 2022.
- [40] Maurizio Mattarelli, Massimo Vassalli, and Silvia Caponi. Relevant Length Scales in Brillouin Imaging of Biomaterials : The Interplay between Phonons Propagation and Light Focalization, September 2020.
- [41] Alfonso Blázquez-Castro. Optical Tweezers : Phototoxicity and Thermal Stress in Cells and Biomolecules. *Micromachines*, 10(8) :507, July 2019.
- [42] Andrew J. Traverso, Jonathan V. Thompson, Zachary A. Steelman, Zhaokai Meng, Marlan O. Scully, and Vladislav V. Yakovlev. Dual Raman-Brillouin Microscope for Chemical and Mechanical Characterization and Imaging. *Analytical Chemistry*, 87(15) :7519–7523, August 2015.
- [43] Raksha Raghunathan, Jitao Zhang, Chen Wu, Justin Rippey, and Manmohan Singh. Evaluating biomechanical properties of murine embryos using Brillouin microscopy and optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 22(08), 2017.
- [44] Carlo Bevilacqua, Héctor Sánchez-Iranzo, Dmitry Richter, Alba Diz-Muñoz, and Robert Prevedel. Imaging mechanical properties of sub-micron ECM in live zebrafish using Brillouin microscopy. *Biomedical Optics Express*, 10(3) :1420, March 2019.
- [45] Zhaokai Meng and Vladislav V. Yakovlev. Optimizing signal collection efficiency of the VIPA-based Brillouin spectrometer. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 08(04) :1550021, July 2015.

-
- [46] Stephan Reiss, Gerolf Burau, Oliver Stachs, Rudolf Guthoff, and Heinrich Stolz. Spatially resolved Brillouin spectroscopy to determine the rheological properties of the eye lens. *Biomedical Optics Express*, 2(8), August 2011.
- [47] Zhaokai Meng and Vladislav V. Yakovlev. Subcellular imaging of mechanical and chemical properties using Brillouin and Raman microspectroscopies. page 93280P, April 2015.
- [48] Zhaokai Meng, Berkay Basagaoglu, and Vladislav V. Yakovlev. Atherosclerotic plaque detection by confocal Brillouin and Raman microscopies. page 93033N, February 2015.
- [49] Zhaokai Meng and Vladislav V. Yakovlev. Precise Determination of Brillouin Scattering Spectrum Using a Virtually Imaged Phase Array (VIPA) Spectrometer and Charge-Coupled Device (CCD) Camera. *Applied Spectroscopy*, 70(8) :1356–1363, August 2016.
- [50] Zhaokai Meng, Sandra C. Bustamante Lopez, Kenith E. Meissner, and Vladislav V. Yakovlev. Subcellular measurements of mechanical and chemical properties using dual Raman-Brillouin microspectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 9(3), March 2016.
- [51] Hamid Keshmiri, Domagoj Cikes, Marketa Samalova, Lukas Schindler, Michal Urbanek, Ivan Yudushkin, Dea Slade, and Wolfgang J Weninger. Imaging the microscopic viscoelastic anisotropy in living cells. *bioRxiv*, pages 1–29, 2023.
- [52] Jitao Zhang, Antonio Fiore, Seok-Hyun Yun, Hanyoup Kim, and Giuliano Scarcelli. Line-scanning Brillouin microscopy for rapid non-invasive mechanical imaging. *Scientific Reports*, 6(1), December 2016.
- [53] Carlo Bevilacqua, Juan Manuel Gomez, Ulla-Maj Fiuza, Chii Jou Chan, Ling Wang, Sebastian Hambura, Manuel Eguren, Jan Ellenberg, Alba Diz-Muñoz, Maria Leptin, and Robert Prevedel. High-resolution line-scan Brillouin microscopy for live imaging of mechanical properties during embryo development. *Nature Methods*, page 2022.04.25.489364, March 2023.
- [54] W. H. Steel. Luminosity, Throughput, or Etendue? *Applied Optics*, 13(4) :704, April 1974.
- [55] R. John Koschel. *Illumination Engineering : Design with Nonimaging Optics*.
- [56] Allan W. Snyder and J. D. Love. *Optical Waveguide Theory*. Number 190 in Science Paperbacks. Chapman and Hall, London ; New York, 1983.
- [57] Masataka Shirasaki. Large angular dispersion by a virtually imaged phased array and its application to a wavelength demultiplexer. *Optics Letters*, 21(5), March 1996.

- [58] Masataka Shirasaki, A N Akhter, and C Lin. Virtually Imaged Phased Array with Graded Reflectivity. *Technology*, 11(11) :1443–1445, 1999.
- [59] Shijun Xiao and Andrew M. Weiner. 2-D wavelength demultiplexer with potential for ≤ 1000 channels in the C-band. *Conference Proceedings - Lasers and Electro-Optics Society Annual Meeting-LEOS*, 2(13) :573–574, 2004.
- [60] S. X. Wang, Shijun Xiao, and A. M. Weiner. Broadband, high spectral resolution 2-D wavelength-parallel polarimeter for Dense WDM systems. *Optics Express*, 13(23) :9374, 2005.
- [61] Shijun Xiao and Andrew M. Weiner. An eight-channel hyperfine wavelength demultiplexer using a virtually imaged phased-array (VIPA). *IEEE Photonics Technology Letters*, 17(2) :372–374, February 2005.
- [62] Scott A. Diddams, Leo Hollberg, and Vela Mbele. High-resolution spectral fingerprinting with a stabilized femtosecond laser frequency comb. *Optics InfoBase Conference Papers*, (July) :10–13, 2006.
- [63] Scott A. Diddams, Leo Hollberg, and Vela Mbele. Molecular fingerprinting with the resolved modes of a femtosecond laser frequency comb. *Nature*, 445(7128) :627–630, February 2007.
- [64] Lora Nugent-Glandorf, Tyler Neely, Florian Adler, Adam J. Fleisher, Kevin C. Cossel, Bryce Bjork, Tim Dinneen, Jun Ye, and Scott A. Diddams. Mid-infrared virtually imaged phased array spectrometer for rapid and broadband trace gas detection. *Optics Letters*, 37(15) :3285, 2012.
- [65] Xiaoming Zhu, Dong Lin, Zhibo Hao, Liang Wang, and Jinping He. A VIPA Spectrograph with Ultra-high Resolution and Wavelength Calibration for Astronomical Applications. *The Astronomical Journal*, 160(3), August 2020.
- [66] Max Born and Emil Wolf. *Principles of Optics (7th Edition)*. 2019.
- [67] Joseph W. Goodman and Mary E. Cox. Introduction to Fourier Optics. *Physics Today*, 22(4) :97–101, April 1969.
- [68] Jitao Zhang, Milos Nikolic, Kandice Tanner, and Giuliano Scarcelli. Rapid biomechanical imaging at low irradiation level via dual line-scanning Brillouin microscopy. *Nature Methods*, 20(May), 2023.
- [69] Albert Vega, Andrew M Weiner, and Christopher Lin. Generalized grating equation for virtually-imaged phased-array spectral dispersers. Technical report, 2003.

-
- [70] Shijun Xiao, Andrew M. Weiner, and Christopher Lin. A dispersion law for virtually imaged phased-array spectral dispersers based on paraxial wave theory. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 40(4) :420–426, April 2004.
- [71] Xinrong Hu, Qiang Sun, Jing Li, Chun Li, Ying Liu, and Jianzhong Zhang. Spectral dispersion modeling of virtually imaged phased array by using angular spectrum of plane waves. *Optics Express*, 23(1), 2015.
- [72] Pei-Jung Wu, Irina V. Kabakova, Jeffrey W. Ruberti, Joseph M. Sherwood, Iain E. Dunlop, Carl Paterson, Peter Török, and Darryl R. Overby. Water content, not stiffness, dominates Brillouin spectroscopy measurements in hydrated materials. *Nature Methods*, 15(8) :561–562, August 2018.
- [73] S. V. Adichtchev, Yu. A. Karpegina, K. A. Okotrub, M. A. Surovtseva, V. A. Zykova, and N. V. Surovtsev. Brillouin spectroscopy of biorelevant fluids in relation to viscosity and solute concentration. *Physical Review E*, 99(6) :062410, June 2019.
- [74] Miloš Nikolić and Giuliano Scarcelli. Long-term Brillouin imaging of live cells with reduced absorption-mediated damage at 660nm wavelength. *Biomedical Optics Express*, 10(4) :1567, April 2019.
- [75] Raimund Schlüssler, Stephanie Möllmert, Shada Abuhattum, Gheorghe Cojoc, Paul Müller, Kyoohyun Kim, Conrad Möckel, Conrad Zimmermann, Jürgen Czarske, and Jochen Guck. Mechanical Mapping of Spinal Cord Growth and Repair in Living Zebrafish Larvae by Brillouin Imaging. *Biophysical Journal*, 115(5) :911–923, September 2018.
- [76] Zhaokai Meng, Andrew J. Traverso, and Vladislav V. Yakovlev. Background cleanup in Brillouin microspectroscopy of scattering medium. *Optics Express*, 22(5) :5410, March 2014.
- [77] Zhaokai Meng, Georgi I. Petrov, and Vladislav V. Yakovlev. Flow cytometry using Brillouin imaging and sensing via time-resolved optical (BISTRO) measurements. *The Analyst*, 140(21), 2015.
- [78] Kim V. Berghaus, Seok H. Yun, and Giuliano Scarcelli. High speed sub-GHz spectrometer for Brillouin scattering analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(106), December 2015.
- [79] Zachary Steelman, Zhaokai Meng, Andrew J. Traverso, and Vladislav V. Yakovlev. Brillouin spectroscopy as a new method of screening for increased CSF total protein during bacterial meningitis. *Journal of Biophotonics*, 8(5), May 2015.

- [80] Antonio Fiore, Jitao Zhang, Peng Shao, Seok Hyun Yun, and Giuliano Scarcelli. High-extinction virtually imaged phased array-based Brillouin spectroscopy of turbid biological media. *Applied Physics Letters*, 108(20), May 2016.
- [81] Peng Shao, Sebastien Besner, Jitao Zhang, Giuliano Scarcelli, and Seok-Hyun Yun. Etalon filters for Brillouin microscopy of highly scattering tissues. *Optics Express*, 24(19) :22232, September 2016.
- [82] Chii Jou Chan, Carlo Bevilacqua, and Robert Prevedel. Mechanical mapping of mammalian follicle development using Brillouin microscopy. *Communications Biology*, 4(1) :1133, December 2021.
- [83] Miloš Nikolić, Giuliano Scarcelli, and Kandice Tanner. Multimodal microscale mechanical mapping of cancer cells in complex microenvironments. *Biophysical Journal*, 121(19) :3586–3599, October 2022.
- [84] Charles W. Ballmann, Zhaokai Meng, and Vladislav V. Yakovlev. Nonlinear Brillouin spectroscopy : What makes it a better tool for biological viscoelastic measurements. *Biomedical Optics Express*, 10(4), April 2019.
- [85] Govind P. Agrawal and Niloy K. Dutta. *Semiconductor Lasers*. Springer US, Boston, MA, 1993.
- [86] D. Sands. *Diode Lasers*. 2005.
- [87] L. Ricci, M. Weidemüller, T. Esslinger, A. Hemmerich, C. Zimmermann, V. Vuletic, W. König, and T. W. Hänsch. A compact grating-stabilized diode laser system for atomic physics. *Optics Communications*, 117(5-6) :541–549, 1995.
- [88] Daniel A. Steck. Rubidium 85 D Line Data. 2003.
- [89] Paul Siddons, Charles S. Adams, Chang Ge, and Ifan G. Hughes. Absolute absorption on rubidium D lines : Comparison between theory and experiment. *Journal of Physics B : Atomic, Molecular and Optical Physics*, 41(15), 2008.
- [90] Seo Ro Shin, Heung Ryoul Noh, and Heung Sik Noh. Calculation of the absorption coefficient for a doppler-broadened multilevel atom. *Journal of the Korean Physical Society*, 56(11) :195–198, 2010.
- [91] T. Toyoda and M. Yabe. The temperature dependence of the refractive indices of SrTiO₃ and TiO₂. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 16(12) :97–100, 1983.
- [92] Sheila Reynolds. Swift Glass - Material of the month : Fused silica.

-
- [93] G. E. Devlin, J. L. Davis, L. Chase, and S. Geschwind. Absorption of Unshifted Scattered Light by a Molecular I₂ Filter in Brillouin and Raman Scattering. *Applied Physics Letters*, 19(5), September 1971.
- [94] Zhaokai Meng, Andrew J. Traverso, Charles W. Ballmann, Maria A Troyanova-Wood, and Vladislav V. Yakovlev. Seeing cells in a new light : A renaissance of Brillouin spectroscopy. *Adv. Opt. Photon.*, 8(2) :300–327, June 2016.
- [95] Jan Rix, Ortrud Uckermann, Katrin Kirsche, Gabriele Schackert, Edmund Koch, Matthias Kirsch, and Roberta Galli. Correlation of biomechanics and cancer cell phenotype by combined Brillouin and Raman spectroscopy of U87-MG glioblastoma cells. *Journal of The Royal Society Interface*, 19(192), July 2022.
- [96] Raimund Schlüssler, Kyoohyun Kim, Martin Nötzel, Anna Verena Taubenberger, Shada Abuhattum, Timon Beck, Paul Müller, Shovamaye Maharana, Gheorghe Cojoc, Salvatore Girardo, Andreas Hermann, Simon Alberti, and Jochen Guck. Correlative all-optical quantification of mass density and mechanics of sub-cellular compartments with fluorescence specificity. *eLife*, 11 :2020.10.30.361808, January 2022.
- [97] Giuseppe Antonacci, Guillaume Lepert, Carl Paterson, and Peter Török. Elastic suppression in Brillouin imaging by destructive interference. *Applied Physics Letters*, 107(6), August 2015.
- [98] Guillaume Lepert, Ricardo M. Gouveia, Che J. Connon, and Carl Paterson. Assessing corneal biomechanics with Brillouin spectro-microscopy. *Faraday Discussions*, 187, 2016.
- [99] Giuseppe Antonacci, Kareem Elsayad, and Dario Polli. On-Chip Notch Filter on a Silicon Nitride Ring Resonator for Brillouin Spectroscopy. *ACS Photonics*, 9(3) :772–777, 2022.
- [100] Giuseppe Antonacci, Valeria de Turreis, Alessandro Rosa, and Giancarlo Ruocco. Background-deflection Brillouin microscopy reveals altered biomechanics of intracellular stress granules by ALS protein FUS. *Communications Biology*, 1(1) :139, December 2018.
- [101] Giuliano Scarcelli and Seok Hyun Yun. Multistage VIPA etalons for high-extinction parallel Brillouin spectroscopy. *Optics Express*, 19(11), May 2011.
- [102] F. Scarponi, Sara Mattana, S. Corezzi, Silvia Caponi, L. Comez, P. Sassi, A. Morresi, M. Paolantoni, L. Urbanelli, C. Emiliani, L. Roscini, L. Corte, G. Cardinali,

- F. Palombo, J. R. Sandercock, and D. Fioretto. High-Performance Versatile Setup for Simultaneous Brillouin-Raman Microspectroscopy. *Physical Review X*, 7(3), July 2017.
- [103] Sara Mattana, Maurizio Mattarelli, Lorena Urbanelli, Krizia Sagini, Carla Emiliani, Mauro Dalla Serra, Daniele Fioretto, and Silvia Caponi. Non-contact mechanical and chemical analysis of single living cells by microspectroscopic techniques. *Light : Science & Applications*, 7(2), February 2018.
- [104] Charles W. Ballmann, Jonathan V. Thompson, Andrew J. Traverso, Zhaokai Meng, Marlan O. Scully, and Vladislav V. Yakovlev. Stimulated Brillouin Scattering Microscopic Imaging. *Scientific Reports*, 5 :1–7, 2015.
- [105] Itay Remer and Alberto Bilenca. High-speed stimulated Brillouin scattering spectroscopy at 780 nm. *APL Photonics*, 1(6), September 2016.
- [106] Itay Remer, Roni Shaashoua, Netta Shemesh, Anat Ben-Zvi, and Alberto Bilenca. High-sensitivity and high-specificity biomechanical imaging by stimulated Brillouin scattering microscopy. *Nature Methods*, 17(9) :913–916, September 2020.
- [107] Charles W. Ballmann, Zhaokai Meng, Andrew J. Traverso, Marlan O. Scully, and Vladislav V. Yakovlev. Impulsive Brillouin microscopy. *Optica*, 4(1) :124, 2017.
- [108] Benedikt Krug, Nektarios Koukourakis, and Juergen W. Czarske. Impulsive stimulated Brillouin microscopy for non-contact, fast mechanical investigations of hydrogels. *Optics Express*, 27(19) :26910, 2019.
- [109] Giuliano Scarcelli, Sebastien Besner, Roberto Pineda, Patricia Kalout, and Seok Hyun Yun. In Vivo Biomechanical Mapping of Normal and Keratoconus Corneas. *JAMA Ophthalmology*, 133(4), April 2015.
- [110] Kareem Elsayad, Stephanie Werner, Marçal Gallemí, Jixiang Kong, Edmundo R. Sánchez Guajardo, Lijuan Zhang, Yvon Jaillais, Thomas Greb, and Youssef Belkhadir. Mapping the subcellular mechanical properties of live cells in tissues with fluorescence emission–Brillouin imaging. *Science Signaling*, 9(435), July 2016.
- [111] Jitao Zhang, Xuefei A. Nou, Hanyoup Kim, and Giuliano Scarcelli. Brillouin flow cytometry for label-free mechanical phenotyping of the nucleus. *Lab on a Chip*, 17(4), 2017.
- [112] Giuseppe Antonacci and Sietse Braakman. Biomechanics of subcellular structures by non-invasive Brillouin microscopy. *Scientific Reports*, 6, 2016.

-
- [113] S. Caponi, M. Dionigi, D. Fioretto, M. Mattarelli, L. Palmieri, and G. Socino. Electro-optic modulator for high resolution Brillouin scattering measurements. *Review of Scientific Instruments*, 72(1 I) :198–200, 2001.
- [114] Omar F. Zouani, Thomas Dehoux, Marie-Christine Durrieu, and Bertrand Audoin. Universality of the network-dynamics of the cell nucleus at high frequencies. *Soft Matter*, 10(43), September 2014.
- [115] Jitao Zhang, Farid Alisafaei, Miloš Nikolić, Xuefei A. Nou, Hanyoup Kim, Vivek B. Shenoy, and Giuliano Scarcelli. Nuclear Mechanics within Intact Cells Is Regulated by Cytoskeletal Network and Internal Nanostructures. *Small*, 16(18), 2020.
- [116] Kweku A. Addae-Mensah and John P. Wikswo. Measurement Techniques for Cellular Biomechanics In Vitro. *Experimental Biology and Medicine*, 233(7), July 2008.
- [117] Sara Mattana, Silvia Caponi, Francesco Tamagnini, Daniele Fioretto, and Francesca Palombo. Viscoelasticity of amyloid plaques in transgenic mouse brain studied by Brillouin microspectroscopy and correlative Raman analysis. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 10(06) :1742001, November 2017.
- [118] Sara Mattana, M. Alunni Cardinali, Silvia Caponi, D. Casagrande Pierantoni, L. Corte, L. Roscini, G. Cardinali, and D. Fioretto. High-contrast Brillouin and Raman microspectroscopy for simultaneous mechanical and chemical investigation of microbial biofilms. *Biophysical Chemistry*, 229, October 2017.
- [119] Giuliano Scarcelli, Roberto Pineda, and Seok Hyun Yun. Brillouin Optical Microscopy for Corneal Biomechanics. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(1), January 2012.
- [120] Rafael J. Jiménez Riobóo, Manuel Desco, and María Victoria Gómez-Gavero. Impact of optical tissue clearing on the Brillouin signal from biological tissue samples. *Biomedical Optics Express*, 10(6), June 2019.
- [121] Min Gu. *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. WORLD SCIENTIFIC, July 1996.
- [122] Tim Dabbs and Monty Glass. Fiber-optic confocal microscope : FOCON. *Applied Optics*, 31(16) :3030, 1992.
- [123] Michael J. Nasse and Jörg C. Woehl. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 27(2) :295, 2010.

- [124] Peter J. Shaw and David J. Rawlins. The point-spread function of a confocal microscope : Its measurement and use in deconvolution of 3-D data. *Journal of Microscopy*, 163(2) :151–165, 1991.
- [125] Tony Wilson and A. R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Optics Letters*, 12(4) :227, 1987.
- [126] Tony Wilson. Resolution and optical sectioning in the confocal microscope. *Journal of Microscopy*, 244(2) :113–121, November 2011.
- [127] R. Gauderon and C. J.R. Sheppard. Signal level in a confocal scanning microscope using step-index optical fibres. *Journal of Modern Optics*, 45(3) :529–537, 1998.
- [128] Min Gu, X. Gan, and C. J. R. Sheppard. Three-dimensional coherent transfer functions in fiber-optical confocal scanning microscopes. *Journal of the Optical Society of America A*, 8(7) :1019, 1991.
- [129] Eitan Edrei, Milos Nikolic, and Giuliano Scarcelli. Improving localization precision of Brillouin measurements using spectral autocorrelation analysis. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 10(06) :1742004, November 2017.
- [130] Noemi Correa, Simon Harding, Michelle Bailey, Sophie Brasselet, and Francesca Palombo. Image analysis applied to Brillouin images of tissue-mimicking collagen gels. *Biomedical Optics Express*, 10(3), March 2019.
- [131] Jayanta Debnath, Senthil K. Muthuswamy, and Joan S. Brugge. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, 30(3) :256–268, 2003.
- [132] Monika E. Dolega, Fabien Abeille, Nathalie Picollet-D’ahan, and Xavier Gidrol. Controlled 3D culture in Matrigel microbeads to analyze clonal acinar development. *Biomaterials*, 52(1) :347–357, 2015.
- [133] Bastien Laperrousaz, Stephanie Porte, Sophie Gerbaud, Ville Härmä, Frédérique Kermarrec, Virginie Hourtane, Frédéric Bottausci, Xavier Gidrol, and Nathalie Picollet-D’ahan. Direct transfection of clonal organoids in Matrigel microbeads : A promising approach toward organoid-based genetic screens. *Nucleic Acids Research*, 46(12) :e70–e70, July 2018.
- [134] Pei-Hsun Wu, Daniele M. Gilkes, Jude M. Phillip, Akshay Narkar, Thomas Wen-Tao Cheng, Jorge Marchand, Meng-Horng Lee, Rong Li, and Denis Wirtz. Single-cell morphology encodes metastatic potential. *Science Advances*, 6(4), January 2020.

-
- [135] Nargess Khalilgharibi, Giulia Paci, and Yanlan Mao. Line-scanning speeds up Brillouin microscopy. *Nature Methods*, 20(5) :643–644, 2023.
- [136] Christina Conrad, Kelsey M. Gray, Kimberly M. Stroka, Imran Rizvi, and Giuliano Scarcelli. Mechanical Characterization of 3D Ovarian Cancer Nodules Using Brillouin Confocal Microscopy. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 12(3) :215–226, June 2019.
- [137] Guqi Yan, Sylvain Monnier, Malèke Mouelhi, and Thomas Dehoux. Probing molecular crowding in compressed tissues with Brillouin light scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(4), January 2022.
- [138] Lucy Erin O’Brien, Mirjam M P Zegers, and Keith E Mostov. Building epithelial architecture : Insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7) :531–537, July 2002.
- [139] Electra Coucouvanis and Gail R. Martin. Signals for death and survival : A two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell*, 83(2) :279–287, 1995.
- [140] Electra Coucouvanis and Gail R. Martin. BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development*, 126(3) :535–546, 1999.
- [141] Jayanta Debnath, Kenna R. Mills, Nicole L. Collins, Mauricio J. Reginato, Senthil K. Muthuswamy, and Joan S. Brugge. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*, 111(5) :757, 2002.
- [142] Małgorzata Bruska, Marzena Dominiak, Ievgeniia Kocherova, Artur Bryja, Paul Mozdziak, Tarcio Hiroshi, Ishimine Skiba, and Jamil A Shibli. Photobiomodulation — Underlying Mechanism and Clinical Applications. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1724), 2020.
- [143] L. Yang. Analytical treatment of virtual image phase array. In *Optical Fiber Communication Conference and Exhibit*. Opt Soc. America, 2002.
- [144] A Mokhtari and A A Shishegar. A Rigorous Vectorial Gaussian Beam Modeling of Virtually-Imaged-Phased-Array. Technical report.
- [145] Xiaoming Zhu, Dong Lin, Zhongnan Zhang, Xintong Xie, and Jinping He. Dispersion Characteristics of the Multi-mode Fiber-fed VIPA Spectrograph. *The Astronomical Journal*, 165(6) :228, 2023.

- [146] Antonio Fiore, Carlo Bevilacqua, and Giuliano Scarcelli. Direct Three-Dimensional Measurement of Refractive Index via Dual Photon-Phonon Scattering. *Physical Review Letters*, 122(10), March 2019.
- [147] Andrew M. Weiner. Reply to Comment on “Generalized grating equation for virtually-imaged phased-array spectral dispersions”. *Applied Optics*, 51(34) :8187, December 2012.
- [148] Robert Chabbal. V. — Qualité des lames et couches réfléchissantes pour le Fabry-Perot - Finesse limite d’un Fabry-Perot formé de lames imparfaites. *Journal de Physique et le Radium*, 19(3) :295–300, 1958.
- [149] Kareem Elsayad. Spectral Phasor Analysis for Brillouin Microspectroscopy. *Frontiers in Physics*, 7, April 2019.
- [150] Peter Török and Matthew R. Foreman. Precision and informational limits in inelastic optical spectroscopy. *Scientific Reports*, 9(1), December 2019.

Deuxième partie

Annexes

Annexe A

Détails de calculs

A.1 Différence de chemin optique

La figure A.1 schématise la configuration usuelle rencontrée dans une cavité optique. Un faisceau incident rencontre une première interface semi-réfléchissante au point A. Une partie du faisceau est réfléchi, et une autre partie entre dans la cavité. En traversant la cavité, le faisceau rencontre une seconde interface qui reflète partiellement le faisceau au point B. Une partie de ce faisceau réfléchi sera alors transmis par la seconde interface, et une partie sera reflétée dans la cavité. La partie reflétée dans la cavité rencontrera alors la première surface au point C. La partie reflétée du faisceau au point C rencontrera alors la seconde interface au point F et ainsi de suite. Nous ajoutons à ce schéma les points D et E, qui représentent la projection des points C (respectivement F) sur les faisceaux ayant été reflétés par les plans semi-réfléchissant 1 (respectivement 2).

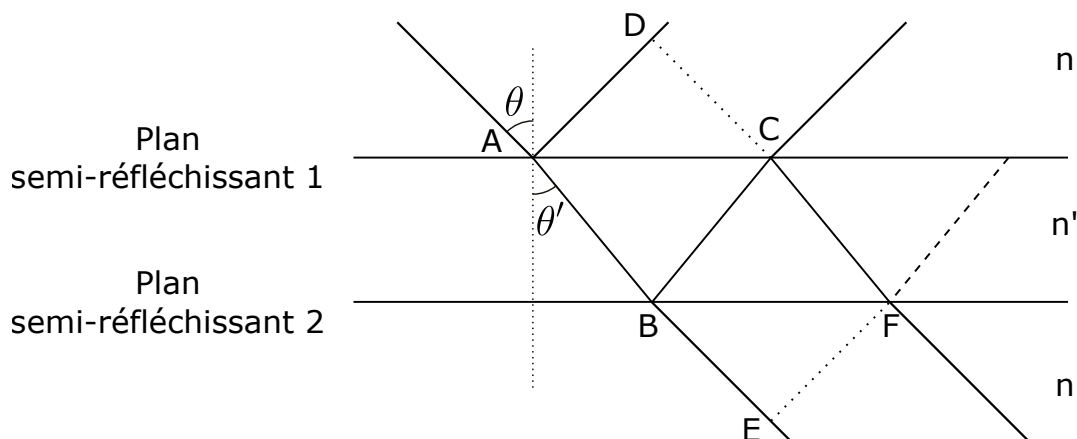


FIGURE A.1 – Schéma de la différence de chemin optique dans une cavité optique.

Dans cette configuration, nous voulons que tous les rayons de même sens soient en phase, pour qu'ils puissent interférer constructivement. Cette condition impose que la phase du faisceau en C soit la même qu'en D, et que la phase du faisceau en E soit la même qu'en F. En notant $\phi(x)$ la phase du faisceau en un point x , nous auront donc :

$$\begin{cases} \phi(D) = \phi(C) \\ \phi(E) = \phi(F) \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

Ces équations peuvent se développer en faisant intervenir le chemin optique et le vecteur d'onde $k = 2\pi/\lambda$, et en rappelant que ϕ est une fonction périodique définie sur $[0, 2\pi]$:

$$\begin{cases} k(n'(AB + BC) - nAD) = 2m\pi \\ k(n'(BC + CF) - nBE) = 2m\pi \end{cases} \quad (\text{A.2})$$

Le calcul donne [66] :

$$n'(AB + BC) - nAD = 2n'h \cos \theta' = n'(BC + CF) - nBE \quad (\text{A.3})$$

A.2 Détail du calcul d'angle entre le faisceau d'illumination et de collection

En reprenant les notations de la figure 1.4, nous pouvons définir l'angle θ via le produit scalaire des vecteurs unitaires d'illumination et de collection :

$$\cos \theta = \frac{\vec{u} \cdot \vec{v}}{\|\vec{u}\| \|\vec{v}\|} \quad (\text{A.4})$$

Avec :

$$\begin{cases} \vec{u} = \tan \theta_{i,a} \cos \theta_{i,t} \vec{x} + \tan \theta_{i,a} \sin \theta_{i,t} \vec{y} - \vec{z} \\ \vec{v} = [\tan \theta_{c,a} \cos \theta_{c,t} \cos \theta_0 - \sin \theta_0] \vec{x} + \tan \theta_{c,a} \sin \theta_{c,t} \vec{y} - \\ \quad [\cos \theta_0 + \tan \theta_{c,a} \cos \theta_{c,t} \sin \theta_0] \vec{z} \end{cases} \quad (\text{A.5})$$

D'où :

$$\begin{cases} \|\vec{u}\| = \sqrt{1 + \tan^2 \theta_{i,a}} \\ \|\vec{v}\| = \sqrt{1 + \tan^2 \theta_{c,a}} \end{cases} \quad (\text{A.6})$$

Et :

$$\begin{aligned} \vec{u} \cdot \vec{v} = \tan \theta_{i,a} \cos \theta_{i,t} \tan \theta_{c,a} \cos \theta_{c,t} \cos \theta_0 - \tan \theta_{i,a} \cos \theta_{i,t} \sin \theta_0 + \\ \tan \theta_{i,a} \sin \theta_{i,t} \tan \theta_{c,a} \sin \theta_{c,t} + \cos \theta_0 + \tan \theta_{c,a} \cos \theta_{c,t} \sin \theta_0 \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

Amenant, par :

$$\cos \theta = \frac{\vec{u} \cdot \vec{v}}{\|\vec{u}\| \|\vec{v}\|} \quad (\text{A.8})$$

A :

$$\begin{aligned} \cos \theta = \frac{1}{\sqrt{1 + \tan^2 \theta_{i,a}} \sqrt{1 + \tan^2 \theta_{c,a}}} [\tan \theta_{i,a} \cos \theta_{i,t} \tan \theta_{c,a} \cos \theta_{c,t} \cos \theta_0 - \\ \tan \theta_{i,a} \cos \theta_{i,t} \sin \theta_0 + \tan \theta_{i,a} \sin \theta_{i,t} \tan \theta_{c,a} \sin \theta_{c,t} + \\ \cos \theta_0 + \tan \theta_{c,a} \cos \theta_{c,t} \sin \theta_0] \end{aligned} \quad (\text{A.9})$$

Puis en rappelant la formule de l'angle moitié :

$$\cos(\theta/2) = \sqrt{\frac{1 + \cos \theta}{2}} \quad (\text{A.10})$$

Nous pouvons exprimer $\omega_s(\omega)$ en fonction des divers angles définis ci-dessus.

A.3 Calcul de l'angle solide couplé dans le VIPA

L'angle solide se définit de manière générale par l'expression suivante :

$$\Omega = \iint \sin \nu d\phi d\nu \quad (\text{A.11})$$

avec ν l'altitude et ϕ l'azimuth.

Ainsi un cône présentant un angle à son apex de 2θ aura un angle solide

$$\Omega = \int_0^{2\pi} \pi d\phi \int_0^\theta \sin \nu d\nu = 2\pi(1 - \cos \theta) \quad (\text{A.12})$$

Afin d'exprimer maintenant l'angle solide associé à l'aire de la figure 2.4c coloriée en vert, nous pourrions nous placer dans l'approximation des petits angles, et considérer que le rapport entre l'angle solide associé à l'aire verte et l'angle solide associé à tout le faisceau est le même que le rapport de l'aire de la partie verte du faisceau par la somme des parties vertes et rouges de l'aire du faisceau. Commençons donc par établir l'aire de la partie verte du faisceau :

$$A = 2 \int_{\tan(\beta-\theta(x))}^{\tan(\beta)} \sqrt{\tan^2 \beta - x^2} dx \quad (\text{A.13})$$

Par le changement de variable $x = \tan(\beta) \sin(\gamma)$ et en appliquant l'identité : $2 \cos^2 \gamma = 1 + \cos 2\gamma$, nous arrivons à :

$$A = \tan^2 \beta \int_{\arcsin\left(\frac{\tan^2(\beta-\theta(x))}{\tan^2 \beta}\right)}^{\frac{\pi}{2}} (1 + \cos(2\gamma)) d\gamma \quad (\text{A.14})$$

Ce qui amène à :

$$A = \frac{\tan^2 \beta}{2} \left[\pi - 2 \arcsin\left(\frac{\tan^2(\beta - \theta(x))}{\tan^2 \beta}\right) - \sin\left(2 \arcsin\left(\frac{\tan^2(\beta - \theta(x))}{\tan^2 \beta}\right)\right) \right] \quad (\text{A.15})$$

Nous en déduisons alors l'angle solide associé à l'aire verte sur la figure 2.4c :

$$\Omega_A = (1 - \cos \beta) \left[\pi - 2 \arcsin\left(\frac{\tan^2(\beta - \theta(x))}{\tan^2 \beta}\right) - \sin\left(2 \arcsin\left(\frac{\tan^2(\beta - \theta(x))}{\tan^2 \beta}\right)\right) \right] \quad (\text{A.16})$$

Notons que cette expression est obtenue pour les paramètres sans prise en compte de l'indice de réfraction du VIPA. En prenant alors en compte cet indice, nous retombons sur l'équation présentée en section 2.3.

A.4 Equation paramétrique des isofréquences d'un spectromètre VIPA à deux axes de dispersion

En repartant de l'équation 2.13, en établissant la condition $\delta = 2m\pi$, nous obtenons :

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \sin^2 \theta_x - \sin^2 \theta_y - \sin \varphi \sin \theta_x} \right]^2 - 1 + n'^2} = 2m\pi \quad (\text{A.17})$$

D'où :

$$\frac{m\lambda}{2h} = \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \sin^2 \theta_x - \sin^2 \theta_y - \sin \varphi \sin \theta_x} \right]^2 - 1 + n'^2} \quad (\text{A.18})$$

En appliquant l'hypothèse des petits angles sur θ_x et θ_y , nous obtenons :

$$\frac{m\lambda}{2h} = \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \left(\frac{x}{f_S}\right)^2 - \left(\frac{y}{f_S}\right)^2 - \sin \varphi \frac{x}{f_S}} \right]^2 - 1 + n'^2} \quad (\text{A.19})$$

Soit :

$$\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2 = \left[\cos \varphi \sqrt{1 - \left(\frac{x}{f_S}\right)^2 - \left(\frac{y}{f_S}\right)^2 - \sin \varphi \frac{x}{f_S}} \right]^2 \quad (\text{A.20})$$

Puis, comme $\cos \varphi \sqrt{1 - \left(\frac{x}{f_S}\right)^2 - \left(\frac{y}{f_S}\right)^2} > \sin \varphi \frac{x}{f_S}$:

$$\sqrt{\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2} = \cos \varphi \sqrt{1 - \left(\frac{x}{f_S}\right)^2 - \left(\frac{y}{f_S}\right)^2} - \sin \varphi \frac{x}{f_S} \quad (\text{A.21})$$

Soit, en soulignant que $\varphi \approx 0$:

$$\frac{f_S}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2} = \sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} - \tan \varphi x \quad (\text{A.22})$$

Donc :

$$\sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} = \frac{f_S}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2} + \tan \varphi x \quad (\text{A.23})$$

Ce qui amène finalement à :

$$y^2 = f_S^2 - x^2 - \left(\frac{f_S}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2} + \tan \varphi x \right)^2 \quad (\text{A.24})$$

Donc la représentation paramétrique des isofréquences prend bien la forme suivante :

$$y = \pm \sqrt{ax^2 + bx + c} \quad (\text{A.25})$$

Avec :

$$\begin{cases} a = -1 - \tan^2 \varphi \\ b = \frac{f_S \tan \varphi}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2} \\ c = f_S^2 \left(1 - \frac{1}{\cos^2 \varphi} \left(\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2\right)\right) \end{cases} \quad (\text{A.26})$$

Notons qu'il est également possible d'appliquer l'hypothèse des petits angles sur l'angle d'inclinaison du VIPA :

$$\begin{cases} a = -1 - \varphi^2 \\ b = \frac{f_S \varphi}{1 - \varphi^2/2} \sqrt{\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2} \\ c = f_S^2 \left(1 - \frac{1}{(1 - \varphi^2/2)^2} \left(\left(\frac{m\lambda}{2h}\right)^2 + 1 - n'^2\right)\right) \end{cases} \quad (\text{A.27})$$

A.5 Redressement des courbures des isofréquences

Repartons de l'équation 2.13 présentant le déphasage d'un VIPA dans le cas général.

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \sin^2 \theta_x - \sin^2 \theta_y} - \sin \varphi \sin \theta_x\right]^2 - 1 + n'^2} = 2m\pi \quad (\text{A.28})$$

Dans l'approximation des petits angles, cette équation devient :

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \left(\frac{x}{f_S}\right)^2 - \left(\frac{y}{f_S}\right)^2} - \sin \varphi \left(\frac{x}{f_S}\right)\right]^2 - 1 + n'^2} = 2m\pi \quad (\text{A.29})$$

Pour redresser les isofréquences, tous les points présentant le même déphasage doivent être sur la même coordonnée x . L'existence de ces isofréquences implique donc l'existence du point $(x',)$ associé au point (x, y) . La valeur de la coordonnée x' doit alors vérifier :

$$\cos \varphi \sqrt{1 - \left(\frac{x}{f_S}\right)^2 - \left(\frac{y}{f_S}\right)^2} - \sin \varphi \left(\frac{x}{f_S}\right) = \cos \varphi \sqrt{1 - \left(\frac{x'}{f_S}\right)^2} - \sin \varphi \left(\frac{x'}{f_S}\right) \quad (\text{A.30})$$

D'où :

$$x'^2 = \left(f_S^2 - \left(\sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} + \tan \varphi x' - \tan \varphi x\right)^2\right) \quad (\text{A.31})$$

Ce qui amène au polynôme d'ordre 2 :

$$(1 + \tan^2 \varphi)x'^2 + 2 \tan \varphi \left(\sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} - \tan \varphi x \right) x' + \left(\sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} - \tan \varphi x \right)^2 - f_S^2 = 0 \quad (\text{A.32})$$

D'où le discriminant Δ :

$$\Delta = 4 \left(\tan^2 \varphi f_S^2 - \left(\left(\sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} - \tan \varphi x \right)^2 - f_S^2 \right) \right) \quad (\text{A.33})$$

Et donc les solutions pour x' :

$$x' = - \frac{2 \tan \varphi \left(\sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} - \tan \varphi x \right) \pm \sqrt{\Delta}}{2(1 + \tan^2 \varphi)} \quad (\text{A.34})$$

$$x' = - \frac{\tan \varphi \left(\sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} - \tan \varphi x \right) \pm \sqrt{\tan^2 \varphi f_S^2 - \left(\left(\sqrt{f_S^2 - x^2 - y^2} - \tan \varphi x \right)^2 - f_S^2 \right)}}{1 + \tan^2 \varphi} \quad (\text{A.35})$$

Notons que cette équation n'a besoin que de deux paramètres : l'angle d'inclinaison φ et la focale de la lentille située derrière le VIPA f_S pour pouvoir être appliquée sur le détecteur (en admettant que le signal soit parfaitement centré sur le détecteur).

A.6 Divergence maximale permise pour une courbure inférieure à un seuil

En repartant de l'équation 2.13, nous pouvons établir, pour $\theta_x = 0$, l'équation suivante :

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \sin^2 \theta_y} \right]^2 - 1 + n'^2} = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{[\cos \varphi \cos \theta_y]^2 - 1 + n'^2} \quad (\text{A.36})$$

Pour établir une condition sur la divergence, nous pouvons relier l'erreur en longueur d'onde $\delta\lambda$ à la divergence du faisceau, via :

$$\frac{2\pi}{\lambda + \delta\lambda} 2h \sqrt{\cos^2 \varphi - 1 + n'^2} = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{[\cos \varphi \cos \theta_y]^2 - 1 + n'^2} \quad (\text{A.37})$$

Soit :

$$\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda} \sqrt{\cos^2 \varphi - 1 + n'^2} = \sqrt{[\cos \varphi \cos \theta_y]^2 - 1 + n'^2} \quad (\text{A.38})$$

Puis

$$\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda}\right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) = [\cos \varphi \cos \theta_y]^2 - 1 + n'^2 \quad (\text{A.39})$$

Soit

$$\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda}\right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) + 1 - n'^2 = [\cos \varphi \cos \theta_y]^2 \quad (\text{A.40})$$

Puis

$$\frac{1}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda}\right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) + 1 - n'^2} = \cos \theta_y \quad (\text{A.41})$$

Amenant finalement à

$$\theta_y = \arccos \left[\frac{1}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda}\right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) + 1 - n'^2} \right] \quad (\text{A.42})$$

A.7 Estimation de la puissance transmise en configuration confocale

En repartant de l'équation 2.13, nous pouvons établir, pour $\theta_x = 0$, l'équation suivante :

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{\left[\cos \varphi \sqrt{1 - \sin^2 \theta_y}\right]^2 - 1 + n'^2} = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{[\cos \varphi \cos \theta_y]^2 - 1 + n'^2} \quad (\text{A.43})$$

Pour établir une condition sur la divergence, nous pouvons relier l'erreur en longueur d'onde $\delta\lambda$ à la divergence du faisceau, via :

$$\frac{2\pi}{\lambda + \delta\lambda} 2h \sqrt{\cos^2 \varphi - 1 + n'^2} = \frac{2\pi}{\lambda} 2h \sqrt{[\cos \varphi \cos \theta_y]^2 - 1 + n'^2} \quad (\text{A.44})$$

Soit :

$$\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda} \sqrt{\cos^2 \varphi - 1 + n'^2} = \sqrt{[\cos \varphi \cos \theta_y]^2 - 1 + n'^2} \quad (\text{A.45})$$

Puis

$$\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda}\right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) = [\cos \varphi \cos \theta_y]^2 - 1 + n'^2 \quad (\text{A.46})$$

Soit

$$\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda}\right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) + 1 - n'^2 = [\cos \varphi \cos \theta_y]^2 \quad (\text{A.47})$$

Puis

$$\frac{1}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda}\right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) + 1 - n'^2} = \cos \theta_y \quad (\text{A.48})$$

Amenant finalement à

$$\theta_y = \arccos \left[\frac{1}{\cos \varphi} \sqrt{\left(\frac{\lambda}{\lambda + \delta\lambda}\right)^2 (\cos^2 \varphi - 1 + n'^2) + 1 - n'^2} \right] \quad (\text{A.49})$$

A.8 Estimation de la largeur d'une Lorentzienne

En reprenant l'expression normalisée en amplitude d'une Lorentzienne :

$$\mathcal{L}_{\nu_0, \Gamma}(\nu) = \frac{(\Gamma/2)^2}{(\nu - \nu_0)^2 + (\Gamma/2)^2} \quad (\text{A.50})$$

L'intégrale de cette expression donne :

$$\int_{\nu_1}^{\nu_2} \mathcal{L}_{\nu_0, \Gamma}(\nu) d\nu = \frac{\Gamma}{2} \left[\arctan \left(\frac{\nu_2 - \nu_0}{\Gamma} \right) - \arctan \left(\frac{\nu_1 - \nu_0}{\Gamma} \right) \right] \quad (\text{A.51})$$

Dans le cas où $\nu_1 + \nu_2 = 2\nu_0 = W$, c'est-à-dire où la fenêtre d'intégration est centrée sur le centre de la Lorentzienne, nous pouvons exprimer l'intégrale en fonction de la taille de fenêtre W :

$$\int_{\nu_0 - W/2}^{\nu_0 + W/2} \mathcal{L}_{\nu_0, \Gamma}(\nu) d\nu = \Gamma \arctan \left(\frac{W}{2\Gamma} \right) \quad (\text{A.52})$$

En règle générale, Γ est proche de 1 GHz, donc en exprimant W en GHz, nous pouvons approcher Γ par :

$$\Gamma \approx \frac{\int_{\nu_1}^{\nu_2} \mathcal{L}_{\nu_0, \Gamma}(\nu) d\nu}{\arctan(W/2)} \quad (\text{A.53})$$

Annexe B

Éléments de description de la spectroscopie Brillouin en Physique Quantique

L'approche des phénomènes Physiques décrits dans le corpus de cette thèse n'a fait usage que des notions de Physique Classique. En soulignant cependant que le phénomène observé est un échange d'énergie entre le milieu (sous la forme d'une onde mécanique) et une onde électromagnétique (la lumière incidente qui sera diffractée), nous pouvons aborder le phénomène du point de vue quantique. Dans cette approche, nous décrirons la lumière comme un ensemble de photons et l'onde mécanique comme un ensemble de phonons. Nous sommes rapidement passés sur la notion de phonon dans le corpus, attardons-nous ici un peu plus longuement sur cette notion.

Le postulat de la Physique Quantique est la quantification de l'énergie. Il existe donc une unité d'énergie que l'on appelle quanta. Un échange d'énergie implique un échange de quanta, et l'énergie d'un phénomène est elle-même décomposable en quanta. Lorsque l'on veut ainsi s'attarder sur l'énergie d'une onde mécanique, l'envie nous prend d'utiliser un quanta. Techniquement, une onde mécanique n'étant qu'un mouvement d'atomes, ces quantas sont de divers types, en fonction des liaisons observées. Il est donc difficile de donner une des quatre natures (gravitation, électromagnétisme, nucléaire faible ou nucléaire fort) au quanta observé, ce qui au passage n'empêchera pas l'échange d'énergie entre différents quanta et l'onde mécanique. Pour pallier ce défaut, nous utilisons une quasi-particule, c'est-à-dire un pseudo-quanta qui n'a pas de réelle existence physique mais qui nous permet de cacher notre incapacité à décrire

correctement la quantification d'énergie dans une onde mécanique. Ce pseudo-quanta est le phonon. Cette quasi-particule décrit donc une unité élémentaire d'énergie mécanique.

L'intérêt d'un phonon s'illustre lorsqu'une interaction entre un phonon et un photon intervient. Dans ce cas, deux principes : la conservation de l'énergie et la conservation du moment quantique interviennent et amènent aux équations 1.7 et 1.9 :

$$E_s = h\nu_s = E_i \pm E_{phonon} = h\nu_i \pm hf \quad (\text{B.1})$$

$$\vec{q} = \vec{k}_s - \vec{k}_0 \quad (\text{B.2})$$

De là, le déroulement des sections 1.3, 1.4 et 1.5 reste identique et les résultats présentés s'appliquent de la même manière.

