

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Énergie Matériaux et Télécommunications

IMAGERIE TISSULAIRE PAR MICROSCOPIE DE SECONDE HARMONIQUE INTERFÉROMÉTRIQUE

Par

Maxime Rivard

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.)
en sciences de l'énergie et des matériaux

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Andreas Peter Ruediger INRS-ÉMT
Examineur externe	Marie-Claire Schanne-Klein Laboratoire d'Optique et Biosciences École Polytechnique, France
Examineur externe	Caroline Boudoux Département de Génie Physique École Polytechnique de Montréal
Directeur de recherche	François Légaré INRS-ÉMT

RÉSUMÉ

La microscopie optique non linéaire est un domaine qui a beaucoup évolué dans les derniers 25 ans. Ses applications en biologie pour l'étude des tissus sont nombreuses. Dans ce domaine, la microscopie de génération de seconde harmonique (GSH) est une technique d'imagerie qui se distingue des autres par son mécanisme de contraste unique, qui permet d'imager les structures non centrosymétriques comme le collagène des tissus conjonctifs, la myosine des tissus musculaires et certains cristaux optiques non linéaires.

Toutefois, la microscopie GSH ne mesure que l'irradiance du signal GSH et sa phase est perdue. Cela pose problème puisque la phase du signal GSH contient de l'information sur l'orientation des molécules non centrosymétriques dans la zone imagée. Il faut donc trouver un moyen de mesurer la phase du signal GSH pour améliorer notre interprétation des images GSH dans les tissus biologiques.

Cela est possible en combinant l'interférométrie et la microscopie GSH. L'objectif de ce projet est donc de construire un microscope GSH interférométrique pour mesurer la phase relative du signal GSH dans les tissus biologiques et utiliser ces nouveaux résultats pour faire une meilleure interprétation des images obtenues en microscopie GSH dans ceux-ci.

Cette thèse présente une revue historique de la microscopie, de l'optique non-linéaire et de la microscopie optique non-linéaire. La théorie de la génération de seconde harmonique y est détaillée, dans un contexte de microscopie. La structure des tissus musculaires et des tissus conjonctifs de collagène y est résumée, en mettant l'accent sur leurs propriétés optiques non linéaires. L'histoire et la théorie de la microscopie GSH interférométrique y sont également abordées. La conversion d'un montage en microscope GSH interférométrique et le protocole à suivre pour s'en servir y sont expliqués. Finalement, les résultats de la microscopie GSH interférométrique dans un cristal de niobate de lithium périodiquement orienté (PPLN), dans un tissu musculaire et dans différents tissus de collagène y sont présentés et interprétés. Pour les tissus de collagène, les résultats des simulations réalisées dans un modèle que nous avons développé y sont également présentés et interprétés.

Le microscope GSH interférométrique a permis d'imager les domaines de polarités opposées dans le cristal PPLN, dans les tissus musculaires et dans les tissus de collagène. Cela démontre que le montage fonctionne correctement et peut servir à l'imagerie des tissus biologiques. Les domaines dans les tissus musculaires sont similaires à ceux du cristal PPLN, tandis que les domaines dans les tissus de collagène font plusieurs centaines de microns de long et quelques microns à quelques dizaines de microns de large. Des images de la phase du signal GSH ont également été obtenues.

Les résultats dans les muscles ont permis de mettre en évidence la bipolarité des filaments de myosine. Un modèle a été mis au point pour expliquer les résultats dans les tissus de collagène. Dans celui-ci, les fibrilles de collagène sont représentées par de longs cylindres ayant une polarité $\chi^{(2)}$ aléatoire qui est maintenue sur toute leur longueur. Des simulations réalisées à partir de ce modèle donnent des résultats en accord avec ceux obtenus en microscopie GSH interférométrique. La combinaison de tous ces résultats a permis d'établir une corrélation entre la largeur de la distribution de la phase, le ratio de fibrilles ayant des polarités opposées dans une région donnée (ratio f) et l'irradiance du signal GSH dans les domaines des tissus de collagène. La polarité aléatoire des fibrilles de collagène donne lieu à une structure complexe dans les tissus qui permet d'expliquer les modulations importantes du signal GSH dans la direction avant. Les longues et fines structures visibles dans les images GSH du signal avant ne sont pas des fibrilles individuelles, mais sont causées plutôt par la variation du ratio f et de l'accord de phase lorsque le point focal est déplacé dans le tissu. Les images GSH interférométrique et notre modèle permettent donc de faire une meilleure interprétation des images GSH des tissus de collagène.

Finalement, certaines améliorations peuvent être apportées au montage pour augmenter la sensibilité, accélérer l'acquisition des images et obtenir la phase en temps réel. D'autres tissus biologiques, comme le cartilage (riche en collagène type II), devraient également être imagés avec cette technique. L'approximation du ratio f à partir de la largeur de la distribution de la phase dans les domaines des tissus de collagène doit être poussée plus loin.

Mots clés : Microscopie, seconde harmonique, GSH, interférométrie, optique non linéaire, laser, collagène, tissus biologiques, phase, polarité, tendon, fascia, muscle.

ABSTRACT

Nonlinear optical microscopy is a field that evolved a lot in the past 25 years. It has many applications in biology for tissue imaging. Within this field, second harmonic generation (SHG) microscopy is a technique that differentiates itself from others by its unique contrast mechanism. It allows imaging of noncentrosymmetric structures such as collagen in connective tissues, myosin in muscular tissues and some crystals with nonlinear optical properties.

However, SHG microscopy can only measure the intensity of the SHG signal. Its phase is lost, which is a problem since the SHG phase contains information on the orientation of the noncentrosymmetric molecules in the imaged area. A mean to measure the phase of the SHG signal must be found in order to improve our interpretation of SHG images taken in biological tissues.

This can be achieved by combining interferometry and SHG microscopy. The goal of this project is to build an interferometric SHG microscope that can measure the relative SHG signal phase in biological tissues. These new results will then be used to find a more accurate interpretation of the images obtained with SHG microscopy in these tissues.

This thesis contains a historical review on microscopy, on nonlinear optics and on nonlinear optical microscopy. The theory behind second harmonic generation, in the context of microscopy, is presented in details. The structure of muscle tissues and connective tissues rich in collagen are explained, with an emphasis on their nonlinear optical properties. The history and the theory behind interferometric SHG microscopy are also explained in details. The conversion of a microscope setup into an interferometric SHG microscope and the protocol that must be followed to use it are also presented in this work. Finally, this thesis presents and explains the results obtained with interferometric SHG microscopy in a periodically poled lithium niobate (PPLN) crystal, in muscular tissue and in different connective tissues rich in collagen. The results of simulations performed with a model that we developed for collagen tissues are also presented and explained.

The interferometric SHG microscope provided images in which the domains with opposite polarities could clearly be identified in PPLN crystal, in muscle tissues and in various collagen tissues. This demonstrates that the setup works properly and can be used to perform imagery in biological tissues. The domains in muscle tissues are similar to those in PPLN crystal. The domains in collagen tissues can measure hundreds of microns in length and from a few microns to a few tens of microns in width. Images of the relative phase of the SHG signal in biological tissues have also been obtained.

The results in muscle tissues show the bipolarity of myosin filaments. A model was developed to explain the results obtained in collagen tissues. In this model, collagen fibrils are represented by long cylinders with a random $\chi^{(2)}$ polarity that is maintained over their whole length. Simulations based on this model provide results that are coherent with those obtained with interferometric SHG microscopy. The compilation of all these results allows to establish a correlation between the width of the phase distribution, the ratio of fibrils with opposite polarities within a region (f ratio) and the SHG signal intensity in the domains of collagen tissues. The random polarity of collagen fibrils creates a complex structure in tissues that explains the large modulations of the SHG signal in the forward direction. The long and thin structures that can be seen in the images obtained from the forward SHG signal are not individual fibrils. They are caused by the variation of the f ratio and the phase matching when the focal spot of the laser is moved within the tissue. The interferometric SHG images and the model provide a more accurate interpretation of the images obtained with SHG microscopy in collagen tissues.

Finally, the interferometric SHG microscope setup can still be improved to increase its sensitivity, to increase its image acquisition speed and to provide the SHG phase in real time. Other biological tissues, such as cartilage (rich in type II collagen), should also be studied with this technique. The approximation of the f ratio based on the width of the SHG phase distribution within the domains in collagen tissues must also be further studied.

Keywords : Microscopy, second harmonic, SHG, interferometry, nonlinear optic, laser, collagen, biological tissues, phase, polarity, tendon, fascia, muscle.

PRÉSENTATION DE L'AUTEUR

Maxime Rivard a complété son baccalauréat en génie physique, spécialisé en photonique, à l'École Polytechnique de Montréal en 2008. Durant celui-ci, il a eu l'opportunité de faire deux stages d'été et de travailler sur des projets reliés à la fibre optique avec Dr. Nicolas Godbout et Dr. Suzanne Lacroix à Polytechnique. Durant l'été 2008, il a fait un 3e stage à Polytechnique, mais cette fois-ci dans le domaine de la biophotonique avec Dr. Caroline Boudoux. Ce stage a été une expérience de travail unique puisque Dr. Boudoux construisait un nouveau laboratoire à Polytechnique, en partant d'une salle vide, et particulièrement enrichissant parce que ce stage lui a permis d'en apprendre beaucoup sur les applications de la photonique au domaine biomédical. Maxime Rivard a ensuite débuté sa maîtrise à l'INRS à Varennes avec Dr. My Ali El Khakani et Dr. François Légaré en septembre 2008. Son projet de maîtrise était la synthèse de nanoparticules métalliques pour des applications en microscopie optique non linéaire. Durant l'été 2010, il a effectué un passage direct au doctorat avec Dr. François Légaré comme directeur de thèse. Son projet de doctorat était de combiner la microscopie de génération de seconde harmonique (GSH) et l'interférométrie pour construire un microscope capable de mesurer la phase du signal GSH dans les tissus biologiques. La phase de la GSH est importante puisqu'elle donne de l'information sur l'orientation relative des structures imagées. Elle ne peut pas être mesurée en microscopie GSH standard. Ce projet a été un succès et les résultats obtenus dans le tendon et dans les tissus musculaires ont été publiés et présentés à plusieurs congrès nationaux et internationaux.



Photo de l'auteur prise au laboratoire du microscope à l'INRS en août 2012.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier François Légaré pour m'avoir épaulé durant les sept dernières années de ma maîtrise et de mon doctorat. Ton côté humain, ta créativité, ton écoute et ton ouverture d'esprit en recherche font de toi un directeur hors pair. Je garderai d'excellents souvenirs des discussions que nous avons eues en dehors du travail et de nos voyages en conférences. Tu m'as offert toutes les opportunités pour réussir mes études supérieures et je t'en suis très reconnaissant. Choisir son directeur de recherche est une loterie pour un étudiant, tout comme choisir ses étudiants est une loterie pour un directeur de recherche. J'estime avoir été gagnant à cette loterie.

Merci à Marie-Claire Schanne-Klein, Caroline Boudoux et Andreas Ruediger d'avoir pris le temps de lire et d'évaluer mon travail.

Je remercie les autres étudiants et étudiantes que j'ai eu la chance de côtoyer au laboratoire de microscopie optique non linéaire. Mathieu Giguère, le pionnier du laboratoire, Marie-Andrée Houle, Antony Bertrand-Grenier, Mathieu Laliberté, Marie Claire Blache, Charles-André Couture et Stéphane Bancelin. J'aimerais souligner la contribution importante de Charles-André Couture à la réussite de ce projet. Il a réalisé beaucoup de programmation pour le traitement des images et pour le contrôle de la plaque de verre à un moment où j'étais occupé par la rédaction d'articles. Il a également passé beaucoup de temps au laboratoire à imager plusieurs tissus en microscopie GSH interférométrique. Un grand merci à Charles-André Couture et à Stéphane Bancelin pour avoir repris le flambeau de mon projet et pour l'avoir amené plus loin.

Merci à Bruno E. Schmidt et Eva Hemmer qui m'ont souvent dépanné lorsque j'avais des questions ou des problèmes dans le laboratoire.

J'en profite pour remercier les nombreux collaborateurs qui ont contribué, de différentes façons, à la réalisation de mon doctorat. De l'INRS, Martin Vallières, Catalin Harnagea et Alain Pignolet ont réalisé et publié les travaux sur la PFM dans le collagène en 2010. Également de l'INRS, Mischa Nicklaus et Andreas Ruediger m'ont prêté les couches minces de STO que j'ai pu imager en microscopie GSH. De l'université McGill, Amir K. Miri et Luc-Guy Mongeau ont obtenu et

préparé les échantillons de tissus musculaires qui ont servi aux expériences de microscopie GSH interférométrique. De l'université Ludwig-Maximilians de Munich, Christian P. Pfeffer a obtenu et préparé les échantillons de tendon de queue de souris et de fascia qui ont servi aux expériences de microscopie GSH interférométrique. De l'université d'Oxford, Cameron Brown nous a fait parvenir les échantillons de tendons ischio-jambier humains qui ont servi aux expériences de microscopie GSH interférométrique. Finalement, de l'université d'Ottawa, Konstantin Popov, Jarno van der Kolk et Lora Ramunno ont réalisé un travail colossal de programmation pour faire les simulations qui modélisent la GSH dans les tissus de collagène.

On oublie souvent en recherche de souligner le travail du personnel administratif et des techniciens. J'aimerais donc remercier Hélène Sabourin pour avoir répondu à mes nombreuses questions sur les procédures à suivre pour compléter mes études. J'aimerais également remercier Nathalie Graveline pour son travail qui facilite les commandes de matériel pour les laboratoires. Merci à Louise Hudon pour les services informatiques et à l'équipe de techniciens de l'atelier qui m'ont dépanné lorsque j'en avais besoin.

Un grand merci aux amis que j'ai rencontré à l'INRS. Vincent Le Borgne, qui m'a fait découvrir l'INRS, Loïck-Alexandre Gautier, Nazar Delegan, Sébastien Vignes et Régis Imbeault.

Tout au long de mes études, j'ai également eu la chance de rencontrer des professeurs marquants, comme Luc Richer (au secondaire) et Pierre Noël de Tilly (au cégep), qui m'ont transmis leur passion pour les sciences. J'aimerais également remercier Nicolas Godbout, Suzanne Lacroix et Caroline Boudoux, mes anciens directeurs de stages à Polytechnique, ainsi que François Busque pour m'avoir initié à la recherche en laboratoire aux cycles supérieurs.

Un grand merci à ma famille qui m'encourage et me soutient. À mes parents pour m'avoir encouragé à suivre un parcours en science. Surtout à ma mère qui a relu et corrigé le texte de cette thèse et à mon père qui m'a aidé à réviser le chapitre 4. Merci à Thi Xuan Thu Le pour m'avoir enduré durant les longs mois de rédaction de cette thèse.

Je suis également très reconnaissant du FRQNT pour les deux années de support financier qui m'ont été octroyées durant mon doctorat.

THE THESIS YOUR PHD COULD END LIKE

Hello, grad student, look at your PHD project, now back to Facebook, now back at your thesis, now back to PHD comics.

Sadly, your PHD project isn't progressing due to procrastination on teh interwebz, but if your PHD stopped being a complete failure and became as amazing, successful and popular as an Internet cat video, it could progress like it should.

Look down, back up, where are you ?

You're in a cold and dark lab, praying for the thesis your PHD could end like.

What's in your hand ? Back at Facebook !

I know it, it's a mouse clicking on links letting you read and watch that thing you love.

Look again, the mouse is now a free labsnack !

Anything is possible when your PHD project ends with a thesis !

I'm on a swivel chair.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFM	Microscopie à force atomique
ATP	Adénosine triphosphate
Ca ²⁺	Ion calcium
CARS	Diffusion Raman cohérente anti-Stokes / Microscopie CARS
CCD	(Caméra) Dispositif à transfert de charge (Charge-coupled device)
épi / epi	Désigne la direction de propagation inverse à celle du faisceau d'illumination en microscopie
fs	Femtoseconde [10^{-15} s]
GDF (DFG)	Génération de différence de fréquences
GSF (SFG)	Génération de somme de fréquences
GSH (SHG)	Génération de seconde harmonique / Seconde harmonique / Microscopie GSH
GTH (THG)	Génération de troisième harmonique / Troisième harmonique / Microscopie GTH
L_{coh}	Longueur de cohérence
MEB (SEM)	Microscopie électronique à balayage
MET (TEM)	Microscopie électronique en transmission
nm	Nanomètre [10^{-9} m]
OCT	Tomographie par cohérence optique
ON (NA)	Ouverture numérique
PALM	Microscopie de localisation par photoactivation

PFM	Microscopie à force piézoélectrique
PMT	Tube photomultiplicateur
PPLN	Cristal de niobate de lithium périodiquement orienté
ps	Picoseconde [10^{-12} s]
ratio f	Moyenne du nombre de fibrilles de collagène ayant une polarité $+\chi^{(2)}$ par rapport au nombre total de fibrilles dans une région donnée
SNOM	Microscopie optique en champ proche
SRS	Diffusion Raman stimulée / Microscopie SRS
STED	Déplétion par émission stimulée / Microscopie de déplétion par émission stimulée
STORM	Microscopie par reconstruction stochastique optique
STM	Microscopie à effet tunnel
Verre BK7	Verre borosilicate crown (un type de verre utilisé en optique)
Δk	Accord de phase
λ	Longueur d'onde d'une onde électromagnétique [m]
μm	Micron ou micromètre [10^{-6} m]
φ_{mat}	Phase optique du signal GSH du matériau [rad]
φ_{ref}	Phase optique du signal GSH de référence [rad]
$\chi^{(2)}$	Susceptibilité diélectrique de 2 ^e ordre [m/V]
ω	Fréquence d'une onde électromagnétique [rad/s]
2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION.....	1
2	INTRODUCTION A LA MICROSCOPIE ET A L'OPTIQUE NON LINÉAIRE	7
2.1	TECHNIQUES DE MICROSCOPIE.....	7
2.1.1	<i>Microscopie optique</i>	<i>10</i>
2.1.2	<i>Microscopie électronique</i>	<i>13</i>
2.1.3	<i>Microscopie à sonde locale</i>	<i>14</i>
2.2	OPTIQUE NON LINEAIRE	16
2.2.1	<i>Processus de 2e ordre.....</i>	<i>17</i>
2.2.2	<i>Processus de 3e ordre.....</i>	<i>20</i>
2.3	RESUME DES TECHNIQUES DE MICROSCOPIE OPTIQUE NON LINEAIRE.....	25
2.3.1	<i>Revue historique</i>	<i>25</i>
2.3.2	<i>Montage et fonctionnement d'un microscope optique non linéaire</i>	<i>26</i>
2.3.3	<i>Techniques de microscopie optique non linéaire.....</i>	<i>30</i>
2.4	CONCLUSION	33
3	MICROSCOPIE GSH	35
3.1	HYPERPOLARISABILITE ET NON CENTROSOMETRIE	35
3.2	GSH AVEC UNE ONDE PLANE	40
3.2.1	<i>Solution de l'équation d'onde.....</i>	<i>40</i>
3.2.2	<i>Accord de phase.....</i>	<i>45</i>
3.3	GSH AVEC UN FAISCEAU FORTEMENT FOCALISE	50
3.3.1	<i>Approximation par un faisceau gaussien.....</i>	<i>50</i>
3.3.2	<i>Phase de Gouy.....</i>	<i>52</i>
3.3.3	<i>Solution de l'équation d'onde pour un faisceau gaussien</i>	<i>53</i>
3.3.4	<i>Champ électrique axial.....</i>	<i>57</i>
3.3.5	<i>Résolution spatiale pour la microscopie GSH.....</i>	<i>63</i>
3.4	PATRON DE RADIATION.....	68
3.4.1	<i>Processus cohérent vs incohérent.....</i>	<i>69</i>
3.4.2	<i>Forme du patron en fonction de la structure</i>	<i>70</i>
3.4.3	<i>Ratio de signal avant vs arrière.....</i>	<i>74</i>
3.5	APPLICATIONS DE LA MICROSCOPIE GSH	75
3.5.1	<i>Imagerie des matériaux optique.....</i>	<i>75</i>
3.5.2	<i>Imagerie des tissus biologiques</i>	<i>79</i>

3.5.3	<i>Mesure de potentiel de membrane</i>	84
3.6	CONCLUSION	85
4	TISSUS BIOLOGIQUES	87
4.1	TISSUS MUSCULAIRES	87
4.1.1	<i>Structure des tissus musculaires</i>	87
4.1.2	<i>GSH dans les tissus musculaires</i>	92
4.2	TISSUS DE COLLAGENE	98
4.2.1	<i>Types de collagène</i>	99
4.2.2	<i>Structure et synthèse du collagène</i>	99
4.2.3	<i>GSH dans les tissus de collagène</i>	107
4.2.4	<i>Hypothèses de l'interprétation des images GSH du collagène</i>	111
4.2.5	<i>Origine moléculaire du $\chi^{(2)}$ dans le collagène</i>	114
4.2.6	<i>Structure piézoélectrique du collagène</i>	116
4.3	CONCLUSION	120
5	MICROSCOPIE GSH INTERFÉROMÉTRIQUE	123
5.1	LIMITATION DE LA MICROSCOPIE GSH	123
5.2	INTERFEROMETRIE.....	126
5.2.1	<i>Conditions d'interférence</i>	126
5.2.2	<i>Équation d'interférence</i>	127
5.2.3	<i>Configurations d'interféromètres</i>	128
5.2.4	<i>Obtention des conditions d'interférence</i>	131
5.2.5	<i>Amplification du signal</i>	134
5.3	CONTROLE DE LA PHASE	135
5.4	METHODE DE TRAITEMENT DES IMAGES	137
5.5	EXPERIENCES PRELIMINAIRES ET VALIDATION DU PROJET	140
5.6	CONCLUSION	143
6	MONTAGE ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	145
6.1	EXPERIENCES ET MOTIVATION	145
6.2	CONVERSION DU MONTAGE EN MICROSCOPE GSH INTERFEROMETRIQUE.....	146
6.2.1	<i>Ancien montage</i>	146
6.2.2	<i>Conversion du montage</i>	151
6.2.3	<i>Montage du microscope GSH interférométrique</i>	157
6.3	PREPARATION DES TISSUS	159
6.4	PROTOCOLE D'ACQUISITION DES IMAGES.....	161
6.5	CONCLUSION	164

7	RÉSULTATS ET DISCUSSION	165
7.1	MICROSCOPIE GSH INTERFEROMETRIQUE DU PPLN	165
7.2	MICROSCOPIE GSH INTERFEROMETRIQUE DES TISSUS MUSCULAIRES	175
7.3	MICROSCOPIE GSH INTERFEROMETRIQUE DES TISSUS DE COLLAGENE.....	184
7.3.1	<i>Tendon de queue de souris.....</i>	<i>185</i>
7.3.2	<i>Tendon ischio-jambier humain</i>	<i>192</i>
7.3.3	<i>Fascia</i>	<i>197</i>
7.3.4	<i>Modèle pour la GSH dans le collagène</i>	<i>201</i>
7.3.5	<i>Résultat des simulations et interprétation.....</i>	<i>206</i>
7.4	CONCLUSION	218
8	CONCLUSION	221
8.1	RESULTATS.....	221
8.2	OUVERTURE	227
	LISTE DES RÉFÉRENCES.....	229
	ANNEXE A	247
	ANNEXE B.....	253
	ANNEXE C	277

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1	PRINCIPAUX PROCESSUS OPTIQUES NON LINÉAIRES DE DEUXIÈME ORDRE.....	19
FIGURE 2.2	PRINCIPAUX PROCESSUS OPTIQUES NON LINÉAIRES DE TROISIÈME ORDRE	21
FIGURE 2.3	PROCESSUS D'ÉMISSION DE LA FLUORESCENCE PAR L'ABSORPTION D'UN OU DE PLUSIEURS PHOTONS	22
FIGURE 2.4	PROCESSUS OPTIQUES DE DIFFUSION RAMAN, DE DIFFUSION RAMAN STIMULÉE ET CARS	23
FIGURE 2.5	SYSTÈME DE LENTILLE DANS UN MICROSCOPE OPTIQUE À BALAYAGE LASER.....	27
FIGURE 2.6	DÉMONSTRATION DE LA TRÈS COURTE PROFONDEUR DE CHAMP OBTENUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE NON LINÉAIRE.....	27
FIGURE 2.7	SCHÉMA DU MONTAGE D'UN MICROSCOPE OPTIQUE NON LINÉAIRE	28
FIGURE 2.8	TRAJET DU BALAYAGE DU FAISCEAU LASER DANS LE MATÉRIAU IMAGÉ.....	29
FIGURE 3.1	MOMENT DIPOLAIRE DANS DIFFÉRENTES MOLÉCULES.....	36
FIGURE 3.2	ORIENTATION DES DIPÔLES ET NON CENTROSYMMÉTRIE DANS LES MATÉRIAUX.....	37
FIGURE 3.3	EFFICACITÉ DE LA GSH EN FONCTION DE L'ACCORD DE PHASE	46
FIGURE 3.4	STRUCTURE D'UN CRISTAL PÉRIODIQUEMENT ORIENTÉ.....	48
FIGURE 3.5	CARACTÉRISTIQUES D'UN FAISCEAU GAUSSIEN	51
FIGURE 3.6	COMPARAISON DES FRONTS DE PHASE D'UN FAISCEAU GAUSSIEN AVEC CEUX D'UNE ONDE PLANE ..	53
FIGURE 3.7	SIGNAL GSH PRODUIT PAR UN FAISCEAU GAUSSIEN TRAVERSANT UNE PLAQUE DE QUARTZ EN FONCTION DE LA POSITION DU VOLUME FOCAL PAR RAPPORT AUX INTERFACES.....	56
FIGURE 3.8	DIAGRAMME D'UN FAISCEAU FORTEMENT FOCALISÉ EN UN POINT.....	58
FIGURE 3.9	DISTRIBUTION SPATIALE DE L'AMPLITUDE DES COMPOSANTES X, Y ET Z DU CHAMP ÉLECTRIQUE À PROXIMITÉ DU POINT FOCAL D'UN FAISCEAU FORTEMENT FOCALISÉ.....	59
FIGURE 3.10	TRAJET DE CINQ RAYONS DANS UN FAISCEAU FORTEMENT FOCALISÉ POUR EXPLIQUER L'ORIGINE DE LA COMPOSANTE AXIALE DU CHAMP ÉLECTRIQUE À PROXIMITÉ DU POINT FOCAL	61
FIGURE 3.11	RÉSOLUTION SPATIALE LATÉRALE	66
FIGURE 3.12	RÉSOLUTION SPATIALE AXIALE.....	68
FIGURE 3.13	PATRON DE RADIATION DU SIGNAL CARS POUR DIFFÉRENTES STRUCTURES DE DIPÔLES	70
FIGURE 3.14	PATRON DE RADIATION DU SIGNAL GSH D'UNE MEMBRANE ET DU SIGNAL GTH D'UN VOLUME.....	72
FIGURE 3.15	PATRON DE RADIATION DU SIGNAL GSH EN FOCALISANT PRÈS DE L'INTERFACE D'UNE PLAQUE DE QUARTZ CRISTALLIN.....	73
FIGURE 3.16	IMAGES D'UN CRISTAL PÉRIODIQUEMENT ORIENTÉ	76
FIGURE 3.17	IMAGES DES INTERFACES À L'INTÉRIEUR D'UN CRISTAL CONTENANT DES DOMAINES AYANT DES POLARITÉS OPPOSÉES	76
FIGURE 3.18	IMAGES GSH D'UN CRISTAL PPLN	77
FIGURE 3.19	IMAGES GSH À PLUS HAUTE RÉOLUTION D'UN CRISTAL PPLN	77

FIGURE 3.20	IMAGE GSH DE STRUCTURES NON CENTROSYMÉTRIQUES FORMÉES PAR LES DISLOCATIONS DANS UNE COUCHE MINCE DE SrTiO_3	78
FIGURE 3.21	IMAGES GSH DE DIFFÉRENTS TISSUS RICHES EN COLLAGÈNE I.....	79
FIGURE 3.22	IMAGES GSH DE DIFFÉRENTS TISSUS RICHES EN COLLAGÈNE II	80
FIGURE 3.23	IMAGES GSH DE TISSUS DE CARTILAGE	80
FIGURE 3.24	IMAGE EN FLUORESCENCE DEUX PHOTONS ET EN GSH D'UN TISSU DE PEAU SAIN MONTRANT L'ASSEMBLAGE DE COLLAGÈNE ET DE FIBRES ÉLASTIQUES DANS CELUI-CI	81
FIGURE 3.25	IMAGES EN FLUORESCENCE DEUX PHOTONS ET EN GSH D'UN TISSU RÉNAL.....	81
FIGURE 3.26	IMAGES GSH DE TISSUS MUSCULAIRES ET DE TISSUS DE COLLAGÈNE	82
FIGURE 3.27	IMAGES EN FLUORESCENCE DEUX PHOTONS ET EN GSH D'UN TISSU MUSCULAIRE.....	82
FIGURE 3.28	IMAGE EN FLUORESCENCE DEUX PHOTONS ET EN GSH DES MICROTUBULES D'UN EMBRYON DURANT SA PREMIÈRE MITOSE.....	83
FIGURE 3.29	IMAGERIE DU POTENTIEL DE MEMBRANE EN MICROSCOPIE GSH.....	84
FIGURE 4.1	LES FIBRES MUSCULAIRES, LES MYOFIBRILLES, LE SARCOMÈRE ET LES FILAMENTS	88
FIGURE 4.2	LE SARCOMÈRE, LES FILAMENTS ÉPAIS ET LA MYOSINE.....	90
FIGURE 4.3	IMAGES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DES FILAMENTS ÉPAIS DU MUSCLE CHEZ LES VERTÉBRÉS.....	91
FIGURE 4.4	LA MYOSINE EST LA SOURCE DU SIGNAL GSH DANS LE SARCOMÈRE	93
FIGURE 4.5	SIGNAL GSH DANS UN TISSU MUSCULAIRE EN FONCTION DE L'ANGLE ENTRE LA POLARISATION DU LASER ET L'AXE DES FILAMENTS DE MYOSINE	94
FIGURE 4.6	OBSERVATION D'UNE OU PARFOIS DE DEUX BANDES DE SIGNAL GSH PAR SARCOMÈRE DANS LES TISSUS MUSCULAIRES	98
FIGURE 4.7	IMAGERIE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ET EN MICROSCOPIE AFM DES FIBRILLES DE COLLAGÈNE	100
FIGURE 4.8	STRUCTURE EN TRIPLE HÉLICE DES CHAÎNES ALPHA POUR FORMER LA MOLÉCULE DE TROPOCOLLAGÈNE	101
FIGURE 4.9	ARRANGEMENT DES MOLÉCULES DE TROPOCOLLAGÈNE DANS UNE FIBRILLE DE COLLAGÈNE ET ORIGINE DE LA PÉRIODICITÉ $D = 67$ NM OBSERVÉE DANS LA FIBRILLE DE COLLAGÈNE.....	102
FIGURE 4.10	LES NIVEAUX HIÉRARCHIQUES DE LA STRUCTURE DU COLLAGÈNE FIBRILLAIRE	104
FIGURE 4.11	PROCESSUS D'ASSEMBLAGE <i>IN VIVO</i> DES FIBRILLES DE COLLAGÈNE PAR LES CELLULES FIBROBLASTES.....	105
FIGURE 4.12	L'INVERSION DE LA POLARITÉ DANS UNE FIBRILLE DE COLLAGÈNE	106
FIGURE 4.13	IMAGES GSH DE DIFFÉRENTS TISSUS RICHES EN COLLAGÈNE III.....	107
FIGURE 4.14	SIGNAL GSH DANS UN TISSU DE COLLAGÈNE EN FONCTION DE L'ANGLE ENTRE LA POLARISATION DU LASER ET L'AXE DES FIBRILLES	109
FIGURE 4.15	COMPARAISON DU SIGNAL GSH AVANT ET ARRIÈRE DANS LE FASCIA	110
FIGURE 4.16	INFLUENCE DE LA POLARITÉ DES FIBRILLES DE COLLAGÈNE SUR LA GSH	112

FIGURE 4.17	MODÈLE DU RATIO DE SIGNAL GSH AVANT VS ARRIÈRE D'UNE FIBRILLE DE COLLAGÈNE EN FONCTION DE SON DIAMÈTRE	113
FIGURE 4.18	IMAGERIE EN MICROSCOPIE AFM ET PFM DES FIBRILLES DE COLLAGÈNE DANS LE FASCIA.....	117
FIGURE 4.19	IMAGERIE EN MICROSCOPIE AFM ET PFM DES FIBRILLES DE COLLAGÈNE DANS LE TENDON DE QUEUE DE SOURIS (SECTION LONGITUDINALE)	118
FIGURE 4.20	IMAGERIE EN MICROSCOPIE AFM ET PFM DES FIBRILLES DE COLLAGÈNE DANS LE TENDON DE QUEUE DE SOURIS (SECTION TRANSVERSALE).....	119
FIGURE 4.21	HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DE LA PHASE DE LA RÉPONSE PIÉZOÉLECTRIQUE MESURÉE DANS DEUX IMAGES DE TENDON DE QUEUE DE SOURIS	120
FIGURE 5.1	DEUX STRUCTURES POLAIRES ORIENTÉES DANS DES DIRECTIONS OPPOSÉES ÉMETTENT UN SIGNAL GSH DÉPHASÉ DE π	123
FIGURE 5.2	CONFIGURATIONS POSSIBLES POUR UN INTERFÉROMÈTRE MACH-ZEHNDER DANS UN MICROSCOPE GSH INTERFÉROMÉTRIQUE	129
FIGURE 5.3	CONFIGURATIONS POSSIBLES POUR AJUSTER LE DÉLAI DE GROUPE DANS L'INTERFÉROMÈTRE D'UN MICROSCOPE GSH INTERFÉROMÉTRIQUE	133
FIGURE 5.4	CONTRÔLE DU DÉPHASAGE ENTRE LES FRONTS D'ONDES DU FAISCEAU LASER ET DU FAISCEAU GSH DE RÉFÉRENCE.....	135
FIGURE 5.5	OPÉRATION DE SOUSTRACTION DES IMAGES GSH INTERFÉROMÉTRIQUE POUR EXTRAIRE ET ISOLER LE CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DANS CELLES-CI	138
FIGURE 5.6	IMAGE DE LA PHASE DU SIGNAL GSH INTERPOLÉE À CHAQUE PIXEL DANS LA ZONE IMAGÉE	139
FIGURE 5.7	MONTAGE DE L'EXPÉRIENCE PRÉLIMINAIRE D'INTERFÉROMÉTRIE MENÉE EN DEHORS DU MICROSCOPE.....	141
FIGURE 5.8	IMAGES GSH ET PREMIÈRES IMAGES DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DE LA SURFACE D'UN CRISTAL PPLN ET D'UN TISSU DE FASCIA RICHE EN COLLAGÈNE	142
FIGURE 6.1	PHOTOGRAPHIE DES SOURCES LASERS DU LABORATOIRE	147
FIGURE 6.2	PHOTOGRAPHIE DE L'ANCIEN MONTAGE DU MICROSCOPE OPTIQUE NON LINÉAIRE DU LABORATOIRE	148
FIGURE 6.3	PHOTOGRAPHIE DE LA NOUVELLE PLATEFORME DE TRANSLATION DU MICROSCOPE POUR LE BALAYAGE DU MATÉRIAU IMAGÉ	152
FIGURE 6.4	COMPARAISON DES IMAGES GSH OBTENUES AVEC L'ANCIEN ET LE NOUVEAU SYSTÈME DE BALAYAGE DANS UN CRISTAL PPLN	153
FIGURE 6.5	SCHÉMA DU MONTAGE DU MICROSCOPE GSH INTERFÉROMÉTRIQUE	157
FIGURE 6.6	PHOTOGRAPHIES MONTRANT LE TRAJET DU FAISCEAU LASER DANS L'INTERFÉROMÈTRE ET JUSQU'AU MICROSCOPE POUR LE MONTAGE FINAL DU MICROSCOPE GSH INTERFÉROMÉTRIQUE ...	159
FIGURE 6.7	INTERFÉRENCE DE LA GSH EN FONCTION DE L'ANGLE DE LA PLAQUE DE VERRE QUI CONTRÔLE LE DÉPHASAGE	163
FIGURE 7.1	IMAGES GSH DE LA SURFACE D'UN CRISTAL PPLN	166

FIGURE 7.2	IMAGES GSH INTERFÉROMÉTRIQUES D'UN CRISTAL PPLN.....	168
FIGURE 7.3	IMAGES DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DANS UN CRISTAL PPLN I	169
FIGURE 7.4	COMPORTEMENT SINUSOÏDALE DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE EN FONCTION DE LA PHASE DE RÉFÉRENCE DANS UN CRISTAL PPLN	170
FIGURE 7.5	IMAGE DE LA PHASE DU SIGNAL GSH ET HISTOGRAMMES DE LA DISTRIBUTION DE CETTE PHASE DANS UN CRISTAL PPLN	171
FIGURE 7.6	IMAGES DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DANS UN CRISTAL PPLN II	173
FIGURE 7.7	VARIATION DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE EN CHANGEANT L'OUVERTURE NUMÉRIQUE DE COLLECTION DE LA LUMIÈRE	174
FIGURE 7.8	IMAGES GSH D'UN TISSU MUSCULAIRE.....	176
FIGURE 7.9	IMAGES GSH INTERFÉROMÉTRIQUES ET IMAGES DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DANS UN TISSU MUSCULAIRE.....	177
FIGURE 7.10	COMPORTEMENT SINUSOÏDALE DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE EN FONCTION DE LA PHASE DE RÉFÉRENCE DANS UN TISSU MUSCULAIRE.....	178
FIGURE 7.11	IMAGES DE LA PHASE DU SIGNAL GSH ET HISTOGRAMMES DE LA DISTRIBUTION DE CETTE PHASE DANS UN TISSU MUSCULAIRE.....	180
FIGURE 7.12	PROFIL DU SIGNAL GSH ET DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE LE LONG DE TROIS SARCOMÈRES CONSÉCUTIFS POUR METTRE EN ÉVIDENCE L'ORGANISATION STRUCTURALE BIPOLAIRE DES FILAMENTS DE MYOSINE DANS LES TISSUS MUSCULAIRES	182
FIGURE 7.13	COMPARAISON DE L'IMAGE GSH ET DE L'IMAGE DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DANS UNE GRANDE RÉGION D'UN TISSU MUSCULAIRE.....	183
FIGURE 7.14	IMAGE DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE METTANT EN ÉVIDENCE LES DISLOCATIONS DANS UN TISSU MUSCULAIRE.....	184
FIGURE 7.15	IMAGES GSH D'UN TENDON DE QUEUE DE SOURIS	186
FIGURE 7.16	IMAGES DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DANS UN TENDON DE QUEUE DE SOURIS.....	187
FIGURE 7.17	COMPORTEMENT SINUSOÏDALE DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE EN FONCTION DE LA PHASE DE RÉFÉRENCE DANS UN TENDON DE QUEUE DE SOURIS	188
FIGURE 7.18	IMAGES DE LA PHASE DU SIGNAL GSH ET HISTOGRAMMES DE LA DISTRIBUTION DE CETTE PHASE DANS UN TENDON DE QUEUE DE SOURIS	189
FIGURE 7.19	IMAGES GSH ET IMAGES DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE D'UNE GRANDE RÉGION DANS UN TENDON ISCHIO-JAMBIER HUMAIN.....	193
FIGURE 7.20	IMAGES GSH ET IMAGES DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE À PLUS HAUTE RÉOLUTION DANS UN TENDON ISCHIO-JAMBIER HUMAIN.....	194
FIGURE 7.21	IMAGES DE LA PHASE DU SIGNAL GSH ET HISTOGRAMMES DE LA DISTRIBUTION DE CETTE PHASE DANS UN TENDON ISCHIO-JAMBIER HUMAIN	195
FIGURE 7.22	IMAGES GSH ET IMAGES DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DANS LE FASCIA	198

FIGURE 7.23	IMAGES DE LA PHASE DU SIGNAL GSH ET HISTOGRAMMES DE LA DISTRIBUTION DE CETTE PHASE DANS LE FASCIA	199
FIGURE 7.24	COUPE TRANSVERSALE D'UN TISSU DE COLLAGÈNE VIRTUEL DANS LEQUEL UN FAISCEAU LASER EST FOCALISÉ ET DISTRIBUTION DU DIAMÈTRE DES FIBRILLES DE COLLAGÈNE	203
FIGURE 7.25	VARIATION DE LA PHASE DU SIGNAL GSH EN BALAYANT LE POINT FOCAL DANS UN TISSU VIRTUEL POUR DIFFÉRENTS RATIO F	206
FIGURE 7.26	RÉSULTATS DES SIMULATIONS NUMÉRIQUES POUR LA GSH DANS LES TISSUS VIRTUELS DE COLLAGÈNE POUR DIFFÉRENTS RATIO F	211
FIGURE 7.27	RATIO F MOYEN EN FONCTION DE L'ÉCART TYPE DU PIC OBTENU DANS LA DISTRIBUTION DE LA PHASE MOYENNE DU SIGNAL GSH.....	212
FIGURE 7.28	HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DE LA PHASE DANS UN DOMAINE DU FASCIA ET ESTIMATION DU RATIO F MOYEN DANS CE DOMAINE.....	214
FIGURE 7.29	SIMULATIONS NUMÉRIQUES DU RATIO DE SIGNAL GSH AVANT VS ARRIÈRE DANS LES TISSUS VIRTUELS EN FONCTION DU RATIO F MOYEN POUR DIFFÉRENTS DIAMÈTRES MOYENS DE FIBRILLES DE COLLAGÈNE.....	216
FIGURE 7.30	IMAGES GSH D'UNE SECTION LONGITUDINALE DE TENDON DE QUEUE DE SOURIS EN FAISANT VARIER L'OUVERTURE NUMÉRIQUE D'ILLUMINATION.....	217
FIGURE A.1	PUIT DE POTENTIEL D'UN ÉLECTRON DANS UN MILIEU NON CENTROSYMÉTRIQUE.....	248
FIGURE C.1	PORTION DU CODE LABVIEW DU MICROSCOPE EN CHARGE DE L'ACQUISITION DES IMAGES.....	280
FIGURE C.2	CODE LABVIEW DE LA BOUCLE D'ACQUISITION DES DONNÉES POUR UNE IMAGE.....	282
FIGURE C.3	PARCOURS DU FAISCEAU LASER DANS LE MATÉRIAU IMAGÉ DURANT UN BALAYAGE.....	283
FIGURE C.4	COMPARAISON DES IMAGES GSH OBTENUES DANS UN CRISTAL PPLN ET DES TEMPS REQUIS POUR LEUR ACQUISITION AVEC L'ANCIEN ET LE NOUVEAU SYSTÈME DE BALAYAGE (AVEC OU SANS SIGNAL DE DÉCLENCHEMENT).....	284

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3.1	ACCORD DE PHASE ET LONGUEUR DE COHÉRENCE DANS DIFFÉRENTS MATÉRIAUX	47
TABLEAU 7.1	MESURE DU CONTRASTE INTERFÉROMÉTRIQUE DANS TROIS ZONES DES IMAGES DE LA FIGURE 7.7 POUR LES CAS OÙ L'IRIS DE COLLECTION DE LA LUMIÈRE EST OUVERT OU FERMÉ.....	175

1 INTRODUCTION

La biophotonique est la science de l'étude du vivant à l'aide de la lumière. La microscopie optique non linéaire a profondément bouleversé ce domaine, introduisant une multitude de nouvelles façons d'obtenir des images de tissus biologiques, en utilisant la lumière des lasers. La publication des travaux du groupe de Watt W. Webb en 1990 [1] est considérée comme étant l'événement qui marque les débuts de la microscopie optique non linéaire. Différentes techniques de microscopie optique non linéaire font leur apparition vers la fin des années 1990. Parmi celles-ci, on retrouve entre autres la microscopie de génération de seconde harmonique (microscopie GSH) qui s'est grandement développée au début des années 2000 [2-7].

La génération de seconde harmonique est un phénomène où deux photons sont convertis en un seul, au double de leur fréquence optique, dans un matériau non centrosymétrique. La microscopie GSH est donc une technique de microscopie qui emploie un mécanisme de contraste capable d'imager les structures non centrosymétriques dans un matériau. Elle peut servir à l'imagerie de cristaux transparents ayant des propriétés optiques non linéaires, mais surtout, elle permet d'imager certaines structures non centrosymétriques dans les tissus biologiques. Par exemple, elle est employée pour l'imagerie des tissus riches en collagène [4, 6, 8-9] et en myosine [10]. Cette technique peut également servir à l'échelle cellulaire pour voir les microtubules [5] et les membranes cellulaires [11]. La microscopie GSH est une technique cohérente pour laquelle la génération de signal dépend d'un accord de phase. À l'échelle microscopique, la structure non centrosymétrique du matériau affecte grandement la quantité de signal et la direction dans laquelle celui-ci est généré [12]. Faire une interprétation correcte des images obtenues avec cette technique, dans les tissus biologiques, peut s'avérer difficile. Ceux-ci peuvent contenir des structures non centrosymétriques agencées dans une architecture complexe. Une solide connaissance de la physique du phénomène de GSH et de la structure biologique des tissus imagés est donc requise pour interpréter correctement les images obtenues.

Les tissus musculaires sont riches en myosine et l'interprétation des images GSH dans ceux-ci est unanimement assez bien comprise. Les tissus musculaires ont été grandement étudiés par microscopie électronique et leur structure, à l'échelle nanométrique, est connue [13-17]. Dans les muscles striés, les molécules de myosine se regroupent pour former les filaments épais, tandis

que l'actine forme les filaments minces. Les molécules de myosine sont orientées dans des directions opposées dans chaque moitié d'un filament épais. Les filaments épais et minces forment une structure appelée le sarcomère qui ressemble à des peignes emboîtés l'un dans l'autre. Le glissement des filaments épais le long des filaments minces permet la contraction ou la relaxation du sarcomère. Un muscle est composé d'une multitude de sarcomères placés bout à bout ce qui permet sa contraction. Plusieurs études réalisées par microscopie GSH ont démontré que la structure responsable du signal dans le tissu musculaire est la molécule de myosine [5, 10, 18-21]. Plus précisément, il a été démontré que la queue de la molécule de myosine est la structure responsable du signal tandis que la tête a peu d'impact sur celui-ci [19, 22]. La GSH est donc observée là où se trouvent les filaments épais dans les images. À cause de la bipolarité des filaments épais, une ou parfois deux bandes de signal GSH par sarcomère sont observées [23, 24]. À l'exception de ce phénomène qui n'a pas encore été bien expliqué, l'origine du signal GSH dans les tissus musculaires est bien comprise et concorde avec les observations faites en microscopie électronique. Les images GSH des tissus musculaires sont donc généralement interprétées correctement.

Le collagène est une famille de molécules qui compose de nombreux tissus. Il a pour principale fonction de donner ou de renforcer les propriétés mécaniques des tissus. Les molécules de collagène, formées de trois chaînes d'acides aminés enroulées en hélice, s'assemblent pour former de longues fibrilles [25]. Ces fibrilles peuvent ensuite former de plus grosses structures comme des fibres, des faisceaux, des feuilletts ou des lamelles de collagène dépendamment du tissu [9]. Dans les tissus connectifs, les fibrilles de collagène sont regroupées ensemble de sorte qu'elles soient alignées. Les premières images GSH de tissus de collagène ont été prises en 1985 par Isaac Freund et Moshe Deutsch dans du tendon de queue de rat [8]. Dans les images prises avec les microscopes d'aujourd'hui, à première vue, on observe de longues structures parallèles et espacées qui ressemblent à des fibres de collagène individuelles. Mais l'interprétation des images GSH des tissus connectifs riches en collagène est plus difficile que pour les tissus musculaires. Elle a connu un parcours plus mouvementé, puisque deux hypothèses différentes ont été en opposition pour tenter d'expliquer l'origine du signal GSH dans les tissus connectifs. La première hypothèse soutient que les fibrilles de collagène sont parallèles, mais que leur polarité pointe dans une direction aléatoire le long de leur axe pour chaque fibrille [26, 27]. Ainsi, cette structure non centrosymétrique complexe de fibrilles, ayant des polarités aléatoires,

serait responsable des modulations du signal observées dans les images GSH. La seconde hypothèse soutient que les fibrilles de collagène sont parallèles, mais que leur non centrosymétrie serait présente uniquement à la surface des fibrilles [28, 29]. Ainsi, cette structure non centrosymétrique complexe de cylindres creux parallèles expliquerait les modulations du signal observées dans les images GSH. Plusieurs recherches supportent la première hypothèse. Par exemple, des mesures en microscopie électronique [25, 30] et en microscopie à force piézoélectrique [31, 32] ont démontré que la polarité des fibrilles est aléatoire d'une fibrille à l'autre et que celle-ci est maintenue sur une grande distance [25, 31-33]. De plus, l'origine de la non centrosymétrie du collagène à l'échelle macroscopique a également été expliquée par spectroscopie en somme de fréquences [34] et par modélisation [35]. Finalement, d'autres publications remettent en question la seconde hypothèse [36-40]. Toutefois, il semble que le débat sur l'explication de l'origine du signal GSH dans les tissus de collagène ne soit pas encore clos, puisque, dans la majorité des publications récentes de microscopie GSH du collagène [9, 35, 41], le fait que les fibrilles ont une polarité aléatoire n'est même pas mentionné, alors qu'il s'agit d'une information absolument fondamentale. Dans un premier temps, il serait donc nécessaire d'obtenir des résultats en microscopie GSH qui tranchent en faveur de l'un des deux modèles et, dans un deuxième temps, de donner une explication de l'origine du signal GSH qui soit une interprétation correcte des images GSH dans les tissus de collagène.

La microscopie à force piézoélectrique (microscopie PFM) est capable de déterminer la polarité des fibrilles de collagène en mesurant la phase de leur réponse piézoélectrique [31, 32]. Il serait possible de faire de même, avec une résolution spatiale moins élevée, pour la microscopie GSH, en mesurant la phase du signal généré par un tissu de collagène. De tels résultats en microscopie GSH mettraient en évidence l'importance de la polarité aléatoire des fibrilles pour expliquer la génération de signal, ce qui aiderait à trancher en faveur de l'un des deux modèles. Toutefois, les microscopes GSH standards sont incapables de retrouver la phase optique du signal, puisque celle-ci oscille beaucoup trop rapidement pour être détectée électroniquement. Il faut donc utiliser une technique de microscopie GSH améliorée, capable de mesurer la phase optique du signal généré à chaque point dans les images.

Avant d'être appliquée à la microscopie, des travaux avaient déjà été réalisés pour mesurer la phase optique d'un signal GSH par interférométrie [42-44]. En combinant la microscopie GSH et

l'interférométrie, il devient alors possible de mesurer la phase optique relative du signal GSH dans les images. Cette technique de microscopie GSH interférométrique a été employée pour l'imagerie des domaines dans des cristaux périodiquement orientés [45-47]. Elle s'est raffinée avec les avancées en microscopie GSH [48-50], mais elle n'a pas encore été employée pour mesurer la phase optique de la GSH dans les tissus biologiques. Il serait donc nécessaire d'exploiter le potentiel de la microscopie GSH interférométrique pour l'imagerie des tissus biologiques.

Bref, il y a donc un besoin de poursuivre le développement de la microscopie GSH interférométrique pour améliorer le domaine de la microscopie GSH dans son ensemble. De plus, cette technique doit être employée dans les tissus biologiques pour mesurer la phase du signal GSH, afin d'identifier la polarité des structures imagées. Finalement, cette technique semble être un outil prometteur pour l'imagerie des tissus de collagène, dans le but d'améliorer notre compréhension du phénomène de GSH dans ceux-ci.

Ce projet de doctorat consistait donc à convertir un microscope GSH en y intégrant un interféromètre. Ce nouveau montage servirait à l'imagerie des tissus biologiques pour obtenir la phase optique relative du signal GSH, afin de mesurer la polarité des structures imagées. Notre hypothèse est que la polarité aléatoire des fibrilles de collagène permet d'expliquer les structures observées dans les images GSH des tissus. Les résultats de l'imagerie des tissus de collagène qui seraient obtenus avec ce nouveau montage devraient confirmer ou infirmer cette hypothèse et permettre d'améliorer notre compréhension du mécanisme de GSH dans ceux-ci. Concrètement, ces résultats pourraient aider à faire une interprétation correcte des images obtenues en microscopie GSH.

Le chapitre deux propose une introduction aux domaines de la microscopie et de l'optique non linéaire. Les principes de bases de la microscopie et les différentes techniques qui se sont développées au fil du temps y sont expliqués. Les principaux mécanismes optiques non linéaires et leur histoire y sont ensuite présentés. La fin du chapitre explique comment ces domaines se sont rejoints, ce qui a marqué les débuts de la microscopie optique non linéaire. L'histoire et les notions de bases de la microscopie optique non linéaire y sont expliquées.

Le chapitre trois introduit la théorie qui explique la GSH dans les matériaux. Le cas particulier de la GSH avec un faisceau laser fortement focalisé y est expliqué en détail puisqu'il s'applique à la microscopie GSH à balayage. Le patron de radiation de la GSH, c'est-à-dire la direction dans laquelle le signal est généré, y fait également l'objet de discussion. Pour finir, les applications particulières de la microscopie GSH y sont présentées.

Le chapitre quatre présente la théorie sur les tissus biologiques en mettant une emphase sur leurs propriétés optiques non linéaires. La structure moléculaire et les caractéristiques de la myosine et du collagène y sont expliquées. À une échelle de taille plus grande, la structure et les caractéristiques des tissus musculaires et des tissus connectifs riches en collagène y sont également décrites. Ces deux tissus en particulier ont été choisis pour leur structure, afin de réaliser les expériences de microscopie GSH interférométrique présentées au chapitre sept.

Le chapitre cinq explique la théorie et l'histoire de la microscopie GSH interférométrique. Son avantage sur la microscopie GSH conventionnelle y est démontré. La théorie et certaines considérations pratiques concernant le phénomène d'interférence y sont présentées. Les différents mécanismes de contrôle de la phase pour l'interférométrie et la méthode de traitement des images y sont discutés. Finalement, les expériences préliminaires réalisées avant d'amorcer le projet sont également présentées.

Le chapitre six décrit le processus de conversion du microscope GSH conventionnel en microscope GSH interférométrique. Le choix de la source laser, le choix de la configuration de l'interféromètre dans le montage et le choix de la technique d'acquisition des images y sont expliqués. Le montage final y est décrit, les méthodes de préparation des différents tissus y sont abordées et le protocole à suivre pour l'acquisition des images y est également donné.

Le chapitre sept regroupe la présentation des résultats obtenus avec leurs interprétations. Les premiers résultats présentés sont ceux de l'imagerie d'un cristal périodiquement orienté. Ceux-ci démontrent que le montage fonctionne. Les résultats qui suivent sont ceux de l'imagerie des tissus musculaires. Ceux-ci démontrent que le montage fonctionne également pour l'imagerie des tissus biologiques. Finalement, les résultats de l'imagerie des tissus de collagène sont donnés. Un modèle est ensuite suggéré pour décrire la GSH dans ces tissus. Ce modèle est mis à l'épreuve par des simulations et les résultats de celles-ci sont présentés. Les résultats des simulations sont

comparés avec les images obtenues, afin de déterminer si ce modèle est valide. Il s'avère que le modèle suggéré permet de faire une meilleure interprétation des images obtenues par microscopie GSH conventionnelle dans les tissus de collagène.

Le chapitre huit conclut cet ouvrage. Il comprend un retour sur ce qui a été présenté ainsi qu'une ouverture vers les améliorations qui peuvent être apportées au montage et la suggestion d'autres tissus qui devraient être imagés par microscopie GSH interférométrique.

2 INTRODUCTION À LA MICROSCOPIE ET À L'OPTIQUE NON LINÉAIRE

Cette section porte sur les domaines de la microscopie et de l'optique non linéaire. Elle contient une introduction et un résumé de l'histoire de ces deux domaines. Finalement, elle explique comment ceux-ci se sont rejoints, ce qui a marqué les débuts de la microscopie optique non linéaire. L'histoire et les notions de bases de la microscopie optique non linéaire y sont également résumées.

2.1 Techniques de microscopie

"Une image vaut mille mots". Ce proverbe s'applique particulièrement bien à la microscopie considérant les découvertes qui ont été faites dans ce domaine de l'imagerie.

La microscopie regroupe un ensemble de techniques d'imagerie qui permettent de voir directement ce qui est invisible à l'œil nu. Ces techniques ont permis de découvrir la structure d'une foule de matériaux. Elles ont également radicalement amélioré notre compréhension des propriétés ou de la fonctionnalité de ces matériaux. Elles ont un usage pratique indispensable comme outil d'analyse dans différents domaines comme la biologie, la santé, la microfabrication, la nanofabrication et en sciences des matériaux.

La microscopie existe depuis déjà quelques centaines d'années et elle a une riche histoire. Elle regroupe trois grandes familles de techniques d'imagerie capables d'atteindre une résolution spatiale micrométrique, voir même nanométrique. Ces familles sont la microscopie optique, la microscopie électronique et la microscopie à sonde locale. Ces familles regroupent elles-mêmes une foule de techniques d'imagerie assez diversifiées qui ont chacune leurs avantages et inconvénients.

Les caractéristiques importantes des différentes techniques de microscopie sont : le mécanisme de contraste, la résolution spatiale, le champ de vision, la vitesse d'acquisition, la profondeur de pénétration et l'usage *in vivo*.

Une image est essentiellement une matrice de points avec différentes intensités. C'est cette différence de contraste entre les points aux différentes positions dans l'image qui permet de l'analyser et de l'interpréter pour lui donner un sens. Le mécanisme de contraste est donc l'une des caractéristiques les plus importantes d'une technique de microscopie. Le matériau imagé est sondé par de la lumière, un faisceau d'électron ou encore une pointe très fine. Selon sa structure et sa composition locale, le matériau va interagir de différente façon lorsqu'il est sondé. Par exemple, il peut absorber ou diffuser la lumière ou les électrons de différentes façons. En mesurant avec un détecteur ce qui ressort du matériau, il est possible de voir comment il interagit lorsqu'il est sondé. Puisque cette interaction dépend de la structure locale du matériau, le détecteur peut mesurer si cette interaction est plus ou moins forte à différents endroits dans le matériau. Par exemple, les zones contenant des structures qui absorbent plus de lumière dans un matériau apparaîtraient plus sombres dans l'image prise dans celui-ci avec un microscope optique. Le mécanisme de contraste permet d'obtenir une image du matériau contenant des variations d'intensités qui donnent des informations spécifiques sur sa structure et sa composition locale.

Il existe à peu près autant de mécanismes de contraste que de techniques de microscopie différentes. Pour ne donner que quelques exemples, l'absorption de la lumière ou des électrons permet de voir directement quelles structures du matériau absorbent la lumière ou les électrons. La diffusion des électrons peut donner de l'information sur la structure cristalline du matériau. La fluorescence est surtout utilisée pour voir des marqueurs qui peuvent s'attacher à différentes structures dans des matériaux biologiques. Les processus optiques non linéaires dépendent fortement de la structure locale du matériau. Il existe également plusieurs phénomènes physiques d'interaction entre une surface et une pointe très fine qui sont exploités par les techniques de microscopie à sonde locale. Il existe donc plusieurs techniques de microscopie différentes utilisant divers mécanismes de contraste qui permettent d'obtenir différentes informations sur la structure et les propriétés locales du matériau imagé. Le mécanisme de contraste employé sera souvent lié aux autres caractéristiques importantes des différentes techniques de microscopie.

La microscopie est employée pour voir l'infiniment petit. La taille du plus petit point qui peut être sondé à l'aide d'une technique de microscopie donne sa résolution spatiale. Pour qu'une technique de microscopie soit utile, sa résolution spatiale doit être inférieure à la taille des

structures que l'on veut observer dans le matériau. Les structures plus petites que la limite de résolution spatiale apparaîtront floues dans l'image du matériau. Les techniques de microscopie optique permettent typiquement d'atteindre une résolution de l'ordre du micron (μm). Certaines techniques particulières arrivent toutefois à descendre sous la limite de diffraction de la lumière et peuvent atteindre une résolution spatiale sous 100 nanomètres (nm). Les techniques de microscopie électronique et à sonde locale permettent d'atteindre une résolution de l'ordre du nanomètre. Finalement, la résolution latérale, c'est-à-dire dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau ou à l'axe de la pointe, et la résolution axiale, c'est-à-dire dans la direction de propagation du faisceau ou de l'axe de la pointe, sont souvent inégales.

Le champ de vision et la vitesse d'acquisition des images sont d'autres caractéristiques importantes pour la microscopie. Il est intéressant d'être en mesure de prendre des images couvrant une aire importante du matériau pour progressivement grossir l'image vers une zone d'intérêt. C'est généralement la méthode employée en microscopie et cela demande un champ de vision important. Il faut une vue d'ensemble pour identifier où se trouvent les détails intéressants. En observant de trop près, on court le risque de regarder au mauvais endroit ou d'avoir à tâtonner longtemps pour trouver ce que l'on cherche. Naturellement, imager une aire plus grande demande généralement une image plus grande contenant plus de pixels, donc un temps d'acquisition plus long. La vitesse à laquelle une image peut être acquise est donc également importante. Cette caractéristique devient même cruciale si les structures microscopiques observées sont en mouvement, ce qui est le cas dans un organisme vivant. Une technique de microscopie qui pourrait être intégrée à un endoscope et capable d'acquérir plusieurs images de taille raisonnable par seconde serait d'un grand intérêt pour des applications cliniques dans le domaine médical, mais ce ne serait pas le cas si le temps d'acquisition d'une image était de plusieurs minutes.

Une autre caractéristique importante des techniques de microscopie est leur capacité à imager des organismes vivants. Les techniques de microscopie électronique et à sonde locale peuvent imager des tissus biologiques *ex vivo* après que ceux-ci aient été préparés, mais seules les techniques de microscopie optique peuvent imager des organismes encore vivants. L'imagerie d'organismes vivants apporte de nombreux défis puisque le vivant bouge rapidement et peut mourir ou être endommagé (ce que l'on cherche à éviter).

2.1.1 Microscopie optique

L'apparition des premiers microscopes optiques au début du XVII^e siècle marque le début de l'histoire de la microscopie [51-52]. La microscopie optique en champ clair est la toute première technique de microscopie développée. Un objectif et un oculaire positionnés avec précision par rapport à un échantillon permettent d'observer directement à l'œil une image agrandie de celui-ci. L'échantillon est éclairé par derrière pour que la lumière le traverse avant d'être collectée par l'objectif. Les mécanismes d'absorption et de diffusion de la lumière dans l'échantillon permettent d'obtenir un contraste dans l'image. La limite de résolution théorique qu'un tel système peut atteindre est d'environ 200 nm [53]. Cela est suffisamment petit pour permettre d'observer le monde cellulaire, ce qui fera de la microscopie optique une technique de caractérisation ayant beaucoup d'applications en biologie.

De nombreuses techniques d'éclairage différentes ont été développées pour améliorer le contraste obtenu dans les images. Les prochains paragraphes décrivent les principales, sans trop entrer dans les détails de chacune.

La microscopie en réflexion permet d'observer un échantillon opaque en l'éclairant de façon à ce que la lumière soit réfléchi par celui-ci vers l'objectif plutôt que d'être transmise à travers celui-ci. Cette technique est fort utile pour observer la surface d'un échantillon trop épais ou encore d'une roche ou d'un métal.

La microscopie en champ sombre illumine l'échantillon de façon à ce que l'objectif ne collecte pas la lumière de la source, à moins que celle-ci soit déviée par l'échantillon. La lumière diffusée ou réfléchi par certaines structures dans l'échantillon est collectée. Cela permet d'améliorer le contraste dans certains cas, comme lorsque l'on observe des structures transparentes qui offrent très peu de contraste par absorption.

La microscopie en lumière polarisée utilise un polariseur après la source de lumière et un analyseur avant le détecteur pour bloquer la lumière de la source. Cela permet de voir clairement les structures biréfringentes dans le matériau puisque celles-ci modifieront la polarisation de la lumière qui pourra ainsi traverser l'analyseur et atteindre le détecteur.

La microscopie en fluorescence est une technique où le contraste est obtenu par la fluorescence du matériau imagé plutôt que par absorption ou diffusion de la lumière. Un ou plusieurs photons sont absorbés par les structures fluorescentes dans le matériau imagé et celles-ci réémettent de la lumière avec une couleur différente de celle des photons qui servent à l'excitation de la fluorescence. Un filtre optique ou un miroir dichroïque permet ensuite de ne laisser que la lumière issue de la fluorescence atteindre le détecteur. La couleur de la lumière émise par fluorescence est décalée vers le rouge par rapport à la couleur de la lumière absorbée. La fluorescence peut provenir directement du matériau, on parle alors d'autofluorescence endogène, ou peut provenir de marqueurs qui sont ajoutés au matériau. L'usage de l'autofluorescence offre l'avantage de demander moins de préparation du matériau observé, tandis que l'usage de marqueurs fluorescents permet de cibler différentes structures spécifiques et d'utiliser des marqueurs de différentes couleurs. La microscopie en fluorescence offre donc un mécanisme de contraste très versatile pour mettre en évidence différentes structures dans un matériau. Cette technique est extrêmement importante pour la biologie. Elle présente toutefois certains inconvénients comme les phénomènes de photoblanchiment et de phototoxicité des marqueurs fluorescents.

La microscopie à contraste de phase (Zernike) [54] et la microscopie à contraste interférentiel (Nomarski) [55] ont été développées vers le milieu du XX^e siècle. Les variations d'indice de réfraction dans le matériau causent un déphasage des fronts d'ondes lumineuses et ce déphasage peut être mesuré avec un phénomène d'interférence. Ces techniques permettent donc d'obtenir un contraste en fonction des variations d'indice de réfraction dans le matériau. L'idée d'utiliser un phénomène d'interférence pour mesurer la phase du signal a été reprise dans le projet de cette thèse.

La microscopie confocale est souvent utilisée conjointement à la microscopie en fluorescence. Le concept derrière cette technique a été élaboré par Marvin Minsky en 1957 [56, 57]. Il a tout de même fallu un certain temps pour que cette technique soit perfectionnée et pour que l'équipement qu'elle requiert soit disponible pour pouvoir en faire un usage commercial. L'avantage principal d'un microscope confocal est de permettre d'obtenir une excellente résolution axiale en ne collectant que le signal provenant d'un plan dans le matériau imagé. Un système confocal utilise un sténopé pour l'illumination du matériau et pour la collection du

signal. Cela permet de focaliser la lumière provenant de la source en un seul point, mais plus important encore, cela fait en sorte de ne collecter que le signal provenant de ce point. Cette méthode requiert une source de lumière intense et un détecteur sensible puisque beaucoup de lumière est rejetée, ce qui fait augmenter le temps d'acquisition de l'image. Puisqu'un seul point à la fois est éclairé dans le matériau, cette technique demande également un système de balayage pour obtenir une image de celui-ci. Ce balayage peut être fait, soit en déviant le faisceau pour qu'il se déplace dans le matériau, ce qui est très rapide, ou en le gardant fixe et en déplaçant le matériau. La résolution spatiale théorique obtenue avec la microscopie confocale est légèrement meilleure que la limite de résolution optique [58]. Le concept de balayage du faisceau a été repris plus tard par les techniques de microscopie optique non linéaire.

La tomographie par cohérence optique (OCT en anglais) est une technique de microscopie interférométrique qui est apparue dans les années 1990 [59]. Cette technique utilise essentiellement un interféromètre de Michelson comme montage. L'un des bras contient un miroir pour renvoyer un signal de référence tandis que l'autre sonde le matériau et collecte le signal réfléchi par les interfaces à l'intérieur de celui-ci. À l'aide d'une source couvrant un large spectre de longueurs d'ondes, il est possible, en mesurant l'interférence de la lumière provenant des deux bras, de retrouver la position des différentes interfaces dans le matériau. Cette technique est donc sensible aux variations d'indice de réfraction dans le matériau.

Il existe également certaines techniques qui permettent de dépasser la limite de résolution optique imposée par la diffraction de la lumière. L'illumination structurée utilise un phénomène d'interférence et un traitement des images pour reconstituer une image avec une meilleure résolution. La Microscopie STED (déplétion par émission stimulée), inventée en 1994 par Stephen W. Hell, permet d'atteindre une résolution spatiale sous 100 nm avec la microscopie en fluorescence [60-62]. Cette technique utilise un faisceau normal pour l'excitation de la fluorescence et un second faisceau dans une couleur décalée vers le rouge et dont le profil d'irradiance à la forme d'un beigne pour désexciter les molécules fluorescentes. Seulement les molécules qui n'auront pas été désexcitées au centre du beigne émettront donc de la fluorescence et la taille de cette zone n'est pas limitée par la limite de diffraction de la lumière. Il existe également d'autres techniques stochastiques qui peuvent atteindre ce genre de résolution spatiale comme la microscopie PALM (localisation par photoactivation) développée en 2006 par Eric

Betzig [62, 63] et la microscopie STORM (par reconstruction stochastique optique) aussi développée séparément en 2006 par Michael J. Rust [64].

Finalement, durant les années 1990, différentes techniques de microscopie optique non linéaire ont fait leur apparition comme la microscopie en fluorescence par absorption multiphotonique [1], la microscopie de seconde harmonique [3-6, 18, 27, 45-47, 65, 66], la microscopie de troisième harmonique [67, 68] et la microscopie par diffusion Raman (CARS) [69-71]. Ces techniques seront décrites plus en détail dans la section 2.3 de ce chapitre étant donné leur lien avec la microscopie GSH.

2.1.2 Microscopie électronique

La microscopie électronique a fait son apparition en 1931 suite au travail d'Ernst Ruska et de Max Knoll [72]. Ce type de microscope utilise un faisceau d'électrons pour sonder le matériau imagé. Les électrons sont émis par une cathode et accélérés par une anode. Un système de lentilles électromagnétique et électrostatique permet de contrôler la divergence du faisceau d'électrons afin de pouvoir le concentrer sur le matériau observé. Le tout se trouve dans une enceinte maintenue sous vide pour que les électrons puissent se propager. La microscopie électronique joue un rôle important dans le développement des nanotechnologies. Elle a également été utilisée pour imager les fibrilles de collagène [25, 30, 73] et les filaments dans les muscles [13-17].

La microscopie électronique en transmission (MET ou TEM en anglais) [74] est une technique similaire à la microscopie optique en champ clair. Le matériau observé doit être très mince pour pouvoir transmettre une partie des électrons qui le traversent. Une image est obtenue en fonction de l'absorption et de la diffusion des électrons dans le matériau. La résolution spatiale que peut atteindre cette technique est de l'ordre de 0,1 nm. Cette technique peut être employée en champ clair ou en champ sombre et il est également possible d'obtenir des images dans un mode de diffraction qui donne des informations sur la structure cristalline d'un matériau comme les techniques de diffraction des rayons X. Bien que la microscopie électronique ne soit pas en mesure d'imager des matériaux encore vivants, celle-ci peut être utilisée sur des échantillons

biologiques très fins. Il existe même certaines techniques de marquages avec des atomes lourds qui jouent un rôle similaire à celui d'un marqueur fluorescent en microscopie optique.

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais) [75] est une technique similaire à la microscopie confocale. Le faisceau d'électron est concentré en un point et balaye la surface du matériau. Lors de l'interaction du faisceau avec la surface du matériau, des électrons secondaires et des électrons rétrodiffusés sont émis. Ceux-ci peuvent être collectés par un détecteur, ce qui permet de reconstituer une image de la surface imagée. Cette technique peut atteindre une résolution spatiale de l'ordre de 1 nm et peut imager la surface d'un matériau opaque. Elle a une grande profondeur de champ, ce qui permet d'obtenir de bonnes images 2D de nanostructures 3D.

2.1.3 Microscopie à sonde locale

La troisième famille de techniques de microscopie regroupe les techniques à sonde locale. Ces techniques utilisent une pointe extrêmement fine qui vient sonder la surface du matériau imagé. Le rayon de courbure au bout de la pointe permet d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre du nanomètre.

La première technique à sonde locale qui est apparue est la microscopie à effet tunnel (STM). Celle-ci a été inventée en 1981 par deux chercheurs chez IBM, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer [72, 76]. La pointe conductrice est balayée à quelques ångströms (0,1 nm) au-dessus de la surface imagée et un phénomène d'effet tunnel permet à un courant électrique de traverser entre la pointe et la surface. En maintenant ce courant constant, une image de la topographie de la densité d'états électroniques de la surface est obtenue. Cette technique peut donc être utilisée avec les matériaux conducteurs ou semi-conducteurs. La résolution spatiale obtenue est de l'ordre de la taille d'un atome. Ce système d'imagerie requiert un système de positionnement excessivement précis et utilise des moteurs piézoélectriques pour déplacer la pointe. Cette technique permet également de déplacer des atomes individuellement sur une surface avec la pointe du microscope [77].

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique semblable à la microscopie à effet tunnel, mais la pointe mesure directement la topographie de la surface puisqu'elle n'utilise pas

de courant par effet tunnel. Elle a été inventée en 1985 par Gerd Binnig, Calvin Quate et Christoph Gerber [78]. La pointe est montée sur un levier flexible dont la déflexion est mesurée par la réflexion d'un laser sur un quadrant de photodiodes ou un STM. Celle-ci peut être utilisée en contact avec la surface ou en mode non contact ou encore en contact intermittent durant le balayage. La résolution spatiale latérale que peut atteindre cette technique est de l'ordre du rayon de courbure de la pointe, ce qui peut être d'environ 10 nm. La résolution spatiale perpendiculaire à la surface peut être de l'ordre de 0,1 nm toutefois. Un des problèmes de cette technique de microscopie est l'usure de la pointe qui entraîne une perte de résolution spatiale latérale durant l'utilisation, surtout en mode contact.

La microscopie à force piézoélectrique (PFM) est une technique dérivée de la microscopie à force atomique. Le matériau imagé est placé sur une électrode et une différence de potentiel alternative est appliquée entre celle-ci et la pointe conductrice du microscope. Le résultat est de faire vibrer les structures piézoélectriques à l'échelle nanométrique sur la surface balayée. Cette vibration est captée par la pointe et la déflexion du levier, sur lequel celle-ci est montée, permet de mesurer localement l'amplitude de la piézoélectricité du matériau. Cette technique a été utilisée entre autres pour mesurer les propriétés piézoélectriques des fibrilles de collagène [31, 32, 40].

La microscopie optique en champ proche (SNOM) est une technique où la pointe est une fibre optique effilée recouverte d'une couche métallique. Une ouverture plus petite que la limite de diffraction optique, au bout de la pointe, permet d'envoyer et de collecter la lumière à la surface du matériau avec une résolution spatiale bien inférieure à la longueur d'onde de celle-ci.

Il existe également d'autres techniques de microscopie à sonde locale plus exotiques qui exploitent différentes interactions entre une pointe nanométrique et une surface. Par exemple, certaines techniques utilisent une pointe métallique pour amplifier localement le champ électrique par résonance plasmon pour amplifier des phénomènes optiques [79].

2.2 Optique non linéaire

La majeure partie de cette section est tirée du livre *Nonlinear Optics* de Robert W. Boyd [80]. Pour en apprendre plus sur l'optique non linéaire, cet ouvrage est fortement recommandé au lecteur.

L'optique non linéaire est un domaine qui est apparu suite à la découverte de la génération de seconde harmonique par Peter Franken en 1961 [81], seulement un an après l'invention du premier laser par Theodore Maiman en 1960 [82]. Il est toutefois important de souligner que l'absorption et l'émission de deux photons par l'intermédiaire d'un niveau virtuel avaient été prédites théoriquement par Maria Göppert-Mayer en 1929 [83, 84]. L'avènement du laser a permis de fournir une source de lumière suffisamment intense pour l'observation de phénomènes optiques non linéaires dans les matériaux, ce qui explique les trente années avant la confirmation expérimentale de cette prédiction. En temps normal, lorsque le champ électrique est faible dans un matériau, sa polarisation diélectrique $P(t)$ [C/m²] est proportionnelle au champ électrique. Toutefois, lorsque le champ est élevé, des contributions d'ordres plus élevés viennent s'ajouter comme le montre la formule

$$P(t) = \sum_{i=1}^{\infty} P^{(i)} = \varepsilon_0 \sum_{i=1}^{\infty} \chi^{(i)} E(t)^i = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E(t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)} E(t)^2 + \varepsilon_0 \chi^{(3)} E(t)^3 + \dots \quad (2.1)$$

où ε_0 est la constante de permittivité du vide, $E(t)$ est le champ électrique [V/m] et $\chi^{(i)}$ sont les coefficients de la susceptibilité diélectrique de $i^{\text{ème}}$ ordre. Concrètement, $\chi^{(i)}$ représente la densité de diffuseurs d'un matériau qui interagissent avec le champ électrique. Étant donné la nature vectorielle de la polarisation et du champ électrique, les coefficients $\chi^{(i)}$ de la susceptibilité diélectrique sont des tenseurs de rang $i+1$. Notez que le champ électrique et la polarisation du matériau sont des quantités qui peuvent varier dans le temps comme dans le cas où le champ électrique correspond à celui d'une onde lumineuse, c'est-à-dire d'une onde électromagnétique. L'irradiance [W/m²] moyenne d'une telle onde en fonction de l'amplitude de la composante électrique du champ électromagnétique [V/m] est donnée par

$$I = \frac{n\varepsilon_0 c}{2} |E|^2 \quad (2.2)$$

où n est l'indice de réfraction et c est la vitesse de la lumière. L'indice de réfraction d'un matériau est d'ailleurs donné par la formule

$$n^2 = 1 + \chi^{(1)}. \quad (2.3)$$

Le coefficient d'ordre un de la susceptibilité diélectrique, $\chi^{(1)}$, affecte directement l'indice de réfraction des matériaux et permet d'expliquer les phénomènes optiques linéaires comme la réflexion, la réfraction, la dispersion, la diffraction, la polarisation de la lumière, la biréfringence et l'activité optique. Son ordre de grandeur est d'environ 1, ce qui fait en sorte que ces phénomènes sont observables indépendamment de l'irradiance. Les coefficients d'ordre plus élevés permettent d'expliquer divers phénomènes optiques non linéaires dont la plupart génèrent de nouvelles fréquences. Les ordres de grandeur des coefficients $\chi^{(2)}$ et $\chi^{(3)}$ sont de 2×10^{-12} m/V et de 4×10^{-24} m²/V² [80], ce qui fait en sorte que ces phénomènes ne sont importants que si l'amplitude du champ électrique, c'est-à-dire l'irradiance, est élevée.

Les prochaines sections s'attarderont aux processus optiques non linéaires de 2^e et 3^e ordre. Les processus d'ordre plus élevés ne seront pas abordés en détail puisqu'ils sont similaires à ceux de 2^e et 3^e ordre, mais demandent une irradiance plus élevée pour être observés.

2.2.1 Processus de 2e ordre

Les processus optiques non linéaires de 2^e ordre ne peuvent se produire que dans les matériaux non centrosymétriques, c'est-à-dire dans les matériaux qui n'ont pas de centre d'inversion. Les matériaux qui ont un centre d'inversion ou encore qui sont isotropes ont un tenseur $\chi^{(2)}$ nul et il n'est tout simplement pas possible d'observer des processus optiques non linéaires de 2^e ordre à l'intérieur de ceux-ci. Puisque la symétrie est brisée à une interface, il est possible d'obtenir des effets optiques non linéaires de 2^e ordre à la surface d'un matériau, mais ceux-ci sont, en général, très faibles.

Les différents processus peuvent être trouvés à partir de la polarisation de 2^e ordre de la formule 2.1 et en utilisant un champ électromagnétique ayant une composante électrique oscillant à deux fréquences différentes

$$E(t) = E_1 e^{-i\omega_1 t} + E_2 e^{-i\omega_2 t} + c.c. \quad (2.4)$$

$$P^{(2)}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} E(t)^2 \quad (2.5a)$$

$$P^{(2)}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[E_1^2 e^{-i2\omega_1 t} + E_2^2 e^{-i2\omega_2 t} + 2E_1 E_2 e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} + 2E_1 E_2^* e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} + c.c. \right] + 2\varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[E_1 E_1^* + E_2 E_2^* \right] \quad (2.5b)$$

La polarisation qui résulte de ce mélange contient plusieurs nouvelles fréquences différentes. Les termes E_1^2 et E_2^2 correspondent à la génération de seconde harmonique. Le terme $E_1 E_2$ correspond à la somme de fréquences. Le terme $E_1 E_2^*$ correspond à la différence de fréquences. Finalement, les termes $E_1 E_1^*$ et $E_2 E_2^*$ correspondent à la rectification optique. Les diagrammes d'énergie de ces différents processus sont présentés à la figure 2.1. Ces processus sont tous paramétriques puisque les transitions ne se font que par des niveaux d'énergie virtuels et que le système final est dans le même état quantique que le système initial. Un processus est dit non paramétrique si le système final est dans un état quantique différent du système initial c'est-à-dire s'il y a eu un échange réel de population électronique entre deux niveaux réels différents. Certains processus de 3^e ordre sont non paramétriques.

La génération de seconde harmonique (GSH) est un phénomène qui peut se produire même si le champ électrique responsable de la polarisation du matériau n'oscille qu'à une seule fréquence. Ce processus a été découvert en 1961 par le groupe de Franken avec un laser rubis et un cristal de quartz [81]. Deux photons à la fréquence ω sont convertis en un photon à la fréquence 2ω dans le matériau. Cette conversion se produit de façon instantanée et il y a une relation de phase entre les photons à ω et 2ω . Cela mène à des effets d'interférences qui font en sorte que la GSH est un processus cohérent. C'est également le cas pour tous les processus optiques non linéaires paramétriques où il n'y a que des transitions par des niveaux d'énergie virtuels à l'exception du niveau fondamental. La GSH peut être très efficace dans certains cristaux et est souvent utilisée pour obtenir une nouvelle longueur d'onde à partir d'un laser ayant une longueur d'onde fixe.

La génération de somme de fréquences (GSF) est très similaire à la GSH, mais celle-ci implique nécessairement que le champ électrique responsable de la polarisation du matériau doit osciller à

deux fréquences différentes. Un photon à la fréquence ω_1 et un photon à la fréquence ω_2 sont convertis en un photon à la fréquence $\omega_1 + \omega_2$.

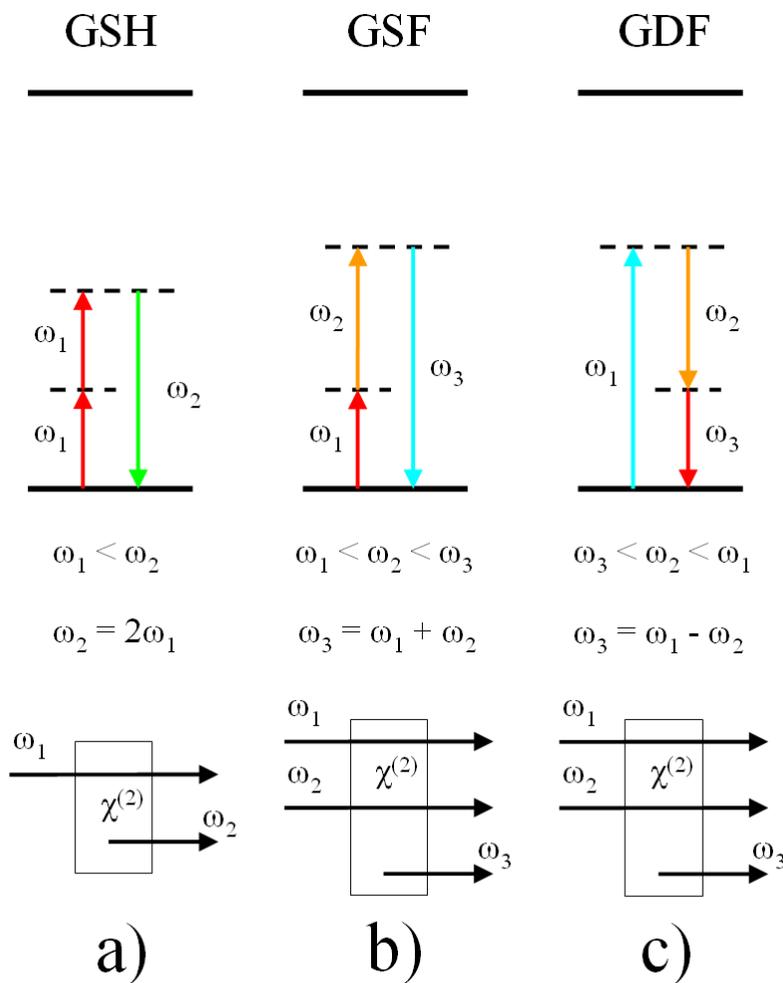


Figure 2.1 Diagrammes de Jablonski et représentations schématiques des principaux processus optiques non linéaires de 2^e ordre. (a) La génération de seconde harmonique (GSH). (b) La somme de fréquences (GSF). (c) La différence de fréquences (GDF).

La génération de différence de fréquences (GDF) est très similaire à la GSH aussi, mais celle-ci implique également que le champ électrique responsable de la polarisation du matériau doit osciller à deux fréquences différentes. Un photon à la fréquence ω_1 est converti en un photon à la fréquence ω_2 et en un photon à la fréquence $\omega_1 - \omega_2$. Pour rendre le processus plus efficace, il faut généralement envoyer d'autres photons à la fréquence ω_2 pour entretenir la GDF comme dans un processus d'émission stimulée. Ce processus est particulièrement utile pour générer

différentes longueurs d'ondes dans l'infrarouge et est à la base du fonctionnement de l'oscillateur paramétrique optique et de l'amplificateur paramétrique optique.

La rectification optique est une polarisation statique, c'est-à-dire avec une fréquence nulle, qui apparaît dans le matériau quand celui-ci est soumis à un champ électromagnétique oscillant à une ou plusieurs fréquences.

Finalement, bien qu'il n'apparaisse pas de façon évidente dans l'équation 2.5, l'effet électro-optique de 2^e ordre, mieux connu sous le nom d'effet Pockels, est un autre phénomène optique non linéaire d'une grande importance. Il a été découvert en 1893 par Friedrich Carl Alwin Pockels [85]. Lorsque le champ électrique E_2 est statique, donc à une fréquence $\omega_2 = 0$, la polarisation de 2^e ordre oscillera à la même fréquence que le champ E_1 ce qui équivaut à un effet optique de premier ordre. En d'autres termes, l'application d'un champ électrique statique E_2 , sur un matériau ayant un $\chi^{(2)}$ non nul, aura pour effet de modifier son indice de réfraction. Ce phénomène a été observé bien avant l'apparition du laser étant donné qu'il ne requiert qu'un champ électrique statique. La variation de l'indice de réfraction est proportionnelle à l'amplitude du champ électrique E_2 appliqué sur le matériau. Cet effet permet de modifier la biréfringence d'un matériau, ce qui est très utile pour contrôler la phase où la polarisation de la lumière qui le traverse. L'effet Pockels est utilisé, entre autres, dans le domaine des télécommunications et pour certaines technologies laser.

2.2.2 Processus de 3e ordre

Les processus optiques non linéaires de 3^e ordre peuvent se produire dans tous les matériaux ce qui les distingue grandement des processus de 2^e ordre. Ceux-ci peuvent être trouvés à partir de la formule 2.1 avec une méthode similaire à celle employée pour trouver les processus de 2^e ordre.

La génération de troisième harmonique (GTH) est un processus paramétrique, similaire à la GSH. Trois photons à la fréquence ω sont convertis en un photon à la fréquence 3ω dans le matériau. La GTH est également un processus cohérent comme la GSH et peut également servir à obtenir une nouvelle longueur d'onde à partir d'un laser ayant une longueur d'onde fixe.

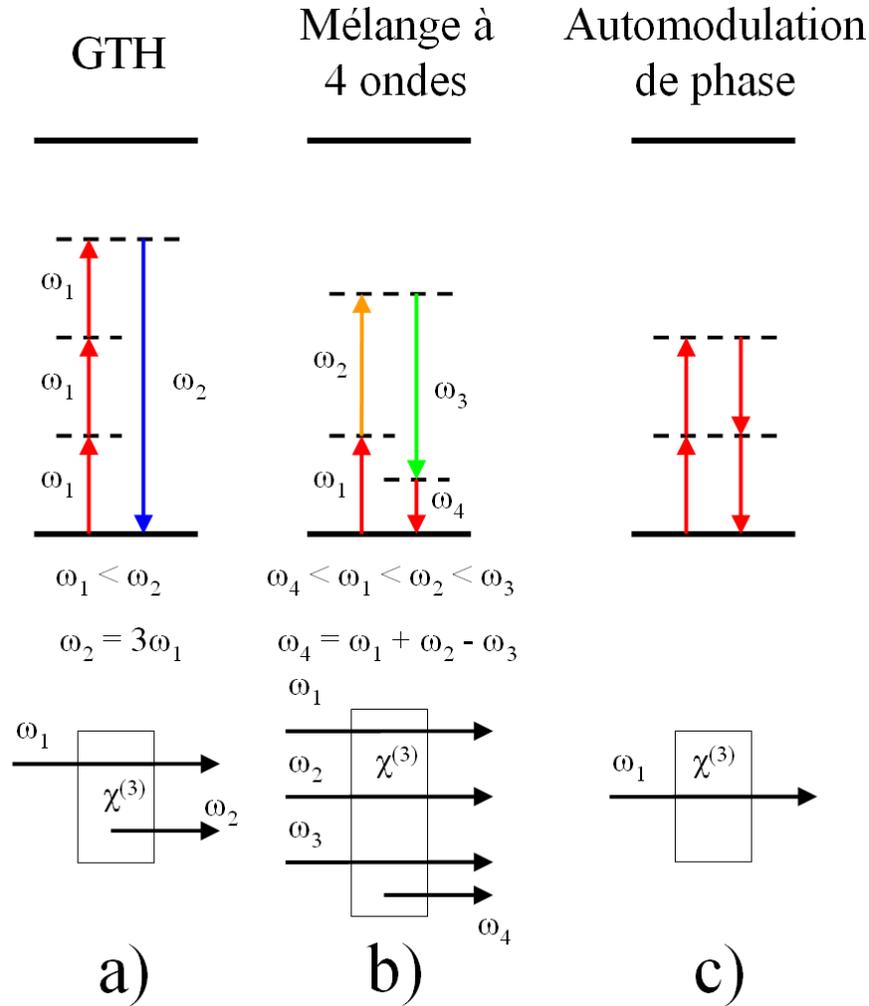


Figure 2.2 Diagrammes de Jablonski et représentations schématiques des principaux processus optiques non linéaires de 3^e ordre. (a) La génération de troisième harmonique (GTH). (b) Le mélange à quatre ondes. (c) L'automodulation de phase.

Le mélange à quatre ondes est un processus paramétrique similaire à la GSF et à la GDF, mais au 3^e ordre. En additionnant ou soustrayant trois fréquences différentes, il est possible de faire plusieurs combinaisons qui permettront d'en obtenir une 4^e.

L'automodulation de phase est un processus paramétrique très important puisque, comme la GSH et la GTH, celui-ci peut se produire même si le champ électrique responsable de la polarisation du matériau n'oscille qu'à une seule fréquence. Une polarisation proportionnelle au $\chi^{(3)}$ et oscillant à la fréquence ω est obtenue lorsque deux photons à la fréquence ω sont convertis en deux photons également à cette fréquence. Il s'agit d'un cas particulier du mélange à quatre

ondes où tous les photons ont la même fréquence. En pratique, cela a pour conséquence que le $\chi^{(3)}$ contribuera à modifier l'indice de réfraction du matériau. Cette modification de l'indice de réfraction du matériau est proportionnelle à l'irradiance de la lumière, ce qui permet d'observer certains phénomènes très intéressants dans les matériaux. Puisque l'irradiance d'un faisceau lumineux est plus forte au centre de celui-ci, l'indice de réfraction du matériau qu'il traverse sera plus grand à cet endroit, ce qui crée un effet similaire à une lentille à gradient d'indice. Ce phénomène est appelé l'autofocalisation et est dû à l'automodulation de phase. Lorsqu'une impulsion laser est courte, celle-ci est formée de composantes qui oscillent à différentes fréquences et de nouvelles fréquences peuvent être obtenues par un mélange à quatre ondes très proche de l'automodulation de phase. La variation de l'irradiance au passage de l'impulsion dans un matériau entraîne une variation de son indice de réfraction, ce qui génère de nouvelles fréquences lumineuses à l'avant et à l'arrière de l'impulsion. Ce phénomène peut être employé pour élargir le spectre d'une impulsion courte ou encore pour obtenir certains effets d'ondes solitons.

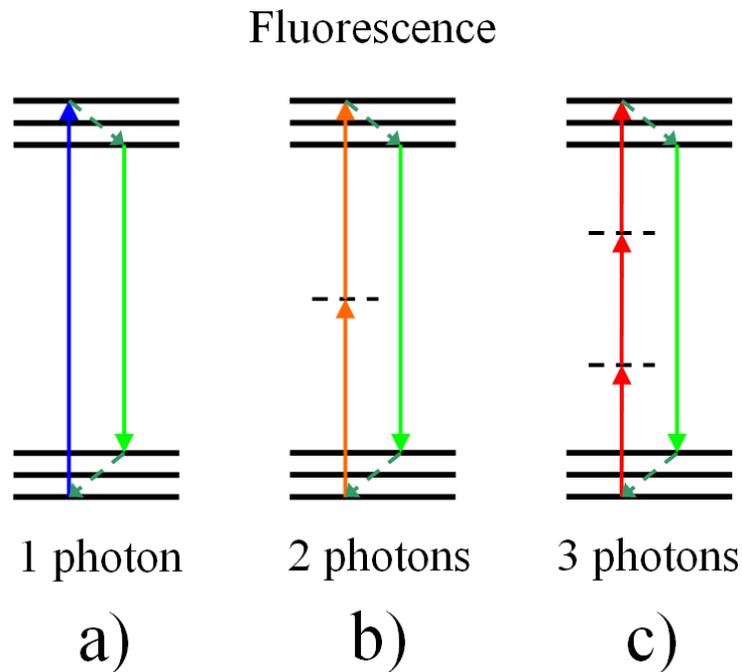


Figure 2.3 Diagrammes de Jablonski des processus d'émission de la fluorescence par absorption (a) d'un photon, (b) de deux photons et (c) de trois photons.

La fluorescence par absorption multiphotonique est un processus non paramétrique. Deux ou plusieurs photons sont absorbés simultanément par une molécule qui se retrouve dans un état excité. Il y a donc une transition vers un niveau réel en passant par un ou des niveaux virtuels. La molécule retourne ensuite dans son état fondamental après l'émission de fluorescence. Ce processus optique non linéaire est une méthode alternative à l'absorption d'un seul photon pour exciter la fluorescence d'une molécule. La fluorescence par absorption de deux photons a été découverte en 1961 par Kaiser et Garrett [86] et la fluorescence par absorption de trois photons a été découverte en 1964 par Singh et Bradley [87]. La section efficace d'absorption de deux photons est proportionnelle à la partie imaginaire du $\chi^{(3)}$ [88].

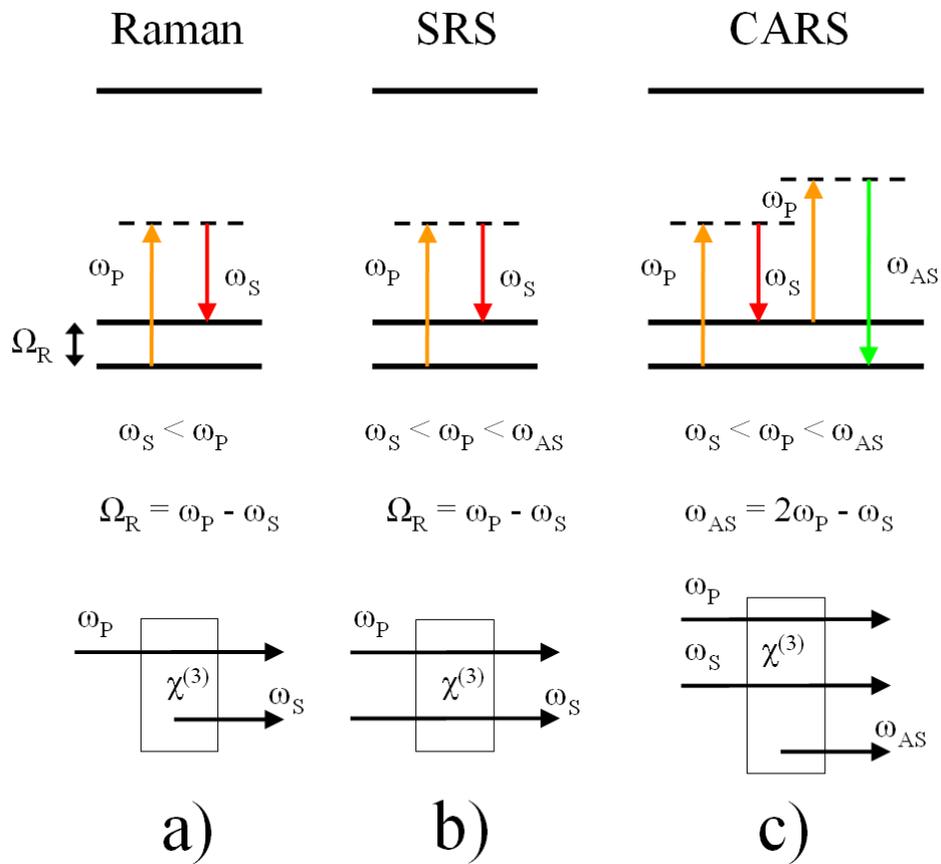


Figure 2.4 Diagrammes de Jablonski et représentations schématiques des différents processus optiques Raman. (a) La diffusion Raman. (b) La diffusion Raman stimulée (SRS). (c) La diffusion Raman cohérente anti-Stokes (CARS).

La diffusion Raman stimulée (SRS) et la diffusion Raman cohérente anti-Stokes (CARS) sont deux processus optiques non linéaires dérivés de la diffusion Raman. La diffusion Raman est un processus qui a été découvert en 1928 par Râman et Krishnan [89]. Un photon pompe ω_p est converti en un photon Stokes ω_s par émission spontanée à partir d'un niveau virtuel. La différence d'énergie se retrouve dans un niveau vibrationnel réel de la molécule dont la fréquence de vibration est $\Omega = \omega_p - \omega_s$. Cependant, cette transition est très improbable par émission spontanée. Approximativement un photon Stokes est émis pour un million de photons pompes. En envoyant des photons à la fois aux fréquences ω_p et ω_s , la conversion peut se faire par émission stimulée et devient beaucoup plus probable. On appelle ce processus diffusion Raman stimulée et il a été découvert en 1962 par Woodbury [90]. Il est cependant difficile de mesurer la quantité de signal ω_p converti en signal ω_s avec cette technique puisque les fréquences mesurées sont les mêmes que celles employées pour l'excitation. La diffusion Raman cohérente anti-Stokes, découverte en 1965 par Maker et Terhune [91], offre une solution à ce problème. En utilisant la diffusion Raman stimulée, on obtient une cohérence vibrationnelle entre les molécules exposées aux faisceaux. Cette cohérence vibrationnelle est ensuite sondée avec un autre photon pompe ω_p , ce qui génère un photon anti-Stokes ω_{as} selon la formule $\omega_{as} = \omega_p + \Omega = 2\omega_p - \omega_s$. L'ensemble de ce processus est appelé la diffusion Raman cohérente anti-Stokes (CARS). Il devient facile de détecter et d'isoler le signal anti-Stokes des autres puisqu'il est à une fréquence différente. Toutefois, le signal anti-Stokes contient également un bruit causé par un mélange à quatre ondes qui n'a rien à voir avec le niveau vibrationnel de la molécule [71, 92-95]. Ces processus sont très utiles puisqu'ils fournissent des informations spectroscopiques qui permettent d'identifier les molécules.

Il existe également un effet électro-optique de 3^e ordre appelé effet électro-optique quadratique ou encore effet Kerr. Il a été découvert en 1875 par John Kerr [96]. Celui-ci est assez similaire à l'effet Pockels à quelques détails près. Il peut être observé dans tous les matériaux. Il rend le matériau biréfringent, comme l'effet Pockels. Il est généralement plus difficile à observer que l'effet Pockels puisqu'il est de 3^e ordre et demande donc un champ électrique statique élevé. Finalement, la variation d'indice de réfraction est proportionnelle au carré de l'amplitude du champ électrique appliqué.

2.3 Résumé des techniques de microscopie optique non linéaire

2.3.1 Revue historique

Plusieurs événements clés sont responsables de l'apparition de la microscopie optique non linéaire. Différentes techniques de microscopie sont apparues et se sont perfectionnées sur plusieurs centaines d'années avant même que les phénomènes optiques non linéaires soient observés et compris. Durant la mise en place de la théorie de la mécanique quantique, au début des années 1930, Maria Göppert-Mayer prédit le phénomène d'absorption ou d'émission simultanée de deux photons par l'intermédiaire d'un niveau virtuel [84]. Au début des années 1960, le laser est inventé [82] et le phénomène est finalement observé expérimentalement ce qui marque le début de l'optique non linéaire [81]. Durant les années 1970, il est découvert que certains tissus biologiques et certaines molécules organiques peuvent générer de la seconde harmonique [97, 98]. Vers la fin des années 1970, un groupe d'Oxford suggère d'utiliser un microscope à balayage pour obtenir des images en microscopie de seconde harmonique [84, 99]. L'utilisation d'un microscope à balayage plutôt qu'un microscope optique en grand champ permet d'atteindre plus facilement l'irradiance requise pour la GSH. Ce groupe constate également que la résolution spatiale d'un tel microscope dépendrait de la longueur d'onde générée plutôt que celle de la source laser. Il suggère également l'utilisation d'un tel montage pour obtenir des images en utilisant d'autres processus optiques non linéaires. Il a également réalisé ce microscope, mais les sources laser capables d'émettre des impulsions brèves n'étaient pas très au point à cette époque. Indépendamment, durant les années 1980, des tissus riches en collagène commencent à être imagés par microscopie de seconde harmonique grand champ [8, 26, 100, 101].

En 1990, Winfried Denk, James H. Strickler et Watt W. Webb publient un article intitulé "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy" qui marquera les débuts de la microscopie optique non linéaire [1]. Le groupe de Webb a utilisé une source laser à colorant qui émettait des impulsions femtosecondes à un taux de répétition élevé dans leur montage, mais le développement des lasers Titane Saphir durant les années 1980 et 1990 [102, 103] fournira une source de lumière femtoseconde bien adaptée pour la microscopie optique non linéaire à

balayage [104]. Vers la fin des années 1990 et le début des années 2000, la microscopie par absorption de trois photons [105], la microscopie GTH [67, 68], la microscopie CARS [69-71] et la microscopie GSH [3-6, 18, 27, 45-47, 65, 66] commencent à être employées en laboratoire comme des outils d'imagerie. Durant ces dernières années, plusieurs améliorations et montages dérivés de ces techniques de microscopie optique non linéaire ont également été développés et l'usage de la microscopie optique non linéaire est assez répandu en laboratoire. La prochaine grande étape pour ce domaine sera sans doute de trouver des façons d'utiliser ces techniques de microscopie comme outil pour pouvoir effectuer des diagnostics et ainsi permettre à celles-ci d'avoir un usage clinique et de s'implanter dans le domaine médical.

2.3.2 Montage et fonctionnement d'un microscope optique non linéaire

Les différentes techniques de microscopie optique non linéaire utilisent toutes un montage assez similaire. Ce montage comprend une ou plusieurs sources lasers pour obtenir l'effet optique non linéaire désiré dans le matériau imagé et un microscope à balayage. La ou les sources lasers doivent avoir un taux de répétition élevé et une durée d'impulsion courte. Le taux de répétition élevé sert à maintenir une faible quantité d'énergie par impulsion pour éviter des effets d'ionisation, d'ablation et de dommages dans le matériau imagé. La durée d'impulsion courte permet d'obtenir une irradiance élevée. En d'autres termes, cela fait en sorte que les photons sont regroupés ensemble dans le temps ce qui favorise les interactions non linéaires qui impliquent plusieurs photons en même temps.

Comme le montre la figure 2.5, le microscope à balayage contient un système composé de miroirs galvanométriques et de lentilles qui permettent de contrôler très rapidement et avec précision l'angle auquel le faisceau arrivera au centre de l'arrière de l'objectif du microscope. En utilisant deux miroirs galvanométriques positionnés avec des axes de rotation perpendiculaires, il devient possible de balayer avec le faisceau laser n'importe quel point dans le plan du matériau imagé.

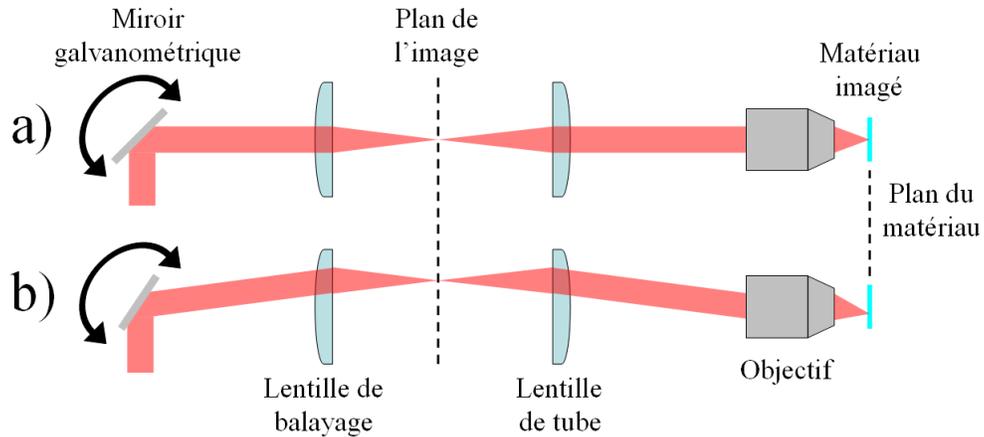


Figure 2.5 Schéma du système de lentilles dans un microscope optique à balayage laser. L'orientation du miroir galvanométrique peut être changée avec précision et rapidité ce qui permet de balayer le faisceau laser le long d'une ligne dans le plan du matériau imagé. Un deuxième miroir galvanométrique avec un axe de rotation orienté perpendiculairement au premier permet de balayer le faisceau laser n'importe où dans le plan du matériau imagé. (a) Trajet du faisceau lorsque le miroir galvanométrique l'envoie au centre des lentilles du microscope. (b) Trajet du faisceau lorsque le miroir galvanométrique le fait dévier du centre des lentilles du microscope.

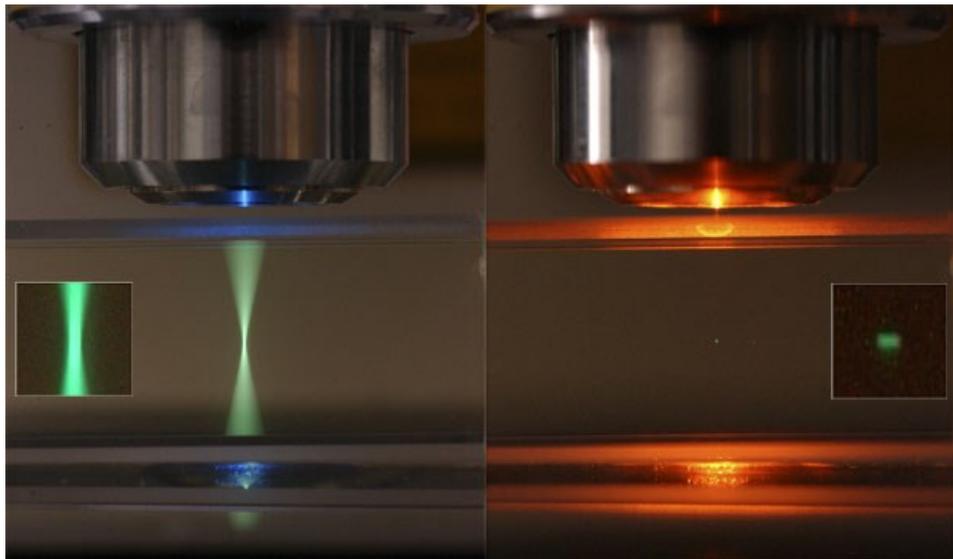


Figure 2.6 Démonstration de la très courte profondeur de champ obtenue en microscopie en fluorescence par absorption de deux photons. Le faisceau est focalisé par un objectif dans une solution de fluorescéine contenue dans une cuvette en quartz. La fluorescéine a un pic d'excitation à 494 nm (bleu) et un pic d'émission à 521 nm (vert). L'image de gauche montre la colonne de fluorescence excitée par un faisceau à 488 nm (absorption d'un photon). Celle de droite montre le point de fluorescence excitée par un faisceau pulsé dans l'infrarouge (absorption de deux photons). Cette image permet de se faire une idée de la résolution spatiale qui est obtenue avec les techniques de microscopie optique non linéaire. Elle a été prise sur un microscope Zeiss par Steve Ruzin et Holly Aaron à UC Berkeley.

Le laser interagit avec le matériau au point focal pour générer un signal optique non linéaire qui dépendra principalement de la polarisation non linéaire locale du matériau, c'est-à-dire du $\chi^{(2)}$ ou du $\chi^{(3)}$ à l'échelle de la taille du point focal. L'interaction n'a lieu principalement qu'au point focal, car c'est là que l'irradiance est la plus élevée [7 (voir figure 2)]. Les photons sont regroupés ensemble dans l'espace à ce point, ce qui favorise les interactions non linéaires qui impliquent plusieurs photons en même temps. Ceci est bien démontré par la comparaison du processus de fluorescence par absorption d'un ou de deux photons, présenté à la figure 2.6. Une résolution spatiale similaire à celle montrée dans cette figure est également obtenue avec les autres techniques de microscopie optique non linéaire.

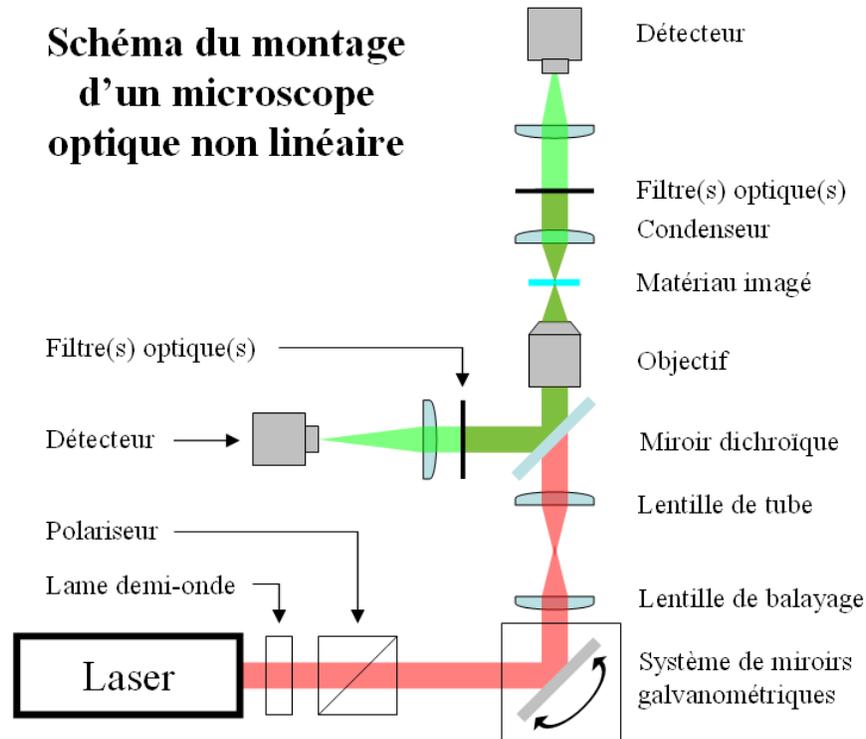


Figure 2.7

Schéma des principaux éléments retrouvés dans un montage de microscope optique non linéaire. Il faut une source laser à impulsions courtes dont la puissance est contrôlée par une lame demi-onde et un polariseur. Selon la technique de microscopie employée, une deuxième source laser peut également être requise, dans quel cas, les faisceaux des deux sources seront combinés et synchronisés ensemble. Un système de balayage du faisceau est également requis. Il est représenté dans ce schéma par le système de miroirs galvanométriques, mais d'autres méthodes peuvent également être employées. Le faisceau laser balaye le matériau imagé et le signal optique non linéaire est collecté dans la direction avant et/ou arrière. Le signal collecté dans la direction arrière est envoyé vers le détecteur par un miroir dichroïque. Des filtres optiques sont utilisés pour bloquer le faisceau laser et laisser passer le signal optique non linéaire. Des détecteurs extrêmement sensibles vont ensuite mesurer ce signal.

Selon le mécanisme optique non linéaire, le signal optique obtenu peut être généré dans la direction de propagation du faisceau (signal avant) ou dans la direction inverse de propagation du faisceau (signal arrière ou signal épi). Le signal arrière est collecté par l'objectif utilisé pour l'illumination du matériau imagé et peut être détourné vers un détecteur par un miroir dichroïque. Le signal avant est collecté par un condenseur ou encore un second objectif pour être envoyé vers un détecteur. Les tubes photomultiplicateurs (PMT) ou les photodiodes à avalanche sont souvent utilisés comme détecteurs en microscopie optique non linéaire puisque le signal optique collecté est généralement extrêmement faible et il faut un détecteur avec un gain élevé pour pouvoir le mesurer. Des filtres sont utilisés pour bloquer complètement la lumière provenant du faisceau laser utilisé pour la génération du signal optique non linéaire qui, lui, peut les traverser pour atteindre les détecteurs. La figure 2.7 permet d'avoir une vue d'ensemble des principaux éléments retrouvés dans la majorité des microscopes optiques non linéaires [106].

Mesure de χ à l'échelle microscopique

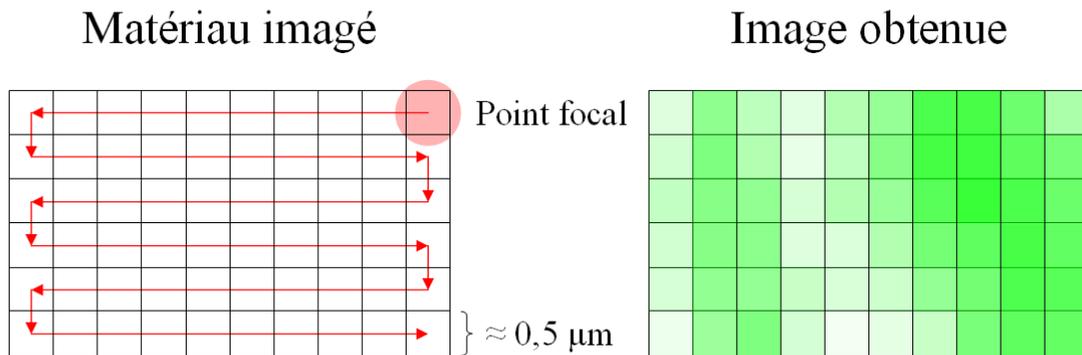


Figure 2.8 Schéma du balayage du faisceau laser dans le matériau imagé. La taille des pixels est de l'ordre de la résolution spatiale du faisceau. Le motif représenté ici est un balayage à trame bidirectionnel. Il est également possible d'utiliser un balayage à trame unidirectionnel où toutes les lignes de l'image sont acquises en déplaçant le faisceau dans la même direction ce qui est plus lent, mais donne généralement une image de meilleure qualité. En synchronisant l'acquisition du détecteur avec le mouvement du faisceau durant le balayage, il est possible de reconstituer une image du matériau permettant de voir les variations dans les propriétés optiques non linéaires de celui-ci à l'échelle microscopique.

Le dernier élément important pour obtenir une image consiste à synchroniser le mouvement des miroirs qui font le balayage avec l'acquisition des données par le détecteur. En balayant une zone rectangulaire avec le faisceau dans le matériau, il devient possible de reconstituer une image

montrant la quantité de signal optique non linéaire qui a été générée à chaque point dans cette zone comme le montre la figure 2.8. Il est également possible d'obtenir la quantité de signal générée à chaque point dans un volume 3D du matériau en prenant une série d'images 2D à différentes profondeurs dans celui-ci.

2.3.3 Techniques de microscopie optique non linéaire

Les principaux processus utilisés en microscopie optique non linéaire sont la fluorescence par absorption multiphotonique, la GSH, la GTH et le CARS. Les principaux avantages de ces techniques sont :

1. La résolution spatiale tridimensionnelle est similaire à celle obtenue en microscopie confocale à balayage, mais sans la nécessité d'utiliser un sténopé.
2. L'usage d'une source infrarouge pour l'illumination permet d'imager beaucoup plus profondément dans les tissus [2 (voir figure 2), 107]. L'infrarouge est moins absorbé et moins diffusé par les tissus que la lumière visible ce qui permet d'obtenir un point focal moins déformé et un bon rapport signal sur bruit, même lorsque le tissu est épais. De plus, les photons du laser qui sont diffusés ne contribuent pas à la génération de bruit dans le signal, comme c'est le cas en microscopie linéaire, puisqu'ils ne passent pas par le point focal.
3. Finalement, certaines de ces techniques comme la GSH et la GTH offrent un mécanisme de contraste complètement nouveau qui ne peut pas être obtenu avec les autres techniques de microscopie optique.

Le principal désavantage de la microscopie optique non linéaire est le coût non négligeable de la source laser et du microscope à balayage.

La microscopie en fluorescence par absorption multiphotonique [1] ne requiert qu'une seule source laser pour l'excitation de la fluorescence. Cette technique est comparable à la microscopie confocale en fluorescence puisque toutes les deux utilisent le même mécanisme de contraste. Toutefois, le fait d'utiliser plusieurs photons dans l'infrarouge pour l'excitation offre l'avantage

de pouvoir imager beaucoup plus profondément dans des tissus biologiques. La profondeur qui peut être atteinte dépend du tissu imagé et du système utilisé, mais va de plusieurs centaines de microns jusqu'à 1 mm ou plus dans certains cas [107]. La résolution spatiale obtenue avec les deux techniques est comparable. Bien que la microscopie multiphotonique ne requière pas l'usage d'un sténopé avant le détecteur, le rendement d'excitation de la fluorescence en fonction de l'irradiance du laser est plus faible qu'en absorption à un photon. Un dernier avantage majeur de la fluorescence par absorption multiphotonique est que, puisque l'excitation n'a lieu qu'au point focal, il n'y a pas de risque de photoblanchiment du reste du tissu. Bref, la microscopie en fluorescence par absorption multiphotonique est surtout avantageuse par rapport à la microscopie confocale pour imager des tissus épais. Un avantage de la microscopie en fluorescence par absorption multiphotonique sur les autres techniques de microscopie optique non linéaire est que le signal arrière et le signal avant sont de même grandeur. Il est donc avantageux de collecter le signal arrière pour pouvoir utiliser cette technique dans des tissus vivants.

La microscopie GSH ne requiert qu'une seule source laser pour la génération du signal. Sa longueur d'onde sera généralement comprise entre 800 nm et 1400 nm pour générer un signal dans le visible. Cette technique permet de voir les structures non centrosymétriques à l'échelle microscopique dans un matériau. Elle peut être utilisée pour étudier certains cristaux transparents ou pour imager certains tissus biologiques à condition de retrouver des structures non centrosymétriques dans ces matériaux. La microscopie GSH peut être employée entre autres pour imager le collagène [4, 6], la myosine [10], les microtubules [5] et les membranes cellulaires [11] dans différents tissus. Contrairement à la fluorescence, la microscopie GSH ne dépose pas d'énergie dans le matériau imagé (sauf par l'absorption du laser) et n'est pas accompagnée d'effet de photoblanchiment [5 (voir figure 15)]. Il s'agit d'une technique endogène, c'est-à-dire que le signal provient directement des structures déjà présentes dans le matériau. Contrairement à la fluorescence, il s'agit également d'une technique cohérente où la génération de signal dépend d'un accord de phase, ce qui fait en sorte que le signal avant est généralement beaucoup plus important que le signal arrière [12]. Il est donc nécessaire, en général, d'utiliser un détecteur pour le signal avant dans un microscope GSH. Finalement, il est facile de combiner les techniques de microscopie en fluorescence par absorption multiphotonique et de microscopie GSH dans un seul montage, ce qui est fort intéressant d'un point de vue pratique et monétaire.

La microscopie GTH [67, 68] ne requiert qu'une seule source laser pour la génération du signal. Sa longueur d'onde sera généralement comprise entre 1200 nm et 2100 nm pour générer un signal dans le visible. Cette technique permet de voir des interfaces transparentes et est particulièrement utile pour voir les très petites structures dans un matériau [108, 109]. Comme la microscopie GSH, cette technique ne dépose pas d'énergie dans le matériau imagé, n'est pas accompagnée d'effet de photoblanchiment et est une technique endogène cohérente. Le signal avant est donc également plus fort que le signal arrière avec cette technique.

La microscopie CARS [69-71, 94] requiert généralement deux sources laser pour la génération du signal. De plus, ces sources doivent être synchronisées entre elles pour émettre des impulsions exactement au même taux de répétition et ces impulsions lumineuses doivent être superposées ensemble spatialement, en réunissant les faisceaux, et temporellement, en contrôlant le délai entre les deux sources. Ces sources doivent émettre des impulsions picosecondes pour favoriser le processus optique non linéaire CARS plutôt que le bruit provenant du mélange à quatre ondes [71, 93-95]. La différence de longueur d'onde entre celles-ci doit correspondre avec celle du niveau vibrationnel que l'on cherche à sonder. Cela peut requérir une ou des sources accordables pour pouvoir faire de la microspectroscopie CARS. Ces contraintes de montage sont beaucoup plus imposantes que pour les trois autres techniques de microscopie optique non linéaire présentées plus haut. Il est possible d'utiliser un oscillateur paramétrique optique picoseconde [94, 110], deux lasers synchronisés ensemble électroniquement [71] ou encore un laser et une fibre microstructurée à effet optique non linéaire [95, 111] pour obtenir un faisceau ayant les propriétés requises pour faire de la microscopie CARS. Comme la microscopie GSH et GTH, la microscopie CARS est une technique cohérente et le signal avant est généralement plus fort que le signal arrière. La microscopie CARS est surtout utilisée pour voir les structures riches en liaisons C-H dans les tissus [93, 112], car ces liaisons sont très abondantes dans les tissus gras et il est plus difficile de voir d'autres liaisons avec cette technique, à cause du bruit provenant du mélange à quatre ondes. Cette technique sert entre autres à imager les structures de myéline retrouvées autour des axones dans la moelle épinière, ce qui pourrait avoir des applications importantes pour l'étude de maladies comme la sclérose en plaques [113, 114]. Il existe également d'autres techniques CARS plus complexes utilisant la polarisation (P-CARS) [93], le temps de vie de la cohérence vibrationnelle (T-CARS [92, 93] ou encore la modulation de la

fréquence du faisceau (FM-CARS) [94, 115] qui permettent de réduire ou d'éliminer le bruit provenant du mélange à quatre ondes.

2.4 Conclusion

Ce chapitre servait à donner au lecteur un aperçu global de l'histoire et une compréhension générale des domaines de la microscopie, de l'optique non linéaire et de la microscopie optique non linéaire. Bien que cette thèse se concentrera principalement sur la microscopie GSH, il semblait logique pour un travail de cette envergure de bien mettre en contexte les principaux éléments qui ont mené à l'émergence de ce domaine de recherche avant d'aborder le projet dans ses détails.

3 MICROSCOPIE GSH

Cette section aborde le phénomène de GSH dans les matériaux. Le cas particulier de la GSH en microscopie où le faisceau laser est fortement focalisé y est décrit en détail. Le patron de radiation de la GSH, c'est-à-dire la direction dans laquelle le signal est généré, y fait également l'objet de discussion. Pour terminer, les applications particulières de la microscopie GSH y sont présentées.

3.1 Hyperpolarisabilité et non centrosymétrie

Au chapitre 2, nous avons brièvement abordé la GSH en indiquant que ce phénomène ne peut se produire que dans les matériaux non centrosymétriques. Pour bien expliquer ce phénomène, il est nécessaire de l'aborder en partant de l'échelle atomique. Cette section est inspirée du chapitre 1 de Boyd [80].

Un atome contient des électrons, des protons et des neutrons, ce qui fait en sorte qu'il contient un centre de charge positive (le noyau) et un centre de charge négative (le centre du nuage d'électrons autour du noyau). À l'équilibre, ces deux centres sont superposés, mais lorsque l'atome est soumis à un champ électrique, comme celui d'une onde électromagnétique par exemple, les centres de charges se décalent et un dipôle électrique se forme. Le même phénomène se produit également dans une molécule, mais de façon plus complexe, en fonction de l'architecture de celle-ci. Le moment dipolaire $\mu(t)$ [Cm] d'un atome ou d'une molécule en fonction du champ électrique est donné par la formule

$$\mu(t) = \mu_0 + \alpha E(t) + \beta E(t)^2 + \gamma E(t)^3 + \dots \quad (3.1)$$

où μ_0 est le moment dipolaire permanent, α est la polarisabilité linéaire, $E(t)$ est le champ électrique et β et γ sont les termes d'hyperpolarisabilité du 1^{er} et du 2^e ordre. Notez que $\mu(t)$, μ_0 et $E(t)$ sont des vecteurs comptant trois éléments (un par dimension de l'espace) et que α est un tenseur de rang deux (une matrice 3x3), β est un tenseur de rang trois (avec 27 éléments) et γ est un tenseur de rang quatre (avec 81 éléments).

Dans un atome seul, μ_0 et β sont nuls à cause de sa symétrie. Ce n'est pas nécessairement le cas dans une molécule. Par exemple, comme on peut le voir à la figure 3.1, la molécule d'eau (H_2O) et la molécule de monoxyde de carbone (CO) ont un moment dipolaire permanent et un β non nuls, tandis que le dioxygène (O_2) et le dioxyde de carbone (CO_2) ont un moment dipolaire et un β nuls. Cela est dû à l'électronégativité des atomes qui les composent, à la nature des liaisons qui les unissent et aux symétries qu'on retrouve dans leur architecture.

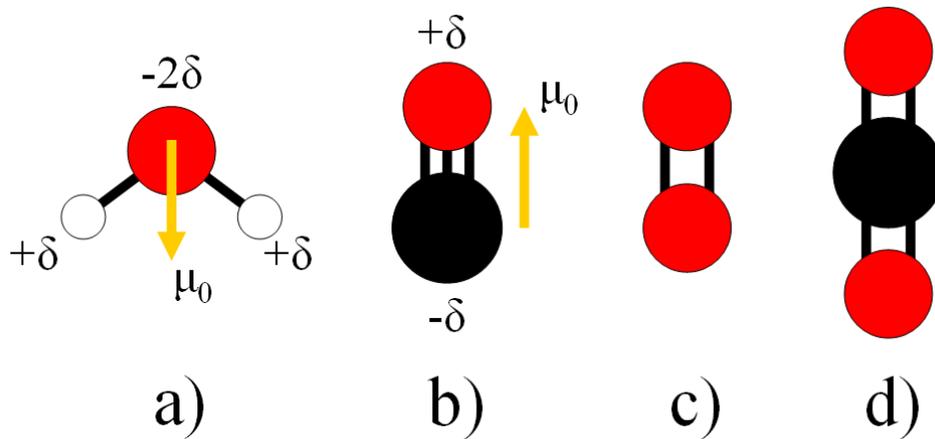


Figure 3.1 Représentation schématique d'une molécule (a) d'eau (H_2O), (b) de monoxyde de carbone (CO), (c) de dioxygène (O_2) et (d) de dioxyde de carbone (CO_2). $\pm\delta$ désigne la distribution des charges partielles dans les molécules. En fonction de la symétrie, de l'électronégativité des atomes et de la nature des liaisons qui les unissent, il peut y avoir un moment dipolaire permanent μ_0 (a-b) ou non (c-d).

Dans un matériau de taille macroscopique, on peut retrouver une très grande quantité de liaisons atomiques qui forment des dipôles. Ces dipôles sont d'ailleurs responsables de la polarisation diélectrique du matériau qui a été introduite au chapitre 2.2.

$$P(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E(t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)} E(t)^2 + \varepsilon_0 \chi^{(3)} E(t)^3 + \dots \quad (3.2)$$

En négligeant les contributions supplémentaires des effets de forme du matériau, il existe une relation assez simple entre la polarisation diélectrique d'un matériau et le moment dipolaire des dipôles qui le composent. La polarisation diélectrique dans un certain volume est égale à la somme vectorielle des dipôles dans celui-ci, divisée par ce volume. En d'autres mots, la polarisation diélectrique dans un certain volume est égale à la densité de dipôles, N_v , multipliée par leur grandeur moyenne dans celui-ci.

$$P(t) = \frac{1}{V} \sum_V \mu(t) = N_V \langle \mu(t) \rangle \quad (3.3)$$

Par extension, il est également possible de lier la susceptibilité diélectrique de 2^e ordre $\chi^{(2)}$ avec l'hyperpolarisabilité du 1^{er} ordre β par la formule

$$\chi^{(2)} = N_V \langle \beta \rangle / \epsilon_0. \quad (3.4)$$

La susceptibilité diélectrique de 2^e ordre d'un matériau dépend entre autre de la densité de dipôles dans celui-ci, mais surtout de leur orientation moyenne. Cela nous amène donc à aborder le sujet de la structure du matériau à l'échelle atomique et de la symétrie qui peut être retrouvée ou non dans cette structure.

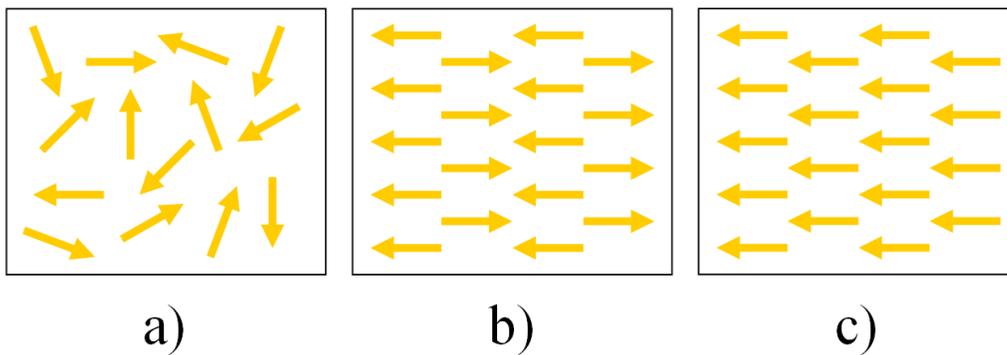


Figure 3.2 Représentation schématique de l'orientation des dipôles dans un matériau (a) amorphe centrosymétrique, (b) cristallin centrosymétrique et (c) cristallin non centrosymétrique. Seul le matériau (c) a un $\chi^{(2)}$ différent de zéro car la somme vectorielle des dipôles est nulle dans les deux autres matériaux.

Dans un matériau, les dipôles peuvent être orientés de façon totalement aléatoire, lorsque celui-ci a une structure amorphe, ou selon une structure très organisée, lorsque celui-ci est de nature cristalline. Un matériau amorphe aura nécessairement un $\chi^{(2)}$ nul puisque, en moyenne, les dipôles qu'il contient ne pointent dans aucune orientation préférentielle. Un matériau cristallin peut avoir un $\chi^{(2)}$ non nul, mais à condition que ses dipôles soient alignés dans une orientation et une direction préférentielle. Certains matériaux cristallins ont un $\chi^{(2)}$ nul même si leurs dipôles sont alignés dans une orientation préférentielle, parce que leurs dipôles pointent dans des directions opposés. Un matériau ayant un $\chi^{(2)}$ non nul est désigné comme étant non centrosymétrique (pas

de centre d'inversion), tandis qu'un matériau ayant un $\chi^{(2)}$ nul est désigné comme étant centrosymétrique (présence d'un centre d'inversion). La figure 3.2 illustre bien la distinction entre un matériau centrosymétrique et non centrosymétrique.

La génération de seconde harmonique ne peut se produire que dans un matériau non centrosymétrique puisque le $\chi^{(2)}$ y est non nul. La preuve mathématique de cette affirmation est donnée dans l'annexe A, mais une description plus simple du phénomène de GSH sera donnée ici.

Lorsqu'une onde électromagnétique traverse un matériau, sa polarisation diélectrique indique qu'il y a une oscillation de ses dipôles. Lorsque le champ électrique de l'onde est élevé, la contribution des termes non linéaires de la polarisation diélectrique devient non négligeable. Ces termes feront en sorte que la polarisation diélectrique oscillera à de nouvelles fréquences différentes de celle de l'onde électromagnétique initiale. Il y aura donc des dipôles dans le matériau qui oscilleront à de nouvelles fréquences. Puisqu'un dipôle qui oscille réémet de la radiation, une onde électromagnétique oscillant à ces nouvelles fréquences sera générée par ceux-ci et pourra être observée à l'extérieur du matériau. Ces quelques lignes expliquent pourquoi il est possible d'observer de la lumière d'une nouvelle couleur après qu'un faisceau lumineux intense ait traversé un matériau ayant des propriétés optiques non linéaires.

Le processus de génération d'harmoniques est un processus cohérent. L'oscillation du moment dipolaire des dipôles dans le matériau suit l'onde électromagnétique quasi-instantanément. Cela fait en sorte qu'il existe une relation de phase entre l'onde électromagnétique générée et l'onde électromagnétique initiale. Comme il sera expliqué au chapitre 5, cette propriété de la GSH est d'ailleurs exploitée pour pouvoir accomplir la microscopie de génération de seconde harmonique interférométrique.

La relation de phase entre l'onde générée et l'onde initiale explique aussi pourquoi les matériaux centrosymétriques ne génèrent pas de seconde harmonique. Il y a une interférence destructive entre le signal généré par des dipôles adjacents ayant des moments dipolaires opposés. Même dans un matériau non centrosymétrique, étant donné que la GSH est un processus cohérent et à cause de cette relation de phase, il peut y avoir des effets d'interférences destructives qui vont

diminuer l'efficacité de la conversion de l'onde initiale en GSH. Ces effets d'interférences sont déterminés par l'accord de phase de l'onde fondamentale (initiale) et de l'onde générée.

Un autre aspect important à aborder pour la GSH est la nature tensorielle du $\chi^{(2)}$ qui ajoute une certaine complexité au phénomène. Le tenseur $\chi^{(2)}$ est de rang trois et a 27 éléments, ce qui n'est pas très commode à représenter sur papier puisqu'il est de dimension 3x3x3. En isolant la polarisation diélectrique de 2^e ordre $P_i^{(2)}(2\omega)$ de la formule 3.2, on obtient en réalité la formule suivante

$$P_i^{(2)}(2\omega) = \varepsilon_0 \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)} E_j(\omega) E_k(\omega) \quad (3.5)$$

où ijk peuvent chacun prendre les valeurs x, y ou z pour représenter une direction dans l'espace, où $\chi_{ijk}^{(2)}$ représente les éléments du tenseur $\chi^{(2)}$ et où $E_j(\omega)$ et $E_k(\omega)$ correspondent aux champs électriques responsables de la GSH. Dans la plupart des cas, à cause des symétries dans le matériau, plusieurs éléments du tenseur sont nuls ou négligeables et seulement quelques-uns de ces éléments auront vraiment de l'importance. Lorsque c'est le cas, cette formule peut être grandement simplifiée en ne gardant que la contribution des éléments importants du tenseur $\chi^{(2)}$.

Pour la GSH en général, ou lorsque la condition de symétrie de Kleinman est respectée, il est possible d'exprimer le tenseur du $\chi^{(2)}$ sous une notation contractée en posant

$$\chi_{ixx}^{(2)} = 2d_{i1} \quad \chi_{iyy}^{(2)} = 2d_{i2} \quad \chi_{izz}^{(2)} = 2d_{i3} \quad \chi_{iyz}^{(2)} = 2d_{i4} \quad \chi_{ixz}^{(2)} = 2d_{i5} \quad \chi_{ixy}^{(2)} = 2d_{i6}. \quad (3.6)$$

Les coefficients d_{il} forment une matrice 3x6 de 18 éléments, dont seulement 10 sont indépendants, qui décrit complètement le $\chi^{(2)}$ d'un matériau de façon plus visuelle. Avec cet outil, la formule 3.5 peut être réorganisée de cette façon

$$\begin{bmatrix} P_x(2\omega) \\ P_y(2\omega) \\ P_z(2\omega) \end{bmatrix} = 2\varepsilon_0 \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x(\omega)^2 \\ E_y(\omega)^2 \\ E_z(\omega)^2 \\ 2E_y(\omega)E_z(\omega) \\ 2E_x(\omega)E_z(\omega) \\ 2E_x(\omega)E_y(\omega) \end{bmatrix}. \quad (3.7)$$

Notez que cette formule n'est valable que pour la GSH. Pour les autres processus non linéaires de 2^e ordre impliquant trois fréquences, ce qui est à droite de l'égalité de la formule 3.7 doit être multiplié par un facteur 2 et les termes de champs électriques sont légèrement différents à cause de la fréquence supplémentaire. Pour éviter la confusion, le restant des simulations dans cette thèse ne concerneront que la GSH et se baseront sur la formule 3.7.

Enfin, un matériau ayant un $\chi^{(2)}$ non nul aura aussi des propriétés piézoélectriques. La contribution électronique à la polarisation diélectrique d'un matériau responsable de son $\chi^{(2)}$ lui confère également des propriétés piézoélectriques. D'autres mécanismes plus lents peuvent également contribuer aux propriétés piézoélectriques d'un matériau [116]. C'est pourquoi, un matériau piézoélectrique n'aura pas forcément un $\chi^{(2)}$ non nul pour un champ électrique oscillant à des fréquences optiques. Il est donc important de retenir que le tenseur piézoélectrique d'un matériau non centrosymétrique est similaire à son tenseur $\chi^{(2)}$. En étudiant un tel matériau avec une technique comme la microscopie à force piézoélectrique, ses propriétés piézoélectriques donnent de l'information sur sa structure $\chi^{(2)}$.

3.2 GSH avec une onde plane

Pour bien comprendre le phénomène de GSH dans un matériau, il est utile de débiter par une simulation de la GSH avec une onde plane traversant un matériau. Cette preuve est tirée des sections 2.1 et 2.2 de Boyd [117].

3.2.1 Solution de l'équation d'onde

On débute avec les équations de Maxwell.

$$\nabla D = \rho \tag{3.8a}$$

$$\nabla B = 0 \tag{3.8b}$$

$$\nabla \times E = -\frac{\partial B}{\partial t} \tag{3.8c}$$

$$\nabla \times H = \frac{\partial D}{\partial t} + J \quad (3.8d)$$

On pose comme conditions que le matériau ne contient pas de charges libres (formule 3.9a), qu'il n'est pas conducteur (formule 3.9b), qu'il n'a pas de propriétés magnétiques à des fréquences d'oscillations optiques (formule 3.9c) et qu'il se comporte comme un diélectrique avec des propriétés non linéaires (formule 3.9d).

$$\rho = 0 \quad (3.9a)$$

$$J = 0 \quad (3.9b)$$

$$B = \mu_0 H \quad (3.9c)$$

$$\begin{aligned} D &= \varepsilon_0 E + P \\ D &= \varepsilon_0 E + P^{(1)} + P^{NL} \\ D &= \varepsilon_0 E + \varepsilon_0 \chi^{(1)} E + P^{NL} \\ D &= \varepsilon_0 (1 + \chi^{(1)}) E + P^{NL} \\ D &= \varepsilon_0 n^2 E + P^{NL} \end{aligned} \quad (3.9d)$$

On trouve l'équation d'onde.

$$\nabla \times E = -\mu_0 \frac{\partial H}{\partial t} \quad (3.10a)$$

$$\nabla \times (\nabla \times E) = -\mu_0 \frac{\partial}{\partial t} (\nabla \times H) \quad (3.10b)$$

$$\nabla(\nabla E) - \nabla^2 E = -\mu_0 \frac{\partial^2 D}{\partial t^2} \quad (3.10c)$$

$$\nabla^2 E \approx \mu_0 \frac{\partial^2 D}{\partial t^2} \quad (3.10d)$$

$$\nabla^2 E - \varepsilon_0 \mu_0 n^2 \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 P^{NL}}{\partial t^2} \quad (3.10e)$$

$$\nabla^2 E - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 P^{NL}}{\partial t^2} \quad (3.10f)$$

Dans cette formule, E et P^{NL} seront de la forme

$$E(r, t) = \sum_n E_n(r) e^{-i\omega_n t} + c.c. \quad (3.11a)$$

$$P^{NL}(r, t) = \sum_n P_n^{NL}(r) e^{-i\omega_n t} + c.c. \quad (3.11b)$$

ce qui permet de simplifier l'équation d'onde à

$$\nabla^2 E_n(r) + \frac{\omega_n^2 n_n^2}{c^2} E_n(r) = -\frac{\omega_n^2}{\varepsilon_0 c^2} P_n^{NL}(r). \quad (3.12)$$

Pour la GSH, le champ devra avoir deux fréquences différentes. Puisqu'il s'agit d'une onde plane, nous assumerons que celle-ci se propage dans la direction Z.

$$E_1(z, t) = A_1 e^{i(k_1 z - \omega_1 t)} + c.c. \quad (3.13a)$$

$$E_2(z, t) = A_2 e^{i(k_2 z - \omega_2 t)} + c.c. \quad (3.13b)$$

où

$$\omega_2 = 2\omega_1 \quad (3.14)$$

En utilisant la formule 3.7, on établit la relation

$$P^{(2)}(\omega_2) = 2\varepsilon_0 d_{eff} [E_1(\omega_1)]^2 \quad (3.15a)$$

$$P^{(2)}(\omega_2) = 2\varepsilon_0 d_{eff} A_1^2 e^{i(2k_1 z - 2\omega_1 t)} \quad (3.15b)$$

$$P^{(2)}(\omega_2) = 2\varepsilon_0 d_{eff} A_1^2 e^{i(2k_1 z - \omega_2 t)} \quad (3.15c)$$

où d_{eff} correspond à la valeur effective de d_{il} en fonction de l'orientation du tenseur $\chi^{(2)}$ par rapport à la polarisation de l'onde électromagnétique.

On substitue ensuite $P^{(2)}(\omega_2)$ dans P^{NL} pour résoudre l'équation 3.12.

$$\nabla^2 E_2(r) + \frac{\omega_2^2 n_2^2}{c^2} E_2(r) = -\frac{\omega_2^2}{\epsilon_0 c^2} P_2^{(2)}(r) \quad (3.16a)$$

$$\frac{\partial^2}{\partial z^2} (A_2 e^{i(k_2 z - \omega_2 t)}) + \frac{\omega_2^2 n_2^2}{c^2} A_2 e^{i(k_2 z - \omega_2 t)} + c.c. = -\frac{\omega_2^2}{\epsilon_0 c^2} (2\epsilon_0 d_{eff} A_1^2 e^{i(2k_1 z - \omega_2 t)}) + c.c. \quad (3.16b)$$

$$\left[\frac{\partial^2 A_2}{\partial z^2} + 2ik_2 \frac{\partial A_2}{\partial z} - k_2^2 A_2 + \frac{\omega_2^2 n_2^2}{c^2} A_2 \right] e^{i(k_2 z - \omega_2 t)} + c.c. = -\frac{2d_{eff} \omega_2^2 A_1^2 e^{i(2k_1 z - \omega_2 t)}}{c^2} + c.c. \quad (3.16c)$$

Puisque $k_2 = \omega_2 n_2 / c$, le troisième et le quatrième terme entre crochets vont s'annuler. On obtient

$$\frac{\partial^2 A_2}{\partial z^2} + 2ik_2 \frac{\partial A_2}{\partial z} = -\frac{2d_{eff} \omega_2^2 A_1^2}{c^2} e^{i(2k_1 - k_2)z}. \quad (3.17)$$

En général, lorsque l'amplitude de l'onde varie lentement dans l'espace, il est possible de négliger le premier terme de gauche par rapport au second. On obtient donc l'équation

$$\frac{\partial A_2}{\partial z} = \frac{id_{eff} \omega_2^2 A_1^2}{k_2 c^2} e^{i\Delta k z} \quad (3.18)$$

où

$$\Delta k = 2k_1 - k_2 \quad (3.19)$$

est appelé le terme d'accord de phase.

En utilisant la même méthode, une seconde équation est obtenue en utilisant la fréquence ω_1 . Ces deux équations permettent de trouver l'évolution du système. Toutefois, si l'irradiance de la GSH produite reste beaucoup plus faible que l'irradiance du signal à la fréquence fondamentale,

comme c'est le cas en microscopie, on peut alors assumer que A_1 reste constant et une solution peut être obtenue en intégrant directement l'équation 3.18.

$$A_2 = \int_0^L \frac{id_{eff}\omega_2^2 A_1^2}{k_2 c^2} e^{i\Delta k z} dz \quad (3.20a)$$

$$A_2 = \frac{id_{eff}\omega_2^2 A_1^2}{k_2 c^2} \int_0^L e^{i\Delta k z} dz \quad (3.20b)$$

$$A_2 = \frac{id_{eff}\omega_2^2 A_1^2}{k_2 c^2} \left[\frac{e^{i\Delta k z}}{i\Delta k} \right]_0^L \quad (3.20c)$$

$$A_2 = \frac{id_{eff}\omega_2^2 A_1^2}{k_2 c^2} \left[\frac{e^{i\Delta k L} - 1}{i\Delta k} \right] \quad (3.20d)$$

On convertit ensuite les amplitudes en irradiances.

$$I_i = \frac{n_i \epsilon_0 c}{2} |A_i|^2 \quad (3.21a)$$

$$|A_1|^2 = \frac{2I_1}{n_1 \epsilon_0 c} \quad (3.21b)$$

$$A_2 = \frac{id_{eff}\omega_2^2}{k_2 c^2} \left(\frac{2I_1}{n_1 \epsilon_0 c} \right) \left[\frac{e^{i\Delta k L} - 1}{i\Delta k} \right] \quad (3.22a)$$

$$A_2 = \frac{i2d_{eff}\omega_2^2 I_1}{n_1 \epsilon_0 k_2 c^3} \left[\frac{e^{i\Delta k L} - 1}{i\Delta k} \right] \quad (3.22b)$$

$$I_2 = \frac{n_2 \epsilon_0 c}{2} |A_2|^2 \quad (3.23a)$$

$$I_2 = \frac{n_2 \varepsilon_0 c}{2} \frac{i 2 d_{\text{eff}} \omega_2^2 I_1}{n_1 \varepsilon_0 k_2 c^3} \left[\frac{e^{i\Delta k L} - 1}{i\Delta k} \right] \frac{-i 2 d_{\text{eff}} \omega_2^2 I_1}{n_1 \varepsilon_0 k_2 c^3} \left[\frac{e^{-i\Delta k L} - 1}{-i\Delta k} \right] \quad (3.23b)$$

$$I_2 = \frac{n_2 \varepsilon_0 c}{2} \frac{4 d_{\text{eff}}^2 \omega_2^4 I_1^2}{n_1^2 \varepsilon_0^2 k_2^2 c^6} \left[\frac{e^{i\Delta k L/2} - e^{-i\Delta k L/2}}{i\Delta k} \right] e^{i\Delta k L/2} \left[\frac{e^{-i\Delta k L/2} - e^{i\Delta k L/2}}{-i\Delta k} \right] e^{-i\Delta k L/2} \quad (3.23c)$$

$$I_2 = \frac{2 d_{\text{eff}}^2 \omega_2^4 n_2^2 I_1^2}{n_1^2 n_2 \varepsilon_0 k_2^2 c^5} \left[\frac{e^{i\Delta k L/2} - e^{-i\Delta k L/2}}{i\Delta k} \right] \left[\frac{-e^{-i\Delta k L/2} + e^{i\Delta k L/2}}{i\Delta k} \right] \quad (3.23d)$$

$$I_2 = \frac{2 d_{\text{eff}}^2 \omega_2^2 I_1^2}{n_1^2 n_2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\omega_2^2 n_2^2}{k_2^2 c^2} \left(\left[\frac{e^{i\Delta k L/2} - e^{-i\Delta k L/2}}{2i} \right] \frac{L}{\Delta k L/2} \right)^2 \quad (3.23e)$$

$$I_2 = \frac{2 d_{\text{eff}}^2 \omega_2^2 I_1^2}{n_1^2 n_2 \varepsilon_0 c^3} L^2 \left(\frac{\sin(\Delta k L/2)}{\Delta k L/2} \right)^2 \quad (3.23f)$$

La formule 3.23f est extrêmement importante. Celle-ci permet de comprendre comment l'irradiance de la GSH se comportera en fonction de différents paramètres et permet même de l'approximer, à condition de connaître ceux-ci avec précision. Elle indique que l'irradiance de la GSH dépendra du carré de $\chi^{(2)}$, du carré de ω_2 , du carré de l'irradiance du laser à ω_1 , du carré de la longueur d'interaction L et finalement d'un dernier paramètre suivant une fonction sinc^2 qui est associé à l'accord de phase et qui peut grandement affecter la quantité de GSH obtenue. Vu son importance, ce dernier paramètre est décrit séparément dans la prochaine section.

3.2.2 Accord de phase

L'accord de phase est déterminé par la fonction $\text{sinc}^2(\Delta k L/2)$ où $\Delta k = 2k_1 - k_2$. Il s'agit d'un effet qui provient du fait que l'onde à la fréquence ω_1 et celle à la fréquence ω_2 ne se propagent pas nécessairement avec la même vitesse de phase. Lorsque ces vitesses sont différentes, après une certaine distance de propagation dans le matériau, un déphasage s'accumule entre les ondes à ω_1 et à ω_2 . Ce déphasage fera en sorte que le signal à ω_2 généré plus loin dans le matériau interférera destructivement avec le signal à ω_2 généré plus tôt dans le matériau. En pratique, la puissance du signal GSH va osciller périodiquement durant sa propagation entre zéro et une

valeur maximale déterminée par l'accord de phase. La GSH est reconvertie en signal à la fréquence ω_1 ce qui explique le mécanisme de diminution du signal de GSH après qu'il ait été généré.

Ce phénomène peut également être vu d'une autre manière. L'onde à ω_1 va activer le réseau de dipôles qui émettront de la radiation à la fréquence ω_2 . Toutefois, étant donné que l'onde à ω_1 ne se propage pas à la même vitesse que l'onde à ω_2 , la synchronisation des dipôles sera imparfaite pour continuellement faire croître le signal de GSH dans la direction de propagation du faisceau à ω_1 . Après une certaine distance, le déphasage devient trop important et on obtient des effets d'interférence destructive qui font diminuer le signal de GSH jusqu'à ce qu'il devienne suffisamment faible pour augmenter à nouveau.

Notez que la formule 3.19 qui définit l'accord de phase ne s'applique que pour la direction de propagation avant. Dans le cas où la GSH se propagerait dans la direction arrière, le signe de k_2 est inversé et l'accord de phase pour cette direction devient

$$\Delta k_{epi} = 2k_1 + k_2. \quad (3.24)$$

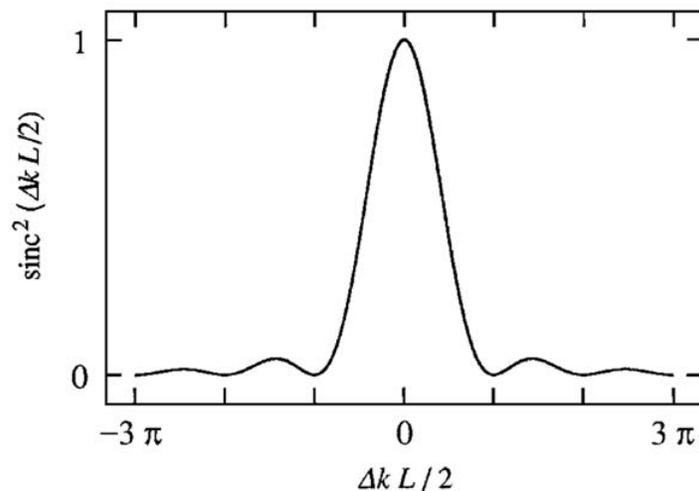


Figure 3.3 Cette figure est tirée de Boyd [117 (voir figure 2.2.2, p. 78)]. Efficacité de la GSH en fonction de l'accord de phase.

Il est utile de définir sur quelle distance le processus de GSH reste efficace dans un matériau. On définit donc une longueur pour laquelle $\text{sinc}^2(\Delta kL/2)$ reste élevé. Celle-ci est appelée la longueur de cohérence et est donnée par la formule

$$L_{coh} = \frac{2}{\Delta k}. \quad (3.25)$$

Comme le montre la figure 3.3, si $L < L_{coh}$, alors $\text{sinc}^2(\Delta kL/2)$ est supérieur à 0,7 et le phénomène de GSH sera efficace.

En temps normal, la vitesse de phase des ondes à ω_1 et à ω_2 dans un matériau est toujours différente à cause de la dispersion. Le tableau 3.1 donne un aperçu de Δk pour les directions de propagation avant et arrière dans quelques matériaux pour les longueurs d'ondes $\lambda_1 = 800$ nm et $\lambda_2 = 400$ nm. Comme on peut le voir, pour la direction de propagation avant, la longueur de cohérence est généralement de l'ordre d'une dizaine de microns. Pour la microscopie, cela n'est pas un problème trop important puisque la longueur d'interaction dans le volume focal est de l'ordre de quelques microns de toute manière. Toutefois, cela pose problème pour les applications où l'on veut obtenir un bon rendement de conversion du laser à ω_1 en GSH.

Matériau	n_1	n_2	Δk	L_{coh}	Δk_{epi}	$L_{coh\ epi}$
Eau H ₂ O	1,329	1,339	-157080	12,7 μm	$41,9 \times 10^6$	48 nm
Quartz SiO ₂	1,5383	1,5577	-304734	6,6 μm	$48,6 \times 10^6$	41 nm
LiNbO ₃	2,17547	2,33212	-2460652	0,81 μm	$70,8 \times 10^6$	28 nm

Tableau 3.1 Accord de phase aux longueurs d'ondes $\lambda_1 = 800$ nm et $\lambda_2 = 400$ nm, pour les directions de propagation avant et arrière (épi), dans différents matériaux. Bien que l'eau soit un matériau centrosymétrique, les tissus biologiques en contiennent. L'eau joue donc un rôle dans la détermination de leur indice de réfraction et de l'accord de phase dans ceux-ci. Les indices de réfraction sont tirés du site internet [118].

Dans le cas où un rendement de conversion élevé est recherché pour la GSH, l'idéal est d'avoir un accord de phase parfait, $\Delta k = 0$, ce qui donne une longueur de cohérence très grande et ne limite la GSH que par l'épaisseur du cristal non linéaire et la quantité de puissance laser pompe disponible. Un accord de phase parfait peut être obtenu, pour la direction de propagation avant,

dans certains cas, lorsque les propriétés biréfringentes d'un cristal peuvent être exploitées avec ses propriétés optiques non linéaires. Une autre astuce consiste à fabriquer synthétiquement le cristal non linéaire pour obtenir une condition de quasi accord de phase. Ces cristaux sont appelés des cristaux périodiquement orientés. Ils sont formés d'un empilement périodique de couches cristallines d'une épaisseur micrométrique dont le signe du $\chi^{(2)}$ est opposé entre les couches voisines. Si l'épaisseur des couches est $\pi / \Delta k$, on obtient alors une condition de quasi accord de phase qui fait en sorte que le signal de GSH peut continuer de croître puisque l'inversion du signe du $\chi^{(2)}$ dans le cristal permet de compenser le désaccord de phase entre l'onde GSH et l'onde du laser à ω_1 . La figure 3.4 présente le schéma d'un cristal périodiquement orienté.

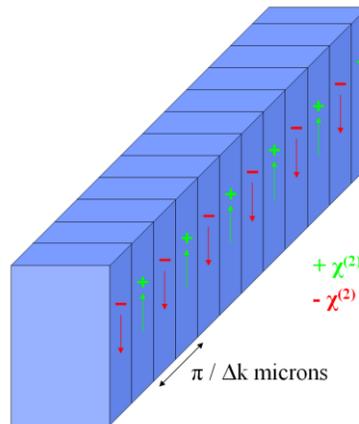


Figure 3.4 Structure d'un cristal périodiquement orienté. Le signe du $\chi^{(2)}$ s'inverse entre les domaines adjacents. Cela donne au matériau une structure périodique qui permet d'atteindre un quasi accord de phase pour la GSH.

Suite aux précisions apportées sur l'accord de phase et pour terminer, voici quelques conclusions tirées de la formule 3.23f pour pouvoir en faire un usage pratique avec un laser pulsé en microscopie optique non linéaire.

1. Doubler la puissance du laser à ω_1 va quadrupler la puissance de la GSH.
2. Doubler la durée des impulsions du laser (sans changer sa puissance) a pour conséquence de diviser l'irradiance de moitié. Toutefois, l'interaction non linéaire a lieu durant deux fois plus longtemps. La puissance de la GSH est donc divisée par 2^2 et multipliée par 2 suivant cette logique. La puissance de la GSH est donc inversement proportionnelle à la

durée des impulsions du laser (d'où l'intérêt d'utiliser un laser à impulsions courtes pour maximiser la GSH).

3. Doubler la surface du faisceau laser sur le matériau (sans changer sa puissance) a pour conséquence de diviser l'irradiance de moitié. Toutefois, l'interaction non linéaire a lieu sur une surface deux fois plus grande. La puissance de la GSH est donc divisée par 2^2 et multipliée par 2 suivant cette logique. La puissance de la GSH est donc inversement proportionnelle à la taille de la surface éclairée par le laser. À une puissance fixe, un faisceau concentré dans un point plus petit génère plus de GSH et donne une meilleure résolution spatiale pour la microscopie (d'où l'intérêt d'utiliser un objectif de microscope pour concentrer le laser et maximiser la GSH). Toutefois, si l'intensité lumineuse est trop élevée, il y a risque d'endommager le matériau.
4. La GSH augmente en fonction du carré de la distance sur laquelle a lieu l'interaction. Toutefois, cela est seulement le cas si la taille des structures non centrosymétriques du matériau imagé reste inférieure à la longueur de cohérence L_{coh} . En général, en microscopie, on ne cherche pas à augmenter la distance sur laquelle a lieu l'interaction, car cela dégrade la résolution spatiale et le matériau imagé offre généralement un accord de phase imparfait.
5. Le signal GSH arrière est généralement extrêmement faible puisque la longueur d'interaction dépasse $L_{\text{coh}}^{\text{epi}}$ dans la plupart des cas (voir le tableau 3.1). Il arrive plus souvent qu'un signal mesuré dans la direction arrière soit un signal GSH émis dans la direction avant et rétrodiffusé ou réfléchi par une interface vers l'arrière, plutôt qu'un signal GSH émis directement dans la direction arrière.
6. Il peut s'avérer difficile de déterminer avec précision le paramètre d_{eff} dans un matériau. Celui-ci dépend du système cristallin et de la classe cristalline du matériau responsable de la GSH. Son amplitude est propre à chaque matériau et dépend de la fréquence ω_1 employée. Finalement, il dépend également de l'angle entre l'orientation cristalline et la polarisation de l'onde.

3.3 GSH avec un faisceau fortement focalisé

L'approximation par une onde plane du faisceau laser permet de comprendre les principes fondamentaux de la GSH dans un matériau. Toutefois, en microscopie, le faisceau laser est fortement focalisé par un objectif de microscope. Il est donc plus juste d'utiliser un faisceau gaussien pour représenter le faisceau laser dans un matériau. Cette section présentera les propriétés d'un faisceau gaussien et la façon dont il affecte la GSH dans un matériau. Les preuves concernant le faisceau gaussien sont tirées de la section 2.10 de Boyd [117].

3.3.1 Approximation par un faisceau gaussien

Reprenons l'équation d'onde dans un milieu linéaire.

$$\nabla^2 E - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = 0 \quad (3.26)$$

Bien que cela ne soit pas apparent à première vue, en faisant quelques approximations, le champ électrique d'un faisceau gaussien est une solution de l'équation 3.26 et est donné par la formule

$$E(r, z, t) = E_0 \frac{w_0}{w(z)} e^{\frac{-r^2}{w(z)^2}} e^{i \frac{kr^2}{2R(z)}} e^{i\Phi(z)} e^{i(kz - \omega t)} \quad (3.27a)$$

où

$$r = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (3.27b)$$

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2} \quad (3.27c)$$

$$R(z) = z \left[1 + \left(\frac{z_0}{z}\right)^2 \right] \quad (3.27d)$$

$$\Phi(z) = -\arctan\left(\frac{z}{z_0}\right) \quad (3.27e)$$

$$z_0 = \frac{\pi w_0^2 n}{\lambda} \quad (3.27f)$$

$$w_0 = \frac{\lambda}{\pi n \theta_{div}} \approx \frac{\lambda}{\pi N.A.} \quad (3.27g)$$

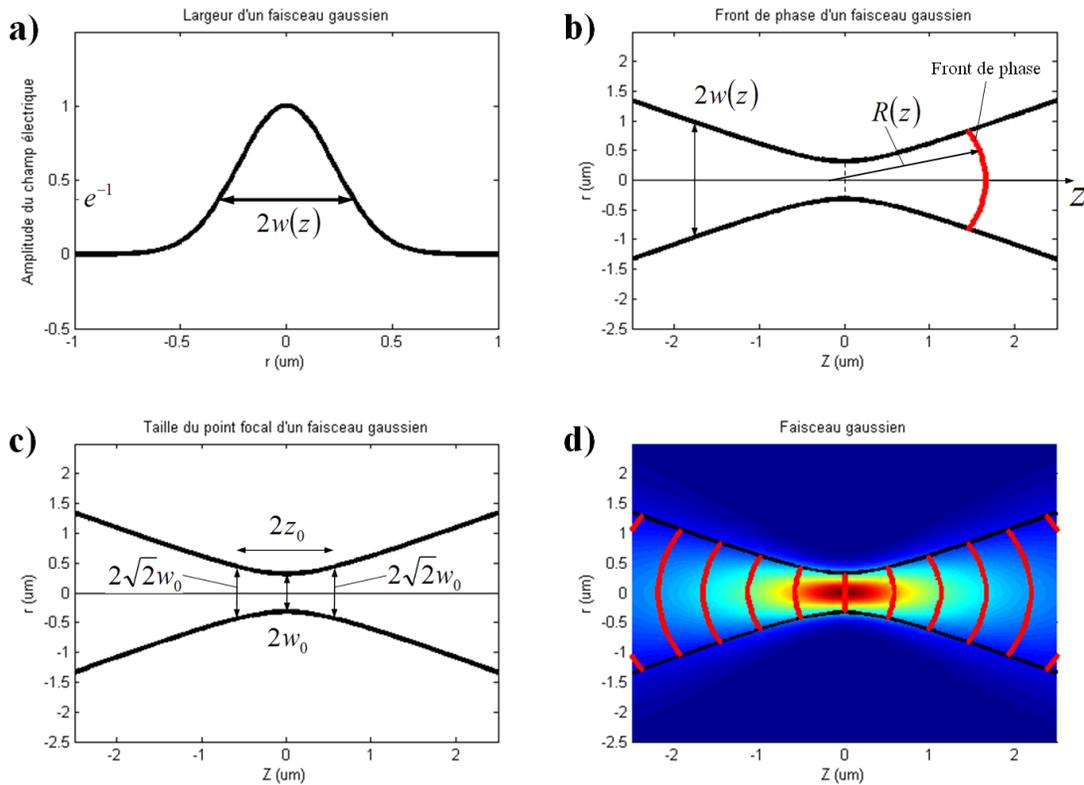


Figure 3.5 Graphiques permettant de visualiser les caractéristiques d'un faisceau gaussien. (a) L'amplitude du champ électrique en fonction de r garde toujours un profil gaussien de largeur $2w(z)$, peu importe la valeur de z . (b) Le faisceau se propage dans la direction z . Il converge en un point et diverge ensuite. Le rayon de courbure des fronts de phase du faisceau est donné par $R(z)$. (c) La dimension du point focal où l'amplitude du champ électrique est la plus élevée est donnée par $2w_0$ et $2z_0$. À $z = \pm z_0$, l'aire du faisceau est le double de l'aire à $z = 0$. (d) Ce dernier graphique montre l'amplitude du champ électrique en fonction de r et de z . L'amplitude est presque nulle aux endroits bleu foncé et est maximale au centre du point focal qu'on peut voir en rouge foncé. Le point focal a approximativement la forme d'un ellipsoïde ovale dans le plan r - z . Finalement, les lignes rouges représentent des fronts de phase du faisceau qui sont espacés de 2π .

r correspond au rayon en coordonnées cylindrique dans l'une des directions transverses à l'axe z . θ_{div} désigne l'angle de divergence du faisceau dans le champ lointain, tandis que $N.A.$ signifie l'ouverture numérique qui est liée à l'angle θ_{div} . Dans l'équation 3.27a, on retrouve les éléments d'une onde plane se propageant dans la direction de l'axe z . On retrouve également un terme qui module l'amplitude en fonction de z , un terme qui module l'amplitude en fonction de r et deux termes qui modulent la phase en fonction de r et z . Le terme 3.27c sert à désigner la largeur du faisceau en fonction de z (figure 3.5a). Le terme 3.27d définit le rayon de courbure des fronts de phase de l'onde (figure 3.5b). Le terme 3.27e est une correction de la phase pour le faisceau gaussien par rapport à celui d'une onde plane. Finalement, les termes 3.27f et 3.27g définissent la taille du point focal du faisceau (figure 3.5c) et sont définis par l'angle θ_{div} , la longueur d'onde λ et l'indice de réfraction n . La figure 3.5d permet de visualiser l'amplitude et la phase du champ électrique en fonction de r et z pour bien comprendre l'apparence d'un faisceau gaussien.

Notez qu'il est également possible d'exprimer la formule 3.27a sous une forme plus esthétique, mais moins facile à interpréter.

$$E(r, z, t) = E_0 \left(1 + i \frac{z}{z_0} \right)^{-1} e^{\frac{-r^2}{w_0^2} \left(1 + i \frac{z}{z_0} \right)^{-1}} e^{i(kz - \omega t)} \quad (3.28)$$

3.3.2 Phase de Gouy

La formule 3.27e définit un terme de phase dans l'équation 3.27a qui est appelé la phase de Gouy [11, 108, 119]. Ce terme applique un déphasage de $\pi/2$ et de $-\pi/2$ de part et d'autre du point focal. La meilleure façon de le visualiser consiste à comparer les fronts de phase d'un faisceau gaussien avec ceux d'une onde plane comme à la figure 3.6.

Cette anomalie dans la phase du faisceau gaussien a un impact majeur sur la GSH. En effet, puisque la phase est doublée par le processus de GSH, la phase de Gouy à ω causera un déphasage variant de $+\pi$ à $-\pi$ de part et d'autre du point focal à 2ω . Hors, là où l'intensité est élevée le long de l'axe z , cela correspond à un déphasage qui s'approche de π entre le signal généré avant et après le point focal. Par exemple, le déphasage à 2ω entre les points $(0, -z_0)$ et $(0, z_0)$ est d'exactly π . Malheureusement, un déphasage de π entraîne nécessairement un effet

d'interférence destructive. Si le faisceau est focalisé au cœur d'un milieu ayant un $\chi^{(2)}$ uniforme, la GSH générée avant le point focal interférera destructivement avec la GSH générée après, résultant en un signal très faible. Il faut donc un milieu non uniforme avec une ou plusieurs interfaces pour obtenir de la GSH avec un faisceau gaussien. Heureusement, la microscopie GSH s'intéresse avant tout à l'étude de milieux non uniformes.

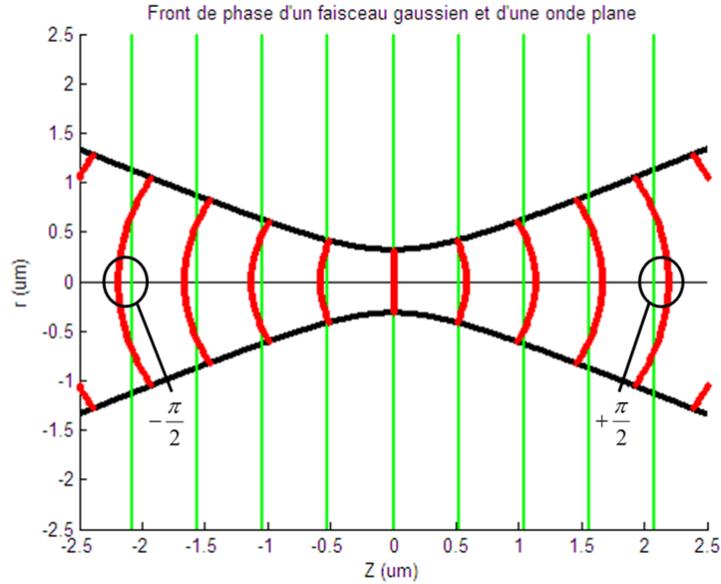


Figure 3.6 Comparaison des fronts de phase d'un faisceau gaussien (en rouge) avec ceux d'une onde plane (en vert). L'anomalie de phase de Gouy pour un faisceau gaussien devient apparente le long de l'axe z lorsqu'on s'éloigne du point focal. Avant le point focal, les fronts de phase ont un retard de $\pi/2$ par rapport à une onde plane tandis qu'après ils ont une avance de $\pi/2$.

3.3.3 Solution de l'équation d'onde pour un faisceau gaussien

Maintenant que les caractéristiques d'un faisceau gaussien ont été bien définies, reprenons à partir de l'équation 3.12 pour trouver la solution de l'équation d'onde pour la GSH avec un faisceau gaussien. En utilisant des simplifications similaires à celles effectuées aux équations 3.16 à 3.18, on arrive à simplifier l'équation d'onde.

$$\nabla^2 E_n(r, z) + \frac{\omega_n^2 n_n^2}{c^2} E_n(r, z) = -\frac{\omega_n^2}{\epsilon_0 c^2} P_n^{NL}(r, z) \quad (3.29a)$$

$$2ik_n \frac{\partial E_n(r, z)}{\partial z} + \nabla_T^2 E_n(r, z) \approx -\frac{\omega_n^2}{\varepsilon_0 c^2} P_n^{NL}(r, z) \quad (3.29b)$$

L'onde à la longueur d'onde fondamentale est de la forme

$$E_1(r, z) = E_1 \left(1 + i \frac{z}{z_0} \right)^{-1} e^{\frac{-r^2}{w_0^2} \left(1 + i \frac{z}{z_0} \right)^{-1}} e^{ik_1 z} \quad (3.30)$$

tandis qu'on suppose que la solution pour la GSH est de la forme

$$E_2(r, z) = E_2(z) \left(1 + i \frac{z}{z_0} \right)^{-1} e^{\frac{-2r^2}{w_0^2} \left(1 + i \frac{z}{z_0} \right)^{-1}} e^{ik_2 z}. \quad (3.31)$$

À partir de la formule 3.30 et en utilisant encore une fois la formule 3.7, on établit la relation

$$P^{(2)}(\omega_2) = 2\varepsilon_0 d_{eff} [E_1(\omega_1)]^2 \quad (3.32a)$$

$$P^{(2)}(\omega_2) = 2\varepsilon_0 d_{eff} E_1^2 \frac{1}{\left(1 + i z/z_0 \right)^2} e^{\frac{-2r^2}{w_0^2} \left(1 + i \frac{z}{z_0} \right)^{-1}} e^{i2k_1 z}. \quad (3.32b)$$

On substitue 3.31 et 3.32b dans 3.29b.

$$2ik_2 \frac{\partial E_2(r, z)}{\partial z} + \nabla_T^2 E_2(r, z) = -\frac{\omega_2^2}{\varepsilon_0 c^2} \left[2\varepsilon_0 d_{eff} E_1^2 \frac{1}{\left(1 + i z/z_0 \right)^2} e^{\frac{-2r^2}{w_0^2} \left(1 + i \frac{z}{z_0} \right)^{-1}} e^{i2k_1 z} \right] \quad (3.33a)$$

$$\frac{\partial E_2(z)}{\partial z} \approx \frac{i\omega_2^2}{k_2 c^2} d_{eff} E_1^2 \frac{e^{i\Delta k z}}{\left(1 + i z/z_0 \right)} \quad (3.33b)$$

En intégrant directement l'équation 3.33b, on obtient

$$E_2(z) = \frac{i\omega_2^2}{k_2 c^2} d_{eff} E_1^2 \int_{z_1}^{z_2} \frac{e^{i\Delta k z}}{\left(1 + i z/z_0 \right)} dz \quad (3.34)$$

où z_1 et z_2 désignent la position des interfaces du matériau ayant un $\chi^{(2)}$.

Cette équation permet d'obtenir une solution pour différents cas. Si $z_2 - z_1 \ll z_0$, on retrouve exactement la même solution que pour une onde plane (voir équation 3.20b), puisque la divergence du faisceau est considérée comme étant négligeable par rapport à l'épaisseur du milieu ayant des propriétés non linéaires.

$$E_2(z) = \frac{i\omega_2^2}{k_2 c^2} d_{\text{eff}} E_1^2 \int_{z_1}^{z_2} \frac{e^{i\Delta k z}}{\approx 1} dz \quad (3.35a)$$

$$E_2(z) = \frac{i\omega_2^2}{n_2 c} d_{\text{eff}} E_1^2 \int_0^L e^{i\Delta k z} dz \quad (3.35b)$$

Dans le cas où le faisceau est focalisé au cœur du matériau, on a alors

$$E_2(z) = \frac{i\omega_2^2}{k_2 c^2} d_{\text{eff}} E_1^2 \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{i\Delta k z}}{(1 + i z/z_0)} dz \quad (3.36)$$

qui donne 0 pour $\Delta k \leq 0$ et

$$E_2(z) = \frac{i\omega_2^2}{k_2 c^2} d_{\text{eff}} E_1^2 2\pi e^{-z_0 \Delta k} \quad (3.37)$$

pour $\Delta k > 0$.

Comme expliqué dans la section précédente, l'annulation du signal pour $\Delta k \leq 0$ est due principalement à la phase de Gouy. Lorsque $\Delta k > 0$, le déphasage dû à Δk et celui dû à la phase de Gouy du faisceau gaussien peuvent compenser l'un pour l'autre et il devient possible d'obtenir un signal de GSH. Toutefois, comme il a été montré au tableau 3.1, Δk est négatif dans la plupart des matériaux pour les longueurs d'ondes du visible et de l'infrarouge. Notez que pour arriver à cette solution, des bornes d'intégration infinies sont employées, ce qui est impossible en pratique. Expérimentalement, le signal GSH obtenu en focalisant dans le cœur du matériau ne sera pas nul [120], mais il sera très faible, beaucoup plus faible qu'en focalisant à proximité d'une interface par exemple (figure 3.7).

Un dernier cas important est celui où le faisceau est focalisé à l'une des interfaces du matériau, on a alors

$$E_2(z) = \frac{i\omega_2^2}{k_2 c^2} d_{eff} E_1^2 \int_0^\infty \frac{e^{i\Delta kz}}{(1 + iz/z_0)} dz. \quad (3.38)$$

La solution de cette équation ne donne pas 0. Puisqu'il n'y a pas de GSH générée avant le point focal, l'interférence destructive causée par la phase de Gouy est absente et le signal de GSH généré après le point focal fait en sorte que la GSH, à la sortie du cristal, est beaucoup plus élevée que si le point focal se trouvait au cœur de celui-ci.

La figure 3.7 montre le résultat d'une simulation numérique, basée sur l'équation 3.34, de la GSH avec un faisceau gaussien. Cette simulation donne la variation, en fonction de la position du point focal par rapport à ses deux interfaces, de la quantité de signal GSH obtenue à la sortie d'un cristal. Un cristal de quartz d'une épaisseur de 200 μm a été utilisé dans cette simulation et le milieu en dehors du cristal est de l'air. Comme on peut le voir, le signal de GSH est plus fort lorsque le point focal se trouve proche de l'interface avant ou arrière du cristal, tandis qu'il tend vers 0 lorsque le point focal se trouve au cœur du cristal, comme prévu par l'équation 3.36.

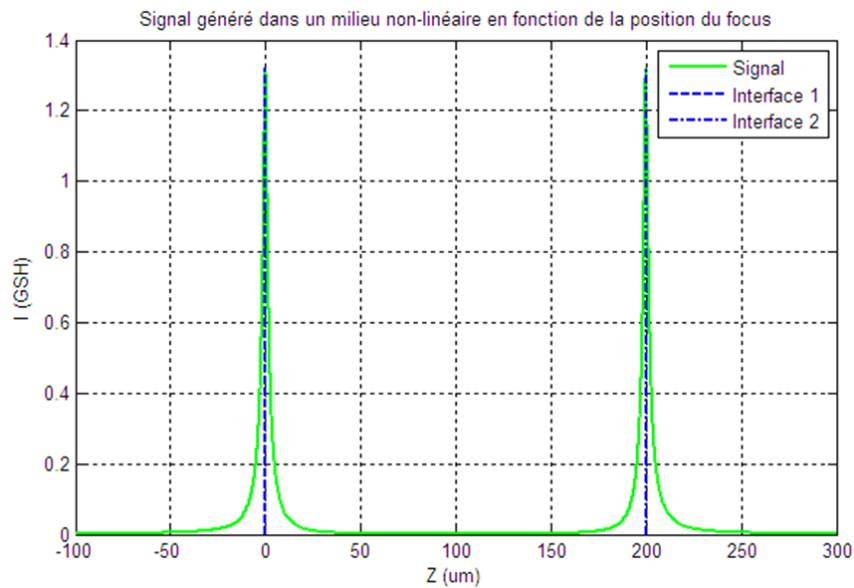


Figure 3.7 Signal de GSH produit par un faisceau gaussien traversant une plaque de quartz d'une épaisseur de 200 μm . Le quartz, avec un $\chi^{(2)}$ non nul, est compris entre 0 μm et 200 μm , tandis qu'avant et après, le milieu est de l'air, avec un $\chi^{(2)}$ nul. Les deux lignes bleues délimitent les interfaces entre les différents milieux. La courbe en vert correspond à la puissance du signal GSH à la sortie du cristal en fonction de la position en z du point focal du faisceau gaussien. Le signal GSH à la sortie du cristal est maximal lorsque le point focal est à l'une des deux interfaces tandis qu'il est presque nul lorsque celui-ci est en dehors ou au cœur du cristal.

La solution à ces cas relativement simples aide à comprendre la GSH avec un faisceau focalisé. D'autres structures ayant un $\chi^{(2)}$ non nul et hétérogènes à l'échelle micrométrique, comme celles retrouvées dans les tissus biologiques par exemple, peuvent également émettre un signal de GSH malgré l'anomalie de phase de Gouy. Le fait qu'elles soient hétérogènes peut grandement affecter la phase de la GSH dans le matériau, ce qui peut réduire l'interférence destructive causée par la phase de Gouy, normalement observable dans un milieu ayant un $\chi^{(2)}$ non nul et homogène.

La GSH avec un faisceau gaussien est similaire à la GSH avec une onde plane. Toutefois, il y a deux distinctions importantes entre les deux qu'il est essentiel de comprendre. Tout d'abord, pour un faisceau gaussien, la GSH a lieu principalement au point focal où l'irradiance est la plus forte. Comme le démontre la figure 2.6, c'est d'ailleurs pour cette raison qu'on utilise un faisceau fortement focalisé en microscopie GSH. Deuxièmement, la phase de Gouy affecte grandement l'accord de phase qui permet d'obtenir de la GSH dans les milieux non centrosymétriques. Il est donc important d'en tenir compte pour interpréter correctement le signal GSH produit par un faisceau focalisé.

3.3.4 Champ électrique axial

L'usage d'un faisceau gaussien pour représenter l'onde électromagnétique d'un faisceau laser est correct. Cependant, lorsque le faisceau est très fortement focalisé, cette approximation s'éloigne de la réalité. Le champ électrique d'un faisceau gaussien ne pointe que dans la direction radiale, ce qui est vrai dans le cas où l'angle de divergence, θ_{div} , est faible. Toutefois, lorsque le faisceau est très fortement focalisé par un objectif de microscope ayant une ouverture numérique élevée, une nouvelle composante du champ électrique pointant dans la direction de propagation du faisceau apparaît au point focal et le faisceau gaussien ne décrit plus aussi bien le comportement du champ électrique.

Supposons un faisceau collimé qui traverse un objectif de microscope pour être fortement focalisé en un point comme le montre la figure 3.8. La polarisation du faisceau collimé incident pointe le long de l'axe x et a un profil gaussien. Pour un faisceau collimé, θ_{div} est presque nul et on fait l'approximation que $w(z) \approx w_0$ et que $R(z) \rightarrow \infty$ de sorte que

$$\vec{E}_{in}(r, z, t) \approx E_0 e^{\frac{-r^2}{w_0^2}} e^{i(kz - \omega t)} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}. \quad (3.39)$$

La composante du champ en x est donc maximale, tandis que les composantes en y et en z sont nulles. Bref, on a une onde plane polarisée en x avec un profil gaussien.

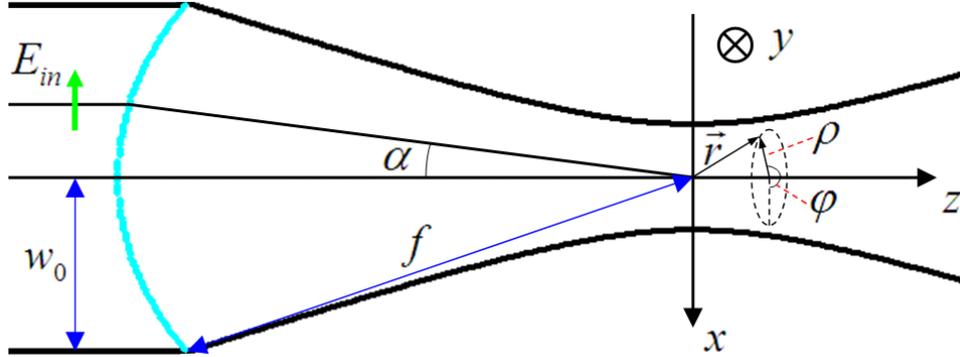


Figure 3.8 À gauche, le faisceau incident est collimé et a une largeur w_0 . Sa polarisation pointe le long de l'axe x . Le faisceau est ensuite fortement focalisé par une lentille ayant une longueur focale f . α est l'angle auquel les rayons lumineux qui forment le faisceau incident atteignent le point focal. On cherche à trouver les composantes du champ électrique dans un petit rayon r autour du point focal. Les coordonnées cylindriques ρ , φ et z sont employées près du point focal.

Ce faisceau est ensuite fortement focalisé par une lentille ayant une longueur focale f . Les composantes du champ électrique à proximité du point focal seront alors données par [119, 121, 122]

$$\vec{E}_f(\rho, \varphi, z, t) \approx \frac{ikf}{2} e^{-i\omega t} \begin{bmatrix} I_0 + I_2 \cos(2\varphi) \\ I_2 \sin(2\varphi) \\ -i2I_1 \cos(\varphi) \end{bmatrix} \quad (3.40a)$$

$$I_0 = \int_0^{\alpha_{\max}} E_{in}(\alpha) \sin(\alpha) \sqrt{\cos(\alpha)} (1 + \cos(\alpha)) J_0(k\rho \sin(\alpha)) e^{ikz \cos(\alpha)} d\alpha \quad (3.40b)$$

$$I_1 = \int_0^{\alpha_{\max}} E_{in}(\alpha) (\sin(\alpha))^2 \sqrt{\cos(\alpha)} J_1(k\rho \sin(\alpha)) e^{ikz \cos(\alpha)} d\alpha \quad (3.40c)$$

$$I_2 = \int_0^{\alpha_{\max}} E_{in}(\alpha) \sin(\alpha) \sqrt{\cos(\alpha)} (1 - \cos(\alpha)) J_2(k\rho \sin(\alpha)) e^{ikz \cos(\alpha)} d\alpha \quad (3.40d)$$

$$E_{in}(\alpha) = E_0 e^{-\frac{(f \sin(\alpha))^2}{w_0^2}} \quad (3.40e)$$

où, $J_i(k\rho \sin(\alpha))$ est la fonction de Bessel de premier type et d'ordre i . La démarche complète pour arriver à ce résultat est expliquée en détail dans l'article de B. Richards et Emil Wolf [121].

Les équations 3.40 peuvent être résolues numériquement. La distribution de l'amplitude des composantes x , y et z du champ électrique E_f au point focal est représentée à la figure 3.9.

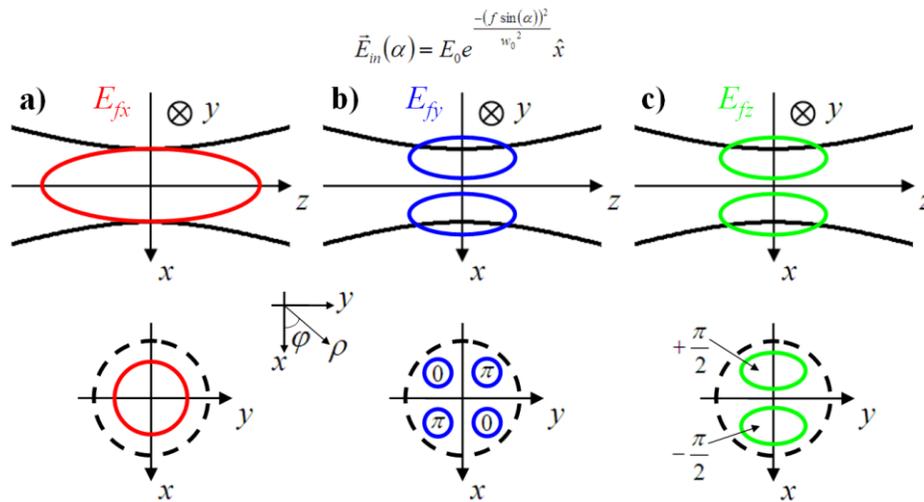


Figure 3.9 Distribution spatiale de l'amplitude des composantes (a) x , en rouge, (b) y , en bleu, et (c) z , en vert, du champ électrique à proximité du point focal. Les zones encadrées indiquent où l'amplitude est la plus élevée pour chaque composante. Pour un faisceau gaussien de la forme décrite par l'équation 3.40e et une ouverture numérique de 1.4, $E_{fy \max} \approx E_{fx \max} / 18$ et $E_{fz \max} \approx E_{fx \max} / 3$. Dans chaque zone, la phase du champ électrique par rapport à celle de E_{fx} est indiquée.

L'amplitude du champ électrique en x a donc à peu près le même aspect que celui d'un faisceau gaussien (voir les figures 3.5d et 3.9a). Selon l'aspect de $E_{in}(\alpha)$ et l'ouverture numérique, les composantes du champ électrique en y et en z peuvent être plus ou moins importantes. Pour $E_{in}(\alpha)$ avec un profil gaussien et une ouverture numérique de 1.4, le rapport des amplitudes entre les différentes composantes du champ électrique est donné par $E_{fy \max} \approx E_{fx \max} / 18$ et $E_{fz \max} \approx E_{fx \max} / 3$ [119]. Les champs E_{fy} et E_{fz} sont nuls en plein centre du point focal. En général, le champ électrique en y est négligé étant donné que son amplitude est très faible, mais le champ en z peut avoir une amplitude considérable qui, dans certains cas, peut jouer un rôle important. Notez que $E_{in}(\alpha)$ pourrait avoir une autre forme si le faisceau à l'entrée de l'objectif est différent. Il est

d'ailleurs possible de contrôler ce paramètre pour obtenir un champ électrique en z très important au point focal [123].

Bien qu'il y ait une différence de π entre les phases des deux zones où le champ électrique E_{fz} est important, cela ne signifie pas qu'il ne peut pas y avoir de GSH. Pour les éléments $\chi^{(2)}_{izz}$ du tenseur, on multiplie par E_{fz}^2 et la différence de phase est doublée pour donner 2π . Dans ce cas, les deux zones émettent donc de la GSH en phase. Pour les éléments $\chi^{(2)}_{ixz}$ du tenseur, on multiplie par $E_{fx}E_{fz}$ et la différence de phase entre les deux zones émettant de la GSH reste π . Toutefois, même si ces deux zones sont très rapprochées, elles restent suffisamment éloignées pour que de la GSH soit présente dans le champ lointain, mais avec un patron de radiation fortement altéré par l'interférence.

Malgré que la démarche qui mène à l'équation 3.40 n'ait pas été présentée en détail, voici une démarche simplifiée qui explique, de façon très claire, d'où provient la composante du champ électrique en z au point focal.

Débutons par une description du problème avec la figure 3.10. On s'intéresse à cinq points par où passent des rayons lumineux dans le faisceau collimé. Une fois fortement focalisés par un objectif de microscope, une composante de champ électrique en z apparaît dans les rayons 1 et 5, tandis que la polarisation reste orientée purement dans la direction x pour les rayons 2 à 4. On s'intéresse donc à calculer le champ électrique résultant des rayons 1 et 5 à proximité du centre du point focal, le long de l'axe x .

Débutons en calculant r_1 , r_5 et r .

$$r = \frac{L}{\cos(\alpha)} \quad (3.41a)$$

$$r_1 \approx r + \Delta x \sin(\alpha) \quad (3.41b)$$

$$r_5 \approx r - \Delta x \sin(\alpha) \quad (3.41c)$$

La figure 3.10 est trompeuse puisqu'en réalité, $\Delta x \ll L$. Vu cette différence de grandeur, l'approximation de r_1 , r_5 par les formules 3.41b et 3.41c est correcte.

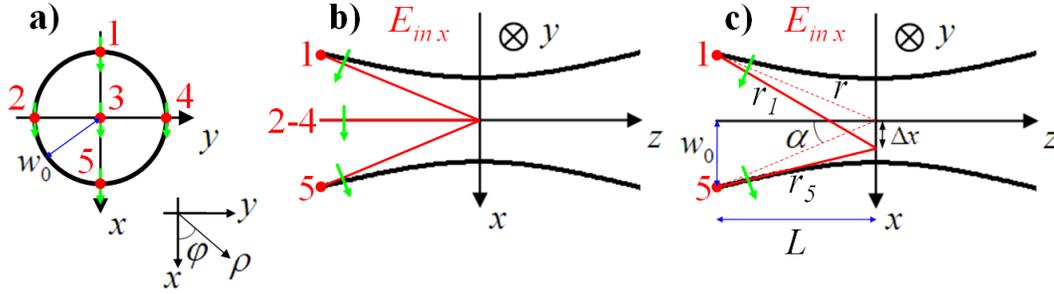


Figure 3.10 (a) Position spatiale de 5 points d'intérêt par où passent des rayons lumineux du faisceau collimé avant qu'il soit fortement focalisé. Le contour du faisceau est dessiné en noir et la polarisation (flèches en vert) du faisceau pointe dans la direction x pour les cinq rayons lumineux. (b) Trajet principal, après avoir traversé la lentille, des rayons du faisceau fortement focalisé passant par les cinq points. Les trajets des rayons 2 à 4 apparaissent superposés étant donné qu'il s'agit d'une représentation 2D. Toutefois, la polarisation des rayons 2 à 4 pointe dans la direction x , tandis que celle des rayons 1 et 5 a une composante en z apparue avec l'inclinaison des trajets des rayons lumineux. (c) Puisqu'on cherche à expliquer la présence du champ en z , on ne se concentre que sur les rayons lumineux provenant des points 1 et 5. L'angle α a la même définition que dans la figure 3.8. L est la distance en z entre les points 1 ou 5 et la position $z = 0$. Δx correspond à un très petit décalage des rayons le long de l'axe x , de sorte que $\Delta x \ll L$. r_1 est la distance entre le point 1 et $(\Delta x, 0, 0)$. r_5 est la distance entre le point 5 et $(\Delta x, 0, 0)$. r est la distance entre le point 1 ou 5 et le point $(0, 0, 0)$.

À moins qu'il n'y ait des distorsions importantes dans les fronts de phase du faisceau ou que celui-ci ne soit pas gaussien, la phase des rayons aux points 1 et 5 est la même. Si Δx est différent de 0, alors r_1 et r_5 seront inégaux et la phase des rayons passant par les points 1 et 5 sera également différente une fois que ces rayons atteindront le point $(\Delta x, 0, 0)$. Il y aura donc un phénomène d'interférence entre les deux rayons. Nous assumons que l'amplitude du champ électrique pour les rayons 1 et 5 est la même. Calculons l'amplitude obtenue en fonction de Δx .

On définit d'abord les ondes des rayons passant par les points 1 et 5.

$$\vec{E}_1 = Ae^{i(kr_1 - \omega t)} \begin{bmatrix} \cos(\alpha) \\ 0 \\ -\sin(\alpha) \end{bmatrix} \quad (3.42a)$$

$$\vec{E}_5 = Ae^{i(kr_5 - \omega t)} \begin{bmatrix} \cos(\alpha) \\ 0 \\ \sin(\alpha) \end{bmatrix} \quad (3.42b)$$

On calcule ensuite la composante en z du champ électrique le long de l'axe x dans le point focal.

$$E_{fz} = -A \sin(\alpha) e^{i(kr_1 - \alpha t)} + A \sin(\alpha) e^{i(kr_5 - \alpha t)} \quad (3.43a)$$

$$E_{fz} = -A \sin(\alpha) [e^{i(kr_1)} - e^{i(kr_5)}] e^{-i\alpha t} \quad (3.43b)$$

$$E_{fz} = -A \sin(\alpha) [e^{i(kr + k\Delta x \sin(\alpha))} - e^{i(kr - k\Delta x \sin(\alpha))}] e^{-i\alpha t} \quad (3.43c)$$

$$E_{fz} = -i2A \sin(\alpha) \frac{[e^{ik\Delta x \sin(\alpha)} - e^{-ik\Delta x \sin(\alpha)}]}{2i} e^{i(kr - \alpha t)} \quad (3.43d)$$

$$E_{fz} = 2A \sin(\alpha) \sin(k\Delta x \sin(\alpha)) e^{i\left(kr - \alpha t - \frac{\pi}{2}\right)} \quad (3.43e)$$

On répète le même calcul pour la composante en x du champ électrique le long de l'axe x dans le point focal.

$$E_{fx} = A \cos(\alpha) e^{i(kr_1 - \alpha t)} + A \cos(\alpha) e^{i(kr_5 - \alpha t)} \quad (3.44a)$$

$$E_{fx} = A \cos(\alpha) [e^{i(kr_1)} + e^{i(kr_5)}] e^{-i\alpha t} \quad (3.44b)$$

$$E_{fx} = A \cos(\alpha) [e^{i(kr + k\Delta x \sin(\alpha))} + e^{i(kr - k\Delta x \sin(\alpha))}] e^{-i\alpha t} \quad (3.44c)$$

$$E_{fx} = 2A \cos(\alpha) \frac{[e^{ik\Delta x \sin(\alpha)} + e^{-ik\Delta x \sin(\alpha)}]}{2} e^{i(kr - \alpha t)} \quad (3.44d)$$

$$E_{fx} = 2A \cos(\alpha) \cos(k\Delta x \sin(\alpha)) e^{i(kr - \alpha t)} \quad (3.44e)$$

Les résultats obtenus, soit les équations 3.43e et 3.44e, sont cohérents avec l'équation 3.40a. La composante x du champ le long de l'axe x est donnée par $\cos(k\Delta x \sin(\alpha))$. Elle est maximale pour $\Delta x = 0$. Cela correspond bien à ce qui a été représenté à la figure 3.9a. La composante z du champ le long de l'axe x est donnée par $\sin(k\Delta x \sin(\alpha))$. Elle est nulle pour $\Delta x = 0$ et l'inversion du signe du sinus lorsque Δx change de signe correspond à la différence de phase de π entre les deux zones représentées à la figure 3.9c. Notons également la différence de phase de $\pi/2$ entre la composante x et z du champ électrique. Ce déphasage fait en sorte que la polarisation est elliptique, avec une forte composante en x et une faible composante en z , dans les deux zones où

la composante en z est non-nulle. De plus, dans la zone où $x > 0$, la polarisation tourne dans le sens horaire, tandis qu'elle tourne dans le sens antihoraire dans la zone où $x < 0$.

On comprend maintenant d'où provient la composante axiale en z du champ électrique et les subtilités de son comportement. À partir d'ici, il serait également possible de pousser cette démarche plus loin en intégrant sur toute la surface du faisceau pour tenir compte de tous les rayons lumineux et obtenir une amplitude réaliste des composantes x et z du champ électrique.

Dans la plupart des cas, l'approximation par un faisceau gaussien suffit pour l'interprétation des résultats obtenus en microscopie GSH. Toutefois, il est important de savoir qu'un champ axial existe et qu'il est plus juste d'utiliser l'équation 3.40 pour décrire le faisceau lorsque l'ouverture numérique de l'objectif est élevée. Dans certains cas particuliers, il est nécessaire de tenir compte du champ axial pour l'interprétation des résultats obtenus en microscopie GSH. Pour réaliser des simulations, il est également préférable d'utiliser la formule 3.40.

3.3.5 Résolution spatiale pour la microscopie GSH

Dans les sections précédentes, nous avons vu en détail la théorie expliquant la GSH avec un faisceau fortement focalisé dans un matériau. Rappelons qu'en microscopie GSH, le faisceau laser est balayé pour déplacer le point focal dans le matériau, ce qui permet d'obtenir une image de celui-ci (figure 2.8). L'intensité des pixels de cette image est donnée par le $|\chi^{(2)}|^2$ moyen et l'accord de phase dans le volume focal, lorsque celui-ci est centré aux différents points balayés dans le matériau. La microscopie GSH sert donc à obtenir une image du $\chi^{(2)}$ local dans le matériau. Toutefois, il est important de connaître la résolution spatiale d'un microscope GSH. Celle-ci dépend principalement de la taille du volume dans lequel les dipôles contribuent au signal, comme pour la fluorescence par absorption de deux photons, mais dans le cas de la microscopie GSH, elle peut aussi dépendre de l'accord de phase.

En microscopie, la capacité d'un système à distinguer deux sources de lumière ponctuelles différentes détermine sa résolution spatiale et est limitée principalement par la diffraction. Ce phénomène peut être expliqué de façon très intuitive : deux structures distinctes séparées d'une distance plus courte que la taille du volume focal apparaîtront nécessairement comme une seule et même structure lorsqu'elles seront imagées. Le faisceau laser les illuminera simultanément

puisqu'elles sont très proches l'une de l'autre. Alternativement, si les deux structures sont séparées d'une distance plus grande que la taille du volume focal, celle-ci pourront être illuminées séparément, ce qui permettra de les distinguer l'une de l'autre lorsqu'elles seront imagées.

Il reste toutefois à définir ce qu'on entend par la taille du volume focal, ce qui peut s'avérer subjectif étant donné que l'amplitude du champ électrique varie de façon continue à proximité du point focal. Pour définir la résolution spatiale obtenue avec un faisceau gaussien, il est pratique d'utiliser les paramètres w_0 et z_0 , puisque ceux-ci sont reliés à la taille du volume focal. Il est également nécessaire de distinguer la résolution spatiale latérale et axiale, puisque le volume focal a une forme plus allongée dans la direction axiale.

Pour évaluer la résolution spatiale latérale, supposons deux sources ponctuelles séparées d'une distance Δx . En optique linéaire, la somme de l'irradiance des deux sources correspond au signal qui sera détecté et est proportionnelle à E^2 (équation 3.21a). On peut donc employer l'équation 3.27a, au carré, pour évaluer la résolution spatiale latérale d'un système optique linéaire.

$$I \propto E(\vec{r} - \Delta\vec{x}/2, z)^2 + E(\vec{r} + \Delta\vec{x}/2, z)^2 \propto e^{-\frac{2((x-\Delta x/2)^2 + y^2)}{w_0^2}} + e^{-\frac{2((x+\Delta x/2)^2 + y^2)}{w_0^2}} \quad (3.45)$$

Toutefois, puisque l'irradiance de la GSH est proportionnelle au carré de l'irradiance du faisceau à la longueur d'onde fondamentale, on doit employer l'équation 3.27a à la puissance quatre pour évaluer la résolution spatiale latérale en microscopie GSH.

$$I_{GSH} \propto e^{-\frac{4((x-\Delta x/2)^2 + y^2)}{w_0^2}} + e^{-\frac{4((x+\Delta x/2)^2 + y^2)}{w_0^2}} \quad (3.46a)$$

$$I_{GSH} \propto e^{-\frac{2((x-\Delta x/2)^2 + y^2)}{(w_0/\sqrt{2})^2}} + e^{-\frac{2((x+\Delta x/2)^2 + y^2)}{(w_0/\sqrt{2})^2}} \quad (3.46b)$$

Les équations 3.45 et 3.46b démontrent donc que la GSH permet d'améliorer la résolution spatiale d'un facteur $2^{0.5}$ par rapport au cas optique linéaire. De manière plus générale, la génération d'harmonique améliore la résolution latérale d'un facteur $N^{0.5}$, où N est l'ordre de l'harmonique générée.

Ce résultat a une autre implication importante. L'ouverture numérique du faisceau fondamental et du faisceau de GSH sont également différents d'un facteur $N^{0.5}$. Ceci peut être démontré à partir des équations 3.45, 3.46b et 3.27g.

$$w_{0laser} = \frac{\lambda_{laser}}{\pi N \cdot A_{laser}} = w_0 \quad (3.47a)$$

$$w_{0GSH} = \frac{\lambda_{GSH}}{\pi N \cdot A_{GSH}} = \frac{\lambda_{laser}}{2\pi N \cdot A_{GSH}} = w_0 / \sqrt{2} \quad (3.47b)$$

$$\frac{\lambda_{laser}}{2\pi N \cdot A_{GSH}} = \frac{\lambda_{laser}}{\pi N \cdot A_{laser}} / \sqrt{2} \quad (3.47c)$$

$$N \cdot A_{GSH} = \frac{N \cdot A_{laser}}{\sqrt{2}} \quad (3.47d)$$

Cette réduction de la divergence du faisceau de GSH par rapport au faisceau fondamental est naturelle, puisque le profil d'intensité du faisceau fondamental favorise davantage la génération de signal pour un angle de divergence α plus faible. À cause de cette variation de l'ouverture numérique, il est donc nécessaire d'utiliser l'équation 3.46b en microscopie GSH plutôt que l'équation 3.45 à 2ω pour calculer la résolution spatiale latérale.

Revenons à l'équation 3.46b et trouvons pour quelle valeur de Δx on arrive à distinguer les deux points. La figure 3.11 est le résultat d'une simulation montrant le profil d'intensité GSH de deux points séparés d'une distance Δx . Pour cette simulation, λ vaut 800 nm, λ_{GSH} vaut 400 nm, l'ouverture numérique est fixée à 1,15 et w_0 est calculé à partir de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique du faisceau fondamental. La distance Δx est exprimée en fonction de w_0 divisé par la racine de 2. En optique linéaire, une définition communément acceptée pour la résolution maximale qu'une optique circulaire peut atteindre est [53]

$$R = 0,61 \frac{\lambda}{N.A.} \quad (3.48a)$$

$$\Delta x = 0,61\pi \frac{\lambda}{\pi N.A.} = 1,9164 w_0 . \quad (3.48b)$$

Pour le cas de la GSH, Δx sera donc donné par

$$\Delta x = 1,9164 \frac{w_0}{\sqrt{2}}. \quad (3.49)$$

Il existe d'autres définitions plus ou moins conservatrices. Par exemple, Mertz donne comme définition [124]

$$\Delta x \approx 0,52 \frac{\lambda}{N.A.\sqrt{N}} \quad (3.50a)$$

$$\Delta x \approx 1,6336 \frac{w_0}{\sqrt{2}}. \quad (3.50b)$$

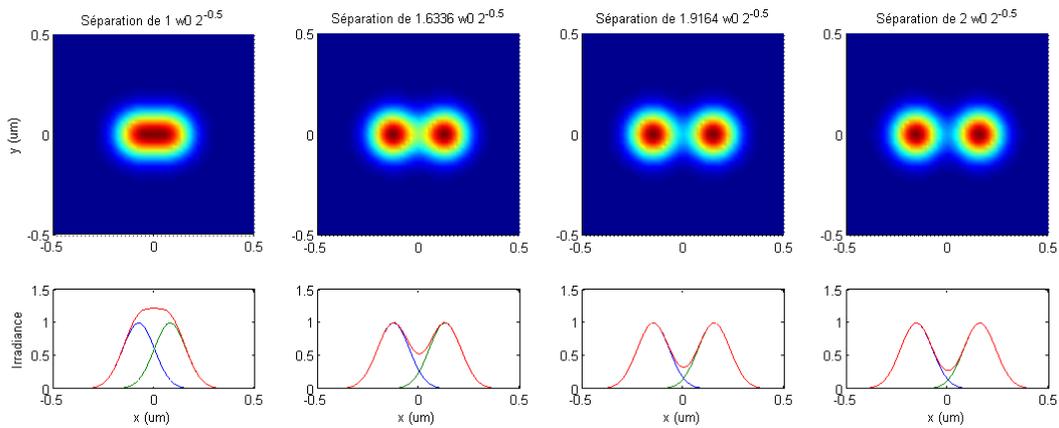


Figure 3.11 Distribution de l'irradiance GSH de deux sources ponctuelles dans le plan xy et le long de l'axe x pour différentes séparations Δx . Pour cette simulation, λ vaut 800 nm, l'ouverture numérique est fixée à 1,15 et w_0 est calculé à partir de ces deux paramètres.

La figure 3.11 illustre ces différents cas en plus de $\Delta x = w_0 2^{-0,5}$ et $\Delta x = 2w_0 2^{-0,5}$ à titre de comparaison. Pour une distance $\Delta x = w_0 2^{-0,5}$, les deux sources ponctuelles apparaissent comme une source unique. Cette distance est donc trop petite pour correspondre à la résolution spatiale latérale du système. Pour une distance $\Delta x = 2w_0 2^{-0,5}$, les deux sources ponctuelles sont bien séparées l'une de l'autre, mais cette distance est donc trop grande. La résolution spatiale latérale du système se situe donc quelque part entre ces deux valeurs de Δx . La formule 3.50b semble être une définition très appropriée, puisque les points apparaissent justes assez séparés pour qu'ils puissent être distingués l'un de l'autre. Le profil d'irradiance le long de l'axe x a un minimum

local en $x = 0$ qui vaut environ la moitié du maximum des deux pics. Pour un choix plus conservateur sur la limite de résolution du système, on pourrait aussi utiliser la formule 3.49. Toutefois, pour le restant de cet ouvrage, j'utiliserai la formule 3.50b pour définir la limite de résolution spatiale latérale d'un système de microscopie GSH. Notez que, pour les paramètres qui ont été utilisés dans cette simulation et dans des conditions idéales, un tel système permettrait d'atteindre une résolution latérale d'environ 250 nm.

Pour évaluer la résolution spatiale axiale, on utilise une méthode similaire, mais en décalant les deux sources ponctuelles d'une distance Δz le long de l'axe z . La formule 3.51 permet d'évaluer pour quelle valeur de Δz les deux sources ponctuelles de GSH apparaissent distinctes.

$$I_{GSH} \propto \left(\frac{w_0}{w(z - \Delta z/2)} \right)^4 e^{\frac{-4r^2}{w(z - \Delta z/2)^2}} + \left(\frac{w_0}{w(z + \Delta z/2)} \right)^4 e^{\frac{-4r^2}{w(z + \Delta z/2)^2}} \quad (3.51)$$

La figure 3.12 est le résultat d'une simulation utilisant la formule 3.51 et montrant le profil d'intensité GSH de deux points séparés d'une distance Δz . Pour cette simulation, λ vaut 800 nm, λ_{GSH} vaut 400 nm, l'ouverture numérique est fixée à 1,15 et w_0 est calculé à partir de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique du faisceau fondamental. La distance Δz est exprimée en fonction de z_0 . Les cas z_0 , $1,6336z_0$, $2z_0$ et $3z_0$ sont représentés dans cette figure. On peut voir que la résolution spatiale axiale d'un système optique GSH sera comprise entre z_0 et $3z_0$. Pour la distance $2z_0$, le profil d'irradiance le long de l'axe z a un minimum local en $z = 0$ qui vaut environ la moitié de celle des deux pics. Pour rester cohérent avec notre définition de la résolution spatiale latérale, on peut donc conclure que la résolution spatiale axiale d'un système de microscopie GSH vaut environ $2z_0$. Notez que, pour les paramètres qui ont été utilisés dans cette simulation et dans des conditions idéales, un tel système permettrait d'atteindre une résolution axiale d'environ 500 nm. Cependant, cette grandeur augmente rapidement lorsque l'ouverture numérique est plus petite, puisque z_0 est inversement proportionnel au carré de l'ouverture numérique. Notez qu'il est préférable d'avoir une résolution axiale inférieure à la longueur de cohérence pour aider à maintenir un accord de phase.

Ces simulations, basées sur le volume d'interaction pour définir la résolution spatiale, s'appliquent bien au cas de la fluorescence par absorption de deux photons. Elles peuvent aussi

s'appliquer au cas de la GSH, mais de manière quasi-quantitative. Il serait nécessaire de tenir compte également des effets d'accord de phase pour définir rigoureusement la résolution spatiale dans le cas de la microscopie GSH. Ces simulations donnent tout de même une idée de la limite de résolution spatiale théorique qui peut être atteinte avec un système de microscopie GSH. Cette limite est d'environ 250 nm (latéralement) et est comparable à celle qui peut être atteinte avec un microscope confocal [58]. Il est important de garder en tête qu'en pratique, la résolution spatiale est moins bonne si la taille du volume focal augmente. Un matériau imagé plus dispersif devrait naturellement donner des images avec une moins bonne résolution spatiale [125].

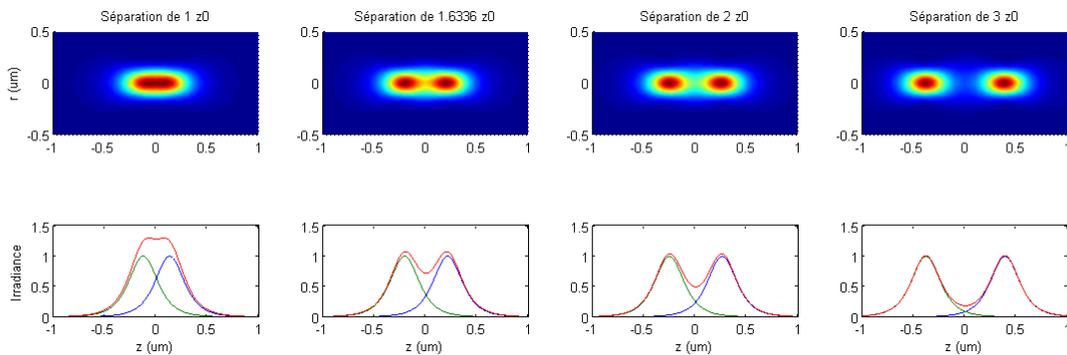


Figure 3.12 Distribution de l'irradiance GSH de deux sources ponctuelles dans le plan rz et le long de l'axe z pour différentes séparations Δz . Pour cette simulation, λ vaut 800 nm, l'ouverture numérique est fixée à 1,15 et w_0 est calculé à partir de ces deux paramètres.

3.4 Patron de radiation

Le patron de radiation d'une source de lumière réfère à la distribution de son irradiance, dans le champ lointain, en fonction de la direction dans laquelle celle-ci est émise. Le champ lointain est le champ électrique obtenu à une distance suffisamment grande de la source pour que celle-ci puisse être considérée comme étant ponctuelle. Pour une source ponctuelle, comme le point focal en microscopie GSH, il est pratique d'utiliser les coordonnées sphériques. L'irradiance de la source peut varier en fonction de la direction d'émission définie par les angles θ et φ .

3.4.1 Processus cohérent vs incohérent

Comme mentionné au début de ce chapitre, la GSH est un processus cohérent. Les transitions électroniques pour les processus cohérents s'effectuent de façon quasi instantanée dans le temps. Cela est dû au fait qu'elles ne passent que par des niveaux d'énergie virtuels. Ce n'est pas le cas pour les processus incohérents, comme la fluorescence par absorption d'un ou de plusieurs photons. Pour ceux-ci, il y a une transition électronique vers un niveau d'énergie réel. L'électron reste dans un état excité durant un certain temps avant de retourner au niveau fondamental par émission spontanée. La phase des dipôles émetteurs de signal est donc reliée à celle de la lumière à la fréquence fondamentale pour les processus cohérents, tandis qu'elle est aléatoire pour les processus incohérents.

Puisqu'il n'y a pas de relation de phase entre les dipôles pour un processus incohérent, l'irradiance du signal est proportionnelle au nombre de dipôles y participant. De plus, le signal est émis, de façon isotrope, dans toutes les directions. Le patron de radiation est donc uniforme. Inversement, à cause de la relation de phase entre les dipôles pour un processus cohérent, il y a interférence constructive ou destructive entre le signal émis par ceux-ci. L'irradiance du signal pour un processus cohérent est donc proportionnelle au carré du nombre de dipôles y participant, mais dépend aussi fortement de la relation de phase entre ceux-ci. Étant donné que l'accord de phase est différent selon la direction d'émission du signal, l'amplitude du signal varie selon cette direction et le patron de radiation est généralement non uniforme. Cette caractéristique distingue grandement la GSH de la fluorescence par absorption de deux photons, malgré les ressemblances entre ces deux processus [7 (voir figure 7)].

Étant donné que la source employée en microscopie GSH est un faisceau laser fortement focalisé, le signal est principalement émis, et collecté, dans la direction de propagation du faisceau fondamental, définie comme la direction avant, et dans la direction inverse à la propagation du faisceau, définie comme la direction arrière ou épi. Le signal GSH avant est généralement plus important, puisque la longueur de cohérence est plus grande dans cette direction. Il peut être collecté facilement lorsque le matériau imagé est mince et transparent. Le signal GSH arrière pur est généralement beaucoup plus faible, puisque la longueur de cohérence dans cette direction est extrêmement courte. Il est également possible que le signal avant

contribue au signal collecté dans la direction arrière, par rétrodiffusion dans le matériau imagé ou par réflexion à une interface près du point focal lorsque le matériau est mince. Lorsque le matériau imagé est épais, comme pour imagier un animal vivant par exemple, il est souvent impossible de collecter directement le signal dans la direction avant, mais la diffusion du signal avant dans la direction arrière peut être plus importante [36].

3.4.2 Forme du patron en fonction de la structure

Les matériaux imagés en microscopie GSH ont généralement une structure $\chi^{(2)}$ hétérogène. Le patron de radiation de la GSH dépend des dipôles qui contribuent au $\chi^{(2)}$. Il peut donc grandement varier en fonction de la structure des dipôles dans le matériau. Pour bien comprendre comment le patron de radiation peut changer, il est utile de connaître la forme qu'il adopte pour différentes distributions de dipôles au point focal. Des simulations pour déterminer le patron de radiation obtenu en microscopie optique non linéaire ont été réalisées par X. Sunney Xie et son équipe (microscopie CARS et GTH) [94, 108, 119] et par Jérôme Mertz et Laurent Moreaux (microscopie GSH et GTH) [11, 12, 65].

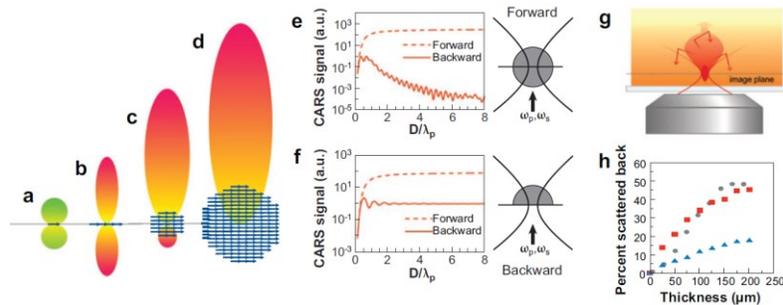


Figure 3.13 Cette figure est tirée de [94 (voir figure 5)]. Patron de radiation du signal CARS pour (a) un seul dipôle, (b) une membrane très mince de dipôles dans le plan xy , (c) une sphère de quelques dipôles et (d) une sphère contenant un très grand nombre de dipôles. (e) La quantité de signal CARS avant et arrière varie en fonction du rayon de la sphère de dipôles. Le patron de radiation obtenu dans un matériau homogène est comparable à celui obtenu pour une sphère ayant un diamètre plus grand que la longueur d'onde. (f) La quantité de signal CARS avant et arrière varie différemment pour une demi-sphère de dipôles ayant une face plane dans le plan xy . (g-h) Dans un matériau épais, le signal avant peut être rétrodiffusé dans la direction inverse et contribuer au signal arrière.

La figure 3.13 présente le patron de radiation et le ratio de signal CARS avant vs arrière obtenu pour différentes distributions de dipôles. Dans le cas le plus simple, où il n'y a qu'un seul dipôle contribuant au $\chi^{(2)}$ du matériau (figure 3.13a), les signaux avant et arrière sont très faibles, mais

égaux. C'est également le cas pour la GSH. Pour une membrane très mince de dipôles répartis dans le plan xy (figure 3.13b), les signaux avant et arrière sont plus forts, puisque plus de dipôles contribuent, et gardent un ratio égal [94, 112]. Supposons une sphère de dipôles avec un diamètre variable centrée au point focal. Lorsque le diamètre est plus petit que la longueur de cohérence du signal arrière, cela revient au même patron de radiation que pour un dipôle unique (figure 3.13a), mais avec un signal plus élevé. À partir du moment où le diamètre de cette sphère dépasse la longueur de cohérence dans la direction arrière, le signal arrière garde une valeur faible tandis que le signal avant continue de croître [12]. Pour ces tailles de sphère, une croissance du diamètre de celle-ci entraîne donc une augmentation du ratio de signal avant vs arrière (figure 3.13c). Lorsque le diamètre s'approche de la grandeur de la longueur d'onde, l'effet de la phase de Gouy commence à se faire ressentir sur le signal avant. Pour le cas de la GSH et de la GTH, le signal avant atteint une valeur maximale et le ratio avant vs arrière est très élevé (figure 3.13d). Pour une sphère ayant un diamètre plus grand, le signal avant GSH ou GTH diminuera ensuite à cause d'effets d'interférences causés par la phase de Gouy. Cela est valable si la longueur de cohérence dans la direction avant est plus grande que la résolution spatiale axiale, ce qui est généralement le cas pour un faisceau fortement focalisé. Pour un diamètre correspondant à plusieurs fois la longueur d'onde, on s'approche de plus en plus du cas où le faisceau est focalisé dans un milieu homogène et le signal continue de décroître [12, 108]. Dans le cas du signal CARS, la phase de Gouy a un effet beaucoup moins important sur celui-ci [119]. Lorsque le diamètre s'approche de la grandeur de la longueur d'onde, le signal CARS avant atteint aussi une valeur maximale (figure 3.13d), mais celui-ci se maintiendra à une valeur fixe pour une sphère de dipôles ayant un diamètre plus grand (figure 3.13e).

La figure 3.14 montre le patron de radiation obtenu pour des simulations réalisées spécifiquement pour la microscopie GSH et GTH. Celles-ci arrivent à la conclusion que, lorsque le diamètre de la sphère de dipôles est de l'ordre de grandeur ou plus grand que la longueur d'onde fondamentale, le patron de radiation adopte une forme conique plutôt que purement vers l'avant le long de l'axe z [11]. Cela s'explique par le fait que l'effet de la phase de Gouy s'applique principalement à proximité de l'axe z à cause de la courbure des fronts d'ondes. Pour un angle α plus élevé, son effet se fait moins ressentir et l'accord de phase revient au même que pour une onde plane, comme on peut voir à la figure 3.6. Puisque la condition d'accord de phase est respectée pour les directions de propagation ayant un angle α élevé et qu'elle l'est moins, à

cause de la phase de Gouy, pour les directions ayant un angle α faible à proximité de l'axe z , il y aura plus de GSH pour un angle élevé et le patron de radiation prend donc une allure conique (figure 3.14a et 3.14c 3HG). Des simulations pour une distribution de dipôles répartis dans une membrane, située dans le plan yz , ont également été réalisées [11, 12, 65, 108]. Pour ce cas, la GSH est émise dans deux directions. Le patron de radiation prend la forme de deux lobes, partant de part et d'autre de la membrane au point focal et allant dans la direction avant avec un angle α élevé. Bref, pour une membrane dans le plan yz , le patron de radiation ressemble à deux oreilles de lapin pointant vers l'avant dans le plan xz (figure 3.14a et 3.14c 2HG). Ce patron de radiation est similaire à celui de la GSH dans la sphère de dipôles, mais avec une interférence destructive supplémentaire le long du plan de la membrane. À la place d'un cône avec un minimum au centre, on obtient donc deux lobes séparés par le même plan dans lequel la membrane se trouve. Ces simulations sont particulièrement importantes puisqu'elles permettent d'expliquer la GSH par les parois cellulaires [3, 11, 65].

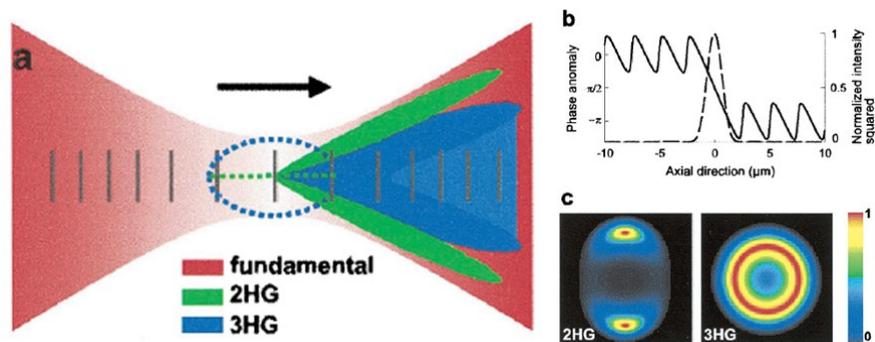


Figure 3.14 Cette figure est tirée de [11 (voir figure 1)]. (a) Coupe dans le plan xz du faisceau fondamental (en rouge), du patron de radiation de la GSH pour des dipôles répartis dans une membrane dans le plan yz (en vert) et du patron de radiation de la GTH pour des dipôles répartis dans un ellipsoïde (en bleu). (b) Profil d'intensité du faisceau fondamental le long de l'axe z et variation de la phase de Gouy. (c) Coupe dans le plan xy du patron de radiation des deux structures décrites en (a). Le patron de radiation pour la GSH d'une membrane correspond à deux lobes sortant de part et d'autre de celle-ci, tandis que celui émis par un ellipsoïde a une forme conique.

Vers la fin de ma maîtrise, nous avons observé expérimentalement un patron de radiation très similaire à celui obtenu théoriquement à la figure 3.14a et 3.14c (3HG) [40]. En focalisant le faisceau à proximité d'une interface d'air et de quartz cristallin (figure 3.15i), la forme du patron de radiation change en fonction de la position du point focal. Lorsque le volume focal est majoritairement dans l'air ou à l'interface, la phase de Gouy n'a pas ou peu d'effets sur l'accord

de phase et le patron de radiation obtenu prend la forme d'un seul lobe centré le long de l'axe de propagation dans la direction avant (figure 3.15f-h). Toutefois, lorsque le volume focal se retrouve majoritairement dans le quartz, alors la phase de Gouy cause des effets d'interférences, comme décrit plus haut, et le patron de radiation prend une allure conique avec des franges d'interférences à l'intérieur de celui-ci (figure 3.15c-e). Le profil radial des patrons de radiation de la figure 3.15c-h est présenté à la figure 3.15j. Le profil de la puissance du signal GSH détecté, en fonction de la position du point focal par rapport à l'interface et en fonction de l'ouverture numérique de la lentille de collection du signal, est donné pour l'interface air-quartz (figure 3.15a) et pour l'interface quartz-air (figure 3.15b). Ce profil d'intensité a un aspect symétrique par rapport à la position de l'interface lorsque l'ouverture numérique de la lentille de collection est élevée, mais cette symétrie disparaît en réduisant l'ouverture numérique de collection, car les patrons de radiations sont différents avant et après l'interface. Avec une ouverture numérique plus faible, moins de signal est collecté lorsque le volume focal se trouve dans le quartz, puisque le patron de radiation prend une forme conique avec un angle de divergence plus élevé. Il est donc important de retenir que deux structures différentes peuvent générer une puissance de signal GSH égale, mais des patrons de radiation différents.

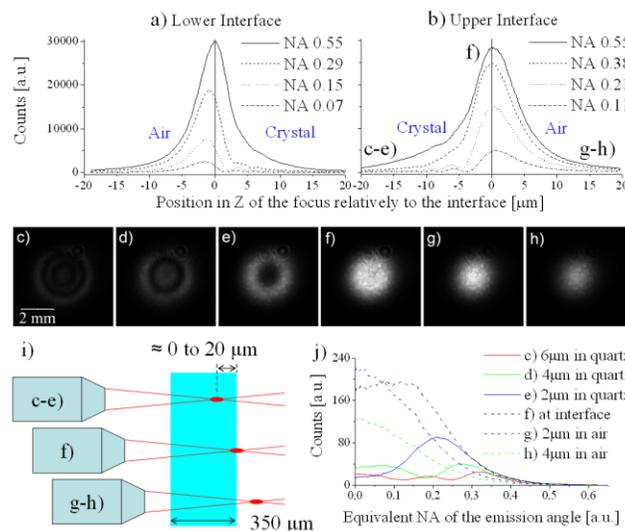


Figure 3.15 Cette figure est tirée de [40 (voir figure 4)]. Profils de puissance, pour différentes ouvertures numériques, de la GSH détectée en focalisant à proximité (a) d'une interface air-quartz et (b) d'une interface quartz-air. Patron de radiation obtenu en focalisant près de l'interface quartz-air (c) 6 μm dans le quartz, (d) 4 μm dans le quartz, (e) 2 μm dans le quartz, (f) à l'interface, (g) 2 μm dans l'air et (h) 4 μm dans l'air. (i) Le schéma qui décrit l'expérience. (j) Profils radiaux des six patrons de radiation montrés dans les images (c-h).

3.4.3 Ratio de signal avant vs arrière

Expérimentalement, il est beaucoup plus facile de mesurer le ratio de signal avant vs arrière que de trouver le patron de radiation complet. Il est donc important de bien comprendre tous les mécanismes qui peuvent affecter ce ratio. Le premier mécanisme qui contribue au signal arrière est la GSH arrière (figure 3.13a-c). Cette contribution est généralement très faible étant donné que la longueur de cohérence pour le signal arrière est très courte. Lorsque le matériau contient de petites structures isolées ayant un $\chi^{(2)}$, leur contribution peut être non négligeable. Le second mécanisme qui contribue au signal arrière est similaire au premier, mais beaucoup moins intuitif. Lorsque le matériau a une structure $\chi^{(2)}$ hétérogène, avec des discontinuités importantes, cela peut jouer sur l'accord de phase et affecter la quantité de signal GSH émis vers l'arrière et vers l'avant. L'interface à la figure 3.13f en est un bon exemple, mais cela peut aussi arriver avec des structures plus complexes. Finalement, le troisième mécanisme qui peut contribuer au signal arrière est la réflexion ou la rétrodiffusion (figure 3.13g-h) du signal GSH avant vers l'arrière [36]. Ce mécanisme peut être particulièrement important lorsque le signal avant est beaucoup plus grand que le signal arrière généré par les deux premiers mécanismes. La réflexion d'une fraction du signal avant vers l'arrière, par une lamelle de microscope ou toute autre interface, est non négligeable lorsque le signal avant est mille fois plus important que le signal arrière généré dans le matériau.

Naturellement, il existe des structures ayant des distributions de dipôles plus complexes que celles qui sont présentées aux figures 3.13 et 3.14. On les rencontre principalement dans les tissus biologiques étant donné que ceux-ci ont souvent une structure hétérogène. Le patron de radiation et le ratio de signal avant vs arrière de la GSH varie en fonction de la structure locale du $\chi^{(2)}$ du matériau. C'est d'ailleurs l'étude du ratio de signal GSH avant vs arrière dans les tissus conjonctifs [36], puis, plus tard, l'étude du patron de radiation de la GSH dans le fascia [40], qui nous ont mis sur une piste pour mieux comprendre la structure du collagène dans ces tissus. Le ratio de signal GSH avant vs arrière est anormalement faible dans les tissus conjonctifs par rapport à celui observé dans un milieu homogène [36]. De plus, le patron de radiation de la GSH varie en fonction de la position dans l'image [40]. Ces deux phénomènes semblent indiquer que le collagène dans les tissus conjonctifs a une structure $\chi^{(2)}$ très hétérogène.

3.5 Applications de la microscopie GSH

La condition de non centrosymétrie pour la génération de signal en microscopie GSH en fait un outil très puissant, mais avec un usage restreint. Les structures non centrosymétriques dans l'image apparaissent avec un fort contraste tandis que les structures centrosymétriques ne génèrent aucun signal. Cela donne des images d'une belle qualité pour l'imagerie des structures non centrosymétriques, mais rend la technique inutilisable si le matériau imagé n'en contient pas. Ce problème peut être contourné en utilisant des marqueurs ayant un $\chi^{(2)}$, mais en général, l'usage de marqueurs fluorescents plutôt que de marqueurs GSH est plus avantageux en microscopie. Cela est dû à la nature cohérente de la microscopie GSH et au fait que sa longueur d'onde est fixée par le laser, contrairement à la fluorescence où le signal est incohérent et où la longueur d'onde est déterminée par le marqueur plutôt que le laser [65]. La microscopie GSH est utilisée principalement pour l'imagerie de tissus biologiques, mais elle peut également servir à imagier d'autres matériaux optiques. Elle a aussi une application bien particulière pour la mesure de potentiel de membrane. La microscopie GSH est souvent combinée avec d'autres techniques de microscopie pour comparer les images et corrélérer les structures observées dans celles-ci. Les images complémentaires obtenues ainsi révèlent plus d'informations qu'en se limitant à une seule technique d'imagerie.

3.5.1 Imagerie des matériaux optique

Certains matériaux cristallins sont non centrosymétriques et transparents. La microscopie GSH peut donc être un outil très intéressant pour leur caractérisation. Si le cristal imagé n'est formé que d'un seul domaine $\chi^{(2)}$, les images obtenues auront un signal à peu près uniforme en focalisant à proximité des interfaces du cristal, ce qui n'a rien de bien intéressant. Cela peut tout de même servir à vérifier l'alignement du laser dans le microscope. Toutefois, si le cristal imagé est une structure plus complexe qui contient plusieurs domaines $\chi^{(2)}$ de polarité opposées, les images obtenues seront beaucoup plus intéressantes et permettront de voir la frontière entre ces domaines. Les cristaux périodiquement orientés, comme celui schématisé à la figure 3.4, qui servent à la GSH avec une condition de quasi accord de phase en sont un parfait exemple.

La microscopie GSH peut donc être utilisée comme une technique de caractérisation non destructive qui permet de voir à l'intérieur du matériau pour vérifier la périodicité des domaines du cristal [45, 46, 50, 126]. La figure 3.16 tirée de [45] illustre son efficacité pour effectuer ce genre de caractérisation. La figure 3.17 tirée de [126] fait de même, mais provient d'un montage plus moderne qui permet d'obtenir des images 2D ou 3D des parois de domaines à l'intérieur du matériau imagé.

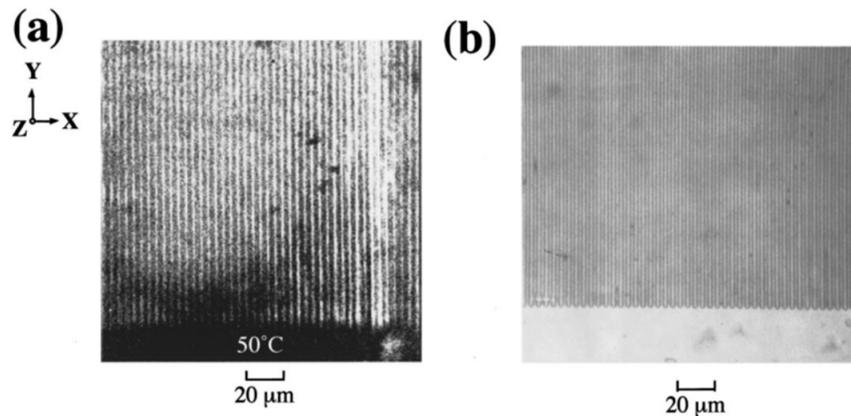


Figure 3.16 Cette figure est tirée de [45 (voir figure 7)]. Images d'un cristal périodiquement orienté. (a) Image GSH du plan XY à l'intérieur du cristal. (b) Image en microscopie optique en champ clair de la même région après l'avoir exposée par gravure chimique.

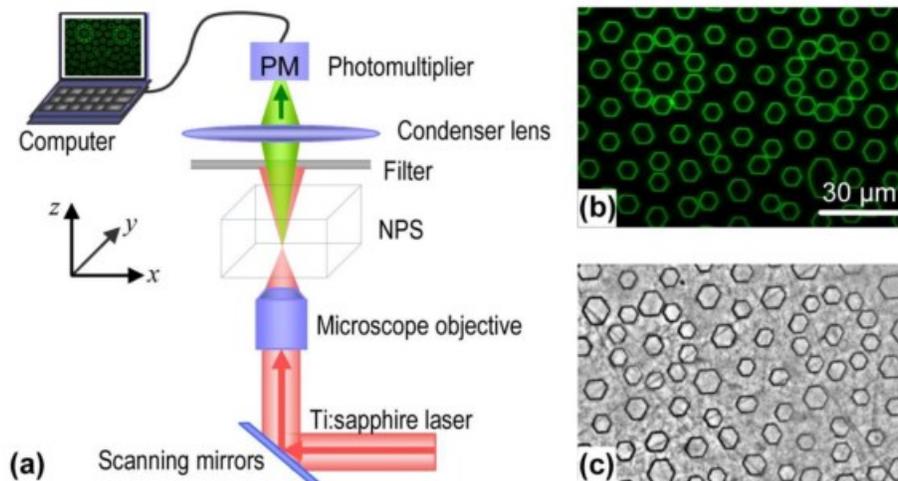


Figure 3.17 Cette figure est tirée de [126 (voir figure 1)]. (a) Schéma du microscope GSH. (b) Image GSH des parois de domaines à l'intérieur du cristal. (c) Image en microscopie optique en champ clair de la même région après l'avoir exposée par gravure chimique.

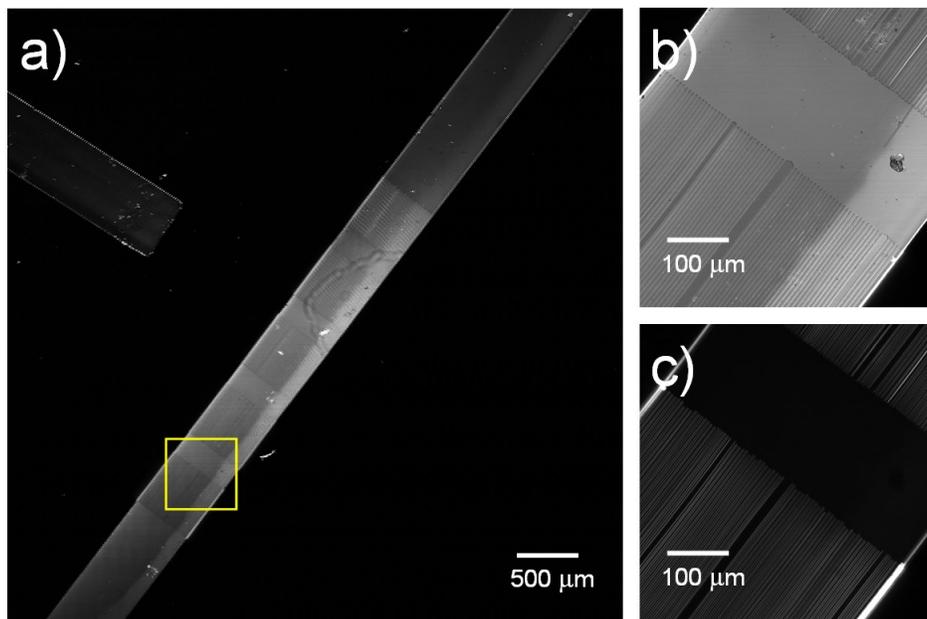


Figure 3.18 (a) Image GSH 5 mm \times 5 mm de la surface d'un cristal de niobate de lithium périodiquement orienté (PPLN). Les cinq zones périodiquement orientées sont facilement identifiables. (b) Image GSH 500 μ m \times 500 μ m de la surface d'un cristal PPLN. (c) Image GSH 500 μ m \times 500 μ m d'un cristal PPLN à 20 μ m sous la surface. Les limites des domaines dans la zone périodiquement orientée sont visibles en balayant le cristal en surface ou en profondeur.

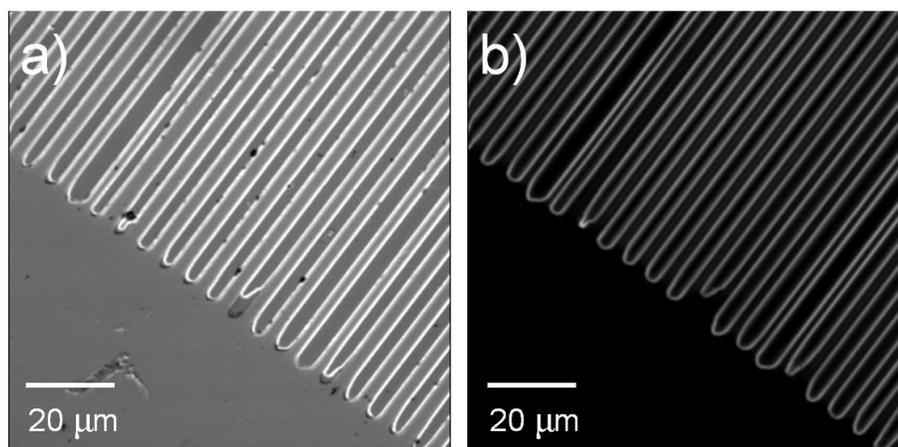


Figure 3.19 (a) Image GSH 100 μ m \times 100 μ m de la surface d'un cristal PPLN. (b) Image GSH 100 μ m \times 100 μ m d'un cristal PPLN à 16 μ m sous la surface. Ces images à haute résolution permettent de voir en détail la forme des domaines dans le cristal.

Des images d'un cristal périodiquement orienté ont également été prises à notre laboratoire au courant de mes études. Celles-ci sont présentées aux figures 3.18 et 3.19. Il s'agit d'un cristal de

niobate de lithium contenant cinq zones périodiquement orientées (PPLN). L'image à basse résolution de la figure 3.18a donne une vue d'ensemble du cristal. Celles de la figure 3.18b-c correspondent à la région encadrée en jaune dans la figure 3.18a. L'image de la figure 3.18b a été prise en balayant la surface du cristal, tandis que celle de la figure 3.18c a été prise en balayant le point focal du faisceau dans un plan $20\ \mu\text{m}$ sous la surface. Comme prévu, le signal diminue fortement en focalisant le faisceau au cœur du cristal (voir figure 3.7), mais aux limites entre les domaines, il y a tout de même génération de signal à cause de la structure $\chi^{(2)}$ particulière, ce qui rend ces limites bien visibles dans l'image. Les images de la figure 3.19 sont similaires à celles de la figure 3.18b-c, mais elles ont été prises à plus haute résolution.

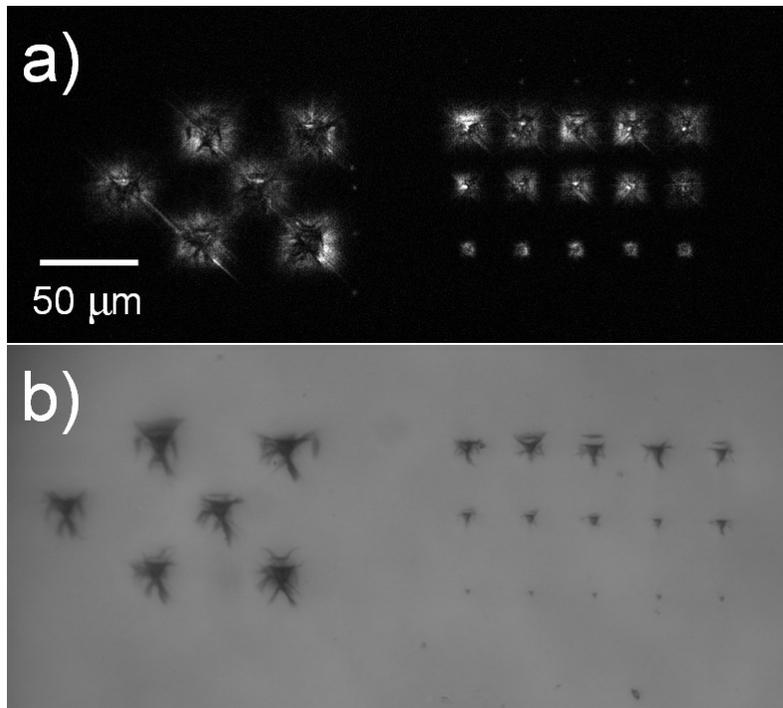


Figure 3.20 (a) Image GSH $400\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$ des structures non centrosymétriques formées par les dislocations en surface du matériau. (b) Image en microscopie optique en champ clair de la même région. Les images GSH révèlent que les dislocations forment des structures pyramidales à base carrées, même si elles ont été formées par une pointe ayant une forme triangulaire.

Les cristaux périodiquement orientés sont le meilleur exemple de matériaux optiques non biologiques qui puissent être imagés par microscopie GSH, mais d'autres structures peuvent également l'être à condition qu'elles aient un $\chi^{(2)}$. La figure 3.20 présente deux images d'une couche mince de SrTiO_3 déposée sur un substrat. Une pointe de forme triangulaire a appliqué

une pression à différents endroits sur la couche mince. Cela a causé la formation de dislocations autour des endroits où la pointe a été appliquée [127]. Ces dislocations ont amplifié les propriétés non centrosymétriques du SrTiO_3 , ce qui les rend bien visibles par microscopie GSH [128]. La figure 3.20a correspond à l'image GSH du matériau, tandis que la figure 3.20b est une image en microscopie optique en champ clair de la même région. Remarquez que les dislocations se sont propagées en fonction des plans cristallins du matériau, ce qui explique leur forme en pyramide à base carrée, même si elles ont été formées par une pointe ayant une forme triangulaire.

3.5.2 Imagerie des tissus biologiques

L'application la plus importante de la microscopie GSH est l'imagerie des tissus biologiques. Les principales structures biologiques qui peuvent générer de la GSH sont le collagène, la myosine et les microtubules. En utilisant des marqueurs, il est également possible d'imager les membranes cellulaires. Chez les végétaux, la cellulose peut aussi générer un signal GSH [129].

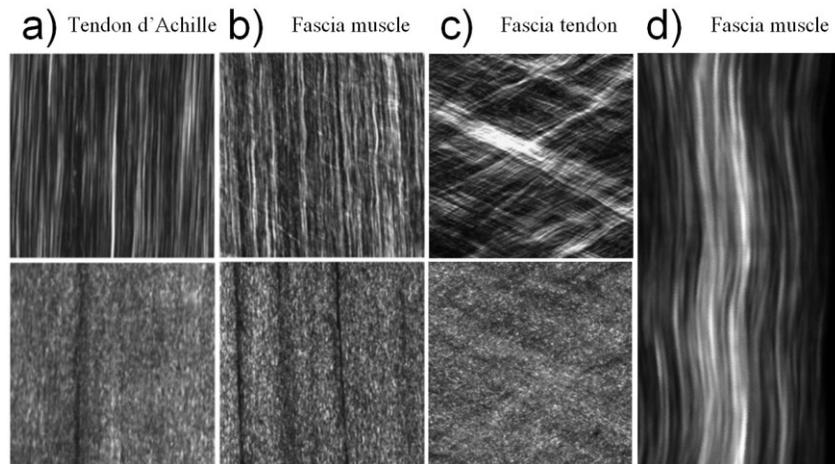


Figure 3.21 Les figures (a) et (b) sont tirées de [36 (voir figures 2a-b et 3a-b)]. La figure (c) est tirée de [131 (voir figure 1c-d)]. La figure (d) est tirée de [40 (voir figure 3a)]. Images GSH du signal avant (haut) et arrière (bas) de différents tissus riches en collagène. (a) Tendon d'Achille $67 \mu\text{m} \times 67 \mu\text{m}$. (b) Fascia du muscle $92 \mu\text{m} \times 92 \mu\text{m}$. (c) Fascia du tendon. (d) Fascia du muscle (signal avant seulement) $20 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$.

Le collagène sert à former la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Il confère les propriétés mécaniques dont ces tissus ont besoin selon leur fonction. On retrouve donc du collagène dans les tissus les tissus conjonctif [6, 21, 27, 36, 38, 130, 131] comme le tendon [9,

27, 36, 131], le fascia [36, 40, 131], la peau [4-6, 9, 130], les vaisseaux sanguins [132], les os [18, 133], le cartilage [41, 134, 135], la dentine [130], la cornée [9, 136], etc... Cependant, le type de collagène et sa structure dépendent du tissu. Comme le montrent les figures 3.21 à 3.26, la microscopie GSH permet d'imager ces différents tissus et donne un aperçu de la distribution et de l'orientation du collagène dans ceux-ci. Notez que ce ne sont pas tous les types de collagène qui génèrent de la GSH. Le collagène type I, le plus répandu, ainsi que le collagène type II, qu'on retrouve dans le cartilage (figure 3.23), en sont capables, mais pas le collagène type IV (figure 3.25).

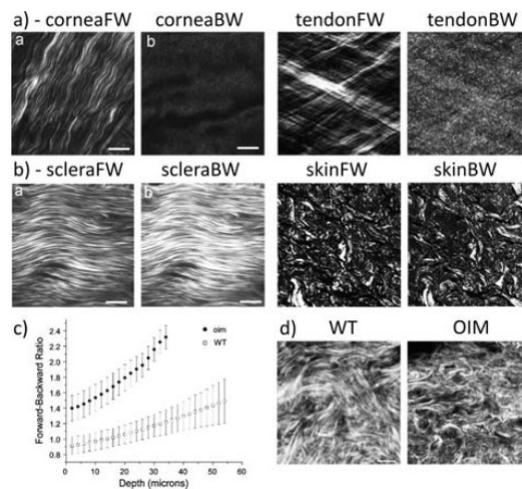


Figure 3.22 Cette figure est tirée de [9 (voir figure 4)]. Images GSH du signal avant et arrière de différents tissus riches en collagène. (a) Cornée et fascia du tendon. (b) Sclère et peau. (d) Image GSH avant d'un tissu de peau sain (WT) et d'un tissu de peau malade (OIM). (c) Ratio de signal avant vs arrière en fonction de la profondeur dans les tissus montrés en (d).

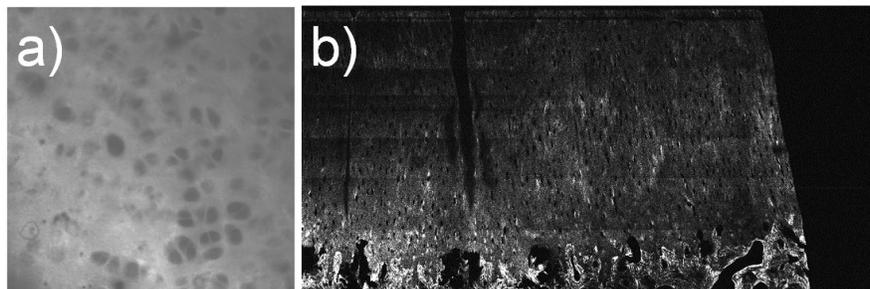


Figure 3.23 La figure (a) est tirée de [134 (voir figure 3)]. Images GSH de tissus de cartilage. (a) Coupe en surface d'un tissu sain. (b) Coupe transversale (5 mm × 2,5 mm) d'un tissu de cartilage. L'os est visible au bas de l'image, là où l'intensité du signal est plus élevée. Les deux images ne proviennent pas du même tissu.

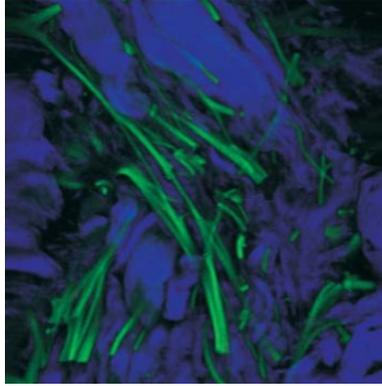


Figure 3.24 Cette figure est tirée de [9 (voir figure 1d)]. Image $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ d'un tissu de peau sain montrant l'assemblage de collagène (GSH, en bleu) et de fibres élastiques (fluorescence par absorption deux photons, en vert) dans celui-ci.

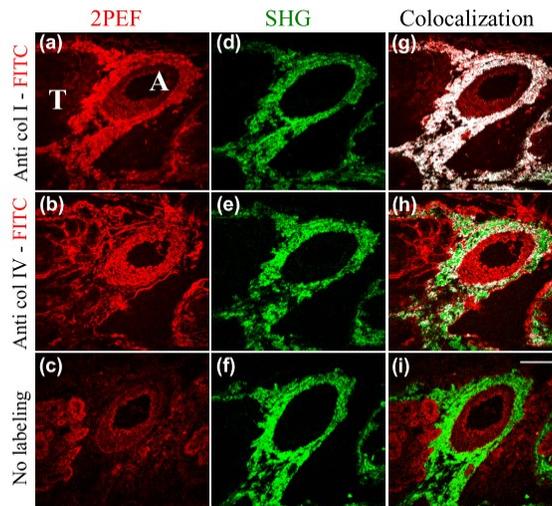


Figure 3.25 Cette figure est tirée de [132 (voir figure 1)]. Imagerie d'un tissu rénal en fluorescence deux photons (a-c) et en GSH (d-f). L'artère est désignée par A et les tubules par T dans l'image (a). Des marqueurs fluorescents s'attachent (a) au collagène type I ou (b) au collagène type IV indiquent la distribution de ces deux types de collagène. (c) Signal endogène (sans l'ajout de marqueur) en fluorescence. (d-f) Images GSH correspondant aux zones imagées en (a-c). (g, h) Recouvrement (en blanc) de la fluorescence et de la GSH. Ces images indiquent que le collagène type I est responsable de la GSH, tandis que le type IV ne l'est pas. (i) Combinaison des images (c) et (f) montrant la distribution de signal endogène dans le tissu. La barre en (i) correspond à une distance de $100\ \mu\text{m}$.

La myosine est l'une des protéines qui constitue les tissus musculaires et est responsable de la GSH dans ceux-ci [5, 10, 18-24, 66, 137]. Elle permet, avec l'actine, la contraction du sarcomère qui est un mécanisme fondamental au fonctionnement du muscle. Les figures 3.26 et 3.27 montrent des images de tissus musculaires acquises en microscopie GSH. Les filaments de

myosine y forment de larges bandes de signal qui permettent de voir la structure périodique des sarcomères dans le muscle strié. L'imagerie par GSH d'un tissu musculaire vivant permet également d'observer la contraction des sarcomères qui le composent en temps réel [137].

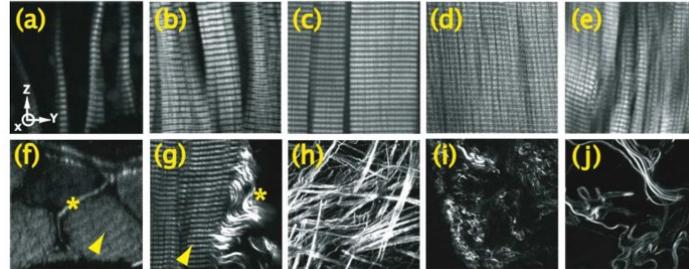


Figure 3.26 Cette figure est tirée de [22 (voir figure 1)]. Images GSH du muscle gastrocnémien d'un têtard xenopus (a) un jour (stage 32), (b) deux jours (stage 37) et (c) quatre jours (stage 46) après la fertilisation. (d) Image GSH du muscle gastrocnémien d'une grenouille xenopus adulte. (e) Image GSH du muscle gastrocnémien d'un tissu humain (femme, 71 ans). (f, g) Images de collagène et du muscle gastrocnémien d'un tissu de golden retriever de 4 mois affecté de dystrophie musculaire de Duchenne. (h-j) Projections d'empilements d'images GSH (h) du tendon d'une grenouille xenopus adulte, (i) de l'aorte d'une grenouille xenopus adulte et (j) du collagène d'un tissu de Beagle adulte. Les images (a-e, g) sont des coupes le long du muscle et font $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$. L'image (f) est une coupe d'une section du muscle et fait $90 \mu\text{m} \times 90 \mu\text{m}$. Les images (h-j) font $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ et sont des projections d'empilements d'images GSH prises sur (h) $100 \mu\text{m}$ d'épaisseur et (i, j) $17 \mu\text{m}$ d'épaisseur.

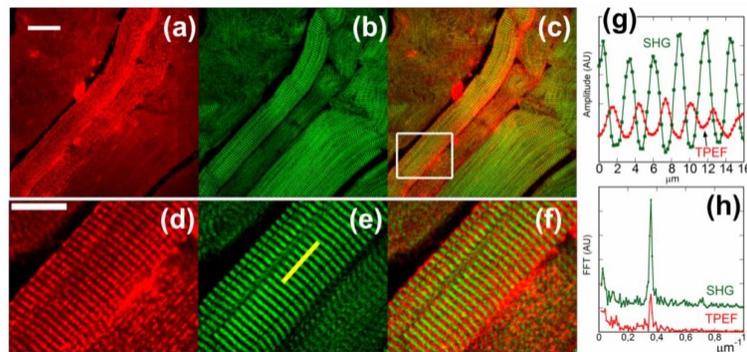


Figure 3.27 Cette figure est tirée de [21 (voir figure 1)]. Imagerie de tissu musculaire de veau en (a) fluorescence deux photons et en (b) GSH. (c) Combinaison des images (a) et (b). (d-f) agrandissement du rectangle blanc dans l'image (c). (g) Variation des signaux le long du profil tracé dans l'image (e). (h) Transformée de Fourier des profils des signaux mettant en évidence la périodicité dans le muscle. La barre en (a) correspond à une distance de $40 \mu\text{m}$ et celle en (d) de $20 \mu\text{m}$.

Les microtubules sont des protéines qu'on retrouve dans les cellules. Ils jouent le rôle de squelette pour celles-ci. Ils peuvent générer un faible signal GSH [5, 18, 138, 139]. La figure 3.28 montre une image GSH des microtubules lors de la mitose d'une cellule.

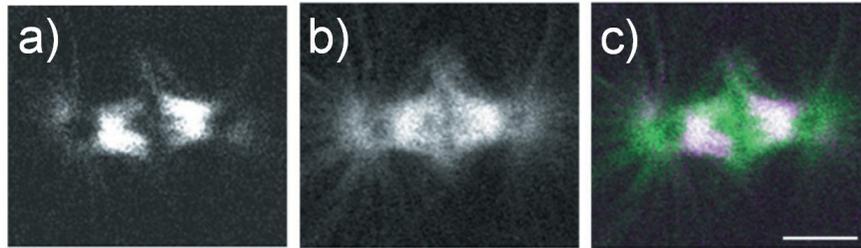


Figure 3.28 Cette figure est tirée de [5 (voir figure 8)]. Imagerie des microtubules d'un embryon durant sa première mitose. (a) Signal GSH. (b) Fluorescence deux photons. (c) Combinaison des images (a) et (b). Le signal GSH est plus faible au centre de l'image et aux deux pôles, comparé à la fluorescence. La barre en (c) correspond à une distance de 10 μm .

La microscopie GSH est souvent combinée à la microscopie en fluorescence deux photons ou à une autre technique de microscopie, afin de pouvoir comparer les images obtenues pour en faire une meilleure interprétation. Cela est bien illustré à la figure 3.24 où le collagène peut être distingué des fibres élastiques, à la figure 3.25 où la fluorescence et la GSH démontrent ensemble que le collagène type I est responsable de la GSH et non le type IV, à la figure 3.27 où la fluorescence indique la position de l'actine et la GSH celle de la myosine et finalement à la figure 3.28 où la fluorescence démontre que la GSH provient bel et bien des microtubules.

Il est également possible en microscopie GSH de pousser plus loin la caractérisation des tissus en comparant les images obtenues pour différentes polarisations du laser et différentes polarisations de collection du signal. Les images du signal collecté dans les directions avant et arrière peuvent aussi être comparées. Le patron de radiation du signal peut également être étudié. Différentes méthodes de traitement des images peuvent être employées pour mieux interpréter les images, afin de comprendre la structure du tissu imagé. Dans certains cas, la microscopie GSH peut même servir d'outil pour poser un diagnostic et déterminer si un tissu est sain ou malade [5, 9, 20, 37, 134, 135, 140], comme le montrent les figures 3.22c-d et 3.26f-g. Cela explique l'importance de cette technique pour l'imagerie des tissus biologiques.

3.5.3 Mesure de potentiel de membrane

La microscopie GSH sert également à la mesure du potentiel de membrane des cellules [3, 11, 65, 141]. Pour cette application, il est nécessaire d'ajouter des marqueurs non centrosymétriques dans le milieu où se trouvent les cellules ou encore à l'intérieur de celles-ci. S'il y a une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur des cellules, les marqueurs auront tendance à s'accumuler sur la membrane cellulaire avec une orientation bien précise. Cela forme une structure non centrosymétrique capable de générer de la GSH. De plus, une variation dans la différence de potentiel entraîne également une variation dans l'intensité du signal GSH. La microscopie GSH a donc la capacité de mesurer le potentiel d'une membrane cellulaire avec une résolution spatiale micrométrique, et ce, sans la nécessité d'utiliser une électrode, puisque le faisceau laser est en mesure de sonder un volume. Une zone plus petite ou encore une ligne de la membrane peut être balayée pour effectuer des mesures très rapides, ce qui est essentiel pour l'étude des variations du potentiel de membrane des neurones. En effet, en plus d'être de très petite taille et de former un réseau très complexe, le potentiel de membrane des neurones varie très rapidement. Cette application est donc d'une grande importance pour l'étude des tissus nerveux. La figure 3.29 est un exemple d'imagerie des membranes cellulaires par microscopie GSH. La variation du potentiel de membrane, causée par l'ajout du potassium dans la solution où baignent les cellules, est responsable de la diminution du signal GSH dans l'image de droite.

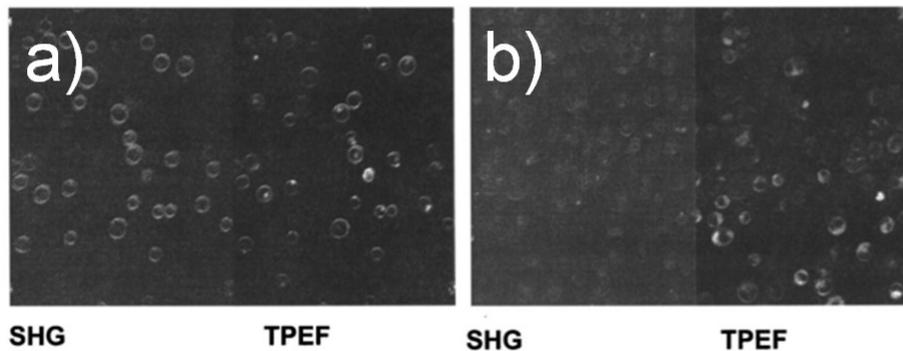


Figure 3.29

Cette figure est tirée de [3 (voir figure 6)]. Imagerie GSH de cellules lymphocytes auxquelles des marqueurs ont été ajoutés, afin de voir le changement dans le potentiel de leur membrane. Les cellules dans les images de gauche baignaient dans une solution neutre, tandis que celles dans les images de droite étaient dans une solution contenant du potassium (135 mM K^+). Le signal en fluorescence ne varie pas avec le potentiel de membrane.

3.6 Conclusion

Les principales notions théoriques permettant de comprendre la microscopie GSH ont été présentées dans ce chapitre. Le mécanisme à l'échelle moléculaire derrière le phénomène de GSH et l'approximation par une onde plane permettent de comprendre comment obtenir de la GSH dans certains matériaux. La GSH avec un faisceau fortement focalisé permet de comprendre les subtilités de la GSH dans le cadre de la microscopie. Dû aux conditions particulières d'accord de phase qui peuvent être rencontrées en microscopie, le patron de radiation peut prendre différentes formes. Finalement, un survol des principales applications de la microscopie GSH a également été présenté.

4 TISSUS BIOLOGIQUES

Cette section explique les notions théoriques concernant les tissus biologiques, en mettant une emphase sur leurs propriétés optiques non linéaires. La structure moléculaire et les caractéristiques de la myosine et du collagène y sont expliquées. À plus grande échelle, les tissus musculaires et les tissus conjonctifs riches en collagène y sont également décrits. Ces deux tissus ont été choisis en raison de leur structure particulière, afin de réaliser les expériences de microscopie GSH interférométrique présentées au chapitre sept.

4.1 Tissus musculaires

Les tissus musculaires sont retrouvés chez les animaux et servent au mouvement. Il existe différents types de tissus musculaires ayant chacun leur fonction, soit les muscles squelettiques, le muscle cardiaque et les muscles lisses. Cette sous-section décrit les muscles squelettiques, aussi appelés muscles striés à cause de leur structure périodique à l'échelle microscopique. Ceux-ci sont généralement fixés aux os par des tendons pour contrôler les mouvements du squelette en se contractant ou en se relâchant. Ils sont donc essentiels pour assurer la motricité chez les animaux.

4.1.1 Structure des tissus musculaires

La microscopie électronique et la diffraction des rayons x ont permis de découvrir la structure et d'expliquer le fonctionnement des tissus musculaires [13, 16, 17]. Les muscles squelettiques sont composés de très longues fibres musculaires appelées myocytes (figure 4.1a). Ces fibres musculaires sont constituées de plusieurs cellules fusionnées ensemble. Elles ont un diamètre allant de 10 à 100 μm et peuvent mesurer plusieurs centimètres de long [16]. À l'intérieur de celles-ci se trouvent des fibres encore plus petites appelées myofibrilles (figure 4.1a-c). Les myofibrilles ont un diamètre allant de 1 à 3 μm et sont toutes alignées parallèlement avec l'axe du myocyte qui les contient [16]. Elles sont entourées de reticulum sarcoplasmique et contiennent un très grand nombre de sarcomères consécutifs (figure 4.1b). Le sarcomère est le moteur, à l'échelle microscopique, qui permet la contraction musculaire. Le réticulum

sarcoplasmique contient les ions de calcium (Ca^{2+}) qui sont la clé permettant au sarcomère de remplir sa fonction et l'ATP cellulaire qui est le carburant permettant l'action des myofibrilles.

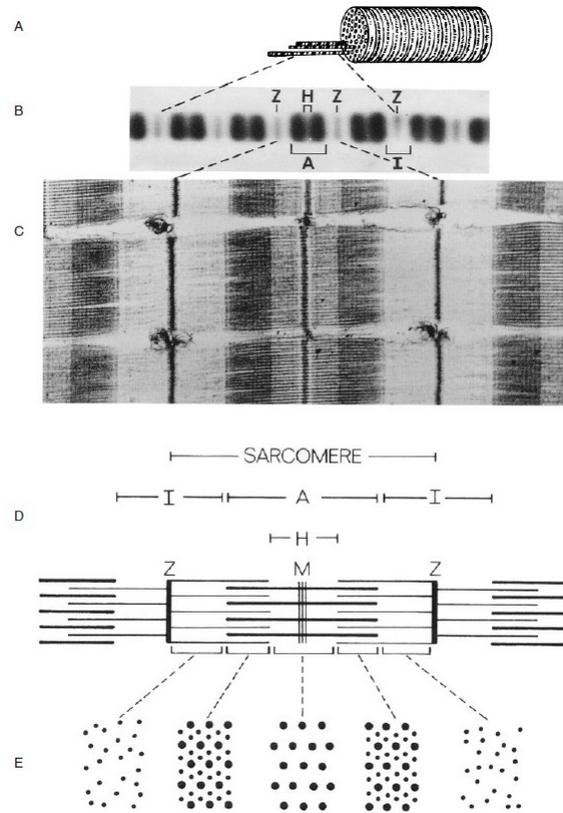


Figure 4.1 Cette figure est tirée de [16 (voir figure 7.1)]. Schéma du sarcomère dans les fibres musculaires. (a) Fibre musculaire, aussi appelée myocyte, de laquelle sortent trois myofibrilles. (b) Image prise en microscopie à contraste de phase d'une myofibrille. (c) Image prise en microscopie électronique d'une coupe longitudinale de trois myofibrilles montrant en détail la structure du sarcomère. (d) Schéma du sarcomère basé sur l'interprétation des images (b) et surtout (c). Les filaments épais de myosine sont situés dans la bande A. Les filaments minces d'actine sont situés en dehors de la zone H et se superposent partiellement aux filaments épais. (e) Schéma de coupes transversales obtenues dans les différentes bandes du sarcomère. La bande I ne contient que les filaments minces, la bande A en dehors de la zone H contient à la fois les filaments minces et épais et la zone H ne contient que les filaments épais.

Le sarcomère est composé principalement de filaments d'actine, aussi appelés filaments minces et de filaments de myosine, aussi appelés filaments épais [13]. Une coupe du sarcomère sur sa longueur révèle que les filaments minces et épais se superposent partiellement ensemble (figure 4.1c). Cette structure ressemble à des peignes emboîtés l'un dans l'autre (figures 4.1d et 4.2a). Une coupe transversale du sarcomère confirme que tout le volume des myofibrilles est rempli de filaments (figure 4.1e). La structure tridimensionnelle du sarcomère ressemble donc

grossièrement à des brosses emboîtées l'une dans l'autre où les poils des brosses représentent les filaments. Les filaments épais sont compris dans la bande A qui apparaît plus sombre (figure 4.1b-c). La bande I, qui est assez claire, contient les filaments minces, mais ceux-ci se prolongent dans la bande A pour se superposer avec les filaments épais. La zone H contient uniquement des filaments épais, ce qui explique pourquoi elle est plus claire que le reste de la bande A, qui contient les deux types de filaments. Les filaments minces de deux sarcomères consécutifs se rejoignent à une jonction apparaissant plus sombre dans l'image qui est appelée la ligne Z ou le disque Z. Les filaments épais sont maintenus ensemble au centre du sarcomère par une structure plus sombre appelée la ligne M. Des filaments de titine, reliant le bout des filaments épais à la ligne Z, trop petits pour être visibles dans l'image de la figure 4.1c, jouent également un rôle de ressort pour centrer l'ensemble des filaments épais au milieu des deux lignes Z. On considère donc qu'un sarcomère complet est la structure comprise entre deux lignes Z et qu'un demi sarcomère est la structure comprise entre une ligne Z et une ligne M. Un sarcomère mesure entre 2 et 3 μm de long. Les bandes et les lignes des sarcomères de myofibrilles adjacentes sont disposées en rang l'une vis-à-vis l'autre, ce qui confère au tissu une structure très organisée qui est périodique à l'échelle macroscopique (figure 4.1c). C'est d'ailleurs dû à cette structure que les muscles squelettiques sont également appelés muscles striés.

Les filaments jouent un rôle crucial pour la contraction musculaire. Les filaments épais sont en mesure de tirer sur les filaments minces pour les ramener vers eux. Cela augmente la longueur sur laquelle les filaments seront superposés et raccourcit la bande I et la zone H. Bref, cette action rapproche les lignes Z d'un sarcomère l'une de l'autre, ce qui correspond à une contraction du sarcomère. En contractant un très grand nombre de sarcomères consécutifs, le mouvement obtenu devient macroscopique et correspond à une contraction musculaire. Notez que le sarcomère peut uniquement se contracter volontairement, mais ne peut pas "s'étirer" volontairement, car la force appliquée par les filaments épais sur les filaments minces ne va que dans une direction. Le sarcomère peut toutefois relâcher sa contraction ce qui lui permet de revenir à sa longueur initiale si une force extérieure l'étire. Le corps contient d'ailleurs des muscles qui travaillent dans des directions contraires pour effectuer cet étirement et contrôler le squelette.

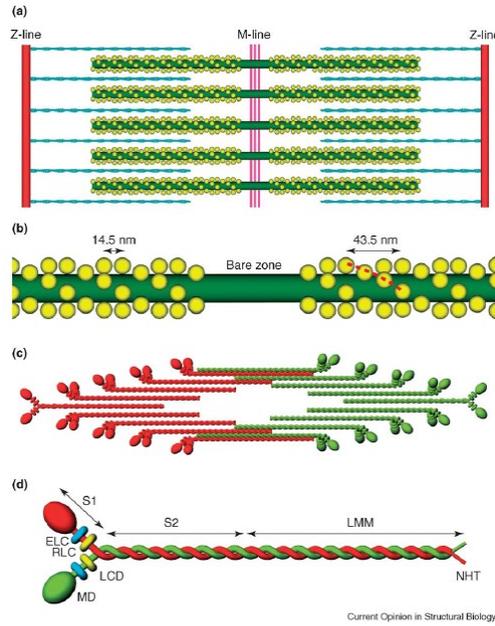


Figure 4.2

Cette figure est tirée de [17 (voir figure 1)]. (a) Schéma du sarcomère des muscles striés montrant les zones où les filaments épais et minces se superposent. Les filaments épais sont rattachés à la ligne M tandis que les filaments minces sont rattachés à la ligne Z. Le sarcomère peut se raccourcir en faisant glisser les deux peignes de filaments minces l'un vers l'autre. Les zones de superposition des filaments épais et minces deviennent alors plus grandes et le sarcomère raccourcit, ce qui permet la contraction musculaire à l'échelle macroscopique. (b) Schéma de la portion centrale d'un filament épais montrant la structure hélicoïdale (trait pointillé rouge) des paires de têtes de myosine (sphères jaunes) à la surface du filament. Le filament (en vert) est formé par les queues de plusieurs protéines de myosine. (c) Schéma de l'agencement des molécules de myosine dans les filaments épais. Dans chaque moitié du filament, les têtes de myosine pointent à l'opposé du centre du filament, ce qui donne une structure bipolaire avec une zone centrale dénuée de têtes en surface. Les queues des molécules se superposent de façon parallèle et antiparallèle dans la zone centrale du filament, mais seulement de manière parallèle en dehors de celle-ci. (d) Molécule individuelle de myosine. La queue (S2 et LMM) a une structure formée de deux chaînes lourdes en faisceau d'hélices. La paire de têtes (S1) est formée des domaines moteurs (MD) et d'une paire de deux chaînes légères (LCD, en bleu et jaune). La structure en bleu est la paire de chaînes légères essentielles (ELC) et celle en jaune est la paire de chaînes légères régulatrices (RLC).

Pour mieux comprendre le phénomène de contraction du sarcomère, il faut connaître la structure des filaments minces et épais à l'échelle moléculaire. Les filaments épais sont composés de nombreuses protéines de myosine [17]. Une molécule de myosine a une paire de têtes et une queue formées de deux chaînes lourdes enroulées en faisceau d'hélices (figure 4.2d). Chaque tête est formée d'un domaine moteur et de deux chaînes légères. La fonction des têtes est d'effectuer une traction sur les filaments minces en utilisant de l'ATP. La queue de la molécule sert à l'assemblage pour former les filaments épais. Dans chaque moitié d'un filament épais, les molécules de myosine sont orientées dans des directions opposées de sorte que les têtes de

myosine pointent à l'opposé du centre du filament situé à la ligne M. Les queues des molécules de myosine se superposent seulement de façon parallèle dans le filament, sauf dans la zone centrale où elles se superposent de façon parallèle et antiparallèle (figure 4.2c). Les queues de plusieurs molécules de myosine forment donc le filament épais, tandis que les paires de têtes dépassent en surface et sont disposées de façon hélicoïdale autour de celui-ci (figures 4.2b et 4.3). Les filaments épais ont donc une structure bipolaire et leur zone centrale est dénuée de têtes en surface [14, 16, 17].

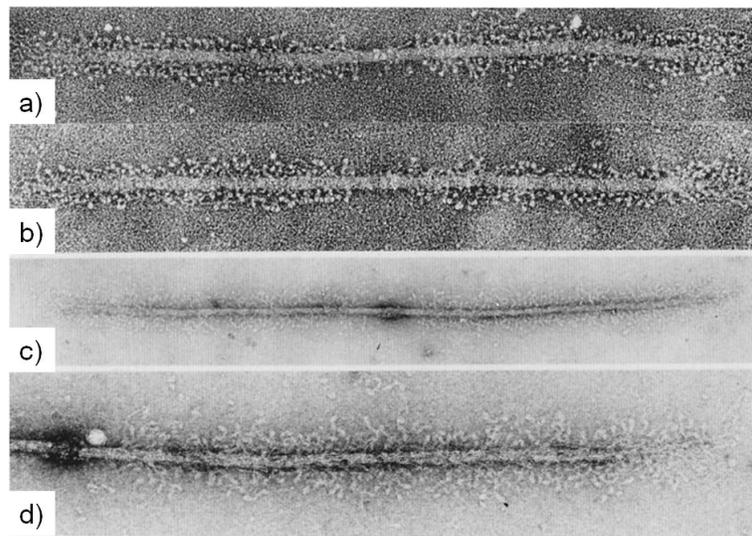


Figure 4.3 Cette figure est tirée de [16 (voir figure 7.6)]. Image prise en microscopie électronique des filaments épais du muscle chez les vertébrés. Les têtes des molécules de myosine qui forment le filament sont visibles. Elles sont absentes dans la zone centrale d'un filament. (a-b) Marquage du filament par évaporation de platine. (c-d) Contraste obtenu par coloration négative avec une solution d'acétate d'uranyle.

Les filaments minces sont composés principalement de protéines d'actine [16]. Les molécules d'actine s'assemblent pour former deux brins enroulés en faisceau d'hélices qui constituent le squelette d'un filament mince. On retrouve également d'autres protéines dans les filaments minces, comme la tropomyosine et la troponine. La distribution des filaments minces et épais dans la zone A, où ils se superposent, fait en sorte qu'un filament mince est entouré de plusieurs filaments épais et qu'un filament épais est également entouré de plusieurs filaments minces (figure 4.1e). Les nombreuses paires de têtes en surface d'un filament épais interagissent donc avec les filaments d'actine qui se trouvent autour de celui-ci. À l'état de repos, la tropomyosine et la troponine inhibent l'interaction entre l'actine et les têtes de myosine en bloquant les sites de

jonction sur l'actine. Lorsque le système nerveux donne le signal au réticulum sarcoplasmique de relâcher le Ca^{2+} , ces ions vont se lier à la troponine et entraîner un remaniement des molécules de tropomyosine et de troponine qui libère temporairement, tant que la concentration de Ca^{2+} est suffisante, les sites de jonction sur l'actine. Durant cette période, les paires de têtes de myosine se lient temporairement à ces sites et consomment de l'ATP pour effectuer une traction sur les filaments d'actine, ce qui entraînera la contraction du sarcomère et, à plus grande échelle, celle du muscle. C'est de cette façon que le système nerveux contrôle la contraction musculaire.

4.1.2 GSH dans les tissus musculaires

La structure du muscle était déjà bien comprise avant le développement de la microscopie GSH. Toutefois, la microscopie GSH permet d'obtenir de bonnes images des tissus musculaires à partir d'un signal endogène, donc sans marquage, et avec une résolution micrométrique qui permet de distinguer individuellement les sarcomères. La microscopie GSH est une technique beaucoup moins invasive que la microscopie électronique et présente donc un intérêt pour l'imagerie de tissus musculaires vivants [66]. Le temps d'acquisition d'une image GSH peut être suffisamment rapide pour suivre le mouvement des sarcomères [137]. Finalement, la microscopie GSH peut également servir à identifier si un tissu musculaire est malade [5, 22]. Ces raisons font en sorte que la microscopie GSH reste une technique fort intéressante pour l'imagerie des tissus musculaires.

L'origine du signal GSH dans les tissus musculaires est attribuée à la myosine [19, 21, 22]. Comme le montre la figure 4.4, le signal GSH dans les sarcomères est localisé là où se trouvent les filaments épais de myosine, mais pas dans les filaments minces d'actine. Ces derniers ont été marqués et sont visibles uniquement en fluorescence. Plus spécifiquement, l'origine du signal GSH est attribuée à la queue des molécules de myosine [19]. Le $\chi^{(2)}$ provient donc de la somme des hyperpolarisabilités des queues des molécules de myosine qui forment les filaments épais. Comme les molécules de myosine sont toutes alignées parallèlement dans un filament, mais avec une inversion du sens des molécules de part et d'autre du centre du filament, cela donne une structure $\chi^{(2)}$ bipolaire. L'hyperpolarisabilité des molécules de myosine s'additionne, mais la portion de gauche du filament a un signe $-\chi^{(2)}$ tandis que celle de droite a un signe $+\chi^{(2)}$. Au centre du filament, à la ligne M, on retrouve des molécules parallèles et antiparallèles et le $\chi^{(2)}$

s'inverse sur une distance très courte qui correspond approximativement à la longueur d'une molécule de myosine [23], soit environ 150 nm [16]. De plus, les filaments épais sont assez densément distribués dans tout le volume du sarcomère et sont alignés les uns par rapport aux autres, puisqu'ils sont reliés ensemble à la ligne M. Un sarcomère entier contient donc un domaine $-\chi^{(2)}$ et un domaine $+\chi^{(2)}$ dans sa bande A. Puisque le tissu musculaire contient de nombreux sarcomères consécutifs et adjacents, tous alignés vis-à-vis les uns des autres, la structure du $\chi^{(2)}$ dans celui-ci est constituée de domaines qui alternent entre $\pm\chi^{(2)}$ avec des espaces où le $\chi^{(2)}$ est nul entre ceux-ci. Cette structure ressemble beaucoup à celle d'un cristal périodiquement orienté.

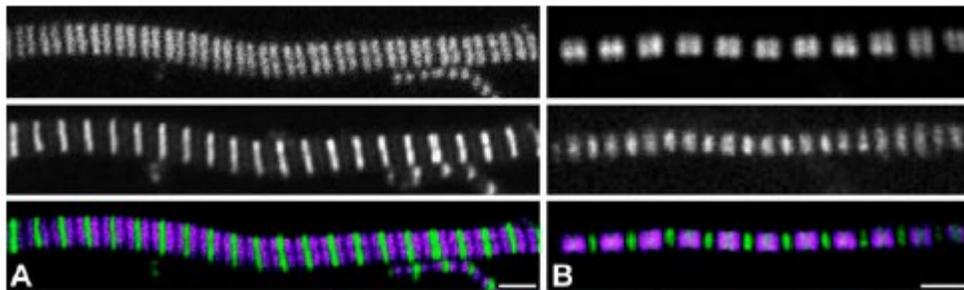


Figure 4.4 Cette figure est tirée de [19 (voir figure 2a-b)]. Identification de la source du signal GSH dans des myofibrilles isolées de souris. Les images du haut ont été prises en microscopie GSH. Celles du milieu ont été prises en fluorescence deux photons. Celles du bas sont une combinaison de celles du haut et du centre (GSH, en mauve, et fluorescence, en vert). Marquage des filaments d'actine (a) par immunofluorescence et (b) par phalloïdine fluorescente. Le signal GSH provient clairement de la myosine. Les barres d'échelles correspondent à une distance de 2,5 μm .

Comme le montrent les images GSH du tissu musculaire des figures 3.26, 3.27, 4.4, 4.5 et 4.6, une bande de signal GSH est généralement visible dans chaque sarcomère, mais il peut parfois y en avoir deux (figures 4.4 et 4.6). Ces bandes ou ces lignes dans les images sont formées par une série de sarcomères adjacents. La direction de la contraction musculaire ainsi que l'axe des filaments de myosine sont perpendiculaires à ces bandes. Bref, plus il y a de myofibrilles adjacentes dans une image, plus les lignes blanches qu'on y voit seront longues. Ceci explique la provenance de la structure périodique de lignes blanches observées dans les images.

L'intensité du signal GSH générée par le tissu imagé dépend de la polarisation du laser. Cela est bien illustré à l'aide des images et du graphique à la figure 4.5. Lorsque la polarisation est alignée avec l'axe des filaments épais, le signal GSH est très faible et atteint un minimum (figure

4.5b à 0° et 180°). Dans les images, le signal semble être maximal lorsque la polarisation est alignée à $\pm 45^\circ$ de l'axe des filaments épais. Lorsque la polarisation est perpendiculaire à l'axe des filaments, le signal atteint un minimum local (figure 4.5b à 90°) légèrement plus faible que la valeur maximale de signal. Des mesures plus précises du signal moyen dans l'image révèlent que le signal est maximal pour un angle entre la polarisation et les filaments d'environ $\pm 50^\circ$ comme le montre la figure 4.5b. Ce comportement peut être expliqué à l'aide du tenseur $\chi^{(2)}$ du tissu musculaire.

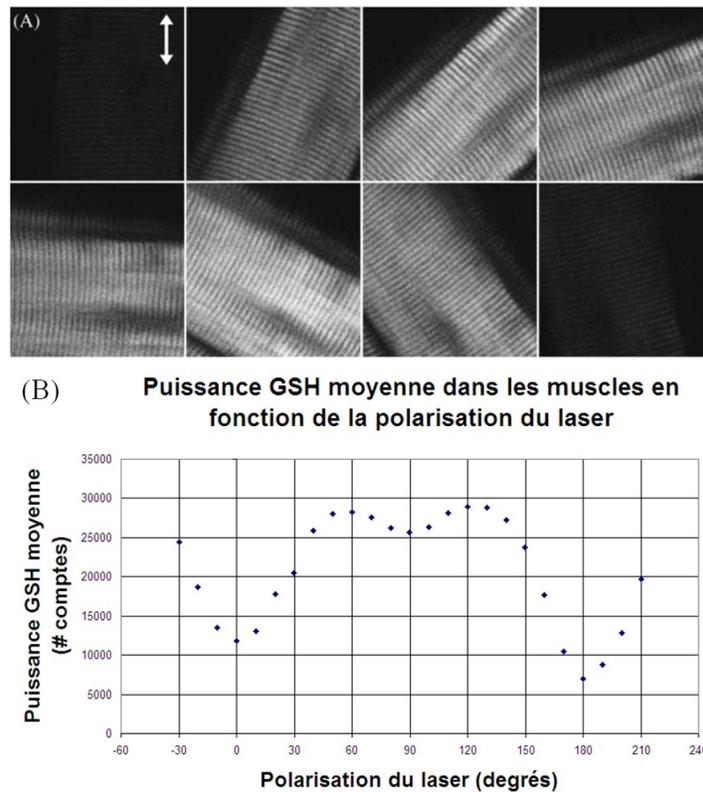


Figure 4.5

La figure (a) est tirée de [10 (voir figure 2)]. La figure (b) provient des mesures que nous avons prises en laboratoire sur les tissus musculaires qui ont été imagés par microscopie GSH interférométrique. (a) Images GSH d'un tissu musculaire. La contraction musculaire ainsi que l'axe des filaments de myosine sont perpendiculaires aux lignes blanches dans l'image qui sont formées de plusieurs sarcomères adjacents. La polarisation du champ électrique du laser oscille dans la direction de la double flèche blanche de la première image et le tissu a été tourné à différents angles dans les images. L'intensité du signal GSH généré par un tissu musculaire dépend donc de l'angle entre la polarisation du champ électrique du laser et la direction dans laquelle les filaments de myosine sont orientés. (b) Graphique du signal GSH moyen généré par un tissu musculaire en fonction de cet angle. Des courbes similaires ont été obtenues précédemment par plusieurs équipes de recherche différentes [10 (voir figure 4a)] [19 (voir figure 6)] [22 (voir figure 2b)] [23 (voir figure 6c)].

Le tenseur $\chi^{(2)}$ des tissus musculaires provient de l'hyperpolarisabilité des molécules de myosine. Les axes des molécules de myosine sont alignés parallèlement dans les filaments épais, mais la rotation des molécules sur leur axe n'arrive pas au même angle (figure 4.2b). Cela confère aux tissus musculaires une symétrie cylindrique C_∞ [10, 19, 22]. En tenant compte du fait que la condition de symétrie de Kleinman est respectée, ce qui fait en sorte que $d_{14} = d_{25} = 0$ et que $d_{15} = d_{31}$, le tenseur $\chi^{(2)}$ des tissus musculaires peut être représenté sous la forme suivante

$$\begin{bmatrix} P_x(2\omega) \\ P_y(2\omega) \\ P_z(2\omega) \end{bmatrix} = 2\varepsilon_0 \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x(\omega)^2 \\ E_y(\omega)^2 \\ E_z(\omega)^2 \\ 2E_y(\omega)E_z(\omega) \\ 2E_x(\omega)E_z(\omega) \\ 2E_x(\omega)E_y(\omega) \end{bmatrix}. \quad (4.1)$$

L'axe z correspond ici à l'axe des filaments. Pour une question de simplicité, on assume que la direction de propagation du laser est orientée le long de l'axe y et que la polarisation du laser oscille linéairement dans le plan xz . En s'en tenant au champ électrique d'un faisceau gaussien, cela donne deux équations qui décrivent la GSH dans les tissus musculaires.

$$P_x(2\omega) = 4\varepsilon_0 d_{15} E_x(\omega) E_z(\omega) \quad (4.2a)$$

$$P_y(2\omega) \approx 0 \quad (4.2b)$$

$$P_z(2\omega) = 2\varepsilon_0 (d_{31} E_x(\omega)^2 + d_{33} E_z(\omega)^2) \quad (4.2c)$$

Pour une polarisation linéaire où θ est l'angle entre la polarisation et l'axe des filaments (donc l'axe z), on a

$$E_x(\omega) = E(\omega) \sin(\theta) \quad (4.3a)$$

$$E_y(\omega) \approx 0 \quad (4.3b)$$

$$E_z(\omega) = E(\omega) \cos(\theta) \quad (4.3c)$$

ce qui permet de ramener les équations 4.2 à

$$P_x(2\omega) = 2\varepsilon_0 d_{15} \sin(2\theta) E(\omega)^2 \quad (4.4a)$$

$$P_z(2\omega) = 2\varepsilon_0 (d_{31} \sin^2(\theta) + d_{33} \cos^2(\theta)) E(\omega)^2 \quad (4.4b)$$

et de trouver finalement que

$$I_{GSH} \propto \left[d_{15}^2 \sin^2(2\theta) + (d_{31} \sin^2(\theta) + d_{33} \cos^2(\theta))^2 \right] E(\omega)^4. \quad (4.5)$$

La formule 4.5 est importante puisqu'elle est à l'origine de la forme de la courbe de la figure 4.5b qui décrit le phénomène de GSH dans les muscles. En principe, si la condition de symétrie de Kleinman est bien respectée, les coefficients d_{15} et d_{31} devraient être égaux. En pratique, les mesures prises dans les tissus musculaires semblent indiquer que c'est bel et bien le cas, puisque des rapports d_{31} / d_{15} obtenus sont compris entre 0,87 et 1,12 [10, 22]. Le coefficient d_{33} est différent des deux autres cependant. Les premiers résultats publiés du rapport $\rho = d_{33} / d_{31}$ lui donnent une valeur de 0,09 [10]. Celle-ci est beaucoup plus faible que ce qui a été rapporté par la suite, ce qui remet en question la validité de ce résultat. D'autres équipes ont trouvé des valeurs pour le rapport d_{33} / d_{31} comprises entre 0,38 et 0,7 [22], $0,6 \pm 0,2$ [22] et 0,56 [23]. Il semble donc que le rapport d_{33} / d_{31} pour les muscles soit d'environ 0,55. Cela explique d'ailleurs pourquoi le signal GSH est beaucoup plus faible lorsque la polarisation est alignée le long de l'axe des filaments de myosine.

En plus des mesures en polarisation de la GSH dans les muscles, le ratio de signal avant vs arrière a également été étudié [36]. Dans un tissu mince et en éliminant la contribution du signal avant réfléchi vers l'arrière, le signal GSH avant est approximativement 478 fois plus élevé que le signal arrière. Tout comme le ratio de signal GSH avant vs arrière dans un cristal uniforme, ce ratio est très élevé. Cette observation importante révèle que le $\chi^{(2)}$ est homogène dans les domaines non centrosymétriques du muscle. Cela concorde avec la structure du muscle, puisque les molécules de myosine pointent toutes dans la même direction dans un domaine et elles pointent toutes dans la direction opposée dans le domaine adjacent, de l'autre côté de la ligne M. Cet alignement crée donc des domaines avec un $\chi^{(2)}$ homogène qui favorise la génération de signal vers l'avant plutôt que vers l'arrière.

Voilà qui résume les propriétés du $\chi^{(2)}$ dans les muscles. Dans son ensemble, la structure du muscle et la GSH dans celui-ci sont bien comprises. La structure $\chi^{(2)}$ du tissu est connue et l'interprétation des images GSH des tissus musculaires est correcte. Les filaments épais de myosine des sarcomères adjacents apparaissent comme une ou parfois deux bandes de signal dans l'image et les filaments sont orientés perpendiculairement à ces bandes.

Il reste toutefois à expliquer pourquoi on observe parfois deux bandes de signal par sarcomère, plutôt qu'une seule, comme le montre la figure 4.6. Des recherches ont été effectuées pour répondre à cette question [23]. Celles-ci arrivent à plusieurs conclusions intéressantes. Tout d'abord, la bipolarité des filaments épais ne peut pas être la principale cause de la diminution du signal GSH à la ligne M. On pourrait croire qu'à la jonction des domaines $\chi^{(2)}$, il y aurait une interférence destructive du signal GSH qui causerait la séparation en deux bandes de signal. Mais la variation du $\chi^{(2)}$ a lieu sur une distance très courte et la résolution optique du microscope ne devrait pas être suffisante pour percevoir une variation importante dans le signal GSH. Si la bipolarité des filaments de myosine était responsable de cet effet, deux bandes de signal seraient toujours observées dans chaque sarcomère. Or, ce n'est pas le cas. La majorité du temps, une seule bande de signal par sarcomère est observée. Les effets d'interférences au centre des filaments épais doivent sans doute altérer le patron de radiation de la GSH à la ligne M, mais ils ne sont pas le principal responsable du dédoublement de la bande de signal.

Une explication alternative plus plausible à l'apparition de deux bandes de signal GSH par sarcomère serait la synthèse et la dégradation du tissu. Il a été montré que le signal GSH se dédouble en deux bandes durant la protéolyse des filaments de myosine [23]. Un tissu musculaire vivant se régénère continuellement et il serait donc normal de voir deux bandes de signal GSH dans certaines zones du tissu qui sont en dégradation ou en reconstruction. Il est également possible que le tissu se dégrade durant la préparation de l'échantillon ou durant le balayage du laser [24], ce qui pourrait être une autre explication de l'apparition de deux bandes de signal GSH. Une autre piste qui serait intéressante à étudier serait l'épaisseur du tissu. Le signal GSH est dédoublé en deux bandes dans une myofibrille isolée (figure 4.4), tandis qu'il ne forme généralement qu'une seule bande dans les tissus plus épais (figures 3.27, 4.5 et 4.6). L'accord de phase obtenu est peut-être différent en fonction de l'épaisseur du tissu ? Bref, bien que la GSH dans les tissus musculaires soit généralement bien comprise, la distribution du signal

GSH en une ou deux bandes dans les images obtenues reste une question qui mérite d'être explorée plus en détail.

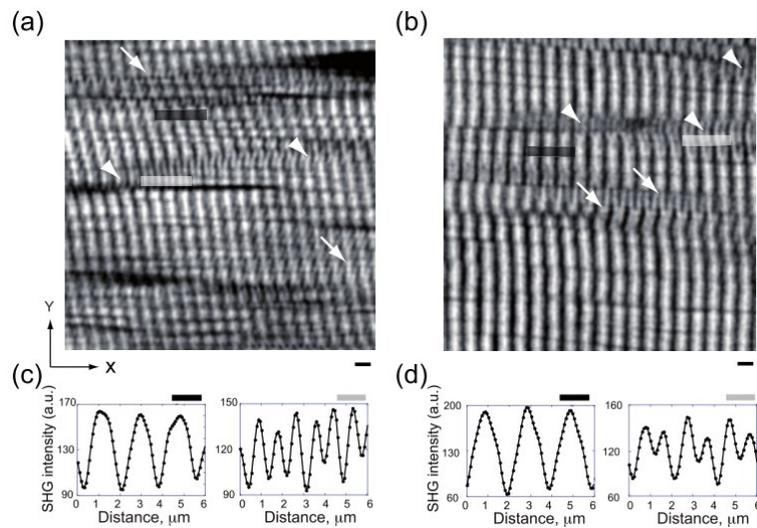


Figure 4.6 Cette figure est tirée de [23 (voir figure 2)]. (a-b) Images GSH du muscle gastrocnémien adulte chez (a) la grenouille xenopus et (b) le rat. Les images font $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ et les barres d'échelles correspondent à une distance de $2 \mu\text{m}$. Les flèches dans l'image montrent que certains sarcomères apparaissent en fourche ou avec deux bandes de signal plutôt qu'une seule. (c-d) Profils d'intensités du signal GSH. Les zones d'où ceux-ci proviennent sont encadrées d'un rectangle sombre ou clair dans les images. Un seul pic par sarcomère est observé dans les profils sombres tandis qu'il y en a deux dans les profils clairs. La résolution spatiale n'est pas suffisamment bonne pour distinguer individuellement les myofibrilles qui sont alignées horizontalement dans les images.

4.2 Tissus de collagène

Le collagène est une protéine structurale très importante qui compose les tissus conjonctifs. Chez les vertébrés, le collagène constitue environ le tiers de la masse des protéines qui composent un organisme [100]. Le tissu conjonctif est une famille qui regroupe un vaste ensemble de différents tissus. La présence d'une matrice extracellulaire, qui sépare les cellules dans le tissu conjonctif, est la principale caractéristique qui distingue celui-ci des autres familles de tissus biologiques, soit les tissus épithéliaux, musculaires et nerveux. La matrice extracellulaire du tissu conjonctif est formée d'un fluide visqueux appelé substance fondamentale et, dans la plupart des tissus conjonctifs, de fibres de collagène et de fibres élastiques. Différentes cellules spécialisées comme les fibroblastes vivent dans la matrice extracellulaire et l'entretiennent. Le collagène

forme des fibres qui contribuent à conférer les propriétés mécaniques dont les tissus ont besoin selon leur fonction. En général, les tissus conjonctifs jouent un rôle de soutien et servent à lier ou séparer les différents tissus dans un organisme, mais ils peuvent également avoir d'autres fonctions. Le tendon [9, 27, 36, 131], les ligaments, le fascia [36, 40, 131], la peau [4-6, 9, 130], les vaisseaux sanguins [132], la cornée [9, 136], le cartilage [41, 134], les os [18, 133] et la dentine [130] sont quelques exemples de tissu conjonctifs qui contiennent du collagène.

4.2.1 Types de collagène

À la base, la structure du collagène est composée de trois chaînes α qui forment une triple hélice. Toutefois, il existe en fait plusieurs types de collagène qui peuvent être classés dans différentes familles en fonction de leurs caractéristiques. À ce jour, 28 types différents ont été identifiés et séparés en 8 familles [142]. La composition spécifique des chaînes α varie selon les types de collagène et détermine leurs propriétés. Selon leurs fonctions, différents tissus seront donc composés de différents types de collagène. Il faut considérer que cette diversité de collagène est d'autant plus importante que plusieurs types de collagènes peuvent être mélangés ensemble dans un même tissu.

Étant donné la diversité de types de collagènes et la grande variété de tissus qui en contiennent, l'étude du collagène est un sujet de recherche assez vaste. Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons sur le collagène de type I. Celui-ci est de forme fibrillaire et est le plus répandu chez les vertébrés [100]. Le tendon et le fascia sont deux tissus très riches en collagène type I dans lesquels les fibrilles sont alignées parallèlement et, pour ces raisons, ils ont été choisis afin de servir de tissus imagés pour ce projet. Notez que le cartilage qui est composé de collagène de type II, qui est également de forme fibrillaire, est un autre tissu, plus complexe, qu'il serait intéressant d'étudier.

4.2.2 Structure et synthèse du collagène

Comme pour les tissus musculaires, la diffraction des rayons x et la microscopie électronique ont permis de découvrir la structure moléculaire du collagène et de voir comment celui-ci s'assemble et s'organise dans les tissus [25, 30]. La microscopie AFM, développée plus tard, est une autre

technique capable d'imager, à très haute résolution, les fibrilles de collagène dans les tissus [143]. La figure 4.7 montre bien la capacité d'imager les fibrilles individuelles avec la microscopie électronique et AFM. Une coupe transversale du tissu permet de compter individuellement chaque fibrille et de mesurer leur diamètre (figure 4.7a) [30, 73]. Une coupe longitudinale du tissu permet de voir la longueur et l'alignement des fibrilles ainsi que la période D de 67 nm dans le profil des fibrilles (figure 4.7b-c). Toutefois, pour bien comprendre le collagène, il est nécessaire de savoir comment celui-ci s'organise à tous les niveaux hiérarchiques.

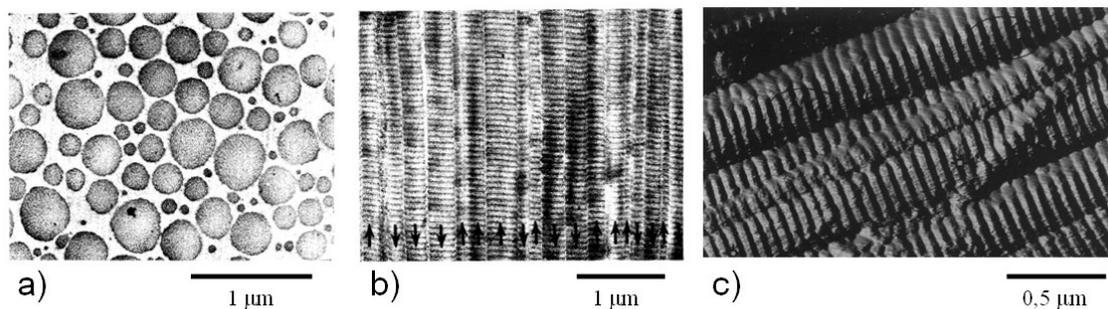


Figure 4.7 Les figures (a) et (b) sont tirées de [30 (voir figures 1 et 6)]. La figure (c) est tirée de [143 (voir figure 1)]. (a) Image prise en microscopie électronique d'une section transversale de tendon de queue de souris fixé et étiré. La section transversale de chaque fibrille est clairement visible. Celles-ci sont bien séparées et ont une forme circulaire de diamètre variable. (b) Image prise en microscopie électronique d'une section longitudinale de tendon de queue de souris fixé et étiré. Les bandes claires et sombres de période $D = 67$ nm sont bien visibles dans le profil des fibrilles. Les flèches indiquent la polarité des fibrilles. Celle-ci a un signe aléatoire entre les fibrilles adjacentes, mais elle reste la même sur toute la longueur d'une fibrille. (c) Image de $2,1 \mu\text{m} \times 1,3 \mu\text{m}$ prise en microscopie AFM d'une section longitudinale de tendon de queue de souris. Cette technique permet également de bien voir la période D à la surface des fibrilles.

Le niveau hiérarchique le plus bas du collagène est la chaîne α [142]. Cette chaîne d'approximativement 0,15 nm de diamètre est une suite d'environ 1055 acides aminés. La séquence d'acides aminés dans la chaîne, c'est-à-dire la structure primaire de la molécule, est représentée par la formule $[\text{Gly} - \text{X} - \text{Y}]_n$ où Gly désigne l'acide aminé glycine et où X - Y désigne deux autres acides aminés qui peuvent varier dans la séquence (voir figure 4.8a). Les acides aminés qu'on retrouve le plus souvent en X - Y sont proline et hydroxyproline, mais plusieurs autres acides aminés, comme alanine, glutamine, arginine ou encore lysine par exemple, peuvent occuper ces positions dans la séquence. Les chaînes α qui composent les différents types de collagène n'ont pas la même séquence d'acides aminés. La chaîne α est

enroulée sur elle-même en hélice gauche avec un pas de 0,84 nm. Cet enroulement correspond à la fois à la structure secondaire et tertiaire de la molécule (voir figure 4.8b). Finalement, trois chaînes α identiques ou différentes, selon le type de collagène, sont regroupées et enroulées ensemble en hélice droite avec un pas de 8,6 nm. L'acide aminé glycine se retrouve toujours près du centre de la triple hélice. Pour le collagène type I, la forme la plus courante de triple hélice est composée de deux chaînes α identiques et d'une troisième différente, mais il est également possible que les trois chaînes α soient identiques. Cette triple hélice de chaînes α correspond à la structure quaternaire de la molécule (voir figure 4.8c). La triple hélice forme donc une molécule d'environ 1,5 nm de diamètre et 300 nm de long appelée tropocollagène.

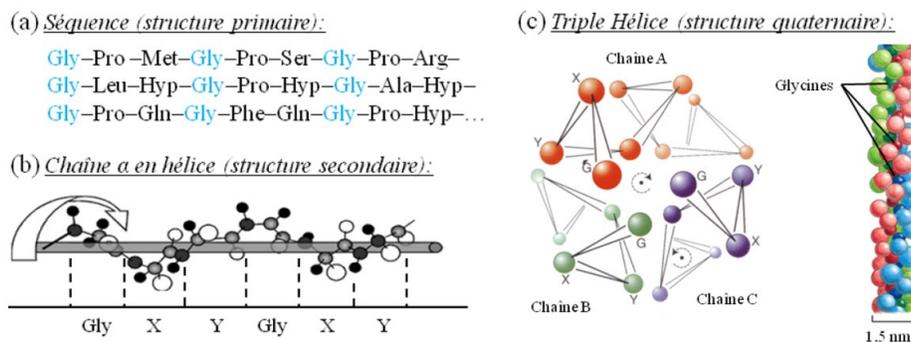


Figure 4.8 Cette figure est tirée de [142 (voir figure 1.2)]. Structure moléculaire du collagène (a) La séquence d'acides aminés des chaînes α correspond à la structure primaire de la protéine de collagène. À tous les trois résidus, on retrouve l'acide aminé glycine. (b) La chaîne α est enroulée sur elle-même en hélice gauche avec un pas de 0,84 nm, ce qui correspond à la fois à la structure secondaire et tertiaire de la protéine. (c) Finalement, trois chaînes α sont enroulées ensemble en triple hélice droite avec un pas de 8,6 nm, ce qui correspond à la structure quaternaire de la protéine. L'acide aminé glycine se retrouve toujours près du centre de la triple hélice.

Les molécules de tropocollagène servent de blocs de construction pour le prochain niveau hiérarchique. Ces molécules s'assemblent de façon autonome pour former la fibrille de collagène. L'assemblage du tropocollagène en fibrille minimise l'énergie en réduisant la quantité de solvant en contact avec la surface des protéines, ce qui explique pourquoi les fibrilles prennent une forme cylindrique et pourquoi ce processus a lieu spontanément [25]. En plus des interactions polaires, des liaisons hydrogènes et des liaisons covalentes de lysyl entre les protéines de tropocollagène permettent de stabiliser la structure de la fibrille, pour lui donner de la solidité et de la rigidité [142]. Le processus d'assemblage permet de former des fibrilles ayant un diamètre variable compris entre 10 nm et 500 nm (revoir figure 4.7a) et une longueur pouvant

aller jusqu'à plusieurs dizaines, voire même plusieurs centaines de microns [25, 30, 73]. Le diamètre d'une fibrille est généralement plus petit à ses extrémités qu'en son centre.

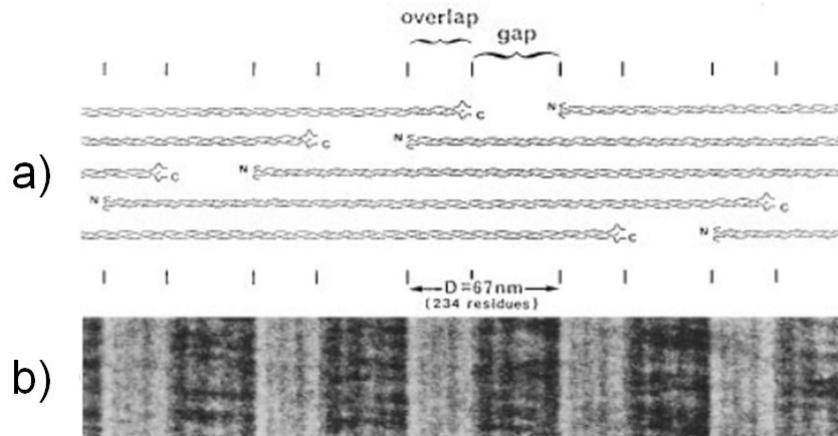


Figure 4.9 Cette figure est tirée de [25 (voir figure 1)]. (a) Représentation schématique de l'arrangement des molécules de tropocollagène dans une fibrille de collagène. (b) Image du profil d'une fibrille de collagène prise en microscopie électronique en utilisant une coloration négative comme technique de marquage. Dans les sections de la fibrille où il y a plus d'espace vide, une plus grande quantité de colorant s'accumule, ce qui fait qu'elles apparaissent plus sombres dans l'image. Cette structure dans la fibrille explique la série de bandes claires et sombres observées dans l'image qui se répète avec une période D de 67 nm (234 résidus).

Les fibrilles prennent donc la forme de très longs cylindres formés de protéines de tropocollagène. Il est possible d'observer en microscopie électronique ou AFM un motif périodique de bandes claires et sombres qui se répète à tous les 67 nm le long de la surface des fibrilles (figures 4.7b-c et 4.9b). Cette particularité des fibrilles de collagène est causée directement par les propriétés d'assemblage du tropocollagène. À tous les 234 résidus dans la chaîne α , il y a une accumulation de résidus polaires qui servent de points d'attaches entre les molécules de tropocollagène adjacentes [25, 142, 144]. Rappelons qu'une molécule de tropocollagène comprend environ 1055 résidus par chaîne α et mesure 300 nm. Par règle de trois, un segment de 234 résidus dans une chaîne α correspond donc à une distance d'approximativement 67 nm. Cette distance qui apparaît périodiquement dans les fibrilles est aussi appelée la période D. Une molécule de tropocollagène mesure approximativement 4,48 fois la période D. Comme le montre la figure 4.9a, il se forme donc un vide entre les molécules de tropocollagène consécutives. La présence de ce vide est due au fait que la longueur des molécules n'est pas un multiple entier de la distance entre les points d'attaches sur celles-ci. Ces

vides entre les molécules consécutives créent une variation subite et périodique du nombre de molécules contenues dans la section de la fibrille de collagène, ce qui entraîne une variation, également subite et périodique, du diamètre de celle-ci. Puisque la molécule de tropocollagène mesure approximativement 4,48 fois la période D , la largeur des zones où il y a plus d'espaces vides est à peu près égale à la largeur des zones où il y a plus de chevauchement entre les molécules adjacentes. Cette fluctuation du diamètre des fibrilles apparaît sous forme de bandes claires et sombres de largeur similaires dans les images prises en microscopie électronique ou AFM (voir figures 4.7b-c et 4.9b). Elle facilite également l'emboîtement des fibrilles dans les tissus, de manière similaire à l'emboîtement des filets de deux boulons adjacents qui seraient mis en contact l'un contre l'autre. Cela contribue à donner une bonne résistance mécanique à la traction aux structures de collagène dans les tissus.

Les fibrilles de collagène servent de bloc pour la construction du prochain niveau hiérarchique, soit les tissus. Elles sont regroupées ensemble pour former différentes structures macroscopiques. La forme de ces structures dépend du tissu et des propriétés que celui-ci doit avoir pour bien remplir sa fonction. En effet, l'arrangement des fibrilles dans un tissu affecte grandement sa résistance mécanique, son élasticité, sa transparence, etc... Les fibrilles forment donc généralement des fibres de collagène, plus grosses et plus longues que les fibrilles individuelles, qui sont regroupées en structures plus grandes comme des feuillets ou des faisceaux de fibres. L'orientation des nombreuses fibres de collagène dans un tissu affecte aussi ses propriétés. Par exemple, dans la cornée, les fibrilles de collagènes, très petites, sont assemblées directement en lamelles empilées les unes sur les autres pour que le tissu soit transparent [136, 142]. Dans la peau, les fibres forment un genre de spaghetti qui lui confère une certaine souplesse, mais organisé dans une direction préférentielle généralement reliée à celle des muscles que la peau recouvre. Dans le tendon, les fibres sont fortement alignées dans la même direction et forment de larges faisceaux, ce qui rend le tissu rigide et très résistant à la traction [142]. Dans le fascia, une mince couche de tissu formée de fibrilles de collagène qui recouvre les tissus musculaires, les fibrilles sont également fortement alignées et forment de minces feuillets disposés côte-à-côte sur la surface du muscle. Dans le cartilage, les fibrilles ne se regroupent pas en fibres, à moins que le tissu ne soit malade [134], et forment des structures en feuillets dans lesquels les fibrilles forment un genre de filet [135].

Pour récapituler, le collagène est très organisé à tous ses niveaux hiérarchiques et cette organisation détermine les diverses fonctions et propriétés du tissu ou de l'organe qu'il compose. Comme le rappelle la figure 4.10, les chaînes α sont enroulées en triples hélices pour former le tropocollagène, les molécules de tropocollagène s'assemblent en fibrilles de diamètre et de longueur variable et les fibrilles forment différentes structures à l'échelle micrométrique dans les tissus comme les fibres de collagène. Comme il sera expliqué dans la prochaine section, la compréhension de la structuration du collagène à ses différents niveaux hiérarchiques est absolument nécessaire pour être en mesure de bien comprendre ses propriétés optiques non linéaires.

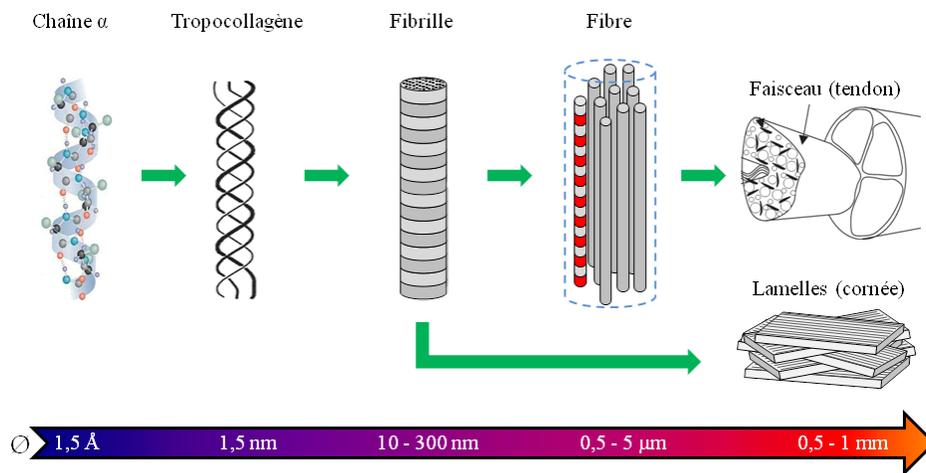


Figure 4.10 Cette figure est tirée de [142 (voir figure 1.5)]. Schématisation des différents niveaux hiérarchiques de la structure du collagène fibrillaire. À l'échelle nanométrique, trois chaînes α s'enroulent en triple hélice pour former le tropocollagène. À l'échelle micrométrique, les molécules de tropocollagène s'assemblent pour former la fibrille de collagène. Plusieurs fibrilles peuvent être regroupées pour former des fibres de collagène. Finalement, à l'échelle du tissu, les fibrilles et les fibres forment des structures plus grosses comme des faisceaux, des feuillets ou des lamelles.

Le collagène est synthétisé par les cellules appelées fibroblastes [25, 142]. Les chaînes α sont synthétisées par les ribosomes à la surface du réticulum endoplasmique. Après y avoir subi quelques transformations, les chaînes α y sont assemblées en triple hélice pour former le procollagène. Celui-ci se distingue du tropocollagène par la présence de terminaisons propeptides aux deux extrémités de la triple hélice. Ces terminaisons empêchent le processus d'auto-assemblage du collagène en fibrilles, ce qui est nécessaire tant que les protéines de collagène se trouvent encore dans la cellule. Le procollagène est ensuite emballé dans des

vésicules par l'appareil de Golgi pour être acheminé à l'extérieur de la cellule. Une fois à l'extérieur, les terminaisons propeptides C et N aux deux extrémités du procollagène sont coupées pour former le tropocollagène et le processus d'auto-assemblage en fibrilles débute. Ce processus de synthèse est illustré à la figure 4.11. Comme expliqué précédemment, les fibrilles de collagènes peuvent ensuite être organisées pour former différentes structures dans les tissus, selon leurs fonctions.

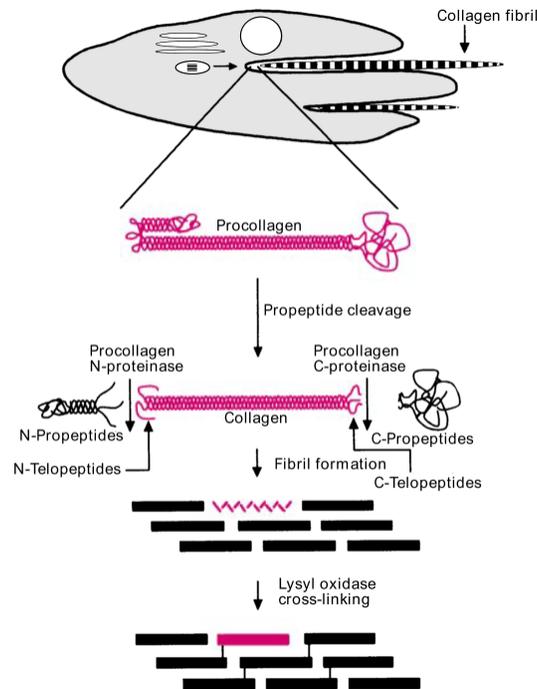


Figure 4.11 Cette figure est tirée de [25 (voir figure 2)]. Processus d'assemblage in vivo des fibrilles de collagène par les cellules fibroblastes. La synthèse des triples hélices de procollagène a lieu à l'intérieur de la cellule. Le procollagène est ensuite acheminé dans des vésicules vers l'extérieur de la cellule pour la formation des fibrilles. Une fois à l'extérieur, les terminaisons propeptides C et N du procollagène sont coupées pour former le tropocollagène et permettre l'auto-assemblage en fibrilles. Lors de cet auto-assemblage, des liaisons covalentes de lysyl entre les protéines de tropocollagène permettent de stabiliser la structure de la fibrille.

Le dernier aspect important à expliquer, avant d'aborder la GSH dans le collagène, est la polarité des fibrilles. Les protéines de procollagène et de tropocollagène ont une polarité qui pointe le long de leur axe [25, 30, 33]. L'extrémité amino-terminale d'une molécule, aussi surnommée extrémité N, est le pôle positif de la molécule, tandis que l'extrémité carboxyl-terminale, aussi surnommée extrémité C, est le pôle négatif (figures 4.11 et 4.12). La structure et l'orientation des liaisons dans la triple hélice de chaînes α est directement responsable de l'origine de cette

polarité. Il en est de même pour les propriétés optiques non linéaires, la piézoélectricité et la pyroélectricité du collagène.

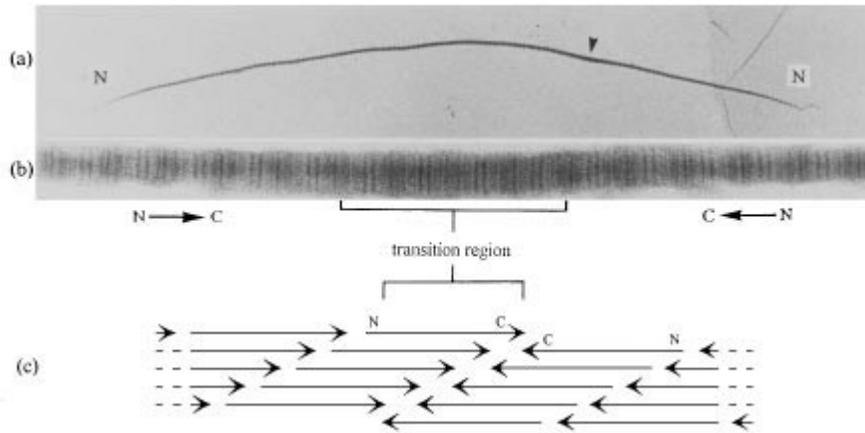


Figure 4.12 Cette figure est tirée de [25 (voir figure 4)]. Image d'une fibrille de collagène bipolaire en microscopie électronique à transmission en utilisant une coloration positive comme technique de marquage. La fibrille provient d'un tendon du métatarse d'un embryon de poulet à 18 jours. (a) La fibrille de collagène mesure $10,5 \mu\text{m}$ et sa polarité s'inverse à un seul endroit, indiqué par la tête de flèche dans l'image, soit à $3,5 \mu\text{m}$ de l'une des extrémités de la fibre. (b) Agrandissement de l'image à l'endroit où l'inversion de polarité des molécules de tropocollagène a lieu dans la fibrille. La région de transition mesure approximativement quatre périodes D soit environ la longueur d'une molécule de tropocollagène. Dans cette région, le motif périodique à la surface de la fibrille de collagène est différent, ce qui permet de la localiser dans l'image. (c) L'analyse du motif dans la région de transition de l'image indique que la polarité des molécules de tropocollagène s'inverse dans la fibrille pour former une jonction C-C, comme le montre ce schéma.

Dans une fibrille de collagène, les molécules de tropocollagène s'assemblent avec leurs dipôles qui pointent dans la même direction. Il est possible qu'il y ait une jonction C-C dans la fibrille résultant en une fibrille bipolaire avec deux extrémités N [25, 33]. Toutefois, aucune jonction N-N dans la fibrille n'a été observée jusqu'à ce jour [25, 33]. L'absence de jonction N-N dans les fibrilles de collagène fait en sorte que les dipôles de tropocollagène ne s'annuleront pas, puisque deux dipôles consécutifs ou adjacents doivent nécessairement pointer dans la même direction. La seule exception à cette règle est à une jonction C-C, mais celle-ci ne peut se produire qu'à un seul endroit dans la fibrille, puisqu'il ne peut y avoir de jonction N-N. La polarité est donc maintenue sur toute la longueur de la fibrille si celle-ci est unipolaire ou encore jusqu'à la jonction C-C, lorsque la fibrille est bipolaire. L'absence de jonction N-N garantit donc que les propriétés non centrosymétriques du tropocollagène à l'échelle nanoscopique sont également présentes à l'échelle microscopique dans les fibrilles [142]. Cette propriété est évidemment

fondamentale pour la GSH dans le collagène. Comme illustré à la figure 4.12, la jonction C-C d'une fibrille, s'il y en a une, peut être trouvée en microscopie électronique. Les mesures en microscopie à force piézoélectrique dans le collagène prouvent également que la polarité et les propriétés non centrosymétriques du collagène sont maintenues le long d'une fibrille [31, 32].

4.2.3 GSH dans les tissus de collagène

Les collagènes fibrillaires type I et type II sont en mesure de générer un fort signal GSH grâce à leur structure polaire. Comme le rappelle la figure 4.13, la microscopie GSH permet d'obtenir des images montrant l'organisation du collagène fibrillaire à l'échelle micrométrique dans les tissus conjonctifs à partir d'un signal endogène, donc sans marquage. Puisque cette technique permet de déterminer l'orientation des fibres de collagène dans les tissus et pour sensiblement les mêmes raisons qu'elle est utile pour l'imagerie des tissus musculaires, la microscopie GSH reste une technique fort intéressante pour l'imagerie des tissus riches en collagène.

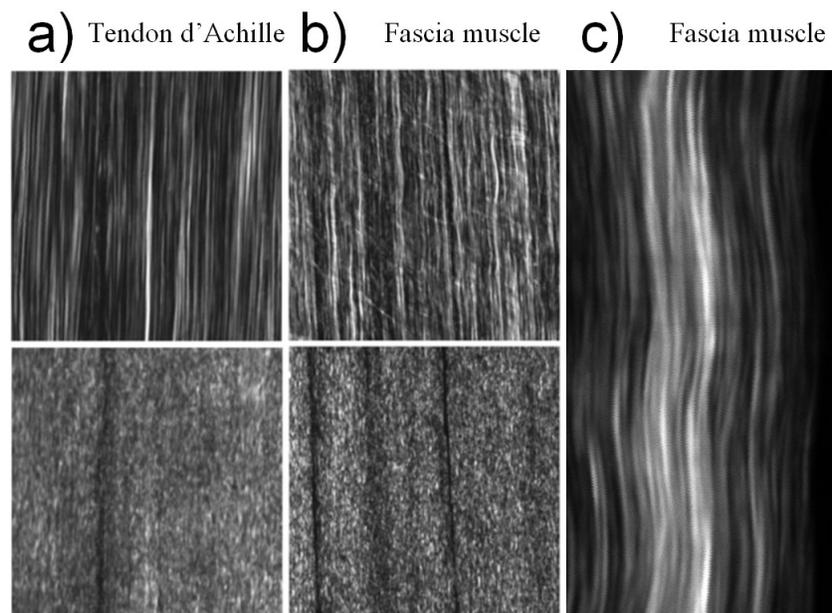


Figure 4.13 Les figures (a) et (b) sont tirées de [36 (voir figures 2a-b et 3a-b)]. La figure (c) est tirée de [40 (voir figure 3a)]. Images GSH du signal avant (haut) et arrière (bas) de différents tissus riches en collagène. (a) Tendon d'Achille $67 \mu\text{m} \times 67 \mu\text{m}$. (b) Fascia du muscle $92 \mu\text{m} \times 92 \mu\text{m}$. (c) Fascia du muscle (signal avant seulement) $20 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$.

Les détails de l'origine du signal GSH dans le collagène sont restés un mystère durant longtemps [26]. Plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant pour tenter d'expliquer le phénomène. Il a rapidement été établi que les fibrilles de collagène sont les structures non centrosymétriques responsables du $\chi^{(2)}$ dans les tissus. Comme pour les tissus musculaires, la configuration en hélice des molécules fait en sorte que le tenseur $\chi^{(2)}$ du collagène a une symétrie cylindrique C_∞ [101]. Les équations 4.1 à 4.5 s'appliquent donc toutes également au collagène. Dans ce cas, l'angle θ fait référence à l'angle entre la polarisation et l'axe des fibrilles (qui correspond à l'axe z). Il est très important de souligner que les coefficients d_{il} non nuls du collagène sont toutefois différents de ceux des tissus musculaires. La plupart des modèles s'entendent sur le fait que la condition de symétrie de Kleinman est respectée dans le collagène [22, 26, 27, 35, 101, 142, 145, 146], même si d'autres modèles n'arrivent pas à cette même conclusion [41]. Dans le cadre de cette thèse et puisque les longueurs d'ondes utilisées pour la GSH sont éloignées de la première bande d'absorption du collagène, qui se trouve dans l'ultraviolet [145], nous assumerons également que la condition de symétrie de Kleinman est respectée dans le collagène. Comme dans les tissus musculaires, cela veut donc dire que $d_{14} = d_{25} = 0$ et que $d_{15} = d_{31}$.

Des mesures en polarisation de la GSH dans le collagène ont été effectuées pour caractériser son $\chi^{(2)}$. La figure 4.14 montre la dépendance en polarisation du signal GSH en fonction de l'angle entre la polarisation du laser et l'axe des fibrilles. Il s'agit de la même mesure que celle présentée à la figure 4.5, mais pour le collagène plutôt que pour le tissu musculaire. La forme de la courbe est cependant différente, car le rapport $\rho = d_{33} / d_{31}$ dans le collagène n'est pas le même que dans les muscles. Le signal GSH est plus fort lorsque la polarisation du laser est parallèle à l'axe de la fibrille, plutôt que perpendiculaire à celui-ci. Plusieurs études ont trouvées différents ratios ρ pour le collagène. La première valeur de ρ trouvée dans le tendon de queue de souris était de 1,3 [101], mais la même équipe a également mesuré une valeur de 1,8 dans d'autres tissus de collagène par la suite [26]. Des valeurs comprises entre 1,4 et 1,5 ont ensuite été obtenues en microscopie GSH [22, 27]. Récemment, une équipe française a trouvé une valeur de 1,36 dans les tendons [146], tandis qu'une équipe canadienne a mesuré une valeur de 1,8 dans un tissu de collagène provenant des poumons [35]. Cette dernière équipe a également proposé un modèle très élaboré pour lequel l'angle entre les molécules de tropocollagène et l'axe de la fibrille affecterait la valeur de ρ . Ce modèle calcule une valeur de ρ comprise entre 1,3 et 1,9 pour les fibrilles de collagène en général et de 1,34 à 1,47 pour les fibrilles de collagène dans lesquels cet

angle serait nul, comme celles qu'on retrouve dans le tendon. Bref, il y a une certaine incertitude sur la valeur exacte de ρ dans le collagène, mais, en général, celle-ci semble être près de 1,4 [142]. Cette valeur explique d'ailleurs pourquoi le signal GSH est plus faible lorsque la polarisation est perpendiculaire à l'axe des fibrilles de collagène.

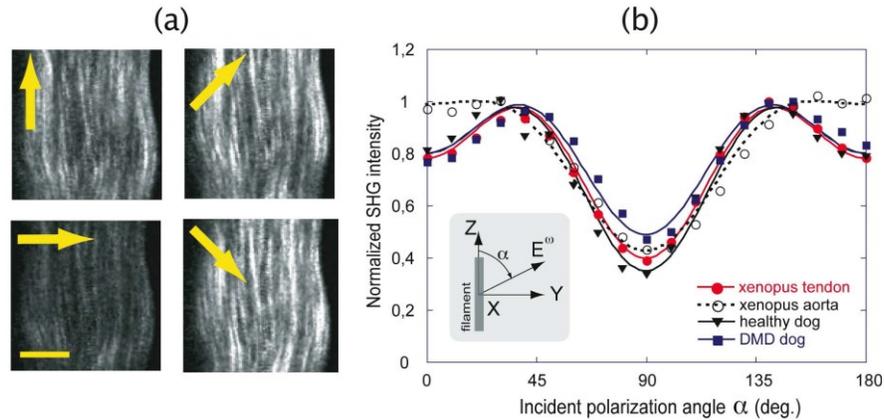


Figure 4.14 Cette figure est tirée de [22 (voir figure 3)]. (a) Images GSH d'une même région d'un tendon de grenouille xenopus adulte. Les fibrilles de collagène sont alignées à peu près à la verticale dans les images. La polarisation du laser est indiquée par les flèches jaunes dans les quatre images (0°, 45°, 90° et 135°). La barre d'échelle correspond à une distance de 10 μm . (b) Graphique du signal GSH moyen généré par des tissus de collagène en fonction de l'angle entre la polarisation du champ électrique du laser et la direction dans laquelle les fibrilles sont orientées. Ces courbes ont été obtenues avec le collagène du tendon et de l'aorte d'une grenouille xenopus adulte, ainsi que celui des tissus d'un chien en santé et d'un chien atteint de dystrophie musculaire de Duchenne. Des courbes similaires ont également été obtenues par d'autres équipes de recherche [101 (voir figure 2)] [41 (voir figure 5)].

Les images du signal GSH arrière obtenues et l'étude du ratio de signal avant vs arrière dans les tissus de collagène donnent des résultats surprenants [36, 131]. Dans un tissu mince et en éliminant la contribution du signal avant réfléchi vers l'arrière, le signal GSH avant n'est que 4,2 fois plus élevé que le signal arrière dans le fascia, tandis qu'il n'est que 25 fois plus élevé dans le tendon. Cet écart est très faible et ne correspond pas du tout au ratio élevé qui est observé dans un matériau ayant un $\chi^{(2)}$ homogène, comme dans un cristal de quartz ou dans les tissus musculaires. Cette observation est un indice important qui suggère que la structure du $\chi^{(2)}$ des tissus de collagène est hétérogène.

On constate également que les structures qui apparaissent dans les images provenant des signaux avant et arrière d'une même zone ne sont pas les mêmes. Comme le montre la figure 4.15, de longues et fines structures espacées les unes des autres sont visibles dans l'image du signal avant.

Le signal varie peu et lentement dans la direction de l'axe des fibrilles, mais varie très brusquement et avec une grande amplitude dans la direction perpendiculaire à celle-ci. Les images obtenues avec le signal arrière montrent des structures bien différentes. Le signal semble osciller autour d'une valeur moyenne partout où il y a du collagène et, au coeur des feuillets de collagène, il n'y a pas d'endroit où il semble nul ou très faible. Les deux lignes sombres horizontales dans l'image 4.15b correspondent aux frontières entre les feuillets de collagène du fascia. Les quelques variations du signal arrière sont à peu près aussi importantes dans les directions parallèle et perpendiculaire aux fibrilles. Ces variations sont un peu plus brusques dans la direction perpendiculaire, ce qui permet tout de même d'identifier la direction des fibrilles dans l'image du signal arrière. Le même phénomène est apparent dans les images de la figure 4.13. Pour expliquer qu'on obtienne des structures aussi différentes dans les images avant et arrière, les mécanismes d'accord de phase pour la GSH avant et arrière dans les tissus de collagène doivent être différents. Bref, en plus du ratio de signal avant vs arrière très faible, la différence entre les images avant et arrière est un autre élément qui indique que la structure du $\chi^{(2)}$ des tissus de collagène est hétérogène.

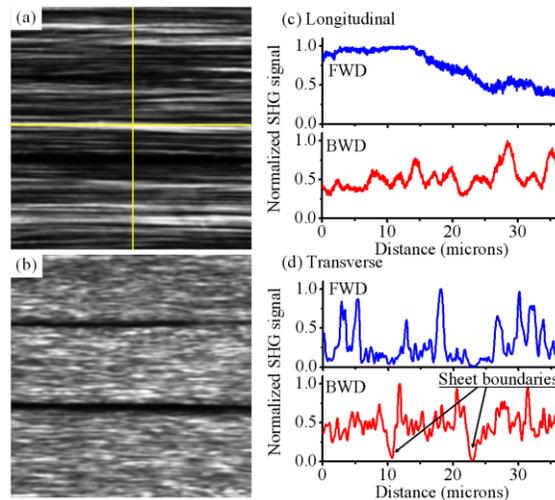


Figure 4.15 Cette figure est tirée de [40 (voir figure 2)]. Images GSH $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ d'un tissu de fascia formé de feuillets de fibrilles de collagène. (a) Image obtenue avec le signal GSH avant. (b) Image obtenue avec le signal GSH arrière, sans contribution de signal avant réfléchi ou rétrodiffusé vers l'arrière. (c-d) Profils des signaux pour les deux images dans (c) la direction longitudinale, donc parallèle à l'axe des fibrilles et (d) la direction transverse, donc perpendiculaire à l'axe des fibrilles. Les profils avant (FWD) et arrière (BWD) ont été pris le long des lignes horizontale et verticale marquées en jaune dans l'image (a). Les frontières entre les feuillets de collagène apparaissent clairement là où le signal est nul dans l'image du signal arrière. Les différences entre les deux images et les profils indiquent que la structure du $\chi^{(2)}$ est hétérogène dans les tissus de collagène.

4.2.4 Hypothèses de l'interprétation des images GSH du collagène

En faisant l'interprétation des images GSH de tissus de collagène (voir les images du signal avant des figures 4.13 et 4.15), il est tentant, à première vue, de penser que les longues structures fines et espacées les unes des autres soient des fibres ou même des fibrilles de collagène individuelles. Toutefois, cette interprétation des images, qui semble logique, est gravement incorrecte. Elle est d'ailleurs en partie responsable du fait que l'explication de l'origine de la GSH dans les tissus de collagène reste un sujet mal compris, qui est encore débattu aujourd'hui. Plusieurs éléments prouvent que les structures observées dans ces images ne sont pas des fibrilles individuelles. Tout d'abord, la microscopie GSH n'offre pas une assez bonne résolution spatiale pour discerner une fibrille de collagène individuellement des autres qui l'entourent dans un tissu. Il est donc improbable que les structures observées dans les images de signal GSH avant soient des fibrilles individuelles. De plus, les images obtenues en microscopie électronique et AFM (voir figure 4.7) démontrent que les fibrilles sont très densément regroupées ensemble. D'ailleurs, les images GSH du signal arrière et les images CARS dans les tissus de collagène le montrent également [38]. Si les structures dans les images GSH étaient des fibrilles individuelles, elles ne seraient pas aussi espacées les unes des autres. Il faut donc trouver une autre explication qui soit une interprétation correcte des images GSH dans les tissus de collagène, puisque les structures qui ressemblent à des fibres ou des fibrilles individuelles dans les images GSH du signal avant n'en sont tout simplement pas. Celles-ci doivent apparaître à cause d'un mécanisme d'accord de phase bien particulier qui est propre aux tissus de collagène.

La première hypothèse pour expliquer l'origine du signal GSH dans les tissus de collagène, afin d'interpréter correctement les images, a été suggérée assez tôt par Isaac Freund [26] et a été reprise et défendue plus tard par Patrick Stoller [27]. Selon cette hypothèse, les fibrilles de collagène sont alignées parallèlement les unes aux autres, mais leur polarité aléatoire créerait des zones dans le tissu où le signal GSH interfère constructivement ou destructivement en fonction du ratio de fibrilles ayant des polarités opposées. Ce concept est illustré à la figure 4.16. Lorsque la polarité des fibrilles adjacentes pointe dans la même direction, leur signal GSH interfère constructivement, tandis que lorsque leur polarité pointe dans des directions opposées, leur signal GSH interfère destructivement. Cette hypothèse est fondée sur les mesures prises en microscopie électronique qui démontrent que les fibrilles de collagène ont une polarité aléatoire [25, 30]. Les

fibrilles de polarité aléatoire dans les tissus de collagène forment donc une structure non centrosymétrique hétérogène et complexe qui serait responsable des modulations du signal qui sont présentes dans les images GSH.

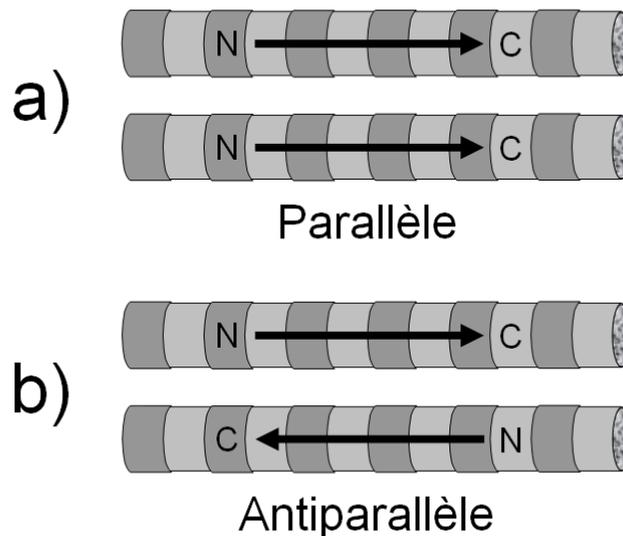


Figure 4.16 Cette figure est inspirée de [27 (voir figure 2)]. (a) Lorsque les polarités de fibrilles adjacentes pointent dans la même direction, la contribution des dipôles des fibrilles sera en phase et il y aura interférence constructive du signal GSH qu'elles génèrent. Le signal GSH sera donc plus important. (b) Inversement, lorsque les polarités de fibrilles adjacentes pointent dans des directions opposées, il y aura interférence destructive du signal GSH et celui-ci sera beaucoup plus faible.

Cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi le signal semble si faible à certains endroits et si fort à d'autres dans les images du signal avant. Selon la position du volume focal dans le tissu, le ratio de fibrilles ayant une polarité $\pm\chi^{(2)}$ change et, du même coup, la quantité de signal GSH générée aussi. C'est pour cette raison que l'on observe de longues et fines structures espacées dans les images du signal avant. Ces structures sont des zones où plus de fibrilles partagent la même polarité, tandis que les endroits où le signal est faible sont des zones où, en moyenne, le nombre de fibrilles adjacentes ayant des polarités opposées est à peu près égal. Ce modèle n'explique pas en détail pourquoi le ratio de signal avant vs arrière est si faible, mais la structure hétérogène du $\chi^{(2)}$ crée sans doute des interfaces entre les fibrilles qui favorisent la génération de signal vers l'arrière. De plus, la génération de signal vers l'avant doit être moindre, en moyenne, que dans une structure ayant un $\chi^{(2)}$ homogène à cause de la polarité aléatoire des fibrilles, ce qui

expliquerait un ratio de signal avant vs arrière plus faible que dans un matériau homogène. Cette hypothèse soulève cependant un doute. Comme première intuition, on s'attendrait à ce que le signal GSH généré par un tissu formé de fibrilles de collagène ayant une polarité aléatoire soit très faible, voir nul, à cause des effets d'interférence destructive obtenus dans une telle structure. Or, le signal GSH généré par le collagène peut être assez important. Il n'est donc pas évident que celle-ci soit exactement la bonne hypothèse, ou encore la seule explication. C'est sans doute cet argument qui a poussé l'élaboration d'une seconde hypothèse.

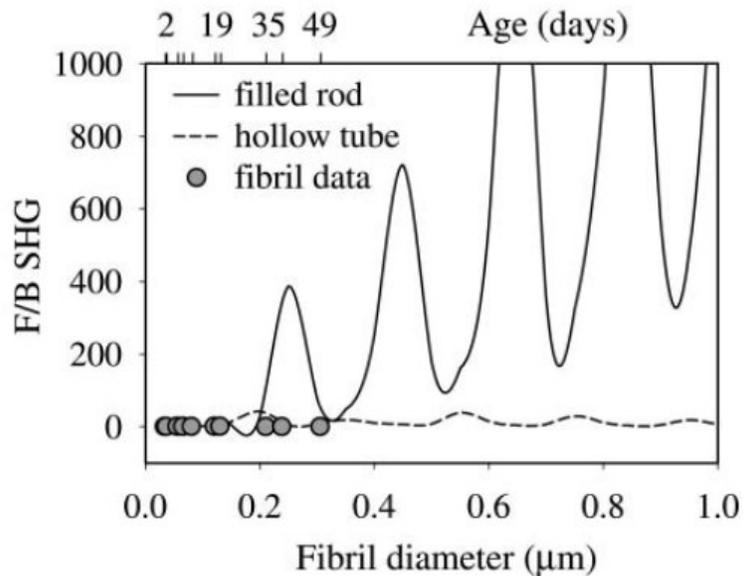


Figure 4.17 Cette figure est tirée de [28 (voir figure 3c)]. Modèle du ratio de signal GSH avant vs arrière d'une fibrille de collagène en fonction de son diamètre. Celle-ci est au centre du volume focal d'un laser. Si le $\chi^{(2)}$ est homogène dans la fibrille, ce ratio suivra la courbe pleine. Toutefois, si le $\chi^{(2)}$ est distribué seulement à la surface de la fibrille (sur une épaisseur inférieure à $\lambda_{2\omega}/10$), on obtient alors un cylindre et le ratio de signal GSH avant vs arrière suivra la courbe en tirets. Le ratio de signal GSH avant vs arrière obtenu dans des tissus d'âges différents, donc formés de fibrilles ayant des diamètres moyens différents, est représenté par des cercles dans le graphique. Celui-ci reste faible et correspond donc davantage au ratio obtenu si les fibrilles avaient une distribution de $\chi^{(2)}$ en cylindre creux plutôt qu'une distribution uniforme dans les fibrilles.

La seconde hypothèse a été suggérée par Rebecca M. Williams, Warren R. Zipfel et Watt W. Webb [28] et a été reprise ou citée plus tard dans plusieurs travaux sur la GSH dans les tissus de collagène [19, 29, 38]. Cette hypothèse est également en accord avec le fait que les fibrilles de collagène sont alignées parallèlement les unes aux autres dans les tissus, mais elle met de côté le fait que les fibrilles aient une polarité aléatoire et avance que la non centrosymétrie des fibrilles est localisée seulement à leur surface. Cette hypothèse soutient donc que les dipôles non

centrosymétriques forment une couche d'épaisseur $\approx \lambda_{GSH}/10$ à la surface des fibrilles, ce qui donnerait des structures $\chi^{(2)}$ en forme de cylindres creux dans les tissus. Cette structure non centrosymétrique complexe et hétérogène expliquerait le ratio de signal avant vs arrière anormalement faible dans les tissus de collagène. Ce concept est illustré à la figure 4.17. Si la distribution du $\chi^{(2)}$ dans les fibrilles a bel et bien la forme d'un cylindre creux, le ratio de signal avant vs arrière dans un tel tissu ressemblera à celui obtenu à une interface mince [113], comme illustré précédemment à la figure 3.13b, et le ratio de signal avant vs arrière sera très faible. Cette hypothèse soulève cependant plusieurs doutes. Tout d'abord, elle n'explique pas bien les modulations de signal dans les images GSH du signal avant. De plus, elle ignore le fait que les fibrilles de collagène ont une polarité aléatoire. Cela permet de contourner le problème rencontré avec la première hypothèse, soit les effets d'interférences destructives, qui devraient annuler le signal GSH avant dans un tissu où les fibrilles ont une polarité parfaitement aléatoire. Mais cela fait en sorte que cette nouvelle hypothèse entre en contradiction avec les mesures en microscopie électronique qui démontrent la polarité aléatoire des fibrilles dans les tissus de collagène. Finalement, la supposition que le $\chi^{(2)}$ soit distribué uniquement en surface des fibrilles et que leur centre ait un $\chi^{(2)}$ nul reste purement hypothétique et doit être vérifiée.

Cela résume donc les deux hypothèses pour expliquer le phénomène de GSH dans les tissus de collagène. Notons qu'il en existe une autre, dérivée de la seconde, où les fibrilles sont considérées comme ayant un $\chi^{(2)}$ uniforme, mais où l'espace entre celles-ci affecterait l'accord de phase et expliquerait le faible ratio de signal avant vs arrière [37]. Cependant, nous nous concentrerons uniquement sur les deux principales dans le cadre de cette thèse.

4.2.5 Origine moléculaire du $\chi^{(2)}$ dans le collagène

Quelques années après la proposition de la seconde hypothèse pour l'interprétation des images GSH, l'origine moléculaire du $\chi^{(2)}$ dans le collagène a été découverte. Le tenseur $\chi^{(2)}$ du collagène doit nécessairement provenir de la somme vectorielle de l'hyperpolarisabilité d'un grand nombre de liaisons polaires contenues dans celui-ci, puisque son signal GSH est d'une grandeur considérable. Toutefois, identifier quelles liaisons contribuent au $\chi^{(2)}$ est loin d'être une tâche triviale vu la complexité de la molécule de tropocollagène. Une équipe de la Californie y est cependant parvenue en 2007, en utilisant une technique de spectroscopie vibrationnel en

génération de somme de fréquences [34]. Ils ont découvert que les liaisons polaires à l'origine du $\chi^{(2)}$ dans le collagène sont les groupes méthylène (CH_2) contenus dans les anneaux de pyrrolidine ($\text{C}_4\text{H}_9\text{N}$) et les liaisons peptidiques qui lient ensemble les acides aminés consécutifs dans une chaîne α . Bien que ces résultats restent qualitatifs, puisqu'ils ne donnent pas la réelle contribution de ces groupes à la grandeur du $\chi^{(2)}$, il s'agit d'une découverte importante. Celle-ci est aujourd'hui généralement acceptée et d'autres travaux théoriques de modélisation du $\chi^{(2)}$ du collagène arrivent aux mêmes conclusions [35, 41].

Les groupes méthylène (CH_2) forment des dipôles ayant une structure en "V" similaire à celle de la molécule d'eau. On retrouve trois groupes méthylène adjacents dans chaque anneau pyrrolidine ($\text{C}_4\text{H}_9\text{N}$) des résidus de proline. Les résidus d'hydroxyproline en contiennent deux à cause de l'atome d'oxygène additionnel. Ces anneaux pointent vers l'extérieur de la triple hélice, avec une orientation presque perpendiculaire à son axe. Cependant, cet écart (d'une orientation parfaitement perpendiculaire) fait en sorte qu'une composante de la polarité de tous les groupes méthylène des anneaux pyrrolidine de la triple hélice pointe dans une direction préférentielle par rapport à l'axe de celle-ci. Ces anneaux forment donc une structure non centrosymétrique dans les molécules de tropocollagène et ajoutent une contribution achirale au tenseur $\chi^{(2)}$ du collagène.

Les liaisons peptidiques ajoutent d'autres liaisons polaires qui contribuent au tenseur $\chi^{(2)}$ du collagène. La liaison peptidique a lieu entre la fonction carboxyle ($\text{C}(\text{O})\text{OH}$) d'un acide aminé et la fonction amine (NH_2 ou NH dans le cas particulier de proline) de celui auquel il se lie. Les atomes OH de la fonction carboxyle et un atome H de la fonction amine se détachent des acides aminés pour former une molécule d'eau et ceux-ci forment une liaison $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ (ou $\text{C}(\text{O})\text{N}$ dans le cas particulier de proline). Comme ces atomes ont des électronégativités différentes, cette liaison forme une structure polaire. Dans la molécule de tropocollagène, les liaisons peptidiques sont organisées de manière chirale dans la triple hélice (figure 4.8c). Elles forment une structure non centrosymétrique et apportent donc une contribution chirale et achirale au tenseur $\chi^{(2)}$ du collagène. La contribution achirale vient s'ajouter à celle des groupes méthylène. La contribution chirale signifierait que certains des éléments d_{14} , d_{25} et d_{36} du tenseur $\chi^{(2)}$ seraient peut-être non nuls, mais peu d'études ont été réalisées sur ce sujet car ces éléments du tenseur ne contribuent pas à la GSH lorsque le laser a une polarisation linéaire.

Bref, l'orientation de ces liaisons dans la structure du tropocollagène fait en sorte qu'en faisant l'addition des dipôles, il reste une composante polaire non nulle importante à l'échelle de la molécule, ce qui lui confère une hyperpolarisabilité non nulle. Le $\chi^{(2)}$ d'une fibrille de collagène provient donc de la somme des hyperpolarisabilités des molécules de tropocollagène qui la compose. Étant donné qu'elles sont toutes orientées dans le même sens dans la fibrille, sauf à une jonction C-C, s'il y en a une (revoir figure 4.12), la non centrosymétrie est conservée en passant de la molécule de tropocollagène à la fibrille et les hyperpolarisabilités du tropocollagène peuvent être tout simplement additionnées de façon scalaire pour déterminer celle de la fibrille. Les fibrilles ont toutefois une polarité aléatoire dans le tissu, ce qui forme une structure hétérogène dans laquelle chaque fibrille a un signe $\pm\chi^{(2)}$. Cela rend la modélisation du $\chi^{(2)}$ dans le tissu plus complexe, car sa valeur effective à un endroit donné dans celui-ci dépendra de la taille du volume focal, du nombre de fibrilles dans ce volume, de leur diamètre, du signe de leur polarité et de leur position.

Finalement, ces résultats sur l'origine moléculaire du $\chi^{(2)}$ dans le collagène sont en accord avec la première hypothèse, mais semblent être en contradiction avec la seconde. Puisque chaque molécule de tropocollagène dans la fibrille a une hyperpolarisabilité qui contribue au $\chi^{(2)}$, celui-ci devrait être uniforme partout dans la fibrille et ne pourrait donc pas être localisé uniquement à sa surface.

4.2.6 Structure piézoélectrique du collagène

Puisque le collagène a un $\chi^{(2)}$ non nul, il a également des propriétés piézoélectriques. Les fibrilles de collagène sont donc d'excellentes candidates pour être étudiées en microscopie à force piézoélectrique. Cette technique permet de mettre en évidence la structure non centrosymétrique dans un matériau à l'échelle nanométrique, ce qui est très intéressant puisque la résolution de la microscopie GSH est insuffisante pour analyser le $\chi^{(2)}$ des fibrilles individuellement. En plaçant le tissu sur une électrode et en appliquant une différence de potentiel alternative entre celle-ci et la pointe conductrice du microscope à sonde locale, les fibrilles piézoélectriques de collagène se mettent à vibrer à la même fréquence que la variation de potentiel alternative. Cette vibration est captée par la pointe de la sonde locale, ce qui permet de mesurer la piézoélectricité du tissu à l'échelle nanométrique. Notez finalement que les fibrilles ayant des polarités opposées vibrent

avec une phase décalée de 180° . Cela n'est pas un problème, puisque la mesure de la vibration par le détecteur, qui détermine la position de la sonde, est corrélée avec la phase de la différence de potentiel alternative appliquée. Il est alors possible de voir quelles structures vibrent en phase et quelles structures vibrent en antiphase, ce qui permet de distinguer le signe de la piézoélectricité des différentes fibrilles dans l'image.

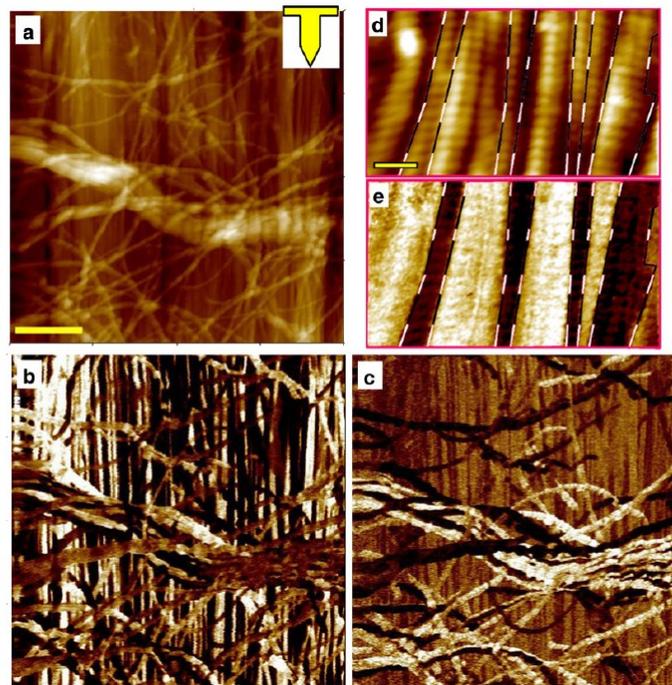


Figure 4.18 Cette figure est tirée de [31 (voir figure 1)]. (a et d) Images en microscopie AFM de la topographie d'un tissu de fascia. (b, c et e) Images en microscopie PFM de la réponse piézoélectrique des fibrilles de collagène qui composent le tissu. Les images (b) et (e) montrent la réponse piézoélectrique de la déformation des fibrilles dans la direction verticale de l'image tandis que l'image (c) montre la réponse piézoélectrique de la déformation des fibrilles dans la direction latérale de l'image. L'orientation de la pointe de la sonde est indiquée en haut à droite dans l'image (a). La barre d'échelle dans l'image (a) correspond à une distance de $2 \mu\text{m}$ et s'applique aux images (a-c). La barre d'échelle dans l'image (d) correspond à une distance de 250 nm et s'applique aux images (d-e). Les images (d-e) ont été prises à haute résolution et permettent de voir la période D de 67 nm à la surface des fibrilles et l'organisation des fibrilles en domaines ayant des polarités opposées. Les frontières des domaines sont marquées par des lignes en traits noirs et blancs.

Des travaux ont été réalisés à l'INRS sur le collagène du fascia [31, 40]. Ceux-ci démontrent que les fibrilles ont bel et bien une polarité qui est uniforme et continue tout le long de la fibrille de collagène. De plus, comme observé en microscopie électronique, les fibrilles dans le tissu ont une polarité qui pointe dans une direction aléatoire, même si les fibrilles sont parallèles (figure

4.18). La piézoélectricité de la fibrille fait en sorte qu'en appliquant un champ électrique sur celle-ci, elle se déforme dans la direction de son axe. C'est pour cette raison que le contraste piézoélectrique est important pour les fibrilles verticales dans les images 4.18b et 4.18e, où la vibration dans la direction verticale des images a été mesurée, tandis qu'il est important pour les fibrilles horizontales dans l'image 4.18c, où la vibration dans la direction latérale de l'image a été mesurée. On arrive à voir, surtout dans l'image 4.18e, des domaines formés de plusieurs fibrilles parallèles et adjacentes qui ont la même polarité. Ces domaines, généralement plus petits que la taille du volume focal, doivent donc avoir un $\chi^{(2)}$ uniforme et font en sorte que le tissu a une structure hétérogène qui devrait donner un accord de phase qui varie selon la position du volume focal dans le tissu.

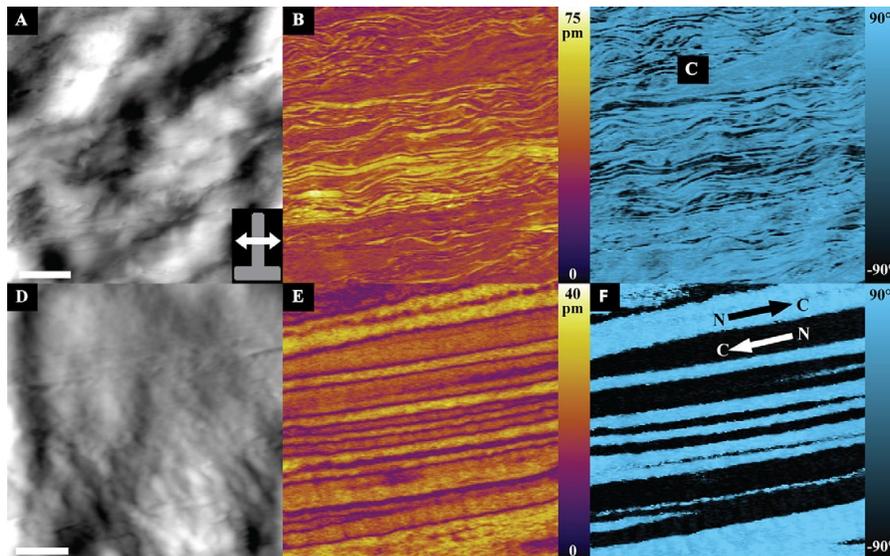


Figure 4.19 Cette figure est tirée de [32 (voir figure 2)]. Images AFM et PFM d'une section longitudinale de tendon de queue de souris. (a) Image en microscopie AFM de la topographie du tissu. L'orientation de la pointe de la sonde est indiquée en bas à droite. (b) Image de l'amplitude de la réponse piézoélectrique latérale dans la même région qu'en (a). (c) Image de la phase de la réponse piézoélectrique latérale. (d) Image en microscopie AFM de la topographie d'une zone plus petite dans le tissu. (e) Image de l'amplitude de la réponse piézoélectrique latérale dans la même région qu'en (d). (f) Image de la phase de la réponse piézoélectrique latérale montrant la polarité opposée des fibrilles à l'échelle nanométrique. L'orientation de la polarité des fibrilles est indiquée par les flèches N-C et C-N. La barre d'échelle dans l'image (a) correspond à une distance de 2 μm et s'applique aux images (a-c). Celle dans l'image (d) correspond à une distance de 200 nm et s'applique aux images (d-f).

D'autres recherches ont également été effectuées sur le collagène, dans le tendon de queue de souris, dans la sclère et dans la cornée [32]. Les images dans le tendon de queue de souris

ressemblent beaucoup à celles prises dans le fascia et mènent aux mêmes conclusions (figures 4.19 et 4.20). Notez que, les images de la figure 4.20 permettent de voir la forme des domaines dans une section transversale du tissu, en mesurant la vibration de la sonde dans la direction normale au plan de coupe du tissu, ce qui n'avait pas pu être réalisé en microscopie électronique auparavant.

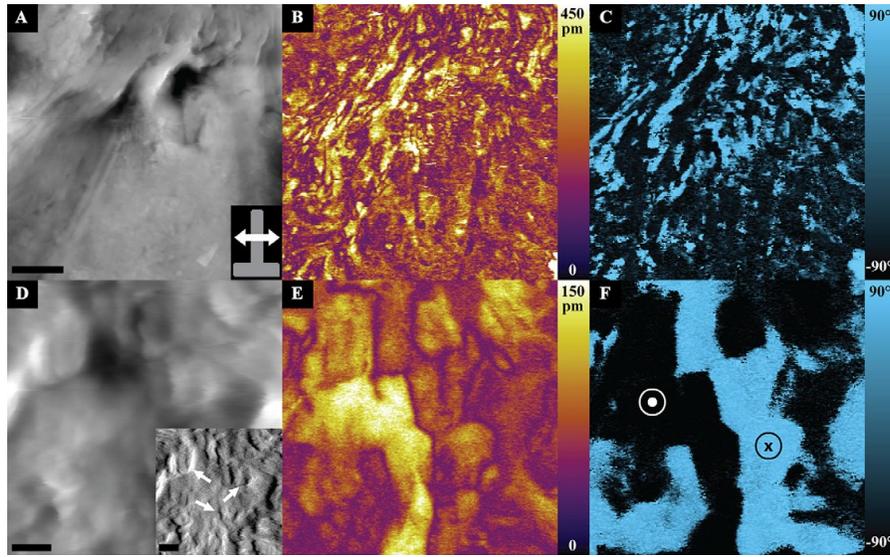


Figure 4.20 Cette figure est tirée de [32 (voir figure 3)]. Images AFM et PFM d'une section transversale de tendon de queue de souris. (a) Image en microscopie AFM de la topographie du tissu. (b) Image de l'amplitude de la réponse piézoélectrique verticale dans la même région qu'en (a). (c) Image de la phase de la réponse piézoélectrique verticale. (d) Image en microscopie AFM de la topographie d'une zone plus petite dans le tissu. (e) Image de l'amplitude de la réponse piézoélectrique verticale dans la même région qu'en (d). (f) Image de la phase de la réponse piézoélectrique verticale montrant la polarité opposée des fibrilles à l'échelle nanométrique. L'orientation de la polarité des fibrilles est indiquée par les flèches sortant de l'image dans la zone noire et entrant dans l'image dans la zone bleue. La barre d'échelle dans l'image (a) correspond à une distance de 2 μm et s'applique aux images (a-c). Celle dans l'image (d) correspond à une distance de 200 nm et s'applique aux images (d-f).

Les images 4.19c, 4.19f, 4.20c et 4.20f permettent de visualiser la phase de la réponse piézoélectrique, donc le signe de la polarité des fibrilles. Cela est très utile pour comprendre la structure tridimensionnelle du $\chi^{(2)}$ dans les tissus de collagène. On constate dans les grandes images (4.19c et 4.20c) que la polarité des fibrilles semble bel et bien aléatoire, comme observé en microscopie électronique. Pour le vérifier, il est utile de construire un histogramme de la phase mesurée à chaque pixel dans une image. Cela permet de voir de façon quantitative le ratio de fibrilles ayant une polarité positive vs négative. Dans l'historgramme 4.21a qui provient de

l'image 4.19f, ce ratio est bel et bien proche de 1:1 dans la zone imagée, mais dans l'histogramme 4.21b qui provient de l'image 4.20f, il ne l'est pas. La raison pour laquelle les pics sont inégaux dans l'histogramme 4.21b doit être tout simplement que, même si les fibrilles ont une polarité aléatoire dans le tissu, il arrive de rencontrer des zones à l'échelle micrométrique où, par hasard, la polarité des fibrilles aura une direction préférentielle. La zone imagée dans la figure 4.20d-f en est un bon exemple.

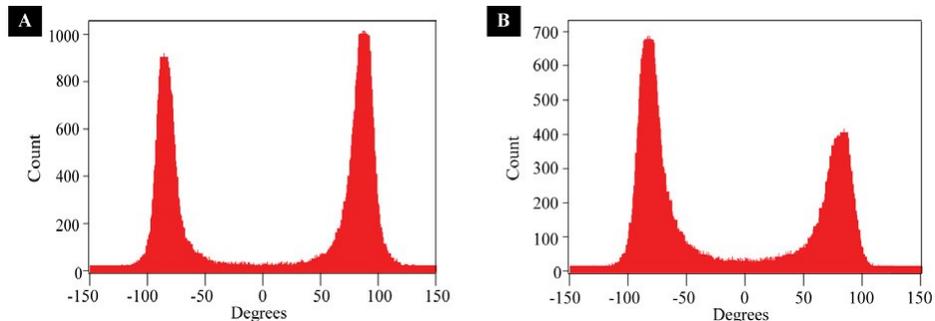


Figure 4.21 Cette figure est tirée de [32 (voir figure 4)]. Histogrammes montrant les distributions de la phase de la réponse piézoélectrique mesurée dans deux images de tendon de queue de souris. Notez que la phase est bien définie autour des valeurs $\pm 90^\circ$ puisque la résolution nanométrique permet de mesurer la phase des fibrilles individuellement. La phase obtenue n'est pas une valeur moyenne obtenue de plusieurs fibrilles. (a) Histogramme de la distribution de la phase pour l'image de la figure 4.19f montrant le ratio de fibrilles ayant des polarités opposées dans l'image de la section longitudinale du tissu. Puisque les deux pics ont la même hauteur, ce ratio est à peu près égal dans la zone imagée. (b) Histogramme de la distribution de la phase pour l'image de la figure 4.20f montrant le ratio de fibrilles ayant des polarités opposées dans l'image de la section transversale du tissu. Les deux pics n'ont pas la même hauteur dans cette image, ce qui signifie que le ratio de fibrilles ayant des polarités opposées est inégal dans la zone imagée.

Les résultats obtenus en microscopie piézoélectriques sont fortement en faveur de la première hypothèse de l'interprétation des images GSH du collagène. D'ailleurs, il serait très utile d'avoir un outil similaire en microscopie GSH qui serait capable de mesurer la phase du signal GSH dans les tissus pour étudier le collagène. Le prochain chapitre discute de cette idée.

4.3 Conclusion

Les tissus musculaires et les tissus conjonctifs de collagène ont une structure riche et complexe autant à l'échelle moléculaire que micrométrique. Les filaments minces d'actine et les filaments épais de myosine composent les nombreux sarcomères qui forment un tissu musculaire. Les

filaments épais de myosine sont responsables de la GSH dans les muscles et forment une structure $\chi^{(2)}$ qui ressemble à celle d'un cristal périodiquement orienté. Les triples hélices de tropocollagène s'assemblent en fibrilles de collagène avec une polarité uniforme le long de l'axe de la fibrille. Cependant, dans le tissu, la polarité de chaque fibrille peut pointer dans une direction aléatoire ce qui donne une structure $\chi^{(2)}$ très complexe pour la GSH. Deux hypothèses sont présentement considérées pour l'interprétation des images GSH dans les tissus de collagène.

5 MICROSCOPIE GSH INTERFÉROMÉTRIQUE

Cette section explique ce qu'est la microscopie GSH interférométrique et ce qu'elle apporte de plus que la microscopie GSH conventionnelle. Les nombreux détails concernant l'intégration d'un interféromètre dans un microscope GSH y sont également abordés. Les différents mécanismes de contrôle de la phase pour l'interférométrie et la méthode employée pour le traitement des images y sont discutés. Finalement, les expériences préliminaires qui ont été réalisées avant d'amorcer le projet sont également présentées.

5.1 Limitation de la microscopie GSH

Supposons deux structures non centrosymétriques achirales orientées dans des directions opposées comme représentées à la figure 5.1. La polarité et le signe du $\chi^{(2)}$ de ces structures seront donc opposés. L'inversion du signe du $\chi^{(2)}$ a pour conséquence d'inverser le signe de la composante électrique du champ électromagnétique de la GSH (équation 3.20), ce qui revient à un déphasage d'un facteur π pour le signal GSH. Deux structures non centrosymétriques achirales orientées dans des directions opposées émettent donc un signal GSH déphasé d'un facteur π .

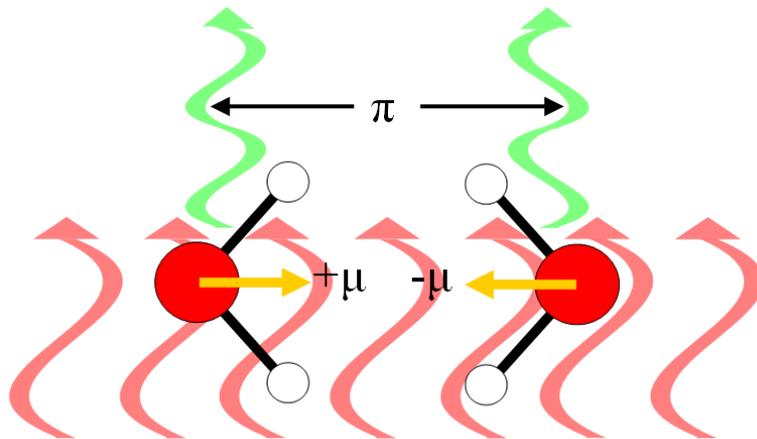


Figure 5.1 Deux structures polaires orientées dans des directions opposées émettent un signal GSH déphasé d'un facteur π . Par simplicité, ce schéma ne montre que deux molécules d'eau, mais cela reste vrai pour deux structures composées d'un grand nombre de molécules formant deux domaines ayant des $\chi^{(2)}$ opposés comme dans les tissus de collagène ou les muscles.

En mesurant la phase optique du signal GSH à chaque point dans la zone balayée par le faisceau, il est donc possible de voir les changements dans la polarité des structures non centrosymétriques qui composent le matériau imagé. Ces changements dans la polarité sont une information sur l'orientation relative de ces structures. Bref, en mesurant la phase de la GSH, il devient possible de déterminer l'orientation relative des molécules dans l'image. Dans le cadre de ce projet de doctorat, cette conclusion est d'une importance capitale. D'ailleurs, c'est ce même concept qui est employé en microscopie à force piézoélectrique pour mesurer la phase de la réponse piézoélectrique à la surface du matériau sondé.

La microscopie GSH permet de mesurer l'intensité du signal GSH à chaque point dans le matériau imagé, mais ce signal oscille beaucoup trop rapidement pour que sa phase optique puisse être mesurée directement par un détecteur électronique. L'information contenue dans la phase du signal GSH est donc perdue avec un microscope GSH conventionnel. Pour contourner cette limitation, la microscopie GSH est combinée avec l'interférométrie.

L'idée consiste à faire interférer le signal GSH du matériau imagé avec un second signal de GSH provenant de l'extérieur du microscope et dont la phase optique est contrôlée. Ce second signal GSH sert de référence pour celui du matériau. Pour éviter toutes ambiguïtés, on distinguera donc ces deux signaux par les noms "signal GSH de référence" et "signal GSH du matériau". Ces signaux interféreront ensemble suivant la formule 5.1. Le défi consiste à trouver la phase optique du signal GSH du matériau, φ_{mat} . Les irradiances I_{ref} et I_{mat} peuvent être mesurées par le microscope GSH tandis que φ_{ref} , la phase optique du signal GSH de référence, est connue et contrôlée dans le montage. L'interférence permet donc de traduire une variation dans la phase, φ_{mat} , qui ne peut pas être mesurée directement par le détecteur électronique, par une variation d'amplitude dans l'irradiance du signal GSH total, qui est facilement mesurable par le détecteur. En incorporant un interféromètre dans le montage d'un microscope GSH, l'amplitude et la phase relative du signal GSH du matériau imagé peuvent donc être retrouvées à chaque point dans l'image.

$$I = I_{ref} + I_{mat} + 2\sqrt{I_{ref}I_{mat}} \cos(\varphi_{mat} - \varphi_{ref}) \quad (5.1)$$

Cette idée de combiner la GSH et l'interférométrie n'est pas nouvelle. Déjà à partir de 1986, il existait des montages capables de mesurer la phase de la GSH afin de retrouver l'orientation des molécules non centrosymétriques sur une surface [42, 43, 147]. Cependant, ces montages n'offraient pas une résolution spatiale très élevée puisque la microscopie optique non linéaire n'était pas encore très développée à l'époque. Ce même type de montage a été employé pour identifier des domaines ferroélectriques ayant des polarités opposées [44]. Des montages combinant un microscope GSH et un interféromètre sont ensuite apparus et ont été employés, entre autres, pour imager les domaines des cristaux périodiquement orientés [45-47]. Toutefois, ce type de microscope GSH interférométrique employait des sources laser ayant des durées d'impulsions trop longues et des taux de répétitions trop faibles, donc une énergie par impulsion trop élevée, pour l'imagerie des tissus biologiques.

En 2004, un ingénieux montage capable de réaliser simultanément la microscopie GSH interférométrique et la microscopie GSH OCT est développé par l'équipe de Peter T. C. So [48]. Ce montage utilisait des impulsions laser brèves et aurait sans doute pu servir pour l'imagerie des tissus biologiques. Suite à celui-ci, d'autres montages de microscope GSH OCT [148, 149] et de microscope GSH interférométrique [49, 50, 150] ont été réalisés. Toutefois, ceux-ci n'ont pas été employés pour mesurer directement la phase du signal GSH dans les tissus biologiques. Soulignons tout de même que le groupe de Yoshiaki Uesu a eu l'idée, un an avant nous et de manière indépendante, d'imager le tissu musculaire en microscopie GSH interférométrique [150]. L'idée d'employer l'interférométrie en microscopie optique non linéaire est ensuite appliquée à la microscopie CARS [111, 151]. La mesure de la phase en microscopie CARS ne permet pas de trouver l'orientation de la molécule comme en microscopie GSH, mais elle permet d'isoler le signal CARS résonnant. En 2009, un montage astucieux de microscope GSH à sonde locale permet de mesurer la phase de la GSH à l'échelle nanométrique à la surface d'un cristal contenant des domaines ferroélectriques ayant des polarités opposées [79]. Finalement, une autre technique développée récemment, nommée la microscopie GSH holographique, est aussi en mesure de retrouver la phase du signal GSH [152-154].

Malgré ces récents progrès, la microscopie GSH interférométrique n'a pas encore été utilisée à son plein potentiel pour l'imagerie des tissus biologiques. Les premiers montages décrits au paragraphe précédent mesuraient la phase de la GSH pour identifier l'orientation des molécules

sur une surface ou à une interface. Les premiers microscopes GSH interférométriques ont également servi à distinguer les domaines ferroélectriques ayant des orientations moléculaires opposées dans des cristaux périodiquement orientés. Toutefois, bien que quelques tissus aient été imagés en microscopie GSH interférométrique, cette technique n'a pas encore servi à mesurer l'orientation moléculaire des structures non centrosymétriques à l'échelle microscopique dans les tissus biologiques. L'objectif de ce projet de doctorat consistait donc à réaliser cette étape qui n'avait pas encore été explorée; c'est-à-dire de convertir un microscope GSH en microscope GSH interférométrique et de l'utiliser pour l'imagerie des tissus biologiques, comme les muscles squelettiques, le tendon et le fascia, afin de déterminer l'orientation des structures non centrosymétriques dans ceux-ci et pour mieux expliquer l'origine du signal GSH dans ces tissus.

5.2 Interférométrie

L'interférence est un phénomène propre aux ondes. L'addition de plusieurs ondes ensemble ne se résume pas à la somme de leurs amplitudes maximales respectives. Il faut également tenir compte de la phase des ondes additionnées. Étant donné que la lumière est une onde électromagnétique, il est possible d'observer de l'interférence entre deux ondes lumineuses sous certaines conditions.

5.2.1 Conditions d'interférence

Tout d'abord il faut avoir à sa disposition au moins deux sources de lumière cohérentes, c'est-à-dire dont les ondes lumineuses ont des phases bien définies l'une par rapport à l'autre. Il peut s'agir de deux sources laser, ou encore une seule source laser dédoublée par une lame séparatrice de puissance ou par des fentes. Dans le montage du microscope GSH interférométrique, les deux sources sont le cristal qui génère le signal GSH de référence et le matériau imagé qui génère le signal GSH du matériau. Ces deux sources sont activées par le même laser ce qui fait en sorte qu'elles sont cohérentes.

Deuxièmement, les ondes lumineuses doivent également avoir la même polarisation pour interférer. Il est donc important de s'assurer que les éléments des tenseurs $\chi^{(2)}$ du cristal de

référence et du matériau imagé émettent un signal avec la même polarisation. S'ils émettent avec une polarisation différente, il est possible d'utiliser une lame d'onde spéciale qui agit comme une lame demi-onde, $\lambda/2$, à la longueur d'onde du laser et comme une lame d'onde, λ , à la longueur d'onde de la GSH. Ainsi, les polarisations du cristal de référence et du matériau peuvent être superposées.

Troisièmement, les sources doivent avoir la même longueur d'onde pour pouvoir détecter l'interférence. Si ce n'est pas le cas, leur différence de phase changerait continuellement et beaucoup trop rapidement. Cette condition est respectée pour le microscope GSH interférométrique puisque les deux sources sont activées par le même laser et auront donc une longueur d'onde centrale égale à exactement la moitié de celui-ci. Notons qu'une impulsion courte a un spectre large, ce qui pousserait à croire que cela empêcherait d'obtenir des effets d'interférence étant donné que plusieurs longueurs d'ondes sont impliquées. En pratique, les oscillations de l'onde dans une impulsion courte ont lieu à la fréquence centrale du spectre de celle-ci. Il est donc possible d'observer des effets d'interférence entre deux impulsions courtes à condition que la longueur d'onde centrale de leurs spectres soit la même.

Finalement, pour observer de l'interférence entre deux ondes, celles-ci doivent se rencontrer au même endroit et au même moment. Il faut combiner les champs électriques des deux ondes pour observer de l'interférence. Cela revient à maintenir une bonne superposition spatiale et temporelle des deux faisceaux à l'endroit où ceux-ci interfèrent. Pour obtenir de l'interférence entre deux impulsions courtes, comme dans le cas de la microscopie GSH interférométrique, il devient plus difficile d'effectuer la superposition temporelle étant donné que celles-ci sont plus courtes. Il est important de s'assurer que la longueur du trajet optique des deux bras de l'interféromètre est la même. Si elle n'est pas exactement la même, il y aura un délai entre les impulsions qui réduira graduellement l'amplitude du terme d'interférence jusqu'à zéro, lorsque ce délai devient trop important par rapport à la durée des impulsions.

5.2.2 Équation d'interférence

L'équation 5.2 est une version plus réaliste, plus complète et plus complexe de la formule 5.1 qui décrit l'interférence entre deux sources cohérentes de même longueur d'onde :

$$I(\vec{r}) = I_{ref}(\vec{r}) + I_{mat}(\vec{r}) + 2\sqrt{I_{ref}(\vec{r})I_{mat}(\vec{r})}v_{pol}v_{temporel}\cos(\varphi_{mat}(\vec{r}) - (\varphi_{0ref}(\vec{r}) + \Delta\varphi_{ref}(\vec{r}))) \quad (5.2)$$

Les irradiances, I , et les phases, φ , sont exprimées en fonction de la position spatiale r , puisque la direction de propagation de la GSH de référence n'est pas nécessairement la même que celle de la GSH du matériau. De plus, comme expliqué au chapitre 3, l'irradiance d'un faisceau laser ayant un profil gaussien varie dans l'espace. L'irradiance totale, $I(r)$, au point r , est la somme des irradiances des sources individuelles et d'un troisième terme qui provient de l'interférence. Ce dernier terme dépend de l'irradiance et de la différence de phase entre les deux ondes au point r , mais aussi de deux termes de contraste allant de 0 à 1. v_{pol} représente la superposition des polarisations des champs électriques des deux sources. Si les polarisations sont orientés dans la même direction, v_{pol} vaut 1 tandis que si elles sont orthogonales, v_{pol} vaut 0. Ce paramètre peut facilement être maximisé à 1, en polarisant les sources linéairement dans la même direction ou en installant un analyseur devant le détecteur. $v_{temporel}$ représente la superposition temporelle des champs électriques des deux sources. Pour un laser continu, $v_{temporel}$ vaut 1, mais pour un laser pulsé qui a une courte longueur de cohérence, la valeur de $v_{temporel}$ varie entre 0 et 1, en fonction de la durée et du délai entre les impulsions. La superposition spatiale des champs électriques des deux sources, c'est-à-dire de leur patron de radiation, et les déformations dans leurs fronts d'ondes jouent également un rôle dans le contraste obtenu lorsque le détecteur utilisé mesure la puissance totale des faisceaux, puisqu'il faut intégrer l'irradiance sur toute la surface de détection. Ce terme de contraste est représenté par la dépendance de I et de φ en fonction de r . Le terme $\Delta\varphi$ correspond à la différence de phase introduite par le mécanisme qui contrôle la phase des faisceaux dans l'interféromètre.

5.2.3 Configurations d'interféromètres

Pour l'interféromètre d'un microscope GSH, il est préférable d'utiliser une configuration Mach-Zehnder pour travailler avec le signal avant plutôt qu'une configuration Michelson. La configuration Michelson est plus pratique pour les systèmes de tomographie par cohérence optique où le signal arrière est utilisé. Le montage du microscope GSH interférométrique de l'équipe de Peter T. C. So utilisait d'ailleurs un interféromètre hybride pour réaliser simultanément la microscopie GSH interférométrique et la tomographie par cohérence optique.

Cependant, notre projet requiert un système capable de travailler avec le signal avant généré par le matériau. La figure 5.2 présente trois configurations d'interféromètres avec différents avantages et inconvénients qui peuvent servir d'interféromètre dans un microscope GSH.

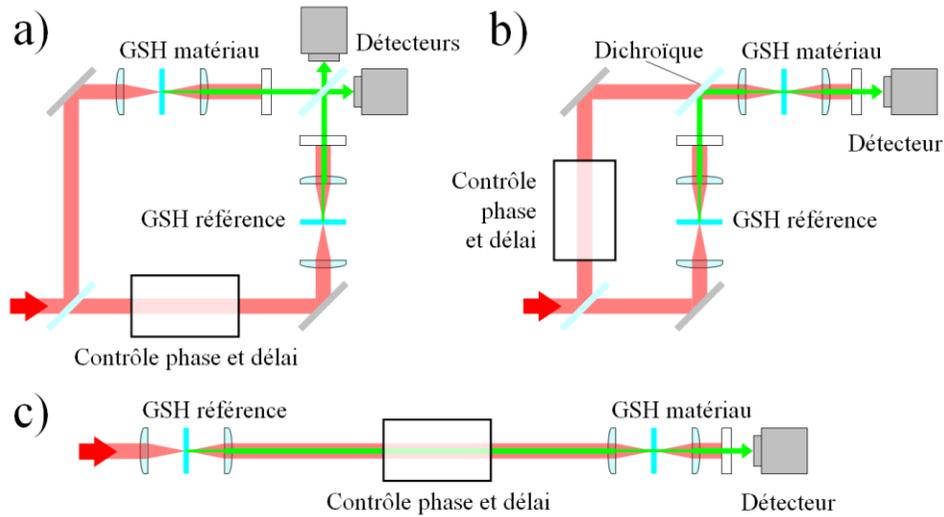


Figure 5.2 Configurations possibles pour un interféromètre Mach-Zehnder dans un microscope GSH interférométrique. Le maintien de la relation de phase entre le laser et la GSH permet à ces trois différentes configurations d'être fonctionnelles. (a) Cette première configuration ressemble à celle d'un interféromètre Mach-Zehnder modifié pour la GSH. L'interférence a lieu après la deuxième lame séparatrice aux détecteurs. Ceux-ci fournissent deux mesures, complémentaires, qui permettent de facilement trouver le contraste interférométrique. (b) Cette deuxième configuration se distingue de la première puisque le matériau imagé est séparé du reste de l'interféromètre. Cette configuration est adaptée à la microscopie GSH interférométrique puisqu'il suffit d'envoyer le faisceau laser et le faisceau GSH de référence dans un microscope GSH conventionnel. Il n'y a qu'un seul détecteur et l'interférence a lieu directement dans le matériau imagé. (c) Cette dernière configuration colinéaire est similaire à la seconde et est également adaptée à la microscopie GSH interférométrique. La séparation physique des deux bras de l'interféromètre par des lames séparatrices et par des miroirs devient superflue puisque les deux bras opèrent à différentes fréquences jusqu'au matériau imagé. Celle-ci offre certains avantages et inconvénients par rapport à la seconde configuration.

La première configuration (figure 5.2a) est celle qui ressemble le plus à celle d'un interféromètre Mach-Zehnder standard, mais modifié pour la GSH. Le faisceau de GSH de référence et le faisceau de GSH du matériau se rencontrent à 90° sur la deuxième lame séparatrice. L'interférence a lieu après celle-ci et deux faisceaux sont ensuite collectés par des détecteurs. Ces faisceaux sont complémentaires ; s'il y a interférence constructive dans l'un, il y a nécessairement interférence destructive dans l'autre. Cela permet d'identifier facilement la composante qui varie en cosinus dans l'interférence du signal GSH. Il est facile avec cette

configuration de contrôler le délai entre les deux bras et la phase du signal, puisque ceux-ci utilisent des trajets différents. L'inconvénient majeur avec cette configuration est que le matériau imagé, donc le microscope, se trouve au cœur de l'interféromètre. Il est donc nécessaire d'apporter des modifications importantes au système de détection d'un microscope GSH standard pour utiliser cette configuration qui demande un alignement d'une grande précision.

La seconde configuration (figure 5.2b) permet justement de séparer les pièces de l'interféromètre du microscope GSH. Le faisceau laser et le signal GSH de référence sont envoyés ensemble dans le microscope jusqu'au matériau. L'interférence a lieu à l'intérieur du matériau imagé où il peut y avoir génération de plus de GSH lorsqu'il y a interférence constructive ou encore reconversion du signal GSH de référence en photons à la fréquence fondamentale, lorsqu'il y a interférence destructive. On ne dispose donc malheureusement pas de deux signaux complémentaires comme dans un interféromètre Mach-Zehnder standard. Nous reviendrons sur une façon de contourner cette limitation plus tard, dans la section 5.4. Cette configuration permet également de contrôler le délai entre les deux bras et la phase du signal, puisque ceux-ci utilisent des trajets différents. Toutefois, le fait de séparer le faisceau sur des trajets différents demande un alignement d'une grande précision et rend l'interféromètre moins stable et plus sensible aux vibrations.

La troisième configuration (figure 5.2c) est inspirée de la seconde. De la même façon, le faisceau laser et le signal GSH de référence sont envoyés ensemble dans le microscope jusqu'au matériau où l'interférence a lieu. Toutefois, le faisceau laser n'est pas séparé dans deux bras différents. Celui-ci génère le signal de GSH de référence et les faisceaux se propagent en suivant le même trajet jusqu'au microscope. Les deux bras de l'interféromètre sont donc superposés ensemble dans l'espace, mais restent bien distincts l'un de l'autre, puisque le laser et la GSH de référence n'ont pas la même longueur d'onde. Cela a pour avantage de donner une configuration d'interféromètre extrêmement robuste, pratiquement insensible aux vibrations et plus facile à aligner. Étant donné que les faisceaux suivent le même trajet, la relation de phase entre ceux-ci reste la même, puisqu'ils subissent le même bruit dû aux vibrations. En contrepartie, il devient plus difficile de contrôler le délai entre les deux bras et la phase lorsque ceux-ci sont superposés. Il est également nécessaire d'employer un miroir achromatique plutôt qu'une lentille pour collimer le faisceau laser et le faisceau de GSH de référence.

5.2.4 Obtention des conditions d'interférence

Revenons à l'équation 5.2 et rappelons que l'on cherche à trouver φ_{mat} . Pour trouver sa valeur, il faut isoler, dans le signal mesuré, tout le terme de droite de l'équation, soit celui qui contient la fonction cosinus. Pour plus de clarté, nous appellerons ce terme le contraste interférométrique, puisqu'il correspond à l'amplitude de l'interférence. Certaines astuces peuvent être employées pour mesurer un bon contraste interférométrique.

Il est important que les patrons de radiation de la GSH de référence et du matériau soient bien superposés l'un sur l'autre. Cela maximise le produit des irradiances contenues dans la racine carrée de l'équation 5.2. Bien qu'il ne soit pas possible de contrôler la forme du patron de radiation de la GSH du matériau, il est possible de s'assurer que le patron de radiation de la GSH de référence soit bien circulaire et uniforme. L'usage d'un cristal de quartz comme source de GSH de référence est idéal pour obtenir ce genre de patron de radiation, avec une puissance comparable à la GSH produite par le matériau imagé.

Le détecteur employé dans un système de microscopie GSH à balayage est un puissancemètre, comme un tube photomultiplicateur (PMT) par exemple, qui intègre la totalité de l'irradiance qu'il collecte. Pour mesurer correctement le contraste interférométrique, il est nécessaire que le détecteur ne collecte qu'une seule frange claire ou sombre. S'il collecte plusieurs franges simultanément, l'intégration du signal donnerait une mesure du contraste interférométrique plus faible ou même nulle. Si les faisceaux du laser et du signal GSH de référence ne sont pas parfaitement colinéaires, on observera des franges verticales ou horizontales dans le patron de radiation de la GSH et le contraste interférométrique mesuré sera faible. Il est donc important que ces faisceaux soient parfaitement alignés. S'ils le sont, la forme des franges claires et sombres obtenues devrait ressembler à des cercles concentriques. Idéalement, le détecteur ne mesurera que la grande frange claire ou sombre au centre du patron de radiation. La taille de cette frange dépend principalement du rayon de courbure des fronts d'ondes de la GSH de référence et de la GSH du matériau. Si celle-ci n'occupe pas tout le patron de radiation, il est possible de réduire l'ouverture numérique de collection du signal pour que le détecteur ne voie que la frange centrale. Ainsi, le signal mesuré sera plus faible, mais le contraste interférométrique mesuré par le détecteur sera meilleur. Notons que pour la troisième

configuration d'interféromètre (figure 5.2c), les faisceaux laser et GSH de référence restent parfaitement alignés par défaut puisque ceux-ci suivent le même trajet.

En utilisant un polariseur entre le filtre qui bloque le faisceau laser et le détecteur, le paramètre v_{pol} vaut nécessairement 1 puisque, une fois rendu au détecteur, le signal GSH de référence et du matériau ont la même polarisation. Cela permet de mesurer un meilleur contraste interférométrique en rejetant le signal qui n'a pas la bonne polarisation. Il faut toutefois orienter le polariseur pour laisser passer le plus de signal possible. Dans le pire des cas, c'est-à-dire si la polarisation est circulaire, 50% du signal sera perdu en utilisant un polariseur bien orienté, mais le contraste interférométrique sera meilleur.

Finalement, puisque le laser utilise des impulsions courtes, il faut optimiser $v_{temporel}$. À cause de la dispersion du laser et de la GSH dans les optiques en verre, comme l'objectif de microscope, et étant donné qu'il est difficile d'aligner les miroirs pour obtenir un interféromètre avec deux bras ayant exactement la même longueur, il est nécessaire d'avoir un mécanisme pour corriger le délai de groupe entre les impulsions.

Dans les configurations d'interféromètres de la figure 5.2a et 5.2b, la dispersion peut facilement être compensée à l'aide d'une ligne à délai dans l'un des bras de l'interféromètre, afin de corriger le délai de groupe pour que les impulsions arrivent simultanément à l'endroit où celles-ci interfèrent entre elles. Une ligne à délai est constituée d'au minimum deux miroirs dont deux d'entre-eux sont montés sur une plateforme de translation micrométrique, afin de pouvoir changer la longueur du trajet emprunté par la lumière (figure 5.3a).

Pour la configuration de la figure 5.2c, le problème est plus complexe étant donné que les faisceaux suivent le même trajet. Une ligne à délai constituée de miroirs ne peut pas être employée. Tout d'abord, il est possible de limiter la dispersion en remplaçant certaines lentilles par des miroirs métalliques concaves puisque ceux-ci sont achromatiques et n'ajoutent aucun délai. Il reste néanmoins un objectif de microscope et le mécanisme pour contrôler la phase, ce qui représente une dispersion non négligeable.

Si les impulsions du laser sont plus longues que le délai entre le laser et la GSH dans l'interféromètre, il est possible de tout simplement s'en tenir à minimiser la dispersion dans le

montage et accepter que $v_{temporel}$ soit plus petit que 1. Cela entraîne tout de même une baisse de contraste, car l'objectif de microscope cause nécessairement une dispersion non négligeable de quelques picosecondes. Cette option peut donc être envisageable avec un laser émettant des impulsions d'une durée de plusieurs picosecondes. Il s'agit tout de même d'un sacrifice important puisque, en plus d'avoir une baisse du contraste interférométrique, un laser émettant des impulsions d'une dizaine de picosecondes générera, à puissance égale, 100 fois moins de GSH qu'un laser émettant des impulsions d'une centaine de femtosecondes.

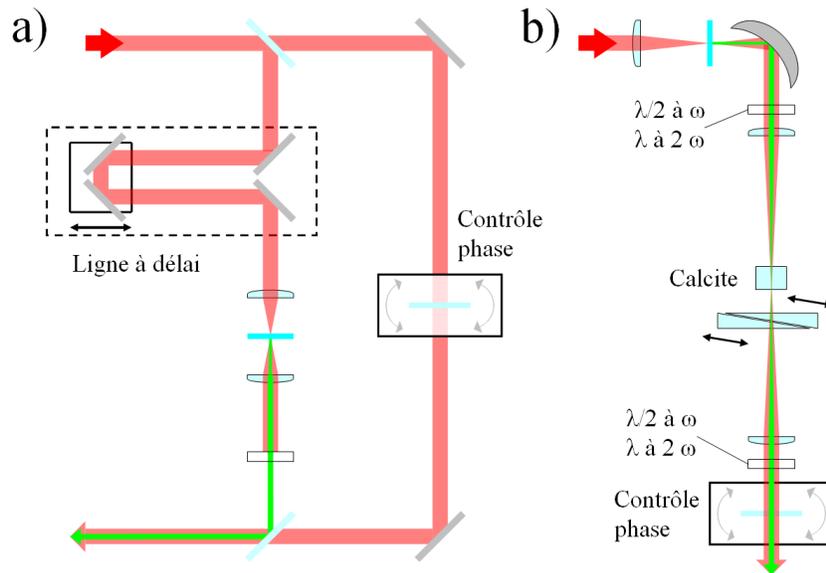


Figure 5.3 Configurations possibles pour ajuster le délai de groupe dans l'interféromètre d'un microscope GSH interférométrique. (a) L'ajout d'une ligne à délai dans l'un des bras est suffisante pour les configurations présentées à la figure 5.2a et 5.2b. (b) Pour la configuration présentée à la figure 5.2c, il est nécessaire d'utiliser une lame d'onde spéciale pour aligner la polarisation du laser sur l'axe lent et la polarisation de la GSH de référence sur l'axe rapide des cristaux de calcite. En faisant glisser les deux cristaux coupés en coin l'un sur l'autre, il est possible d'ajuster l'épaisseur de calcite pour compenser le délai de groupe. Une 2^e lame d'onde ramène les polarisations ensemble. Les lentilles servent à focaliser faiblement les faisceaux dans les cristaux de calcite. Celles-ci pourraient être des doublets achromatiques ou encore pourraient être remplacées par des miroirs concaves.

Alternativement, si les impulsions sont très courtes ou encore pour s'assurer de maximiser le contraste interférométrique, il est également possible de corriger la dispersion avec des optiques biréfringentes, comme montré à la figure 5.3b [155]. La polarisation du laser à ω est d'abord orientée le long de l'axe lent des cristaux de calcite et la polarisation de la GSH de référence le long de l'axe rapide en utilisant une lame demi-onde, $\lambda/2$, à la longueur d'onde du laser et λ à la

longueur d'onde de la GSH. Les faisceaux sont ensuite focalisés faiblement à travers un bloc de calcite, puis à travers deux coins de calcite qui peuvent glisser l'un contre l'autre, afin de pouvoir contrôler l'épaisseur totale de calcite qui se trouvera dans le trajet optique. La focalisation est importante pour que le faisceau soit altéré de façon uniforme par le cristal. Puisque le cristal de calcite est fortement biréfringent, cela permet de compenser le délai de groupe dans le système, afin que les impulsions laser et de la GSH de référence arrivent simultanément dans le matériau pour qu'il y ait interférence. Il faut ensuite collimer à nouveau les faisceaux et superposer leur polarisation avec une deuxième lame d'onde identique à la précédente. Il est donc possible de compenser le délai de groupe causé par la dispersion et d'obtenir un paramètre $v_{temporel}$ d'une valeur de 1 pour les trois configurations présentées à la figure 5.2 en utilisant les mécanismes illustrés à la figure 5.3.

5.2.5 Amplification du signal

Il est également possible d'utiliser la microscopie GSH interférométrique pour amplifier un signal GSH faible. Le signal du contraste interférométrique ressemble beaucoup au signal GSH du matériau, puisque le contraste interférométrique dépend de la racine de I_{ref} et de I_{mat} . En augmentant I_{ref} , l'amplitude du contraste interférométrique augmentera aussi ce qui permet d'amplifier une partie du signal GSH du matériau.

Cette amplification fonctionne bien en théorie, mais en pratique, elle est sujette à certaines limites. Supposons que I_{ref} est beaucoup plus grand que le contraste interférométrique qui est lui-même beaucoup plus grand que I_{mat} . Alors, le signal GSH peut être amplifié en augmentant I_{ref} à condition d'être en mesure d'isoler le contraste interférométrique. Si I_{ref} est trop élevé, sa contribution ajoutera dans l'image un bruit important par rapport à l'amplitude du contraste interférométrique. Il faut donc un signal I_{ref} très stable et un détecteur avec une bonne gamme dynamique pour pouvoir observer une amplification importante du signal GSH avec cette méthode. Celle-ci devrait tout de même fonctionner de manière efficace pour obtenir une faible amplification du signal GSH, ce qui pourrait être exploité pour des applications où le signal GSH est très faible.

5.3 Contrôle de la phase

Il est nécessaire d'ajouter un mécanisme pour contrôler la phase relative entre le faisceau laser et le faisceau GSH de référence. Comme présenté à la figure 5.4, ce mécanisme doit être en mesure d'allonger ou de raccourcir, avec une grande précision, le trajet optique de la GSH de référence d'une longueur d'au moins λ_{GSH} par rapport au trajet optique du laser. Ainsi, un décalage de phase allant de 0 à 2π ou plus peut être obtenu entre la GSH de référence et la GSH du matériau, ce qui permet de retrouver φ_{mat} . Notez que la phase du laser est également doublée par le processus de GSH dans le matériau, ce qui donne des fronts d'ondes deux fois plus contractés pour la GSH du matériau. Il faut bien comprendre que, le maintien de la relation de phase entre le laser à ω et la GSH à 2ω rend la mesure de φ_{mat} possible et permet à ce projet d'être réalisable.

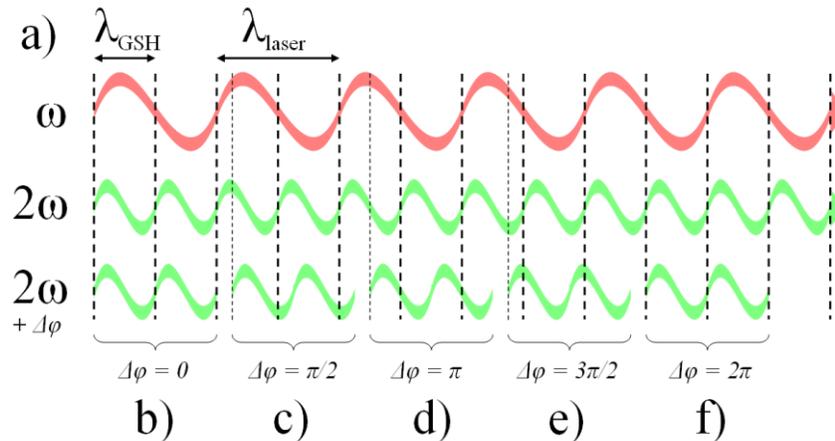


Figure 5.4 (a) Fronts d'ondes du faisceau laser et du faisceau GSH de référence. (b-f) Représentation d'un segment d'onde GSH de référence pour (b) $\Delta\varphi = 0$, (c) $\Delta\varphi = \pi/2$, (d) $\Delta\varphi = \pi$, (e) $\Delta\varphi = 3\pi/2$, (f) $\Delta\varphi = 2\pi$.

Plusieurs méthodes avec différents avantages et inconvénients peuvent être employées pour obtenir ce contrôle sur la phase.

1. Un premier montage consiste à ajouter dans le trajet des faisceaux un tube rempli de gaz dont la pression peut être ajustée. Le gaz peut tout simplement être de l'air, mais il faut un mécanisme pour contrôler précisément et rapidement la pression dans le tube durant l'expérience. Le tube doit être assez long, ce qui peut poser problème si le montage doit être compact.

2. Un second montage consiste à faire varier la distance entre le cristal de référence et le matériau. Cela peut être accompli en ajoutant tout simplement une ligne à délai sur le trajet des faisceaux. Dans l'air, la distance qu'il faut ajouter dans le trajet pour obtenir un déphase de 2π entre 1064nm et 532nm est de 13,1cm. Cette méthode est très simple et élégante, mais elle demande un bon alignement de la ligne à délai et peut poser problème si les faisceaux divergent.
3. Un troisième montage consiste à ajouter dans le trajet des faisceaux une plaque de verre qui peut pivoter [43, 147, 156]. Ce montage ne requiert pas d'alignement additionnel, mais la rotation de la plaque entraîne un léger décalage latéral des faisceaux sans toutefois affecter leur direction de propagation. Ce décalage peut d'ailleurs être corrigé en utilisant une deuxième plaque de verre qui tourne dans la direction inverse de la première. Il est également nécessaire de caractériser le décalage de phase obtenu en fonction de l'angle de rotation de la plaque, puisqu'il ne s'agit pas d'une relation linéaire.
4. Un quatrième montage consiste à utiliser deux prismes de verre en coin similaires à ceux présentés à la figure 5.3b. Ceux-ci n'entraîneront pas de décalage du faisceau comme la plaque de verre, mais leur alignement est plus difficile.
5. Une cinquième méthode consiste à utiliser un modulateur de phase optique, c'est-à-dire une cellule de Pockels. En appliquant un champ électrique sur le cristal de la cellule de Pockels, son indice de réfraction change, ce qui permet d'obtenir un décalage de phase entre le laser et la GSH. Ce changement est beaucoup plus rapide que les quatre autres méthodes décrites plus haut, puisqu'il ne requiert aucun déplacement mécanique ou aucune stabilisation de la pression. En appliquant un décalage de phase qui varie rapidement de façon périodique dans le temps et en synchronisant la lecture des détecteurs avec celui-ci, il devient possible de trouver φ_{mat} en temps réel durant la prise d'une image. Cela peut être d'un grand intérêt pour accélérer et automatiser la prise de mesures.

Pour mieux comprendre, l'article "Phase measurements in nonlinear optics" [157] constitue une excellente référence qui décrit en détail les quatre premiers montages présentés plus haut et les concepts importants pour effectuer des mesures de phase en optique non linéaire. Il est

également possible de trouver d'autres articles décrivant l'usage d'un modulateur de phase optique pour faire varier la phase relative dans le montage [48, 49, 151].

5.4 Méthode de traitement des images

Les images obtenues en microscopie GSH interférométrique ne donnent pas directement la phase optique du signal GSH du matériau, φ_{mat} . Dans une image, chaque pixel a un signal qui suit la formule 5.1 ou encore 5.3a. Extraire la phase optique φ_{mat} de la zone imagée revient à faire l'interpolation d'une fonction cosinus à chaque pixel en utilisant des images prises à différentes phases de référence, φ_{ref} . Pour réaliser l'interpolation d'un cosinus, il faut un minimum de trois points. Deux points sont insuffisants pour ce type de fonction, puisque deux solutions ayant des phases différentes peuvent passer par ceux-ci. Il est donc nécessaire d'avoir une combinaison d'au moins trois images ayant été prises à différentes phases de référence pour interpoler correctement la phase optique φ_{mat} à chaque pixel. Un plus grand nombre d'images correspond à un plus grand nombre de points, ce qui permettra de faire une meilleure interpolation et d'améliorer la précision de la phase optique φ_{mat} trouvée à chaque pixel.

$$I(\Delta\varphi_{ref}) = I_{ref} + I_{mat} + 2\sqrt{I_{ref}I_{mat}} \cos(\varphi_{mat} - (\varphi_{0ref} + \Delta\varphi_{ref})) \quad (5.3a)$$

$$I(0) - I(\pi) = \left[I_{ref} + I_{mat} + 2\sqrt{I_{ref}I_{mat}} \cos(\varphi_{mat} - \varphi_{0ref}) \right] - \left[I_{ref} + I_{mat} + 2\sqrt{I_{ref}I_{mat}} \cos(\varphi_{mat} - \varphi_{0ref} - \pi) \right] \quad (5.3b)$$

$$I(0) - I(\pi) = \left[2\sqrt{I_{ref}I_{mat}} \cos(\varphi_{mat} - \varphi_{0ref}) \right] - \left[-2\sqrt{I_{ref}I_{mat}} \cos(\varphi_{mat} - \varphi_{0ref}) \right] \quad (5.3c)$$

$$I(0) - I(\pi) = 4\sqrt{I_{ref}I_{mat}} \cos(\varphi_{mat} - \varphi_{0ref}) \quad (5.3d)$$

Une méthode simple et pratique qui peut être appliquée pour traiter les images et résoudre cette interpolation consiste à utiliser des paires d'images GSH interférométriques. Une paire d'images correspond ici à deux images ayant été prises à des phases de référence décalées de π . En soustrayant ces images l'une à l'autre, comme présenté dans la figure 5.5b et 5.5d, une nouvelle image dans laquelle chaque pixel a un signal qui suit l'équation 5.3d est obtenue. Cette opération

permet donc d'isoler le contraste interférométrique en éliminant les termes I_{ref} et I_{mat} dans le signal de l'image. Elle amplifie également d'un facteur deux le terme de contraste interférométrique. La nouvelle image ne contient plus que le contraste interférométrique et ses pixels ont des comptes positifs et négatifs. Pour distinguer les pixels où le signal est positif des pixels où celui-ci est négatif dans l'image, les pixels positifs sont représentés sur une échelle de couleur allant du noir, pour une valeur nulle, au vert, pour la valeur maximale, tandis que les pixels négatifs sont représentés sur une échelle de couleur allant du noir, pour une valeur nulle, au rouge, pour la valeur minimale (voir figure 5.5c). Ainsi, l'image obtenue après la soustraction montre clairement le signe et l'intensité du contraste interférométrique. Comme montré à la figure 5.5, cela rend son interprétation à l'œil nu beaucoup plus intuitive que celle des images GSH interférométrique originales. Si I_{ref} est beaucoup plus élevé que I_{mat} , afin d'amplifier le signal GSH, cette étape du traitement des images est fort utile étant donné qu'elle permet d'isoler le contraste interférométrique du reste du signal.

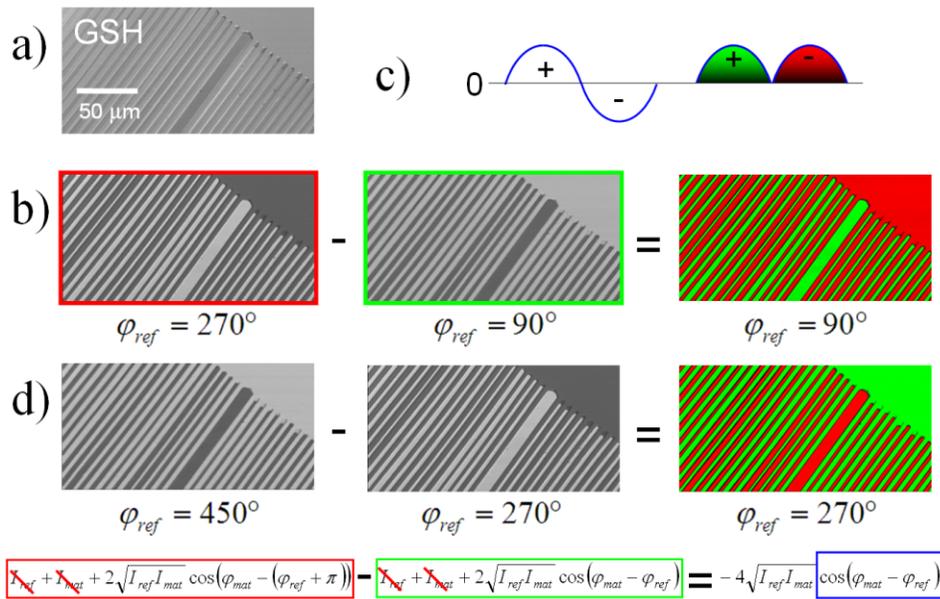


Figure 5.5 (a) Image GSH de la surface d'un cristal périodiquement orienté $200 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. (b) Soustraction de deux images GSH interférométrique de la même zone. Elles ont été prise à une phase de référence de 90° et de $90^\circ + 180^\circ = 270^\circ$. L'image résultante après la soustraction contient un signal qui correspond uniquement au contraste interférométrique. Les domaines ayant des orientations opposées sont facilement identifiables dans cette nouvelle image. (c) Les valeurs positives de signal sont représentées sur une échelle en vert dans l'image tandis que les valeurs négatives de signal sont représentées sur une échelle en rouge. (d) La soustraction de deux images GSH interférométrique à des phases décalées de 180° par rapport aux précédentes donne une nouvelle image parfaitement opposée à celle obtenue par la soustraction précédente.

Après avoir effectué l'opération de soustraction des images GSH interférométrique, les nouvelles images obtenues sont employées pour faire l'interpolation et retrouver la phase φ_{mat} . En choisissant correctement les phases de référence, un minimum de deux paires d'images est requis pour faire l'interpolation, mais un plus grand nombre devrait améliorer la précision. Un algorithme compare, pour chaque pixel de la zone imagée, le signal obtenu expérimentalement à différentes phases de référence avec un signal théorique qui dépend de φ_{mat} et de φ_{ref} . Pour une certaine valeur de φ_{mat} , le signal obtenu expérimentalement suit le signal théorique, indépendamment de φ_{ref} . Cette phase correspond à la phase optique du signal GSH, φ_{mat} , pour un pixel. Une fois que l'algorithme a complété son calcul, la phase optique du signal GSH, φ_{mat} , est connue à chaque pixel dans la zone imagée. Les détails du fonctionnement et le code de l'algorithme qui a servi au traitement des images pour cette thèse est donné dans l'annexe B. Une nouvelle image, comme celle de la figure 5.6, est construite pour visualiser cette phase. Il est préférable d'employer une échelle utilisant un dégradé de plusieurs couleurs pour représenter la phase, puisqu'il s'agit d'une caractéristique périodique. Ainsi, un dégradé allant du rouge ($\varphi_{mat} = -\pi$), au jaune, au vert, au cyan ($\varphi_{mat} = 0$), au bleu, au rose et de retour au rouge ($\varphi_{mat} = \pi$) est une bonne façon d'exprimer visuellement la phase dans cette nouvelle image.

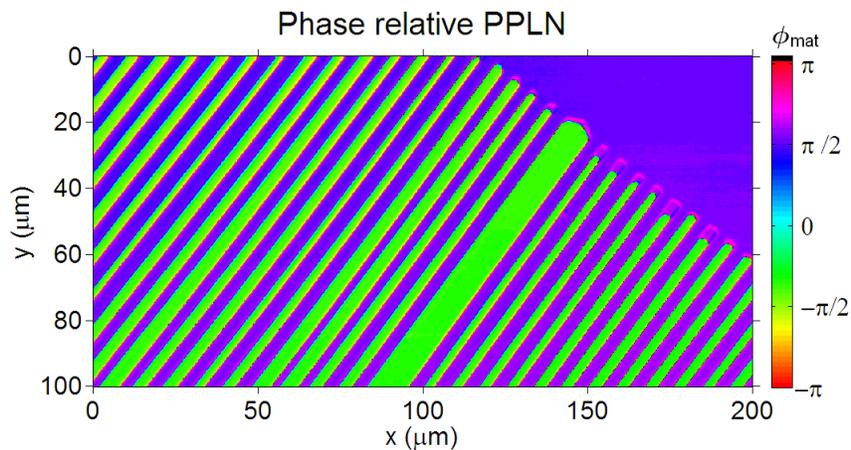


Figure 5.6 Image de la surface d'un cristal périodiquement orienté présentant la phase interpolée à chaque pixel dans la zone imagée. Les domaines ont une phase très uniforme centrée près de $-0,36\pi$ (domaines verts) et de $0,54\pi$ (domaines mauves). Une inspection attentive de l'image révèle que la phase varie rapidement et passe par 0 ou $\pm\pi$ à l'interface des domaines.

Si le matériau imagé contient des domaines bien définis, comme dans un cristal périodiquement orienté par exemple, la distribution des phases φ_{mat} trouvées à différents pixels dans le matériau

devrait se concentrer autour de deux valeurs spécifiques de phases qui sont opposées. Il est bien important de comprendre que l'image de la phase du signal GSH se distingue de celles obtenues par la soustraction de paires d'images. Cette image permet de visualiser directement la phase du signal GSH dans la zone imagée, tandis que les autres images ne permettent de visualiser que le contraste interférométrique pour différentes phases de référence.

5.5 Expériences préliminaires et validation du projet

Avant d'adapter notre montage pour en faire un microscope GSH interférométrique, quelques expériences préliminaires ont d'abord été réalisées pour s'assurer de la validité de nos hypothèses et pour confirmer que le projet serait réalisable.

La première expérience a été conçue en dehors du microscope et servait à vérifier le fonctionnement de la plaque de verre pour le contrôle de la phase, la stabilité de l'interféromètre et la superposition des patrons de radiations sur le détecteur. Le montage, présenté à la figure 5.7a, était constitué de deux plaques de quartz cristallin, la première pour le signal GSH de référence et la seconde pour le signal GSH du matériau, deux lentilles et deux miroirs concaves pour la collimation des faisceaux, une plaque de verre montée sur une plateforme de rotation et une caméra CCD avec des filtres pour la détection du signal.

Cette expérience a permis de démontrer qu'il était bel et bien possible d'observer un phénomène d'interférence et que la plaque de verre permettait de contrôler la phase de référence avec succès. La caméra CCD était en mesure de bien distinguer le cas où il y a interférence constructive (figure 5.7b) ou destructive (figure 5.7c) entre les signaux GSH des deux cristaux de quartz. En se limitant à la zone du centre du patron de radiation, l'irradiance du signal est douze fois plus forte dans le cas où il y a interférence constructive par rapport à lorsqu'il y a interférence destructive. Toutefois, en pratique, les patrons de radiations ne sont pas parfaitement identiques et, en tenant compte de toute la surface du détecteur, la puissance du signal GSH est environ quatre fois plus forte lorsqu'il y a interférence constructive que lorsqu'il y a interférence destructive. Notons que l'ajout d'un iris au montage pour réduire l'ouverture numérique de collection permettrait tout de même d'améliorer le contraste interférométrique en sacrifiant un peu de signal, si nécessaire.

La plaque de verre permettait de contrôler la différence de phase entre la GSH des cristaux de quartz, mais il a également été possible de constater qu'en tournant l'un des deux cristaux de 180° , l'orientation de son tenseur s'inversait et l'interférence aussi (voir figure 6.7 du chapitre suivant). Cela démontrait qu'il était bel et bien possible d'employer l'interférence en microscopie GSH pour mesurer la phase du signal GSH et ainsi identifier l'orientation relative entre les différentes structures $\chi^{(2)}$ dans la zone imagée.

Cette expérience a démontré que le quartz cristallin donnait un excellent patron de radiation pour servir de source GSH de référence. Finalement, elle a également prouvé que la configuration d'interféromètre ayant deux bras superposés spatialement était extrêmement robuste.

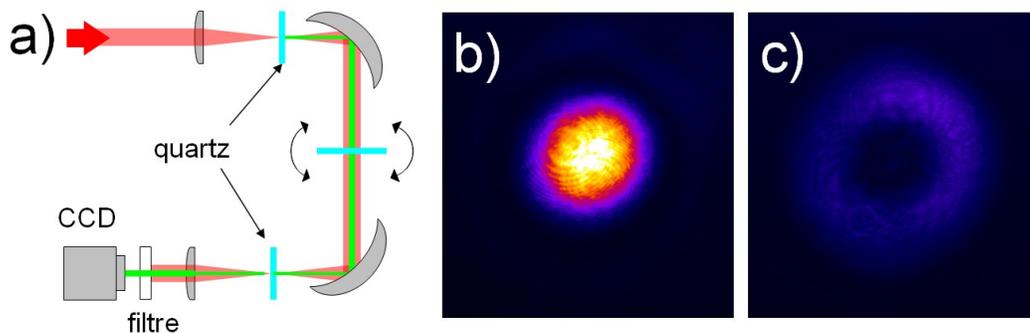


Figure 5.7 (a) Schéma du montage pour l'expérience préliminaire d'interférométrie menée en dehors du microscope. (b-c) Images prises par la caméra CCD du patron de radiation de la GSH dans le cas où les signaux interfèrent (b) constructivement et (c) destructivement.

Après avoir mené cette première expérience en dehors du microscope avec succès, le montage original a été conservé, mais le faisceau a été redirigé avec des miroirs vers l'entrée du microscope, après que celui-ci ait traversé la plaque de verre. Il était important de vérifier si les résultats pouvaient être obtenus à nouveau en employant le microscope. Le faisceau laser et le faisceau de GSH de référence passaient donc par le système de balayage d'un microscope GSH standard. Les résultats obtenus dans le quartz avec la caméra CCD ont pu être répétés en passant par le microscope. Des images en mode interférométrique ont ensuite été prises dans un cristal périodiquement orienté (figure 5.8b) et même dans un tissu de fascia riche en collagène (figure 5.8d). Il y avait tout de même deux problèmes majeurs avec cette version du montage.

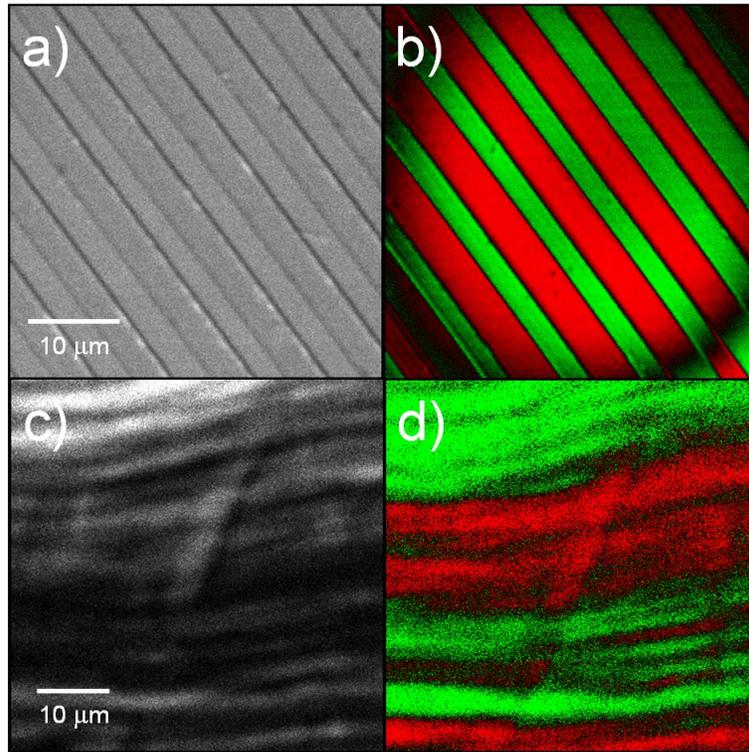


Figure 5.8 (a) Image GSH de la surface d'un cristal périodiquement orienté $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$. (b) Image du contraste interférométrique du même cristal. L'inversion de phase sur les bords de l'image est causée par le balayage du faisceau. (c) Image GSH d'un tissu de fascia riche en collagène $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$. (d) Image du contraste interférométrique du même tissu. À cause de la faible transmission du faisceau GSH de référence, le bruit est très élevé dans cette image, mais il est tout de même possible de voir qu'il y a certains domaines opposés dans le tissu.

Tout d'abord, les couches minces sur les lentilles du système de balayage ne laissaient passer qu'environ 1% du faisceau GSH de référence. Cela posait un sérieux problème pour ajuster le niveau de signal de la GSH de référence et de la GSH du matériau. Pour contourner ce problème, il aurait été nécessaire de remplacer les lentilles ou de construire un second microscope ou encore de trouver un cristal capable de générer un signal très fort avec un patron de radiation uniforme qui puisse servir de source pour le signal GSH de référence.

Le second problème était le champ de vision obtenu en passant par le système de balayage. Celui-ci semblait beaucoup plus petit en mode interférométrique qu'en microscopie GSH standard. Comme le montrent les bords de l'image de la figure 5.8b, les images prises en mode interférométrique ajoutent un effet inattendu d'inversion de la phase dans les domaines du cristal périodiquement orienté. Cet effet est dû à un décalage entre le point focal du laser et celui du

faisceau GSH de référence durant le balayage des faisceaux. Ce décalage réduit le champ de vision de la microscopie GSH interférométrique et crée un déphasage additionnel dont il faut tenir compte durant le balayage. Balayer un faisceau pour qu'il frappe l'arrière d'un objectif de microscope avec un angle variable revient au même que de le faire passer à travers une plaque de verre qui pivote. Cette comparaison explique bien l'origine du déphasage durant le balayage. Cet effet est d'ailleurs plus prononcé lorsque l'angle de balayage augmente, ce qui explique pourquoi il est plus apparent aux bords de l'image.

Ces résultats ont poussé le projet dans ses débuts à se diriger vers un autre type de montage. En contournant le système de balayage par miroirs galvanométriques et en employant plutôt un système de balayage par plateforme de translation, les deux problèmes étaient résolus simultanément. Toutefois, l'usage d'un système de balayage par plateforme de translation a un prix puisqu'il est tout de même moins précis et beaucoup plus lent (environ 100×) qu'un système de balayage par miroirs galvanométriques. Tout cela sans compter qu'il faut un temps considérable pour construire un tel système. Il a tout de même été décidé de poursuivre le projet sur cette voie.

5.6 Conclusion

La microscopie GSH interférométrique permet donc de mesurer la phase relative du signal GSH contrairement à la microscopie GSH standard. La phase du signal GSH peut s'avérer fort utile pour identifier des variations dans le signe de la polarité des structures non centrosymétriques qui composent le matériau imagé. Ces changements dans la polarité sont une information sur l'orientation relative des molécules qui émettent le signal dans la zone imagée. La microscopie GSH interférométrique peut également être employée pour amplifier un signal GSH faible. Une méthode de traitement des images relativement simple permet d'isoler le contraste interférométrique et de faire l'interpolation de la phase du signal GSH à chaque pixel dans la zone imagée.

6 MONTAGE ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Ce chapitre aborde les aspects pratiques du projet maintenant que les notions théoriques importantes ont été couvertes. Tout d'abord, nous exposons les différentes expériences prévues pour faire la vérification de nos hypothèses. Puis, nous expliquons le processus de conversion du microscope GSH conventionnel en microscope GSH interférométrique. Le montage final y est décrit, les méthodes de préparation des différents tissus y sont abordées et le protocole à suivre pour l'acquisition des images y est également donné.

6.1 Expériences et motivation

Nous avons montré que la microscopie GSH est une technique très utile pour l'imagerie des tissus biologiques et que celle-ci peut être améliorée en la combinant à l'interférométrie. Cette amélioration permet de retrouver la phase du signal GSH à chaque pixel dans l'image, ce qui révèle l'orientation relative des structures non centrosymétriques dans la zone imagée. Cet avantage, que l'on retrouve déjà avec la microscopie PFM, est fort utile pour la microscopie GSH. Notre premier objectif consiste donc à réaliser un montage de microscopie GSH interférométrique. Ce montage sera d'abord testé avec un cristal de quartz et un cristal périodiquement orienté comme matériaux imagés, pour démontrer qu'il fonctionne correctement.

Nous avons également expliqué que la microscopie GSH interférométrique a été très peu utilisée dans les tissus biologiques. Elle n'a pas encore servi à mettre en évidence la différence de phase entre la GSH des différentes structures qui composent les tissus. Nous comptons donc utiliser ce nouveau montage pour l'imagerie des tissus biologiques, en insistant sur l'interprétation des images obtenues de la phase du signal GSH. Les tissus que nous avons choisis d'imager sont les tissus musculaires et les tissus de collagène comme le fascia et le tendon dans lesquels les fibrilles sont alignées parallèlement. La structure du $\chi^{(2)}$ dans les muscles est connue, est bien définie et contient une inversion de polarité au niveau des filaments de myosine, ce qui en fait le tissu idéal pour démontrer que la microscopie GSH interférométrique peut être employée dans les tissus biologiques. La structure du $\chi^{(2)}$ dans les tissus de collagène, comme le fascia et le tendon, est complexe et beaucoup plus aléatoire. Il est donc souhaitable d'utiliser la microscopie

GSH interférométrique dans ce genre de tissu pour se servir des images obtenues dans ceux-ci afin d'expliquer le phénomène de GSH dans les tissus de collagène.

Les images GSH interférométriques obtenues dans le tendon et le fascia fourniront des résultats supplémentaires qui devraient supporter l'une ou l'autre des deux hypothèses de l'interprétation des images GSH du collagène (fibrilles avec polarité aléatoire vs fibrilles avec un $\chi^{(2)}$ distribué en cylindre), qui ont été expliquées au chapitre quatre. Après avoir définitivement choisi l'hypothèse qui est la plus plausible, nous serons en mesure de développer un modèle des tissus de collagène. Ce modèle permettra d'obtenir des résultats théoriques qui seront comparés aux résultats expérimentaux pour confirmer s'il est valable ou non. À l'aide des résultats expérimentaux et de ce modèle, il sera donc possible de trouver une explication précise à l'origine du signal GSH dans les tissus de collagène. Cette explication permettra finalement d'interpréter correctement les images GSH de ces tissus.

6.2 Conversion du montage en microscope GSH interférométrique

Au début du projet, nous disposions d'un microscope GSH et de deux sources laser dans notre laboratoire. Cette sous-section présente ceux-ci et explique les choix qui ont été faits et les méthodes qui ont été employées pour convertir le montage en microscope GSH interférométrique. Nous décrivons également le montage final qui a servi à l'acquisition des images GSH interférométrique qui seront exposées dans les résultats au prochain chapitre.

6.2.1 Ancien montage

Nous disposons de deux sources laser au laboratoire d'imagerie. Celles-ci sont montrées dans la photographie de la figure 6.1. La première est un oscillateur titane-saphir modèle Tsunami de chez Spectra-Physics. Ce laser émet un train d'impulsions avec un taux de répétition de 80 MHz. Ce taux de répétition peut être ajusté et fixé à une fréquence très précise, ce qui permet de le synchroniser avec un autre laser, pour la microscopie CARS, ou de l'employer comme source pour pomper un oscillateur paramétrique optique, mais cela n'est pas requis pour la microscopie GSH. La puissance moyenne de ce laser peut atteindre 3 W lorsque sa longueur d'onde centrale

est près de 800 nm. La durée des impulsions lumineuses qu'il émet est d'environ 100 fs, ce qui correspond à un spectre d'une largeur d'environ 10 nm. Cette source permet donc d'atteindre une irradiance très élevée durant le passage d'une impulsion, même si la puissance moyenne du laser n'est pas si grande. Sa longueur d'onde centrale peut être accordée entre 700 et 1000 nm, ce qui en fait une source de lumière très versatile pour différentes applications nécessitant une source de lumière infrarouge offrant une bonne puissance moyenne et des impulsions brèves. Cela explique d'ailleurs pourquoi les lasers titane-saphir sont répandus en recherche.

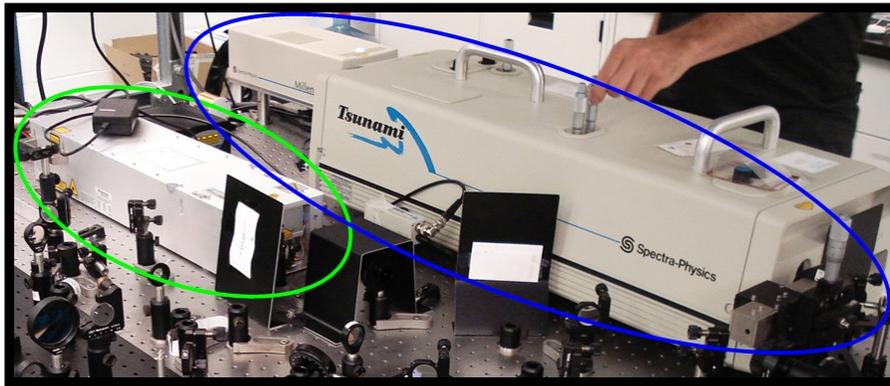


Figure 6.1 Les sources lasers du laboratoire. La boîte encerclée en bleu est un oscillateur titane-saphir modèle Tsunami de chez Spectra-Physics. Ce laser émet un train d'impulsions à 80 MHz et peut atteindre une puissance moyenne de 3 W lorsque sa longueur d'onde centrale est près de 800 nm. Sa longueur d'onde centrale peut être accordée entre 700 et 1000 nm et la durée de ses impulsions est d'environ 100 fs. La boîte encerclée en vert est un oscillateur Nd :YVO₄ modèle Vanguard de chez Spectra-Physics. Ce laser émet un train d'impulsions à environ 80 MHz et atteint une puissance moyenne de 4 W. Sa longueur d'onde centrale est centrée à 1064 nm et la durée de ses impulsions est d'environ 15 ps.

La seconde source laser est un oscillateur Nd :YVO₄ modèle Vanguard de chez Spectra-Physics. Ce laser émet un train d'impulsions avec un taux de répétition fixe d'environ 80 MHz. Sa puissance moyenne peut atteindre 4 W et sa longueur d'onde centrale est centrée à 1064 nm. La durée des impulsions lumineuses qu'il émet est d'environ 15 ps, ce qui correspond à un spectre d'une largeur de moins d'un nanomètre. Cette source est moins versatile que la première et la durée de ses impulsions est plus longue. Cela fait en sorte qu'elle est moins efficace pour générer des phénomènes optiques non linéaires, mais elle offre cependant une meilleure cohérence temporelle pour l'interférométrie, ce qui s'avère intéressant dans le cadre de ce projet.

La source titane-saphir sert principalement à la GSH, à la fluorescence par absorption de deux photons et à pomper un oscillateur paramétrique optique pour la GTH. La source Nd :YVO₄ sert principalement à la microscopie CARS en la synchronisant avec l'autre source.

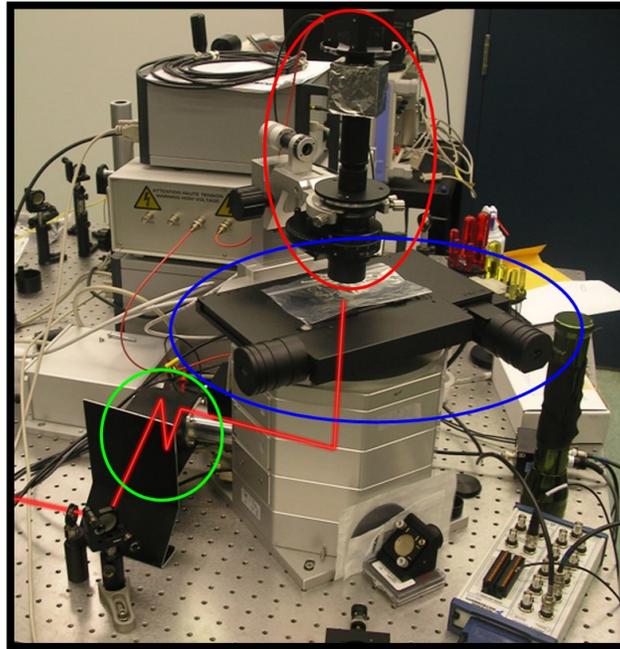


Figure 6.2 Ancien montage du microscope optique non linéaire. Le trajet en rouge du faisceau laser jusqu'à l'échantillon a été rajouté sur l'image. Celui-ci passe par une boîte (encerclée en vert) qui contient deux miroirs galvanométriques avant d'entrer dans la boîte de forme octogonale qui est le squelette du microscope. Un miroir placé à 45° au fond du microscope renvoie le faisceau vers le haut jusqu'à l'objectif de microscope qui focalise le faisceau dans le matériau imagé fixé sur une lame de microscope supportée par la plateforme de translation (encerclée en bleu). Plusieurs lentilles, à l'intérieur du microscope, se trouvent sur le trajet du faisceau laser. L'objectif de microscope est caché juste au dessous du sac ziploc dans la photographie. Des miroirs dichroïques peuvent être ajoutés dans le trajet du faisceau pour collecter un signal dans la direction arrière. Comme le montre la portion encerclée en rouge, le montage original a été modifié pour que le condenseur puisse collecter le signal dans la direction avant et l'acheminer jusqu'à un détecteur fixé au dessus du microscope. Les quatre boîtes grises empilées à l'arrière servent à contrôler les composants électroniques du microscope. Le tout est contrôlé par un ordinateur par l'intermédiaire d'un programme LabVIEW avec une interface graphique. Les images obtenues par le montage sont sauvegardées directement sur l'ordinateur.

Le microscope original était un montage commercial conçu par Till Photonics (maintenant connu sous le nom de FEI) pour la microscopie en fluorescence par absorption multiphotonique. Celui-ci avait déjà subi quelques modifications, réalisées au courant de ma maîtrise, pour être en mesure de collecter le signal dans la direction avant, afin de pouvoir être utilisé pour la microscopie GSH, GTH et CARS. La figure 6.2 montre une photographie du montage original.

Le schéma des différentes composantes de ce montage est très similaire à celui qui a été présenté à la figure 2.7 du chapitre deux.

Le faisceau laser doit être aligné pour entrer dans une boîte (encerclée en vert dans la figure 6.2) qui contient deux miroirs galvanométriques qui balayent le faisceau laser dans deux directions orthogonales. Un miroir concave entre les miroirs galvanométriques fait en sorte que le faisceau n'est pas décalé du centre du deuxième miroir suite au balayage du premier miroir, ce qui causerait un effet d'astigmatisme. Après les miroirs galvanométriques, un système de lentilles de balayage se trouve dans le tube qui relie la boîte des miroirs galvanométriques au squelette octogonal du microscope. Un miroir placé à 45° au centre du fond du microscope réfléchit le faisceau à la verticale. Le faisceau traverse ensuite une lentille de tube pour arriver collimé et centré à l'arrière de l'objectif de microscope qui sert à l'illumination du matériau imagé. Les surfaces des différentes lentilles contenues dans le microscope sont recouvertes de couches minces pour optimiser la transmission de la lumière infrarouge. Entre la lentille de tube et l'objectif de microscope, deux étages superposés du squelette du microscope contiennent des chariots motorisés conçus pour héberger différents miroirs dichroïques ou miroirs métalliques, afin de rediriger la lumière dans la direction arrière vers une caméra CCD ou vers un tube photomultiplicateur. Une plateforme rotative permet d'héberger jusqu'à quatre objectifs de microscope différents qui peuvent être interchangeables au cours d'une expérience (voir figure 6.3). Nous utilisons principalement deux modèles d'objectifs de microscope sur ce microscope. Le premier est un objectif Olympus UPLSAPO 20X qui a une distance de travail de 0,6 mm et une ouverture numérique de 0,75. Le second est un objectif Olympus UAPO 40X qui a une distance de travail de 0,25 mm et une ouverture numérique de 1,15. Une goutte d'eau doit être ajoutée entre la lame de microscope et l'objectif avec ce dernier. Un moteur mécanique et un moteur piézoélectrique permettent de contrôler, avec une très grande précision, la distance entre l'objectif de microscope et le matériau imagé. Le matériau imagé est soutenu par une lame de microscope posé sur une plateforme de translation (encerclée en bleu dans la figure 6.2), au dessus de l'objectif de microscope. La plateforme de translation permet de déplacer le matériau imagé avec une précision micrométrique pour prendre des images à différents endroits dans celui-ci. Au dessus du matériau imagé se trouve un condenseur supporté par une pince dont la hauteur peut être grossièrement ajustée. Ce condenseur collecte le signal dans la direction avant et contient, intégré dans son trajet optique, un iris et une roulette pouvant héberger jusqu'à cinq

filtres optiques différents. Une pièce adaptatrice fabriquée à l'atelier de l'INRS permet de fixer des tubes au condenseur (encadré en rouge dans la figure 6.2). Ces tubes peuvent contenir des filtres optiques additionnels. Une caméra CCD ou un tube photomultiplicateur peuvent être fixés au bout des tubes, pour collecter la lumière émise dans la direction avant. Ce paragraphe résume le fonctionnement de l'aspect optique du microscope.

Le microscope requiert également trois boîtes pour fonctionner. L'une d'entre elles sert à contrôler les miroirs galvanométriques, tandis que les deux autres, qui sont reliées à l'ordinateur, servent à contrôler les moteurs, les composantes électroniques du microscope et la synchronisation du système lors de l'acquisition d'une image. La caméra CCD est branchée directement à l'ordinateur et génère facilement des images à l'aide du programme qui la fait fonctionner, mais le processus pour obtenir des images avec un tube photomultiplicateur est plus complexe. Lorsque celui-ci collecte des photons, il produit un courant. Une source de tension variable l'alimente et permet d'amplifier grandement le signal très faible qui est obtenu. Le courant à la sortie du tube photomultiplicateur est envoyé dans un amplificateur qui est branché sur un panneau National Instrument relié à la carte d'acquisition des données de l'ordinateur. Le mouvement des miroirs galvanométriques responsables du balayage du faisceau est synchronisé avec l'acquisition des données par l'ordinateur. Pour chaque pixel de l'image, une valeur moyenne des données brutes, qui se rapportent à celui-ci, est calculée pour déterminer son intensité. Une image est finalement reconstituée par l'ordinateur de cette façon. Les images sont sauvegardées dans un dossier temporaire et les images intéressantes peuvent être sauvegardées manuellement de manière permanente en format TIF. Les fichiers TIF peuvent contenir une image unique ou encore une "pile" d'images, ce qui est fort utile pour visualiser un volume dans le matériau imagé.

L'ordinateur permet de contrôler le microscope à l'aide d'un programme LabVIEW offrant une interface graphique. Sans expliquer son fonctionnement trop en détail, ce programme complexe réalise l'initialisation du microscope au démarrage, permet de contrôler les différentes pièces motorisées dans le microscope, permet de définir les paramètres du balayage pour l'acquisition des images, s'occupe du fonctionnement du microscope durant l'acquisition d'une image et offre également certaines fonctionnalités pour automatiser l'acquisition des données lors d'une expérience. Autre information pertinente, la gamme dynamique de l'intensité à chaque pixel dans

nos images va de 0 à 32767 comptes en utilisant un tube photomultiplicateur, tandis qu'elle ne va que de 0 à 255 comptes avec notre caméra CCD. Il est donc possible de quantifier la différence de signal, entre des zones où cette différence est très grande, en utilisant un tube photomultiplicateur pour l'acquisition d'une image. Une image de 500×500 pixels peut être acquise en quelques secondes avec ce système. Ces paragraphes résument le fonctionnement de l'aspect électronique du microscope.

6.2.2 Conversion du montage

Comme mentionné à la fin du chapitre cinq, la mauvaise transmission du faisceau GSH de référence par les lentilles de balayage dans le microscope et le déphasage supplémentaire causé par le balayage du faisceau nous ont poussés à adopter une configuration où le faisceau suit un trajet fixe et où le matériau imagé est déplacé pour effectuer le balayage. Cette méthode permet d'éviter ces deux problèmes, mais implique de sacrifier la vitesse d'acquisition des images. En effet, le temps d'acquisition d'une image avec une plateforme de translation passe de quelques secondes à quelques minutes, à cause de l'accélération et de la décélération de la plateforme qui est beaucoup moins rapide que celle des miroirs galvanométriques. En fin de compte cette solution a été difficile et longue à implémenter et n'était peut être pas la meilleure, mais elle s'est avérée être la plus sûre pour bien comprendre et maîtriser le montage.

Pour transformer l'ancien montage, notre plan était tout simplement de contourner l'ancien système de balayage en faisant passer le faisceau laser par un autre chemin dans le microscope. Nous avons évité les miroirs galvanométriques et toutes les lentilles de balayage contenues dans le microscope, en installant un miroir métallique à 45° dans l'un des chariots qui contient normalement des miroirs dichroïques. Ainsi, le faisceau est réfléchi à la verticale, directement vers l'arrière de l'objectif de microscope, sans subir de déviation. En théorie, cette solution est toute simple et fonctionne bien, mais en pratique, nous avons perdu plusieurs mois de travail à cause du miroir à 45° . Le miroir que nous avons commandé était défectueux. Une certaine courbure à sa surface ajoutait un effet d'astigmatisme important dans le microscope. Après avoir finalement identifié ce problème, le miroir a été remplacé et le montage a pu fonctionner correctement.

Nous avons également dû acheter une nouvelle plateforme de translation pour porter et déplacer le matériau imagé. Le modèle que nous avons choisi est une plateforme de translation motorisée MLS203 de chez Thorlabs. Celle-ci est plus rapide et plus précise que l'ancienne, mais surtout, son déplacement peut être synchronisé avec l'acquisition des données collectées par le tube photomultiplicateur. Une plaque de métal percée a été fabriquée à l'atelier de l'INRS afin de pouvoir fixer la nouvelle plateforme de translation au squelette de l'ancien montage, puisque la position des trous pour les vis ne correspondait pas pour ces deux pièces (voir figure 6.3).

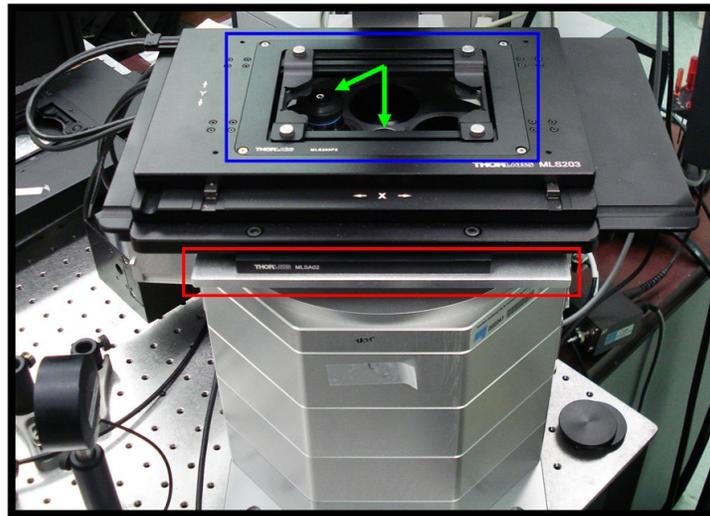


Figure 6.3 Nouvelle plateforme de translation du microscope pour le balayage du matériau imagé. La plaque de métal encadrée en rouge a été fabriquée à l'atelier de l'INRS et permet de fixer la nouvelle plateforme de translation au squelette de l'ancien montage. Le porte-échantillon est encadré en bleu. Les flèches vertes indiquent la position des objectifs de microscope qui peuvent être utilisés pour l'imagerie. La flèche verte verticale dans l'image pointe sur l'objectif de microscope qui se trouve sur le trajet du faisceau laser dans le microscope.

Une fois la nouvelle plateforme installée, le programme LabVIEW du microscope a dû être altéré pour pouvoir fonctionner avec celle-ci. De nouvelles fonctions ont dû être programmées pour pouvoir réaliser le balayage et la reconstitution d'images avec la plateforme de translation. Ce fut l'occasion pour moi d'apprendre LabVIEW et de découvrir dans ses détails le fonctionnement du programme original (commenté en allemand !). J'ai ensuite programmé, testé et débogué les nouvelles fonctions requises. La synchronisation de l'acquisition des données avec le mouvement de la plateforme de translation a posé un problème, mais nous sommes arrivés à le résoudre avec l'aide des concepteurs de la plateforme. En fin de compte, la modification du programme a été une tâche d'envergure qui a pris plusieurs mois à accomplir,

mais le résultat en a valu la peine. La figure 6.4 montre la comparaison d'une image GSH d'un cristal périodiquement orienté prise avec un balayage des miroirs galvanométriques et avec un balayage de la nouvelle plateforme de translation. Comme on peut voir dans la seconde image, mis à part quelques déformations subtiles dues à de petites fluctuations de la vitesse de la plateforme de translation, les images obtenues ont une résolution spatiale similaire et sont de qualité comparable. Nous avons donc réussi à fabriquer notre propre système de balayage pour notre microscope GSH interférométrique, tout en contournant l'ancien. Plus de détails sur le fonctionnement du nouveau programme LabVIEW du microscope sont expliqués dans l'annexe C.

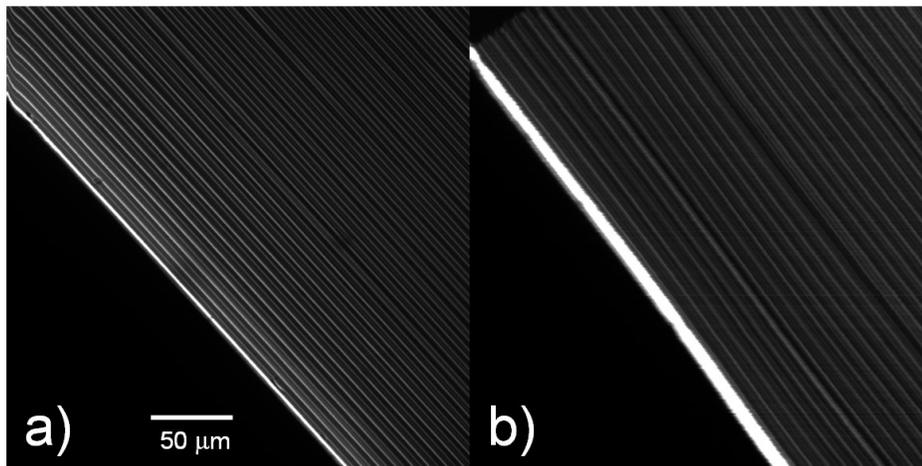


Figure 6.4 Image GSH d'un cristal périodiquement orienté de $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$. (a) Image acquise avec le système de balayage des miroirs galvanométriques. (b) Image acquise avec le balayage de la nouvelle plateforme de translation. Les images obtenues ont une résolution spatiale similaire et sont de qualité comparable.

Différentes configurations de montage ont été testées pour l'interféromètre avant de choisir celle qui serait utilisée pour réaliser ce projet. Nous avons pu constater qu'en pratique, il est très difficile d'obtenir un interféromètre stable en utilisant une configuration Mach-Zehnder comme celle présentée à la figure 5.3a. Or, pour mesurer correctement la phase de la GSH dans un tissu, la relation de phase entre la GSH de référence et le faisceau laser doit rester stable durant toute la durée de l'acquisition des images, c'est-à-dire durant plusieurs heures. Nous avons donc rapidement décidé d'abandonner cette configuration pour adopter celle présentée à la figure 5.2c. Comme expliqué au chapitre cinq, cette configuration d'interféromètre dans laquelle le faisceau

laser et le faisceau GSH de référence restent superposés sur le même trajet est extrêmement robuste et stable. Il s'agit donc du meilleur choix de configuration pour obtenir des résultats précis.

Dans cet interféromètre, le faisceau est focalisé près de l'interface d'un cristal de quartz par une lentille avec une longueur focale assez courte. Ce cristal de quartz est une plaque polie de 350 μm d'épaisseur. Son axe optique Y est normal à sa surface et ce cristal joue le rôle de source GSH de référence. Lorsque la polarisation du laser est orientée le long de l'axe optique X du cristal, un signal GSH important est obtenu, tandis qu'en orientant la polarisation le long de l'axe optique Z du cristal, le signal GSH diminue et devient pratiquement nul. Le quartz est monté dans une pièce optomécanique de rotation pour que le cristal puisse être réorienté par rapport à la polarisation du laser. Cela permet de faire passer très rapidement le microscope du mode GSH standard à GSH interférométrique et vice versa. De plus, une plateforme de translation linéaire permet d'approcher ou d'éloigner l'interface du cristal de quartz de référence du point focal du laser, pour obtenir plus ou moins de signal GSH de référence.

Le faisceau laser et le faisceau GSH de référence sont superposés et doivent ensuite être collimés. Pour obtenir un effet achromatique et pour éviter d'ajouter de la dispersion dans l'interféromètre, il est préférable d'utiliser un miroir concave plutôt qu'une lentille pour la collimation des faisceaux. Nous avons pu identifier deux options. La première est de dévier les faisceaux avec un miroir en forme de "D" vers un miroir sphérique concave qui collime les faisceaux. Il est également possible d'utiliser un miroir parabolique hors-axe pour accomplir le même effet, mais ce type de miroir est plus difficile à aligner correctement. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode la plus simple, soit un miroir sphérique concave.

Il fallait ensuite choisir une méthode pour contrôler la phase relative entre le faisceau laser et le faisceau GSH de référence. Nous avons considéré trois options.

1. La première était l'usage d'une plaque de verre rotative sur le trajet des faisceaux, puisque cette méthode est simple et efficace pour contrôler la différence de phase. Celle-ci ne requiert aucun alignement supplémentaire et ajoute très peu de dispersion dans l'interféromètre. Elle cause cependant un léger décalage latéral des faisceaux, mais sans changer leur alignement. Cela ne devrait avoir qu'un effet négligeable sur les résultats.

Toutefois, la relation entre l'angle de la plaque et la différence de phase n'est pas linéaire et doit donc être caractérisée.

2. La seconde option était de tout simplement utiliser une ligne à délai. Cette option n'ajoute pas de dispersion dans le montage, ni de décalage, à condition que la ligne à délai soit bien alignée. De plus, la relation entre le mouvement de la ligne à délai et la différence de phase est linéaire. Toutefois, cette méthode demande un alignement du montage très rigoureux pour fonctionner correctement.
3. La troisième option était d'ajouter un modulateur de phase optique dans le trajet. Celle-ci est beaucoup plus complexe à réaliser que les deux autres, puisqu'elle requiert de la programmation supplémentaire et une synchronisation de l'acquisition des images avec la modulation de phase appliquée. Cette option est toutefois plus payante à long terme, puisque le montage serait en mesure de faire le traitement des données, pour trouver la phase de la GSH, durant l'acquisition des images. Cependant, la dispersion supplémentaire, qui est ajoutée dans l'interféromètre par le modulateur de phase avec cette méthode, peut poser un problème.

En fin de compte, nous avons choisi d'utiliser la première méthode, soit la plaque de verre rotative, pour obtenir plus tôt nos premières images GSH interférométrique dans les tissus. Nous avons utilisé une plaque de verre BK7 d'une épaisseur de 1,5 mm montée sur une plateforme rotative motorisée. Cette épaisseur de verre est suffisante pour obtenir le déphasage nécessaire pour réaliser la microscopie GSH interférométrique. La ligne à délai reste toutefois une méthode intéressante qui permettrait d'avoir une relation simplifiée entre la phase et le mouvement de la ligne à délai, tandis que l'usage d'un modulateur de phase serait sans doute une amélioration importante qui pourrait être apportée au montage dans le futur.

Le dernier choix important qu'il reste est celui de la source laser. Indépendamment de la longueur d'onde exacte du laser et du modèle d'objectif de microscope qui sont utilisés, l'objectif de microscope ajoute quelques picosecondes de dispersion entre les impulsions du laser et celles de la GSH de référence. Si aucun mécanisme de compensation de la dispersion n'est ajouté dans l'interféromètre, il faut nécessairement utiliser la source laser Vanguard pour obtenir un contraste interférométrique. Les impulsions du laser Tsunami, bien que plus intéressante pour

la GSH, sont tout simplement trop courtes pour l'interférométrie à moins d'ajouter un mécanisme de compensation de la dispersion. Nous avons donc pris la décision, pour garder le montage simple et pour obtenir plus tôt nos premières images GSH interférométriques dans les tissus, de ne pas compenser la dispersion pour la première version fonctionnelle du montage et d'utiliser la source laser Vanguard de 15 ps à 1064 nm. Les images qui seront présentées au dernier chapitre ont donc été acquises en utilisant cette source. Toutefois, l'ajout d'un mécanisme de compensation de la dispersion, comme celui présenté à la figure 5.3b, qui permettrait d'utiliser la source laser Tsunami, serait une amélioration importante à apporter au montage.

Cette amélioration au montage a d'ailleurs été réalisée par mes collègues Charles-André Couture et Stéphane Bancelin durant la rédaction de cette thèse [155]. Ils ont employé des cristaux de calcite et le montage présenté à la figure 5.3b pour y arriver. Pour une longueur d'onde laser de 810 nm et GSH de 405 nm, une épaisseur de 2,5 mm de calcite est nécessaire dans l'interféromètre pour compenser la dispersion avec l'objectif UPLSAPO 20X. Cela correspond à 8,33 ps de dispersion entre les impulsions laser et GSH. La même dispersion serait obtenue dans 5,52 cm de verre fused silica. Par calcul, il est donc possible d'estimer que la dispersion serait d'environ 4,22 ps entre un laser à 1064 nm et sa GSH à 532 nm. Ce résultat est cohérent avec l'observation d'un contraste interférométrique, même sans compenser la dispersion, avec le laser Vanguard, qui produit des impulsions d'une durée d'environ 15 ps. Finalement, pour une longueur d'onde laser de 810 nm et GSH de 405 nm, une épaisseur de 2,0 mm de calcite est nécessaire dans l'interféromètre pour compenser la dispersion avec l'objectif UAPO 40X. Cela correspond à 6,67 ps de dispersion entre les impulsions laser et GSH, ce qui équivaut à 4,42 cm de verre fused silica. La dispersion serait donc d'environ 3,38 ps entre un laser à 1064 nm et sa GSH à 532 nm. Il est donc possible avec ce nouveau montage, qui compense la dispersion, d'utiliser le laser Tsunami à 810 nm. Cela permet d'augmenter d'un facteur 100 la quantité de signal GSH, en plus d'améliorer le contraste interférométrique en compensant la dispersion (ce qui permet d'avoir $v_{temporel} = 1$, voir équation 5.2). Un article contenant des résultats dans le cartilage obtenus avec cette nouvelle version du montage a été publié vers la fin de la rédaction de cette thèse [158].

6.2.3 Montage du microscope GSH interférométrique

Différents éléments du montage ont été décrits séparément. Voici donc une récapitulation de la configuration et du fonctionnement du montage final qui a servi à l'acquisition des images GSH interférométriques qui seront présentées au prochain chapitre. La figure 6.5 montre un schéma du montage dans son ensemble.

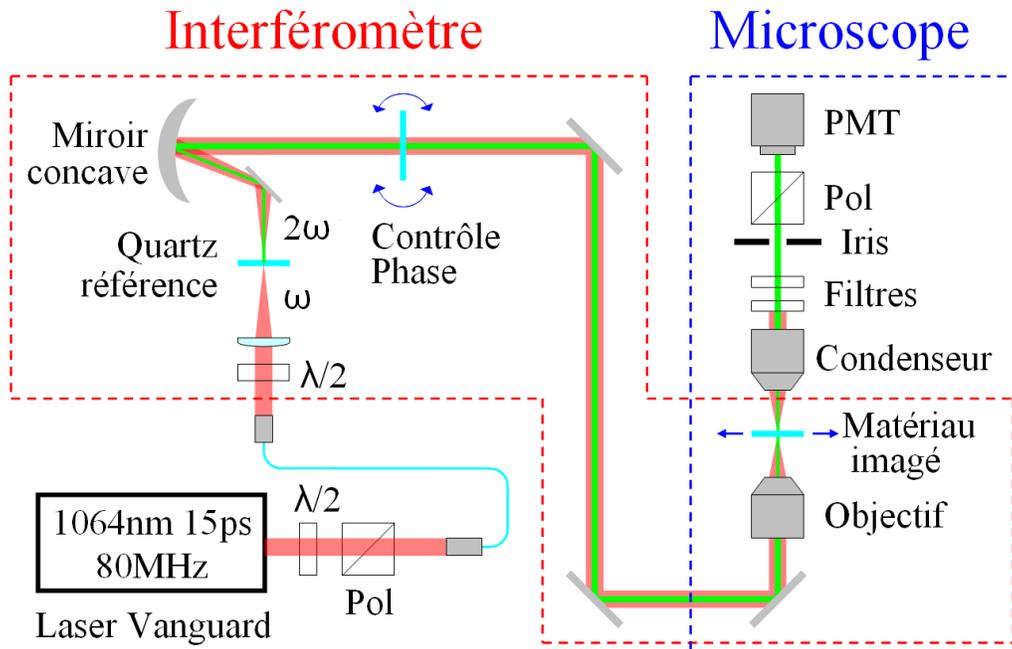


Figure 6.5 (a) Schéma du montage du microscope GSH interférométrique. Une fibre optique collecte et guide le faisceau laser jusqu'à l'interféromètre. Le faisceau traverse ensuite l'interféromètre (voir figure 6.6 et chapitre cinq) avant d'être envoyé dans le microscope. Les faisceaux sont réfléchis par un miroir vers l'objectif de microscope et suivent un trajet fixe dans le microscope. Le matériau imagé est déplacé par la plateforme de translation pour balayer le point focal des faisceaux dans la zone imagée. Le signal GSH de référence interfère avec le signal GSH du matériau imagé dans celui-ci. Les faisceaux sont ensuite collectés par un condensateur dans la direction avant. Ils sont filtrés pour ne laisser passer que le signal GSH. Un iris et un polariseur aident ensuite à améliorer le contraste interférométrique, avant que le signal GSH soit collecté par un tube photomultiplicateur pour reconstituer l'image GSH interférométrique de la zone imagée.

Tout d'abord, le laser Vanguard produit un faisceau formé d'un train d'impulsions d'une durée d'environ 15 ps à 1064 nm (voir figure 6.1). Sa puissance est ajustée par une lame demi-onde et un polariseur. Le faisceau est ensuite collecté et guidé par une fibre optique pour être envoyé jusqu'à l'interféromètre. Cela permet également de filtrer spatialement le faisceau laser et d'obtenir un beau mode pour la GSH et l'interférométrie. La figure 6.6 montre quelques

photographies de l'interféromètre qui a été construit pour le microscope. À l'entrée de celui-ci, une lame demi-onde permet de réorienter la polarisation. Le faisceau est focalisé à proximité de la première interface du cristal de quartz de référence, par une lentille d'une longueur focale de 5 cm. Le cristal de référence est une plaque de quartz de 350 μm d'épaisseur. Son axe optique Y est normal à ses deux surfaces planes polies. Le cristal de quartz de référence peut être tourné autour de cet axe pour aligner la polarisation de la GSH de référence avec celle du matériau imagé, ou encore pour rapidement retirer ou remettre le signal GSH de référence. Le cristal de quartz peut être avancé ou reculé par rapport à la position du point focal pour ajuster la puissance du signal GSH de référence. Le faisceau laser et le faisceau GSH de référence divergent ensuite en suivant le même trajet. Ils sont redirigés par un miroir plan en forme de "D" vers un miroir sphérique concave ayant une longueur focale de 10 cm, pour être collimés de manière achromatique. Les faisceaux traversent ensuite une plaque de verre BK7 d'une épaisseur de 1,5 mm montée sur une plateforme rotative motorisée (voir figure 6.6b). Celle-ci permet de contrôler la différence de phase relative entre les deux faisceaux. Deux miroirs plans servent ensuite à aligner le faisceau dans le microscope (voir figure 6.6d). Un troisième miroir plan, situé dans l'un des chariots motorisés à l'intérieur du microscope, permet de réfléchir les faisceaux à la verticale vers l'arrière de l'objectif de microscope. Ce trajet permet d'éviter les lentilles et les miroirs galvanométriques de l'ancien système de balayage. Un système de détection du signal arrière pourrait également être incorporé dans l'autre chariot du microscope, mais nous n'en avons pas besoin pour nos expériences. L'objectif de microscope collecte ensuite les deux faisceaux et les focalise simultanément dans le matériau imagé. Le matériau imagé est fixé à une lame de microscope portée par la nouvelle plateforme de translation (voir figure 6.3). La plateforme permet de déplacer le matériau imagé pour trouver une zone d'intérêt et permet aussi de balayer le matériau imagé pour faire l'acquisition d'une image. Le signal GSH de référence interfère avec le signal GSH du matériau, dans le matériau imagé. Le signal GSH résultant de l'interférence est ensuite collecté par un condenseur dans la direction de propagation avant. Des filtres servent à bloquer le faisceau laser et à ne laisser passer que la GSH. L'iris compris dans le condenseur peut être utilisé pour améliorer le contraste interférométrique. Un polariseur est placé avant le détecteur pour maximiser le contraste interférométrique. Le polariseur est orienté pour laisser passer le maximum de GSH. Le signal GSH est finalement collecté par un tube

photomultiplicateur qui sert à prendre les mesures qui permettront à l'ordinateur de reconstituer les images GSH interférométrique.

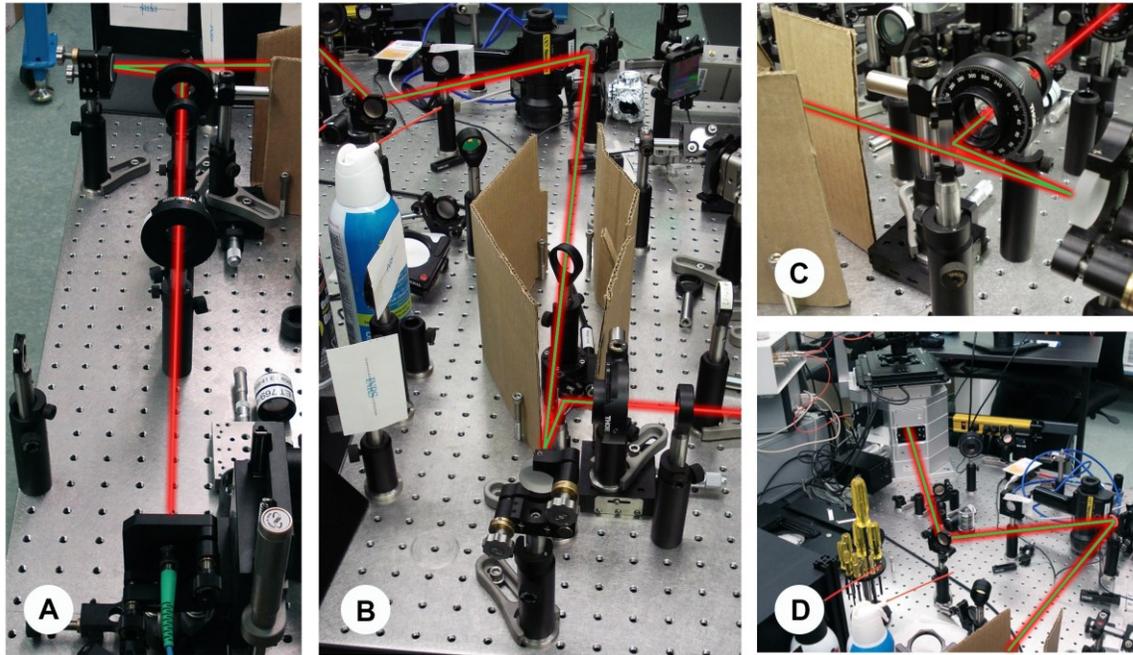


Figure 6.6 Trajet du faisceau laser dans l'interféromètre et jusqu'au microscope pour le montage final du microscope GSH interférométrique. Le trajet en rouge correspond à celui du faisceau laser. Celui en rouge et vert correspond à la superposition du faisceau laser et du faisceau de GSH de référence. Ces trajets ont été rajoutés manuellement sur les images. (a) Le faisceau laser est collimé par une lentille à la sortie d'une fibre optique. Il traverse une lame demi-onde avant de continuer sa route vers l'interféromètre. (b) Le faisceau laser est focalisé près de l'interface du cristal de quartz de référence par une lentille ayant une longueur focale de 5 cm. Le cristal de quartz peut être tourné ou déplacé vers l'avant ou l'arrière pour ajuster la puissance du signal GSH de référence. Le faisceau laser et le faisceau de GSH de référence sont superposés et divergent vers un miroir en forme de "D" qui les redirige vers un miroir sphérique concave. Ce dernier a une longueur focale de 10 cm et collime les faisceaux superposés simultanément et de manière achromatique. Les faisceaux traversent ensuite la plaque de verre de contrôle de la phase installée entre les deux murs en carton. (c) Autre point de vue des composantes décrites en (b). (d) Deux miroirs servent finalement à aligner les faisceaux superposés dans le microscope. Les faisceaux entrent dans le microscope par une ouverture qui permet de contourner le système de miroirs galvanométriques. Ils sont focalisés par l'objectif de microscope dans le matériau imagé où il y a interférence et le signal GSH obtenu est ensuite détecté dans la direction avant par un tube photomultiplicateur.

6.3 Préparation des tissus

Plusieurs matériaux ont été sélectionnés pour être imagés avec le microscope GSH interférométrique. Un cristal de quartz et un cristal périodiquement orienté de niobate de lithium

peuvent être tout simplement collés sur une lame de microscope pour être imagés, mais les tissus biologiques demandent une certaine préparation. Pour réaliser nos expériences, nous avons accès à du muscle de souris, du tendon de queue de souris, du tendon humain et du fascia de souris. Ces différents tissus ont été coupés en minces couches qui ont été fixées sur des lames de microscope. L'usage de minces couches réduit les effets de dispersion de la lumière dans le tissu imagé. De plus, cela permet d'assurer que la relation de phase entre le faisceau laser et le faisceau GSH de référence soit maintenue durant leur propagation à travers le tissu imagé, afin de retrouver avec précision la phase optique du signal GSH du matériau, φ_{mat} .

Un échantillon de tissu a été collecté du muscle gastrocnémien médial d'une souris et a immédiatement été fixé dans une solution 4% formaldéhyde. Le tissu a été enrobé dans un mélange de résine et de glycol ("Tissue-Tek® Optimal Cutting Temperature Compound", Sakura® Finetek) avant d'être gelé de manière instantanée. Le tissu n'a pas été déshydraté ou marqué avant d'être gelé et coupé. Le tissu a ensuite été coupé en fines tranches d'une épaisseur de 20 μm par un microtome cryostat (Leica CM3050 S). Les tranches ont été fixées sur une lame de microscope, coincées entre la lame de microscope et une lamelle de microscope collées ensemble avec du vernis à ongle.

Des échantillons de tissus ont été collectés du tendon de la queue d'une souris mâle C57/B6 de 8 semaines. Ils ont été fixés dans une solution 4% formaldéhyde pour 6~8 heures à 4 °C. Ils ont ensuite été coupés en pièces d'une longueur d'environ 5 mm à l'aide d'un scalpel. La couche de peau a été retirée et les compartiments de tendon ont été ouverts et exposés avec précautions à l'aide d'un microscope de dissection Nikon. Après avoir été extraits, les échantillons de tendon ont été collés sur des lames de microscope d'une épaisseur de 0,15 mm. D'autres échantillons de tendon ont été enrobés dans un mélange de résine et de glycol ("Tissue-Tek® Optimal Cutting Temperature Compound", Sakura® Finetek) avant d'être gelés pour ensuite être coupés en fines tranches d'une épaisseur de 10 μm par un microtome cryostat (Leica CM3000). Ces tranches ont également été collées sur des lames de microscope d'une épaisseur de 0,15 mm.

Des échantillons de tendons ischio-jambier humains ont été récupérés des tissus restants d'une opération de reconstruction du ligament croisé antérieur. Les tissus ont été gelés de manière instantanée et ont ensuite été découpés en fines tranches d'une épaisseur de 10 μm par un

microtome cryostat. Les tranches ont été fixées sur une lame de microscope, coincées entre la lame de microscope et une lamelle de microscope. Cela permet d'isoler les échantillons de tissus du milieu extérieur, ce qui est préférable pour les tissus humains, pour des raisons de sécurité.

La couche de fascia du muscle tibial antérieur d'une souris C57BL/6 a été collectée avec précautions à l'aide d'un microscope de dissection Nikon. Le tissu a été fixé dans une solution 4% formaldéhyde durant 1~2 heures à 4 °C. La lame de microscope sur laquelle le fascia a été transféré a d'abord été traitée avec une solution de gélatine et d'alun de chrome pour que le tissu adhère à sa surface. Une pièce d'environ 3 mm × 3 mm de fascia a ensuite été transférée sur celle-ci. L'épaisseur d'un tissu de fascia est déjà d'approximativement 10 µm, ce qui explique pourquoi l'usage d'un microtome n'a pas été requis pour la préparation de cet échantillon.

6.4 Protocole d'acquisition des images

Pour réaliser une expérience d'imagerie d'un matériau à l'aide du microscope GSH interférométrique, il est nécessaire de suivre un certain protocole. Sans trop s'attarder sur les détails, il faut débiter en démarrant les lasers, l'ordinateur et les boîtes du microscope. En ouvrant le programme du microscope sur l'ordinateur, le microscope s'initialisera pour être prêt à recevoir des commandes et à fonctionner. L'étape suivante consiste à vérifier l'alignement des faisceaux. Différents iris et repères sur le trajet du laser permettent de vérifier que l'alignement est bon. Si ce n'est pas le cas, des miroirs sur le trajet du laser permettent de le corriger. Le faisceau laser doit être particulièrement bien aligné pour entrer dans la fibre optique, lorsqu'il est collimé par le miroir sphérique concave et à l'entrée du microscope. Pour vérifier que l'alignement dans le microscope est optimal, il faut s'assurer que le faisceau passe par le centre de l'arrière de l'objectif de microscope et qu'il soit centré sur un point que nous avons dessiné au plafond du laboratoire, au dessus du microscope. Ce point au plafond est positionné vis-à-vis d'une ligne imaginaire verticale centrée sur l'objectif de microscope. Il est également possible d'utiliser la caméra CCD après les filtres optiques, avec le faisceau GSH de référence, pour aider à compléter l'alignement des faisceaux.

La prochaine étape consiste à déposer une pièce de quartz à la position du matériau imagé. L'objectif de microscope est approché du quartz pour obtenir un signal GSH. Cela permet de

connaître approximativement à quelle hauteur l'objectif devra être situé pour l'imagerie du matériau imagé durant l'expérience. Cela permet également de réaliser la caractérisation de la plaque de verre pour vérifier si l'on a bel et bien de l'interférence entre la GSH du quartz de référence et la GSH du quartz situé à la position du matériau imagé. L'interférence de la GSH des deux pièces de quartz en fonction de l'angle de la plaque de verre suivra approximativement la formule suivante

$$I(2\omega) = C_1 + C_2 \cos \left[4\pi \frac{D}{\lambda} \left(n_{2\omega} \cos \left(\arcsin \left[\frac{\sin(\theta)}{n_{2\omega}} \right] \right) - n_{\omega} \cos \left(\arcsin \left[\frac{\sin(\theta)}{n_{\omega}} \right] \right) \right) + \Phi \right]. \quad (6.1)$$

Dans cette équation, C_1 et C_2 sont des variables pour ajuster la courbe théorique aux valeurs expérimentales, D est l'épaisseur de la plaque de verre, λ est la longueur d'onde du laser, $n_{2\omega}$ et n_{ω} sont les indices de réfraction de la plaque de verre à 2ω et à ω , θ est l'angle entre la plaque de verre et les faisceaux tandis que Φ est une constante de différence de phase.

La figure 6.7 montre un exemple du résultat expérimental et de la courbe théorique, basée sur l'équation 6.1, de la caractérisation de l'interférence de la GSH en fonction de l'angle de la plaque de verre. Cette caractérisation a été réalisée avec la plaque de verre BK7 de 1,5 mm d'épaisseur et le laser Vanguard (laser à 1064 nm et GSH à 532 nm). On peut voir que la phase varie très lentement lorsque l'angle θ est près de 0° , mais qu'elle varie plus rapidement pour des angles plus grands. Dans l'exemple de la figure 6.7, il est possible d'obtenir un déphasage de plus de 3π dans l'interférence en tournant la plaque de verre d'un angle compris entre 10° et 30° . Ce déphasage est amplement suffisant pour nos besoins durant l'expérience de microscopie GSH interférométrique.

Les courbes sont inversées entre la figure 6.7a et 6.7b, car entre les deux expériences, le quartz de référence a subi une rotation de 180° autour de l'axe parallèle à la direction de propagation du faisceau laser. Cette inversion de l'orientation du cristal correspond à une inversion du signe du $\chi^{(2)}$ du cristal de quartz de référence, ce qui entraîne également une inversion de l'interférence. Soulignons que la plaque de verre est montée sur une plateforme motorisée pour contrôler son angle avec précision, afin d'obtenir la bonne phase de référence. Une plateforme de rotation contrôlée manuellement n'était pas assez précise et n'était pas assez rapide pour réaliser

adéquatement la microscopie GSH interférométrique. Une fonction du nouveau programme LabVIEW du microscope permet de faire automatiquement l'acquisition des courbes de la figure 6.7.

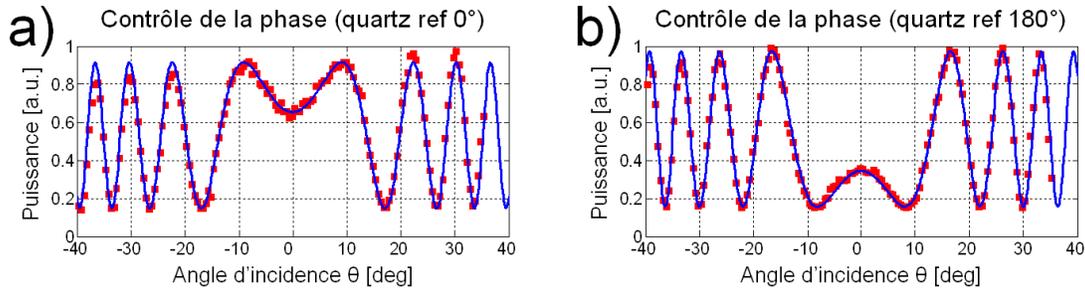


Figure 6.7 Interférence de la GSH à 532 nm entre le quartz de référence et le quartz situé à la position du matériau imagé en fonction de l'angle de la plaque de verre de BK7 d'une épaisseur de 1,5 mm. Les points en rouge correspondent aux mesures expérimentales, tandis que la courbe en bleu est une courbe théorique, basée sur l'équation 6.1 et ajustée pour épouser les valeurs expérimentales. (a) En tournant la plaque de verre entre 10° et 30°, un déphasage de plus de 3π dans l'interférence peut être obtenu, ce qui est amplement suffisant pour réaliser la microscopie GSH interférométrique. (b) Une rotation du cristal de quartz de référence de 180° autour de l'axe parallèle à la direction de propagation du faisceau laser entraîne une inversion du signe de son $\chi^{(2)}$, ce qui cause une inversion de l'interférence.

Après que la caractérisation de la plaque de verre soit complétée, l'expérience d'imagerie débute. Le quartz utilisé pour la caractérisation est retiré et le matériau imagé est placé dans le microscope. En installant la lame de microscope sur laquelle se trouve le matériau imagé dans le porte-échantillon de la plateforme de translation, il est important qu'il n'y ait pas de jeu afin que la lame de microscope reste immobile dans le porte-échantillon. La plateforme de translation accélère assez rapidement lors de l'imagerie et un jeu entraînerait un déplacement de la zone imagée qui serait néfaste durant l'expérience. Il faut s'assurer que l'orientation de la polarisation du laser, l'orientation du quartz de référence et l'orientation du polariseur soient ajustées correctement pour l'expérience, par rapport à l'orientation du matériau imagé.

Le quartz de référence est tourné de 90° pour qu'il n'y ait pas de signal GSH de référence. Le matériau est imagé en microscopie GSH standard pour trouver une zone d'intérêt dans celui-ci. La puissance laser au point focal généralement utilisée pour l'imagerie est comprise entre 10 mW et 100 mW. Le voltage appliqué sur le tube photomultiplicateur pour amplifier le signal est généralement compris entre 500 V et 800 V. Lorsqu'une ou plusieurs zones d'intérêts ont été

identifiées et imagées, le quartz de référence est à nouveau tourné de 90° pour passer en mode interférométrique. Après avoir descendu l'objectif pour focaliser en dehors du matériau imagé, il est utile d'ajuster la puissance du signal GSH de référence, pour qu'elle soit comparable à celle du signal GSH du matériau imagé. Une fois cette étape complétée, le point focal est ramené dans le matériau imagé en remontant l'objectif et l'on procède à l'acquisition des images GSH interférométriques dans une zone d'intérêt du matériau. Puisque l'acquisition des images peut prendre plusieurs heures, il est préférable d'acquérir en série les images qui seront soustraites ensemble à l'étape du traitement des images. Par exemple, les images à une phase de référence de 0° , de 180° et de 360° sont d'abord acquises. Ensuite les images à une phase de référence de 30° , de 210° et de 390° . Ensuite 60° , 240° et 420° , etc. Cette manière de procéder fait en sorte de minimiser l'impact sur les résultats que causerait une déformation des images durant l'expérience. Cette déformation des images pourrait être causée par un mouvement ou une déformation du matériau imagé ou encore une déviation infime du faisceau laser durant l'acquisition. Une fonction du nouveau programme LabVIEW du microscope permet de faire automatiquement l'acquisition de toutes les images GSH interférométriques dans le bon ordre, en tournant la plaque de verre entre chaque prise d'image. Une fois que les images GSH interférométriques brutes sont obtenues, elles sont sauvegardées sur l'ordinateur pour ensuite être traitées, comme expliqué à la section 5.4. Cela permet d'obtenir les images du contraste interférométrique et finalement l'image de la phase relative du signal GSH du matériau dans la zone d'intérêt (voir annexe B).

6.5 Conclusion

La conversion de l'ancien montage en microscope GSH interférométrique n'a pas été une tâche facile. Plusieurs choix ont dû être faits pour obtenir un montage fonctionnel sur lequel certaines améliorations peuvent encore être apportées. Ce montage nous a tout de même permis de réaliser les différentes expériences pour vérifier nos hypothèses. Les méthodes de préparation des différents tissus imagés et le protocole à suivre pour l'acquisition des images dans ceux-ci, avec le nouveau montage, ont également été expliqués.

7 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette section regroupe la présentation des résultats obtenus avec leurs interprétations. Les premiers résultats présentés sont ceux de l'imagerie d'un cristal périodiquement orienté. Les résultats qui suivent sont ceux de l'imagerie des tissus musculaires. Finalement, les résultats de l'imagerie des tissus de collagène sont donnés. Un modèle est ensuite suggéré pour décrire la GSH dans ces tissus. Ce modèle est mis à l'épreuve par des simulations et les résultats de celles-ci sont présentés. Les résultats des simulations sont comparés avec les images obtenues afin de déterminer si ce modèle est valide.

7.1 Microscopie GSH interférométrique du PPLN

Pour démontrer que notre microscope GSH interférométrique fonctionne, il a d'abord servi à l'imagerie de cristaux non centrosymétriques. Le quartz cristallin a un $\chi^{(2)}$ homogène et ne donne pas des images très intéressantes, puisqu'il y a très peu de variations dans le signal en focalisant à différents points près de l'interface du cristal. Nous n'avons donc pas pris d'images GSH interférométriques dans le quartz cristallin. Nous nous sommes contentés des résultats des expériences préliminaires (revoir figure 5.7) et de la caractérisation de la plaque de verre (revoir figure 6.7), qui démontrent qu'il y a bel et bien interférence dans le second cristal de quartz. Un cristal de niobate de lithium périodiquement orienté (PPLN) a un $\chi^{(2)}$ hétérogène et est un candidat beaucoup plus intéressant pour l'imagerie en microscopie GSH interférométrique [50]. Les domaines ayant des $\chi^{(2)}$ opposés devraient apparaître avec une différence de phase de π dans les images obtenues. Nous nous sommes donc servis de ce matériau comme premier candidat pour tester le microscope.

Des images en microscopie GSH standard ont d'abord été prises à la surface du cristal pour identifier une zone d'intérêt contenant plusieurs domaines ayant des $\chi^{(2)}$ opposés (figure 7.1). Dans l'image de la figure 7.1a, les cinq zones carrées, dans lesquelles le cristal a été périodiquement orienté, sont clairement identifiables. Cette très grande image montre l'un des avantages du balayage à l'aide d'une plateforme de translation. Le champ de vision n'est limité que par le mouvement de la plateforme, tandis que pour un balayage du faisceau, il est limité par

l'objectif de microscope. À partir de cette image, une zone propre du cristal est sélectionnée pour prendre des images avec une meilleure résolution et un agrandissement plus important, afin d'obtenir des images où les domaines du cristal sont bien visibles (figure 7.1b-c). Il peut sembler surprenant que les interfaces des domaines soient visibles dans les images GSH standard du PPLN. Ce phénomène s'explique principalement par le fait que la condition d'accord de phase est différente lorsque le faisceau est fortement focalisé au cœur d'un domaine du cristal par rapport à lorsqu'il est focalisé à l'interface de deux domaines. Il se peut aussi que des dénivellations micrométriques à la surface du cristal, entre les domaines, contribuent à créer un contraste de signal GSH entre ceux-ci.

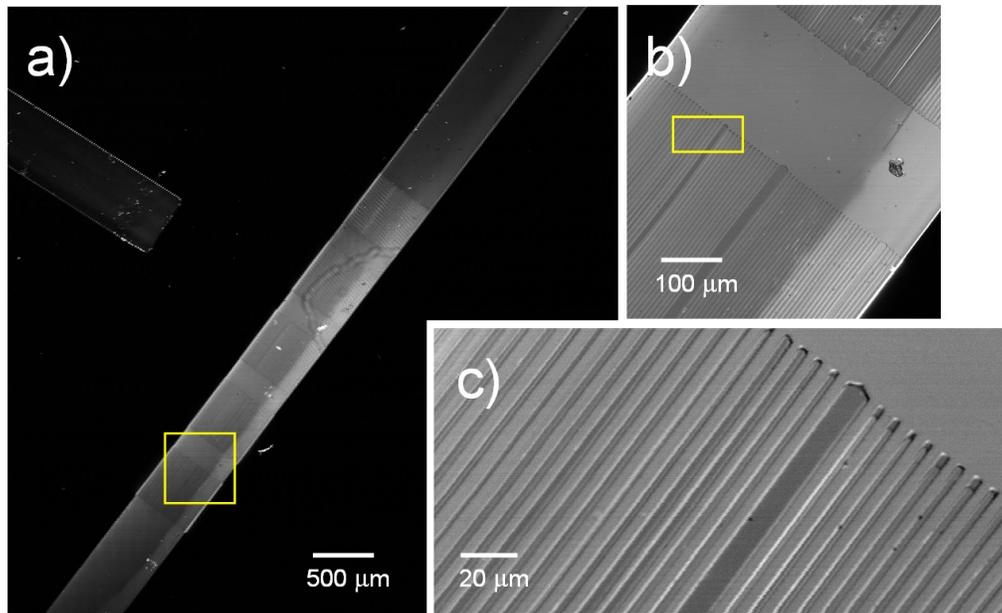


Figure 7.1 (a) Image GSH de $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ de la surface d'un cristal de niobate de lithium périodiquement orienté (PPLN). Les cinq zones périodiquement orientées sont facilement identifiables. (b) Image GSH de $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ de la surface du cristal (zoom sur la zone encadrée en jaune de l'image (a)). (c) Image GSH de $200\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ de la surface du cristal (zoom sur la zone encadrée en jaune de l'image (b)). Les limites des domaines dans la zone périodiquement orientée sont visibles.

Après l'acquisition des images GSH standard, la même zone d'intérêt est imagée en microscopie GSH interférométrique. La figure 7.2 présente les images brutes du PPLN en microscopie GSH interférométrique, prises à différentes phases de référence. Dans celles-ci, il est facile de distinguer les endroits où l'interférence est constructive ou destructive. Une inversion de l'interférence se produit lorsque la phase de référence passe de 150° à 180° et de 330° à 360° .

Les images pour lesquelles l'interférence est la plus forte sont celles où la phase de référence est de 90° et de 270° . En traitant ces images pour isoler le contraste interférométrique, comme illustré précédemment à la figure 5.5, les images du contraste interférométrique du PPLN sont obtenues (figure 7.3). Les domaines opposés sont plus apparents dans ces images puisqu'ils sont de couleurs différentes. Le contraste interférométrique est maximal pour les phases de référence 90° et 270° tandis qu'il est minimal pour 180° et 360° . Les images du contraste interférométrique ayant une phase de référence décalée de π sont identiques, mais avec des couleurs inversées. Notez que la phase de référence 0° est fixée de manière arbitraire, ce qui fait en sorte que la valeur donnée comme phase de référence pour une image en particulier n'a pas vraiment de signification. Toutefois, la différence de phase de référence entre différentes images a une signification importante et sert à l'interpolation de la phase du signal GSH dans la zone imagée.

À première vue, le traitement des images ne semble pas apporter grand-chose en comparant les images de la figure 7.2 à celles de la figure 7.3, mais cela est dû au fait que le signal GSH est très uniforme dans un cristal PPLN, ce qui fait en sorte qu'il est facile d'identifier à quel endroit l'interférence est constructive ou destructive dans les images de la figure 7.2. Lorsque le signal GSH n'est pas uniforme, comme dans un tissu biologique, cette identification est beaucoup moins évidente et le traitement des images pour isoler le contraste interférométrique devient extrêmement important pour identifier rapidement et précisément quelles structures interfèrent constructivement ou destructivement dans les images. C'est la principale raison pour laquelle le traitement des images qui permet d'isoler le contraste interférométrique est une étape importante de l'analyse des résultats.

Comme expliqué au chapitre 5, le contraste interférométrique en fonction de la phase de référence varie en suivant une fonction sinusoïdale (revoir équation 5.3d). C'est bel et bien ce qui est observé expérimentalement dans la figure 7.3. La figure 7.4b le démontre puisque, en faisant varier la phase de référence, la moyenne du contraste interférométrique expérimental de la région encadrée en jaune dans la figure 7.4c, représentée sur le graphique par des carrés rouges et des carrés verts, suit bel et bien une courbe théorique sinusoïdale, tracée en bleu sur le graphique.

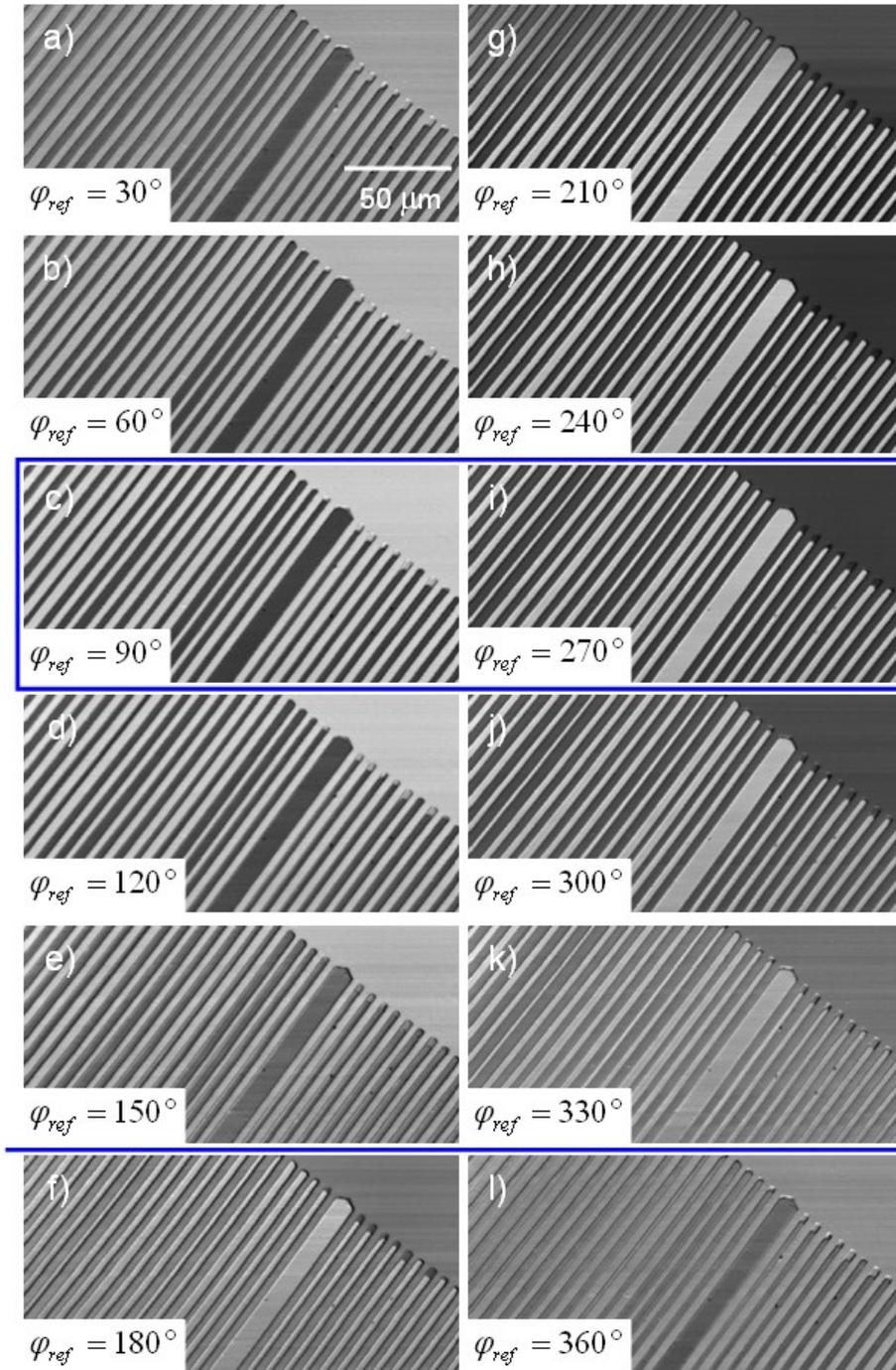


Figure 7.2

Images GSH interférométrique brutes de la zone imagée dans la figure 7.1c ($200\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$), prises à différentes phases de référence. (a-l) La phase de référence pour chaque image est indiquée en bas à gauche de celle-ci. Elle varie par bonds de 30° entre chaque image. Les domaines où il y a interférence constructive ou destructive sont bien visibles. L'interférence est plus importante dans les images (c) et (i) encadrées en bleu. Les zones d'interférences constructives et destructives s'inversent entre les images séparées du trait bleu, c'est-à-dire en passant de l'image (e) à (f) et en passant de l'image (k) à (l).

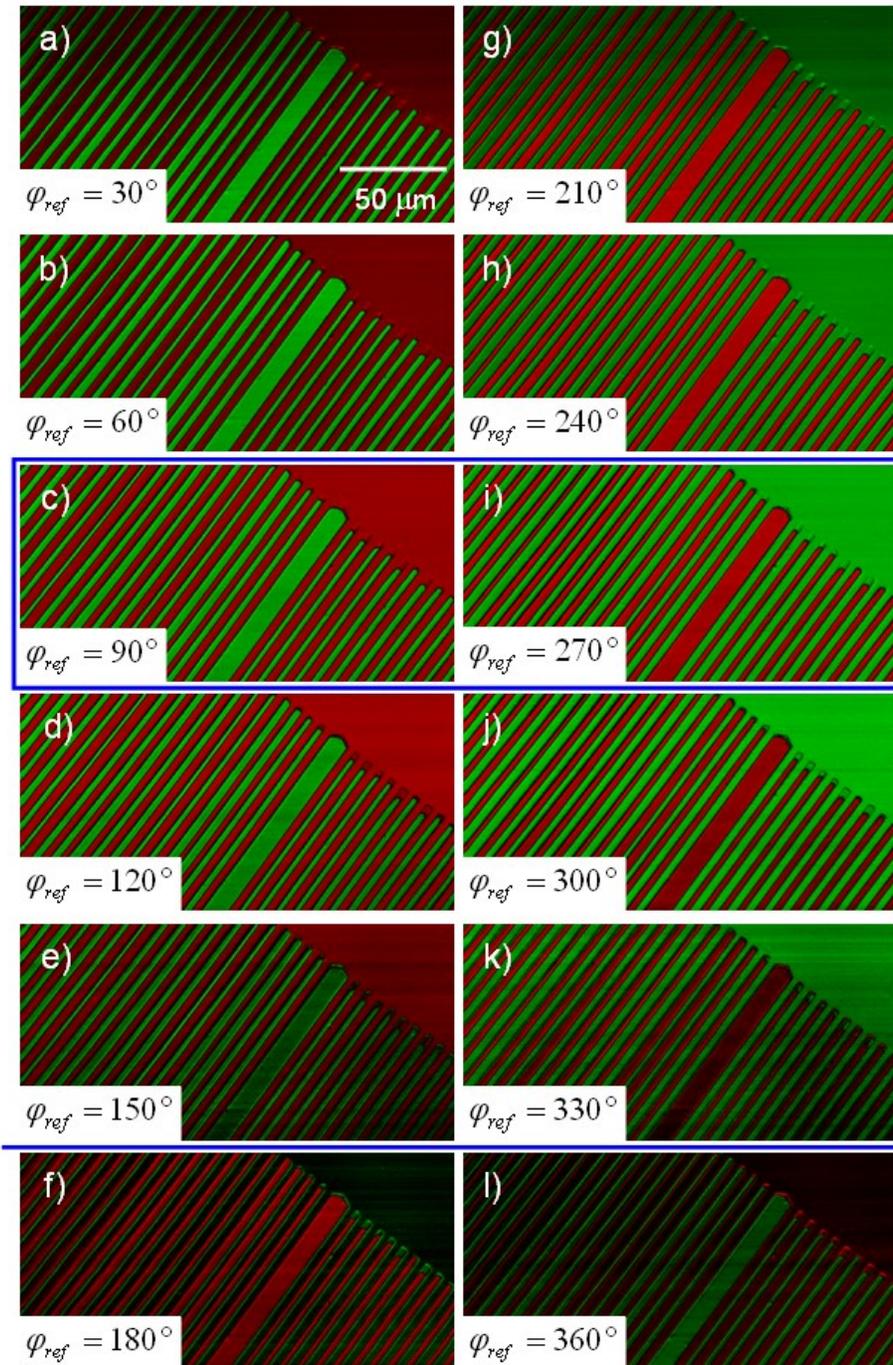


Figure 7.3

Images GSH interférométrique traitées de la zone imagée dans la figure 7.1c ($200\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$), pour différentes phases de référence. (a-l) La phase de référence pour chaque image est indiquée en bas à gauche de celle-ci. Les domaines où il y a interférence constructive ou destructive sont bien identifiés en rouge et vert. L'interférence est plus importante dans les images (c) et (i) encadrées en bleu. Les zones d'interférences constructives et destructives s'inversent entre les images séparées du trait bleu, c'est-à-dire en passant de l'image (e) à (f) et en passant de l'image (k) à (l). Les images de la colonne de gauche et de droite ont des phases opposées de π ce qui fait en sorte qu'elles sont identiques, mais avec des couleurs inversées.

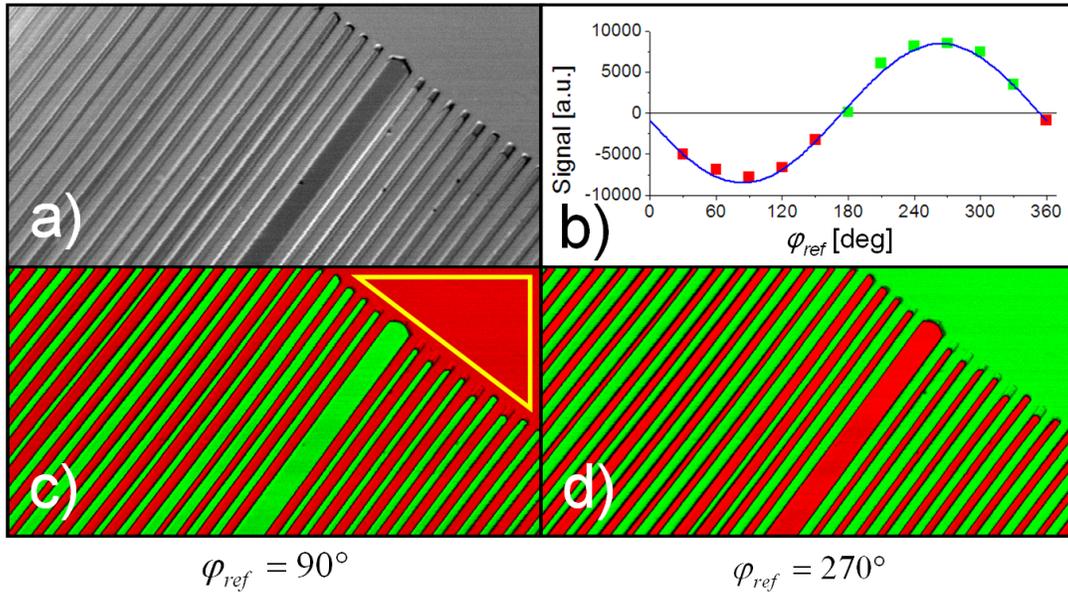


Figure 7.4 Cette figure est tirée de [159 (voir figure 3)]. (a) Image GSH de $200 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ de la surface d'un cristal PPLN. (b) La moyenne du contraste interférométrique, dans la région encadrée en jaune dans l'image (c), varie sinusoidalement en fonction de la phase de référence, φ_{ref} . (c-d) Images GSH du contraste interférométrique pour les phases de référence (c) $\varphi_{ref} = 90^\circ$ et (d) $\varphi_{ref} = 270^\circ$, pour lesquelles le contraste est maximal.

À partir des images du contraste interférométrique, l'image de la phase relative du signal GSH est calculée (figure 7.5a). Cette image contient les valeurs de la phase du signal GSH à chaque pixel. Elle permet de voir que la phase du signal GSH reste très uniforme à l'intérieur des domaines et s'inverse à la frontière entre ceux-ci. Les domaines bleus et mauves semblent toutefois être davantage bleus dans le haut de l'image et mauves dans le bas de l'image. Il doit donc y avoir un très léger décalage de phase le long de l'axe y de l'image, causé par une inclinaison angulaire très faible entre la surface du cristal et le plan imagé.

Cette image permet également de construire un histogramme de la distribution de la phase (figure 7.5b), semblable à ceux obtenus en microscopie PFM qui ont été présentés à la figure 4.21. Chaque pixel de celle-ci est compté dans la colonne de l'historgramme associée à sa phase. La largeur des colonnes est choisie pour obtenir à la fois une bonne résolution sur la phase et un nombre de comptes élevé par colonne pour que la distribution ait un aspect moins bruité. Le même procédé est répété pour construire un second histogramme avec une dimension supplémentaire. Cet histogramme donne la distribution des pixels en fonction de leur phase et de leur contraste interférométrique (figure 7.5c).

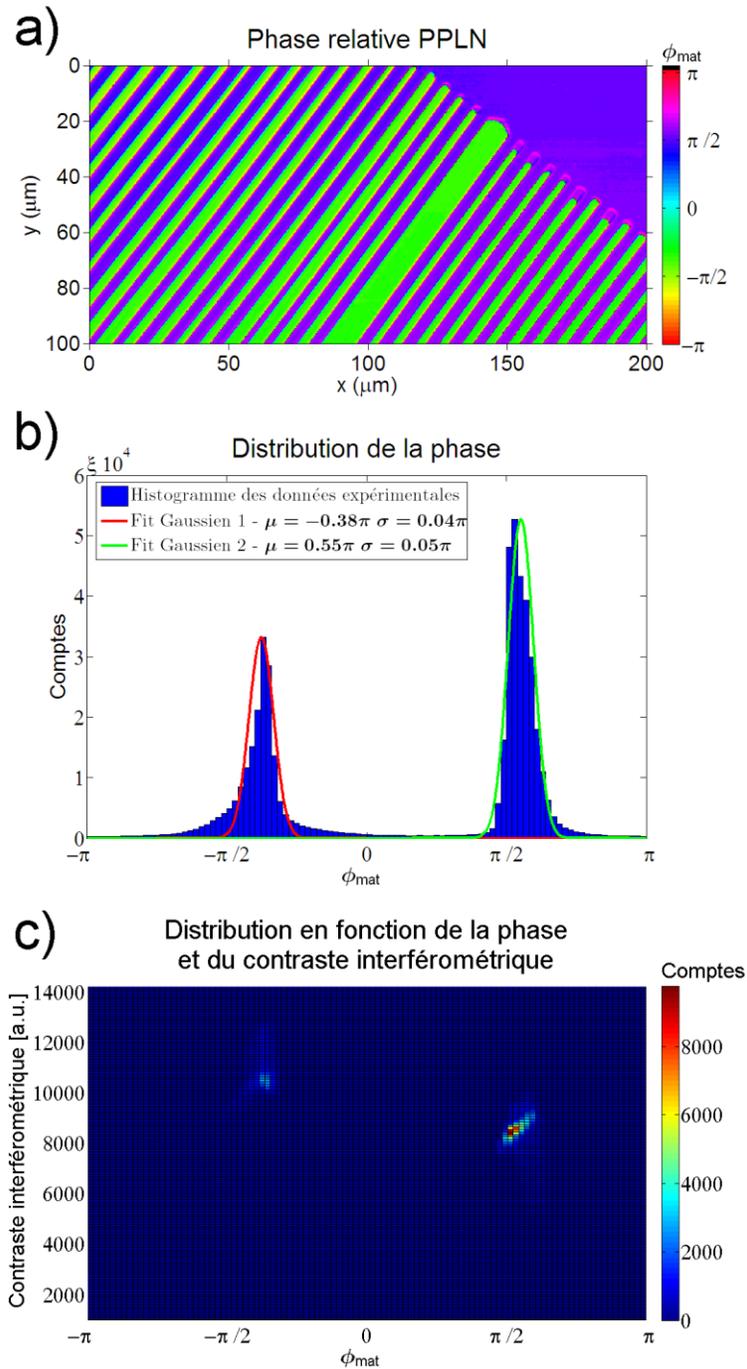


Figure 7.5

(a) Image de la surface d'un cristal périodiquement orienté présentant la phase interpolée à chaque pixel dans la zone imagée. Une inspection attentive de l'image révèle que la phase varie rapidement et passe par 0 ou $\pm\pi$ à l'interface des domaines. (b) Histogramme de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase. (c) Histogramme 2D de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase et du contraste interférométrique. Les domaines ont une phase très uniforme centrée près de $-0,38\pi$ (domaines verts) et de $0,55\pi$ (domaines mauves). L'écart type de la distribution de la phase pour les deux pics obtenus est d'environ $0,045\pi$ et la distance entre ces deux pics est d'environ $0,93\pi$. Le contraste interférométrique est très élevé partout dans l'image.

L'histogramme de la figure 7.5b contient deux pics bien distincts. En faisant correspondre des courbes gaussiennes sur ces pics, on obtient des informations supplémentaires sur la distribution. Le pic rouge (associé aux domaines verts) est centré près de $-0,38\pi$ (-68°) et a un écart type d'environ $0,044\pi$, tandis que le pic vert (associé aux domaines mauves) est centré près de $0,55\pi$ (99°) et a un écart type d'environ $0,045\pi$. Le pic vert est plus haut que le rouge, car les domaines mauves sont un peu plus larges que les domaines verts et à cause de la portion en haut à droite de l'image. Les deux pics sont très étroits et l'écart type est petit, ce qui démontre quantitativement que la phase du signal GSH reste très uniforme à l'intérieur des domaines. Toutefois, l'écart entre les pics est de $0,93\pi$, ce qui n'est pas exactement π comme on s'attendrait. L'histogramme révèle qu'en fait, le contraste interférométrique est maximal dans les domaines mauves pour les phases de référence près de 90° et 270° , tandis qu'il est maximal dans les domaines verts pour les phases de référence près de 60° et 240° . En réexaminant la figure 7.3 de plus près, il semble que ce soit bel et bien le cas. Ce déphasage de 13° dans la phase entre les domaines est dû à une dénivellation submicrométrique à la surface du cristal entre ceux-ci. En effet, une gravure chimique en surface est souvent réalisée sur les cristaux PPLN pour créer une dénivellation qui rend la forme de leurs domaines plus facilement visible. Le cristal PPLN étudié dans cette expérience avait été gravé durant sa fabrication avant qu'il nous soit livré. En étudiant attentivement une pile d'images GSH prises à des plans espacés d'un micron près de la surface du PPLN, il est possible de voir grossièrement cette dénivellation entre les domaines, puisque le signal GSH est maximal à des hauteurs légèrement différentes dans la pile d'images pour des domaines adjacents. D'ailleurs, cela explique pourquoi un contraste est obtenu entre les domaines en microscopie GSH standard. Il serait nécessaire d'imager la surface du cristal en microscopie AFM pour confirmer cette hypothèse hors de tout doute. La caractérisation de la surface du cristal en microscopie AFM permettrait également d'établir une corrélation entre la profondeur de la dénivellation et la grandeur du déphasage. Cela mettrait en évidence le pouvoir de résolution axial de l'interférométrie qui devrait être significativement inférieur à la grandeur de la longueur d'onde. Dernière observation importante, la figure 7.5c démontre que le contraste interférométrique est très élevé partout dans le cristal PPLN.

Le montage a également été utilisé pour prendre des images GSH interférométrique dans des conditions différentes. Comme le montre la figure 7.6a, il est possible d'obtenir une bonne image du contraste interférométrique, même en balayant une zone plus grande. Le montage fonctionne

également en utilisant un objectif de microscope différent, comme le montre l'image du contraste interférométrique de la figure 7.6b. Notez qu'en changeant d'objectif de microscope au cours d'une expérience, le trajet optique des faisceaux dans l'interféromètre du microscope est altéré. La phase de référence pour laquelle le contraste interférométrique est maximal dépend donc de l'objectif de microscope utilisé. C'est pour cette raison que le contraste interférométrique maximal est obtenu à $\varphi_{ref} = 90^\circ$ dans l'image 7.6a et à $\varphi_{ref} = 0^\circ$ dans l'image 7.6b.

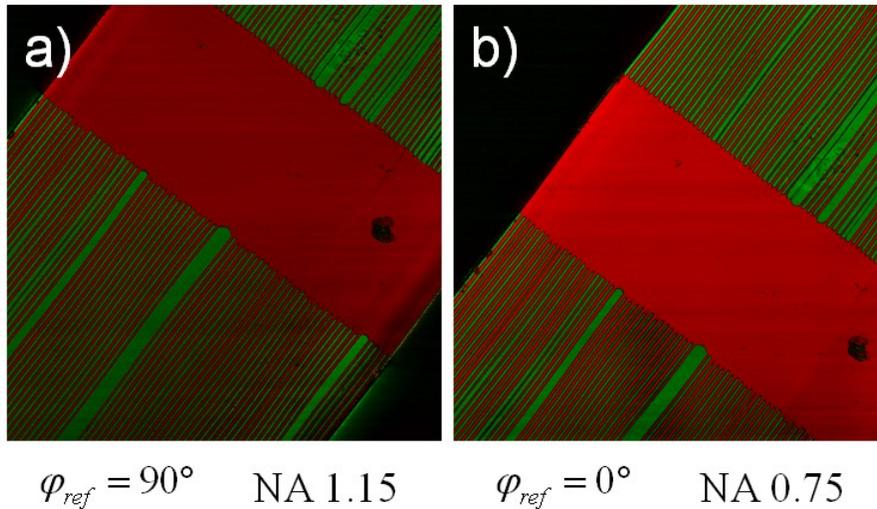


Figure 7.6 La microscopie GSH interférométrique peut également être employée pour imager des régions plus grandes, comme le montrent ces deux images du contraste interférométrique de $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$. (a) Image du contraste interférométrique maximal avec l'objectif UAPO 40X NA 1.15 à une phase de référence $\varphi_{ref} = 90^\circ$. (b) Image du contraste interférométrique maximal avec l'objectif UPLSAPO 20X NA 0.75 à une phase de référence $\varphi_{ref} = 0^\circ$. La phase de référence pour le contraste interférométrique maximal est différente pour ces deux cas puisque les objectifs de microscope causent un déphasage différent dans le trajet optique de l'interféromètre.

Nous avons également vérifié si le contraste interférométrique peut être amélioré en réduisant l'ouverture numérique de collection du signal GSH. Les images de la figure 7.7a-c ont été acquises alors que l'iris du système de collection du signal GSH était complètement ouvert, tandis que les images de la figure 7.7d-f ont été acquises alors qu'il était partiellement refermé, afin de réduire l'ouverture numérique de collection. Les images ont été prises aux phases de référence qui donnent un contraste interférométrique maximal, $\varphi_{ref} = 90^\circ$ (figure 7.7a,d) et $\varphi_{ref} = 270^\circ$ (figure 7.7b,e). Les deux images du contraste interférométrique sont présentées en utilisant une échelle de teintes de gris identique (figure 7.7c,f), où noir désigne un contraste interférométrique négatif, gris désigne un contraste interférométrique nul et blanc désigne un

contraste interférométrique positif. On observe que le contraste interférométrique est nul en dehors du cristal PPLN, dans les deux triangles gris en haut à gauche et en bas à droite des images de la figure 7.7. Il est également possible de voir que le contraste interférométrique est légèrement meilleur dans les images du bas de la figure 7.7 (iris fermé) par rapport aux images du haut (iris ouvert).

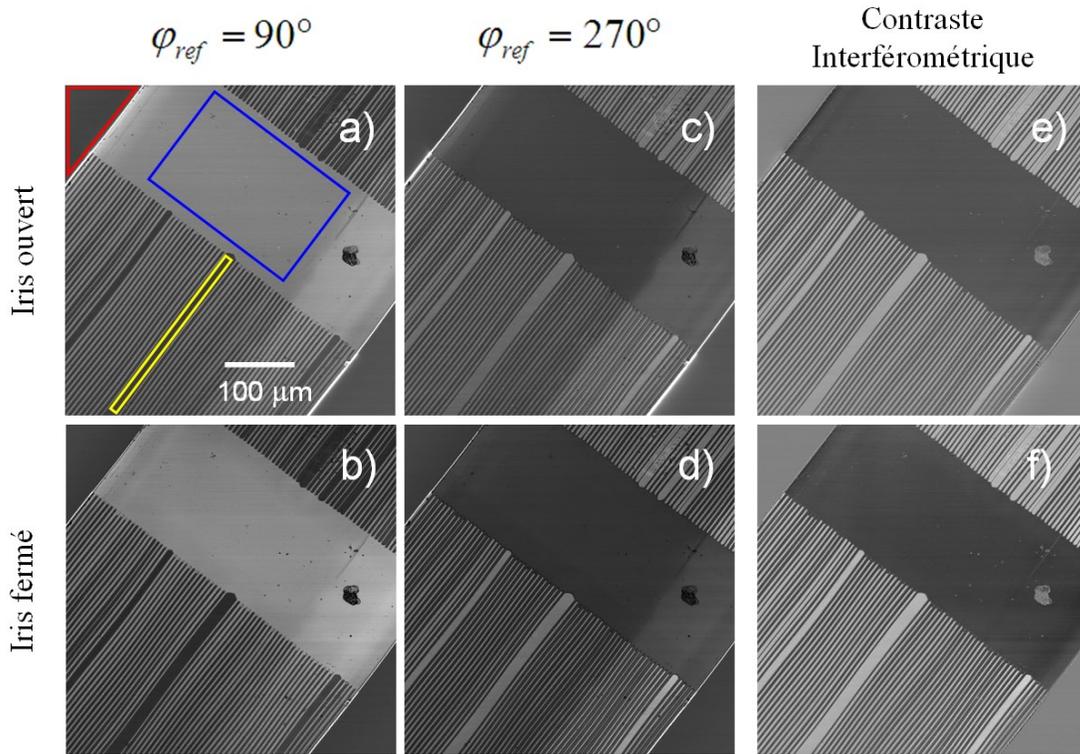


Figure 7.7 Images GSH interférométrique de $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ du cristal PPLN. (a-b) Images GSH interférométriques brutes à une phase de référence $\varphi_{ref} = 90^\circ$ pour laquelle l'interférence est maximale. (c-d) Images GSH interférométriques brutes à une phase de référence $\varphi_{ref} = 270^\circ$ pour laquelle l'interférence est maximale et inversée par rapport aux images (a-b). (e-f) Images du contraste interférométrique obtenues de la soustraction des images précédentes. Elles sont présentées sur une échelle de gris plutôt que rouge et vert pour conserver l'échelle originale de contraste, afin qu'elles puissent être comparées. (a,c et e) Les images du haut ont été obtenues avec l'iris du système de détection complètement ouvert. (b,d et f) Les images du bas ont été obtenues avec l'iris partiellement fermé. On constate à l'œil que le contraste interférométrique est légèrement meilleur lorsque l'iris est partiellement fermé plutôt qu'ouvert. (a) Trois zones (rouge, bleue et jaune) ont été délimitées dans la première image pour calculer les valeurs du signal moyen présentées au tableau 7.1.

Pour s'en assurer de manière quantitative, le signal moyen a été mesuré dans trois mêmes zones des six images. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 7.1. Le nombre de comptes moyens du signal GSH est plus élevé lorsque l'iris est ouvert plutôt que fermé, surtout lorsqu'il y

a interférence destructive (chiffres en rouge) ou lorsqu'il n'y a pas d'interférence (chiffres en noir). Cependant, cette différence semble être moins prononcée lorsqu'il y a interférence constructive (chiffres en vert). Malgré cela, la différence entre les nombres de comptes moyens du signal GSH, qui donne le contraste interférométrique, est plus importante lorsque l'iris est fermé plutôt qu'ouvert. Cela est dû au fait qu'il doit y avoir un mélange d'interférence constructive et destructive dans le patron de radiation. En réduisant l'ouverture numérique, une portion plus petite du patron de radiation, avec une interférence plus uniforme, se rend jusqu'au détecteur. Le contraste interférométrique obtenu s'en trouve donc amélioré.

Zones	Iris ouvert			Iris fermé		
	$\varphi_{ref} = 90^\circ$	$\varphi_{ref} = 270^\circ$	Contraste	$\varphi_{ref} = 90^\circ$	$\varphi_{ref} = 270^\circ$	Contraste
Zone rouge	10800	10900	126	9000	9100	78
Zone bleue	18000	10100	-7840	17700	7400	-10340
Zone jaune	9700	14800	5150	6500	14300	7760

Tableau 7.1 Moyenne de la puissance, en nombre de comptes, du signal GSH dans les images de la figure 7.7 pour les trois zones délimitées dans la figure 7.7a. Il n'y a pas d'interférence pour les puissances écrites en noir. Il y a interférence constructive pour les puissances en vert. Il y a interférence destructive pour les puissances en rouge. Le contraste interférométrique obtenu dans chaque zone est écrit en bleu. La puissance moyenne est plus élevée lorsque l'iris est ouvert, mais le contraste interférométrique est plus élevé lorsque l'iris est partiellement fermé.

Ceci résume les résultats que nous avons obtenus en microscopie GSH interférométrique dans un cristal de niobate de lithium périodiquement orienté. Ces résultats indiquent que notre montage fonctionne correctement et permet bel et bien de retrouver la phase du signal GSH du matériau imagé. Certains des résultats obtenus dans le cristal PPLN ont été publiés dans notre article sur la microscopie GSH interférométrique dans le collagène [159].

7.2 Microscopie GSH interférométrique des tissus musculaires

Le montage a ensuite servi à l'imagerie des tissus biologiques. Nous avons d'abord choisi d'imager les tissus musculaires puisque la structure de leur $\chi^{(2)}$ est connue. Nous avons à notre

disposition des échantillons minces de muscle gastrocnémien médial de souris préparés par nos collaborateurs, Amir K. Miri et Luc Mongeau, de l'université McGill. Ces échantillons ont d'abord été imagés en microscopie GSH standard pour trouver une zone où le signal GSH était fort et où les fibres musculaires semblaient être en bon état. La figure 7.8 montre des images à différentes échelles de l'échantillon qui a été retenu pour cette étude. La première image (figure 7.8a) couvre presque toute la surface de l'échantillon et nous a permis de trouver une zone, en bas à droite de celle-ci, où le signal GSH semblait assez fort. La seconde image (figure 7.8b) permet de mieux voir les fibres musculaires du tissu et nous a permis de trouver une zone, en bas à gauche de celle-ci, où quelques fibres musculaires semblent être bien préservées. La troisième image (figure 7.8c) montre une portion de ces quelques fibres musculaires. Les sarcomères sont visibles à cette échelle. La quatrième image (figure 7.8d) est un agrandissement sur la fibre musculaire en meilleur état dans cette région.

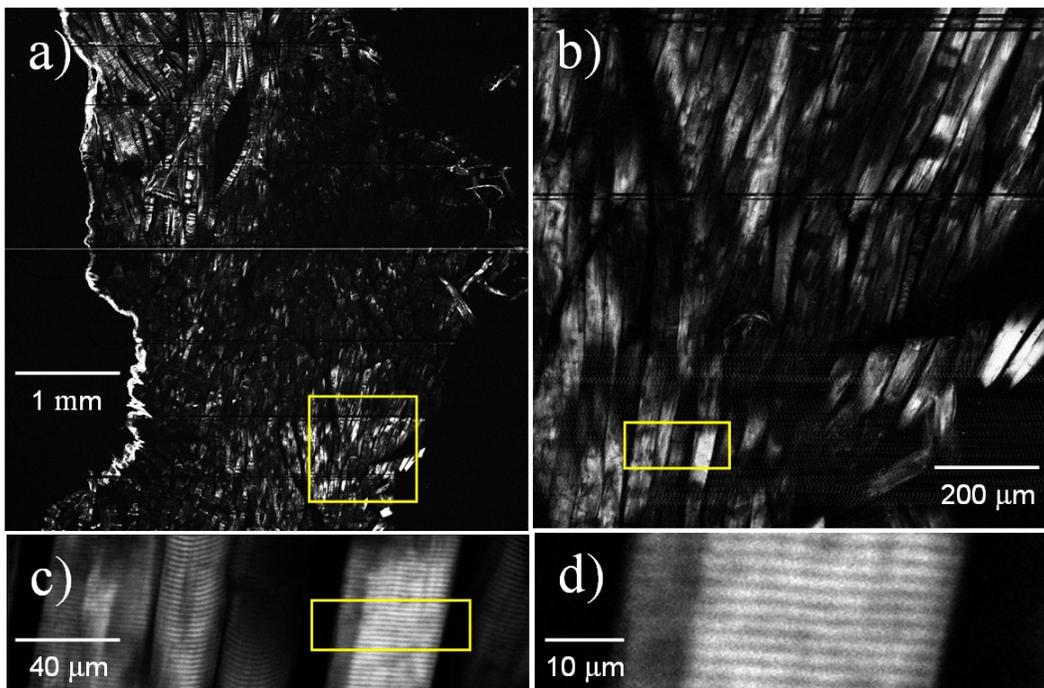


Figure 7.8 (a) Image GSH de $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ d'un échantillon de muscle gastrocnémien médial de souris. (b) Image GSH de $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ de la zone encadrée en jaune dans l'image (a). Les lignes horizontales noires dans les deux premières images proviennent du fait que la hauteur de l'objectif a été réajustée durant l'acquisition de ces grandes images pour s'assurer que le signal reste optimal. (c) Image GSH de $200\text{ }\mu\text{m} \times 60\text{ }\mu\text{m}$ de la zone encadrée en jaune dans l'image (b). À cette échelle, la structure périodique des sarcomères est visible. (d) Image GSH de $65\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$ de la zone encadrée en jaune dans l'image (c). On compte une dizaine de sarcomères consécutifs sur une distance de $20\text{ }\mu\text{m}$.

Après avoir identifié la région du tissu à étudier, nous avons pris une série de 36 images de celle-ci en microscopie GSH interférométrique, en faisant varier la phase de référence de 15° à 540° par bonds de 15° . Ces images brutes ont servi à reconstituer 24 images du contraste interférométrique pour une phase de référence allant de 15° à 360° par bonds de 15° . Cela donne beaucoup d'images qui semblent assez similaires les unes aux autres. La figure 7.9 présente donc les images les plus importantes du lot, c'est-à-dire celles pour lesquelles le contraste interférométrique est le plus important. À titre de comparaison, l'image GSH standard de la région étudiée est présentée à la figure 7.9a. Dans les images GSH interférométrique brutes, les phases de référence pour lesquelles le contraste interférométrique est le plus important sont 90° , 270° et 450° . Les trois images associées à ces phases de référence sont présentées à la figure 7.9b-d. Finalement, les deux images du contraste interférométrique maximal dans le tissu, pour les phases de référence 90° et 270° , sont présentées à la figure 7.9e-f.

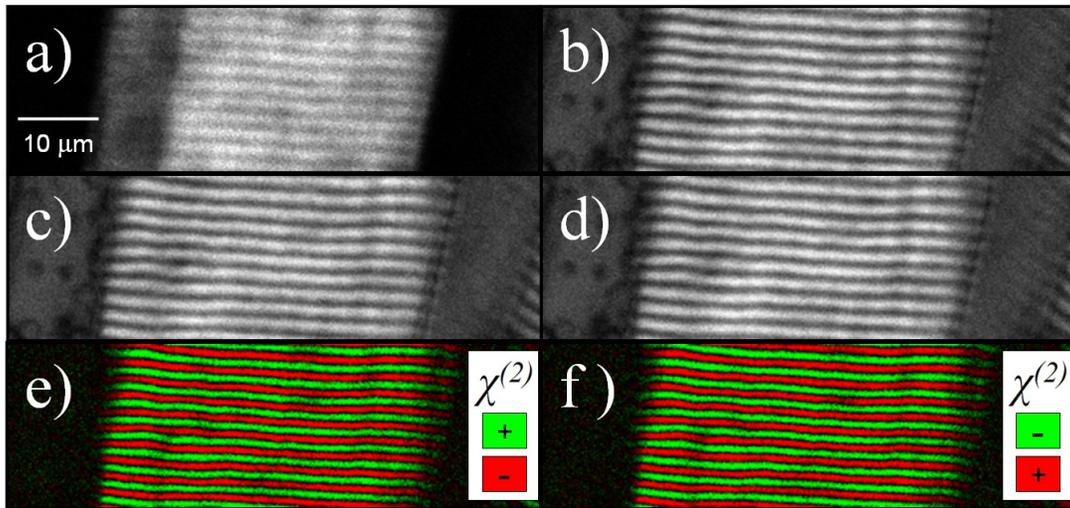


Figure 7.9 Cette figure est tirée de [160 (voir figure 2)]. (a) Image GSH de $65 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ des sarcomères d'une fibre musculaire d'un échantillon de muscle gastrocnémien médial de souris. (b-d) Images GSH interférométrique brutes de la zone imagée en (a), prises aux phases de référence pour lesquelles le contraste interférométrique est le plus important, soit $\varphi_{ref} =$ (b) 90° , (c) 270° et (d) 450° . (e-f) Images GSH interférométrique traitées de la zone imagée en (a). L'image (e) ($\varphi_{ref} = 90^\circ$) est obtenue en soustrayant l'image (b) à l'image (c). L'image (f) ($\varphi_{ref} = 270^\circ$) est obtenue en soustrayant l'image (c) à l'image (d). Comme on s'y attend, l'image (e) est l'inverse de l'image (f). Les domaines de couleurs différentes ont des $\chi^{(2)}$ de signes opposés.

La figure 7.10 montre, comme la figure 7.4, que le contraste interférométrique, dans un domaine du tissu musculaire, suit bel et bien une courbe sinusoïdale (figure 7.10a), comme on s’y attendrait. Les 24 points en vert et en rouge correspondent à la moyenne du contraste interférométrique dans la région encadrée en jaune (figure 7.10b), pour les 24 images du contraste interférométrique. L’observation de ce comportement sinusoïdal démontre que le montage fonctionne tout aussi bien pour l’imagerie des tissus biologiques.

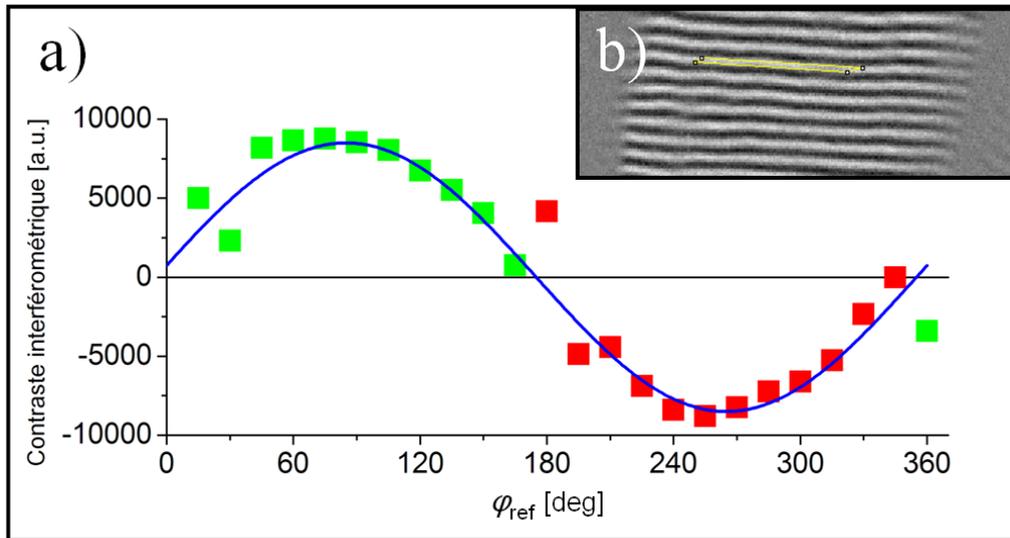


Figure 7.10 Cette figure est inspirée de [160 (voir figure 3)]. (a) La moyenne du contraste interférométrique, dans la région encadrée en jaune dans l’image (b), varie sinusoïdalement en fonction de la phase de référence, φ_{ref} . (b) Image GSH interférométrique traitée de $65 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ d’une fibre musculaire. Une échelle de gris a été utilisée pour représenter cette image plutôt que rouge et vert.

Le même procédé suivi pour l’imagerie du cristal PPLN est répété ici avec le tissu musculaire. À partir des 24 images du contraste interférométrique, l’image de la phase relative du signal GSH est calculée (figure 7.11a). Cette image permet de voir que la phase du signal GSH se tient autour de deux valeurs, soit $-\pi/2$ (domaines verts et jaunes) et $\pi/2$ (domaines bleus, roses et rouges). Toutefois, la phase n’est pas aussi uniforme à l’intérieur d’un domaine que dans un cristal PPLN. Les variations de couleurs à l’intérieur d’un domaine indiquent que la phase du signal GSH fluctue légèrement dans celui-ci. Notons que l’inversion très rapide de la phase entre les domaines adjacents fait apparaître de très fines lignes rouges, jaunes et cyans entre ceux-ci. Celles-ci portent un peu à confusion pour faire l’interprétation de l’image de la phase du signal GSH. Pour cette raison, une seconde image identique à la première, mais utilisant une échelle de

couleur différente, est construite pour mieux visualiser les domaines ayant des $\chi^{(2)}$ opposés dans le tissu imagé (figure 7.11b). Cette image utilise une échelle où le contraste est noir pour les phases près de 0 et $\pm \pi$, rouge pour les phases près de $-\pi/2$ et vert pour les phases près de $\pi/2$. Elle ressemble beaucoup à l'image du contraste interférométrique présentée à la figure 7.9f.

Comme pour le cristal PPLN, l'image de la phase dans les muscles est utilisée pour construire un histogramme de la distribution de la phase (figure 7.11c). Celui-ci contient deux pics bien distincts sur lesquels on fait correspondre deux courbes gaussiennes. Le pic rouge (associé aux domaines rouges de la figure 7.11b) est centré près de $-0,49\pi$ (-88°) et a un écart type d'environ $0,07\pi$ tandis que le pic vert (associé aux domaines verts de la figure 7.11b) est centré près de $0,50\pi$ (90°) et a un écart type d'environ $0,06\pi$. Les deux pics ont la même hauteur, car les domaines rouges et verts occupent la même surface dans la zone imagée. Les deux pics sont étroits et l'écart type est petit, ce qui démontre quantitativement que la phase du signal GSH reste assez uniforme à l'intérieur des domaines. Par rapport à ceux observés dans le cristal PPLN, les deux pics obtenus dans le tissu musculaire sont tout de même un peu plus larges. Ce résultat n'est pas trop surprenant puisqu'une coupe de tissu biologique aura nécessairement une structure moins homogène qu'un cristal PPLN. L'écart entre les pics obtenus dans le tissu musculaire est de $0,99\pi$, ce qui est très proche de la valeur attendue de π .

Un second histogramme de la distribution des pixels en fonction de leur phase et de leur contraste interférométrique (figure 7.11d) est également construit. Celui-ci permet de voir que le contraste interférométrique est généralement élevé dans le tissu musculaire, mais contrairement au PPLN, celui-ci est moins élevé à certains endroits dans le tissu. Ce deuxième histogramme permet également de faire une autre observation intéressante. Il semble que lorsque le contraste interférométrique est élevé, la phase est plus proche de l'une ou l'autre des valeurs centrales des deux pics de la distribution, tandis que lorsque le contraste interférométrique est faible, la phase semble être plus aléatoire.

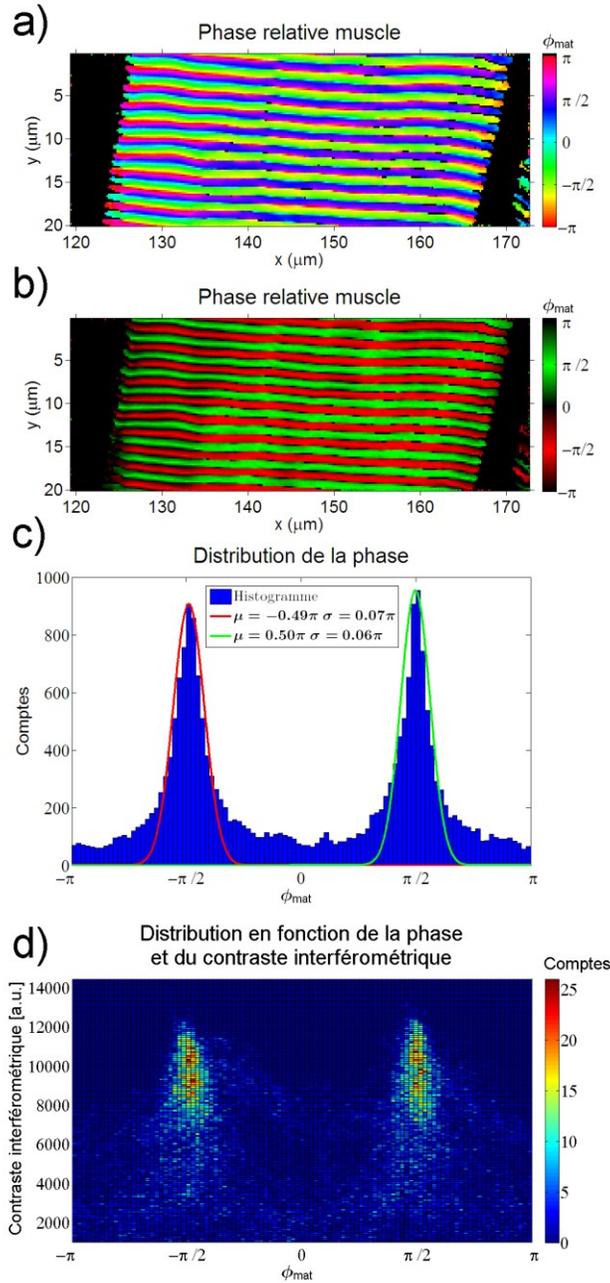


Figure 7.11

Cette figure est inspirée de [160 (voir figure 4)]. (a) Image de la phase du signal GSH dans une portion de fibre musculaire. Une inspection attentive de l'image révèle que la phase varie rapidement et passe par 0 ou $\pm\pi$ à l'interface des domaines. (b) Image de la phase du signal GSH identique à la précédente, mais utilisant une autre échelle de couleur pour mieux visualiser les domaines ayant des $\chi^{(2)}$ opposés dans le tissu imagé. (c) Histogramme de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase. (d) Histogramme 2D de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase et du contraste interférométrique. Les domaines ont une phase très uniforme centrée près de $-0,49\pi$ (domaines rouges de l'image (b)) et de $0,50\pi$ (domaines verts de l'image (b)). L'écart type de la distribution de la phase pour les deux pics obtenus est d'environ $0,07\pi$ et $0,06\pi$ et la distance entre ces deux pics est d'environ $0,99\pi$. Le contraste interférométrique est assez élevé dans l'image.

Maintenant que les résultats de la microscopie GSH interférométrique dans les muscles ont été présentés, voici l'interprétation que nous en faisons. On compte une dizaine de lignes blanches sur une distance de 20 μm dans l'image GSH de la figure 7.9a. La longueur d'un sarcomère étant approximativement 2 μm , il est évident que chaque ligne blanche dans cette image est associée à la bande A d'un sarcomère. Sur la même distance de 20 μm , on compte une dizaine de lignes vertes (interférence constructive) et une dizaine de lignes rouge (interférence destructive) dans les images du contraste interférométrique du tissu (figure 7.9e-f). Dans l'image de la phase (figure 7.11b), on observe également deux dizaines de lignes entre lesquelles la phase est décalée de π (figure 7.11c).

Ces résultats indiquent que le tissu contient des domaines ayant des polarités $\chi^{(2)}$ opposées, qui apparaissent de façon très claire, en rouge et en vert, dans les images du contraste interférométrique et dans l'image de la phase. De plus, pour chaque bande A d'un sarcomère, on compte un domaine vert et un domaine rouge. En comparant minutieusement l'image GSH avec celles du contraste interférométrique, on constate que le centre des lignes blanches de l'image GSH arrive toujours vis-à-vis l'interface entre deux domaines. Cette observation est mise en évidence à la figure 7.12b. Puisque l'on sait que le signal GSH provient des filaments de myosine dans le tissu musculaire, ces images montrent que les deux extrémités de ces filaments émettent un signal GSH avec une phase décalée de π . On en déduit que l'orientation des molécules de myosines qui forment les filaments épais est inversée entre les deux extrémités. La figure 7.12 montre, de manière très claire, le lien, à l'échelle micrométrique, entre la structure des sarcomères et les images du contraste interférométrique. Les images GSH interférométrique des tissus musculaires mettent donc en évidence la bipolarité des filaments de myosine et sont cohérents avec les résultats qui ont été obtenus précédemment en microscopie électronique dans ces tissus.

Comme le montre la figure 7.13, des images plus grandes ont également été prises dans le tissu musculaire. Celles-ci montrent que, même à plus grande échelle, deux domaines ayant des polarités $\chi^{(2)}$ opposées sont toujours associés à un sarcomère dans les tissus musculaires. On remarque également qu'à l'intérieur d'une fibre musculaire, le contraste interférométrique et le signal GSH peuvent parfois diminuer. Cela forme des lignes sombres perpendiculaires aux lignes des domaines dans l'image.

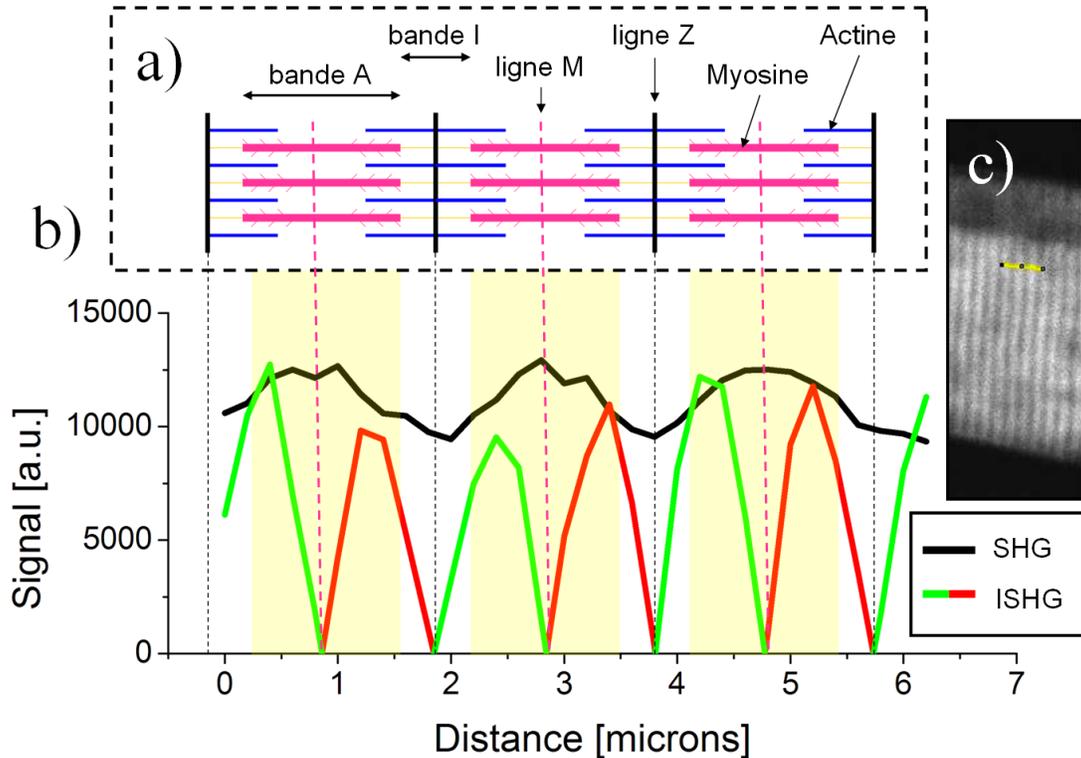


Figure 7.12 Cette figure est tirée de [160 (voir figure 5)]. (a) Représentation schématique, basée sur celle de la figure 4.1, de trois sarcomères consécutifs. (b) Profils du signal GSH (en noir) et du contraste interférométrique (en vert et rouge) le long du trait jaune dessiné dans l'image (c). (c) Image GSH, tournée de 90°, de la zone d'intérêt. Pour faciliter l'interprétation de ces résultats, la taille du schéma en (a) a été ajustée pour correspondre avec les profils présentés en (b). Cette figure montre que la microscopie GSH interférométrique permet de distinguer clairement l'inversion du $\chi^{(2)}$ dans le tissu (pics verts et rouges), tandis que la microscopie GSH standard ne le permet pas (pics noirs). Ces résultats mettent également en évidence l'organisation structurale bipolaire des filaments de myosine dans les tissus musculaires.

La présence de ces lignes sombres semble être causée par des dislocations à l'intérieur des fibres musculaires. En cristallographie et en science des matériaux, une dislocation est un défaut dans la structure cristalline d'un matériau. Dans certains cas, ce défaut peut être causé par la présence d'un demi-plan d'atomes supplémentaire, inséré entre deux plans d'atomes, qui vient déformer les mailles cristallines. Étant donné que les muscles ont une structure micrométrique presque cristalline, un parallèle peut être fait avec la cristallographie. Une dislocation dans la structure microscopique d'un tissu musculaire correspond donc à un sarcomère incomplet, inséré entre deux autres sarcomères complets (qui couvrent toute la largeur de la fibre musculaire). Les zones encadrées en blanc dans l'image de la figure 7.14 montrent plusieurs dislocations dans les fibres musculaires du tissu. Le nombre de sarcomères à gauche et à droite des lignes sombres dans cette

image est inégal. Il y en a un de plus de l'un ou l'autre des côtés de celles-ci. Le décalage des sarcomères, forcé par l'insertion d'un sarcomère supplémentaire aux endroits où se trouvent ces dislocations, doit être responsable de la diminution du signal GSH et du contraste interférométrique à ces endroits. Les images GSH interférométriques permettent de voir ces dislocations de manière beaucoup plus claires que les images GSH standard.

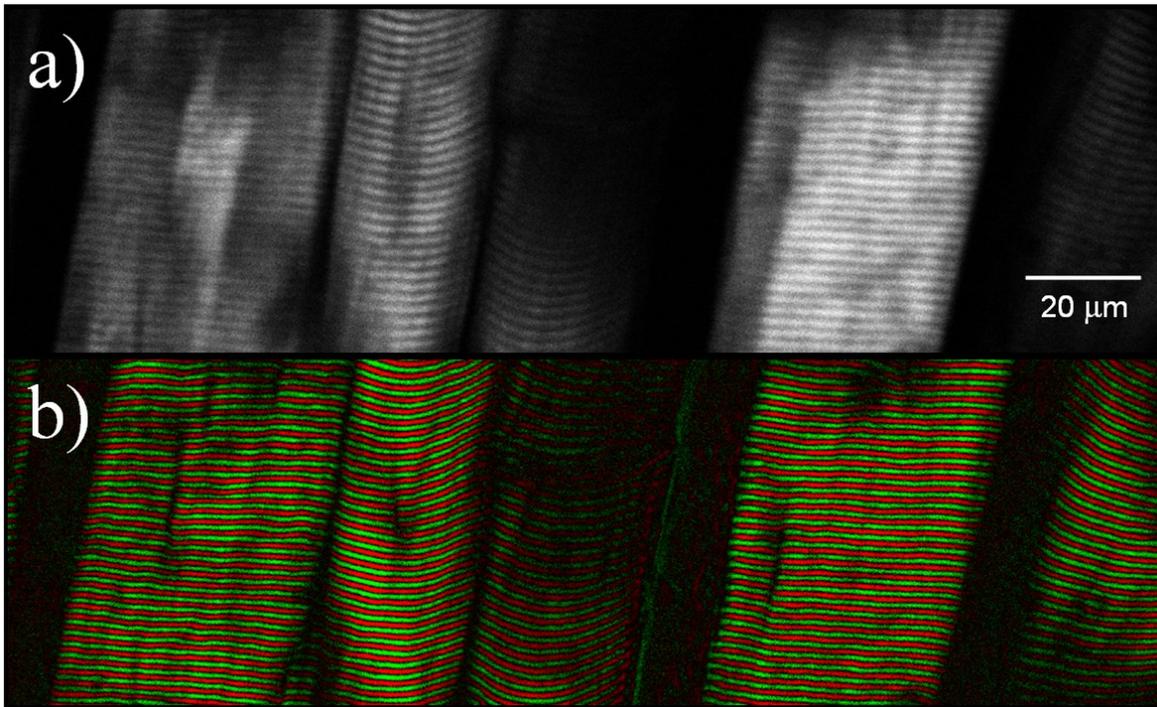


Figure 7.13 (a) Image GSH de $200\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$ montrant une portion de quelques fibres musculaires. À cette échelle, la structure périodique des sarcomères est visible. (b) Image du contraste interférométrique pour $\varphi_{ref} = 90^\circ$ dans la même région qu'en (a). Cette image montre que, même à grande échelle, deux domaines ayant des polarités $\chi^{(2)}$ opposées sont toujours associés à un sarcomère dans les tissus musculaires.

Suite à l'observation de ces dislocations, on peut se demander d'où elles proviennent et si elles sont nombreuses dans le tissu musculaire. Il serait surprenant que celles-ci soient apparues durant la coupe et la préparation de l'échantillon. Les fibres musculaires sont tout simplement en trop bon état pour que cette hypothèse soit plausible. Les dislocations ont donc probablement dû apparaître durant la formation ou la réparation du tissu musculaire, pendant qu'il était encore vivant. Si c'est bien le cas, il ne serait pas surprenant que ce genre de défauts puissent être trouvés un peu partout dans les fibres musculaires, puisqu'ils semblent être assez répandus dans

la portion des quelques fibres observées dans la figure 7.14. On arrive d'ailleurs à en observer une dans l'image de la figure 4.5a et les dislocations dans les tissus musculaires sont sans doute responsables des structures en "Y" dans les images de la figure 4.6. Les travaux de l'équipe de François Tiaho offrent de bonnes pistes de solutions pour expliquer la présence de ces dislocations dans les tissus musculaires [23, 24, 161].

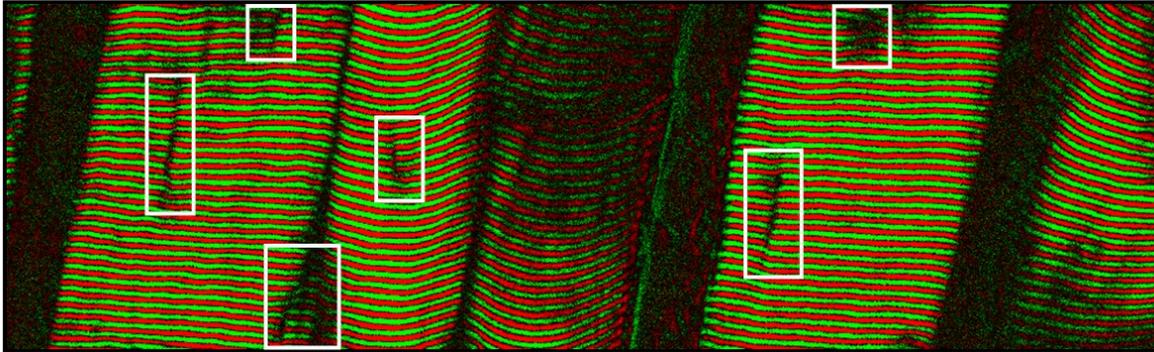


Figure 7.14 Image du contraste interférométrique de $200 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ pour $\varphi_{ref} = 90^\circ$ montrant une portion de quelques fibres musculaires. Celle-ci est identique à celle de la figure 7.13b, mais avec un contraste augmenté. On observe des dislocations dans les zones encadrées en blanc dans cette image. Ces zones contiennent un sarcomère supplémentaire à gauche ou à droite des lignes sombres observées dans celles-ci.

Ceci résume les résultats que nous avons obtenus en microscopie GSH interférométrique dans le tissu musculaire. Ces résultats prouvent que notre montage permet de retrouver la phase du signal GSH dans les tissus biologiques. Ils permettent également de mettre en évidence l'organisation structurale bipolaire des filaments de myosine dans les tissus musculaires. Ceux-ci sont en accord avec la théorie présentée au chapitre 4 et avec les images obtenues en microscopie électronique dans les tissus musculaires. La majorité des résultats présentés dans cette section ont été publiés dans notre article sur la microscopie GSH interférométrique dans les muscles [160].

7.3 Microscopie GSH interférométrique des tissus de collagène

Comme expliqué au chapitre 4, les tissus de collagène ont une structure $\chi^{(2)}$ complexe qui n'est pas encore tout à fait bien comprise. Suite aux résultats encourageants obtenus dans les tissus musculaires, nous avons poursuivi nos études avec le microscope GSH interférométrique dans des tissus riches en collagène. Nous avons à notre disposition différents échantillons de tissus de

collagène. Notre collaborateur, Christian P. Pfeffer, de l'université Ludwig-Maximilians (Munich), a préparé les échantillons minces de tendon de queue de souris et l'échantillon de fascia du muscle tibial antérieur de souris. Un autre de nos collaborateurs, Cameron Brown, de l'université d'Oxford, a pu nous procurer les échantillons minces de tendon ischio-jambier humain.

7.3.1 Tendon de queue de souris

Les échantillons de tendon de queue de souris ont été imagés en premier. On prend d'abord des images en microscopie GSH standard pour trouver une zone où le tissu est en bon état. La figure 7.15 montre les images de l'échantillon qui a été retenu pour cette étude. La première image (figure 7.15a) couvre toute la surface de l'échantillon et nous a permis de trouver une zone, en haut à gauche dans celle-ci, où le tissu est en bon état. La seconde image (figure 7.15b) montre la zone d'intérêt qui a été étudiée en microscopie GSH interférométrique. Ces images montrent bien que le tendon a une structure fibrillaire et que les axes des fibrilles dans celles-ci sont orientés horizontalement. La troisième image (figure 7.15c) a été acquise en collectant le signal GSH arrière. Elle permet de voir que le signal GSH est généré partout où il y a du collagène, même si elle contient également du signal GSH avant réfléchi ou rétrodiffusé vers l'arrière. On peut voir dans les deux premières images de longues et fines structures qui ressemblent à des fibrilles de collagène individuelles, mais qui, comme expliqué dans la section 4.2.4 et comme le rappelle la troisième image, n'en sont pas.

Comme pour les muscles, 36 images GSH interférométrique ont été prises dans le tendon de queue de souris, en faisant varier la phase de référence de 15° à 540° par bonds de 15° . Ces images brutes ont servi à reconstituer 24 images du contraste interférométrique pour une phase de référence allant de 15° à 360° par bonds de 15° . La figure 7.16b-c présente les images du contraste interférométrique obtenues pour les phases de référence pour lesquelles le contraste est maximal, soit $\varphi_{ref} = 90^\circ$ et $\varphi_{ref} = 270^\circ$. À titre de comparaison, l'image GSH standard de la région étudiée est présentée à la figure 7.16a. Les images du contraste interférométrique révèlent plus d'informations sur l'organisation structurale du $\chi^{(2)}$ à l'échelle microscopique dans le tendon. Les fibrilles sont regroupées ensemble et forment de longs domaines $\chi^{(2)}$ qui apparaissent en rouge et en vert dans les images (figure 7.16b-c). Les domaines rouges et les domaines verts dans l'image

doivent donc avoir des polarités différentes les uns des autres. Ce résultat obtenu en microscopie GSH interférométrique est cohérent avec ceux qui ont été obtenus en microscopie électronique et en microscopie PFM indiquant que les fibrilles de collagène ont une polarité aléatoire dans les tissus.

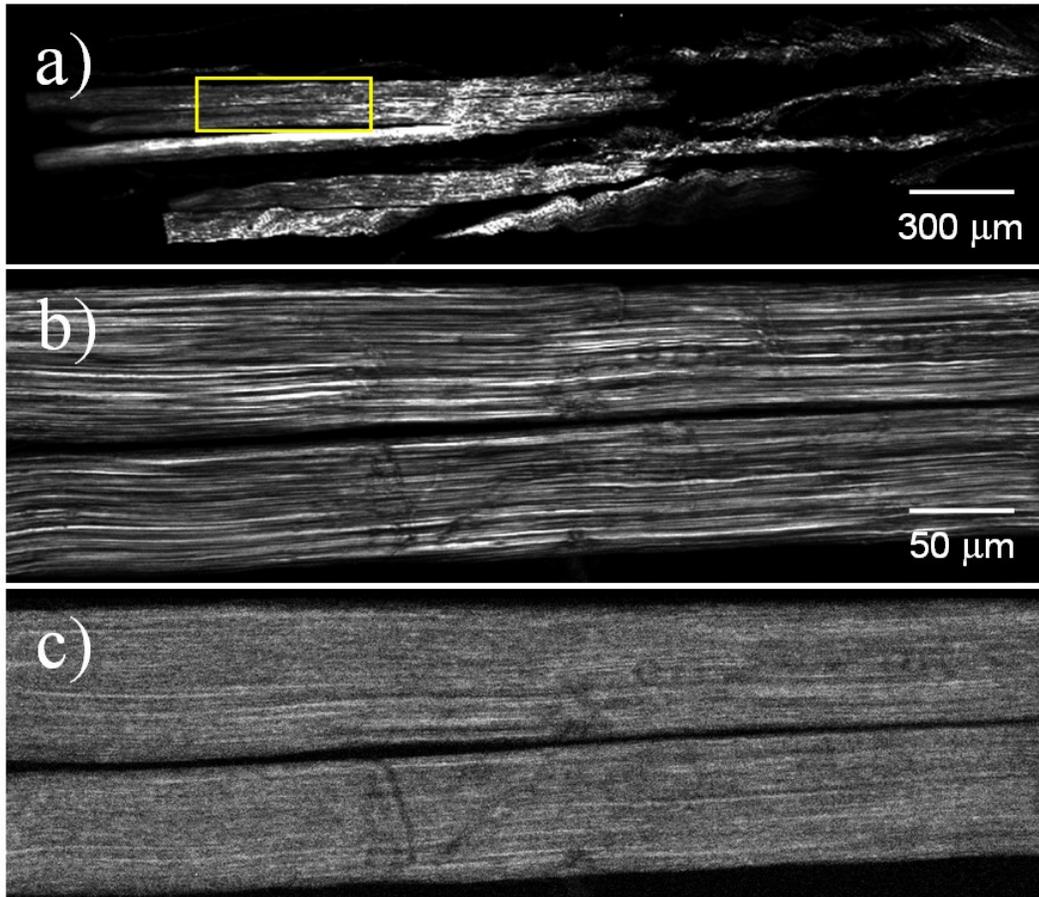


Figure 7.15 (a) Image GSH de $3 \text{ mm} \times 0,75 \text{ mm}$ d'un échantillon de tendon de queue de souris. (b) Image GSH de $500 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ du signal avant de la zone encadrée en jaune dans l'image (a). L'axe des fibrilles de collagène est orienté dans la direction horizontale des images. (c) Image GSH du signal arrière de la même région montrant qu'il y a du signal GSH partout où il y a du collagène. Rappelons que les longues et fines structures qui ressemblent à des fibrilles de collagène individuelles dans l'image (b), n'en sont pas.

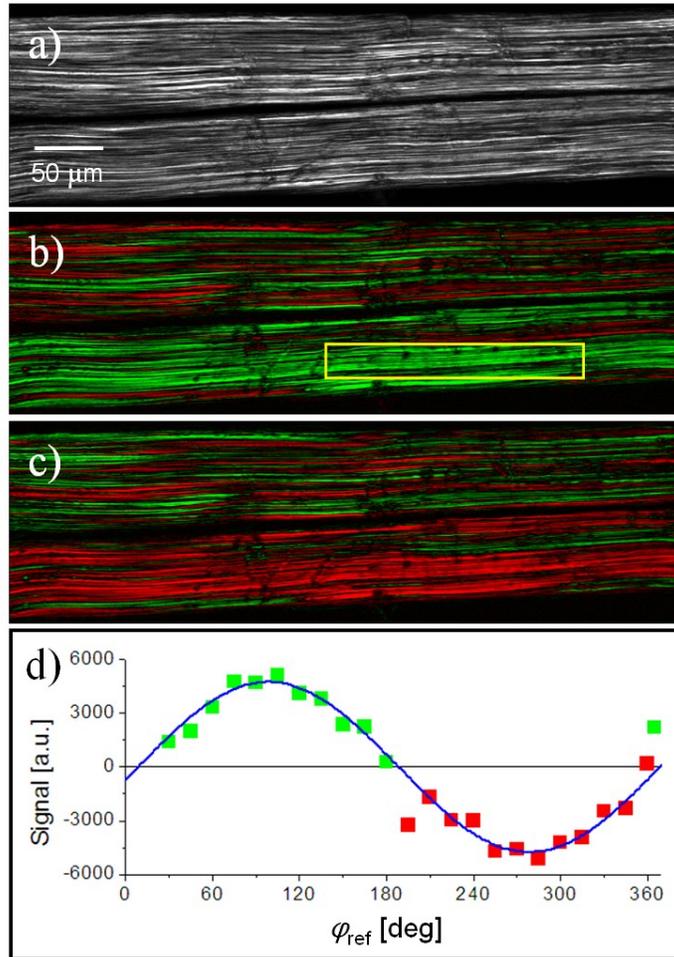


Figure 7.16 Cette figure est tirée de [159 (voir figure 4)]. (a) Image GSH de $500\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$ du tendon de queue de souris. (b) Image du contraste interférométrique pour $\varphi_{ref} = 90^\circ$ de la même région que l'image (a). (c) Image du contraste interférométrique pour $\varphi_{ref} = 270^\circ$. Celle-ci est l'opposée de l'image (b). Le contraste interférométrique est maximal à ces phases de référence pour la majorité des structures dans l'image. (d) La moyenne du contraste interférométrique, dans la région encadrée en jaune dans l'image (b), varie sinusoidalement en fonction de la phase de référence, φ_{ref} .

La figure 7.16d montre, comme les figures 7.4 et 7.10, que le contraste interférométrique, dans un domaine du tendon, suit bel et bien une courbe sinusoidale, comme on s'y attendrait. Les 24 points en vert et en rouge correspondent à la moyenne du contraste interférométrique dans la région encadrée en jaune (figure 7.16b), pour les 24 images du contraste interférométrique. Ce comportement indique que l'on mesure bel et bien un phénomène d'interférence en microscopie GSH interférométrique dans le tendon. Il peut également être observé dans la figure 7.17 qui montre les images du contraste interférométrique dans un domaine pour différentes phases de référence.

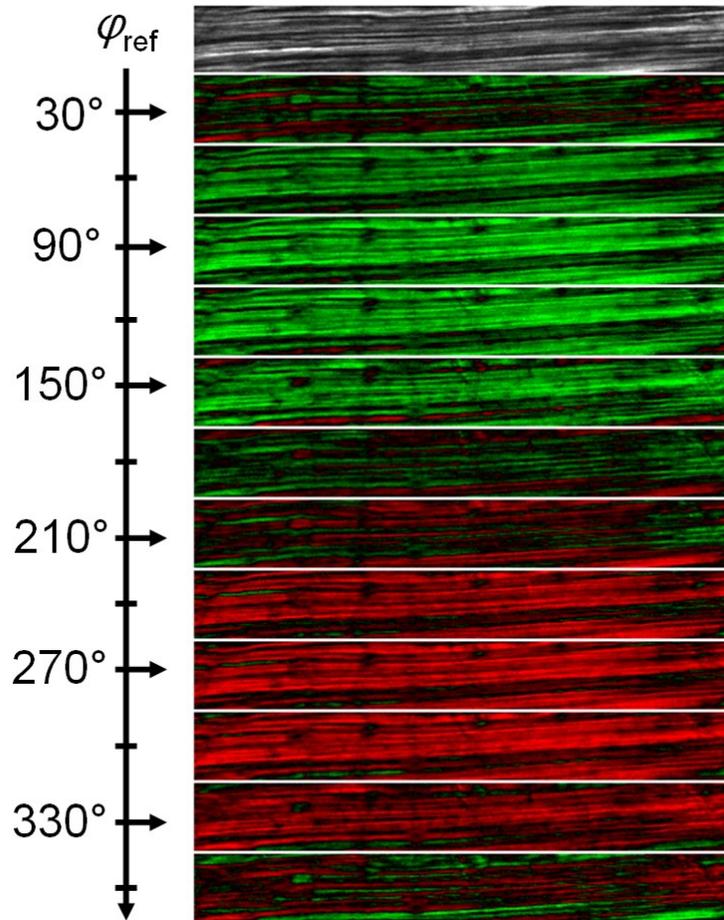


Figure 7.17 Cette figure est tirée de [159 (voir figure 5)]. Image GSH de la région encadrée en jaune dans la figure 7.16b suivie des images du contraste interférométrique pour différentes phases de référence. Celles-ci montrent que le contraste est maximal pour $\varphi_{ref} = 90^\circ$ et $\varphi_{ref} = 270^\circ$.

Les 24 images du contraste interférométrique servent ensuite à calculer l'image de la phase relative du signal GSH (figure 7.18a). Cette image montre que la phase du signal GSH dans cet échantillon de tendon semble être beaucoup plus aléatoire que dans les muscles ou dans le PPLN. Certaines longues et fines structures dans l'image apparaissent bleues, roses, rouges, jaunes ou encore vertes, ce qui signifie qu'elles génèrent un signal GSH à différentes phases. On remarque cependant que l'image contient majoritairement des structures jaunes et vertes, tandis qu'elle contient peu de structures cyans. Comme pour les muscles, cette image porte à confusion pour la visualisation des domaines ayant des $\chi^{(2)}$ opposés dans le tissu imagé. On présente donc à nouveau la même image de la phase en utilisant l'échelle de couleurs rouge, vert et noir (figure 7.18b). Celle-ci ressemble à l'image du contraste interférométrique présentée à la figure 7.16c.

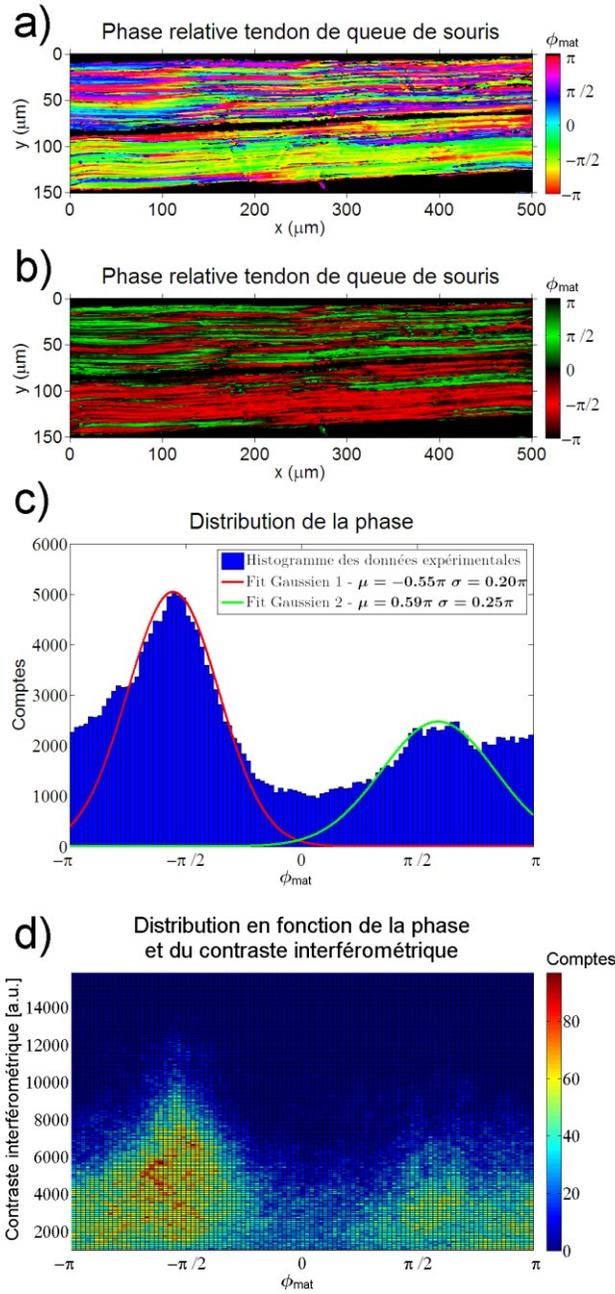


Figure 7.18

Cette figure est inspirée de [159 (voir figure 7)]. (a) Image de la phase du signal GSH dans le tendon de queue de souris. Elle contient plusieurs domaines générant des phases qui semblent être plus ou moins aléatoires. (b) Image de la phase du signal GSH identique à la précédente, mais utilisant une autre échelle de couleur pour mieux visualiser les domaines ayant des $\chi^{(2)}$ opposés dans le tissu imagé. (c) Histogramme de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase. (d) Histogramme 2D de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase et du contraste interférométrique. Les domaines ont une phase plus ou moins aléatoire. On observe tout de même deux pics dans la distribution, centrés près de $-0,55\pi$ (domaines rouges de l'image (b)) et de $0,59\pi$ (domaines verts de l'image (b)). L'écart type de la distribution de la phase pour les deux pics obtenus est d'au moins $0,20\pi$ et $0,25\pi$ et la distance entre ces deux pics est d'environ $1,14\pi$. Le contraste interférométrique varie beaucoup dans l'image.

Un histogramme de la distribution de la phase est construit à partir de l'image de la phase (figure 7.18c). Comme le présageait l'image de la phase du signal GSH, le profil de la distribution de la phase est beaucoup plus uniforme et moins concentré autour de deux valeurs que dans le PPLN et les muscles. Il semble tout de même y avoir deux pics, plus discrets, dans la distribution obtenue. Le pic rouge (associé aux domaines rouges de la figure 7.18b) est centré près de $-0,55\pi$ (-99°) et a un écart type d'au moins $0,20\pi$ tandis que le pic vert (associé aux domaines verts de la figure 7.18b) est centré près de $0,59\pi$ (106°) et a un écart type d'au moins $0,25\pi$. Le pic rouge est plus élevé que le vert à cause de la grande région au bas de l'échantillon ayant une phase mieux définie. Les deux pics sont larges et l'écart type est grand ce qui démontre quantitativement que la phase du signal GSH peut être assez éloignée des valeurs centrales de ceux-ci à l'intérieur de certains domaines. L'écart entre les pics obtenus dans le tendon de queue de souris est de $1,14\pi$, ce qui est assez éloigné de la valeur attendue de π . Cela est sans doute dû au fait que la phase du signal GSH est assez aléatoire dans cet échantillon de tendon. La différence de hauteur entre les deux pics n'aide pas non plus, le pic vert ne dépasse pas de beaucoup les phases GSH aléatoires dans la distribution.

Un second histogramme de la distribution des pixels en fonction de leur phase et de leur contraste interférométrique (figure 7.18d) est également construit. Celui-ci permet de voir que le contraste interférométrique est beaucoup plus variable dans le tendon par rapport aux muscles et au PPLN. Dans certaines régions de l'image du tendon, le contraste interférométrique est très fort tandis qu'ailleurs il peut être moyen ou encore très faible. On observe cependant de façon plus claire dans le tendon que, lorsque le contraste interférométrique est élevé, la phase du signal GSH est plus proche de l'une ou l'autre des valeurs centrales des deux pics de la distribution, tandis que lorsque le contraste interférométrique est faible, la phase est plus aléatoire.

À première vue, on pourrait penser que les domaines rouges et verts des images du contraste interférométrique (figure 7.18b-c) et de l'image de la phase (figure 7.18b) émettent un signal GSH déphasé de π comme dans le cristal PPLN ou dans les muscles, mais, comme l'indique la distribution de la phase du signal GSH (figure 7.18c), cette interprétation n'est pas tout à fait exacte. Ces résultats soulèvent donc la question suivante : pourquoi la phase du signal GSH est-elle centrée autour de deux valeurs décalées de π dans les muscles et le PPLN alors qu'elle est plus aléatoire dans le tendon ?

L'explication qui semble être la plus plausible, à nos yeux, est la suivante. Les domaines ayant un $\chi^{(2)}$ uniforme dans le PPLN et dans les muscles ont une taille plus grande que le volume focal. Dans ces conditions, la phase du signal GSH sera déterminée uniquement par le signe du $\chi^{(2)}$ du domaine à l'intérieur duquel le volume focal se trouve. La phase du signal GSH généré par les muscles et le PPLN doit donc nécessairement avoir une distribution contenant deux pics très étroits décalés de π . De leur côté, les tissus de collagène ont une structure différente. Bien que les fibrilles de collagène individuelles qui forment le tissu aient des polarités identiques ou parfaitement opposées à l'échelle nanométrique, le volume focal du faisceau laser est grand par rapport à une fibrille individuelle et interagit avec plusieurs d'entre-elles simultanément. La polarité, le diamètre et la position des fibrilles dans le volume focal, combinés à la phase de Gouy et à l'irradiance qui varie spatialement pour un faisceau gaussien fortement focalisé, font en sorte que l'irradiance et la phase du signal GSH généré dans le tissu peuvent grandement varier. Si le volume focal contient une majorité de fibrilles ayant la même polarité, il y aura interférence constructive, l'irradiance du signal GSH et le contraste interférométrique seront élevés et la phase du signal GSH sera déterminée par le signe de la polarité de cette majorité de fibrilles. Inversement, si le volume focal contient une proportion égale de fibrilles ayant des polarités opposées, il y aura beaucoup d'interférence destructive, l'irradiance du signal GSH et le contraste interférométrique seront faibles et la phase du signal GSH sera déterminée par la phase de Gouy et la disposition exacte des fibrilles dans le volume focal, ce qui résultera en une phase du signal GSH aléatoire par rapport à celles qui sont obtenues dans le cas précédent.

Puisque la polarité des fibrilles est aléatoire dans un tissu de collagène, il est normal qu'en déplaçant le volume focal dans celui-ci, on rencontre un mélange des deux cas qui viennent d'être décrits. Cela explique pourquoi la phase est plus aléatoire dans l'échantillon de tendon que dans les muscles et le PPLN. C'est pour cette raison que la distribution de la phase est plus uniforme dans le tendon, mais qu'il est tout de même possible d'identifier deux pics dans celle-ci. Cette découverte est extrêmement importante dans le cadre de ce projet et il est nécessaire de bien la comprendre.

Voici un premier aperçu des résultats que nous avons obtenus en microscopie GSH interférométrique dans le tendon. Ces résultats prouvent que le tendon contient des domaines $\chi^{(2)}$ ayant des polarités opposées. La phase du signal GSH est maintenue sur de très longues distances

le long de l'axe des fibrilles à l'intérieur d'un domaine. La phase du signal GSH est déterminée par le signe de la polarité des fibrilles à certains endroits dans le tissu (lorsque le signal GSH est fort), tandis qu'elle semble être plus aléatoire à d'autres endroits (lorsque le signal GSH est plus faible). La phase suit donc une distribution plus ou moins uniforme qui contient tout de même deux pics décalés de π . Ces résultats sont en accord avec la théorie présentée au chapitre 4 et avec les images obtenues en microscopie électronique et en microscopie PFM dans les tissus de collagène. Les résultats présentés dans cette section ont été publiés dans notre article sur la microscopie GSH interférométrique dans le tendon [159].

7.3.2 Tendon ischio-jambier humain

Les échantillons de tendon ischio-jambier humain ont ensuite été imagés en microscopie GSH standard. La figure 7.19 montre les images de l'échantillon qui a été retenu pour cette étude. La première image (figure 7.19a) couvre toute la surface de l'échantillon et nous a permis de trouver une zone assez grande, à droite encadrée en jaune dans celle-ci, où les fibrilles de collagène semblent être bien alignées. La seconde image (figure 7.19b) montre un agrandissement de cette zone. On voit bien dans celle-ci que le tendon a une structure fibrillaire et que les axes des fibrilles dans celle-ci sont orientés horizontalement. Deux images GSH interférométrique brutes ont été prises dans cette région pour calculer une image du contraste interférométrique de cette zone. L'image du contraste interférométrique (figure 7.19c), pour $\varphi_{ref} = 270^\circ$, donne une bonne idée de la distribution et de la dimension des domaines dans le tissu. À partir de cette image, une zone d'intérêt plus petite, encadrée en jaune, a été sélectionnée pour être étudiée en microscopie GSH interférométrique. On observe à la fois des domaines rouges et des domaines verts dans cette zone d'intérêt et les fibrilles y sont bien alignées par rapport au reste du tissu, ce qui justifie sa sélection.

18 images GSH interférométrique ont été prises dans le tendon ischio-jambier humain, en faisant varier la phase de référence de 30° à 540° par bonds de 30° . Ces images brutes ont servi à reconstituer 12 images du contraste interférométrique pour une phase de référence allant de 30° à 360° par bonds de 30° . La figure 7.20b-c présente les images du contraste interférométrique obtenues pour les phases de référence pour lesquelles le contraste est maximal, soit $\varphi_{ref} = 90^\circ$ et $\varphi_{ref} = 270^\circ$. À titre de comparaison, l'image GSH standard de la région étudiée est présentée à la

figure 7.20a. Les structures fibrillaires sont très apparentes dans celle-ci. Les images du contraste interférométrique sont impressionnantes et mettent bien en évidence la présence des domaines $\chi^{(2)}$ polaires à l'échelle microscopique dans le tendon humain. Comme dans le tendon de queue de souris, les fibrilles de collagène forment de longs domaines $\chi^{(2)}$, plus ou moins étroits, qui apparaissent en rouge ou en vert, selon leur polarité, dans les images (figure 7.20b-c).

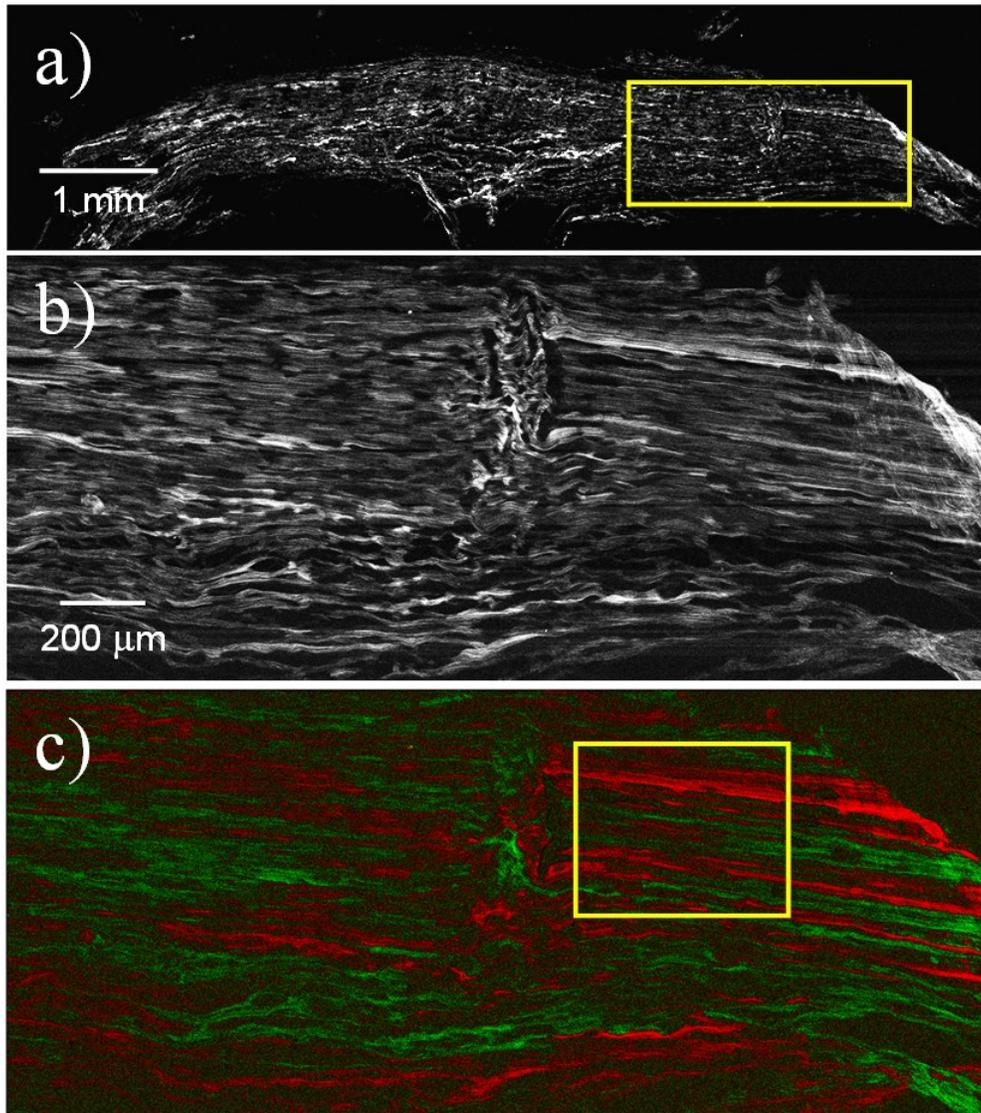


Figure 7.19 (a) Image GSH de $8 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ d'un échantillon de tendon ischio-jambier humain. (b) Image GSH de $2,3 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ de la zone encadrée en jaune dans l'image (a). L'axe des fibrilles de collagène est orienté principalement dans la direction horizontale des images. Dans l'image (b), les structures longues et fines, parfois ondulées, qui ressemblent à des fibrilles de collagène individuelles, n'en sont pas. (c) Image du contraste interférométrique maximal dans la même région, pour $\varphi_{ref} = 270^\circ$. Cette image à grande échelle permet de voir plus clairement la distribution et la dimension des domaines dans le tissu.

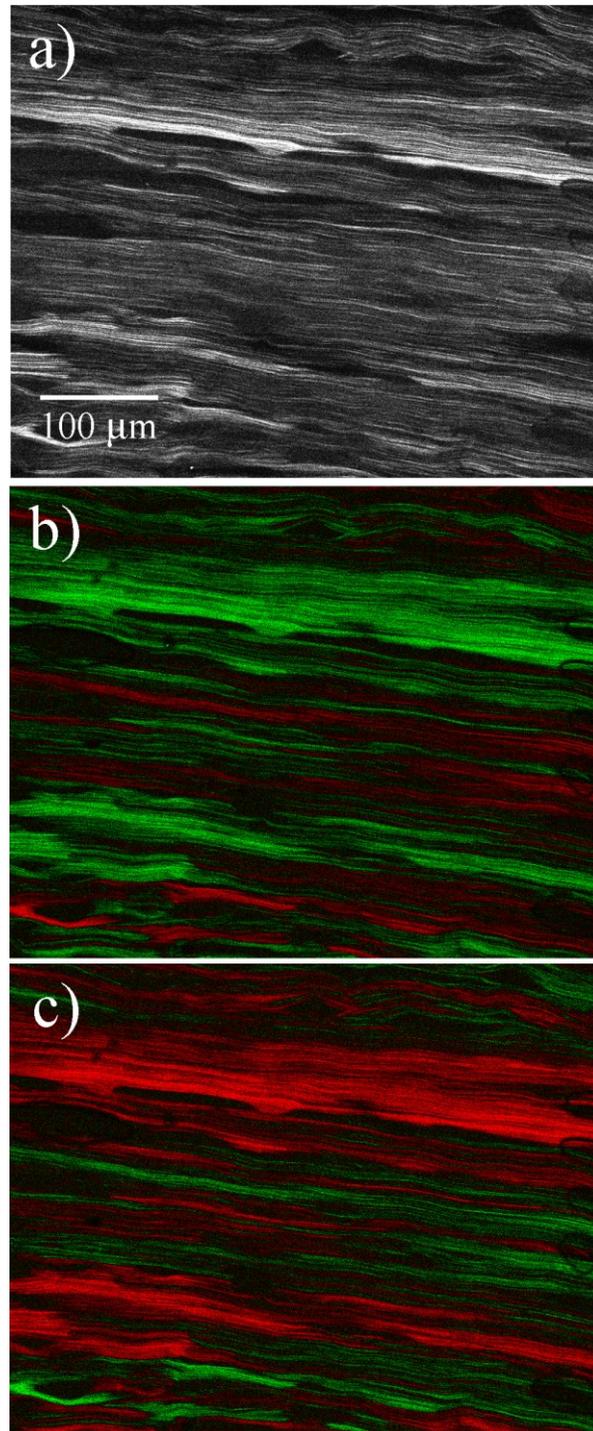


Figure 7.20

(a) Image GSH de $500\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ de la zone encadrée en jaune dans la figure 7.19c. (b) Image du contraste interférométrique pour $\varphi_{ref} = 90^\circ$ de la même région que l'image (a). (c) Image du contraste interférométrique pour $\varphi_{ref} = 270^\circ$. Celle-ci est l'opposée de l'image (b). Le contraste interférométrique est maximal à ces phases de référence pour la majorité des structures dans l'image. La longueur des domaines peut mesurer plusieurs centaines de microns tandis que leur largeur peut varier entre quelques microns et quelques dizaines de microns.

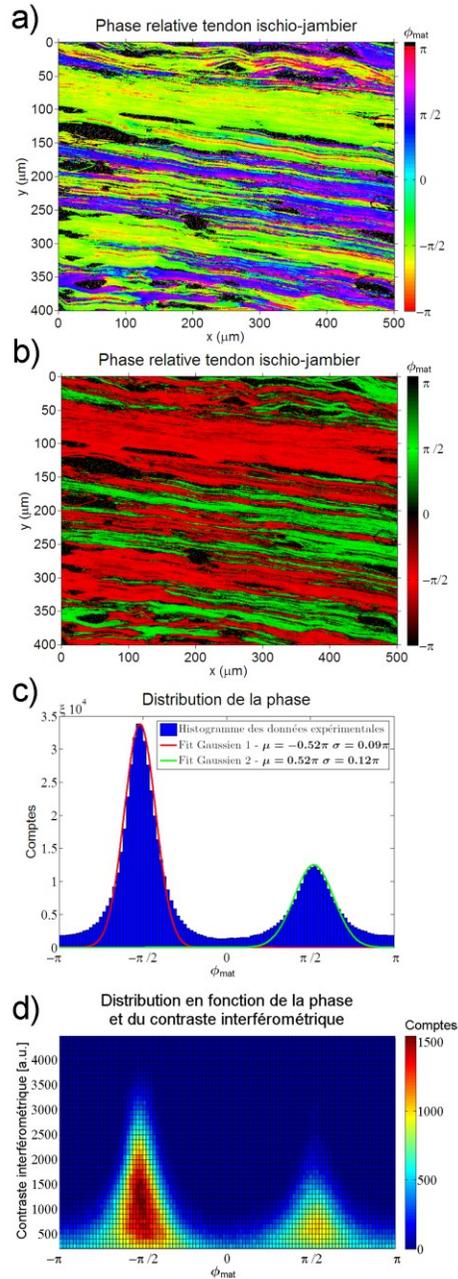


Figure 7.21

(a) Image de la phase du signal GSH dans le tendon ischio-jambier humain. Elle contient plusieurs très longs domaines générant des phases près de $-\pi/2$ (en vert et jaune) et $\pi/2$ (en bleu et rose). (b) Image de la phase du signal GSH identique à la précédente, mais utilisant une autre échelle de couleur pour mieux visualiser les domaines ayant des χ^2 opposés dans le tissu imagé. (c) Histogramme de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase. (d) Histogramme 2D de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase et du contraste interférométrique. Les domaines ont une phase plutôt bien définie, mais avec tout de même une composante aléatoire. On observe donc deux pics dans la distribution centrés près de $-0,52\pi$ (domaines rouges de l'image (b)) et de $0,52\pi$ (domaines verts de l'image (b)). L'écart type de la distribution de la phase pour les deux pics obtenus est d'environ $0,09\pi$ et $0,12\pi$ et la distance entre ces deux pics est d'environ $1,04\pi$. Le contraste interférométrique varie beaucoup dans l'image.

Les 12 images du contraste interférométrique servent ensuite à calculer l'image de la phase relative du signal GSH (figure 7.21a). L'image de la phase obtenue dans le tendon humain est surprenante puisqu'elle diffère de celle obtenue dans le tendon de queue de souris. La phase du signal GSH dans cet échantillon n'est pas aussi aléatoire que dans le tendon de queue de souris, mais elle l'est tout de même davantage que dans les muscles ou dans le PPLN. Les domaines dans l'image apparaissent principalement en un mélange de vert et de jaune et en un mélange de bleu et de rose. L'image contient très peu de zones rouges ou cyans. Pour voir plus clairement les domaines de polarités $\chi^{(2)}$ opposées, la même image de la phase GSH est présentée à nouveau, mais avec l'échelle de couleurs rouge, vert et noir (figure 7.21b). Celle-ci ressemble à l'image du contraste interférométrique présentée à la figure 7.20c.

Un histogramme de la distribution de la phase est construit à partir de l'image de la phase (figure 7.21c). La distribution de la phase obtenue dans cette portion de l'échantillon est à couper le souffle par rapport à celle obtenue dans le tendon de queue de souris. Celle-ci contient deux pics bien distincts, comme dans celles des muscles et du PPLN, mais plus larges que dans ceux-ci. Le pic rouge (associé aux domaines rouges de la figure 7.21b) est centré près de $-0,52\pi$ (-94°) et a un écart type d'environ $0,09\pi$ tandis que le pic vert (associé aux domaines verts de la figure 7.21b) est centré près de $0,52\pi$ (94°) et a un écart type d'environ $0,12\pi$. Le pic rouge est plus élevé que le vert puisque l'échantillon contient une plus grande surface de domaines rouges que verts (figure 7.21b). L'écart type des deux pics est plus grand que dans les muscles et le PPLN, mais plus petit que dans le tendon de queue de souris. Cela démontre quantitativement que la phase du signal GSH dans le collagène peut s'éloigner des valeurs centrales des deux pics obtenus dans la distribution de phase. L'écart entre les pics obtenus dans le tendon ischio-jambier humain est de $1,04\pi$, ce qui est proche de la valeur attendue de π . Ce résultat est rassurant et indique que l'erreur devait être importante pour l'écart obtenu dans le tendon de queue de souris.

Un second histogramme de la distribution des pixels en fonction de leur phase et de leur contraste interférométrique (figure 7.21d) est également construit. Celui-ci permet de voir que le contraste interférométrique reste très variable dans le tendon humain par rapport aux muscles et au PPLN. On observe à nouveau de façon très claire dans le tendon humain que, lorsque le contraste interférométrique est élevé, la phase du signal GSH est plus proche de l'une ou l'autre

des valeurs centrales des deux pics de la distribution, tandis que lorsque le contraste interférométrique est faible, la phase est plus aléatoire.

Les résultats en microscopie GSH interférométrique obtenus dans le tendon humain sont spectaculaires et surpassent ceux du tendon de queue de souris. Encore une fois, on peut voir que le tendon contient des domaines $\chi^{(2)}$ ayant des polarités opposées et que la phase du signal GSH est maintenue sur de très longues distances le long de l'axe des fibrilles à l'intérieur de ces domaines. L'explication de la largeur des deux pics dans la distribution de la phase du signal GSH, donnée dans la section du tendon de queue de souris, s'applique également au tendon humain. L'échantillon que nous avons étudié devait tout simplement contenir des régions où plus de fibrilles partageaient la même polarité que dans le tendon de queue de souris. Cela expliquerait pourquoi les pics obtenus dans la distribution sont plus étroits que dans le tendon de queue de souris, mais plus larges que dans les muscles et le PPLN. Les résultats obtenus dans le tendon humain sont donc en accord avec la théorie présentée au chapitre 4 et avec les images obtenues en microscopie électronique et en microscopie PFM dans les tissus de collagène. Toutefois, puisque ces résultats ont été obtenus après la publication de ceux du tendon de queue de souris, ceux-ci n'ont pas été publiés (à l'exception de l'image 7.21b [162]).

7.3.3 Fascia

Pour finir, nous avons étudié un échantillon de fascia du muscle tibial antérieur de souris. La figure 7.22 montre les images qui ont été obtenues dans celui-ci. La première image (figure 7.22a) couvre toute la surface de l'échantillon et nous a permis de trouver une zone, en bas à droite encadrée en jaune dans celle-ci, où le tissu était en bon état. La seconde image (figure 7.22b) montre un agrandissement de cette zone. On voit bien dans celle-ci que le fascia a une structure fibrillaire et que les axes des fibrilles dans celle-ci sont orientés horizontalement. Cet échantillon avait été préparé longtemps avant cette expérience et avait déjà été imagé auparavant. Le séchage de l'échantillon, qui est immergé dans une solution saline pour l'imagerie, est donc probablement responsable des ondulations visibles le long de l'axe des fibrilles.

La région d'intérêt a ensuite été imagée en microscopie GSH interférométrique. 18 images GSH interférométrique ont été prises dans cette portion du fascia, en faisant varier la phase de référence de 30° à 540° par bonds de 30° . Ces images brutes ont servi à reconstituer 12 images du contraste interférométrique pour une phase de référence allant de 30° à 360° par bonds de 30° . La figure 7.22c-d présente les images du contraste interférométrique obtenues pour les phases de référence pour lesquelles le contraste est maximal, soit $\varphi_{ref} = 90^\circ$ et $\varphi_{ref} = 270^\circ$. Encore une fois, les images du contraste interférométrique mettent bien en évidence la présence de domaines $\chi^{(2)}$ polaires à l'échelle microscopique dans les tissus de collagène. Comme dans les tendons, les fibrilles de collagène forment de longs domaines $\chi^{(2)}$, plus ou moins étroits, qui apparaissent en rouge ou en vert, selon leur polarité, dans les images (figure 7.22c-d).

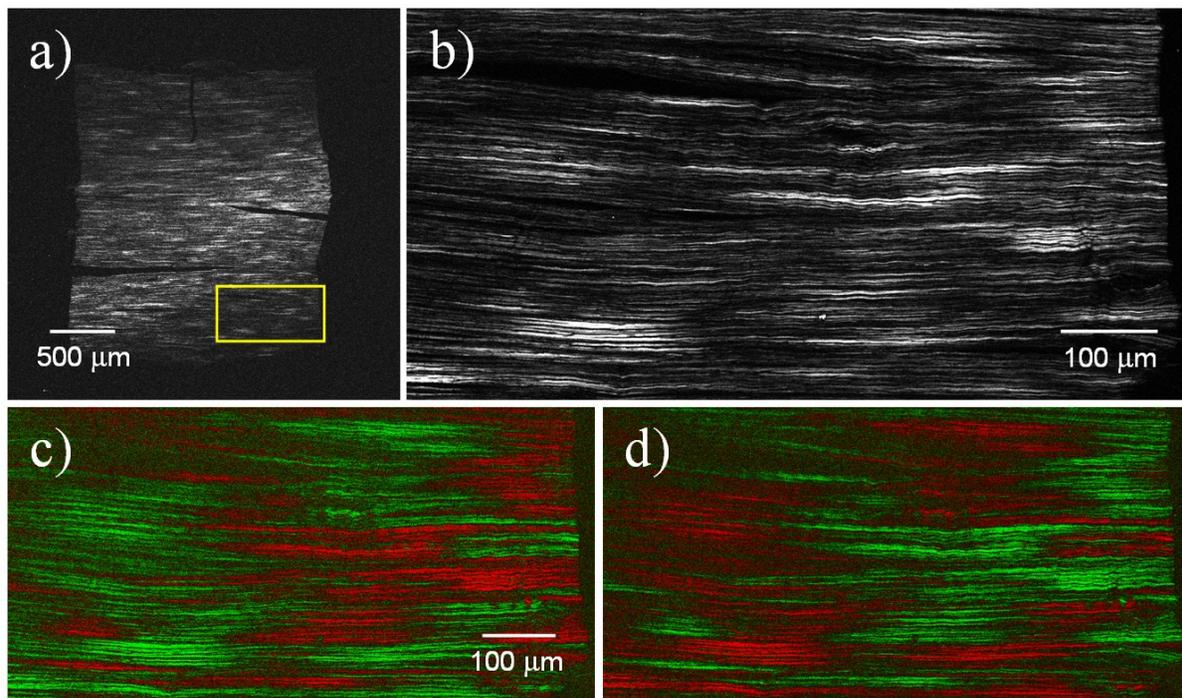


Figure 7.22 (a) Image GSH de $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ d'un échantillon de fascia de muscle de souris. (b) Image GSH de $800 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ de la zone encadrée en jaune dans l'image (a). L'axe des fibrilles de collagène est orienté dans la direction horizontale des images. On peut voir dans l'image (b) les longues et fines structures, parfois ondulées, qui ressemblent à des fibrilles de collagène individuelles, mais qui n'en sont pas. (c) Image du contraste interférométrique pour $\varphi_{ref} = 90^\circ$ de la même région que l'image (b). (d) Image du contraste interférométrique pour $\varphi_{ref} = 270^\circ$. Celle-ci est l'opposée de l'image (c). Dans le fascia, la longueur des domaines varie entre une centaine et quelques centaines de microns.

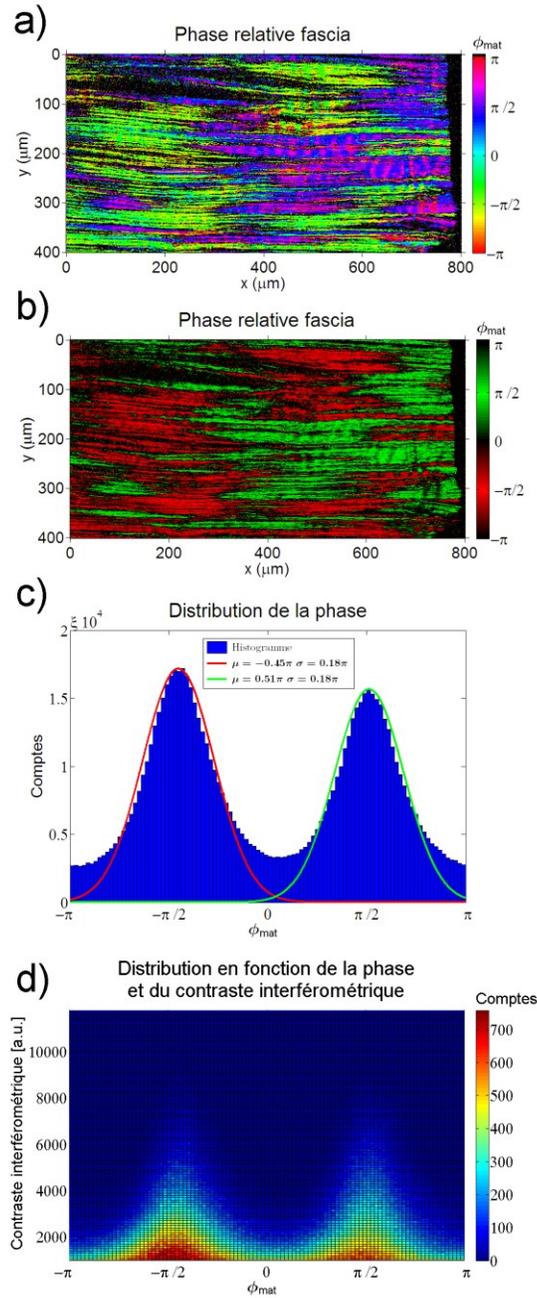


Figure 7.23

(a) Image de la phase du signal GSH dans le fascia. Elle contient plusieurs longs domaines générant des phases près de $-\pi/2$ (en vert et jaune) et $\pi/2$ (en bleu et rose). (b) Image de la phase du signal GSH identique à la précédente, mais utilisant une autre échelle de couleur pour mieux visualiser les domaines ayant des $\chi^{(2)}$ opposés dans le tissu imagé. (c) Histogramme de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase. (d) Histogramme 2D de la distribution des pixels de l'image (a) en fonction de la phase et du contraste interférométrique. Les domaines ont une phase assez bien définie, mais avec tout de même une composante aléatoire. On observe donc deux pics dans la distribution centrés près de $-0,45\pi$ (domaines rouges de l'image (b)) et de $0,51\pi$ (domaines verts de l'image (b)). L'écart type de la distribution de la phase pour les deux pics obtenus est d'environ $0,18\pi$ et la distance entre ceux-ci est d'environ $0,96\pi$. Le contraste interférométrique varie beaucoup dans l'image.

Les 12 images du contraste interférométrique servent ensuite à calculer l'image de la phase relative du signal GSH (figure 7.23a). L'image de la phase obtenue dans le fascia est intéressante et ressemble beaucoup à celle obtenue dans le tendon humain. Les domaines dans l'image apparaissent principalement en un mélange de vert et de jaune et en un mélange de bleu et de rose. L'image contient très peu de zones rouges ou cyans. Les domaines ont toutefois une forme différente dans le fascia. On remarque qu'ils sont plus courts que dans le tendon. Pour voir plus clairement les domaines de polarités $\chi^{(2)}$ opposées, la même image de la phase GSH est présentée à nouveau, mais avec l'échelle de couleurs rouge, vert et noir (figure 7.23b). Celle-ci ressemble à l'image du contraste interférométrique présentée à la figure 7.22d.

Un histogramme de la distribution de la phase est construit à partir de l'image de la phase (figure 7.23c). La distribution de la phase obtenue dans cette portion de l'échantillon est impressionnante et ressemble beaucoup à celle obtenue dans le tendon humain. Le pic rouge (associé aux domaines rouges de la figure 7.23b) est centré près de $-0,45\pi$ (-81°) et a un écart type d'environ $0,18\pi$ tandis que le pic vert (associé aux domaines verts de la figure 7.23b) est centré près de $0,51\pi$ (92°) et a un écart type d'environ $0,18\pi$. Les deux pics ont presque la même hauteur, car les domaines de polarités opposées couvrent à peu près la même surface dans l'échantillon de fascia (figure 7.23b). L'écart entre les pics obtenus dans le tendon ischio-jambier humain est de $0,96\pi$, ce qui est proche de la valeur attendue de π . Ce résultat confirme à nouveau que l'erreur devait être importante pour l'écart obtenu dans le tendon de queue de souris.

Un second histogramme de la distribution des pixels en fonction de leur phase et de leur contraste interférométrique (figure 7.23d) est également construit. Celui-ci permet de voir que le contraste interférométrique reste très variable dans le fascia par rapport aux muscles et au PPLN. On observe encore une fois que, lorsque le contraste interférométrique est élevé, la phase du signal GSH est plus proche de l'une ou l'autre des valeurs centrales des deux pics de la distribution, tandis que lorsque le contraste interférométrique est faible, la phase est plus aléatoire.

Les résultats en microscopie GSH interférométrique obtenus dans le fascia sont élégants et viennent supporter les conclusions que nous avons tirées de l'imagerie du tendon (principalement du tendon humain). La forme des domaines observés dans le fascia, principalement leur

longueur, diffère tout de même un peu de celle des domaines qui sont observés dans le tendon. La longueur des domaines dans le fascia est tout de même de l'ordre d'une centaine de microns à quelques centaines de microns, ce qui est similaire à la longueur d'une fibrille de collagène individuelle. La largeur des deux pics, dans la distribution de la phase du signal GSH du fascia, est plus grande que celle du tendon humain, mais plus petite que celle du tendon de queue de souris. L'explication derrière la largeur de ces pics reste encore la même, c'est-à-dire la variation du ratio de fibrilles ayant des polarités opposées à différents endroits dans le tissu. Les résultats obtenus dans le fascia et dans les tissus de collagène en général sont donc en accord avec la théorie présentée au chapitre 4 et avec les images obtenues en microscopie électronique et en microscopie PFM dans les tissus de collagène. Toutefois, puisque ces résultats ont été obtenus après la publication de ceux du tendon de queue de souris, ceux-ci n'ont pas été publiés.

7.3.4 Modèle pour la GSH dans le collagène

La microscopie GSH interférométrique dans les tissus biologiques nous a fourni de nouveaux résultats qui permettent de mieux comprendre le phénomène de génération de seconde harmonique dans les tissus de collagène. Avec ces résultats supplémentaires, nous devrions maintenant être en mesure d'interpréter correctement les images GSH des tissus de collagène. Rappelons que deux hypothèses de l'interprétation des images GSH du collagène ont été présentées au chapitre 4. La première hypothèse soutient que les fibrilles de collagène sont alignées parallèlement les unes aux autres, mais leur polarité aléatoire créerait des zones dans le tissu où le signal GSH interfère constructivement ou destructivement en fonction du ratio de fibrilles ayant des polarités opposées. La seconde hypothèse soutient aussi que les fibrilles de collagène sont alignées parallèlement les unes aux autres, mais que les dipôles non centrosymétriques forment une couche d'épaisseur $\approx \lambda_{GSH}/10$ à la surface des fibrilles, ce qui donnerait des structures $\chi^{(2)}$ en forme de cylindres creux dans les tissus. Cette hypothèse ne tient pas compte du signe de la polarité aléatoire des fibrilles et assume donc que toutes les fibrilles ont la même polarité.

Il apparaît évident à nos yeux que la première hypothèse est la plus plausible et que la seconde hypothèse est fautive. Les résultats obtenus en microscopie électronique, en microscopie PFM et en microscopie GSH interférométrique montrent tous que la polarité $\chi^{(2)}$ des fibrilles de

collagène est aléatoire et se maintient sur de très longues distances (plusieurs centaines de microns) dans les tissus biologiques. De plus, les travaux sur l'origine moléculaire du $\chi^{(2)}$ dans la fibrille de collagène indiquent que chaque molécule de tropocollagène contribue avec son hyperpolarisabilité au $\chi^{(2)}$ de la fibrille (revoir section 4.2.5). Cela implique que le $\chi^{(2)}$ d'une fibrille doit être uniforme dans son volume et ne peut pas être localisé uniquement à sa surface. La seconde hypothèse doit donc être écartée et nous nous concentrerons sur la première pour construire un modèle qui permet d'expliquer correctement la GSH dans les tissus de collagène.

Pour vérifier la validité de la première hypothèse, on commence par l'élaboration d'un modèle théorique pour décrire les tissus de collagène. Par rapport à la taille du volume focal en microscopie GSH, les fibrilles de collagène sont très longues, ont une forme cylindrique et sont bien alignées ensemble dans les tissus conjonctifs comme le tendon et le fascia. On peut donc représenter un tissu par un regroupement dense de cylindres infinis parallèles de diamètre D_f . Ces cylindres sont distribués de manière aléatoire, mais sans qu'ils se superposent, dans le tissu et une polarité $\pm\chi^{(2)}$ leur est attribuée aléatoirement. Le diamètre D_f des fibrilles est variable et suit une distribution probabiliste, pour l'ensemble des fibrilles dans le tissu, qui est similaire à ce qui a été observé expérimentalement [25, 30, 73]. La forme de cette distribution est donnée par la fonction de densité de probabilité

$$p(D_f) = \left(4D_f / \overline{D_f}^2\right) \exp\left(-2D_f / \overline{D_f}\right) \quad (7.1)$$

où $p(D_f)$ est la densité de probabilité, D_f est le diamètre des fibrilles, compris entre $0 < D_f < \infty$, et $\overline{D_f}$ est le diamètre moyen des fibrilles dans le tissu. La densité de cylindres dans le tissu est donnée par le ratio de remplissage ρ . Ce ratio correspond à la surface occupée par les fibrilles divisée par la surface totale dans une section transversale de tissu, comme celle qui a été présentée à la figure 4.7a. Le ratio ρ peut varier dans différents tissus de collagène. Pour un tissu dense, on aura $\rho \geq 0,5$.

Ce modèle est utilisé pour générer aléatoirement des sections transversales de tissus virtuels qui servent à simuler numériquement le phénomène de génération de seconde harmonique dans les tissus de collagène. La figure 7.24 montre un exemple d'un tissu virtuel construit à partir de ce modèle. La section transversale présentée à la figure 7.24a a un aspect similaire à celles qui sont

observées expérimentalement en microscopie électronique dans de véritables tissus de collagène [25, 30, 73].

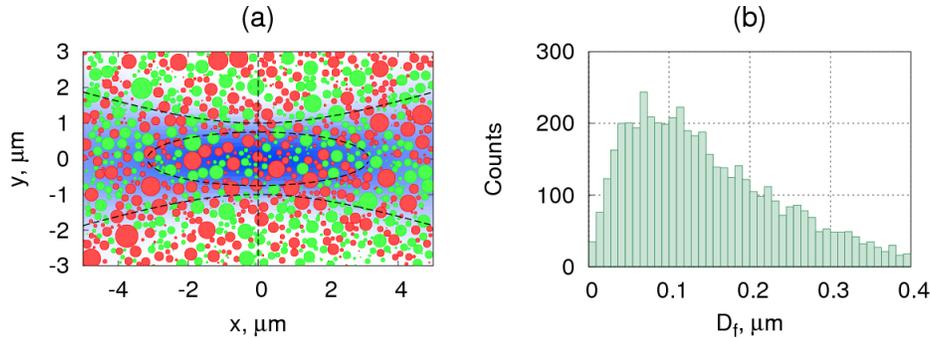


Figure 7.24 Cette figure est tirée de [159 (voir figure 2)]. Exemple d'un tissu de collagène virtuel construit à partir du modèle que nous avons développé. (a) Coupe transversale de $10 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ d'un tissu de collagène virtuel dans lequel un faisceau laser est focalisé. Le trajet du faisceau laser, le plan focal et le point focal sont indiqués par les lignes en pointillés. L'irradiance du faisceau laser apparaît en dégradé de bleu dans l'image. Les fibrilles de collagène sont représentées par des cylindres infinis qui apparaissent comme des cercles dans la coupe transversale. La polarité $\pm\chi^{(2)}$ des fibrilles est aléatoire et est représentée dans l'image en vert ($+\chi^{(2)}$) et en rouge ($-\chi^{(2)}$). La polarisation du laser est parallèle à l'axe des fibrilles. (b) Distribution du diamètre des fibrilles dans le tissu de collagène virtuel présenté en (a). Celle-ci découle de la fonction de densité de probabilité du diamètre des fibrilles donnée par l'équation 7.1.

La simulation numérique de la GSH consiste à calculer l'interaction entre un faisceau laser et un tissu virtuel. On simule donc, dans le tissu virtuel, un faisceau gaussien fortement focalisé qui se propage dans une direction perpendiculaire à l'axe des fibrilles de sorte que sa polarisation soit parallèle à leur axe. Pour simplifier la simulation, on assume que ce faisceau laser est une onde continue et non une impulsion. Cette approximation est correcte pour des impulsions optiques de plus de 100 fs puisqu'elles contiennent un grand nombre de cycles optiques. La longueur d'onde du laser est fixée à 1064 nm pour la simulation et le paramètre w_0 , qui détermine la largeur du point focal, est fixé à $1,1 \mu\text{m}$. La figure 7.24a montre, en traits pointillés et en dégradé de bleu, le faisceau laser ajouté dans un tissu virtuel.

Pour simplifier encore davantage la simulation, on ne tiendra compte que de l'élément d_{33} ou encore $\chi^{(2)}_{zzz}$ du tenseur de susceptibilité optique non linéaire des fibrilles de collagène. Il s'agit de l'élément qui apporte la contribution la plus importante à la GSH pour le collagène et la polarisation laser utilisée fait en sorte que les autres éléments du tenseur $\chi^{(2)}$ ne devraient pas contribuer. On attribue donc une susceptibilité optique non linéaire scalaire $\chi^{(2)}_{zzz}$ à tous les

cylindres qui forment un tissu virtuel. L'amplitude de $\chi^{(2)}_{zzz}$ est constante dans tout le volume des cylindres et a la même grandeur dans tous les cylindres. Toutefois, le signe de $\chi^{(2)}_{zzz}$ pour chaque cylindre dans un tissu virtuel est déterminé aléatoirement pour représenter les deux polarités possibles. La figure 7.24a montre bien à quoi ressemble la structure $\chi^{(2)}$ d'un tissu de collagène. Les cercles verts sont des fibrilles ayant une susceptibilité optique non linéaire $+\chi^{(2)}_{zzz}$, tandis que les cercles rouges sont des fibrilles ayant une susceptibilité optique non linéaire $-\chi^{(2)}_{zzz}$.

Avant d'aller plus loin, il est nécessaire de définir un dernier outil qui servira aux simulations et à l'interprétation des résultats. Supposons que les fibrilles (en verts) ayant une polarité N-C pointant dans la direction $+z$ ont une susceptibilité $+\chi^{(2)}_{zzz}$ et que les fibrilles (en rouges) ayant une polarité N-C pointant dans la direction $-z$ ont une susceptibilité $-\chi^{(2)}_{zzz}$, on définit alors le ratio f

$$f = \frac{A(+\chi^{(2)})}{A(+\chi^{(2)}) + A(-\chi^{(2)})} \approx \frac{n(+\chi^{(2)})}{n(+\chi^{(2)}) + n(-\chi^{(2)})}. \quad (7.2)$$

Où $A(\pm\chi^{(2)})$ correspond à la somme de l'aire des sections des fibrilles ayant un tenseur $\pm\chi^{(2)}$. Puisque le signe de la polarité des fibrilles et leur diamètre sont indépendants et puisque le ratio f est une moyenne, il est également possible d'approximer ce ratio en comptant le nombre de fibrilles $n(\pm\chi^{(2)})$ ayant un tenseur $\pm\chi^{(2)}$. Dans une région donnée, la fraction des fibrilles ayant une susceptibilité $+\chi^{(2)}$ sera donc donnée par le ratio f dans celle-ci. Inversement, la fraction des fibrilles ayant une susceptibilité $-\chi^{(2)}$ sera donnée par $(1 - f)$. Ce ratio est extrêmement important, puisqu'il donne une idée de la quantité d'interférence constructive ou destructive qu'il y aura pour la GSH dans une région donnée. Notez que le ratio f est un paramètre qui varie dans un tissu selon la région dans laquelle il est calculé. Ainsi, le ratio f obtenu en tenant compte de toute la surface du tissu virtuel de la figure 7.24a peut être différent du ratio f obtenu en tenant compte uniquement des fibrilles contenues dans le volume focal délimité en pointillé ou encore du ratio f obtenu en tenant compte uniquement des fibrilles qui seraient contenues dans le volume focal si celui-ci était décalé 2 μm plus haut. Pour éviter les confusions, il est donc utile de bien faire la distinction entre le ratio f moyen dans un tissu ou une région d'un tissu et le ratio f dans le volume focal. Naturellement, en déplaçant le volume focal dans un tissu, le ratio f dans

le volume focal devrait fluctuer, de manière plus ou moins importante, autour du ratio f moyen du tissu.

Le signal GSH généré dans un tissu virtuel est la somme cohérente des signaux GSH générés dans tous les cylindres qui composent celui-ci. On utilise une adaptation vectorielle d'une méthode employant les fonctions de Green pour calculer numériquement le signal GSH obtenu sur l'axe de propagation du faisceau laser dans le champ lointain [163]. Les contributions des cylindres qui forment le tissu virtuel sont additionnées dans le champ lointain pour évaluer l'amplitude et la phase de la composante électrique du champ électromagnétique GSH généré dans celui-ci. Cette méthode suppose que l'indice de réfraction moyen dans le tissu est de 1,4 et ne prend pas en considération les différences d'indices de réfraction dans le tissu virtuel. Cette approximation est acceptable, puisque le principal impact de ces différences d'indices de réfraction est de causer des pertes et une diminution du contraste, en ajoutant de la dispersion. De plus, puisque la longueur d'interaction dans le volume focal du tissu virtuel est très courte ($\sim 4 \mu\text{m}$), on assume que la condition d'accord de phase reliée à Δk est respectée. Ces simulations complexes ont été programmées et réalisées par nos collaborateurs, Konstantin Popov et Lora Ramunno, de l'université d'Ottawa. Il serait possible d'élaborer beaucoup plus en détail pour expliquer comment elles ont été réalisées, mais je ne dispose pas du code qui a servi aux calculs et je n'ai pas contribué directement à cet aspect du projet. Le crédit pour ces simulations revient principalement à Konstantin Popov.

La quantité qui nous intéresse dans le contexte de l'interférométrie est la phase du signal GSH généré dans le tissu virtuel. Dans les résultats des simulations, la phase φ est définie de manière à ce que le signal GSH provenant d'un cylindre minuscule situé au centre du volume focal, ayant une polarité $+\chi^{(2)}$, ait une phase $\varphi = 0$ dans le champ lointain, sur l'axe de propagation du faisceau laser. Étant donné que les tissus virtuels sont construits de manière aléatoire, la phase et l'amplitude du signal GSH obtenu dans chaque tissu virtuel est variable et dépend de la composition locale (répartition, diamètre et polarité) des fibrilles dans le volume focal du laser pour chaque tissu. Notons également qu'en déplaçant le point focal du faisceau laser dans un tissu virtuel, la composition locale des fibrilles change, ce qui entraîne aussi un changement dans la phase et l'amplitude du signal GSH qui est généré.

7.3.5 Résultat des simulations et interprétation

Le modèle que nous avons développé a donc été mis à l'épreuve en réalisant plusieurs simulations dans celui-ci. Nous nous intéressons d'abord au comportement de la phase du signal GSH lorsque le point focal est déplacé dans une direction perpendiculaire à l'axe des fibrilles dans des tissus virtuels ayant différents ratios f moyen. Cela correspond à un balayage le long de l'axe y dans la figure 7.24a. Les résultats de ces simulations sont présentés aux figures 7.25 et 7.26a.

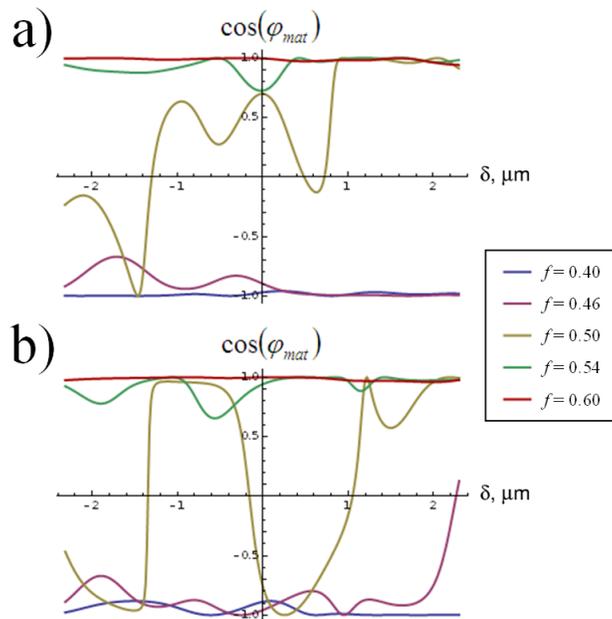


Figure 7.25 (a) Variation de la phase du signal GSH en balayant le point focal sur $5 \mu\text{m}$ dans des tissus virtuels ayant un ratio f moyen de $f = 0,4$, de $f = 0,45$, de $f = 0,5$, de $f = 0,55$ et de $f = 0,6$. (b) Même chose qu'en (a), mais pour des tissus virtuels différents. En générant aléatoirement ces tissus virtuels, les résultats obtenus sont différents.

Ces résultats montrent que, pour les tissus ayant un ratio f moyen de 0,5, c'est-à-dire autant de fibrilles $+\chi^{(2)}$ que de fibrilles $-\chi^{(2)}$, la phase φ du signal GSH fluctue beaucoup, parfois de manière très subite, et peut prendre n'importe quelle valeur entre $-\pi$ et π durant un balayage, sans préférence pour une valeur particulière (courbes jaunes de la figure 7.25 et courbe rouge de la figure 7.26a). Comme nous l'avons supposé vers la fin de la section 7.3.1, la phase de Gouy du faisceau laser, qui ajoute un déphasage variant en fonction de la position dans le volume focal, est responsable du fait que la phase φ puisse prendre des valeurs aléatoires, plutôt que

d'être contrainte à deux valeurs décalées de π , liées à la polarité des fibrilles. On pourrait croire que les effets d'interférences destructives dans un tel tissu entraîneraient nécessairement que l'irradiance du signal GSH soit très faible ou nulle, mais ce n'est pas le cas, en général. Étant donné que les fibrilles sont réparties de manière aléatoire dans le tissu, il est très rare qu'un ratio f d'exactly 0,5 soit maintenu très longtemps dans le volume focal. Même si le ratio f moyen est de 0,5 pour le tissu, le ratio f dans le volume focal fluctue autour de cette valeur durant un balayage. De plus, même si le ratio f est d'exactly 0,5 dans le volume focal, la composition locale (répartition, diamètre et polarité) dans le tissu peut faire en sorte qu'il y ait tout de même un signal GSH, puisque la contribution de chaque fibrille dépend de sa position dans le volume focal. Une fibrille située au centre du volume focal génère plus de signal GSH que si elle se trouve aux bords de celui-ci. Il est donc improbable que le signal GSH s'annule complètement sur une grande surface dans un tissu de collagène, même si le ratio f moyen de celui-ci est de 0,5. En résumé, le signal GSH dans un tissu ayant un ratio f moyen de 0,5 devrait avoir une irradiance qui fluctue autour de valeurs faibles, mais non nulles (à cause de l'interférence destructive) et une phase aléatoire qui peut prendre n'importe quelle valeur entre $-\pi$ et π (à cause de la phase de Gouy).

On s'attendrait donc à ce que la phase mesurée en microscopie GSH interférométrique dans la direction perpendiculaire à l'axe des fibrilles varie brusquement et aléatoirement dans les images, si le ratio f moyen des tissus était de 0,5. En pratique, ce n'est pas tout à fait ce qui a été observé. Certaines régions des tissus imagés, comme la portion du haut du tendon de queue de souris (figure 7.18a) et quelques petites régions du tendon ischio-jambier humain (figure 7.21a) et du fascia (figure 7.23a), affichent bel et bien un tel comportement, mais ce n'est pas le cas pour le restant de la surface des tissus imagés. La portion du bas du tendon de queue de souris et la majorité de la surface imagée dans le tendon ischio-jambier humain et le fascia contiennent de larges domaines dans lesquels la phase est maintenue sur plusieurs microns, voire même plusieurs dizaines de microns, dans la direction perpendiculaire à l'axe des fibrilles. Nous arrivons donc à la conclusion qu'un ratio f moyen de 0,5, à la grandeur du tissu, dans le collagène, décrit mal les résultats expérimentaux du comportement de la phase et n'explique pas la formation de domaines aussi larges. Bien que le ratio f moyen puisse être de 0,5 dans certaines régions des tissus de collagène, il doit être différent de 0,5 dans d'autres régions pour pouvoir expliquer les résultats obtenus dans les images de ces tissus.

En répétant les mêmes simulations, mais pour les tissus virtuels ayant un ratio f moyen inférieur à 0,5, les résultats obtenus sont bien différents. Dans ces conditions, il y a presque toujours une majorité de fibrilles ayant une polarité négative dans le volume focal. Cela fait en sorte que la phase du signal GSH se maintient autour d'une valeur plus proche de $\varphi = \pm\pi$ durant un balayage, comme le montrent les courbes bleues et violettes de la figure 7.25 et la courbe bleue de la figure 7.26a. Bien qu'il y ait encore des fluctuations dans la valeur de la phase du signal GSH, celles-ci sont beaucoup moins importantes que celles qui sont observées dans les tissus ayant un ratio f moyen de 0,5. Aussi, plus le ratio f moyen du tissu virtuel s'éloigne de 0,5, moins les fluctuations de la phase seront importantes comme le montrent les courbes bleues et violettes de la figure 7.25. Bref, la phase tend à se stabiliser près d'une valeur de $\varphi = \pm\pi$ en diminuant le ratio f moyen dans les tissus virtuels.

Ces simulations ont également été réalisées pour des tissus virtuels ayant un ratio f moyen supérieur à 0,5. Sans surprise, le comportement inverse est observé. Comme le montrent les courbes vertes et rouges de la figure 7.25, la phase tend à se stabiliser près d'une valeur de $\varphi = 0$ en augmentant le ratio f moyen dans les tissus virtuels.

Dans les tissus de collagène, le comportement de la phase du signal GSH dans les domaines est bien décrit par les résultats des simulations dans les tissus virtuels ayant un ratio f moyen différent de 0,5. Notre modèle est donc en mesure de reproduire les résultats obtenus expérimentalement en imagerie à condition d'assumer que le ratio f moyen dans le tissu, plus spécifiquement dans ses domaines, soit différent de 0,5. Nous en déduisons que le ratio f moyen varie de manière plus ou moins importante autour de 0,5 en passant d'une région à une autre dans les tissus de collagène, ce qui explique l'observation de domaines $\chi^{(2)}$ de polarités opposées en microscopie GSH interférométrique.

De plus, il est possible d'expliquer la dimension des domaines observés expérimentalement. Dans la direction parallèle à l'axe des fibrilles, les domaines sont très grands, car la polarité des fibrilles se maintient sur toute leur longueur, ou presque (avec, au plus, une inversion de la polarité dans chaque fibrille). Le ratio f change donc très lentement dans la direction longitudinale, car il faut aller plusieurs centaines de microns plus loin pour trouver une configuration de fibrilles différentes, donnant lieu à un ratio f différent. Bref, comparer deux

points espacés de 10 μm le long de l'axe des fibrilles, revient à comparer à peu près la même configuration de fibrilles à quelques détails près. Dans les directions perpendiculaires à l'axe des fibrilles, la configuration des fibrilles et le ratio f changent beaucoup plus rapidement sur des distances allant de quelques microns à quelques dizaines de microns, selon la largeur des domaines. Cela explique pourquoi les domaines $\chi^{(2)}$ des images de microscopie GSH interférométrique des tissus de collagène peuvent mesurer plusieurs centaines de microns de long et quelques microns ou quelques dizaines de microns de large.

Notons que la présence de larges domaines ayant un ratio f moyen différent de 0,5 est en contradiction avec l'idée que la polarité des fibrilles soit déterminée de manière parfaitement aléatoire dans les tissus. Si les signes de la polarité de toutes les fibrilles dans un tissu étaient déterminés de façon purement aléatoire, sans qu'il n'y ait d'interdépendance, le ratio f moyen dans toutes les régions des tissus de collagène serait de 0,5 et ceux-ci ne contiendraient pas de domaines comme ceux observés en microscopie GSH interférométrique. L'existence de ces domaines découle probablement d'un mécanisme, inconnu pour le moment, qui influence le signe de la polarité des fibrilles [162]. Cette dernière conclusion est tirée de nos résultats en microscopie GSH interférométrique, puisque les résultats obtenus en microscopie électronique et en microscopie PFM semblent indiquer que le signe de la polarité des fibrilles est déterminé de manière purement aléatoire. La capacité d'imager une région plus grande donne une meilleure vue d'ensemble de la structure du tissu en microscopie GSH interférométrique, ce qui nous a permis d'arriver à cette conclusion concernant la polarité des fibrilles. Elle mériterait d'être étudiée plus en détail.

D'autres simulations ont également été réalisées pour pousser notre analyse plus loin et améliorer encore davantage notre interprétation de la GSH dans les tissus de collagène. Nous avons donc poursuivi en calculant la probabilité que φ change de π lors d'un balayage de 10 μm dans un tissu virtuel, en fonction de son ratio f moyen. Cette probabilité (P_{slippage}) donne une information quantitative sur l'importance de la fluctuation de la phase en fonction de f . Afin d'estimer cette probabilité, de nombreux tissus virtuels ont été construits aléatoirement pour compter le nombre de fois où φ changeait de π durant un balayage de 10 μm dans ceux-ci. De plus, les simulations ont été réalisées pour différents f . Les résultats expérimentaux des

simulations sont représentés par les points bleus dans le graphique de la figure 7.26b. Cette probabilité semble suivre une fonction gaussienne, qui dépend de f , donnée par la relation

$$P_{slippage} \propto \exp\left(-a(f - 0,5)^2\right) \quad (7.3)$$

où a est un paramètre qui dépend de la distance du balayage, du ratio de remplissage ρ , du diamètre moyen des fibrilles D_f et de la taille du point focal du laser. Pour les paramètres employés dans nos simulations, la probabilité que φ change de π , lors d'un balayage de $10 \mu\text{m}$ dans un tissu virtuel, devient inférieure à 20% pour des tissus ayant un ratio f moyen inférieur à 0,42 ou supérieur à 0,58.

Étant donné que la phase varie lors du balayage d'un tissu virtuel, il nous a semblé être une bonne idée de calculer sa valeur moyenne. En répétant ce calcul dans un très grand nombre de tissus virtuels générés aléatoirement avec un ratio f moyen déterminé, on obtient un histogramme de la distribution de la phase moyenne pour ce ratio f . Nous avons donc réalisé ce calcul dans 500 tissus virtuels avec $f = 0,5$ pour obtenir la distribution de la phase moyenne présentée à la figure 7.26c. Comme on peut voir dans la distribution, la phase moyenne du signal GSH semble être aléatoire lorsque $f = 0,5$ puisque la distribution semble être uniforme. Une observation plus attentive de celle-ci révèle qu'elle ne l'est pas parfaitement. Elle est très légèrement plus haute près de $\varphi = 0$ et de $\varphi = \pm\pi$. Le même calcul a également été réalisé une seconde fois dans 500 autres tissus virtuels avec $f = 0,55$ (figure 7.26d), puis une troisième fois dans 500 tissus virtuels avec $f = 0,45$ (figure 7.26e). Lorsque $f \neq 0,5$, la distribution de la phase moyenne du signal GSH change et forme un pic plus ou moins étroit centré près de $\varphi = 0$ (lorsque $f > 0,5$) ou près de $\varphi = \pm\pi$ (lorsque $f < 0,5$). Ce pic dans la distribution de la phase moyenne peut être approximé par une gaussienne et est représenté en rouge à la figure 7.26d et en vert à la figure 7.26e. De plus, la largeur du pic dans la distribution diminue progressivement lorsque f s'éloigne de 0,5.

Ce fut donc une agréable surprise pour nous d'obtenir exactement le même genre de distributions, à l'aide de simulations numériques dans des tissus virtuels générés à partir de notre modèle théorique, que celles obtenues expérimentalement dans de véritables tissus de collagène (figures 7.18c, 7.21c et 7.23c). En effet, comme l'indiquent les simulations numériques, la largeur des pics dans la distribution de la phase du signal GSH dans les tissus de collagène est

liée au ratio f moyen que l'on retrouve dans les domaines de ces tissus. Puisque les tissus de collagène réels contiennent à la fois des domaines où $f < 0,5$ et $f > 0,5$, la distribution de la phase du signal GSH dans ceux-ci contient deux pics, plus ou moins larges, centrés près de deux valeurs décalées de π (comme si on superposait ensemble les distributions de la figure 7.26d et figure 7.26e). Ce lien que nous avons établi entre notre modèle théorique et les résultats expérimentaux démontre sa validité et est d'une importance capitale.

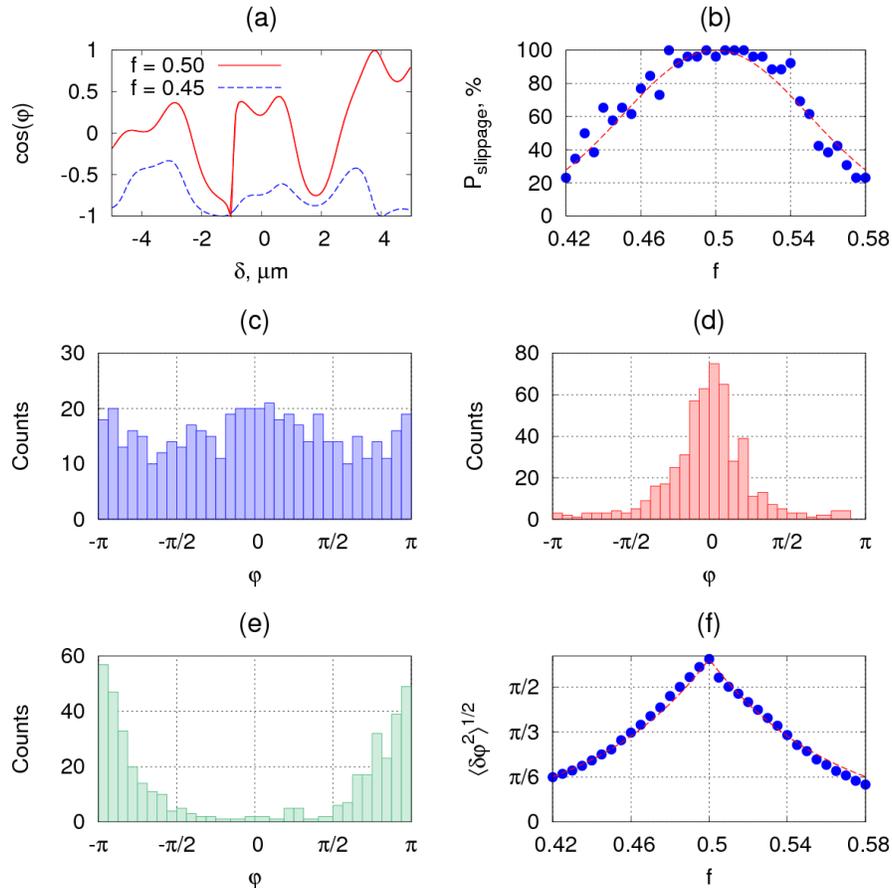


Figure 7.26

Cette figure est tirée de [159 (voir figure 8)]. Résultats des simulations numériques dans des tissus virtuels pour un ratio de remplissage $\rho = 0,5$. (a) Variation de la phase du signal GSH en balayant le point focal sur $10 \mu\text{m}$ dans deux tissus virtuels ayant un ratio f moyen de $f = 0,5$ et de $f = 0,45$. (b) Probabilité que $\cos(\varphi)$ change de 1 ou plus durant un balayage du point focal sur $10 \mu\text{m}$ dans un tissu virtuel. Les points bleus sont les résultats expérimentaux des simulations dans de nombreux tissus virtuels générés aléatoirement, tandis que la ligne rouge en pointillés est une courbe gaussienne qu'on fait correspondre à ces points. (c-e) Distribution de la phase moyenne du signal GSH mesurée dans 500 tissus virtuels différents générés aléatoirement pour un ratio f moyen de (c) $f = 0,5$, en bleu, (d) $f = 0,55$, en rouge, et (e) $f = 0,45$, en vert. (f) Écart type du pic obtenu dans la distribution de la phase moyenne du signal GSH en fonction du ratio f moyen. Les points bleus sont les résultats expérimentaux des simulations, tandis que la ligne rouge en pointillés est une courbe exponentielle qu'on fait correspondre à ces points.

La distribution de la phase moyenne a donc été simulée dans les tissus virtuels pour plusieurs autres ratios f . En mesurant la largeur du pic obtenu dans ces distributions théoriques, un graphique de l'écart type du pic de la distribution de la phase GSH moyenne en fonction de f a été construit (figure 7.26f). Les résultats expérimentaux des simulations sont représentés par les points bleus dans celui-ci, tandis que la courbe rouge en pointillés est une fonction exponentielle qu'on fait correspondre à ces points. Ce graphique est extrêmement important, puisqu'il sert de clé pour estimer le ratio f moyen dans un domaine, à partir de la largeur de la distribution de la phase mesurée en microscopie GSH interférométrique.

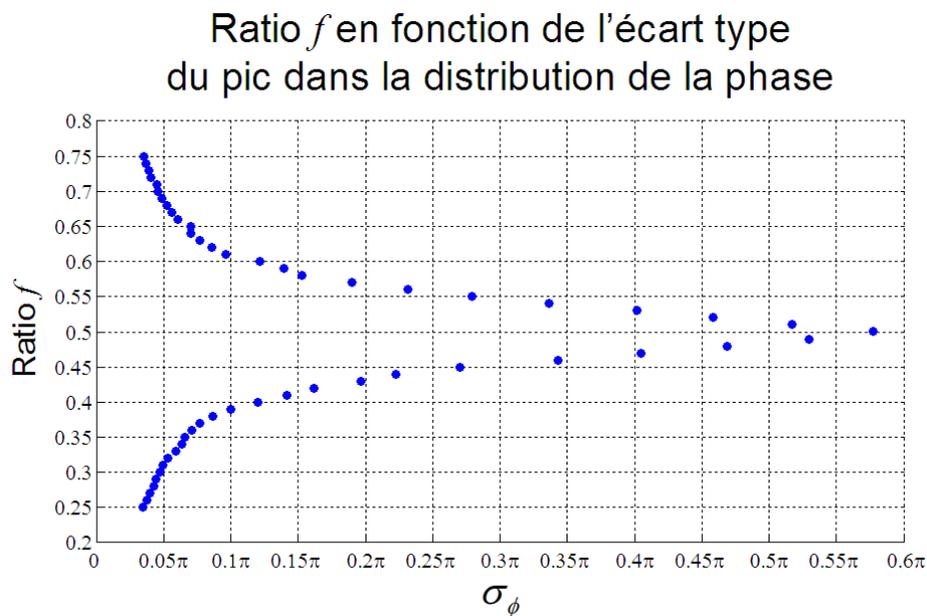


Figure 7.27 Cette figure est tirée de [158 (voir figure 6a)]. Ratio f moyen en fonction de l'écart type du pic obtenu dans la distribution de la phase moyenne du signal GSH. Les points bleus sont les résultats expérimentaux des simulations. Ce graphique est le même que celui de la figure 7.26f, mais les axes ont été échangés et des points ont été ajoutés pour les valeurs de f plus éloignées de 0,5. Ce graphique est valide pour $\lambda = 1064$ nm et $D_f = 80$ nm.

Une seconde version plus complète de ce graphique a été réalisée pour permettre de déterminer le ratio f moyen dans un domaine lorsque l'écart type du pic de la distribution de la phase est très petit (figure 7.27). Les résultats expérimentaux des simulations sont représentés par les points bleus dans celui-ci. Cette deuxième version révèle que la relation n'est pas tout à fait exponentielle, comme semblaient l'indiquer les données expérimentales, moins nombreuses, de la première version. Notez que la relation établie entre f et σ_ϕ n'est exacte que pour $\lambda = 1064$ nm

et un diamètre de fibrilles moyen $D_f = 80$ nm. D'autres simulations ont révélées qu'une augmentation du diamètre moyen des fibrilles dans les tissus entraîne un élargissement du pic le long de l'axe f . Il est donc nécessaire de se trouver dans des conditions expérimentales très proches de celles employées dans les simulations pour utiliser la relation de la figure 7.27 et déduire avec précision le ratio f moyen dans les domaines des tissus de collagène.

Bien que nous ne puissions pas vérifier si le diamètre moyen des fibrilles de collagène est bien de 80 nm dans les tissus que nous avons imagés, la relation de la figure 7.27 peut tout de même servir à estimer f dans les domaines des tissus. Par exemple, dans le tendon de queue de souris (figures 7.18c), les pics de la distribution de la phase ont un écart type de $0,2\pi$ (pic rouge) et de $0,25\pi$ (pic vert), ce qui nous permet d'estimer que le ratio f passe de 0,57 (pic rouge) à 0,45 (pic vert) entre ses domaines ayant des polarités opposées. Dans le tendon ischio-jambier humain (figures 7.21c), les pics de la distribution de la phase ont un écart type de $0,09\pi$ (pic rouge) et de $0,12\pi$ (pic vert), ce qui nous permet d'estimer que f passe de 0,62 (pic rouge) à 0,40 (pic vert) entre ses domaines ayant des polarités opposées. Dans le fascia (figures 7.23c), les pics de la distribution de la phase ont un écart type de $0,18\pi$, ce qui nous permet d'estimer que f passe de 0,575 (pic rouge) à 0,425 (pic vert) entre ses domaines ayant des polarités opposées. Bref, en mesurant l'écart type de la distribution de la phase dans un domaine particulier, il est possible d'estimer le ratio f dans celui-ci. C'est ce que nous avons fait dans le domaine encadré en jaune dans l'image de la figure 7.28a. La distribution de la phase du signal GSH dans ce domaine contient un seul pic ayant un écart type d'environ $0,16\pi$ (figure 7.28b), ce qui nous permet d'estimer le ratio f moyen dans ce domaine à une valeur de 0,42.

Notons toutefois que l'estimation du ratio f par cette méthode peut être faussée. Si le diamètre moyen des fibrilles dans le tissu est plus grand que celui qui a été employé pour les simulations (80 nm), les valeurs de f seront estimées plus près de 0,5 qu'elles ne le sont réellement dans le tissu. La longueur d'onde du laser et la taille du volume focal doivent également avoir un impact similaire. De plus, si d'autres causes d'erreurs expérimentales font en sorte d'introduire des décalages dans la phase du signal GSH, le pic de la distribution de la phase sera plus large et f sera estimé plus près de 0,5 qu'il ne l'est réellement dans le tissu.

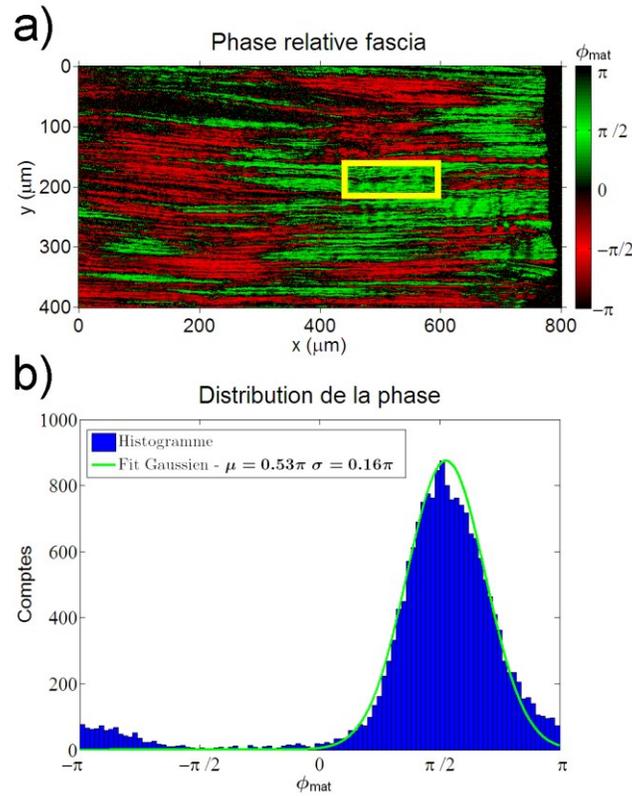


Figure 7.28 (a) Image de la phase du signal GSH dans le fascia. (b) Histogramme de la distribution de la phase dans la région encadrée en jaune dans l'image (a). L'écart type du pic de la distribution dans ce domaine est de $0,16\pi$ ce qui signifie que le ratio f moyen dans ce domaine est d'environ 0,42.

Cette erreur sur l'estimation du ratio f est moins importante lorsque la distribution de la phase est formée de pics larges, mais elle devient très importante lorsque f s'approche de 0 ou 1 dans le tissu. Les pics observés dans la distribution de la phase du cristal PPLN et des muscles en sont un bon exemple. Même si cette analogie est un peu abusive puisque ces matériaux ne sont pas formés de cylindres, comme dans le collagène, on peut considérer que dans le cristal PPLN et dans les tissus musculaires, f alterne entre 0 et 1 en passant d'un domaine à l'autre. Toutefois, l'écart type des pics dans le PPLN est de $0,045\pi$, tandis qu'il est de $0,06\pi$ et $0,07\pi$ dans les muscles. Selon la relation de la figure 7.27, ces écarts types donnent des valeurs de f situées près de 0,30 et 0,70 pour le PPLN et de 0,34 et 0,66 pour les muscles. Bref, on constate que la détermination du ratio f dans un domaine à l'aide de cette méthode reste approximative. Notons toutefois que cette méthode est plus précise lorsqu'elle sert à estimer un ratio f près de 0,5, pour une distribution de la phase contenant un pic large.

Il est intéressant d'être en mesure d'estimer f dans les tissus de collagène, car il existe également un lien entre f et l'irradiance du signal GSH. Le signal GSH généré dans la direction avant dans un tissu dépend principalement du ratio f de l'ensemble des fibrilles contenues dans le volume focal du faisceau laser. Si f est égal à 0,5, il y a autant de fibrilles avec une polarité dans une direction que dans l'autre et le signal GSH devrait être faible. Si f est inférieur ou supérieur à 0,5, une majorité de fibrilles ont la même polarité et l'accord de phase est meilleur, puisqu'il y a moins d'interférence destructive du signal GSH généré à l'intérieur du volume focal. Le signal GSH avant devrait donc croître de manière quadratique en fonction de l'écart entre f et 0,5. Ce concept est très important, puisque le ratio f dans le volume focal change selon sa position dans le tissu, ce qui entraîne une variation de la quantité de signal GSH avant.

En étant en mesure d'estimer f , il devient donc possible d'expliquer, de manière quantitative, la différence de signal GSH, en moyenne, dans la direction avant, entre les différentes régions d'un tissu. C'est d'ailleurs ce que nous observons expérimentalement en comparant les images de la phase avec celles du signal GSH avant. Dans le tendon ischio-jambier humain (figures 7.20a et 7.21a) et dans le fascia (figures 7.22b et 7.23a), là où la phase est bien définie, le signal GSH est fort, tandis que là où elle l'est moins bien, le signal GSH est plus faible. Ce comportement est plus difficile à observer dans le tendon de queue de souris, puisque le ratio f reste assez près de 0,5 dans ce tissu. Notez que puisque le contraste interférométrique dépend de la racine carrée de l'irradiance du signal GSH, celui-ci devrait augmenter de manière linéaire dans les images du contraste interférométrique en fonction de l'écart entre f et 0,5. La découverte d'une corrélation entre la largeur du pic dans la distribution de la phase, le ratio f moyen dans un domaine et l'irradiance du signal GSH avant est importante. Celle-ci pourrait d'ailleurs servir d'outil pour réaliser des mesures quantitatives en microscopie GSH dans les tissus de collagène, ce qui représente, encore à ce jour, un défi difficile à relever.

Il est également intéressant de simuler dans les tissus virtuels, le ratio de signal GSH avant vs arrière en fonction de f et du diamètre moyen des fibrilles. Les résultats de ces simulations sont présentés à la figure 7.29. À cause de la différence de condition d'accord de phase entre la GSH avant et arrière ($\Delta k \neq \Delta k_{epi}$), une augmentation du diamètre moyen D_f des fibrilles entraînera à la fois une augmentation du signal GSH avant et une diminution du signal GSH arrière. Cela explique la différence de hauteur et de pente entre les différentes courbes du graphique.

Simulation du ratio de signal GSH avant vs arrière en fonction du ratio f et du diamètre des fibrilles

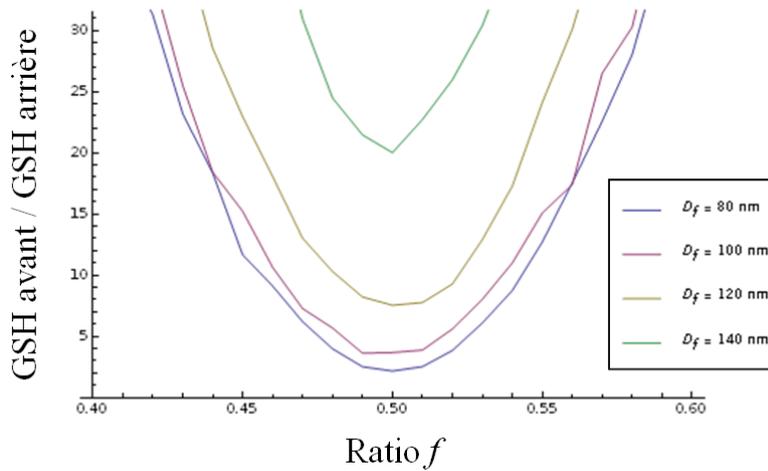


Figure 7.29 Simulation numérique du ratio de signal GSH avant vs arrière dans les tissus virtuels en fonction du ratio f moyen pour différents diamètres moyens D_f de fibrilles. La différence d'accord de phase entre la GSH avant et arrière ($\Delta k \neq \Delta k_{epi}$) fait en sorte que le ratio de signal GSH avant vs arrière augmente avec le diamètre moyen des fibrilles D_f . Le ratio de signal GSH avant vs arrière varie de façon quadratique avec l'écart entre f et 0,5, car le signal GSH avant varie de cette manière en fonction de f , tandis que le signal GSH arrière est indépendant de f . La longueur de cohérence L_{coh} $_{epi}$ très courte fait en sorte que le signe de la polarité des fibrilles n'a pas d'impact significatif sur la quantité de signal GSH arrière. Cela explique pourquoi le signal GSH arrière dépend si peu de f .

Le signal GSH arrière est très peu affecté par le ratio f moyen du tissu, car la longueur de cohérence L_{coh} $_{epi}$ est trop courte pour que la polarité des fibrilles ait un impact significatif sur la quantité de signal GSH arrière. C'est d'ailleurs pour cette raison que le signal arrière est très uniforme dans les images GSH des tissus de collagène (figure 7.15c). Toutefois, le signal GSH avant dépend fortement de f dans le volume focal, car la longueur de cohérence L_{coh} est beaucoup plus grande que le diamètre des fibrilles. Comme expliqué plus tôt, cela fait en sorte que la polarité des fibrilles joue un rôle très important dans l'accord de phase qui détermine la quantité de signal GSH avant qui est généré. La quantité de signal GSH avant est donc minimale pour $f = 0,5$ et augmente de manière quadratique lorsque f s'éloigne de cette valeur. Cela explique les modulations importantes du signal GSH avant observées dans les images GSH des tissus de collagène (figures 7.15b, 7.19b, 7.20a et 7.22b). Puisque le signal GSH arrière varie très peu en fonction de f , le ratio de signal GSH avant vs arrière et la quantité de signal GSH avant se comportent de la même manière en fonction f , c'est-à-dire de manière quadratique. Toutes les conclusions présentées ici ne peuvent pas être tirées directement du graphique de la figure 7.29,

mais elles sont logiques d'un point de vue physique, elles sont supportées par les résultats expérimentaux des images GSH dans les tissus et elles ont toutes été vérifiées par des simulations numériques utilisant notre modèle [135 (voir section 6.4)].

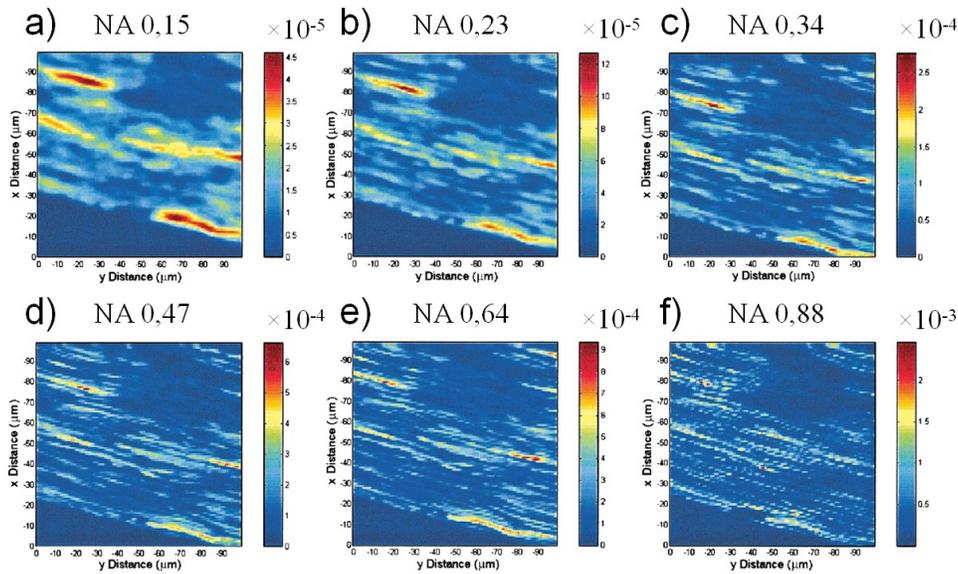


Figure 7.30 Cette figure est inspirée de [27 (voir figure 6)]. Images GSH $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ d'une section longitudinale de tendon de queue de souris. Les six images ont été prises dans la même région, mais en utilisant une ouverture numérique différente à chaque fois. (a) Ouverture numérique de 0,15. (b) Ouverture numérique de 0,23. (c) Ouverture numérique de 0,134. (d) Ouverture numérique de 0,47. (e) Ouverture numérique de 0,64. (f) Ouverture numérique de 0,88. La taille des pixels dans toutes les images est de $1 \mu\text{m}$ ce qui donne une variation de signal plus brusque entre les pixels adjacents lorsque l'ouverture numérique est élevée. Les images obtenues n'ont pas été traitées ou modifiées.

Avec cette nouvelle perspective sur la GSH dans les tissus de collagène, il est intéressant de réexaminer d'anciens résultats, publiés par Patrick Stoller en 2003, qui montrent les variations dans l'image GSH avant d'un tissu en fonction de l'ouverture numérique employée pour l'illumination [27 (voir figure 6)]. On observe dans les images de la figure 7.30 qu'en augmentant l'ouverture numérique du faisceau qui sert à l'illumination, le signal GSH devient plus fort, car l'irradiance augmente dans le volume focal en diminuant sa taille. On observe également que de nouvelles structures, plus fines, apparaissent dans l'image en augmentant l'ouverture numérique, car la résolution spatiale est améliorée. Il est important de réaliser qu'en faisant varier l'ouverture numérique, donc la taille du volume focal, le nombre de fibrilles qui contribue au signal GSH avant change aussi. Si le volume focal est plus grand, plus de fibrilles

contribuent à la détermination de f dans le volume focal et les chances d'obtenir une valeur de f proche de 0,5 sont plus grandes. Inversement, si le volume focal est plus petit, moins de fibrilles contribuent à la détermination de f dans le volume focal et il devient plus probable de rencontrer des endroits où f s'éloigne de 0,5. Cela explique pourquoi les structures observées sont plus fines et pourquoi les modulations du signal GSH avant sont plus importantes dans la direction perpendiculaire à l'axe des fibrilles lorsque l'ouverture numérique utilisée est plus grande.

Nous sommes maintenant en mesure d'interpréter correctement les images obtenues en microscopie GSH. Les longues et fines structures visibles dans les images GSH du signal avant ne sont pas des fibrilles individuelles. Il s'agit tout simplement de longues régions dans lesquelles le ratio f dans le volume focal est éloigné de 0,5. Bien que ces structures ressemblent à des fibrilles individuelles, le tissu contient un grand nombre de fibrilles ayant une polarité plus ou moins aléatoire qui sont densément regroupées ensemble. C'est la fluctuation du ratio f et de la condition d'accord de phase dans la direction perpendiculaire à l'axe des fibrilles qui explique la présence de ces structures dans les images GSH du signal avant, dans les tissus de collagène. De plus, on retrouve des régions dans les tissus de collagène qui forment des domaines dans lesquels f moyen est différent de 0,5. Ces domaines mesurent plusieurs centaines de microns de long et de quelques microns à quelques dizaines de microns de large. Finalement, nous avons pu déterminer qu'il existe une corrélation entre la distribution de la phase, le ratio f moyen et la quantité de signal GSH avant dans les domaines des tissus de collagène. Voilà, d'après nous, l'explication de l'origine des modulations du signal GSH avant, à l'échelle microscopique, dans les images GSH des tissus conjonctifs. Cette explication est accompagnée d'un modèle relativement simple et robuste, qui décrit bien les résultats obtenus expérimentalement (en microscopie GSH, en microscopie GSH interférométrique, en microscopie électronique et en microscopie PFM) lorsqu'il est employé pour réaliser des simulations.

7.4 Conclusion

La microscopie GSH interférométrique peut donc servir à l'imagerie des matériaux cristallins et à l'imagerie des tissus biologiques. Par rapport à la microscopie GSH standard, cette technique donne des informations supplémentaires sur la structure non centrosymétrique du matériau

imagé, en permettant d'obtenir une image de la phase relative du signal GSH à chaque pixel dans la zone imagée. L'image de la phase permet de voir très clairement les domaines ayant des polarités opposées dans le cristal PPLN, dans les tissus musculaires et dans les tissus de collagène. Nous avons pu mettre en évidence, de cette façon, la bipolarité des filaments épais dans le sarcomère des muscles. Les domaines formés dans les tissus de collagène sont toutefois plus complexes. Les fibrilles sont densément regroupées de sorte que leurs axes soient parallèles. Elles forment une distribution hétérogène de cylindres ayant une polarité $\pm\chi^{(2)}$, déterminée de façon plus ou moins aléatoire. On définit le ratio f comme étant le nombre de fibrilles ayant une polarité $+\chi^{(2)}$ par rapport au nombre total de fibrilles dans une région donnée. La fluctuation du ratio f explique la présence des domaines $\chi^{(2)}$ à l'échelle microscopique dans les tissus de collagène. Ces domaines mesurent plusieurs centaines de microns de long et de quelques microns à quelques dizaines de microns de large. En comparant la distribution de la phase obtenue en microscopie GSH interférométrique avec celles qui ont été obtenues à l'aide de simulations numériques dans des tissus virtuels générés à partir de notre modèle, il est possible d'estimer la valeur de f . En fait, il existe une corrélation entre la distribution de la phase, le ratio f moyen et la quantité de signal GSH avant dans les domaines des tissus de collagène. Les structures qui ressemblent à des fibrilles individuelles, observées dans les images du signal avant en microscopie GSH standard, sont dues aux fluctuations de f dans le volume focal, lorsque le faisceau laser est balayé à différents endroits dans le tissu. Le modèle que nous avons élaboré nous permet d'interpréter correctement les images obtenues en microscopie GSH standard et les résultats des simulations, à l'aide de celui-ci, sont en accord avec ceux obtenus expérimentalement en microscopie GSH, en microscopie GSH interférométrique, en microscopie électronique et en microscopie PFM.

8 CONCLUSION

8.1 Résultats

Le premier objectif de ce projet de doctorat était de convertir un microscope GSH en microscope GSH interférométrique. Des expériences préliminaires ont dû être réalisées et plusieurs configurations de montage ont été envisagées et testées pour nous familiariser avec celui-ci. Nous avons finalement décidé d'utiliser une source laser picoseconde, une configuration d'interféromètre dans laquelle les deux bras sont superposés spatialement, une plaque de verre rotative pour contrôler la phase relative entre les bras de l'interféromètre et un système de balayage utilisant une plateforme de translation. Cette configuration était la plus robuste, même si elle n'était pas forcément la meilleure. Après avoir construit et programmé le nouveau montage, celui-ci a d'abord servi à l'imagerie d'un cristal périodiquement orienté de niobate de lithium (PPLN). Les images GSH interférométriques brutes dans le PPLN ont été traitées pour obtenir les images du contraste interférométrique en fonction de la phase de référence, qui permettent de calculer une image de la phase relative du signal GSH dans la zone imagée. Ces images permettent de bien distinguer les domaines ayant un $\chi^{(2)}$ de signe opposé dans le cristal. La phase du signal GSH est très bien définie dans ces domaines. La distribution de la phase dans l'image contient deux pics étroits et la différence de phase entre ceux-ci est proche de π . Les résultats de l'imagerie du PPLN démontrent que notre premier objectif a été atteint. Le montage du microscope GSH interférométrique est fonctionnel et la méthode mise au point pour traiter les images est simple et très efficace.

Notre second objectif était d'utiliser le nouveau montage du microscope GSH interférométrique pour l'imagerie des tissus biologique. En effet, la microscopie GSH interférométrique avait déjà permis d'obtenir des images de la phase du signal GSH dans des cristaux, mais elle n'avait pas encore servi à son plein potentiel pour l'imagerie des tissus biologiques. La phase du signal GSH est pourtant une information très importante dans les tissus, puisqu'elle est liée à l'orientation de la polarité des protéines non centrosymétriques. Le microscope GSH interférométrique nous a permis d'obtenir de bonnes images du contraste interférométrique et de la phase du signal GSH

dans différents tissus biologiques comme le muscle gastrocnémien médial de souris, le tendon de queue de souris, le tendon ischio-jambier humain et le fascia du muscle tibial antérieur de souris. Ces images ont ensuite été interprétées pour expliquer le lien entre celles-ci et la structure des tissus.

Les résultats dans les muscles sont faciles à comprendre. La structure bipolaire des filaments (épais) de myosine et l'arrangement pratiquement cristallin de ces filaments dans le sarcomère et des sarcomères dans les fibres musculaires font en sorte que les muscles striés ont une structure non centrosymétrique similaire à celle d'un cristal périodiquement orienté. Le $\chi^{(2)}$ dans un sarcomère est non nul dans la bande A et son signe s'inverse, sur une distance extrêmement courte, à la ligne M. On observe donc deux domaines ayant des polarités opposées pour chaque sarcomère dans les images GSH interférométriques, tandis qu'on observe généralement une seule bande de signal, mais parfois deux, pour chaque sarcomère dans les images GSH standard. La distribution de la phase dans les muscles contient deux pics un peu plus larges que dans le cristal PPLN. La phase du signal GSH dans les muscles n'est donc pas aussi bien définie que dans le cristal PPLN, mais la différence de phase entre deux domaines adjacents est toujours de π . Les images GSH interférométriques mettent donc en évidence la bipolarité des filaments de myosine, comme l'avaient montré les images en microscopie électronique de ces filaments. Les images du contraste interférométrique des tissus musculaires permettent également de voir quelques dislocations dans la structure périodique des sarcomères.

Les résultats dans les tissus de collagène, comme le tendon et le fascia, sont plus difficiles à interpréter correctement. La structure non centrosymétrique des tissus de collagène est complexe. Les résultats de la microscopie électronique et de la microscopie PFM dans ces tissus indiquent que les fibrilles de collagène sont densément regroupées et ressemblent à de longs cylindres alignés parallèlement les uns aux autres. Leur diamètre est variable et suit une distribution allant de 10 nm à 500 nm. Le signe de leur polarité semble être aléatoire et se maintient sur toute la longueur de la fibrille, avec, au plus, une inversion de signe. Les images du contraste interférométrique et de la phase du signal GSH dans les tissus de collagène montrent qu'ils contiennent de très longs domaines plus ou moins larges dans lesquels la phase du signal GSH ne change pas ou très peu. Ces domaines peuvent mesurer plusieurs centaines de microns en longueur et de quelques microns à quelques dizaines de microns en largeur. Le signe du $\chi^{(2)}$ peut

être opposé entre les différents domaines du tissu. La distribution de la phase du signal dans la zone imagée d'un tissu de collagène contient deux pics beaucoup plus larges que ceux observés dans le cristal PPLN et dans les tissus musculaires. On constate également que la phase du signal GSH dans un domaine est plus près de la valeur centrale de l'un des deux pics de la distribution lorsque le contraste interférométrique est élevé dans ce domaine.

On peut donc supposer, à partir de ces résultats, que la phase du signal GSH dépend de la composition locale (répartition, diamètre et polarité) des fibrilles à l'intérieur du volume focal et est affectée par la phase de Gouy. Plus un nombre important de fibrilles partagent la même polarité dans le volume focal, plus la phase du signal GSH, dans le domaine où se trouve le volume focal, sera bien définie. Selon le signe de la polarité de cette majorité de fibrilles, la phase du signal GSH sera près de la valeur centrale de l'un ou l'autre des deux pics de la distribution. Toutefois, si le volume focal contient un nombre à peu près égal de fibrilles de polarités opposées, alors la phase du signal GSH peut prendre n'importe quelle valeur à cause de la phase de Gouy et en fonction de la composition locale des fibrilles dans le volume focal. Enfin, avant d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats, ce que nous ferons dans les paragraphes qui suivront, soulignons que nous sommes les premiers à obtenir des images GSH interférométrique et des images de la phase du signal GSH dans les tissus biologiques à l'aide d'un microscope GSH interférométrique. Nous avons donc atteint le second objectif du projet avec succès.

Notre troisième et dernier objectif était de trouver une explication qui décrit correctement le phénomène de GSH dans les tissus de collagène, afin d'être en mesure de bien interpréter les images GSH obtenues dans ces tissus. Deux hypothèses contradictoires avaient été proposées pour expliquer la GSH dans les tissus de collagène. La première soutient que la polarité aléatoire des fibrilles est responsable des variations importantes dans le signal GSH avant des images. La seconde soutient que la distribution du $\chi^{(2)}$ à la surface des fibrilles forme une structure de cylindres creux qui explique le ratio de signal avant vs arrière anormalement faible dans les tissus de collagène. Puisque les résultats obtenus en microscopie électronique, en microscopie PFM et en microscopie GSH interférométrique montrent tous que la polarité des fibrilles de collagène est aléatoire et se maintient sur des distances de plusieurs centaines de microns dans les tissus biologiques, il semble évident à nos yeux que la première hypothèse est la plus

plausible. De plus, les travaux sur l'origine moléculaire du $\chi^{(2)}$ dans la fibrille de collagène indiquent que le $\chi^{(2)}$ d'une fibrille doit être uniforme dans son volume et ne peut pas être localisé uniquement à sa surface. La seconde hypothèse est donc incorrecte et doit être rejetée.

Pour vérifier cette hypothèse et pousser plus loin notre interprétation des images GSH, nous avons élaboré un modèle qui a servi à réaliser des simulations numériques. Les fibrilles sont représentées par des cylindres infinis de diamètre D_f avec une polarité $\pm\chi^{(2)}$. Dans le tissu, ces cylindres sont distribués de manière aléatoire, sans se superposer, de sorte qu'ils soient regroupés parallèlement avec une densité donnée par le ratio de remplissage ρ . De plus, leur diamètre D_f et leur polarité sont déterminés aléatoirement. Le diamètre suit une distribution probabiliste similaire à ce qui a été observé expérimentalement dans les tissus de collagène. Pour nous aider dans nos explications, on définit le ratio f comme étant le nombre de fibrilles ayant une polarité $+\chi^{(2)}$ par rapport au nombre total de fibrilles dans une région donnée.

Ce modèle est utilisé pour générer aléatoirement des sections transversales de tissus virtuels, avec un ratio f moyen prédéterminé, qui servent à simuler le phénomène de génération de seconde harmonique dans les tissus de collagène. L'interaction entre un tissu virtuel et un faisceau laser fortement focalisé est simulée numériquement pour calculer les fluctuations dans l'irradiance et la phase du signal GSH lors d'un balayage du faisceau dans la direction perpendiculaire à l'axe des fibrilles. Les simulations utilisent une adaptation vectorielle d'une méthode employant les fonctions de Green pour calculer numériquement, dans le champ lointain et le long de l'axe de propagation du faisceau laser, la somme cohérente des signaux GSH des cylindres qui composent le tissu virtuel. La phase et l'amplitude du signal GSH obtenu dans un tissu virtuel est variable et dépend de la composition locale (répartition, diamètre et polarité) des fibrilles dans le volume focal du laser pour chaque tissu. De plus, en déplaçant le point focal du faisceau laser dans un tissu virtuel, la composition locale des fibrilles change, ce qui entraîne aussi un changement dans la phase et l'amplitude du signal GSH qui est généré.

Les résultats des simulations montrent que la phase du signal GSH se rapproche de $\varphi = 0$ lorsque le ratio f dans le tissu est plus grand que 0,5, tandis qu'elle se rapproche de $\varphi = \pm\pi$ lorsque le ratio f dans le tissu est plus petit que 0,5. Aussi, plus le ratio f dans le tissu est près de 0,5, plus les fluctuations de la phase seront importantes durant un balayage du faisceau dans le tissu.

Lorsque le ratio f est très près de 0,5, la phase du signal GSH peut même s'inverser complètement durant un balayage. Comme nous l'avons supposé avec les résultats de la microscopie GSH interférométrique dans les tissus de collagène, ces variations de la phase sont causées par la phase de Gouy et dépendent de la composition locale des fibrilles dans le volume focal. Les simulations démontrent également qu'il est très difficile d'obtenir et de maintenir les conditions pour que le signal GSH s'annule complètement par interférence destructive, même lorsque le ratio f moyen du tissu est près de 0,5. Le signal GSH peut donc être faible dans ces conditions, mais rarement nul.

D'autres simulations ont également été réalisées pour calculer la distribution de la phase moyenne dans 500 tissus virtuels ayant le même ratio f . Elles ont été répétées pour différents ratios f . Cette distribution est pratiquement uniforme pour des tissus ayant un ratio f de 0,5. Toutefois, si le ratio f des tissus est supérieur à 0,5, la distribution de la phase moyenne contiendra un seul pic centré à $\varphi = 0$ avec une largeur qui diminue lorsque f s'éloigne de 0,5. Inversement, si le ratio f des tissus est inférieur à 0,5, la distribution de la phase moyenne contiendra un seul pic centré à $\varphi = \pm\pi$ avec une largeur qui diminue lorsque f s'éloigne de 0,5. Les distributions obtenues à l'aide des simulations numériques dans les tissus virtuels basés sur notre modèle ressemblent beaucoup à celles obtenues expérimentalement dans de véritables tissus de collagène. La distribution de la phase du signal GSH dans les tissus de collagène réels contient deux pics de largeur variable. Comme l'indiquent les simulations numériques, cette largeur des pics est liée au ratio f moyen dans les domaines des tissus. Puisque les tissus de collagène réels contiennent à la fois des domaines où $f < 0,5$ et $f > 0,5$, la distribution de la phase du signal GSH dans ceux-ci contient deux pics, plus ou moins larges, centrés près de deux valeurs décalées de π .

Les simulations démontrent également que la quantité de signal GSH avant est minimale lorsque $f = 0,5$ et augmente de manière quadratique lorsque f s'éloigne de cette valeur. Cela est dû au fait que la longueur de cohérence pour le signal avant est plus grande que le diamètre des fibrilles. La polarité des fibrilles joue donc un rôle très important dans l'accord de phase qui détermine la quantité de signal GSH avant qui est généré. La quantité de signal GSH arrière est indépendante de f . Cela est dû au fait que la longueur de cohérence pour le signal arrière est plus petite que le diamètre des fibrilles. Le signal GSH arrière est donc très peu affecté par la polarité des fibrilles.

Les fluctuations rapides de f dans le volume focal, en balayant un tissu, sont responsables des modulations importantes du signal GSH avant. C'est la raison pour laquelle des structures qui ressemblent à des fibrilles individuelles sont observées dans les images GSH standard des tissus de collagène.

Il existe donc une corrélation entre la distribution de la phase, le ratio f moyen et la quantité de signal GSH avant dans les domaines des tissus de collagène. Il est possible d'estimer la valeur de f dans les domaines d'un tissu en comparant la largeur des distributions de la phase obtenue en microscopie GSH interférométrique dans ceux-ci, avec celles obtenues par simulations numériques dans les tissus virtuels. Cette méthode d'approximation du ratio f moyen dans un domaine est prometteuse, mais reste toutefois approximative. Le diamètre moyen des fibrilles dans le tissu affecte également la largeur de la distribution de la phase, ce qui ajoute une source d'incertitude importante dans l'estimation de f , si celui-ci est inconnu. Cette méthode est plus précise pour estimer un ratio f près de 0,5 puisque, dans ces conditions, le pic de la distribution de la phase est large.

La taille des domaines observés expérimentalement peut également être expliquée par le ratio f . La polarité des fibrilles est maintenue sur toute leur longueur (avec, au plus, une inversion de la polarité dans chaque fibrille). La configuration des fibrilles qui déterminent le ratio f change donc très lentement dans la direction parallèle à l'axe des fibrilles. Toutefois, dans les directions perpendiculaires à l'axe des fibrilles, la configuration et le ratio f changent beaucoup plus rapidement. C'est pour cette raison que les domaines $\chi^{(2)}$ des images de microscopie GSH interférométrique des tissus de collagène peuvent mesurer plusieurs centaines de microns dans la direction longitudinale, tandis qu'ils ne mesurent que quelques microns à quelques dizaines de microns dans la direction transversale.

Les résultats obtenus en microscopie GSH interférométrique et le modèle que nous avons proposé nous permettent donc d'interpréter correctement les images obtenues en microscopie GSH standard dans les tissus conjonctifs de collagène. Les résultats des simulations réalisées avec ce modèle sont en accord avec les résultats obtenus expérimentalement en microscopie GSH, en microscopie GSH interférométrique, en microscopie électronique et en microscopie PFM. Nous avons donc atteint le troisième et dernier objectif du projet avec succès.

8.2 Ouverture

Bien que mon projet soit complété, des améliorations pourraient être apportées au montage et certaines questions restent encore sans réponses claires. La première amélioration importante du montage consiste à remplacer la source laser à impulsions picosecondes (Vanguard) par la source laser à impulsions femtosecondes (Tsunami). Cette modification requiert de compenser la dispersion dans l'interféromètre en utilisant des cristaux de calcite et des lames d'onde comme illustré à la figure 5.3b. Cela permettrait d'augmenter le signal GSH de deux ordres de grandeur et d'améliorer le contraste interférométrique. Cette modification du montage a été réalisée par mes collègues Charles-André Couture et Stéphane Bancelin durant la rédaction de cette thèse [155, 158].

Une seconde amélioration importante du montage pour la microscopie GSH interférométrique serait de revenir au système de balayage utilisant les miroirs galvanométriques. Cette modification permettrait de diminuer le temps d'acquisition des images de plus d'un ordre de grandeur. Cela accélérerait beaucoup les manipulations, puisque plusieurs images d'une même région doivent être prises en microscopie GSH interférométrique. Cette adaptation requiert de remplacer les lentilles dans le microscope pour laisser passer le signal GSH de référence. De plus, le déphasage entre le laser et la GSH de référence, causé par les lentilles et l'objectif de microscope (revoir figure 5.8b), doit également être compensé durant le traitement des images. Cette amélioration du montage a été réalisée par mon collègue Stéphane Bancelin durant la révision de cette thèse [164]. Elle permet au montage d'acquérir des images interférométriques 40 fois plus rapidement. De plus, en utilisant moins d'images pour réaliser l'interpolation, il est possible de réduire davantage le temps nécessaire pour obtenir une image de la phase du signal GSH.

Finalement, une troisième amélioration pourrait également être apportée au montage en remplaçant la plaque de verre par une ligne à délai ou encore un modulateur de phase optique. La ligne à délai éliminerait le décalage des faisceaux et donnerait un déphasage qui varie linéairement, sans nécessiter d'étape de caractérisation. Le modulateur de phase optique demanderait de modifier le montage, de compenser un délai plus important et d'ajuster le

programme d'acquisition des données du microscope, mais permettrait d'obtenir en temps réel les images du contraste interférométrique et de la phase relative du signal GSH.

Dans le cristal PPLN, il faudrait corrélérer la dénivellation entre les domaines adjacents avec le décalage de 13° observé sur le déphasage de π auquel on s'attendait. Cela mettrait en évidence le pouvoir de résolution axial de l'interférométrie qui devrait être significativement inférieur à la grandeur de la longueur d'onde.

La microscopie GSH interférométrique peut servir à mieux comprendre l'organisation structurale de n'importe quel tissu riche en protéines non centrosymétriques bien organisées. Il serait donc intéressant de s'en servir pour étudier d'autres tissus biologiques, comme le cartilage. Mes collègues Charles-André Couture et Stéphane Bancelin ont d'ailleurs étudié le cartilage durant la rédaction de cette thèse [155, 158]. Ils ont obtenu des résultats intéressants, cohérents avec ceux de Marie-Andrée Houle [135].

Dans les tissus musculaires, la présence d'une ou de deux bandes de signal GSH par sarcomère reste un phénomène qui est mal expliqué. Nous ignorons également si les dislocations que nous avons observées dans la structure des sarcomères des muscles sont un phénomène bien connu ou non. Bref, ces questions méritent d'être étudiées plus en détail.

Dans les tissus de collagène, la présence de larges domaines ayant un ratio f moyen différent de 0,5 semble être en contradiction avec l'idée que la polarité des fibrilles soit déterminée de manière parfaitement aléatoire dans ceux-ci. L'existence de domaines ayant un ratio f différent de 0,5 découle probablement d'un mécanisme, inconnu pour le moment, qui influence le signe de la polarité des fibrilles. La polarité des fibrilles affecte sans doute les propriétés mécaniques des tissus puisqu'elles sont piézoélectriques [162]. Ces questions méritent également d'être étudiées plus en détail.

Pour finir, l'approximation du ratio f à partir de la largeur de la distribution de la phase dans les domaines des tissus de collagène est un outil prometteur qui doit être mis à l'épreuve de manière rigoureuse. Cet outil permettrait de faire des observations quantitatives plutôt que qualitatives dans les images GSH des tissus de collagène.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- [1] W. Denk, J. H. Strickler & W. W. Webb, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy”, *Science* 248, 73-76 (1990).
- [2] K. König, “Multiphoton microscopy in life sciences”, *Journal of microscopy* 200, 83-104 (2000).
- [3] P. J. Campagnola, H. A. Clark, W. A. Mohler, A. Lewis & L. M. Loew, “Second-harmonic imaging microscopy of living cells”, *Journal of Biomedical Optic* 6(3), 277-286 (2001).
- [4] R. M. Williams, W. R. Zipfel & W. W. Webb, “Multiphoton microscopy in biological research”, *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 603-608 (2001).
- [5] P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone & W. A. Mohler, “Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues”, *Biophysical Journal* 81, 493-508 (2002).
- [6] G. Cox, E. Kable, A. Jones, I. Fraser, F. Manconi & M. D. Gorrell, “3-Dimensional imaging of collagen using second harmonic generation”, *Journal of structural biology* 141, 53-62 (2003).
- [7] W. R. Zipfel, R. M. Williams & W. W. Webb, “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences”, *Nature Biotechnology* 21(11), 1369-1377 (2003).
- [8] I. Freund & M. Deutsch, “Second-harmonic microscopy of biological tissue”, *Optics Letters* 11(2), 94-96 (1986).
- [9] R. Cicchi, N. Vogler, D. Kapsokalyvas, B. Dietzek, J. Popp & F. S. Pavone, “From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy”, *Journal of Biophotonics* 6(2), 129-142 (2013).

- [10] S.-W. Chu, S.-Y. Chen, G.-W. Chern, T.-H. Tsai, Y.-C. Chen, B.-L. Lin & C.-K. Sun, “Studies of $\chi(2)/\chi(3)$ Tensors in Submicron-Scaled Bio-Tissues by Polarization Harmonics Optical Microscopy”, *Biophysical Journal* 86(6), 3914–3922 (2004).
- [11] L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M. Blanchard-Desce & J. Mertz, “Coherent Scattering in Multi-Harmonic Light Microscopy”, *Biophysical Journal* 80(3), 1568-1574 (2001).
- [12] J. Mertz & L. Moreaux, “Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers”, *Optics Communications* 196, 325-330 (2001).
- [13] S. G. Page & H. E. Huxley, “Filament Lengths in Striated Muscle”, *The Journal of Cell Biology* 19, 369–390 (1963).
- [14] T. D. Pollard, “Structure and Polymerization of Acanthamoeba Myosin-II Filaments”, *The Journal of Cell Biology* 95, 816–825 (1982).
- [15] J. Q. Xu, B. A. Harder, P. Uman & R. Craig, “Myosin Filament Structure in Vertebrate Smooth Muscle”, *The Journal of Cell Biology* 134(1), 53–66 (1996).
- [16] A. C. Engel & C. Franzini-Armstrong, “Myology”, 3rd edition, The McGraw-Hill Companies, 1960 pages (2004), Chapitre 7 (R. W. Craig & R. Padron, “Molecular Structure of the Sarcomere”, 129-166).
- [17] R. Craig & J. L. Woodhead, “Structure and function of myosin filaments”, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 204–212 (2006).
- [18] W. Mohler, A. C. Millard & J. P. Campagnola, “Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins”, *Methods* 29, 97-109 (2003).
- [19] S. V. Plotnikov, A. C. Millard, P. J. Campagnola & W. A. Mohler, “Characterization of the Myosin-Based Source for Second-Harmonic Generation from Muscle Sarcomeres”, *Biophysical Journal* 90(2), 693–703 (2006).

- [20] C. Greenhalgh, N. Prent, C. Green, R. Cisek, A. Major, B. Stewart & V. Barzda, “Influence of semicrystalline order on the second-harmonic generation efficiency in the anisotropic bands of myocytes”, *Applied Optics* 46(10), 1852–1859 (2007).
- [21] C. Odin, T. Guilbert, A. Alkilani, O. P. Boryskina, V. Fleury & Y. Le Grand, “Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy”, *Optics Express* 16(20), 16151–16165 (2008).
- [22] F. Tiaho, G. Recher & D. Rouède, “Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy”, *Optics Express* 15(19), 12286–12295 (2007).
- [23] G. Recher, D. Rouède, P. Richard, A. Simon, J.-J. Bellanger & F. Tiaho, “Three distinct sarcomeric patterns of skeletal muscle revealed by SHG and TPEF microscopy”, *Optics Express* 17(22), 19763–19777 (2009).
- [24] G. Recher, D. Rouède, E. Schaub & F. Tiaho, “Skeletal muscle sarcomeric SHG patterns photo-conversion by femtosecond infrared laser”, *Biomedical Optics Express* 2(2), 374–384 (2011).
- [25] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter & J. A. Chapman, “Collagen fibril formation”, *Biochemical Journal* 316, 1-11 (1996).
- [26] I. Freund, M. Deutsch & A. Sprecher, “Connective tissue polarity: Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon”, *Biophysical journal* 50, 693–712 (1986).
- [27] P. Stoller, P. M. Celliers, K. M. Reiser & A. M. Rubenchik, “Quantitative second-harmonic generation microscopy in collagen”, *Applied Optics* 42(25), 5209–5219 (2003).
- [28] R. M. Williams, W. R. Zipfel & W. W. Webb, “Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils”, *Biophysical journal* 88(2), 1377-1386 (2005).

- [29] L. Tian, J. Qu, Z. Guo, Y. Jin, Y. Meng & X. Deng, “Microscopic second-harmonic generation emission direction in fibrillous collagen type I by quasi-phase-matching theory”, *Journal of Applied Physics* 108(5), 054701 1-9 (2010).
- [30] D. A. D. Parry & A. S. Craig, “Quantitative Electron Microscope Observations of the Collagen Fibrils in Rat-Tail Tendon”, *Biopolymers* 16(5), 1015-1031 (1977).
- [31] C. Harnagea, M. Vallières, C. P. Pfeffer, D. Wu, B. R. Olsen, A. Pignolet, F. Légaré & Alexei Gruverman, “Two-dimensional nanoscale structural and functional imaging in individual collagen type I fibrils”, *Biophysical journal* 98(12), 3070-3077 (2010).
- [32] D. Denning, S. Alilat, S. Habelitz, A. Fertala & B. J. Rodriguez, “Visualizing molecular polar order in tissues via electromechanical coupling”, *Journal of Structural Biology* 180, 409-419 (2012).
- [33] J. Hulliger, “Connective Tissue Polarity Unraveled by a Markov-Chain Mechanism of Collagen Fibril Segment Self-Assembly”, *Biophysical Journal* 84(6), 3501-3507 (2003).
- [34] I. Rocha-Mendoza, D. R. Yankelevich, M. Wang, K. M. Reiser, C. W. Frank & A. Knoesen, “Sum Frequency Vibrational Spectroscopy: The Molecular Origins of the Optical Second-Order Nonlinearity of Collagen”, *Biophysical journal* 93(12), 4433–4444 (2007).
- [35] A. E. Tuer, S. Krouglov, N. Prent, R. Cisek, D. Sandkuijl, K. Yasufuku, B. C. Wilson & V. Barzda, “Nonlinear Optical Properties of Type I Collagen Fibers Studied by Polarization Dependent Second Harmonic Generation Microscopy”, *The Journal of Physical Chemistry B* 115, 12759-12769 (2011).
- [36] F. Légaré, C. P. Pfeffer & B. R. Olsen, “The Role of Backscattering in SHG Tissue Imaging”, *Biophysical journal* 93(4), 1312–1320 (2007).
- [37] R. Lacombe, O. Nadiarnykh, S. S. Townsend & P. J. Campagnola, “Phase Matching considerations in Second Harmonic Generation from tissues: Effects on emission directionality, conversion efficiency and observed morphology”, *Optics Communications* 281, 1823-1832 (2008).

- [38] C. P. Pfeffer, B. R. Olsen, F. Ganikhanov & F. Légaré, “Multimodal nonlinear optical imaging of collagen arrays”, *Journal of Structural Biology* 164, 140-145 (2008).
- [39] M. Strupler & M.-C. Schanne-Klein, “Simulating Second Harmonic Generation from Tendon Do We See Fibrils?”, *OSA Conference Paper (BIOMED) BTuD83*, 1-3 (2010).
- [40] M. Rivard, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, C. Harnagea, C. P. Pfeffer, M. Vallières, Y. St-Pierre, A. Pignolet, M. A. El Khakani & F. Légaré, “The structural origin of second harmonic generation in fascia”, *Biomedical Optics Express* 2(1), 26–36 (2011).
- [41] P.-J. Su, W.-L. Chen, Y.-F. Chen & C.-Y. Dong, “Determination of Collagen Nanostructure from Second-Order Susceptibility Tensor Analysis”, *Biophysical journal* 100(8), 2053-2062 (2011).
- [42] K. Kemnitz, K. Bhattacharyya, J. M. Hicks, G. R. Pinto & K. B. Eisenthal, “The phase of second-harmonic light generated at an interface and its relation to absolute molecular orientation”, *Chemical Physics Letters* 131, 285-290 (1986).
- [43] J. Y. Huang, Z. Chen & A. Lewis, “Second-Harmonic Generation in Purple Membrane-Poly(vinyl alcohol) Films: Probing the Dipolar Characteristics of the Bacteriorhodopsin Chromophore in bR570 and M412”, *The Journal of Physical Chemistry* 93(8), 3314-3320 (1989).
- [44] F. Laurell, M. G. Roelofs, W. Bindloss, H. Hsiung, A. Suna & J. D. Bierlein, “Detection of ferroelectric domain reversal in KTiOPO₄ waveguides”, *Journal of Applied Physics* 71(10), 4664-4670 (1992).
- [45] S. Kurimura & Y. Uesu, “Application of the second harmonic generation microscope to nondestructive observation of periodically poled ferroelectric domains in quasi-phase-matched wavelength converters”, *Journal of Applied Physics* 81(1), 369-375 (1997).
- [46] Y. Uesu, “SHG Microscope : Principle and its Applications”, *Journal of the Korean Physical Society* 32, 461-463 (1998).

- [47] P. Rechsteiner, J. Hulliger & M. Flörsheimer, “Phase-Sensitive Second Harmonic Microscopy Reveals Bipolar Twinning of Markov-Type Molecular Crystals”, *Chemistry of Materials* 12(11), 3296–3300 (2000).
- [48] S. Yazdanfar, L. H. Laiho & P. T. C. So, “Interferometric second harmonic generation microscopy”, *Optics Express* 12(12), 2739–2745 (2004).
- [49] L. Le Xuan, S. Brasselet, F. Treussart, J.-F. Roch, F. Marquier, D. Chauvat, S. Perruchas, C. Tard & T. Gacoin, “Balanced homodyne detection of second-harmonic generation from isolated subwavelength emitters”, *Applied Physics Letters* 89(12), 121118 1-3 (2006).
- [50] J. Kaneshiro, Y. Uesu & T. Fukui, “Visibility of inverted domain structures using the second harmonic generation microscope: Comparison of interference and non-interference cases”, *Journal of the Optical Society of America B* 27(5), 888–894 (2010).
- [51] M. Born & E. Wolf, “Principles of Optics”, 7th (expanded) edition, Cambridge University Press, 952 pages (1999), section 6.6 (“The microscope”, 281-285).
- [52] Wikipedia, “Microscope Optique”, https://fr.wikipedia.org/wiki/Microscope_optique. (Consulté le 2015/08/20)
- [53] M. Born & E. Wolf, “Principles of Optics”, 7th (expanded) edition, Cambridge University Press, 952 pages (1999), section 8.6.3 (“Image formation in the microscope”, 465-476, équation 32).
- [54] F. Zernike, “Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects”, *Physica* 9(7), 686-698 (1942).
- [55] M. Mansuripur, “Nomarski's Differential Interference Contrast Microscope”, *Optics & Photonics News* 10(9), 34-37 (1999).
- [56] M. Minsky, “Microscopy apparatus”, US Patent 3013467 A, (1957).
- [57] M. Minsky, “Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope”, *Scanning* 10(4), 128-138 (1988).

- [58] G. Cox & C. J. R. Sheppard, “Practical Limits of Resolution in Confocal and Non-Linear Microscopy”, *Microscopy research and technique* 63, 18-22 (2004).
- [59] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito & J. G. Fujimoto, “Optical Coherence Tomography”, *Science* 254(5035), 1178-1181 (1991).
- [60] S. W. Hell & J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy”, *Optics Letters* 19(10), 780-782 (1994).
- [61] G. Moneron & S. W. Hell, “Two-photon excitation STED microscopy”, *Optics Express* 17(17), 14567-14573 (2009).
- [62] Nobelprize.org, “The Nobel Prize in Chemistry 2014”, www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/. (Consulté le 2015/08/20)
- [63] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz & H. F. Hess, “Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution”, *Science* 313, 1642-1645 (2006).
- [64] M. J. Rust, M. Bates & X. Zhuang, “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”, *Nature Methods* 3(10), 793-796 (2006).
- [65] L. Moreaux, O. Sandre & J. Mertz, “Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy”, *Journal of the Optical Society of America B* 17(10), 1685-1694 (2000).
- [66] P. J. Campagnola & L. M. Loew, “Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms”, *Nature Biotechnology* 21(11), 1356-1360 (2003).
- [67] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz & Y. Silberberg, “Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation”, *Applied Physics Letters* 70(8), 922-924 (1997).
- [68] D. Yelin & Y. Silberberg, “Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology”, *Optics Express* 5(8), 169-175 (1999).

- [69] M. D. Duncan, J. Reintjes & T. J. Manuccia, “Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope”, *Optics Letters* 7(8), 350-352 (1982).
- [70] A. Zumbusch, G. R. Holtom & X. S. Xie, “Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering”, *Physical Review Letters* 82, 4142-4145 (1999).
- [71] J.-X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book & X. S. Xie, “An Epi-Detected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (E-CARS) Microscope with High Spectral Resolution and High Sensitivity”, *The Journal of Physical Chemistry B* 105(7), 1277–1280 (2001).
- [72] Nobelprize.org, “The Nobel Prize in Physics 1986”, www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/. (Consulté le 2015/08/20)
- [73] J. Zhu, X. Zhang, Y. Ma, C. Zhou & Y. Ao, “Ultrastructural and Morphological Characteristics of Human Anterior Cruciate Ligament and Hamstring Tendons”, *The Anatomical Record* 295, 1430-1436 (2012).
- [74] Wikipedia, “Microscope électronique en transmission”, https://fr.wikipedia.org/wiki/Microscopie_électronique_en_transmission. (Consulté le 2015/08/20)
- [75] Wikipedia, “Microscope électronique à balayage”, https://fr.wikipedia.org/wiki/Microscopie_électronique_à_balayage. (Consulté le 2015/08/20)
- [76] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber & E. Weibel, “Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy”, *Physical Review Letters* 49(1), 57-61 (1982).
- [77] Youtube, “A Boy And His Atom: The World’s Smallest Movie”, <https://www.youtube.com/watch?v=oSCX78-8-q0>. (Consulté le 2015/08/20)
- [78] G. Binnig, C. F. Quate & Ch. Gerber, “Atomic Force Microscope”, *Physical Review Letters* 56(9), 930-933 (1986).

- [79] C. C. Neacsu, B. B. van Aken, M. Fiebig & M. B. Raschke, “Second-harmonic near-field imaging of ferroelectric domain structure of YMnO₃”, *Physical Review B* 79(10), 100107 1-4 (2009).
- [80] R. W. Boyd, “Nonlinear optics”, 3rd edition, Academic Press, 613 pages (2008), Chapitre 1 (“The nonlinear optical susceptibility”, 1-67).
- [81] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters & G. Weinreich, “Generation of optical harmonics”, *Physical Review Letters* 7, 118-119 (1961).
- [82] T. H. Maiman, “Stimulated optical radiation in ruby”, *Nature* 187, 493-494 (1960).
- [83] M. Göppert-Mayer, “Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen”, *Ann. Phys.* 9, 273-294 (1931). [Title translation: On elementary processes with two quantum steps]
- [84] B. R. Masters et P. T. C. So, “Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy”, 1st edition, Oxford University Press, 896 pages (2008), Chapitre 1 (“The genesis of nonlinear microscopies and their impact on modern developments”, 5-29).
- [85] Wikipedia, “Effet Pockels”, https://fr.wikipedia.org/wiki/Effet_Pockels. (Consulté le 2015/08/21)
- [86] W. Kaiser & C. G. B. Garrett, “Two-photon excitation in CaF₂:Eu²⁺”, *Physical Review Letters* 7(6), 229-231 (1961).
- [87] S. Singh & L. T. Bradley, “Three-photon absorption in naphthalene crystals by laser excitation”, *Physical Review Letters* 12(22), 612-614 (1964).
- [88] R. W. Boyd, “Nonlinear optics”, 3rd edition, Academic Press, 613 pages (2008), Section 12.5 (“Multiphoton Absorption and Multiphoton Ionization”, 549-560).
- [89] C. V. Raman et K. S. Krishnan, *Nature* 121, 501-502 (1928).
- [90] G. Eckhardt, R. W. Hellwarth, F. J. McClung, S. E. Schwarz, D. Weiner & E. J. Woodbury, “Stimulated raman scattering from organic liquids”, *Physical Review Letters* 9(11), 455-457 (1962).

- [91] P. D. Maker & R. W. Terhune, "Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength", *Physical Review* 137(3A), A801-A818 (1965).
- [92] A. Volkmer, L. D. Book & X. S. Xie, "Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Imaging based on Raman free induction decay", *Applied Physics Letters* 80(9), 1505-1507 (2002).
- [93] J.-X. Cheng & X. S. Xie, "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications", *The Journal of Physical Chemistry B* 108(3), 827-840 (2004).
- [94] C. L. Evans & X. S. Xie, "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy : Chemical Imaging for Biology and Medicine", *The Annual Review of Analytical Chemistry* 1, 883-909 (2008).
- [95] A. F. Pegoraro, A. Ridsdale, D. J. Moffatt, Y. Jia, J. P. Pezacki & A. Stolow, "Optimally chirped multimodal CARS microscopy based on a single Ti:sapphire oscillator", *Optics Express* 17(4), 2984-2996 (2009).
- [96] Wikipedia, "Effet Kerr", https://fr.wikipedia.org/wiki/Effet_Kerr. (Consulté le 2015/08/21)
- [97] S. Fine & W. P. Hansen, "Optical Second Harmonic Generation in Biological Systems", *Applied Optics* 10(10), 2350-2353 (1971).
- [98] B. F. Levine & C. G. Bethea, "Second and third order hyperpolarizabilities of organic molecules", *The Journal of Chemical Physics* 63, 2666-2682 (1975).
- [99] J. N. Gannaway & C. J. R. Sheppard, "Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope", *Optical and Quantum Electronics* 10, 435-439 (1978).
- [100] S. Roth & I Freund, "Second harmonic generation in collagen", *The Journal of Chemical Physics* 70(4), 1637-1643 (1979).

- [101] S. Roth & I Freund, "Second Harmonic Generation and Orientational Order in Connective Tissue : A Mosaic Model for Fibril Orientational Ordering in Rat-Tail Tendon", *Journal of Applied Crystallography* 15, 72-78 (1982).
- [102] P. F. Moulton, "Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al₂O₃", *Journal of the Optical Society of America B* 3(1), 125-133 (1986).
- [103] D. E. Spence, P. N. Kean & W. Sibbett, "60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser", *Optics Letters* 16(1), 42-44 (1991).
- [104] D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal & Y. Silberberg, "Third-harmonic microscopy with a titanium-sapphire laser", *Applied Physics B* 74, 97-101 (2002).
- [105] C. Xu, R. M. Williams, W. Zipfel & W. W. Webb, "Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorophores", *Bioimaging* 4, 198-207 (1996).
- [106] V. Nikolenko, B. Nemet & R. Yuste, "A two-photon and second-harmonic microscope", *Methods* 30, 3-15 (2003).
- [107] N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer et C. Xu, "In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain", *Nature Photonics* 7, 205-209 (2013).
- [108] J.-X. Cheng & X. S. Xie, "Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy", *Journal of the Optical Society of America B* 19(7), 1604-1610 (2002).
- [109] D. Débarre, W. Supatto, A.-M. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M.-C. Schanne-Klein & E. Beaurepaire, "Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy", *Nature Methods* 3, 47-53 (2006).
- [110] E. O. Potma & X. S. Xie, "CARS Microscopy For Biology and Medicine", *Optics & Photonics News* (November), 40-45 (2004).

- [111] E. R. Andresen, S. R. Keiding & E. O. Potma, "Picosecond anti-Stokes generation in a photonic-crystal fiber for interferometric CARS microscopy", *Optics Express* 14(16), 7246-7251 (2006).
- [112] J.-X. Cheng, Y. K. Jia, G. Zheng & X. S. Xie, "Laser-Scanning Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy and Applications to Cell Biology", *Biophysical Journal* 83(1), 502-509 (2002).
- [113] H. Wang, Y. Fu, P. Zickmund, R. Shi & J.-X. Cheng, "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Imaging of Axonal Myelin in Live Spinal Tissues", *Biophysical Journal* 89(1), 581-591 (2005).
- [114] E. Bélanger, F. P. Henry, R. Vallée, M. A. Randolph, I. E. Kochevar, J. M. Winograd, C. P. Lin & D. Côté, "*In vivo* evaluation of demyelination and remyelination in a nerve crush injury model", *Biomedical Optics Express* 2(9), 2698-2708 (2011).
- [115] F. Ganikhanov, C. L. Evans, B. G. Saar & X. S. Xie, "High-sensitivity vibrational imaging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering (FM CARS) microscopy", *Optics Letters* 31(12), 1872-1874 (2006).
- [116] C. Kittel, "Introduction to Solid State Physics", 7th edition, Wiley, 688 pages (2005).
- [117] R. W. Boyd, "Nonlinear optics", 3rd edition, Academic Press, 613 pages (2008), Chapitre 2 ("Wave-Equation Description of Nonlinear Optical Interactions", 69-133).
- [118] "Refractive index database", refractiveindex.info. (Consulté le 2015/08/24)
- [119] J.-X. Cheng, A. Volkmer & X. S. Xie, "Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy", *Journal of the Optical Society of America B* 19(6), 1363-1375 (2002).
- [120] S. Cattaneo, M. Siltanen, F. Xiang Wang & M. Kauranen, "Suppression of nonlinear optical signals in finite interaction volumes of bulk materials", *Optics Express* 13(24), 9714-9720 (2005).

- [121] B. Richards & E. Wolf, “Electromagnetic diffraction in optical systems II . Structure of the image field in an aplanatic system”, *The Royal Society* 253(1274), 358-379 (1959).
- [122] E. Y. S. Yew & C. J. R. Sheppard, “Effects of axial field components on second harmonic generation microscopy”, *Optics Express* 14(3), 1167-1174 (2006).
- [123] P. Genevet, N. Yu, F. Aieta, J. Lin, M. A. Kats, R. Blanchard, M. O. Scully, Z. Gaburro & F. Capasso, “Ultra-thin plasmonic optical vortex plate based on phase discontinuities”, *Applied Physics Letters* 100, 013101 1-3 (2012).
- [124] J. Mertz, “Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy”, *The European Physical Journal D* 3, 53-66 (1998).
- [125] F. Helmchen & W. Denk, “Deep tissue two-photon microscopy”, *Nature Methods* 2(12), 932-940 (2005).
- [126] Y. Sheng, A. Best, H.-J. Butt, W. Krolikowski, A. Arie & K. Koynov, “Three-dimensional ferroelectric domain visualization by Cerenkov-type second harmonic generation”, *Optics Express* 18(16), 16539-16545 (2010).
- [127] S. Kondo, N. Shibata, T. Mitsuma, E. Tochigi & Y. Ikuhara¹, “Dynamic observations of dislocation behavior in SrTiO₃ by in situ nanoindentation in a transmission electron microscope”, *Applied Physics Letters* 100, 181906 1-4 (2012).
- [128] H. W. Jang, A. Kumar, S. Denev, M. D. Biegalski, P. Maksymovych, C. W. Bark, C. T. Nelson, C. M. Folkman, S. H. Baek, N. Balke, C. M. Brooks, D. A. Tenne, D. G. Schlom, L. Q. Chen, X. Q. Pan, S.V. Kalinin, V. Gopalan & C. B. Eom, “Ferroelectricity in Strain-Free SrTiO₃ Thin Films”, *Physical Review Letters* 104, 197601 1-4 (2010).
- [129] G. Latour, J.-P. Echard, M. Didier & M.-C. Schanne-Klein, “In situ 3D characterization of historical coatings and wood using multimodal nonlinear optical microscopy”, *Optics Express* 20(22), 24623-24635 (2012).

- [130] T. Yasui, Y. Tohno & T. Araki, “Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light”, *Applied Optics* 43(14), 2861-2867 (2004).
- [131] C. P. Pfeffer, D. R. Olsen & F. Légaré, “Second harmonic generation imaging of fascia within thick tissue block”, *Optics Express* 15(12), 7296-7302 (2007).
- [132] M. Strupler, A.-M. Pena, M. Hernest, P.-L. Tharaux, J.-L. Martin, E. Beaufort & M.-C. Schanne-Klein, “Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues”, *Optics Express* 15(7), 4054-4065 (2007).
- [133] P. Xu, E. Kable, C. J. R. Sheppard & G. Cox, “A quasi-crystal model of collagen microstructure based on SHG microscopy”, *Chinese Optics Letters* 8(2), 213-216 (2010).
- [134] C. P. Brown, M.-A. Houle, M. Chen, A. J. Price, F. Légaré & H. S. Gill, “Damage initiation and progression in the cartilage surface probed by nonlinear optical microscopy”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 5(1), 62–70 (2012).
- [135] M.-A. Houle, “Microscopie à Génération de Seconde Harmonique appliquée à l'imagerie de l'ostéo-arthrite”, *Mémoire de maîtrise en Science de l'Énergie et des Matériaux (Université du Québec. INRS, Québec)*, 86 pages (2013).
- [136] L. Jay, “Imagerie de génération de seconde et troisième harmoniques en ophtalmologie cornéenne”, *Thèse de doctorat en Science de l'Énergie et des Matériaux (Université du Québec. INRS, Québec)*, 250 pages (2013).
- [137] N. Prent, C. Greenhalgh, R. Cisek, A. Major, J. Aus der Au, S. Elmore, J. H. G. M. van Beek, B. Stewart, J. A. Squier & V. Barzda, “Second harmonic generation microscopy reveals contraction dynamics in muscle cells”, *La Physique Au Canada* 65(3), 129–131 (2009).
- [138] D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, M. Ingelsson, B. T. Hyman & W. W. Webb, “Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy”, *Biophysics* 100(12), 7081-7086 (2003).

- [139] F. S. Pavone & P. J. Campagnola, “Second Harmonic Generation Imaging”, 1st edition, Taylor & Francis, 440 pages (2014), Chapitre 7 (A. C. Kwan, “Second-Harmonic Generation Imaging of Microtubules”, 151-167).
- [140] F. S. Pavone & P. J. Campagnola, “Second Harmonic Generation Imaging”, 1st edition, Taylor & Francis, 440 pages (2014), Section III (“Applications of SHG”, 243-426).
- [141] F. S. Pavone & P. J. Campagnola, “Second Harmonic Generation Imaging”, 1st edition, Taylor & Francis, 440 pages (2014), Chapitre 10 (M. Nuriya & R. Yuste, “Imaging Membrane Potential with SHG”, 229-242).
- [142] S. Bancelin, “Imagerie quantitative du collagène par génération de seconde harmonique”, Thèse de doctorat en Biophysique (École Polytechnique (Paris). Laboratoire d'Optique et Biosciences, France), 205 pages (2014).
- [143] D. R. Baselt, J.-P. Revel & J. D. Baldeschwieler, “Subfibrillar structure of type I collagen observed by atomic force microscopy”, *Biophysical Journal* 65, 2644-2655 (1993).
- [144] J. Parkinson, K. E. Kadler & A. Brass, “Self-assembly of rodlike particles in two dimensions: A simple model for collagen fibrillogenesis”, *Physical Review E* 50(4), 2963-2966 (1994).
- [145] P. Stoller, K. M. Reiser, P. M. Celliers & A. M. Ruenchik, “Polarization-Modulated Second Harmonic Generation in Collagen”, *Biophysical Journal* 82, 3330-3342 (2002).
- [146] I. Gusachenko, V. Tran, Y. G. Houssen, J.-M. Allain & M.-C. Schanne-Klein, “Polarization-Resolved Second-Harmonic Generation in Tendon upon Mechanical Stretching”, *Biophysical Journal* 102(9), 2220–2229 (2012).
- [147] Y. Jeon, H. Min, D. Kim & M. Oh-E, “Determination of the Crystalline x-Axis of Quartz by Second-Harmonic Phase Measurement”, *Journal of the Korean Physical Society* 46, S159–S162 (2005).
- [148] Y. Jiang, I. Tomov, Y. Wang & Z. Chen, “Second-harmonic optical coherence tomography”, *Optics Letters* 29(10), 1090-1092 (2004).

- [149] Y. Jiang, I. Tomov, Y. Wang & Z. Chen, “High-resolution second-harmonic optical coherence tomography of collagen in rat-tail tendon”, *Applied Physics Letters* 86(13), 133901 1-3 (2005).
- [150] H. Yokota, J. Kaneshiro & Y. Uesu, “Optical Second Harmonic Generation Microscopy as a Tool of Material Diagnosis”, *Physics Research International*, 1-12 (2012).
- [151] E. O. Potma, C. L. Evans & X. S. Xie, “Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging”, *Optics Letters* 31(2), 241-243 (2006).
- [152] O. Masihzadeh, P. Schlup & R. A. Bartels, “Label-free second harmonic generation holographic microscopy of biological specimens”, *Optics Express* 18(10), 9840–9851 (2010).
- [153] E. Shaffer, C. Moratal, P. Magistretti, P. Marquet & C. Depeursinge, “Label-free second-harmonic phase imaging of biological specimen by digital holographic microscopy”, *Optics Letters* 35(24), 4102–4104 (2010).
- [154] D. G. Winters, D. R. Smith, P. Schlup & R. A. Bartels, “Measurement of orientation and susceptibility ratios using a polarization-resolved second-harmonic generation holographic microscope”, *Biomedical Optics Express* 3(9), 2004–2011 (2012).
- [155] C.-A. Couture, “Imagerie des tissus de collagène par génération de seconde harmonique interférométrique”, *Mémoire de maîtrise en Science de l'Énergie et des Matériaux (Université du Québec. INRS, Québec)*, 81 pages (2015).
- [156] N. Dudovich, O. Smirnova, J. Levesque, Y. Mairesse, M. Y. Ivanov, D. M. Villeneuve & P. B. Corkum, “Measuring and controlling the birth of attosecond XUV pulses”, *Nature Physics* 2(11), 781-786 (2006).
- [157] R. Stolle, G. Marowsky, E. Schwarzberg & G. Berkovic, “Phase measurements in nonlinear optics”, *Applied Physics B* 63, 491–498 (1996).
- [158] C.-A. Couture, S. Bancelin, J. Van des Kolk, K. Popov, M. Rivard, K. Légaré, G. Martel, H. Richard, C. Brown, S. Laverty, L. Ramunno & F. Légaré, “The Impact of Collagen Fibril

- Polarity on Second Harmonic Generation Microscopy”, *Biophysical Journal* 109(12), 2501-2510 (2015).
- [159] M. Rivard, K. Popov, C.-A. Couture, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, F. Martin, H. Pépin, C. P. Pfeffer, C. Brown, L. Ramunno & F. Légaré, “Imaging the noncentrosymmetric structural organization of tendon with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy”, *Journal of Biophotonics* 7(8), 638-646 (2014).
- [160] M. Rivard, C.-A. Couture, A. K. Miri, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, L. Mongeau & F. Légaré, “Imaging the bipolarity of myosin filaments with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy”, *Biomedical Optics Express* 4(10), 2078-2086 (2013).
- [161] D. Rouède, P. Coumaillieu, E. Schaub, J.-J. Bellanger, M. Blanchard-Desce & F. Tiaho, “Myofibrillar misalignment correlated to triad disappearance of mdx mouse gastrocnemius muscle probed by SHG microscopy”, *Biomedical Optics Express* 5(3), 858-875 (2014).
- [162] C. P. Brown, J. L. Boyd, A. J. Palmer, M. Phillips, C.-A. Couture, M. Rivard, P. A. Hulley, A. J. Price, A. Ruediger, F. Légaré & A. J. Carr, “Piezoelectricity modulates mechanics of collagen structures”. (article en révision)
- [163] M. Born & E. Wolf, “Principles of Optics”, 7th (expanded) edition, Cambridge University Press, 952 pages (1999), Chapitre 13 (“Scattering from inhomogeneous media”, 695-734).
- [164] S. Bancelin, C.-A. Couture, K. Légaré, M. Pinsard, M. Rivard, C. Brown & F. Légaré, “Fast interferometric second harmonic generation microscopy”, *Biomedical Optics Express* 7(2), 399-408 (2016).

ANNEXE A

ORIGINE DU SIGNAL DE GSH EXPLIQUÉE PAR LA THÉORIE DES PERTURBATIONS

Cette preuve est tirée de la section 1.4 du livre Nonlinear Optics de Boyd [80].

Supposons un milieu non centrosymétrique dans lequel les électrons sont soumis à un champ électrique oscillant. La position et le mouvement de l'électron est décrit par la solution de $x(t)$ pour la formule :

$$\sum F = m_e \ddot{x} \quad (\text{A.1a})$$

$$F_E + F_{amo} + F_U = m_e \ddot{x} \quad (\text{A.1b})$$

$$F_E = -eE(t) \quad (\text{A.1c})$$

$$F_{amo} = -2m_e \gamma \dot{x} \quad (\text{A.1d})$$

$$F_U = -m_e \omega_0^2 x - m_e a x^2 \quad (\text{A.1e})$$

$$\ddot{x} + 2\gamma \dot{x} + \omega_0^2 x + a x^2 = -\frac{e}{m_e} E(t) \quad (\text{A.1f})$$

où F_E est la force du champ électrique externe sur l'électron, F_{amo} est une force d'amortissement du mouvement de l'électron, F_U est la force du puits de potentiel dans lequel l'électron se trouve, e est la charge de l'électron et m_e est sa masse.

L'intégrale de F_U donne la forme du puits de potentiel dans lequel l'électron est retenu :

$$U(x) = -\int F_U dx = \frac{1}{2} m_e \omega_0^2 x^2 + \frac{1}{3} m_e a x^3 \quad (\text{A.2})$$

En première approximation, il s'agit d'un puits de potentiel harmonique ayant une fréquence d'oscillation ω_0 , toutefois, le terme supplémentaire proportionnel à a vient ajouter une légère déformation au potentiel harmonique et rendra le milieu non centrosymétrique comme le montre la figure A.1.

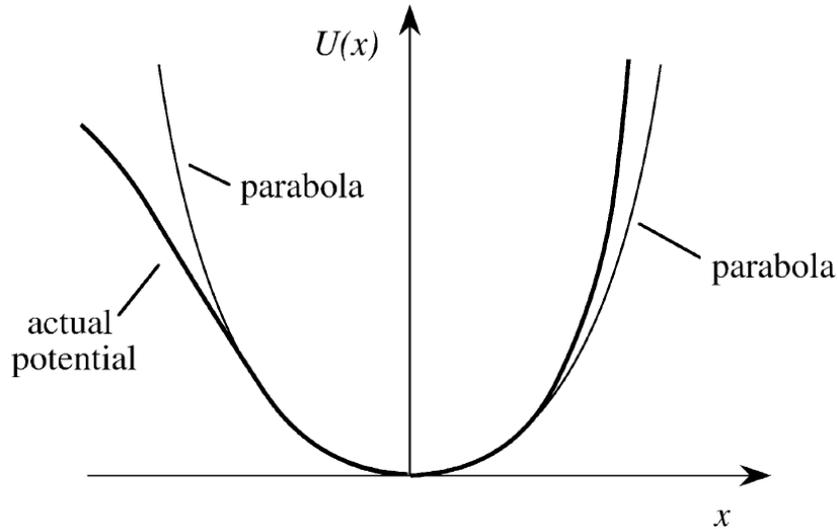


Figure A.1 Cette figure est tirée de Boyd [80 (voir figure 1.4.1, p. 23)]. La courbe en trait gras correspond au puit de potentiel réel d'un électron dans un milieu non centrosymétrique. La courbe en trait fin correspond à un puit de potentiel harmonique.

Pour la GSH, la composante électrique du champ électromagnétique appliqué est de la forme :

$$E(t) = Ee^{-i\omega t} + c.c. \quad (\text{A.3})$$

Il n'existe pas de solution analytique à l'équation A.1f pour ce problème. Toutefois, puisque le terme ax^2 est moins important que $\omega_0^2 x$, il est possible de trouver une solution à l'aide d'une méthode de perturbations. Il faut poser :

$$x = \lambda x^{(1)} + \lambda^2 x^{(2)} + \lambda^3 x^{(3)} + \dots \quad (\text{A.4})$$

et ajuster la formule A.1f pour obtenir :

$$\ddot{x} + 2\gamma\dot{x} + \omega_0^2 x + ax^2 = -\lambda \frac{e}{m_e} E(t) \quad (\text{A.5})$$

En regroupant les termes proportionnels à λ^n , un système de n équations est obtenu, ce qui permet de trouver une solution :

$$\ddot{x}^{(1)} + 2\gamma\dot{x}^{(1)} + \omega_0^2 x^{(1)} = -\frac{e}{m_e} E(t) \quad (\text{A.6a})$$

$$\ddot{x}^{(2)} + 2\gamma\dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} + a[x^{(1)}]^2 = 0 \quad (\text{A.6b})$$

$$\ddot{x}^{(3)} + 2\gamma\dot{x}^{(3)} + \omega_0^2 x^{(3)} + 2ax^{(1)}x^{(2)} = 0 \quad (\text{A.6c})$$

...

La solution à la première équation (A.6a) est celle d'un oscillateur harmonique amorti et est donnée par :

$$x^{(1)}(t) = x^{(1)}(\omega)e^{-i\omega t} + c.c. \quad (\text{A.7a})$$

$$x^{(1)}(\omega) = -\frac{e}{m_e} \frac{E}{D(\omega)} \quad (\text{A.7b})$$

$$D(\omega) = \omega_0^2 - \omega^2 - 2i\omega\gamma \quad (\text{A.7c})$$

$$x^{(1)}(t) = -\frac{e}{m_e} \frac{E}{\omega_0^2 - \omega^2 - 2i\omega\gamma} e^{-i\omega t} + c.c. \quad (\text{A.7d})$$

Cette première solution (A.7d) est substituée dans la seconde équation (A.6b) pour la résoudre. Celle-ci prend la forme de :

$$\ddot{x}^{(2)} + 2\gamma\dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} = -a \frac{(eE/m_e)^2}{[D(\omega)]^2} e^{-2i\omega t} \quad (\text{A.8})$$

Cette seconde équation donne une deuxième partie de la solution. Cette solution est également celle d'un oscillateur harmonique amorti, mais cette fois, la fréquence d'oscillation est 2ω :

$$x^{(2)}(t) = x^{(2)}(2\omega)e^{-i2\omega t} + c.c. \quad (\text{A.9a})$$

$$x^{(2)}(2\omega) = -a \frac{(e/m_e)^2 E^2}{D(2\omega)[D(\omega)]^2} \quad (\text{A.9b})$$

$$D(2\omega) = \omega_0^2 - 4\omega^2 - 4i\omega\gamma \quad (\text{A.9c})$$

$$x^{(2)}(t) = -a \frac{(e/m_e)^2 E^2}{\left[\omega_0^2 - 4\omega^2 - 4i\omega\gamma\right] \left[\omega_0^2 - \omega^2 - 2i\omega\gamma\right]^2} e^{-i2\omega t} + c.c \quad (\text{A.9d})$$

Cette solution permet d'approximer le moment dipolaire puisque :

$$\vec{\mu}(t) = q\vec{d}(t) \quad (\text{A.10a})$$

$$\mu(t) = -ex(t) \quad (\text{A.10b})$$

et de relier celui-ci à la polarisation diélectrique :

$$P(t) = N_V \mu(t) \quad (\text{A.11a})$$

$$P(t) = -N_V ex(t) \quad (\text{A.11b})$$

Cette relation permet de définir la polarisation diélectrique de 1^{er} ordre :

$$P^{(1)}(t) = -N_V ex^{(1)}(t) \quad (\text{A.12a})$$

$$P^{(1)}(t) = -N_V e \left[-\frac{e}{m_e} \frac{E}{D(\omega)} \right] e^{-i\omega t} + c.c \quad (\text{A.12b})$$

$$P^{(1)}(\omega) = N_V \frac{e^2}{m_e} \frac{E}{D(\omega)} \quad (\text{A.12c})$$

Finalement, il est possible d'isoler la susceptibilité diélectrique de 1^{er} ordre, $\chi^{(1)}(\omega)$, de cette expression :

$$P^{(1)}(\omega) = \varepsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) E(\omega) \quad (\text{A.13a})$$

$$\varepsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) E = N_V \frac{e^2}{m_e} \frac{E}{D(\omega)} \quad (\text{A.13b})$$

$$\chi^{(1)}(\omega) = \frac{N_V e^2}{\varepsilon_0 m_e D(\omega)} \quad (\text{A.13c})$$

La même méthode est employée pour trouver la polarisation diélectrique de 2^e ordre et pour trouver la susceptibilité diélectrique de 2^e ordre, $\chi^{(2)}(2\omega)$:

$$P^{(2)}(t) = -N_V e x^{(2)}(t) \quad (\text{A.14a})$$

$$P^{(2)}(t) = -N_V e \left[-a \frac{(e/m_e)^2 E^2}{D(2\omega) [D(\omega)]^2} \right] e^{-i2\omega t} + c.c \quad (\text{A.14b})$$

$$P^{(2)}(2\omega) = a N_V \frac{e^3 E^2}{m_e^2 D(2\omega) [D(\omega)]^2} \quad (\text{A.14c})$$

$$P^{(2)}(2\omega) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega) [E(2\omega)]^2 \quad (\text{A.15a})$$

$$\varepsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega) E^2 = a N_V \frac{e^3 E^2}{m_e^2 D(2\omega) [D(\omega)]^2} \quad (\text{A.15b})$$

$$\chi^{(2)}(2\omega) = a \frac{N_V e^3}{\varepsilon_0 m_e^2 D(2\omega) [D(\omega)]^2} \quad (\text{A.15c})$$

$$\chi^{(2)}(2\omega) = a \frac{\varepsilon_0^2 m_e^2}{N_V^2 e^3} \chi^{(1)}(2\omega) [\chi^{(1)}(\omega)]^2 \quad (\text{A.15d})$$

Cette preuve mène à la conclusion que tous les matériaux ont un $\chi^{(1)}$ non nul. Toutefois, seulement les matériaux dans lesquels a est différent de zéro auront un $\chi^{(2)}$ non nul et seront en mesure de générer de la seconde harmonique. Cette formule permet également d'estimer théoriquement la force du $\chi^{(2)}$ dans un matériau à condition d'estimer a correctement.

ANNEXE B

MÉTHODE DE TRAITEMENT DES IMAGES POUR LA MICROSCOPIE GSH INTERFÉROMÉTRIQUE

Voici le code qui a servi à faire le traitement des piles d'images GSH interférométrique brutes. Il comprend un fichier principal appelé I_SHG.m et un second fichier appelé fit_I_SHG.m qui contient une fonction.

Voici le code de I_SHG.m :

```
% Ce fichier Matlab permet d'analyser des stacks d'images prises en I-SHG
% afin d'en extraire la phase relative pour chaque pixel (moyenné sur une
% région de 3x3). Ne pas oublier d'inclure fit_I_SHG.m dans le même dossier
%
% CHARLES-ANDRÉ COUTURE
% 2014-02-24
%
% Édité par Maxime Rivard
% 2015-06-01

clear all
close all
clc

%% Initialisation et entrée des paramètres

% Valeur max (et min) de la colorbar pour l'affichage des images de
% soustraction et du stack qui sert à faire le fit pour trouver la phase
contrast = 0.7;

% Intervalle pour le nombre de bins en x et y pour les histogrammes --
IMPORTANT
int_x = 0.02;
int_y = 100;

% Mémoriser le folder matlab de départ
current_folder = pwd;

% L'utilisateur sélectionne le fichier d'images qu'il veut analyser
folder_name = uigetdir;
cd(folder_name);
```

```

fname = uigetfile('.tif');

% Obtenir l'info sur le stack d'images
info = imfinfo(fname);
num_images = numel(info);

% Ouvrir la première image
A1_first = imread(fname,1);
h = figure;
imagesc(A1_first)
axis image
colormap(gray)

% Demander les paramètres des images à l'utilisateur
prompt = {'Résolution en x (um):','Résolution en y (um):','Phase de départ (en degrés):','Écart de phase entre chaque image (en degrés):','Nombre de répétitions de chaque image'};
dlg_title = 'Paramètres';
num_lines = 1;
% Valeurs par défaut
def = {'0.2','0.2','0','30','1'};
answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines,def);

% Les réponses en caractères sont converties en chiffres qui sont enregistrés dans des variables.
resx = str2num(cell2mat(answer(1)));
resy = str2num(cell2mat(answer(2)));
start_phase = str2num(cell2mat(answer(3)));
diff_phase = str2num(cell2mat(answer(4)));
avg_img = str2num(cell2mat(answer(5)));

% Menus pour les différents choix
analyse = menu('Type d\'analyse','Phase relative','Vérifier la variation en cos');
shg = menu('Histo2D','Intensité SHG','Contraste interféro');
crop = menu('Région à analyser','Toute l\'image','Sélectionner une région');
obj_test = menu('Y-a-t-il des régions à enlever de l\'image (e.g. des cellules)?','Oui','Non');
save_test = menu('Faut-il sauver chaque image du stack de différences (Il faudra indiquer où les sauver) ?','Oui','Non');
langue = menu('Langue du texte des figures','Fr','Eng');

close(h)

% Si l'image SHG de la zone d'ou provient le stack est demandée, on l'ouvre ici
if shg==1
    fname2 = uigetfile('.tif');
    img_shg = double(imread(fname2));
end

%% Moyennage des images

```

```

% Compteur
new_cpt = 1;

% S'il faut moyenner sur plusieurs images
% Ex : 12 images, moyenné sur 3
% On assume que les images 1 à avg_img sont identiques, puis que la phase
change
% Je veux 1-4-7-10 donc 1:avg:12-(avg_img-1)
% Puis pour chaque i, ajouter 2 puis 3 et moyenner (2:avg_img)
if avg_img~=1
    for i = 1:avg_img:num_images-(avg_img-1)

        A1 = imread(fname, i);
        tmp_tot = A1;

        for j = 2:avg_img
            tmp = imread(fname, i+(j-1));
            tmp_tot = tmp_tot+tmp;
            clear tmp
        end
        tmp_tot = tmp_tot./avg_img;

        new_img(new_cpt, :, :) = tmp_tot;
        new_cpt = new_cpt+1;

        clear tmp_tot
    end
end

% Nouveau nombre d'images
num_images = num_images/avg_img;

%% Soustraction des images GSH interférométriques pour obtenir les images du
contraste interférométrique

% Compteurs
cpt = 1;
usr = 0;

% Numéro d'images à ne pas utiliser lors de la soustraction (e.g. on ne veut
pas
% 4-3 ce qui pourrait correspondre à 195-360 ...)
% On assume que les images sont dans l'ordre theta, theta+180, theta+360,
% theta+diff_phase, theta+diff_phase+180, theta+diff_phase+360...
excl = 4:3:num_images;

% On va chercher les images et on effectue les soustractions
for i = 2:num_images

    % Si le numéro de l'image n'est pas dans la liste d'exclusion
    if isempty(find(i==excl))

```

```

if avg_img == 1 % Si on a moyenné ou non ...
    A1 = imread(fname, i-1);
    A2 = imread(fname, i);
else
    A1 = squeeze(new_img(i-1,:,:));
    A2 = squeeze(new_img(i,:,:));
end

% Si on veut cropper
if crop==2

    % Si c'est la 1ère image
    if i==2

        complete = double(A2(:,:,))-double(A1(:,:,));

        while usr~=1 % Variable pour le contentement de l'utilisateur
            tmp1 = A1;
            tmp2 = A2;

            h = figure;
            imagesc(A1)
            axis image
            colormap(gray)

            % Crop par Free Hand
            hFH = imfreehand();
            binaryImage = hFH.createMask();

            %Si on veut vraiment juste la région entourée -
            %Il y a probablement d'autres lignes à changer dans ce
            %cas ...
            tmp1(~binaryImage) = 0;
            tmp2(~binaryImage) = 0;

            structBoundaries = bwboundaries(binaryImage);
            xy = structBoundaries{1}; % Get n by 2 array of x,y
coordinates.
            xs = xy(:, 2); % Columns.
            ys = xy(:, 1); % Rows

            xmin = min(xs);
            ymin = min(ys);
            width = max(xs)-min(xs);
            height = max(ys)-min(ys);
            rect = [xmin ymin width height];

            cropped_img1 = imcrop(tmp1,rect);
            cropped_img2 = imcrop(tmp2,rect);

            x =
linspace(min(xs)*resx,max(xs)*resx,size(cropped_img1,2));
            y =
linspace(min(ys)*resy,max(ys)*resy,size(cropped_img1,1));

```

```

%           h2 = figure;
%           imagesc(cropped_img1)
%           colormap(gray)
%           close(h)

% Crop par rectangle simple plutôt que free hand

%           % Pour d'abord restreindre l'image ?
%           % [xmin ymin width height]
%           tmp1 = imcrop(tmp1,[85.51 0.51 140.98 216.98]);
%           tmp2 = imcrop(tmp2,[85.51 0.51 140.98 216.98]);

[cropped_img1 rect] = imcrop(tmp1);
cropped_img2 = imcrop(tmp2,rect);

h2 = figure;
imagesc(cropped_img1)
colormap(gray)
close(h)

clear tmp1 tmp2

x
linspace(rect(1)*resx, (rect(1)+rect(3))*resx, size(cropped_img1,2));
y
linspace(rect(2)*resy, (rect(2)+rect(4))*resy, size(cropped_img1,1));

usr = menu('Région OK ?', 'Oui', 'Non');
end

close(h2)

else % Ce n'est pas la 1ère image
tmp1 = A1;
tmp2 = A2;
%           tmp1(~binaryImage) = 0;
%           tmp2(~binaryImage) = 0;

% Comme ça, ça marche pour les 2 méthodes ...
cropped_img1 = imcrop(tmp1,rect);
cropped_img2 = imcrop(tmp2,rect);
end

% Soustraction des images croppées
contr(:, :, cpt) = double(cropped_img2(:, :)) -
double(cropped_img1(:, :));
clear cropped_img1 cropped_img2

else % Si on crope pas

% Soustraction des images complètes
contr(:, :, cpt) = double(A2(:, :)) - double(A1(:, :));
x = linspace(0, size(contr, 2)*resx, size(contr, 2));
y = linspace(0, size(contr, 1)*resy, size(contr, 1));

```

```

        end
        % On incrémente le compteur
        cpt = cpt+1;
    end
end

% Si on a croppé
if shg==1
    if crop==2
        img_shg = imcrop(img_shg,rect);
    end
end

%% Exclusions de certaines portions de l'image pour le calcul

% Les comptes à 0 sont remplacés par 1 pour ne pas être exclus plus tard
for k = 1:size(contr,3)
    for i = 1:size(contr,1)
        for j = 1:size(contr,2)
            if contr(i,j,k)==0
                contr(i,j,k) = 1;
            end
        end
    end
end

% S'il y a des cellules à exclure de l'analyse
if obj_test==1

    A1 = imread(fname, 1);

    if crop==2
        imagesc(imcrop(A1,rect))
    else
        imagesc(A1)
    end
    axis image
    colormap(gray)

    prompt = {'Nombre d''objets à enlever de l''analyse :'};

    dlg_title = 'Input';
    num_lines = 1;
    answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines);

    nbr_objects = str2num(cell2mat(answer(1)));

    % On laisse l'utilisateur sélectionner les régions à exclure une après
    l'autre
    for i = 1:nbr_objects
        hFH = imfreehand();
    end
end

```

```

        binaryImage = hFH.createMask();
        cells{i} = binaryImage;
    end

%     aire_obj = 0;

% On met la valeur des images à zéro là où il y a des cellules ...
for i = 1:size(contr,3)
    tmp = contr(:,:,i);
    for j = 1:nbr_objects
        tmp(find(cells{j})) = 0;
        if shg==1
            img_shg(find(cells{j})) = 0;
        end
        if i==1
            aire_obj = aire_obj+size(find(cells{j}==1),1);
        end
    end
    contr(:,:,i) = tmp;
end

clear tmp
end

%% Réorganisation des images du contraste interférométrique dans un ordre
croissant

% On replace les images dans un ordre croissant de phase
tmp = contr;
clear contr
contr = zeros(size(tmp));

% On a par exemple 0-180 180-360 15-195 195-375 ...
% On veut 0-180 15-195 ... .. 180-360 195-375
contr(:,:,1:size(tmp,3)/2) = tmp(:,:,1:2:size(tmp,3)-1);
contr(:,:,size(tmp,3)/2+1:size(contr,3)) = tmp(:,:,2:2:size(tmp,3));

%% Affichage du stack de différences

cmap = ([1 0 0;0.9677 0 0;0.9355 0 0;0.9032 0 0;0.871 0 0;0.8387 0 0;0.8065 0
0;0.7742 0 0;0.7419 0 0;0.7097 0 0;0.6774 0 0;0.6452 0 0;0.6129 0 0;0.5806 0
0;0.5484 0 0;0.5161 0 0;0.4839 0 0;0.4516 0 0;0.4194 0 0;0.3871 0 0;0.3548 0
0;0.3226 0 0;0.2903 0 0;0.2581 0 0;0.2258 0 0;0.1935 0 0;0.1613 0 0;0.129 0
0;0.0968 0 0;0.0645 0 0;0.0323 0 0;0 0 0;0 0 0;0 0.0323 0;0 0.0645 0;0 0.0968
0;0 0.129 0;0 0.1613 0;0 0.1935 0;0 0.2258 0;0 0.2581 0;0 0.2903 0;0 0.3226
0;0 0.3548 0;0 0.3871 0;0 0.4194 0;0 0.4516 0;0 0.4839 0;0 0.5161 0;0 0.5484
0;0 0.5806 0;0 0.6129 0;0 0.6452 0;0 0.6774 0;0 0.7097 0;0 0.7419 0;0 0.7742
0;0 0.8065 0;0 0.8387 0;0 0.871 0;0 0.9032 0;0 0.9355 0;0 0.9677 0;0 1 0]);

```

```

pos1 = 1;
deg1 = num2str(start_phase);
deg2 = num2str(start_phase+180);

%h_stack = subplot(2,2,1);
figure;
imagesc(x,y,contr(:, :, 1))
xlabel('x (\mum)')
ylabel('y (\mum)')
title([deg2 '\circ - ' deg1 '\circ'])
Maximum = max(max(abs(contr(:, :, pos1))));
axis image
% axis xy
set(gca, 'TickDir', 'out')
caxis([-1*contrast*Maximum contrast*Maximum])
colormap(cmap)
colorbar
%set(gca, 'Position', [0.035 0.5 0.4 0.4])

pos2 = 1 + 90/diff_phase;
deg1 = num2str(start_phase+90);
deg2 = num2str(start_phase+270);

%subplot(2,2,2)
figure;
imagesc(x,y,contr(:, :, pos2))
xlabel('x (\mum)')
ylabel('y (\mum)')
title([deg2 '\circ - ' deg1 '\circ'])
Maximum = max(max(abs(contr(:, :, pos2))));
axis image
% axis xy
set(gca, 'TickDir', 'out')
caxis([-1*contrast*Maximum contrast*Maximum])
colormap(cmap)
colorbar
%set(gca, 'Position', [0.53 0.5 0.4 0.4])

pos3 = 1 + 180/diff_phase;
deg1 = num2str(start_phase+180);
deg2 = num2str(start_phase+360);

%subplot(2,2,3)
figure;
imagesc(x,y,contr(:, :, pos3))
xlabel('x (\mum)')
ylabel('y (\mum)')
title([deg2 '\circ - ' deg1 '\circ'])
Maximum = max(max(abs(contr(:, :, pos3))));
axis image
% axis xy
set(gca, 'TickDir', 'out')
caxis([-1*contrast*Maximum contrast*Maximum])
colormap(cmap)
colorbar
%set(gca, 'Position', [0.035 0.1 0.4 0.4])

```

```

pos4 = 1 + 270/diff_phase;
deg1 = num2str(start_phase+270);
deg2 = num2str(start_phase+450);

%subplot(2,2,4)
figure;
imagesc(x,y,contr(:, :, pos4))
xlabel('x (\mum)')
ylabel('y (\mum)')
title([deg2 '\circ - ' deg1 '\circ'])
Maximum = max(max(abs(contr(:, :, pos4))));
axis image
%axis xy
set(gca, 'TickDir', 'out')
caxis([-1*contrast*Maximum contrast*Maximum])
colormap(cmap)
colorbar
%set(gca, 'Position', [0.53 0.1 0.4 0.4])

%% Sauvegarde du stack d'images du contraste interférométrique

% Pour sauver le stack de différences
if save_test==1

    folder_name2 = uigetdir;
    cd(folder_name2);

    for K = 1:size(contr,3)

        % Sauvegarde des images rouges/vertes du contraste interférométrique
        h2 = figure('units','normalized','outerposition',[0 0 1 1]);
        imagesc(x,y,contr(:, :, K))
%        axis xy
        axis image
        xlabel('x (\mum)')
        ylabel('y (\mum)')
        Maximum = max(max(abs(contr(:, :, K))));
        caxis([-1*contrast*Maximum contrast*Maximum])
        colormap(cmap)
        colorbar
        saveas(h2, ['ColorStack' num2str(K)], 'tif');
        close(h2)

        % Sauvegarde des données brutes du contraste interférométrique
        % IMPORTANT: un offset de 2^15 est ajouté pour éviter les valeurs
        négatives
        imwrite(uint16(contr(:, :, K) + 2^15), ['DataStack' num2str(K)
        '.tif'], 'tif')
    end
end
end

```

```

%% Analyse du contraste sinusoidale des images du contraste interférométrique
if analyse==2

    % Valeur moyenne de la région
    for i = 1:size(contr,3)
        test(i) = mean(mean(contr(:,:,i)));
    end

    % Affichage graphique (1ère image et région croppée si il y a et profil
d'intensité vs la phase)
    figure
    subplot(2,1,1)
    A1 = imread(fname, 1);
    A2 = imread(fname, 2);
    complete = double(A2(:,:,))-double(A1(:,:,));
    x = linspace(0,size(A1,2)*resx,size(A1,2));
    y = linspace(0,size(A1,1)*resy,size(A1,1));
    %imagesc(x,y,A1)
    %colormap(gray)
    imagesc(x,y,complete)
    cmap = ([1 0 0;0.9677 0 0;0.9355 0 0;0.9032 0 0;0.871 0 0;0.8387 0
0;0.8065 0 0;0.7742 0 0;0.7419 0 0;0.7097 0 0;0.6774 0 0;0.6452 0 0;0.6129 0
0;0.5806 0 0;0.5484 0 0;0.5161 0 0;0.4839 0 0;0.4516 0 0;0.4194 0 0;0.3871 0
0;0.3548 0 0;0.3226 0 0;0.2903 0 0;0.2581 0 0;0.2258 0 0;0.1935 0 0;0.1613 0
0;0.129 0 0;0.0968 0 0;0.0645 0 0;0.0323 0 0;0 0 0;0 0 0;0 0.0323 0;0 0.0645
0;0 0.0968 0;0 0.129 0;0 0.1613 0;0 0.1935 0;0 0.2258 0;0 0.2581 0;0 0.2903
0;0 0.3226 0;0 0.3548 0;0 0.3871 0;0 0.4194 0;0 0.4516 0;0 0.4839 0;0 0.5161
0;0 0.5484 0;0 0.5806 0;0 0.6129 0;0 0.6452 0;0 0.6774 0;0 0.7097 0;0 0.7419
0;0 0.7742 0;0 0.8065 0;0 0.8387 0;0 0.871 0;0 0.9032 0;0 0.9355 0;0 0.9677
0;0 1 0]);
    colormap(cmap);
    colorbar

    % Maximum = max(max(abs(contr(:,:,1))));
    % caxis([-1*contrast*Maximum contrast*Maximum])
    if crop==2
        rect(1)=rect(1)*resx;
        rect(3)=rect(3)*resx;
        rect(2)=rect(2)*resy;
        rect(4)=rect(4)*resy;
        rectangle('Position',rect,'LineWidth',5,'EdgeColor','b')
    end

    % axis xy
    axis image
    subplot(2,1,2)
    x = start_phase:diff_phase:start_phase+(size(contr,3)-1)*diff_phase;
    plot(x,test,'.')

    % Fit automatisé d'une fonction sinusoidale

    % On mesure l'amplitude et le décalage (en y) du cos obtenu
    amp = (max(test)-min(test))/2;
    mid = mean(test);

```

```

t = x';

X = ones(size(t,1),3);
X(:,2) = mid+amp*cos(t/180*pi)';
X(:,3) = mid+amp*sin(t/180*pi)';

beta = X\test';

new_amp = sqrt(beta(2)^2+beta(3)^2);
phi_opt = atan2(-beta(3),beta(2))/pi;

amp_opt = new_amp*amp;

model = mid+amp_opt*cos(t/180*pi+phi_opt*pi);
hold on
plot(x,model,'r')

ss_tot = sum((test-mean(test)).^2);
% ss_reg = sum((model-mean(tmp)).^2);
ss_res = sum((test-model').^2);

r2 = 1-ss_res/ss_tot

else

%% Analyse complète des images du contraste interférométrique, pour trouver la
phase

% On revient à l'ancien dossier - voir au tout début du code
cd(current_folder);

% On calcule la phase pour chaque pixel (moyenne sur 9 pixels) - voir
fit_I_SHG.m

tic

for i=1:size(contr,1) % dimension Y
    for j=1:size(contr,2) % dimension X

        % Moyennage sur une région 3X3 si le pixel n'est pas aux bords de
l'image
        if (i~=1 && i~=size(contr,1) && j~=1 && j~=size(contr,2))
            [phase(i,j) amp(i,j) err(i,j)] =
fit_I_SHG(start_phase,diff_phase,contr,i,j,1);
        else
            [phase(i,j) amp(i,j) err(i,j)] =
fit_I_SHG(start_phase,diff_phase,contr,i,j,0);
        end

    end

end
end

```

```

toc

% Le texte qui servira à la construction des graphiques est enregistré
ici
if langue==1
    Titre1 = 'Phase relative';
    Titre2 = 'Contraste interférométrique';
    Titre3 = 'Erreur relative';
    Titre4 = 'Distribution de la phase';
    Titre5 = ['Distribution en fonction de la phase',sprintf('\n'),'et de
1''intensité GSH'];
    Titre6 = ['Distribution en fonction de la phase',sprintf('\n'),'et du
contraste interférométrique'];
    Counts = 'Comptes';
    Yaxis1 = 'Intensité GSH [a.u.]';
    Yaxis2 = 'Contraste interférométrique [a.u.]';
    Legendehisto = 'Histogramme des donn\''ees exp\''erimentales';
else
    Titre1 = 'Relative phase';
    Titre2 = 'Interferometric contrast';
    Titre3 = 'Relative error';
    Titre4 = 'Phase distribution';
    Titre5 = 'Phase and SHG intensity distribution';
    Titre6 = 'Phase and interferometric contrast distribution';
    Counts = 'Counts';
    Yaxis1 = 'SHG intensity [a.u.]';
    Yaxis2 = 'Interferometric contrast [a.u.]';
    Legendehisto = 'Experimental data histogram';
end

% Pour avoir une figure 3D de la phase
% figure;
% surf(x,y,phase)
% colormap([0 0 0;0.0625 0 0;0.125 0 0;0.1875 0 0;0.25 0 0;0.3125 0
0;0.375 0 0;0.4375 0 0;0.5 0 0;0.5625 0 0;0.625 0 0;0.6875 0 0;0.75 0 0;0.8125
0 0;0.875 0 0;0.9375 0 0;1 0 0;1 0.0625 0.0625;1 0.125 0.125;1 0.1875 0.1875;1
0.25 0.25;1 0.3125 0.3125;1 0.375 0.375;1 0.4375 0.4375;1 0.5 0.5;1 0.5625
0.5625;1 0.625 0.625;1 0.6875 0.6875;1 0.75 0.75;1 0.8125 0.8125;1 0.875
0.875;1 0.9375 0.9375;1 1 1;0.9375 1 0.9375;0.875 1 0.875;0.8125 1 0.8125;0.75
1 0.75;0.6875 1 0.6875;0.625 1 0.625;0.5625 1 0.5625;0.5 1 0.5;0.4375 1
0.4375;0.375 1 0.375;0.3125 1 0.3125;0.25 1 0.25;0.1875 1 0.1875;0.125 1
0.125;0.0625 1 0.0625;0 1 0;0 0.9333333337306976 0;0 0.8666666674613953 0;0
0.800000011920929 0;0 0.7333333349227905 0;0 0.6666666686534882 0;0
0.600000023841858 0;0 0.5333333361148834 0;0 0.466666668653488 0;0
0.400000005960464 0;0 0.3333333343267441 0;0 0.2666666680574417 0;0
0.200000002980232 0;0 0.1333333340287209 0;0 0.06666666701436043 0;0 0 0]);
% colorbar
% title('Phase relative (\pi\timesrad)','FontSize',30)
% xlabel('x (\mum)')
% ylabel('y (\mum)')
% axis image
% axis xy
% set(gca,'TickDir','out')
% set(gca,'CLim',[-1 1])

```

```

% Affichage graphique de la phase
h2 = figure('Color',[1 1 1]);
% set(gcf, 'Position', get(0,'Screensize'));
imagesc(x,y,phase)

%colormap([0 0 0;0.0625 0 0;0.125 0 0;0.1875 0 0;0.25 0 0;0.3125 0 0;0.375
0 0;0.4375 0 0;0.5 0 0;0.5625 0 0;0.625 0 0;0.6875 0 0;0.75 0 0;0.8125 0
0;0.875 0 0;0.9375 0 0;1 0 0;0.9375 0 0;0.875 0 0;0.8125 0 0;0.75 0 0;0.6875 0
0;0.625 0 0;0.5625 0 0;0.5 0 0;0.4375 0 0;0.375 0 0;0.3125 0 0;0.25 0 0;0.1875
0 0;0.125 0 0;0.0625 0 0;0 0 0;0 0.0625 0;0 0.125 0;0 0.1875 0;0 0.25 0;0
0.3125 0;0 0.375 0;0 0.4375 0;0 0.5 0;0 0.5625 0;0 0.625 0;0 0.6875 0;0 0.75
0;0 0.8125 0;0 0.875 0;0 0.9375 0;0 1 0;0 0.933333337306976 0;0
0.866666674613953 0;0 0.800000011920929 0;0 0.733333349227905 0;0
0.666666686534882 0;0 0.600000023841858 0;0 0.533333361148834 0;0
0.466666668653488 0;0 0.400000005960464 0;0 0.333333343267441 0;0
0.266666680574417 0;0 0.200000002980232 0;0 0.133333340287209 0;0
0.0666666701436043 0;0 0 0]);
colormap(hsv);
h = colorbar;

xlabel('x (\mum)', 'FontSize',24)
ylabel('y (\mum)', 'FontSize',24)
title(Titre1, 'FontSize',30)
axis image
set(gca, 'TickDir', 'out')
set(gca, 'FontSize',24)
set(h, 'yticklabel', '-p | -p/2 | 0 | p /2 | p', 'fontname', 'symbol')

if obj_test==1 % Si on a enlevé des cellules, elles devraient avoir une
phase fixe de 1.05
set(gca, 'CLim', [-1 1.05])
%colormap([0 0 0;0.0625 0 0;0.125 0 0;0.1875 0 0;0.25 0 0;0.3125 0
0;0.375 0 0;0.4375 0 0;0.5 0 0;0.5625 0 0;0.625 0 0;0.6875 0 0;0.75 0 0;0.8125
0 0;0.875 0 0;0.9375 0 0;1 0 0;0.9375 0 0;0.875 0 0;0.8125 0 0;0.75 0 0;0.6875
0 0;0.625 0 0;0.5625 0 0;0.5 0 0;0.4375 0 0;0.375 0 0;0.3125 0 0;0.25 0
0;0.1875 0 0;0.125 0 0;0.0625 0 0;0 0 0;0 0.0625 0;0 0.125 0;0 0.1875 0;0 0.25
0;0 0.3125 0;0 0.375 0;0 0.4375 0;0 0.5 0;0 0.5625 0;0 0.625 0;0 0.6875 0;0
0.75 0;0 0.8125 0;0 0.875 0;0 0.9375 0;0 1 0;0 0.933333337306976 0;0
0.866666674613953 0;0 0.800000011920929 0;0 0.733333349227905 0;0
0.666666686534882 0;0 0.600000023841858 0;0 0.533333361148834 0;0
0.466666668653488 0;0 0.400000005960464 0;0 0.333333343267441 0;0
0.266666680574417 0;0 0.200000002980232 0;0 0.133333340287209 0;0
0.0666666701436043 0;1 1 0]);
colormap ([1 0 0;1 0.09375 0;1 0.1875 0;1 0.2813 0;1 0.375 0;1 0.4688
0;1 0.5625 0;1 0.6563 0;1 0.75 0;1 0.8438 0;1 0.9375 0;0.9688 1 0;0.875 1
0;0.7813 1 0;0.6875 1 0;0.5938 1 0;0.5 1 0;0.4063 1 0;0.3125 1 0;0.2188 1
0;0.125 1 0;0.03125 1 0;0 1 0.0625;0 1 0.1563;0 1 0.25;0 1 0.3438;0 1 0.4375;0
1 0.5313;0 1 0.625;0 1 0.7188;0 1 0.8125;0 1 0.9063;0 1 1;0 0.9063 1;0 0.8125
1;0 0.7188 1;0 0.625 1;0 0.5313 1;0 0.4375 1;0 0.3438 1;0 0.25 1;0 0.1563 1;0
0.0625 1;0.03125 0 1;0.125 0 1;0.2188 0 1;0.3125 0 1;0.4063 0 1;0.5 0 1;0.5938
0 1;0.6863 0 1;0.7882 0 1;0.8902 0 1;0.9922 0 1;1 0 0.9059;1 0 0.8039;1 0
0.7059;1 0 0.6039;1 0 0.502;1 0 0.4;1 0 0.298;1 0 0.1961;1 0 0.09412;0 0 0]);
set(h, 'ytick', [-1 -0.5 0 0.5 1])
else
set(gca, 'CLim', [-1 1])
set(h, 'ytick', [-1 -0.5 0 0.5 1])

```

```

end

annotation(h2, 'textbox', ...
[0.8735 0.665766622509926 0.0496250000000001 0.0552631578947368], ...
'Interpreter', 'latex', ...
'String', {'\boldmath$\phi_{\text{mat}}$'}, ...
'FontSize', 24, ...
'FitBoxToText', 'off', ...
'LineStyle', 'none');

%     export_fig phase.jpg

% Affichage graphique de l'amplitude
figure('Color', [1 1 1]);
imagesc(x, y, amp)
axis image
colorbar
title(Titre2)

% Affichage de l'erreur
figure('Color', [1 1 1]);
imagesc(x, y, err)
axis image
colorbar
title(Titre3)

%% Calcul pour les histogrammes

% Construction des vecteurs pour les histogrammes
ph_hist = phase;

if shg==1
    shg_hist = img_shg;
else
    amp_hist = amp;
end

if obj_test==1
    ph_hist(find(ph_hist==1.05)) = [];
    amp_hist(find(amp_hist==0)) = [];
    if shg==1
        shg_hist(find(shg_hist==0)) = [];
    end
else
    ph_hist = reshape(ph_hist, 1, size(ph_hist, 1)*size(ph_hist, 2));

    if shg==1
        shg_hist = reshape(shg_hist, 1, size(shg_hist, 1)*size(shg_hist, 2));
    else
        amp_hist = reshape(amp_hist, 1, size(amp_hist, 1)*size(amp_hist, 2));
    end
end
end

```

```

%% Histogramme 2D

figure('Color',[1 1 1]);
hist(ph_hist, -1+int_x/2:int_x:1-int_x/2)
% set(gcf, 'Position', get(0,'Screensize'));

hist_xdata = -1+int_x/2:int_x:1-int_x/2;
hist_ydata = hist(ph_hist, hist_xdata);

set(gca, 'xtick', [-1 -0.5 0 0.5 1])
set(gca, 'FontSize', 24)

h = findobj(gca, 'Type', 'patch');
%set(h, 'FaceColor', 'b', 'EdgeColor', 'w')
set(h, 'FaceColor', 'b')

title(Titre4, 'FontSize', 30)
xlabel('\boldmath$\phi_{mat}$', 'Interpreter', 'Latex', 'FontSize', 24)
ylabel(Counts, 'FontSize', 24)
set(gca, 'xticklabel', '-p | -p / 2 | 0 | p / 2 | p', 'fontname', 'symbol')

%% Histogramme 3D

data_tot(:,1) = ph_hist;
if shg==1
    data_tot(:,2) = shg_hist;
    %data_tot(:,2) = shg_hist./2^15;
else
    data_tot(:,2) = amp_hist;
end

nbinsx = size(-1:int_x:1,2);
nbinsy = ceil((max(data_tot(:,2))-min(data_tot(:,2)))/int_y);

hact = figure('Color',[1 1 1]);
hist3(data_tot, [nbinsx nbinsy]);
% set(gcf, 'Position', get(0,'Screensize'));

% set(gcf, 'renderer', 'opengl');
set(gcf, 'renderer', 'zbuffer')
set(get(gca, 'child'), 'FaceColor', 'interp', 'CDataMode', 'auto');
set(gca, 'FontSize', 24)
xlabel('\boldmath$\phi_{mat}$', 'Interpreter', 'Latex', 'FontSize', 24)
view(0, 90)
set(gca, 'xtick', [-1 -0.5 0 0.5 1])
xlim([-1 1])
if shg==1
    title(Titre5, 'FontSize', 30)
    ylabel(Yaxis1, 'FontSize', 24)
end

```

```

        ylim([min(shg_hist) max(shg_hist)])
    else
        title(Titre6,'FontSize',30)
        ylabel(Yaxis2,'FontSize',24)
        ylim([min(amp_hist) max(amp_hist)])
    end
    h = colorbar;
    set(h,'FontSize',24)

    annotation('textbox',...
        [0.866928884711779          0.943730087931694          0.0685488721804511
        0.0435835351089594],...
        'String',{Counts},...
        'FontSize',24,...
        'FitBoxToText','off',...
        'LineStyle','none');

    set(gca,'xticklabel','-p | -p /2 | 0 | p /2 | p', 'fontname', 'symbol')

%% Analyse région spécifique

    part = menu('Voulez-vous voir un histogramme et une image de la phase
d''une région particulière d''amplitude ?', 'Oui', 'Non');

    if part==1

        max_amp = max(max(data_tot(:,2)))

        prompt = {'Valeur minimale de l''amplitude:', 'Valeur maximale de
l''amplitude:'};
        dlg_title = 'Input';
        num_lines = 1;
        answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines);

        pb = str2num(cell2mat(answer(1)));
        ph = str2num(cell2mat(answer(2)));

        % nbinsy2 = ceil((ph-pb)/int_y);

        phase_test = phase;
        if shg==1
            shg_test=img_shg;
        else
            amp_test=amp;
        end
        %
        phase_test = phase(1:150,400:500);
        %
        amp_test = amp(1:150,400:500);

        for i = 1:size(phase_test,1)
            for j = 1:size(phase_test,2)
                if shg==1
                    if (img_shg(i,j)>ph || img_shg(i,j)<pb)

```

```

        phase_test(i,j) = 1.05;
        shg_test(i,j) = max(max(img_shg))+1;
    end
else
    if (amp(i,j)>ph || amp(i,j)<pb)
        phase_test(i,j) = 1.05;
        amp_test(i,j) = 0;
    end
end
end
end

if shg==1
    shg_test_hist
    reshape(shg_test,1,size(shg_test,1)*size(shg_test,2));
    shg_test_hist(find(shg_test==max(max(img_shg))+1)) = [];
else
    amp_test_hist
    reshape(amp_test,1,size(amp_test,1)*size(amp_test,2));
    amp_test_hist(find(amp_test==0)) = [];
end

phase_test_hist
reshape(phase_test,1,size(phase_test,1)*size(phase_test,2));
phase_test_hist(find(phase_test_hist==1.05)) = [];

figure('Color',[1 1 1]);
hist(phase_test_hist, -1+int_x/2:int_x:1-int_x/2)
% set(gcf, 'Position', get(0,'Screensize'));

hist2_xdata = -1+int_x/2:int_x:1-int_x/2;
hist2_ydata = hist(phase_test_hist, hist2_xdata);

set(gca,'xtick',[-1 -0.5 0 0.5 1])
set(gca,'FontSize',24)

h = findobj(gca,'Type','patch');
%set(h,'FaceColor','b','EdgeColor','w')
set(h,'FaceColor','b')

title(Titre4,'FontSize',30)
xlabel('\boldmath$\phi_{mat}$','Interpreter','Latex','FontSize',24)
ylabel(Counts,'FontSize',24)
set(gca,'xticklabel','-p | -p /2 | 0 | p /2 | p', 'fontname',
'symbol')

% Fit manuel à 2 gaussiennes pour l'histo
xfine = -1:0.001:1;

% Il est nécessaire d'ajuster l'interval "selection" pour obtenir un
bon fit
selection = 1:50;

```

```

fitx = hist2_xdata(selection)
fity = hist2_ydata(selection)

a1 = max(fity)
b1 = sum(fity.*fitx)/sum(fity)
c1 = sqrt(sum(fity.*(fitx-b1).^2)/sum(fity))

stringb1 = sprintf('%.2f', round(b1*100)/100);
stringc1 = sprintf('%.2f', round(c1*100)/100);
hold on;
plot(xfine, a1*exp(-(xfine-
b1).^2/(2*c1^2)), 'Color', 'r', 'LineWidth', 3);
h = legend(Legendehisto, ['Fit Gaussien - \boldmath$\mu = ' stringb1
'\pi$ \boldmath$\sigma = ' stringc1 '\pi$']);

% Il est nécessaire d'ajuster l'interval "selection" pour obtenir un
bon fit
selection = 51:100;
fitx = hist2_xdata(selection)
fity = hist2_ydata(selection)

a2 = max(fity)
b2 = sum(fity.*fitx)/sum(fity)
c2 = sqrt(sum(fity.*(fitx-b2).^2)/sum(fity))

stringb2 = sprintf('%.2f', round(b2*100)/100);
stringc2 = sprintf('%.2f', round(c2*100)/100);
hold on;
plot(xfine, a2*exp(-(xfine-
b2).^2/(2*c2^2)), 'Color', 'g', 'LineWidth', 3);
h = legend(Legendehisto, ['Fit Gaussien 1 - \boldmath$\mu = ' stringb1
'\pi$ \boldmath$\sigma = ' stringc1 '\pi$'], ['Fit Gaussien 2 - \boldmath$\mu =
' stringb2 '\pi$ \boldmath$\sigma = ' stringc2 '\pi$']);

set(h, 'Interpreter', 'Latex', 'Location', 'Best') %taille texte légende
~16 à 20

h2 = figure('Color', [1 1 1]);
% set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
imagesc(x,y,phase_test)

h = colorbar;

xlabel('x (\mum)', 'FontSize', 24)
ylabel('y (\mum)', 'FontSize', 24)
title(Titrel, 'FontSize', 30)
axis image
set(gca, 'TickDir', 'out')
set(gca, 'FontSize', 24)
set(h, 'yticklabel', '-p | -p/2 | 0 | p /2 | p', 'fontname', 'symbol')

set(gca, 'CLim', [-1 1.05])

```

```

%colormap([0 0 0;0.0625 0 0;0.125 0 0;0.1875 0 0;0.25 0 0;0.3125 0
0;0.375 0 0;0.4375 0 0;0.5 0 0;0.5625 0 0;0.625 0 0;0.6875 0 0;0.75 0 0;0.8125
0 0;0.875 0 0;0.9375 0 0;1 0 0;0.9375 0 0;0.875 0 0;0.8125 0 0;0.75 0 0;0.6875
0 0;0.625 0 0;0.5625 0 0;0.5 0 0;0.4375 0 0;0.375 0 0;0.3125 0 0;0.25 0
0;0.1875 0 0;0.125 0 0;0.0625 0 0;0 0 0;0 0.0625 0;0 0.125 0;0 0.1875 0;0 0.25
0;0 0.3125 0;0 0.375 0;0 0.4375 0;0 0.5 0;0 0.5625 0;0 0.625 0;0 0.6875 0;0
0.75 0;0 0.8125 0;0 0.875 0;0 0.9375 0;0 1 0;0 0.9333333337306976 0;0
0.866666674613953 0;0 0.800000011920929 0;0 0.733333349227905 0;0
0.666666686534882 0;0 0.600000023841858 0;0 0.533333361148834 0;0
0.466666668653488 0;0 0.400000005960464 0;0 0.333333343267441 0;0
0.266666680574417 0;0 0.200000002980232 0;0 0.133333340287209 0;0
0.0666666701436043 0;0 0 0]);
%colormap([0 0 0;0.0625 0 0;0.125 0 0;0.1875 0 0;0.25 0 0;0.3125 0
0;0.375 0 0;0.4375 0 0;0.5 0 0;0.5625 0 0;0.625 0 0;0.6875 0 0;0.75 0 0;0.8125
0 0;0.875 0 0;0.9375 0 0;1 0 0;0.9375 0 0;0.875 0 0;0.8125 0 0;0.75 0 0;0.6875
0 0;0.625 0 0;0.5625 0 0;0.5 0 0;0.4375 0 0;0.375 0 0;0.3125 0 0;0.25 0
0;0.1875 0 0;0.125 0 0;0.0625 0 0;0 0 0;0 0.0625 0;0 0.125 0;0 0.1875 0;0 0.25
0;0 0.3125 0;0 0.375 0;0 0.4375 0;0 0.5 0;0 0.5625 0;0 0.625 0;0 0.6875 0;0
0.75 0;0 0.8125 0;0 0.875 0;0 0.9375 0;0 1 0;0 0.9333333337306976 0;0
0.866666674613953 0;0 0.800000011920929 0;0 0.733333349227905 0;0
0.666666686534882 0;0 0.600000023841858 0;0 0.533333361148834 0;0
0.466666668653488 0;0 0.400000005960464 0;0 0.333333343267441 0;0
0.266666680574417 0;0 0.200000002980232 0;0 0.133333340287209 0;0
0.0666666701436043 0;1 1 0]);
%colormap([1 0 0;0.9375 0 0;0.875 0 0;0.8125 0 0;0.75 0 0;0.6875 0
0;0.625 0 0;0.5625 0 0;0.5 0 0;0.4375 0 0;0.375 0 0;0.3125 0 0;0.25 0 0;0.1875
0 0;0.125 0 0;0.0625 0 0;0 0 0;0 0.0625 0;0 0.125 0;0 0.1875 0;0 0.25 0;0
0.3125 0;0 0.375 0;0 0.4375 0;0 0.5 0;0 0.5625 0;0 0.625 0;0 0.6875 0;0 0.75
0;0 0.8125 0;0 0.875 0;0 0.9375 0;0 1 0;0 0.9375 0;0 0.875 0;0 0.8125 0;0 0.75
0;0 0.6875 0;0 0.625 0;0 0.5625 0;0 0.5 0;0 0.4375 0;0 0.375 0;0 0.3125 0;0
0.25 0;0 0.1875 0;0 0.125 0;0 0.0625 0;0 0 0;0.0714285746216774 0
0;0.142857149243355 0 0;0.214285716414452 0 0;0.28571429848671 0
0;0.357142865657806 0 0;0.428571432828903 0 0;0.5 0 0;0.571428596973419 0
0;0.642857134342194 0 0;0.714285731315613 0 0;0.785714268684387 0
0;0.857142865657806 0 0;0.928571403026581 0 0;1 0 0;1 1 0]);
%colormap([0 0 0;0.06667 0 0;0.1333 0 0;0.2 0 0;0.2667 0 0;0.3333 0
0;0.4 0 0;0.4667 0 0;0.5333 0 0;0.6 0 0;0.6667 0 0;0.7333 0 0;0.8 0 0;0.8667 0
0;0.9333 0 0;1 0 0;0.9375 0 0;0.875 0 0;0.8125 0 0;0.75 0 0;0.6875 0 0;0.625 0
0;0.5625 0 0;0.5 0 0;0.4375 0 0;0.375 0 0;0.3125 0 0;0.25 0 0;0.1875 0 0;0.125
0 0;0.0625 0 0;0 0 0;0 0.06667 0;0 0.1333 0;0 0.2 0;0 0.2667 0;0 0.3333 0;0
0.4 0;0 0.4667 0;0 0.5333 0;0 0.6 0;0 0.6667 0;0 0.7333 0;0 0.8 0;0 0.8667 0;0
0.9333 0;0 1 0;0 0.9375 0;0 0.875 0;0 0.8125 0;0 0.75 0;0 0.6875 0;0 0.625 0;0
0.5625 0;0 0.5 0;0 0.4375 0;0 0.375 0;0 0.3125 0;0 0.25 0;0 0.1875 0;0 0.125
0;0 0.0625 0;0 0 0;0 0 0]);
colormap ([1 0 0;1 0.09375 0;1 0.1875 0;1 0.2813 0;1 0.375 0;1 0.4688
0;1 0.5625 0;1 0.6563 0;1 0.75 0;1 0.8438 0;1 0.9375 0;0.9688 1 0;0.875 1
0;0.7813 1 0;0.6875 1 0;0.5938 1 0;0.5 1 0;0.4063 1 0;0.3125 1 0;0.2188 1
0;0.125 1 0;0.03125 1 0;0 1 0.0625;0 1 0.1563;0 1 0.25;0 1 0.3438;0 1 0.4375;0
1 0.5313;0 1 0.625;0 1 0.7188;0 1 0.8125;0 1 0.9063;0 1 1;0 0.9063 1;0 0.8125
1;0 0.7188 1;0 0.625 1;0 0.5313 1;0 0.4375 1;0 0.3438 1;0 0.25 1;0 0.1563 1;0
0.0625 1;0.03125 0 1;0.125 0 1;0.2188 0 1;0.3125 0 1;0.4063 0 1;0.5 0 1;0.5938
0 1;0.6863 0 1;0.7882 0 1;0.8902 0 1;0.9922 0 1;1 0 0.9059;1 0 0.8039;1 0
0.7059;1 0 0.6039;1 0 0.502;1 0 0.4;1 0 0.298;1 0 0.1961;1 0 0.09412;0 0 0]);

set(h,'ytick',[-1 -0.5 0 0.5 1])

```

```

annotation(h2, 'textbox', ...
[0.8735 0.665766622509926 0.0496250000000001 0.0552631578947368], ...
'Interpreter', 'latex', ...
'String', {'\boldmath$\phi_{\text{mat}}$'}, ...
'FontSize', 24, ...
'FitBoxToText', 'off', ...
'LineStyle', 'none');

data_tot2(:,1) = phase_test_hist;
if shg==1
    data_tot2(:,2) = shg_test_hist;
else
    data_tot2(:,2) = amp_test_hist;
end

nbinsy2 = ceil((max(data_tot2(:,2))-min(data_tot2(:,2)))/int_y);

hact = figure('Color',[1 1 1]);
hist3(data_tot2,[nbinsx nbinsy2]);
% set(gcf, 'Position', get(0,'Screensize'));

% set(gcf, 'renderer', 'opengl');
set(gcf, 'renderer', 'zbuffer')
set(get(gca, 'child'), 'FaceColor', 'interp', 'CDataMode', 'auto');
set(gca, 'FontSize', 24)
xlabel('\boldmath$\phi_{\text{mat}}$', 'Interpreter', 'Latex', 'FontSize', 24)
view(0, 90)
set(gca, 'xtick', [-1 -0.5 0 0.5 1])
xlim([-1 1])
if shg==1
    title(Titre5, 'FontSize', 30)
    ylabel(Yaxis1, 'FontSize', 24)
    ylim([min(shg_test_hist) max(shg_test_hist)])
else
    title(Titre6, 'FontSize', 30)
    ylabel(Yaxis2, 'FontSize', 24)
    ylim([min(amp_test_hist) max(amp_test_hist)])
end
h = colorbar;
set(h, 'FontSize', 24)

annotation(hact, 'textbox', ...
[0.866928884711779 0.943730087931694 0.0685488721804511
0.0435835351089594], ...
'String', {Counts}, ...
'FontSize', 24, ...
'FitBoxToText', 'off', ...
'LineStyle', 'none');

set(gca, 'xticklabel', '-p | -p /2 | 0 | p /2 | p', 'fontname',
'symbol')

```

```
    end
end

% On revient à l'ancien dossier - voir au tout début du code
cd(current_folder);
```

Voici le code de fit_I_SHG.m :

```
function [phi_opt amp_opt err_rel] =  
fit_I_SHG(start_phase,diff_phase,contr,posx,posy,weight)  
  
% On calcule la moyenne de la région 3x3 autour du pixel considéré en  
% fonction de la phase.  
  
% Poids attribué : 5 centre, 2 croix, 1 diago  
centre = squeeze(contr(posx,posy,:));  
  
if weight==1  
    sides = squeeze(contr(posx-1,posy,:)) + squeeze(contr(posx+1,posy,:))  
+ squeeze(contr(posx,posy-1,:)) + squeeze(contr(posx,posy+1,:));  
    corners = squeeze(contr(posx-1,posy-1,:)) + squeeze(contr(posx-  
1,posy+1,:)) + squeeze(contr(posx+1,posy-1,:)) +  
squeeze(contr(posx+1,posy+1,:));  
    tmp = (centre*5+sides*2+corners)/17;  
else  
    tmp = centre;  
end  
  
% On mesure l'amplitude et le décalage (en y) du cos obtenu  
amp = (max(tmp)-min(tmp))/2;  
mid = mean(tmp);  
  
% Vecteur phase  
x = start_phase:diff_phase:start_phase+(length(tmp)-1)*diff_phase;  
  
% MARCHE BIEN ET RAPIDE - voir test.m  
  
% Si la cellule est exclue (voir le code dans I_SHG.m)  
if contr(posx,posy)==0  
    phi_opt = 1.05;  
    amp_opt = 0;  
    err_rel = 0;  
% Si la cellule est incluse  
else  
    t = x';  
  
    X = ones(length(t),3);  
    X(:,2) = mid+amp*cos(t/180*pi)';  
    X(:,3) = mid+amp*sin(t/180*pi)';  
  
    beta = X\tmp;  
  
    amp_opt = amp*sqrt(beta(2)^2+beta(3)^2);  
    phi_opt = atan2(-beta(3),beta(2))/pi;  
  
    model = mid+amp_opt*cos(t/180*pi+phi_opt*pi);
```

```
ss_tot = sum((tmp-mean(tmp)).^2);  
%   ss_reg = sum((model-mean(tmp)).^2);  
ss_res = sum((tmp-model).^2);  
  
err_rel = 1-ss_res/ss_tot;  
  
%   h = figure;  
%   plot(t,tmp,'g')  
%   hold on;  
%   plot(t,model,'b')  
%   close(h)  
end  
end
```


ANNEXE C

BALAYAGE DE TRAME EN MICROSCOPIE AVEC UNE PLATEFORME DE TRANSLATION XY

La modification du montage du microscope, pour que celui-ci soit en mesure d'acquérir des images en effectuant le balayage avec une plateforme de translation, est une portion plus technique de ce projet qui est moins intéressante d'un point de vue de la recherche scientifique. Je considère tout de même qu'il s'agit d'un aspect important du projet qui mérite d'être abordé dans cette annexe qui servira de référence pour les futurs utilisateurs du microscope.

Le montage du microscope est contrôlé par un programme LabView qui est exécuté sur l'ordinateur du laboratoire. Lorsque le programme "ScanStageMicroscope.vi" est lancé, un nouveau menu basé sur un fichier texte "GUI.ini" est construit, des variables basées sur un fichier texte "Mic.ini" sont chargées par le programme et différents VI nécessaires au fonctionnement du microscope sont lancés pour son initialisation. Un VI (Virtual Instrument) correspond à une fonction ou une routine dans LabView. La liste de ces VI se trouve dans le fichier texte "Mic.ini" dans la variable "driver.list". Une fois ces étapes complétées, le système est prêt à fonctionner et attend de recevoir des tâches de l'utilisateur. Lorsque l'usager donne une commande, un système de notifications LabView permet aux différents VI du programme d'effectuer la commande demandée. Les variables chargées dans la mémoire peuvent également être modifiées pendant que le programme fonctionne.

Voici une brève description des VI les plus importants du programme :

- "ScanStageMicroscope.VI" est le programme principal qui orchestre l'exécution des autres VI.
- "DStageNewLineScaniMic.vi" est un nouveau VI pour le balayage avec la plateforme de translation XY. Il s'agit d'une combinaison de deux anciens VI du programme original "DScanContinous.vi" et "TiMicSDK.vi". "DScanContinous.vi" s'occupait de l'acquisition des images et du mouvement des miroirs galvanométriques. "TiMicSDK.vi"

s'occupait du déplacement de toutes les autres pièces mécaniques motorisées du microscope (rail des miroirs dichroïques, tourelle rotative des objectifs de microscope, moteurs en Z de l'objectif de microscope et plateforme de translation XY). "DStageLineScanContinuous.vi" est en charge de tout cela en même temps. Les deux VI ont dû être combinés puisque "DScanContinuous.vi" devait être en mesure de contrôler la plateforme de translation pour effectuer un balayage durant l'acquisition d'une image.

- "DFloatingPreview.vi" s'occupe d'afficher les images en temps réel à l'écran de l'ordinateur durant leur acquisition.
- "ManageImagesGUI.vi" permet de sauvegarder les images acquises en format TIF. Plusieurs images peuvent être sauvegardées en "pile" dans le même fichier.
- "TJob.vi" s'occupe d'exécuter des séries de commandes préprogrammées afin d'automatiser le fonctionnement du microscope pour des expériences plus longues sur un même échantillon. Par exemple, l'acquisition d'une série d'images GSH interférométriques, en tournant la plaque de verre entre chaque image, peut être effectuée à l'aide de cet outil.
- "DefineScan.vi" servait à définir tous les paramètres du balayage avec les miroirs galvanométriques. Les dimensions de l'image en nombre de pixels et en microns sont définies ici ainsi que le type de balayage (bidirectionnel ou unidirectionnel). Ce VI permet également de choisir le temps d'exposition des pixels au faisceau laser et de modifier la forme de la zone balayée.
- "IMAQ-view_autosaveGUI.vi" détermine quels ports sont activés pour l'acquisition des données qui servent à reconstruire les images. Les signaux de différents tubes photomultiplicateurs branchés dans différents ports peuvent donc être acquis simultanément pour obtenir plusieurs images en même temps.
- "iMic-GUI.vi" sert d'interface pour que l'utilisateur puisse contrôler les différentes pièces mécaniques motorisées du microscope. La position des miroirs dichroïques sur les deux rails, la position de la tourelle rotative des objectifs de microscope et la position des

moteurs mécanique et piézoélectrique de l'objectif de microscope sont contrôlées à partir de ce VI. Il est également possible de contrôler la position de la plateforme de translation XY. Cet outil est extrêmement pratique pour se déplacer dans le matériau imagé durant l'acquisition lorsque le balayage est réalisé par les miroirs galvanométriques.

Ce VI a reçu des modifications importantes puisqu'il permet maintenant aussi de définir tous les paramètres du balayage avec la plateforme de translation XY. Les dimensions de l'image en nombre de pixels et la taille des pixels en microns sont définies ici ainsi que le type de balayage (bidirectionnel ou unidirectionnel). La vitesse maximale de la plateforme de translation et son accélération peuvent être ajustées ici. Il est encore possible d'utiliser ce VI pour se déplacer dans le matériau imagé à l'aide de la plateforme de translation. Toutefois, les commandes de mouvement de la plateforme entrent en conflit avec celles du balayage durant l'acquisition d'une image. Pour contourner ce problème, durant le balayage, plutôt que d'envoyer une commande de mouvement aux moteurs, on change la position centrale du balayage. En calculant la position de départ et d'arrivée pour chaque ligne durant le balayage par rapport à cette position centrale, on obtient un outil équivalent à l'ancien pour se déplacer dans le matériau imagé durant l'acquisition d'une image. Notez qu'il est encore possible de contrôler la position de la plateforme de translation XY pour déplacer le matériau imagé au-dessus de l'objectif de microscope avant l'acquisition des images.

- "RunSingleGUI.vi" et "RunContinuousGUI.vi" permettent d'envoyer une commande au programme et au microscope d'acquérir une seule image ou N images en continu.
- "zStackJobGUI.vi" permet d'envoyer une commande au programme et au microscope d'acquérir une pile d'images en déplaçant le moteur piézoélectrique de l'objectif de microscope entre l'acquisition de chaque image.
- "IMAQ-scaleGUI.vi" est un outil qui permet d'ajuster le contraste des images affichées à l'écran par "DFloatingPreview.vi".
- "HistogrammGUI.vi" est un outil qui montre la distribution des comptes dans les dernières images qui ont été acquises.

- "LED-Control.vi" servait à ajuster la puissance de la diode électroluminescente dans l'ancien montage.
- "ViewVariablesGUI.vi" montre les valeurs des variables du programme en temps réel.

Pour comprendre comment le programme fonctionne durant le balayage avec la plateforme de translation, il est nécessaire d'étudier le code de "DStageNewLineScaniMic.vi". La figure C.1 montre la portion du code concernant le balayage et l'acquisition des images. Le code a été divisé en sections pour faciliter sa compréhension.

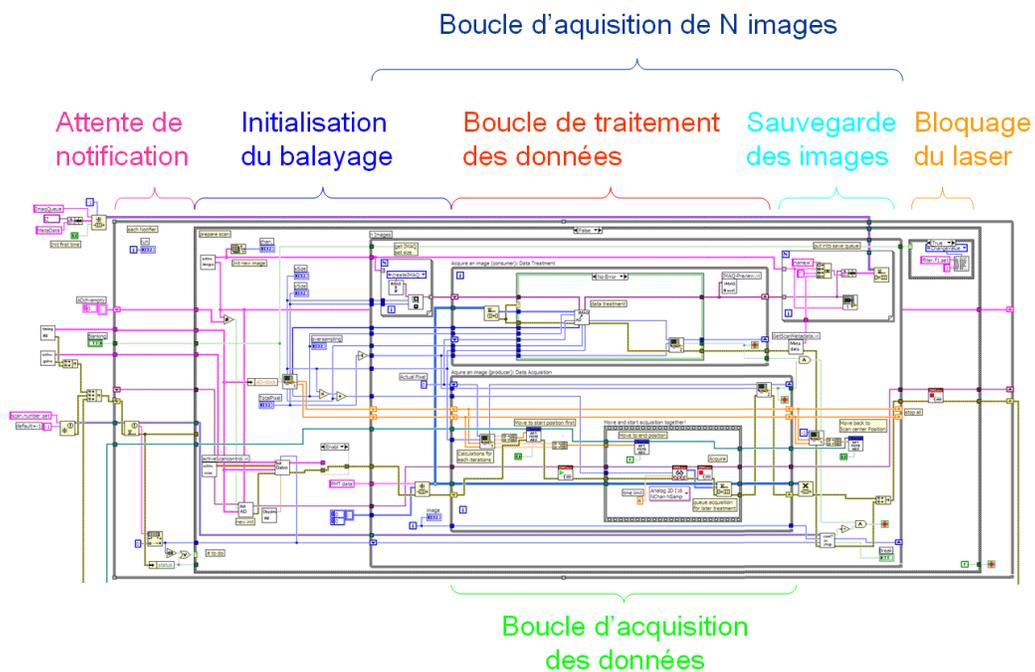


Figure C.1 Portion du code de "DStageNewLineScaniMic.vi" qui s'occupe de l'acquisition des images. Le code est divisé en sections pour faciliter sa compréhension.

- La section "**Attente de notification**" se trouve au début d'une boucle. Elle contient une fonction "Wait on Notification" qui déclenche la prochaine acquisition d'images lorsque l'utilisateur envoie la commande au programme.
- La section "**Initialisation du balayage**" contient trois fonctions importantes. La première, "activeImages.vi", détermine combien d'images sont prises en même temps selon les ports activés pour l'acquisition des données. La seconde, "InitADCard.vi", sert à préparer

l'acquisition des données par l'ordinateur et à déterminer à quel moment celle-ci sera déclenchée par rapport au mouvement de la plateforme de translation XY. La troisième fonction importante, "Stage_InitImage_XLineScan.vi", sert à calculer le mouvement de la plateforme de translation pour réaliser le balayage demandé par l'utilisateur. La position de chaque pixel de la zone imagée, par rapport à une position centrale, est donc calculée ici avant de lancer le balayage et l'acquisition des données.

- La section "**Boucle d'acquisition de N images**" est une boucle qui effectue l'acquisition des images. Une image par ports activés est acquise par cycle de cette boucle et celle-ci est répétée N fois pour prendre des images en continu. Cette section contient trois sous-sections importantes.
- La "**Boucle d'acquisition des données**" s'occupe de synchroniser le mouvement de la plateforme de translation avec l'acquisition des données brutes par l'ordinateur. Cette boucle produit donc des données brutes qui sont envoyées dans une file d'attente.
- La "**Boucle de traitement des données**" s'occupe de traiter les données brutes produites par la "**Boucle d'acquisition des données**". Cette boucle traite les données brutes à mesure qu'elles sont envoyées dans la file d'attente, indépendamment de la boucle qui les produit. Elle envoie également les données traitées à "DFloatingPreview.vi" pour afficher les images qui sont acquises en temps réel à l'écran de l'ordinateur.
- La "**Sauvegarde des images**" s'occupe de sauvegarder les images construites à partir des données traitées. Cette section permet également d'afficher l'histogramme de la distribution du signal dans les images.

Le code de la "**Boucle d'acquisition des données**" mérite une attention plus particulière. La figure C.2 montre un agrandissement de cette portion du code. Cette boucle est répétée une fois pour chaque ligne du balayage. Il faudra donc répéter cette boucle M fois pour une image de N pixels dans la direction X et de M pixels dans la direction Y. La première fonction dans cette boucle calcule la position initiale et finale de la plateforme de translation pour la prochaine ligne qui sera balayée. Ces positions sont calculées par rapport à la position centrale du balayage, qui peut être changée par l'utilisateur durant le balayage. De cette manière, il est donc possible de

déplacer la zone imagée durant l'acquisition d'une image sans déranger le mouvement de balayage de la plateforme de translation XY. Notez que la zone réellement balayée par la plateforme de translation est plus longue dans la direction X que la dimension en X de l'image demandée par l'utilisateur. Il est nécessaire de laisser un jeu pour que la plateforme puisse accélérer et décélérer. De cette façon, la plateforme de translation se déplace à une vitesse presque constante durant son passage dans la zone imagée. Cela est illustré à la figure C.3 qui montre le parcours du faisceau dans le matériau imagé, qui est déplacé par la plateforme de translation.

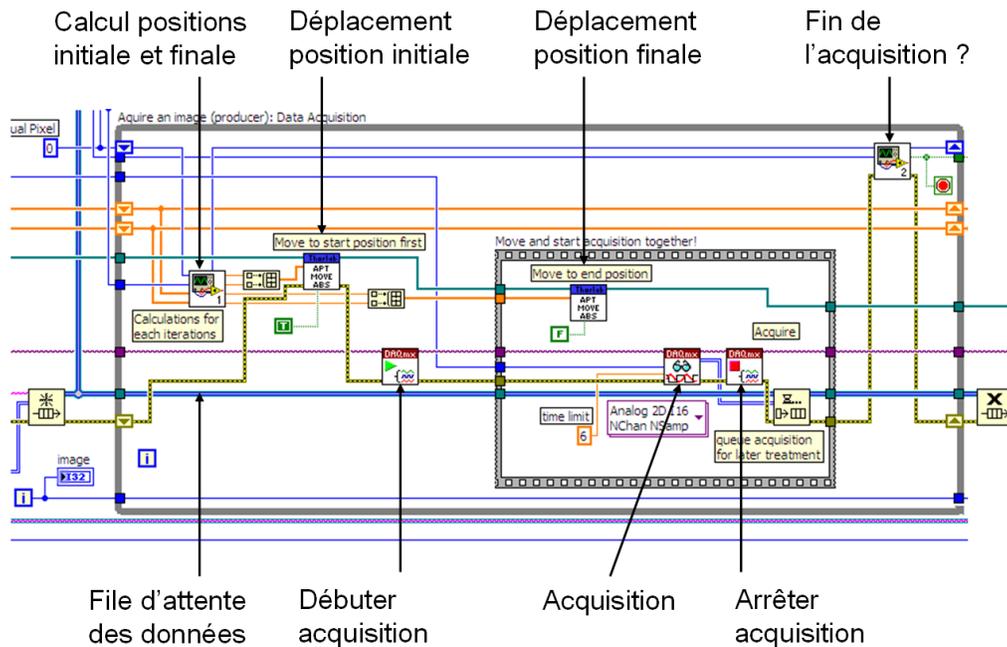


Figure C.2 Code de la boucle d'acquisition des données pour une image.

Une commande est ensuite envoyée pour déplacer la plateforme de translation à la position initiale. Le feu vert est donné pour effectuer l'acquisition des données. On commence ensuite une séquence dans laquelle une commande est envoyée pour déplacer la plateforme de translation à la position finale et l'acquisition des données brutes est effectuée par l'ordinateur. La synchronisation de ces deux commandes est cruciale pour obtenir une bonne image. Une fluctuation de cette synchronisation de l'ordre de la milliseconde aurait des conséquences catastrophiques sur la qualité des images obtenues. Cela nous a causé plusieurs problèmes durant la conversion du montage. En fin de compte, nous avons fabriqué un câble pour brancher la boîte de contrôle de la plateforme de translation à l'ordinateur, afin d'envoyer un signal pour

déclencher l'acquisition des données. Les concepteurs de la plateforme de translation nous ont aidés, afin de faire en sorte que ce signal de déclenchement soit envoyé au moment où la plateforme atteint sa vitesse maximale. De cette manière, le décalage en temps entre le mouvement de la plateforme de translation et l'acquisition des données reste constant d'une ligne à l'autre, ce qui donne une bonne image.

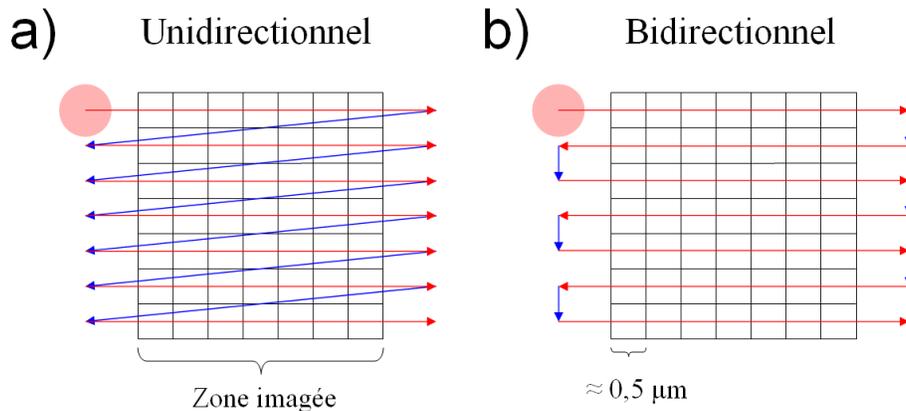


Figure C.3 Parcours du faisceau dans le matériau imagé durant un balayage. Les données sont acquises durant le mouvement de la plateforme le long des lignes rouges. La tête de flèche des lignes rouges correspond aux positions finales de la plateforme pour ces lignes. La tête de flèche des lignes bleues correspond aux positions initiales de la plateforme pour les lignes suivantes. La zone balayée est plus grande que la zone imagée, car il faut donner un jeu pour que la plateforme puisse accélérer et décélérer afin que les données soient acquises lorsqu'elle se déplace à vitesse constante. (a) Balayage unidirectionnel où toutes les lignes sont acquises avec un mouvement de la plateforme dans la même direction. (b) Balayage bidirectionnel, plus rapide, mais donnant des images de moins bonne qualité, puisqu'il est plus difficile de faire arriver toutes les lignes parfaitement vis-à-vis lorsqu'elles ne sont pas toutes prises en effectuant le même mouvement.

La figure C.4 montre la différence entre des images GSH d'un cristal PPLN prises avec et sans le signal de déclenchement. Toutes les images font 500×500 pixels, couvrent une zone de $250 \times 250 \mu\text{m}$ et ont été obtenues avec un balayage unidirectionnel. La première image (figure C.4a) a été obtenue en quelques secondes avec l'ancien système de balayage employant les miroirs galvanométriques et un signal de déclenchement pour l'acquisition des données. La seconde image (figure C.4b) a été obtenue en 300 secondes avec le balayage de la plateforme de translation à une vitesse de 10 mm/s et un signal de déclenchement pour l'acquisition des données. La troisième image (figure C.4c) a été obtenue en 920 secondes avec le balayage de la plateforme de translation à une vitesse de 1 mm/s et sans signal de déclenchement pour l'acquisition des données. La dernière image (figure C.4d) a été obtenue en 265 secondes avec le

balayage de la plateforme de translation à une vitesse de 5 mm/s et sans signal de déclenchement pour l'acquisition des données. Comme le montrent ces images, le signal de déclenchement pour l'acquisition des données est requis pour balayer rapidement le matériau imagé et obtenir une image de bonne qualité.

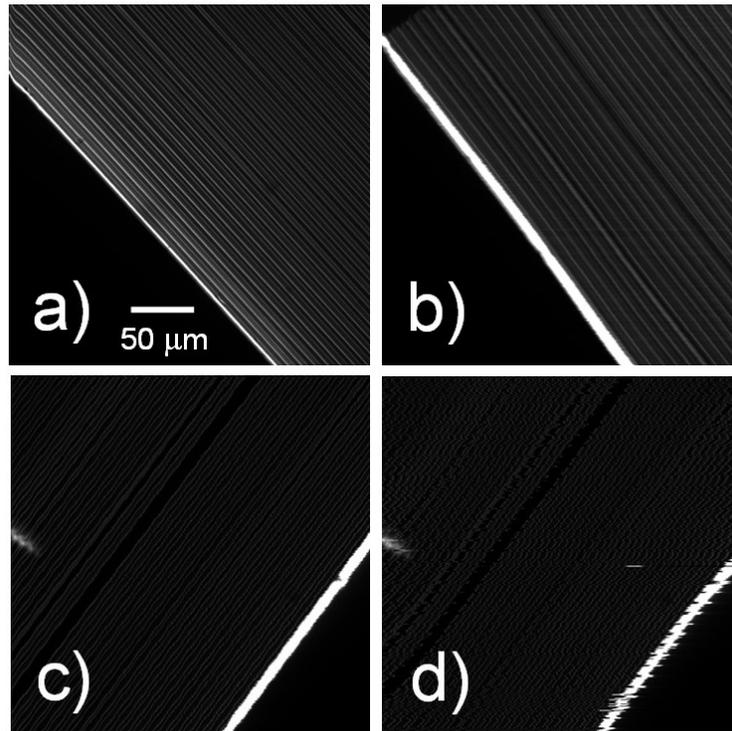


Figure C.4 Images GSH d'un cristal PPLN. La dimension de toutes les images est de 500×500 pixels sur une zone de $250 \times 250 \mu\text{m}$ et le balayage est unidirectionnel. (a) Balayage de quelques secondes avec l'ancien système de miroirs galvanométriques et avec un signal de déclenchement pour l'acquisition des données. (b) Balayage de 300 secondes avec le balayage de la plateforme de translation à une vitesse de 10 mm/s et avec un signal de déclenchement pour l'acquisition des données. (c) Balayage de 920 secondes avec le balayage de la plateforme de translation à une vitesse de 1 mm/s et sans signal de déclenchement pour l'acquisition des données. (d) Balayage de 265 secondes avec le balayage de la plateforme de translation à une vitesse de 5 mm/s et sans signal de déclenchement pour l'acquisition des données. Les lignes n'arrivent plus vis-à-vis les unes des autres dans cette dernière image ce qui fait en sorte qu'elle est de moins bonne qualité.

Une fois les données acquises pour une ligne, l'acquisition est arrêtée et les données brutes sont ajoutées à une file d'attente pour qu'elles soient traitées indépendamment par la "**Boucle de traitement des données**". Finalement, une dernière fonction incrémente un compteur pour passer à la prochaine ligne ou pour sortir de la boucle s'il s'agissait de la dernière ligne de l'image.

Sans se perdre dans tous les détails complexes du fonctionnement du programme, cette annexe explique donc le fonctionnement général du programme et comment le système a été modifié pour être en mesure d'acquérir des images avec une plateforme de translation XY.