Université du Québec
INRS Énergie Matériaux Télécommunications

Une approche simple pour la microscopie multimodale non-linéaire

Par
Antony Bertrand-Grenier

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences de l'énergie et des matériaux

Jury d'évaluation

Fiorenzo Vetrone	Examinateur interne et président du jury INRS-ÉMT
Daniel Houde	Examinateur externe Université de Sherbrooke
François Légaré	Directeur de recherche INRS-ÉMT

©Droits réservés d'Antony Bertrand-Grenier, 2011

RÉSUMÉ DU PROJET

Les avancées récentes en physique des lasers ont permis de mettre en œuvre de nouvelles techniques de microscopie contribuant grandement à la recherche dans plusieurs domaines, notamment l'imagerie biomédicale. Sachant que les liaisons chimiques possèdent des fréquences de vibration qui leur sont caractéristiques, l'une de ces techniques consiste à stimuler l'excitation vibrationnelle d'une liaison chimique spécifique par différence de fréquences de deux impulsions lasers, communément nommées « pompe » et « Stokes ». Connue sous le nom de microscopie CARS (« Coherent anti-Stokes Raman Scattering »), cette technique utilise l'effet Raman stimulé comme contraste d'imagerie. Cette technique a été introduite pour la première fois en 1982 [1] et a été mise en œuvre en 1999 [2]. L'intérêt majeur de cette technique de microscopie est d'abord l'absence de marquage, c'est-à-dire que les échantillons ne nécessitent aucun agent fluorescent. De plus, elle est grandement utilisée pour détecter les vibrations CH_2 symétriques dans un échantillon biologique donné qui elles sont très présentes dans les lipides comme la myéline. D'autre part, la microscopie CARS permet de combiner information spectrale et imagerie haute résolution (de l'ordre du micron [2]).

Ce mémoire présente une nouvelle approche pour cette technique d'imagerie : Un montage expérimental CARS basé sur deux lasers et un microscope a été conçu afin de pouvoir imager des échantillons biologiques tels que l'enveloppe des nerfs riches en myéline. Le premier faisceau utilisé, pour la pompe, est un laser Titane: Saphir accordable qui permet de générer des impulsions lasers d'une durée de 100 femtosecondes et le deuxième, le faisceau Stokes, provient d'un laser à 1064 nm avec des impulsions d'une durée de 12 picosecondes. L'objectif étant d'imager les lipides et d'utiliser la vibration CH_2 symétrique, la durée d'impulsion limitée par la transformée de Fourier pour laquelle le signal CARS est optimal est de l'ordre de la picoseconde [3]. Il est donc nécessaire d'augmenter la durée de l'impulsion du faisceau pompe pour qu'elle soit non loin de cette durée en filtrant spectralement l'impulsion femtoseconde. Pour ce faire, nous construisons un filtre d'amplitude basé sur un système dispersif et une

géométrie 4f afin d'avoir une sélectivité spectrale sur le laser pompe. Un autocorrélateur d'intensité a été également mis au point afin de connaître la durée des impulsions lasers.

Ce filtre d'amplitude est constitué de deux réseaux qui dispersent et recombinent les fréquences. À l'aide de lentilles et d'une fente, nous pouvons sélectionner une largeur spectrale voulue au plan de Fourier. En réduisant la largeur spectrale de l'impulsion en soustrayant une partie des fréquences du spectre de l'impulsion femtoseconde, nous augmentons la durée de l'impulsion. Alors, nous pouvons produire un graphique de la durée d'impulsion en fonction de l'ouverture de la fente. Par exemple, les résultats démontrent qu'à 500 microns d'ouverture, la durée de l'impulsion est de 1.4 picoseconde et qu'à 400 microns, la durée est de 1.8 picoseconde. Nous avons donc pu travailler avec une ouverture de fente non loin de 450 microns.

Par la suite, nous avons pu imager des échantillons biologiques, soit le fascia et un tissu composé de nerfs qui sont riches en myéline. Dans les deux cas, ces tissus ont été obtenus par biopsie sur des souris. Pour l'imagerie du système nerveux, nous avons étudié trois possibilités : Un tissu prélevé chez une souris non-infecté, infecté par le virus exprimant la protéine fluorescence mCherry et un autre infecté par le virus exprimant la protéine fluorescente 78UStdtomato. Avec ce système à deux lasers, nous pouvons non seulement utiliser la technique de microscopie CARS, mais également la fluorescence par absorption deux photons et l'imagerie de seconde harmonique qui ne requièrent qu'un seul laser. Les images obtenues avec ce système démontrent très bien la complémentarité des techniques d'imagerie. Mon travail de recherches réalisé dans le cadre de la maîtrise constitue la première étape au développement d'une plate-forme de microscopie optique non-linéaire multimodale.

Mots clefs : Optique non-linéaire, microscopie CARS, fluorescence, seconde harmonique, filtre d'amplitude, spectroscopie Raman, myéline.

Étudiant	Directeur de recherche

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé en partie en collaboration avec la professeur Angela Pearson de l'Institut Armand-Frappier de l'INRS ainsi que son étudiant au Doctorat en Virologie et Immunologie Pierre-Alexandre Rochette. Ces personnes nous ont fourni les trois types d'échantillons biologiques du tissu prélevé chez sur des souris sacrifiées. Également, Pierre-Alexandre Rochette est venu au laboratoire plusieurs fois pour nous aider à imager les échantillons biologiques.

REMERCIEMENTS

Je veux commencer par remercier Marie-Andrée Houle qui m'a accompagné dans le début du projet. Elle connaissait déjà bien l'INRS ainsi que le laboratoire et a pu m'aider dans les démarches du commencement de ma maîtrise.

Je dois remercier Mathieu Laliberté qui m'a accompagné dans une grande partie du projet. J'ai pu bénéficier de son expertise en optique et il m'a donné de bons conseils en partageant son expérience.

Un remerciement spécial à Angela Pearson et Pierre-Alexandre Rochette pour toutes les informations ainsi que leur temps qu'ils ont pu me donner. Étant spécialistes en biologie, dès que j'avais une question, ils pouvaient y répondre. Également, je remercie non seulement Pierre-Alexandre d'être venu m'aider au laboratoire afin d'imager des échantillons biologiques et ce, plusieurs fois, mais également pour sa participation lors de travaux dans le cadre de ma recherche où j'avais besoin d'aide en biologie.

Je tiens également à remercier deux collègues, Mathieu Giguère et Bruno Schmidt qui ont pu m'aider dès que j'avais une question en optique. Un très grand merci également à Maxime Rivard, il a pu m'intégrer à l'INRS, autant au niveau social qu'au

niveau de la recherche. Il est venu m'aider très souvent dans le laboratoire. Je lui suis reconnaissant.

Sincèrement merci à François Légaré, mon directeur de recherche. Sans lui, je n'aurais pas pu aller à l'INRS. Il a cru en mes capacités et grâce à lui, j'ai pu faire une maîtrise dans un milieu de recherche stimulant. J'ai également pu aller à plusieurs congrès, connaître des collaborateurs dans notre domaine de recherche tout en atteignant mes objectifs.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ DU PROJET ii
AVANT-PROPOS iv
REMERCIEMENTS iv
TABLE DES MATIÈRES vi
LISTE DES FIGURES viii
INTRODUCTION 1

Chapitre 1 – MICROSCOPIE OPTIQUE NON-LINÉAIRE

1.1 Pourquoi la microscopie optique non-linéaire 5
1.2 Processus cohérent et résonant 5
1.3 L'équation d'onde pour l'optique non-linéaire 8
1.4 Les équations d'ondes couplées pour la somme de fréquences 10
1.5 Accord de phase 14
1.6 La phase de Gouy 17

Chapitre 2 – GÉNÉRATION DU SIGNAL CARS

2.1 Diffusion Raman 19
2.2 Microscopie CARS 21
2.3 CARS vu dans les domaines spectral et temporel 22
2.4 Polarisation induite 23
2.5 Comportement du tenseur χ^3 24
2.6 Intensité anti-Stokes totale 26
2.7 Génération du signal anti-Stokes et accord de phase 28

Chapitre 3 – MISE EN OEUVRE

3.1 Suppression du signal non-résonant 31
3.1.1 P-CARS 31
3.1.2 T-CARS 32

3.1.3 FM-CARS 32
3.1.4 Perspectives futures au projet 33
3.2 Oscillateurs lasers et électronique de synchronisation 33
3.2.1 Cavité optique Millennia 33
3.2.2 Oscillateur laser Titane: Saphir 34
3.2.3 Oscillateur laser 1064 nm 35
3.2.4 Électronique de synchronisation 36
3.3 Montage expérimental 37
3.4 Filtre d'amplitude basé sur un système dispersif 41
3.5 Alignement du filtre d'amplitude 43
3.6 Autocorrélateur d'intensité 45
3.7 Durée d'impulsion selon l'ouverture de la fente 46
3.8 Focalisation des faisceaux à l'intérieur du microscope 47
3.9 Filtre et longueur d'onde pour l'imagerie CARS 48

Chapitre 4 – RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.1 Biologie 49
4.1.1 La gaine de myéline 49
4.1.2 La gaine de myéline en pathologie 50
4.1.3 Mise en contexte des virus 52
4.2 Imagerie CARS 53
4.2.1 CARS et fluorescence - myéline 53
4.2.2 CARS et fluorescence - US78tdtomato 57
4.2.3 CARS et autofluorescence - mCherry 58
4.2.4 CARS et seconde harmonique - fascia 62
4.2.5 Contraste CARS selon la longueur d'onde de la pompe 64
4.2.6 Photo-dommage dans la myéline 72

CONCLUSION 75
ANNEXE A – Démonstration de l'équation d'onde de l'optique non-linéaire 78
RÉFÉRENCES 85

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 – Pénétration de la lumière selon la longueur d'onde 5

Figure 1.2 – Diagramme de Jablonski démontrant certains processus optiques non-linéaires. 6

Figure 1.3 – Représentation de la somme de fréquences 9

Figure 1.4 – Effet du vecteur d'accord de phase sur l'efficacité de la somme de fréquences 16

Figure 1.5 – Représentation visuelle de la phase de Gouy 18

Figure 2.1 – Mécanismes de diffusion Raman 20

Figure 2.2 – Diagramme des niveaux vibrationnels en microscopie CARS 21

Figure 2.3 – Exaltation du signal anti-Stokes par excitation d'un mode vibrationnel 22

Figure 2.4 – Visualisation de la polarisation induite 24

Figure 2.5 – Représentation visuelle de la décomposition de l'intensité anti-Stokes totale 26

Figure 2.6 – (A) Signal CARS résonant et non-résonant et le ratio de ces signaux en fonction de la largeur spectrale de l'impulsion. (B) Profil spectral CARS en fonction de la largeur spectrale des impulsions 27

Figure 3.1 – Représentation visuelle des vecteurs de polarisation du faisceau pompe (E_p), du faisceau Stokes (E_s), du signal résonant ($P^{(3)R}$) et du signal non-résonant ($P^{(3)NR}$) 32

Figure 3.2 – Signal CARS en fonction de la fréquence 33

Figure 3.3 – Trajet optique du *Millennia® Pro series* utilisé 34

Figure 3.4 – Trajet optique pour les modèles du Tsunami 3960 et 3941 35

Figure 3.5 – Illustration de la boucle de blocage de phase du *lok-to-clock* 37

Figure 3.6 – Montage expérimental du système de microscopie CARS 38

Figure 3.7 – Filtre d'amplitude basé sur un système dispersif de réseaux et géométrie 4f 42
Figure 3.8 – Montage expérimental du système d'autocorrélation d'intensité 45
Figure 3.9 – Graphique de la durée de l'impulsion selon la largeur de la fente ... 46
Figure 3.10 – Signal obtenu selon z de la focalisation des faisceaux 47

Figure 4.1 – Images obtenues des techniques CARS et de fluorescence pour des échantillons de myéline 54
Figure 4.2 – Images obtenues des techniques CARS (gauche) et de fluorescence (droite) pour un échantillon de US78tdtomato 57
Figure 4.3 – 1ère zone d'images obtenues pour des échantillons de mCherry. 60
Figure 4.4 – 2ième zone d'images obtenues pour des échantillons de mCherry 61
Figure 4.5 – Images obtenues des techniques CARS et de seconde harmonique . 62
Figure 4.6 – Images et graphiques obtenues de la technique CARS dans la myéline à 816 nm 65
Figure 4.7 – 1ère zone d'images CARS dans la myéline à différentes longueurs d'ondes 66
Figure 4.8 – Ligne tracée pour la 1ère zone d'images CARS à différentes longueurs d'ondes 68
Figure 4.9 – Graphiques obtenus de la 1ère zone CARS dans la myéline à différentes longueurs d'ondes 68
Figure 4.10 – 2ième zone d'images CARS dans la myéline à différentes longueurs d'ondes 69
Figure 4.11 – Ligne tracée pour la 2ième zone d'images CARS à différentes longueurs d'ondes 70
Figure 4.12 – Graphiques obtenus de la 2ième zone CARS dans la myéline à différentes longueurs d'ondes 71
Figure 4.13 – Photo-dommage observé dans la myéline 72

INTRODUCTION

La biophotonique est un domaine de recherche qui utilise la lumière soit pour l'analyse, l'imagerie ou le traitement dans le contexte biomédicale. Plusieurs types de microscopie utilisant l'optique linéaire et non-linéaire sont toujours en développement. Parmi les techniques d'optique linéaire, nous retrouvons la microscopie confocale [4]. Pour cette technique d'imagerie, un faisceau est focalisé dans un échantillon biologique et la lumière générée en proximité du point focal est détectée par un photomultiplicateur. La caractéristique principale de la microscopie confocale est de focaliser les photons collectés par l'objectif en un point et de filtrer spatialement afin d'obtenir une résolution micrométrique.

Pour ce qui est des techniques de microscopie optique non-linéaire, la plus simple est la microscopie par absorption de 2 photons. Celle-ci est basée sur l'excitation de molécules fluorescentes et survient dans la bande de l'infrarouge proche, soit entre 700 nm et 1050 nm. Un laser Titane: Saphir (durée des impulsions de 100 femtosecondes, taux de répétition d'environ 80 MHz et d'environ 40 nanojoules par impulsion à pleine puissance) est donc une source idéale puisqu'il fonctionne dans cette gamme de longueurs d'ondes. En raison de l'interaction non-linéaire des impulsions lasers avec l'échantillon, l'absorption à deux photons est plus efficace au focus de l'objectif du microscope, là où l'intensité lumineuse est la plus intense, et la fluorescence est émise en proximité du plan focal, ce qui fourni des informations statiques ou dynamiques avec des résolutions spatiales de l'ordre du micron [5].

De plus, parmi les autres techniques de microscopie optique non-linéaire utilisées, nous retrouvons la microscopie de génération de seconde harmonique (SHG) [6], de génération de troisième harmonique (THG) [7] ainsi que la microscopie CARS [8] (acronyme anglais pour « Coherent Anti-Stokes Raman Scattering »). La seconde harmonique utilise la présence de structures non-centrosymétriques ($\chi^{(2)}$) comme contraste d'imagerie [6]. Pour ce qui est de la troisième harmonique, celle-ci utilise le $\chi^{(3)}$

[7]. En comparaison, la microscopie CARS donne accès également à une information spécifique chimiquement en excitant les modes vibrationnels Raman des molécules pour produire des photons anti-Stokes, ce qui constituent le signal résonant. Toutes ces techniques de microscopie permettent d'obtenir des informations spécifiques sur l'échantillon biologique quant aux types de tissus et de molécules présentes.

Les trois premières techniques de microscopie optique non-linéaire mentionnées sont optimisées par l'utilisation d'impulsions femtosecondes car ces processus dépendent uniquement de l'intensité laser. Pour la microscopie CARS, nous devons réduire la bande spectrale des impulsions lasers pour avoir un excellent contraste spectroscopique pour l'imagerie des lipides et correspondant à des impulsions picosecondes dans la limite de Fourier [3]. Alors, mon projet consistait de développer une plateforme commune pour toutes ces techniques d'imagerie (fluorescence, seconde harmonique, troisième harmonique et CARS), que celle-ci soit optimale et disponible avec les infrastructures que nous disposions dans le laboratoire, soient :

- Oscillateur laser Titane: Saphir, 100 femtosecondes, 80 MHz, 3 W.
- Oscillateur laser 1064 nm, 12 picosecondes, 80 MHz, 3 W.
- Électronique de synchronisation

L'oscillateur laser Titane: Saphir peut être utilisé pour la fluorescence 2 photons ainsi que la seconde harmonique. De plus, nous utilisons l'oscillateur laser Titane: Saphir comme étant le faisceau laser pompe et le laser 1064 nm comme étant le faisceau laser Stokes pour la microscopie CARS [3]. Toutefois, la bande spectrale du laser pompe doit être réduite afin d'obtenir la sélectivité spectrale pour la microscopie CARS, ce qui nous en vient aux objectifs et procédure de recherche du projet :

1. Construire un filtre d'amplitude basé sur un système 4f afin de réduire et pouvoir choisir la bande spectrale désirée pour le laser pompe, ainsi que la longueur d'onde centrale de celui-ci.

2. Recombiner les deux lasers (pompe et Stokes) spatialement et temporellement dans le montage optique à l'aide d'une ligne à délai et d'un miroir dichroïque.
3. Bâtir un autocorrélateur d'intensité afin de pouvoir caractériser la durée des impulsions lasers à la sortie du filtre d'amplitude.
4. Optimiser le montage de façon à ce que le ratio entre la contribution vibrationnelle de CARS par rapport à la contribution électronique de CARS soit le plus élevé possible.
5. Selon les échantillons, optimiser les images (fluorescence, seconde harmonique, CARS) obtenues et vérifier leur complémentarité.

À cette fin, le mémoire est construit comme suit :

1. Le chapitre 1 présente plus en détails les différentes techniques utilisées (fluorescence par absorption à deux photons, seconde harmonique, troisième harmonique, CARS). Également, la base mathématique théorique pour l'optique non-linéaire y est introduite.
2. Le chapitre 2 dévoile les aspects plus théoriques de la microscopie CARS, commençant d'abord par la diffusion Raman et par la suite, démontrant les processus engendrant le comportement du tenseur χ^3, l'intensité anti-Stokes totale ainsi que les différents mécanismes de génération du signal anti-Stokes.
3. Le chapitre 3 s'intéresse à la mise en œuvre du montage expérimental, soient en grande partie le filtre d'amplitude basé sur un système dispersif et de géométrie 4f ainsi que l'autocorrélateur d'intensité.
4. Finalement, le chapitre 4 présente les résultats et images obtenues avec les différentes techniques d'imagerie utilisées et ce, pour les différents tissus imagés. Une brève introduction biologique pour la myéline est également incluse dans ce chapitre.

De ce fait, mon projet de maîtrise consiste à construire un montage de microscopie CARS à l'aide de deux lasers et d'un microscope afin de pouvoir imager des échantillons biologiques; par exemple l'enveloppe des nerfs riches en myéline. La

myéline est une substance ayant une forte concentration en phospholipides riches en vibration CH_2 symétrique. Nous pouvons également nous poser comme question : Quels sont les types d'images que nous pouvons obtenir en microscopie CARS et quelles en sont les limites ? Plusieurs groupes ont démontré certaines instrumentations et applications de la microscopie CARS pour l'imagerie tissulaire [9, 10], particulièrement pour la myéline [11]. Plusieurs questions nous permettent de bien cerner les enjeux de cette technique afin de nous rapprocher du but ultime de la microscopie CARS, soit d'imager les structures moléculaires, et de visualiser leurs interactions et évolution dans un échantillon biologique et ce sans avoir recours au marquage.

CHAPITRE 1

MICROSCOPIE OPTIQUE NON-LINÉAIRE

1.1 Pourquoi la microscopie optique non-linéaire

Nous utilisons des techniques de microscopie optique non-linéaire non seulement pour la résolution micrométrique, mais également pour la profondeur de pénétration avec des lasers infrarouges dans les tissus biologiques. Utilisant ces types de laser, la diffusion est moindre, ce qui minimise l'impact et les dommages sur les échantillons biologiques. La **Figure 1.1** [12] témoigne de la profondeur de pénétration de la lumière selon la longueur d'onde dans les tissus biologiques. La pénétration de la lumière dans les tissus dépend fortement de la longueur d'onde. Ainsi, une lumière rouge pénétrera plus profondément dans les tissus qu'une lumière bleue ou verte.

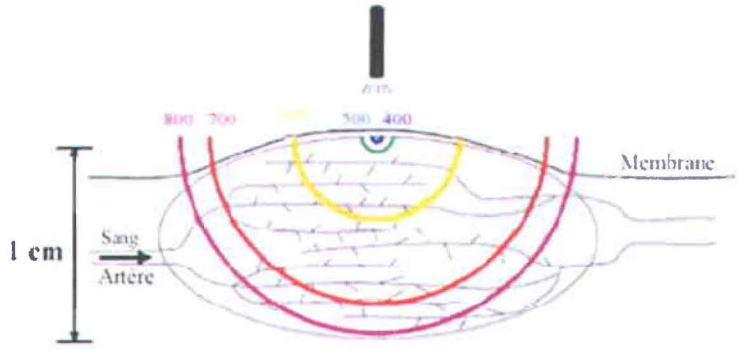


Figure 1.1 – Pénétration de la lumière selon la longueur d'onde

1.2 Processus cohérent et résonant

Depuis quelques décennies, de nouvelles techniques d'imagerie basées sur l'optique non-linéaire furent introduites en microscopie (voir la **Figure 1.2**). Parmi celles-ci, certaines fréquemment utilisées sont :

1. La **Fluorescence induite par absorption à deux photons** (*Two-Photon Excitation Fluorescence*, TPEF) [13] : Émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule (absorption de photons) immédiatement suivie d'une émission spontanée. À noter ici que l'absorption à deux photons est définie comme étant le processus selon lequel un fluorophore est excité en absorbant deux photons infrarouges simultanément.

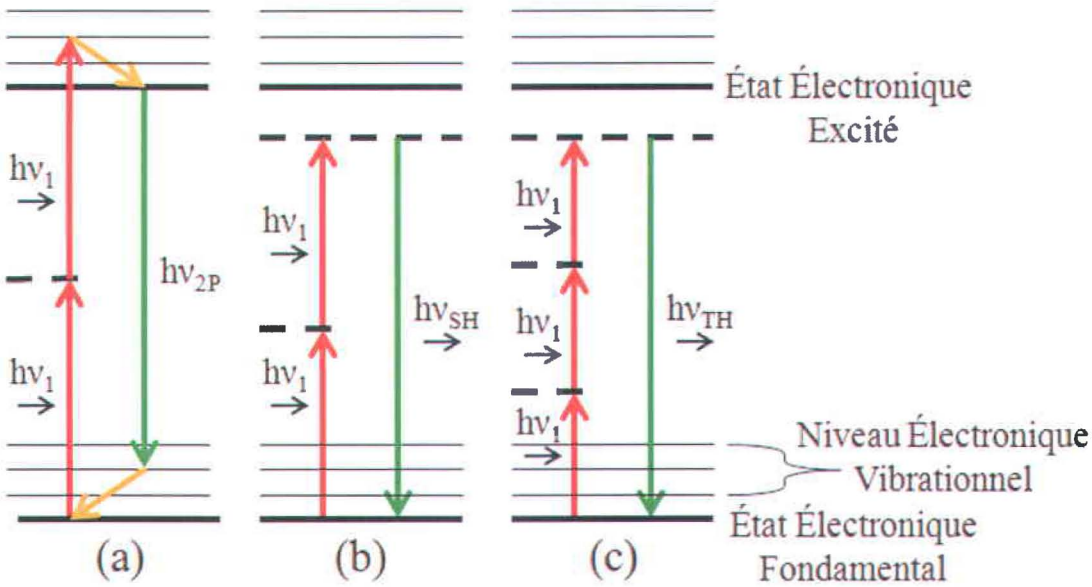


Figure 1.2 – Diagramme de Jablonski démontrant certains processus optiques non-linéaires. Aussi représentés sont les niveaux électroniques et vibrationnels d'une molécule. **(a)** Fluorescence par absorption à deux photons. La molécule absorbe deux photons infrarouges résultants par une excitation électronique de la molécule. Après la relaxation vers un niveau vibrationnel moins élevé, la molécule émet un photon avec moins d'énergie que les photons initiaux ($h\nu_{2P} < 2h\nu_1$). **(b)** Génération de Seconde Harmonique. Deux photons infrarouges sont convertis en un photon avec le double d'énergie ($h\nu_{SH} = 2h\nu_1$). **(c)** Génération de Troisième Harmonique. Trois photons infrarouges sont convertis en un photon avec le triple d'énergie ($h\nu_{TH} = 3h\nu_1$).

2. La **Génération de Seconde Harmonique** (*Second Harmonic Generation,* SHG) [14] : Processus optique non-linéaire dans lequel des photons interagissent avec un matériau non-linéaire et sont combinés pour former de nouveaux photons avec

le double de l'énergie des photons initiaux. Dans notre cas, le faisceau laser de pulsation ω interagit avec un milieu non-centrosymétrique (collagène, myosine) et le signal de seconde harmonique généré est au double de la fréquence du faisceau laser (2ω). Il est à noter que ce processus de nonlinéarité $\chi^{(2)}$ n'a pas lieu dans un milieu centrosymétrique.

3. La **Génération de Troisième Harmonique** (*Third Harmonic Generation*, THG) [15] : Processus optique non-linéaire où la fréquence résultante est trois fois celle du faisceau incident. En principe, ceci peut être atteint avec une nonlinéarité $\chi^{(3)}$, mais ce procédé est difficile dû aux contraintes de l'accord de phase et est limité à l'imagerie de particules dont la taille avoisine la longueur d'onde du laser ou les interfaces [16, 17].

Toutes ces techniques peuvent se classer en deux catégories :

1. Les **processus résonants**, comme par exemple la microscopie de fluorescence par absorption à deux photons. Celle-ci génère la fluorescence efficacement seulement si les photons excitateurs sont spécifiques au spectre d'absorption à deux photons des marqueurs fluorescents.

2. Les **processus cohérents**. L'émission cohérente est une émission lumineuse donnant lieu à des phénomènes d'interférences et où la phase est bien définie. Il y a une relation de phase entre les champs excitateurs locaux et le champ électromagnétique du signal généré. Dans ces cas, nous pouvons parler des microscopies de seconde harmonique (SHG) et de troisième harmonique (THG). La SHG permet d'imager les milieux non-centrosymétriques [18, 19, 20] et la THG est sensibles aux interfaces [15,21] et aux petits objets [22]. Également, dans notre cas, les ondes fondamentales et harmoniques ne provoquent aucune résonance électronique dans le milieu étudié vu les longueurs d'ondes d'excitation utilisées.

La diffusion CARS fait parti de ces deux catégories. De fait, la fréquence vibrationnelle coïncide avec la différence de fréquences des champs excitateurs pompe et Stokes. Les molécules du milieu étudié possédant ce mode vibrationnel oscillent entre l'état fondamental (V = 0) et le premier état vibrationnel excité (V = 1) réel via la préparation d'une superposition cohérente de ces deux états vibrationnels. Également, grâce au processus d'émission stimulée, le niveau vibrationnel (V = 1) est peuplé de manière cohérente puis sondé par un faisceau lui-même cohérent [23].

Afin de mieux visualiser le terme de la cohérence, prenons par exemple le cas de la fluorescence. Lorsqu'un ensemble de molécules fluorescentes est pompé optiquement, une fraction d'entre elles passe du niveau électronique fondamental à un niveau excité. Celles-ci perdent une partie de leur énergie par des processus non-radiatifs pour atteindre un état énergétique plus stable et par la suite, émettent une onde électromagnétique dont la phase est aléatoire. De fait, il n'existe aucune relation de phase entre les champs respectivement associés à l'onde électromagnétique excitatrice et à l'onde électromagnétique émise, ce qui mentionne que la fluorescence est dite « incohérente ».

Dans le cas d'un processus cohérent, il existe une relation de phase déterministe entre le champ incident et le champ diffusé, comme c'est le cas pour la diffusion CARS, soient les champs incidents pompe et Stokes et le champ diffusé anti-Stokes. Alors, il faut prendre en compte les phénomènes d'interférences entre les champs électromagnétiques générés à l'intérieur du volume d'interaction.

1.3 L'équation d'onde pour l'optique non-linéaire

La non-linéarité d'un système matériel en réponse à un champ laser peut causer une polarisation pour développer un nouveau système de composantes de fréquences [24]. Nous parlons ici de polarisation comme étant la direction et l'amplitude dans laquelle vibre le champ électrique associé à une onde lumineuse. Ces nouvelles composantes de fréquences de la polarisation agissent comme des sources de nouvelles composantes spectrales du champ électromagnétique. Dans cette section, nous examinons

comment les équations de Maxwell décrivent la génération de ces nouvelles composantes spectrales du champ électromagnétique et plus en général, nous allons voir comment les différentes composantes de fréquences du champ deviennent couplées par l'interaction non-linéaire.

Une figure simple pour représenter comment ces composantes de fréquences sont générées, nous considérons le processus de somme de fréquences illustrée à la **Figure 1.3.a** [25]. Les champs électromagnétiques incidents sont respectivement aux fréquences ω_1 et ω_2. Un atome isolé peut irradier à cette fréquence dans la forme de la radiation du dipôle, illustré sur la **Figure 1.3.b** [25]. N'importe quel matériel contient un nombre (N) très élevé de dipôles atomiques, chacun oscillant avec une phase qui est déterminée par les phases des champs incidents. Si la phase relative de ces dipôles est la même, le champ irradié par chaque dipôle va s'additionner de manière constructive dans la direction avant (*Forward direction*) afin de bien définir un faisceau comme illustré à la **Figure 1.3.c** [25]. Le système va agir comme une matrice de phase de dipôles (*phased array of dipoles*) avec certaines conditions, connu comme la condition d'accord de phase (équation 1.5.1 à la section 1.5). Sous ces conditions, l'amplitude du champ électromagnétique émit dans la direction avant va être N fois celui d'un seul atome et par conséquent, l'intensité est proportionnelle comme le carré du nombre d'atomes (N^2).

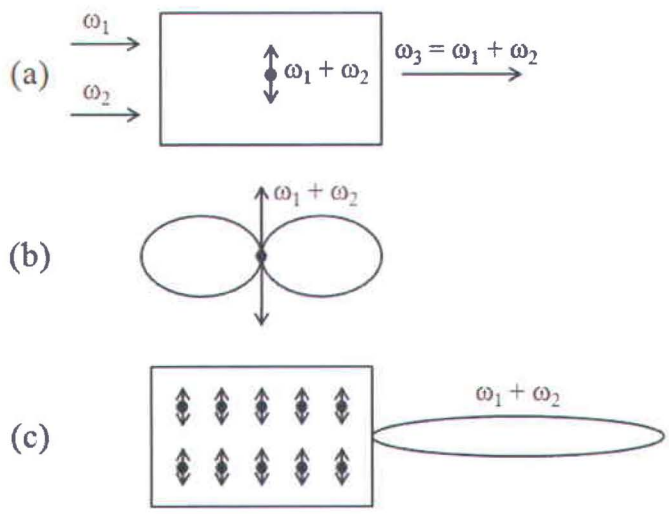


Figure 1.3 – Représentation de la somme de fréquences

Nous partons d'abord de l'équation d'onde pour l'optique non-linéaire suivante :

$$\nabla^2 \widetilde{E}_n - \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_n)}{c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{E}_n}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{P}_n^{NL}}{\partial t^2} \tag{1.3}$$

Une démonstration pour cette Équation d'Onde est produite dans l'Annexe A (voir l'équation A.21). Il est à noter que les équations de base pour définir cette annexe y sont également indiquées dans le livre *Nonlinear Optics* de Robert W. Boyd [26]. Par contre, des étapes supplémentaires ont été ajoutées afin qu'un lecteur puisse comprendre le développement de ces équations afin d'en arriver à l'équation 1.3.

1.4 Les équations d'ondes couplées pour la somme de fréquences

Avec les équations démontrées à l'Annexe A, nous considérons la génération de somme de fréquences, où deux fréquences différentes sont utilisées, dans un système non-linéaire avec un faisceau collimé en onde-continue. Il est à noter que le développement de la somme de fréquences nous permettra d'expliquer l'accord de phase. Nous assumons que l'onde arrive à incidence normale dans le milieu non-linéaire. Pour simplifier le cas, nous ignorons l'effet de la réfraction-double.

L'équation d'onde 1.3 tient compte de toutes les composantes de fréquences du champ électromagnétique et particulièrement la composante de la somme de fréquences à la fréquence ω_3. En l'absence d'une source de termes non-linéaires, la solution de l'équation pour une onde plane à la fréquence ω_3 se propageant dans la direction +z est :

$$\widetilde{E}_3(z,t) = A_3 e^{i(k_3 z - \omega_3 t)} + c.c. \tag{1.4.1}$$

$$\text{où } k_3 = \frac{n_3 \omega_3}{c} \text{ et } n_3^2 = \varepsilon^{(1)}(\omega_3) \tag{1.4.2}$$

Et où l'amplitude de l'onde A_3 est une constante. Nous nous attendons à ce que lorsqu'une source non-linéaire n'est pas trop grande, la solution de l'équation 1.3 va rester de la même forme que l'équation 1.4.1 à l'exception que A_3 deviendra une fonction ayant une petite variation selon z. De ce fait, nous représentons le terme non-linéaire apparaissant dans l'équation 1.3 :

$$\widetilde{P}_3(z,t) = P_3 e^{-i\omega_3 t} + c.c. \tag{1.4.3}$$

D'ailleurs, l'équation qui suit est dans le but de mieux fixer une géométrie (propagation et directions de polarisation) [27]. Il est à noter que d_{eff} est un tenseur sous forme de matrice ijk [28] :

$$P_3 = 4\varepsilon_0 d_{eff} E_1 E_2. \tag{1.4.4}$$

Nous représentons les champs appliqués (i = 1,2) comme :

$$\widetilde{E}_i(z,t) = E_i e^{-i\omega_i t} + c.c. \text{ où } E_i = A_i e^{ik_i z} \tag{1.4.5}$$

L'amplitude du terme de la polarisation non-linéaire peut être écrite comme :

$$P_3 = 4\varepsilon_0 d_{eff} A_1 A_2 e^{i(k_1+k_2)z} = p_3 e^{i(k_1+k_2)z} \tag{1.4.6}$$

Nous pouvons maintenant substituer les équations 1.4.1, 1.4.3 et 1.4.6 dans l'équation d'onde 1.3. Vu que le champ dépend seulement de la coordonnée longitudinale z, nous pouvons remplacer ∇^2 par d^2/dz^2. Il est à noter que l'amplitude A dépend de la coordonnée longitudinale z. Nous obtenons donc :

$$\nabla^2 \widetilde{E}_n - \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_n)}{c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{E}_n}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{P}_n^{NL}}{\partial t^2}$$

$$\frac{d^2\left(A_3 e^{i(k_3 z-\omega_3 t)}+c.c.\right)}{dz^2} - \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_3)}{c^2}\frac{\partial^2\left(A_3 e^{i(k_3 z-\omega_3 t)}+c.c.\right)}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2\left(P_3 e^{-i\omega_3 t}+c.c.\right)}{\partial t^2}$$

$$\left[\frac{d\left(\frac{dA_3}{dz}e^{i(k_3 z-\omega_3 t)}+ik_3 A_3 e^{i(k_3 z-\omega_3 t)}\right)}{dz} - \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_3)}{c^2}\frac{\partial\left(-i\omega_3 A_3 e^{i(k_3 z-\omega_3 t)}\right)}{\partial t}\right] + c.c. = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial\left(-i\omega_3 P_3 e^{-i\omega_3 t}\right)}{\partial t} + c.c.$$

$$\left[\frac{d^2 A_3}{dz^2}e^{i(k_3 z-\omega_3 t)} + ik_3\frac{dA_3}{dz}e^{i(k_3 z-\omega_3 t)} + ik_3\frac{dA_3}{dz}e^{i(k_3 z-\omega_3 t)} + (ik_3)^2 A_3 e^{i(k_3 z-\omega_3 t)} - \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_3)}{c^2}(-i\omega_3)^2 A_3 e^{i(k_3 z-\omega_3 t)}\right]$$

$$+ c.c. = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}(-i\omega_3)^2 P_3 e^{-i\omega_3 t} + c.c.$$

$$\left[\frac{d^2 A_3}{dz^2} + 2ik_3\frac{dA_3}{dz} - k_3{}^2 A_3 + \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_3)}{c^2}\omega_3{}^2 A_3\right]e^{i(k_3 z-\omega_3 t)} + c.c. = -\frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\omega_3{}^2 P_3 e^{-i\omega_3 t} + c.c.$$

$$\left[\frac{d^2 A_3}{dz^2} + 2ik_3\frac{dA_3}{dz} - k_3{}^2 A_3 + \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_3)}{c^2}\omega_3{}^2 A_3\right]e^{i(k_3 z-\omega_3 t)} + c.c. = \frac{-4d_{eff}\omega_3{}^2}{c^2}A_1 A_2 e^{i[(k_1+k_2)z-\omega_3 t]} + c.c. \quad (1.4.7)$$

D'ailleurs, $k_3{}^2 = \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_3)}{c^2}\omega_3{}^2$, le troisième et le quatrième termes du côté gauche de l'équation s'annule. Également, nous pouvons retirer les complexes conjugués de chaque côté et nous gardons l'égalité. Finalement, nous enlevons le facteur exponentiel dépendant du temps de chaque côté et nous réécrivons l'équation :

$$\frac{d^2 A_3}{dz^2} + 2ik_3\frac{dA_3}{dz} = \frac{-4d_{eff}\omega_3{}^2}{c^2}A_1 A_2 e^{i[(k_1+k_2-k_3)z]} \quad (1.4.8)$$

Il est permis de négliger le premier terme du côté gauche de l'équation car celui-ci est beaucoup plus petit que le second terme. Cette approximation est valable lorsque l'approximation de l'amplitude qui varie que très peu est valide :

$$\left|\frac{d^2 A_3}{dz^2}\right| << \left|k_3 \frac{dA_3}{dz}\right| \tag{1.4.9}$$

Cette condition requière que la fraction changeante de A_3 dans une distance de l'ordre d'une longueur d'onde optique doit être beaucoup plus petite que l'unité. Lorsque cette approximation est faite, l'équation 1.4.8 devient :

$$\frac{dA_3}{dz} = \frac{2id_{eff}\omega_3^{\ 2}}{k_3 c^2} A_1 A_2 e^{i\Delta kz} \tag{1.4.10}$$

où nous introduisons la quantité :

$$\Delta k = k_1 + k_2 - k_3 \tag{1.4.11}$$

Cette quantité est appelé le vecteur d'accord de phase. L'équation 1.4.10 est connue comme l'équation de l'amplitude couplée, parce qu'elle montre l'amplitude de l'onde ω_3 varie par conséquence du couplage des ondes ω_1 et ω_2. En général, la variation spatiale des ondes ω_1 et ω_2 doit être prise en considération. Nous pouvons répéter la dérivation donnée plus haut pour chacune des fréquences ω_1 et ω_2, ce qui nous donne les équations :

$$\frac{dA_1}{dz} = \frac{2id_{eff}\omega_1^{\ 2}}{k_1 c^2} A_3 A_2^{\ *} e^{-i\Delta kz} \tag{1.4.12a}$$

$$\frac{dA_2}{dz} = \frac{2id_{eff}\omega_2^{\ 2}}{k_2 c^2} A_3 A_1^{\ *} e^{-i\Delta kz} \tag{1.4.12b}$$

Il est à noter qu'en écrivant ces équations sous cette forme, nous supposons que le système est sans perte. De cette façon, aucun terme « pertes » explicites n'a besoin d'être inclut dans ces équations et nous pouvons également utiliser la condition de symétrie-permutation pour conclure que le coefficient de couplage a la même valeur d_{eff} dans

chaque équation. Nous pouvons réécrire l'équation 1.4.10 de façon plus générale en termes de la variation lente d'amplitude p_3 de la polarisation non-linéaire :

$$\frac{dA_3}{dz} = \frac{i\omega_3}{2\varepsilon_0 n_3 c} e^{i\Delta kz} \tag{1.4.13}$$

1.5 Accord de phase

Pour simplifier, supposons que les amplitudes A_1 et A_2 des champs électromagnétiques incidents peuvent être constantes du côté droit de l'équation 1.4.10. Cette condition est valide quand la conversion des champs incidents vers le champ de somme de fréquences n'est pas trop grande. Notons pour le cas spécial :

$$\Delta k = 0 \tag{1.5.1}$$

L'amplitude A_3 de l'onde de la somme de fréquences augmente linéairement avec z, et par conséquent, cela augmente l'intensité quadratiquement avec z. La condition 1.5.1 est connue comme étant la condition de l'accord de phase parfait. Lorsque cette condition est satisfaite, l'onde générée maintient une relation de phase fixe avec la polarisation non-linéaire et peut extraire l'énergie le plus efficacement des ondes incidentes. D'un point de vu microscopique, quand la condition de l'équation 1.5.1 est satisfaite, les dipôles atomiques individuels que constitue le système matériel sont en phase, donc le champ émit par chaque dipôle s'additionne de manière cohérente dans la direction avant. La puissance totale irradiée par l'ensemble des dipôles atomiques est le carré du nombre d'atomes qui y participent.

Lorsque la condition de l'équation 1.5.1 n'est pas satisfaite, l'intensité de la radiation émise est plus petite que pour le cas où $\Delta k = 0$. L'amplitude du champ électromagnétique de la somme de fréquences au plan de sortie du milieu non-linéaire est donnée en intégrant l'équation 1.4.10 de z = 0 à z = L :

$$A_3(L) = \frac{2id_{eff}\omega_3{}^2 A_1 A_2}{k_3 c^2}\int_0^L e^{i\Delta kz}dz = \frac{2id_{eff}\omega_3{}^2 A_1 A_2}{k_3 c^2}\left(\frac{e^{i\Delta kz}-1}{i\Delta k}\right) \qquad (1.5.2)$$

L'intensité de l'onde ω_3 est donnée par la magnitude du vecteur de Poynting, qui, pour notre définition de l'amplitude du champ, est donné par :

$$I_i = 2n_i\varepsilon_0 c|A_i|^2, \qquad i = 1, 2, 3 \qquad (1.5.3)$$

Nous obtenons donc :

$$I_3 = 2n_3\varepsilon_0 c\left[\frac{2id_{eff}\omega_3{}^2 A_1 A_2}{k_3 c^2}\left(\frac{e^{i\Delta kz}-1}{i\Delta k}\right)\right]^2 = 2n_3\varepsilon_0 c\frac{4id_{eff}{}^2\omega_3{}^4|A_1|^2|A_2|^2}{k_3{}^2 c^4}\left(\frac{e^{i\Delta kz}-1}{i\Delta k}\right)^2$$

$$I_3 = \frac{8d_{eff}{}^2 n_3\varepsilon_0\omega_3{}^4|A_1|^2|A_2|^2}{k_3{}^2 c^3}\left|\frac{e^{i\Delta kz}-1}{\Delta k}\right|^2 \qquad (1.5.4)$$

Pour le terme quadratique qui apparaît dans l'équation, il peut être exprimé comme :

$$\left|\frac{e^{i\Delta kz}-1}{\Delta k}\right|^2 = L^2\left(\frac{e^{i\Delta kz}-1}{\Delta kL}\right)\left(\frac{e^{-i\Delta kz}-1}{\Delta kL}\right) = 2L^2\frac{(1-\cos\Delta kL)}{(\Delta kL)^2} = L^2\frac{\sin^2(\Delta kL/2)}{(\Delta kL/2)^2}$$

$$\left|\frac{e^{i\Delta kz}-1}{\Delta k}\right|^2 = L^2\mathrm{sinc}^2(\Delta kL/2) \qquad (1.5.5)$$

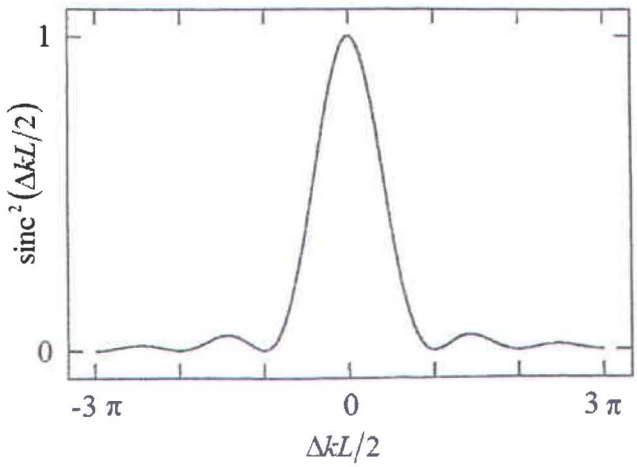


Figure 1.4 – Effet du vecteur d'accord de phase sur l'efficacité de la somme de fréquences

Finalement, notre expression pour I_3 peut être écrite en termes des intensités des champs incidents en utilisant les équations 1.5.3 pour exprimer $|A_i|^2$ en termes des intensités, ce qui nous donne :

$$I_1 = 2n_1\varepsilon_0 c|A_1|^2 \rightarrow |A_1|^2 = \frac{I_1}{2n_1\varepsilon_0 c}; \qquad k_3{}^2 = \frac{n_3{}^2\omega_3{}^2}{c^2} \quad ;$$

$$I_2 = 2n_i\varepsilon_0 c|A_2|^2 \rightarrow |A_2|^2 = \frac{I_2}{2n_2\varepsilon_0 c}$$

$$I_3 = \frac{8d_{eff}{}^2 n_3\varepsilon_0\omega_3{}^4|A_1|^2|A_2|^2}{k_3{}^2c^3}L^2\sin c^2(\Delta kL/2) = \frac{c^2 8d_{eff}{}^2 n_3\varepsilon_0\omega_3{}^4 I_1 I_2}{n_3{}^2\omega_3{}^2c^3(2n_1\varepsilon_0 c)(2n_2\varepsilon_0 c)}L^2\mathrm{sinc}^2(\Delta kL/2)$$

$$I_3 = \frac{2d_{eff}{}^2\omega_3{}^2 I_1 I_2}{n_3c^3\varepsilon_0 n_1 n_2}L^2\mathrm{sinc}^2(\Delta kL/2) \qquad (1.5.6)$$

Il est à noter que l'effet du vecteur d'accord de phase est inclut totalement dans le facteur $\mathrm{sinc}^2(\Delta kL/2)$. Nous devons noter que l'efficacité d'un procédé de 3 ondes diminue lorsque le terme $\Delta k\,L$ augmente, avec certaines oscillations qui peuvent se produire. La raison est que si L est beaucoup plus grand que l'approximation de $1/\Delta k$,

l'onde sortante peut sortir facilement de la phase avec sa propre polarisation, la puissance est donc portée à être transférée de l'onde ω_3 aux ondes ω_1 et ω_2. Pour cette raison, nous définissons :

$$L_{coh} = 2/\Delta k \tag{1.5.7}$$

Cette équation représente la longueur de cohérence. L'interaction avec l'accord de phase peut s'écrire :

$$\mathrm{sinc}^2(L/L_{coh}) \tag{1.5.8}$$

1.6 La phase de Gouy

L'anomalie de la phase de Gouy [29, 30] se définie comme étant la quantification du déphasage entre l'onde focalisée et une onde plane se propageant avec les mêmes conditions, soient le même indice de réfraction du milieu, la même direction de propagation et la même longueur d'onde. Alors, cela réduit la composante axiale du vecteur d'onde k dans la direction de propagation due à la dispersion de ses composantes transverses afin de conserver la quantité de mouvement de k. En microscopie, la phase de Gouy joue un rôle important car c'est un déphasage de π sur la longueur d'interaction. Ce déphasage s'ajoute à $\Delta k L$ et c'est pour cette raison qu'il n'y pas, entre autre, de seconde harmonique dans un milieu homogène en χ^2 [31]. De plus, c'est pour cette même raison que le signal de troisième harmonique est nul dans un milieu homogène en $\chi^{(1)}$ et $\chi^{(3)}$ [7, 32]. Évidemment, pour cette technique, cette anomalie fait en sorte que ce qui est généré avant le focus interfère destructivement avec ce qui est généré après le focus. La troisième harmonique peut être utilisée pour imager les interfaces et les objets dont la taille est près de la longueur d'onde [7]. Pour ce qui est de la phase de Gouy pour l'imagerie CARS [33], nous y reviendrons à la section 2.7 où nous traitons de la génération du signal anti-Stokes et de l'accord de phase. La **Figure 1.5** présente la phase de Gouy. Il est à noter que Boyd [34] a interprétée celle-ci en termes géométriques et

Feng et *al.* [35] ont dévoilé que cette phase de Gouy découle du confinement du champ au voisinage du point de focalisation. L'anomalie de phase ϕ_g est une fonction qui dépend de la distance de propagation z [34]. Il est à noté que z_R est la distance de Rayleigh du faisceau focalisé :

$$\phi_g(z) = -\arctan\left(\frac{z}{z_R}\right) \tag{1.6.1}$$

Si nous prenons l'équation 1.6.1 entre deux points séparés par une distance L par rapport au point de focalisation du faisceau, nous obtenons :

$$\Delta\phi_g(L) = -2\arctan\left(\frac{L}{-2z_R}\right) \tag{1.6.2}$$

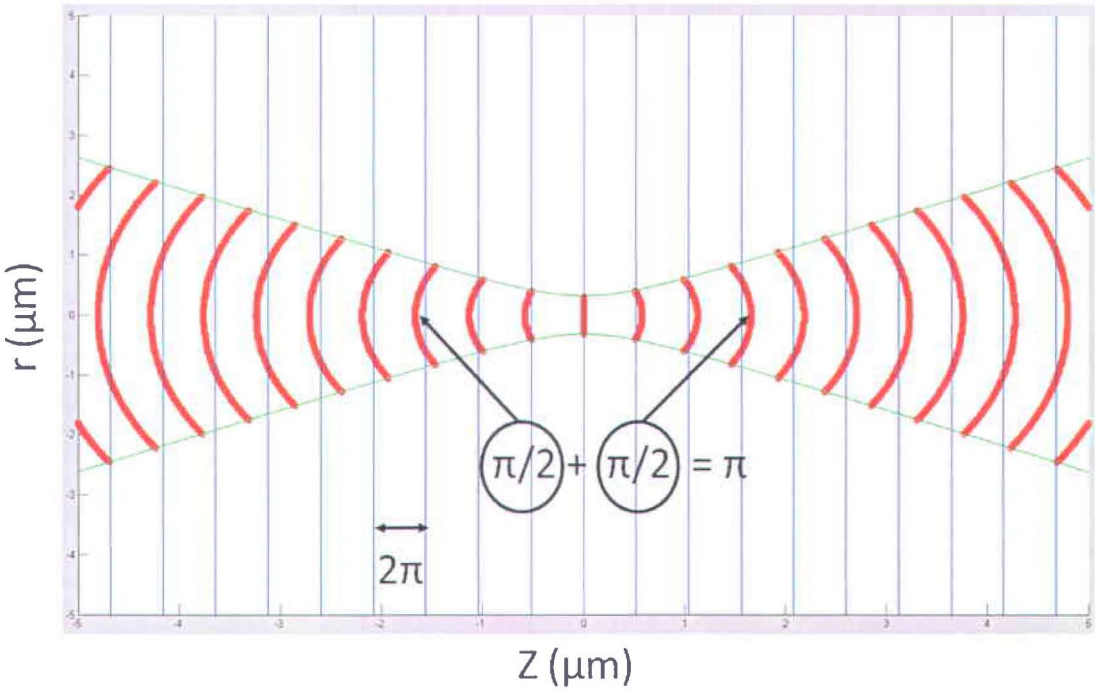


Figure 1.5 – Représentation visuelle de la phase de Gouy

CHAPITRE 2
GÉNÉRATION DU SIGNAL CARS

2.1 Diffusion Raman

Toutes les liaisons chimiques possèdent des fréquences de vibration qui leur sont propres. Les modes vibrationnels possèdent une énergie propre quantifiée. Nous pouvons utiliser l'interaction lumière/matière pour obtenir des informations sur ces vibrations moléculaires. Découverte en 1928, la diffusion Raman [36] permet d'utiliser la lumière pour accéder au spectre vibrationnel des molécules. C.V. Raman et K.S. Krishnan ont focalisé la lumière solaire dans diverses substances moléculaires liquides à travers un télescope. Ils purent mettre en évidence un phénomène de diffusion inélastique : Un décalage de fréquences a pu être observé entre les photons incidents et certains photons diffusés. Ce décalage est appelé « décalage Raman ». Nous parlons ici de diffusion inélastique lorsque l'énergie de la lumière incidente est différente de l'énergie de la lumière diffusée. À l'inverse, une diffusion élastique est lorsque la lumière incidente est à la même pulsation que la lumière diffusée.

Dans un processus de diffusion Raman, une onde pompe (onde lumineuse qui éclaire l'échantillon) de pulsation ω_P incidente sur une molécule est diffusée inélastiquement en une onde dite Stokes de pulsation ω_S et une onde dite anti-Stokes de pulsation ω_{AS}. Il est à noter que la pulsation est définie comme étant $\omega = 2\pi\nu = \frac{2\pi c}{\lambda}$ où ν est la fréquence de l'onde lumineuse et λ sa longueur d'onde. L'interaction de l'onde pompe avec l'échantillon va révéler des informations sur la nature moléculaire de celui-ci. Pour le processus Stokes, l'énergie est perdue par la lumière diffusée tandis que pour le processus anti-Stokes, l'énergie est gagnée par la lumière diffusée.

Sur la **Figure 2.1**, le premier cas démontre la molécule qui passe de son niveau fondamental (V=0) à un niveau vibrationnel (V=1) en prenant de l'énergie au photon et dans le second cas, la molécule passe d'un niveau vibrationnel (V=1) à un niveau fondamental (V=0). L'écart en fréquence entre les ondes générées et l'onde pompe dépend de la pulsation vibrationnelle moléculaire (pulsation Ω_R associé à une vibration moléculaire) de telle sorte que $\omega_P - \omega_S = \omega_{AS} - \omega_P = \Omega_R$.

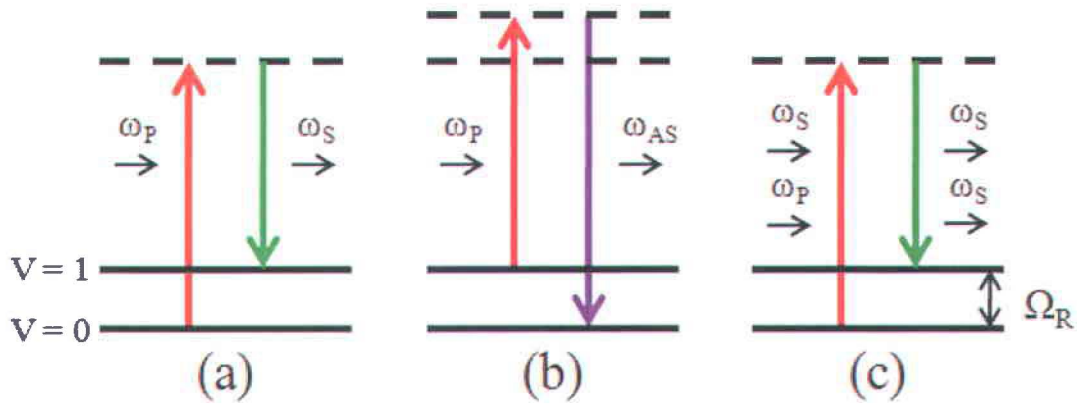


Figure 2.1 – Mécanismes de diffusion Raman. **(a)** Diffusion Stokes spontanée. **(b)** Diffusion anti-Stokes spontanée. **(c)** Diffusion Raman stimulée observé en 1962 par Eckhardt et al. [37]. Le niveau V = 0 est le niveau fondamental et le niveau V = 1 est le premier état vibrationnel excité (de pulsation vibrationnel Ω_R). Également, ω_P, ω_S et ω_{AS} sont les pulsations des ondes « pompe », « Stokes » et « anti-Stokes » mises en jeu dans ces processus de diffusion. Les lignes pleines représentent des états réels de la molécule et les lignes hachées représentent des états virtuels [38] (*virtuals states*).

Le processus engendrant l'onde anti-Stokes est beaucoup moins probable que le processus créant l'onde Stokes étant donné que le niveau fondamental est toujours beaucoup plus peuplé que les niveaux excités à la température de la pièce. Le nombre de photons diffusés par le processus Raman est faible dû à une très faible section efficace de diffusion.

2.2 Microscopie CARS

En 1965, P.D. Maker et R.W. Terhune [39] étudièrent les effets non-linéaires du 3e ordre. Un de ces effets est décrit comme suit : Lorsque deux faisceaux monochromatiques et cohérents de fréquences respectives ν et ν-Δ interagissent dans un milieu matériel, un signal cohérent de fréquence ν+Δ est généré. Ce signal est exalté lorsque le milieu en question possède un mode Raman actif à la fréquence Δ. Les pulsations Ω_R, ω_P, ω_S et ω_{AS} correspondent respectivement aux fréquences Δ, ν, ν-Δ, ν+Δ. La microscopie CARS consiste à forcer l'excitation d'une vibration spécifique par différence de fréquences. Cette technique est un processus à quatre ondes de pulsations différentes, soient ω_P, ω_S, ω_P et ω_{AS}.

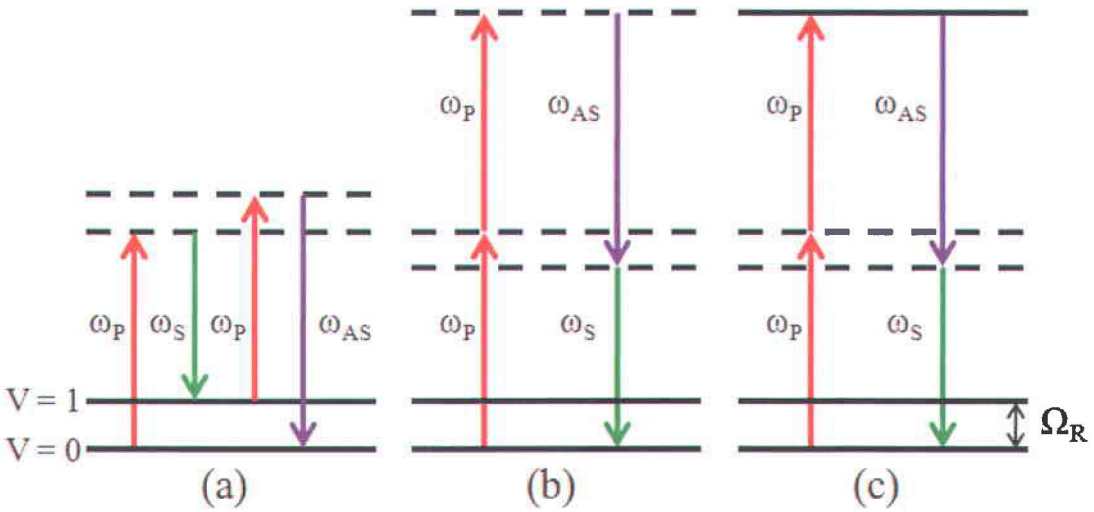


Figure 2.2 – Diagramme des niveaux vibrationnels en microscopie CARS. **(a)** Diffusion CARS résonante. **(b)** Diffusion CARS non-résonante. **(c)** Diffusion CARS non-résonante exaltée électroniquement. Les pulsations des ondes « pompe », « Stokes » et « anti-Stokes » mises en jeu dans ces processus de diffusion sont respectivement ω_P, ω_S et ω_{AS}. Les lignes pleines représentent des états réels de la molécule et les lignes hachées représentent des états virtuels (*virtuals states*). Il est à noter que le signal est optimisé en ajustant la différence de fréquences entre ω_P et ω_S à Ω_R.

Le processus de diffusion Raman spontanée est beaucoup moins efficace que les processus CARS car dans celle-ci, l'excitation de la vibration moléculaire est forcée par différence de fréquences. Également, il est possible de cibler la vibration d'intérêt en ajustant la différence de fréquences ω_P-ω_S.

2.3 CARS vu dans les domaines spectral et temporel

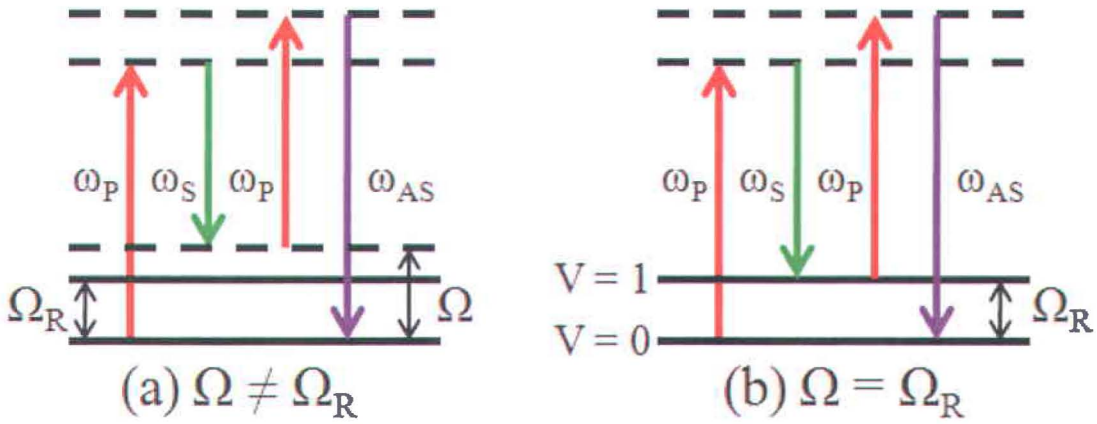


Figure 2.3 – Exaltation du signal anti-Stokes par excitation d'un mode vibrationnel (de pulsation Ω_R). **(a)** Lorsque la différence des pulsations $\Omega = \omega_P$-ω_S n'égale pas Ω_R, nous sommes dans le cas non-résonant, le signal anti-Stokes est donc généré avec une certaine intensité. **(b)** Lorsque $\Omega = \Omega_R$, le système est porté à résonance et le signal anti-Stokes est exalté.

1^{ière} Étape : Les faisceaux aux pulsations ω_P et ω_S produisent une superposition cohérente d'états vibrationnels par diffusion Raman stimulée. Dans le domaine temporel, la superposition de ces deux faisceaux donne lieu à une modulation du champ caractérisée par une porteuse et son enveloppe. L'enveloppe oscille à la pulsation $\Omega = \omega_P - \omega_S$, donc à la pulsation de la vibration Ω_R.

2ième Étape : Un troisième faisceau à la pulsation ω_P sonde la cohérence vibrationnelle par diffusion anti-Stokes.

Sous cet ensemble, la technique CARS est en quelque sorte un montage pompe-sonde et le signal anti-Stokes procurent des informations basées sur le contraste spectroscopique Raman. En considérant des champs pompe et Stokes monochromatiques, seul le niveau vibrationnel de pulsation Ω_R est peuplé lorsque $\omega_P - \omega_S = \Omega_R$. En effet, si nous considérons la largeur spectrale des champs excitateurs, le train d'impulsions induit possède, dans le domaine temporel, une durée finie qui conduit dans le domaine spectral à un élargissement de l'excitation. Donc, il est possible d'exciter des modes à des pulsations autres que Ω_R. En conséquence, il faut limiter la bande spectrale des impulsions à la largeur spectrale du mode vibrationnel. Pour ce qui est de la vibration symétrique CH_2, la largeur spectrale optimale pour la microscopie CARS correspond à des impulsions picosecondes limitées par transformée de Fourier [3].

2.4 Polarisation induite

Dans la diffusion CARS, la polarisation non-linéaire induite est de 3ième ordre ($P^{(3)}$) oscillant à la pulsation ω_{AS}. Celle-ci est provoquée par les champs électromagnétiques excitateurs pompe E_p et Stokes E_s de pulsations ω_P et ω_S et ce, en chaque point r de l'espace. Évidemment, cette polarisation induite est également responsable de l'émission d'un champ électromagnétique anti-Stokes E_{AS} oscillant à la pulsation ω_{AS}. La formule qui suit en témoigne :

$$\vec{P}^{(3)}(\vec{r},-\omega_{as}) = \chi^{(3)}(\vec{r};-\omega_{as};\omega_p,\omega_p,-\omega_s)\vec{E}_p(\vec{r},\omega_p)\vec{E}_p(\vec{r},\omega_p)\vec{E}_s^*(\vec{r},-\omega_s) \quad (2.4)$$

Comme nous avons vu à la **Figure 2.2**, les pulsations Stokes et anti-Stokes correspondent à une émission (signe -) et les pulsations pompes correspondent à une absorption (signe +). Le terme $\chi^{(3)}$ est le tenseur de 3e ordre qui prend en compte l'interaction entre les champs électromagnétiques pompe et Stokes et le milieu non-linéaire où est généré l'anti-Stokes. Il est à noter que l'opérateur * représente le complexe conjugué.

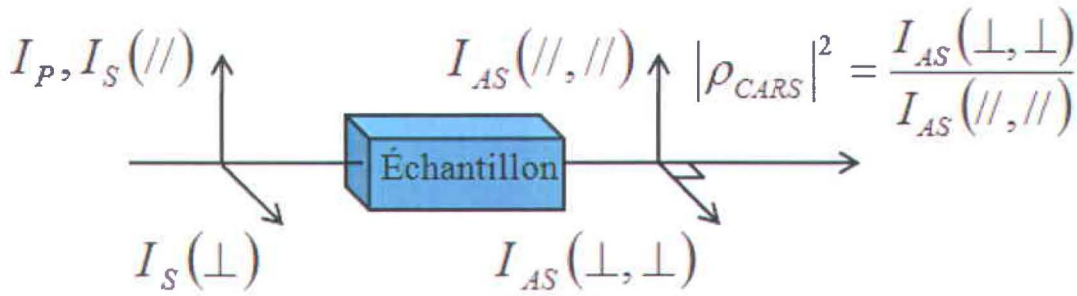


Figure 2.4 – Visualisation de la polarisation induite.

La **Figure 2.4** [40] démontre la définition du coefficient de dépolarisation CARS. Les intensités I_s (//) et I_s (⊥) correspondent respectivement aux intensités du faisceau Stokes parallèle et perpendiculaire à la polarisation du champ pompe (I_p). Les intensités I_{as} (//, //) et I_{as} (⊥, ⊥) correspondent tant qu'à elles aux intensités associées au champ électromagnétique anti-Stokes lorsque celui-ci est respectivement parallèle et perpendiculaire au champ pompe. Autrement dit, le faisceau anti-Stokes est parallèle au champ pompe lorsque le faisceau Stokes est lui aussi parallèle au champ pompe et est perpendiculaire lorsque le faisceau Stokes est également perpendiculaire au champ pompe.

2.5 Comportement du tenseur χ^3

Dans un système à quatre niveaux, l'expression du tenseur $\chi^{(3)}$ dans le domaine spectral est donnée par une somme de 48 termes [41]. Si la seule transition à deux photons possible est celle entre le niveau fondamental (V = 0) et le niveau vibrationnel (V = 1) par diffusion Raman stimulée et s'il n'y a aucune transition à un photon autorisée aux pulsations ω_P et ω_S, nous pouvons alors séparer le terme qui prend en compte la résonance due à la différence de fréquences ($\chi_R^{(3)}$) des termes qui ont une dépendance spectrale lente ($\chi_{NR}^{(3)}$) [42, 43]. Nous avons donc :

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)} \qquad (2.5.1)$$

Le tenseur $\chi^{(3)}$ peut être décomposé en deux parties, une réelle et une imaginaire. La partie réelle est liée à l'indice de réfraction tandis que la partie imaginaire est liée à l'absorption et a une forme lorentzienne. Alors, le terme résonant, possédant une dépendance spectrale lorentzienne, peut être identifié par :

$$\chi_R^{(3)} = \frac{a}{(\omega_p - \omega_s - \Omega_R) + i\Gamma} = \frac{a}{(\delta\omega - \Omega_R) + i\Gamma} \tag{2.5.2}$$

Nous observons facilement que lorsque $\delta\omega = \omega_p - \omega_s = \Omega_R$, ce terme résonant devient maximal. D'ailleurs, Ω_R est la fréquence vibrationnelle, i est le nombre imaginaire et Γ est la mi-largeur à mi-hauteur de la raie Raman. Le terme a est un nombre négatif qui varie lentement par rapport au dénominateur, aussi appelé « force d'oscillateur ». Il est à noter que le terme résonant traduit autant la réponse électronique instantanée du milieu que les queues spectrales de résonances éloignées spectralement. Celui-ci peut être considéré comme réel et constant [42, 43].

Nous savons que l'intensité anti-Stokes est donnée par :

$$I_{as}(\vec{r}) \propto \left|\vec{E}_{as}(\vec{r})\right|^2 \tag{2.5.3}$$

Sachant qu'en un point $\vec{r}$ de l'espace, il existe une relation linéaire entre le champ anti-Stokes $\vec{E}_{as}$ et la polarisation non-linéaire induite $\vec{P}^{(3)}$, nous pouvons donc écrire :

$$I_{as}(\vec{r}) \propto \left|\vec{P}^{(3)}(\vec{r})\right|^2 \tag{2.5.4}$$

En effet, d'après l'équation que nous avons obtenue plus haut, nous savons que la polarisation est proportionnelle au tenseur $\chi^{(3)}$, ce qui nous donne :

$$I_{as}(\vec{r}) \propto \left|\chi^{(3)}(\vec{r})\right|^2 \tag{2.5.5}$$

2.6 Intensité anti-Stokes totale

Ayant vu que l'intensité est proportionnelle au carré du tenseur à l'équation 2.5.5, nous pouvons constater que l'intensité anti-Stokes totale sera proportionnelle à trois termes : Un résonant, un non-résonant et un hétérodyne [44] (résonant et non-résonant). Nous obtenons donc [40] :

$$I_{as}(\vec{r}) \propto \left|\chi^{(3)}(\vec{r})\right|^2 = \left|\chi_R^{(3)}(\vec{r}) + \chi_{NR}^{(3)}(\vec{r})\right|^2 = \left|\chi_R^{(3)}(\vec{r})\right|^2 + 2\Re\left[\chi_R^{(3)}(\vec{r})\chi_{NR}^{(3)*}(\vec{r})\right] + \left|\chi_{NR}^{(3)}(\vec{r})\right|^2$$

$$I_{as}(\vec{r}) \propto \left|\chi_R^{(3)}(\vec{r})\right|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)}(\vec{r})\Re\left[\chi_R^{(3)}(\vec{r})\right] + \left|\chi_{NR}^{(3)}(\vec{r})\right|^2 \tag{2.6.1}$$

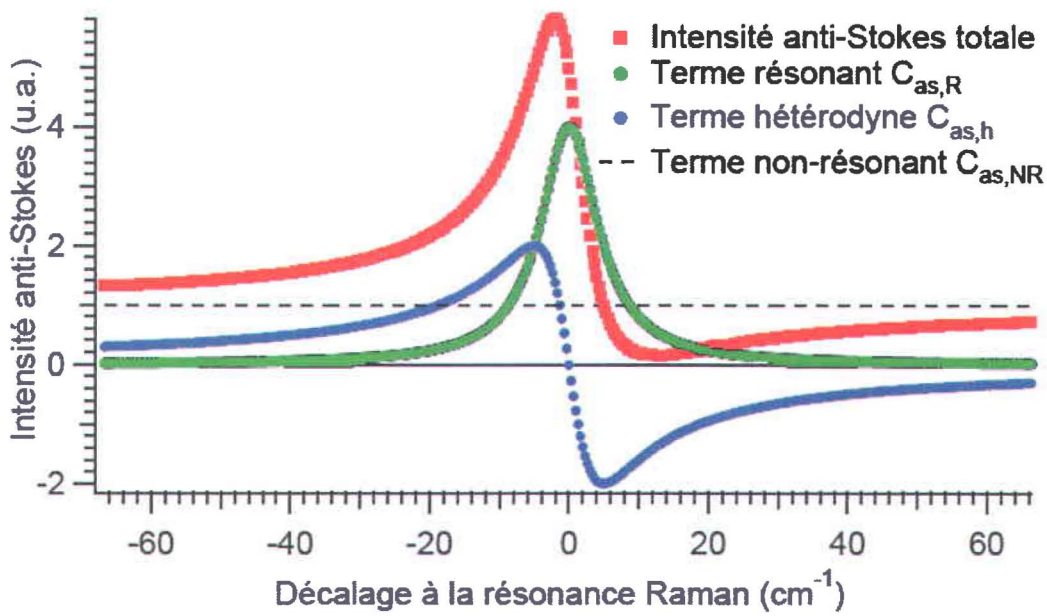


Figure 2.5 – Représentation visuelle de la décomposition de l'intensité anti-Stokes totale

D'après la **Figure 2.5**, nous observons que le terme résonant est celui qui possède toute l'information spectrale (relié au spectre Raman) sur le mode vibrationnel étudié. Ce signal CARS est proportionnel au carré du nombre de molécules qui vibre à ce mode

vibrationnel. Nous pouvons constater que le terme non-résonant est spectralement constant et ne contient donc aucune information spectrale. Enfin, le terme hétérodyne est proportionnel à la partie réelle du terme résonant vu que le terme non-résonant est lui-même réel.

Alors, en plus du signal résonant, nous obtenons toujours une contribution non-résonante. Comme nous pouvons l'observer à la **Figure 2.6** [9], la contribution non-résonante du signal augmente quadratiquement avec la largeur spectrale de l'impulsion lorsque celle-ci est limitée par transformée de Fourier (voir la courbe *nonresonant* de la figure 2.6(a)). Il est à noter que $2\Gamma_R = 10\ cm^{-1}$ pour la figure suivante.

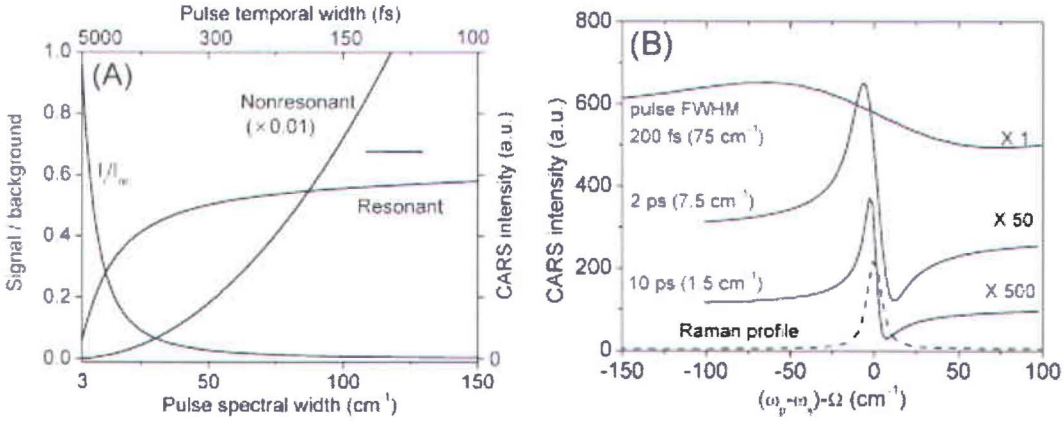


Figure 2.6 – (A) Signal CARS résonant et non-résonant et le ratio de ces signaux en fonction de la largeur spectrale de l'impulsion. (B) Profil spectral CARS en fonction de la largeur spectrale des impulsions.

Quant au signal résonant, il croit également avec l'inverse de la durée de l'impulsion mais sature lorsque la largeur spectrale de celle-ci devient plus large que la largeur spectrale du mode vibrationnel (Γ_R) (voir la courbe *resonant* de la figure 2.6(a)). Ce comportement se traduit par une décroissance du rapport entre le signal résonant et le signal non résonant lorsque la largeur spectrale des impulsions augmente. Donc, plus l'impulsion est courte, plus le signal non-résonant devient élevé et important vis-à-vis le signal résonant. Par exemple, si nous avons une impulsion de l'ordre de la centaine de femtosecondes, la contribution non-résonante est beaucoup trop grande pour obtenir un

contraste adéquat entre le signal résonant et non-résonant. Ainsi, il faut être capable d'obtenir un ratio optimal entre le signal résonant et non-résonant afin d'obtenir un contraste spectroscopie en microscopie CARS et augmenter le ratio du signal de la contribution résonante sur le signal de la contribution non-résonante, incluant les contributions du terme hétérodyne. Le meilleur compromis entre intensité du signal CARS et contraste spectroscopique est alors obtenu avec des impulsions ayant une durée de l'ordre de la picoseconde dans la limite de Fourier [3].

2.7 Génération du signal anti-Stokes et accord de phase

Le signal anti-Stokes obtenu par l'interaction des faisceaux lasers pompe et Stokes avec l'échantillon est la somme cohérente des champs électromagnétiques anti-Stokes en chaque point du volume focal. Lorsque tous ces champs électromagnétiques agissant sur le système sont en phase, leur interférence est constructive et le signal généré est maximal. Afin d'obtenir ce résultat, il faut que le champ anti-Stokes soit en phase avec les polarisations non-linéaires induites, qui elles sont directement reliées aux champs excitateurs pompes et Stokes. Nous appelons la condition d'accord de phase lorsque l'onde anti-Stokes générée est en phase avec la résultante des champs pompe et Stokes, soit lorsque l'interférence est constructive [45]. Cet accord de phase s'écrit :

$$\Delta\vec{k} = \vec{k}_{as} - \left(2\vec{k}_p - \vec{k}_s\right) \tag{2.7.1}$$

De cette formule, $\vec{k}_p$, $\vec{k}_s$ et $\vec{k}_{as}$ sont les vecteurs d'onde respectivement associées aux champs pompe, Stokes et anti-Stokes. D'ailleurs, ceux-ci s'écrivent :

$$\vec{k}_p = \frac{n(\omega_p)\omega_p}{c}\vec{u}_p, \vec{k}_s = \frac{n(\omega_s)\omega_s}{c}\vec{u}_s, \vec{k}_{as} = \frac{n(\omega_{as})\omega_{as}}{c}\vec{u}_{as} \tag{2.7.2}$$

De fait, $\vec{u}_p$, $\vec{u}_s$ et $\vec{u}_{as}$ sont des vecteurs unitaires. À cause de la dispersion du milieu ($n(\omega_p) \neq n(\omega_s) \neq n(\omega_{as})$), la condition d'accord de phase est rarement satisfaite.

Si l'onde anti-Stokes se propage dans la même direction que les champs pompe et Stokes, nous avons une génération avant (Fwd-CARS). Ce désaccord de phase est dû à la dispersion du matériau, soit Δk_{Fwd} :

$$\Delta k_{Fwd} = k_{as,Fwd} - (2k_p - k_s) \tag{2.7.3}$$

À l'inverse, si l'onde anti-Stokes se propage en sens contraire des ondes pompe et Stokes, nous parlons ici d'une génération arrière (Epi-CARS). Celle-ci a pour expression :

$$\begin{aligned}
\Delta k_{Epi} &= k_{as,Epi} - (2k_p - k_s) \\
\Delta k_{Epi} &= -k_{as,Fwd} - (2k_p - k_s) \\
\Delta k_{Epi} &= \Delta k_{Fwd} - 2k_{as,Fwd} \\
\Delta k_{Epi} &= \Delta k_{Fwd} + 2k_{as,Epi}
\end{aligned} \tag{2.7.4}$$

Comme vu à l'équation 1.5.6, lorsque la longueur L du matériau en question est prise en compte, le signal anti-Stokes généré, en fonction du désaccord de phase Δk, est donné par l'expression :

$$I_{as}(\Delta k) \propto L^2 \frac{\sin^2(\Delta kL/2)}{(\Delta kL/2)^2} \tag{2.7.5}$$

Nous observons alors que le signal anti-Stokes n'est efficacement généré que si :

$$\Delta kL/2 << \pi \tag{2.7.6}$$

Lorsque L est beaucoup plus petit que les longueurs d'ondes utilisées, l'accord de phase est satisfait en Fwd et en Epi-CARS. De plus, ils sont égaux en intensité. Toutefois, plus L augmente, plus le signal Fwd augmente par rapport à celui mesuré en Epi en raison d'un accord de phase fortement défavorable pour cette dernière direction [46]. À

l'aide des équations 2.7.2, 2.7.3, 2.7.4 et 2.7.6 nous pouvons calculer Δk pour la silice en assumant $\lambda_p = 816$ nm, $\lambda_s = 1064$ nm, $\lambda_{as} = 1/(2/816 - 1/1064) = 661.75$ nm et calculant l'indice de réfraction à l'aide de l'équation de Sellmeier, ce qui nous donne $\Delta k_{Fwd} \approx 0.15$ μm^{-1} en Fwd et $\Delta k_{Epi} = 23.56$ μm^{-1} en Epi. Nous obtenons que $L_{Fwd} \approx 42.26$ µm et $L_{Epi} \approx 0.27$ µm. La microscopie Epi-CARS permet donc d'imager les très petites structures émettant du signal CARS dans un échantillon tandis que la microscopie Fwd-CARS permet d'imager les structures continues dans le volume focal [46]. Il est à noter qu'en microscopie CARS, malgré que Δk ne soit pas égal à zéro, nous avons que L est petit et de l'ordre du micron alors ΔkL en Fwd est presque nul.

Comme nous avons pu voir à la **Figure 2.2** dans le diagramme des niveaux vibrationnels en microscopie CARS, ω_P, ω_S et ω_{AS} sont les pulsations des ondes « pompe », « Stokes » et « anti-Stokes » mises en jeu dans ces processus de diffusion. Également, à la section 1.6, nous avons vu que la phase de Gouy se définie comme étant la quantification du déphasage entre l'onde focalisée et une onde plane se propageant avec les mêmes conditions. Pour ce qui est de la phase de Gouy pour l'imagerie CARS [33], nous pouvons obtenir les pulsations $\omega_p - \omega_s + \omega_p$, ce qui nous donne les phases respectives $\varphi_p - \varphi_s + \varphi_p$, et enfin, chacune de ces phases inclut la phase de Gouy, ce qui nous donne $\varphi_g - \varphi_g + \varphi_g$ où φ_g est la phase de Gouy. Alors, $\varphi_g - \varphi_g + \varphi_g = \varphi_g$. Cela a comme conséquence que, dans la direction vers l'avant (Fwd), le signal CARS généré avant le point focal n'interfère pas de manière destructive avec le signal CARS généré après le point focal, comme c'est le cas pour la seconde harmonique et la troisième harmonique [7, 31, 32].

CHAPITRE 3
MISE EN OEUVRE

3.1 Suppression du signal non-résonant

La principale limitation de la microscopie CARS est la contribution non-résonante qui ne peut être simplement soustraite. Comme approche, nous pouvons essayer de réduire ce signal ou tout simplement augmenter le signal résonant par rapport à ce signal pour ainsi avoir une image CARS avec le meilleur contraste spectroscopique. Les techniques suivantes (sections 3.1.1 à 3.1.3) sont utilisées pour minimiser l'impact de la contribution non-résonante et d'obtenir une image avec un contraste spectroscopique.

3.1.1 P-CARS

La première approche utilise la détection par sensibilité de polarisation (P-CARS). Celle-ci consiste à imposer un angle différent entre les polarisations des faisceaux pompe et Stokes. Ces polarisations étant linéaires, les contributions résonante et non-résonante du signal anti-Stokes sont donc polarisées dans deux directions différentes [47]. Ainsi, il est possible de supprimer la contribution non-résonante et d'isoler la contribution résonante qui procure le contraste d'imagerie spectroscopique. Plusieurs chercheurs ont initié cette approche en spectroscopie Raman [48, 49] et enfin en microscopie CARS [47, 50]. Nous pouvons visualiser les vecteurs de polarisation à la **Figure 3.1** [47].

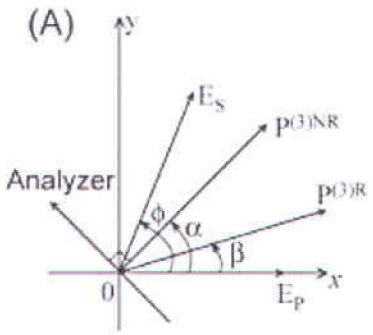


Figure 3.1 – Représentation visuelle des vecteurs de polarisation du faisceau pompe (E_p), du faisceau Stokes (E_s), du signal résonant ($P^{(3)R}$) et du signal non-résonant ($P^{(3)NR}$)

3.1.2 T-CARS

La deuxième technique, connue sous le nom de T-CARS (*Temporal CARS*), consiste à introduire un délai entre les impulsions. Ce délai est inférieur au temps de déphasage de la cohérence vibrationnelle introduite par l'interaction non-linéaire entre les molécules et les faisceaux ω_P et ω_S. Ainsi, le délai entre la première impulsion pompe et la seconde impulsion pompe fait en sorte que cette dernière sonde seulement la cohérence vibrationnelle ce qui supprime complètement la contribution non-résonante au signal CARS [51, 52].

3.1.3 FM-CARS

Une autre technique permettant de supprimer la contribution non-résonante est la microscopie CARS par modulation de fréquences (FM-CARS) [53]. À l'aide de cette technique, il faut utiliser une détection synchrone afin de mesurer l'effet de la modulation de la fréquence. Alors, avec une alternance entre deux fréquences selon un intervalle de temps bien défini, les deux fréquences sélectionnées permettent de distinguer si il y a ou non une contribution résonante au signal CARS. La **Figure 3.2** représente visuellement l'effet de la modulation de fréquences près d'une résonance vibrationnelle [53].

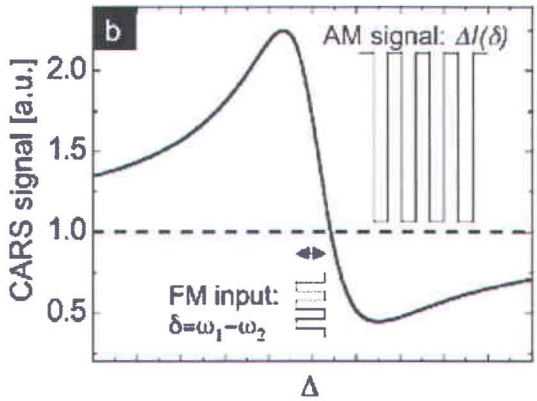


Figure 3.2 – Signal CARS en fonction de la fréquence. Une différence de fréquence (δ) est induite créant ainsi une modulation de l'amplitude du signal (Δl(δ)) seulement s'il y a une contribution vibrationnelle au signal CARS.

3.1.4 Perspectives futures au projet

Avec le montage que nous avons développé, nous pourrions utiliser les techniques P-CARS et FM-CARS. Toutefois, la technique P-CARS est limité en raison de la grande perte de photons dû à l'utilisation du polariseur [47]. La perspective future sera de modifier le filtre d'amplitude, soit la fente de celui-ci, afin d'optimiser le montage et de pouvoir réaliser la microscopie CARS par modulation de fréquences.

3.2 Oscillateurs lasers et électronique de synchronisation

3.2.1 Cavité optique Millennia

La cavité optique du *Millennia*® (de Spectra-Physics) utilise une cavité-X résonante, voir la **Figure 3.3**. Dans cette conception, la sortie de la fibre couplée de 1 ou 2 modules de diodes est utilisée pour pompé le cristal Nd : YVO_4. Celui-ci absorbe la lumière de la diode laser et émet son propre faisceau de lumière à 1064 nm, qui est confiné dans la cavité *Millennia*®.

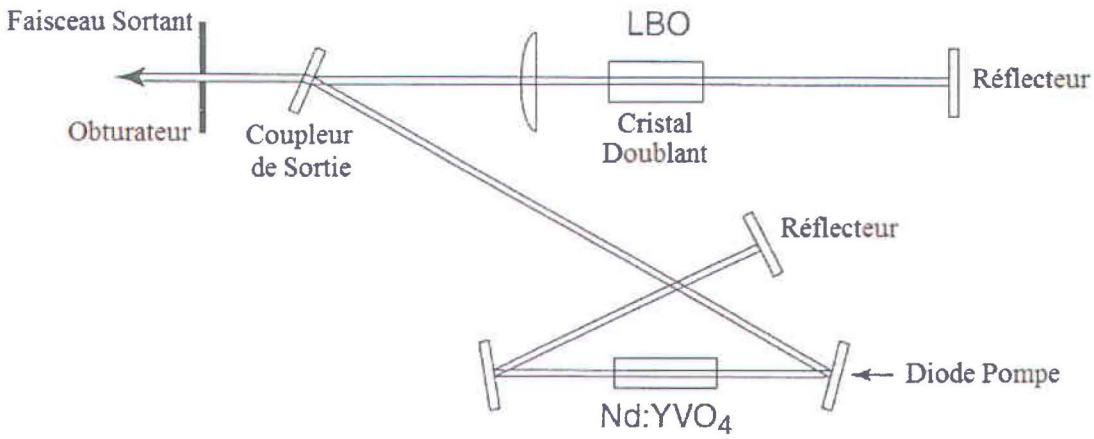


Figure 3.3 – Trajet optique du *Millennia® Pro series* utilisé. Dans ce système, le double de la fréquence converti la lumière 1064 nm du cristal laser à une lumière verte de 532 nm, ce qui devient notre sortie du laser.

3.2.2 Oscillateur laser Titane: Saphir

Cet oscillateur, le *Tsunami®* (de Spectra-Physics), est un laser accordable qui émet de la lumière dans la gamme de 690 nm à 1080 nm. Cette cavité est composée principalement d'un cristal Titane: Saphir (Al_2O_3) pompé par un *Millennia® Pro series*. Il est à noter que celui-ci est utilisée comme étant l'énergie pompe pour le système, soit un laser à l'état solide pompé par diode (*Diode Pumped Solid-State*).

L'ion titane Ti^{3+} est responsable pour l'action du laser Titane: Saphir. Le matériel produit vient de l'introduction du Ti_2O_3 dans le mélange de l'Al_2O_3. Une partie de ce matériel vient de ce mélange où les ions Ti^{3+} sont substitués par un faible pourcentage des ions Al^{3+}. Le niveau électronique fondamental de l'ion Ti^{3+} est séparé en une paire de niveaux vibrationnels. La transition d'absorption survient dans la gamme de longueur d'ondes de 400 nm à 600 nm. La transition de fluorescence survient dans les niveaux vibrationnels moins élevés de l'état excité aux niveaux vibrationnels plus élevés de l'état fondamental.

La base du laser *Tsunami®* contient le cristal Titane: Saphir ainsi que des optiques dans la cavité de l'oscillateur, ce qui peut être observé à la **Figure 3.4**.

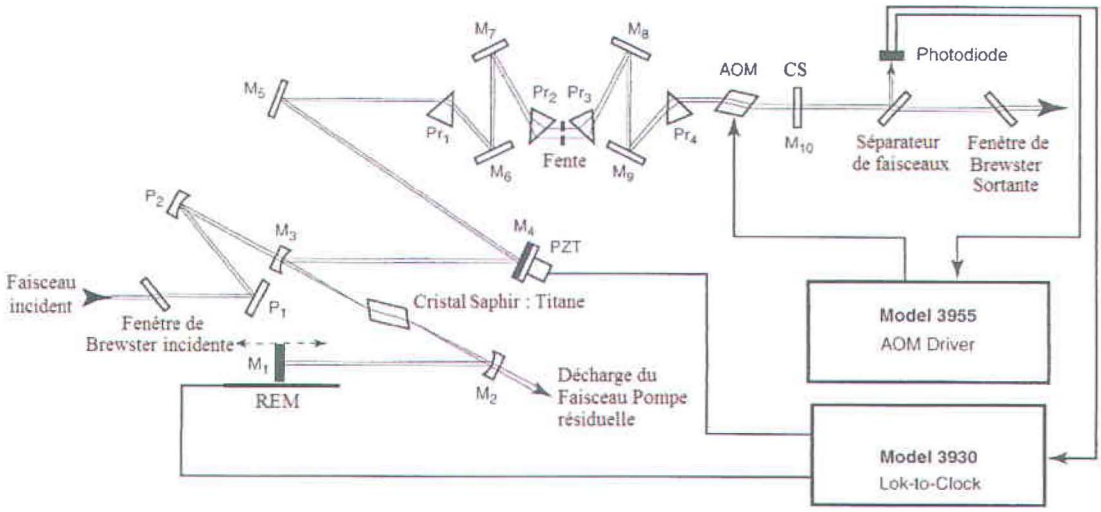


Figure 3.4 – Trajet optique pour les modèles du Tsunami 3960 et 3941 de configurations femtosecondes. Ce système inclut des miroirs (M_1-M_{10}), un coupleur de sortie (CS), un réflecteur élevé motorisé (REM), des prismes (Pr_1-Pr_4) ainsi qu'un transducteur piézo-électrique (PZT). Il est à noté que l'électronique de synchronisation *lok-to-Clock* sera discuté à la section 3.2.4.

Pour choisir la longueur d'onde de ce système laser, nous utilisons la séquence de prisme ainsi que la fente. Cette séquence fournit une région dans la cavité où les longueurs d'ondes sont séparées spatialement. La largeur de la fente peut également être variée.

3.2.3 Oscillateur laser 1064 nm

Le *Vanguard® 350-HMD355* (de Spectra-Physics) est un laser *mode-locked*, à l'état solide capable de fournir 3 W de lumière infrarouge à 1064 nm. L'alimentation électrique utilisée est le *Model J40* et la source utilisée pour produire la puissance pompe est la diode laser ProLite^{TM} localisé dans cette alimentation. Celle-ci est couplée via une fibre optique où la lumière est focalisée au bout du cristal de l'oscillateur ($Nd:YVO_4$) à l'aide d'une microlentille cylindrique avec une ouverture numérique élevée. Afin de

stabiliser la longueur d'onde sortante de la diode, le module est monté directement dans une plateforme où la température est régulée.

L'oscillateur contient un cristal $Nd:YVO_4$ qui émet une lumière laser de 1064 nm. Un télescope focalise, dans un miroir dichroïque, la lumière pompe à l'intérieur du cristal. Les miroirs dichroïques sont très transmissif à la longueur d'onde de la diode pompe et très réflectif à 1064 nm. L'énergie de la pompe est absorbée par le cristal et l'inversion de population est alors créée dans celui-ci. Quand les électrons excités se désexcitent, la lumière 1064 nm est émise et voyage en direction de l'un des miroirs de la cavité. Les photons qui atteignent l'un de ces miroirs reviennent vers le cristal où ils stimulent l'émission de photons. De plus, peu après le premier photon de 1064 nm émis, le faisceau laser est établi entre les miroirs de la cavité. La synchronisation de modes est produite par un miroir semi-conducteur dans la cavité géométrique optimisé pour 80 MHz et de pulsations de 12 picosecondes. Celui-ci a la propriété que la réflectivité augmente avec l'intensité.

3.2.4 Électronique de synchronisation

L'électronique de synchronisation utilisée est le *Model 3930 Lok-to-Clock* et provient d'une stabilisation d'une boucle de synchronisation de phase des impulsions sortantes du laser *Tsunami*. Ce système permet de synchroniser précisément les impulsions sortantes autant à la source de référence interne qu'à une autre extérieure, comme l'oscillateur laser 1064 nm. Donc, nous avons un oscillateur laser Titane: Saphir synchronisé à celui, ce qui nous donne accès aux fréquences pompe et Stokes.

La phase du train de l'impulsion est comparée à la phase d'une référence d'un oscillateur stable. N'importe quelle différence de phase est convertie en erreur de voltage. Ce signal d'erreur est filtré, amplifié et utilisé pour diriger un transducteur piézo-électrique (PZT) qui est monté dans l'oscillateur (M_4). Le mouvement du miroir change la longueur de la cavité du laser *Tsunami*, ce qui modifie le taux de répétition pour minimiser la différence de phase. Quand les impulsions sont parfaitement chevauchées, il

n'y a aucune phase d'erreur. Alors, la longueur de la cavité ainsi que le taux de répétition de l'impulsion sont constants. La **Figure 3.5** peut également être combinée avec la **Figure 3.4** en remplaçant le *model 3930 lok-to-clock.*

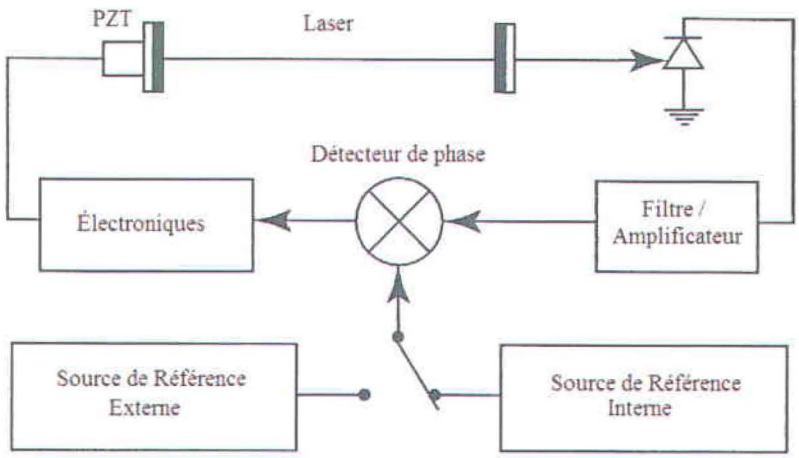
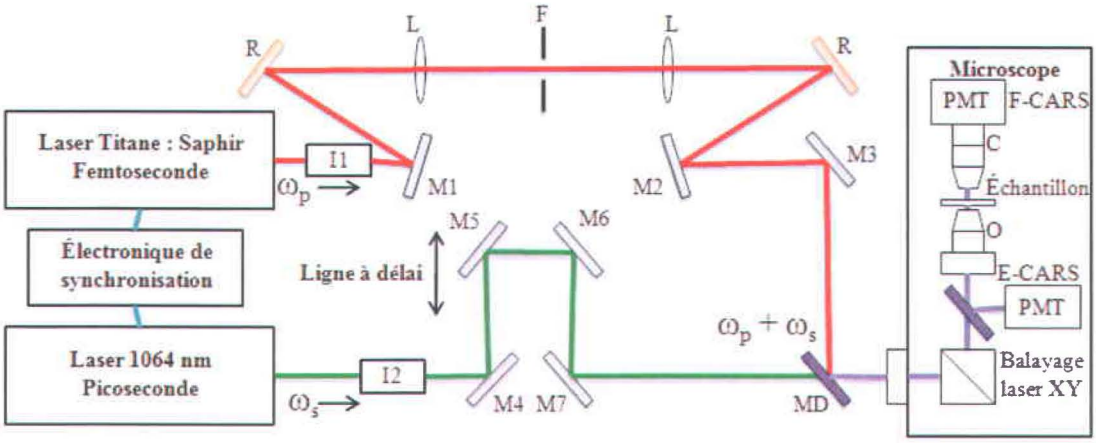


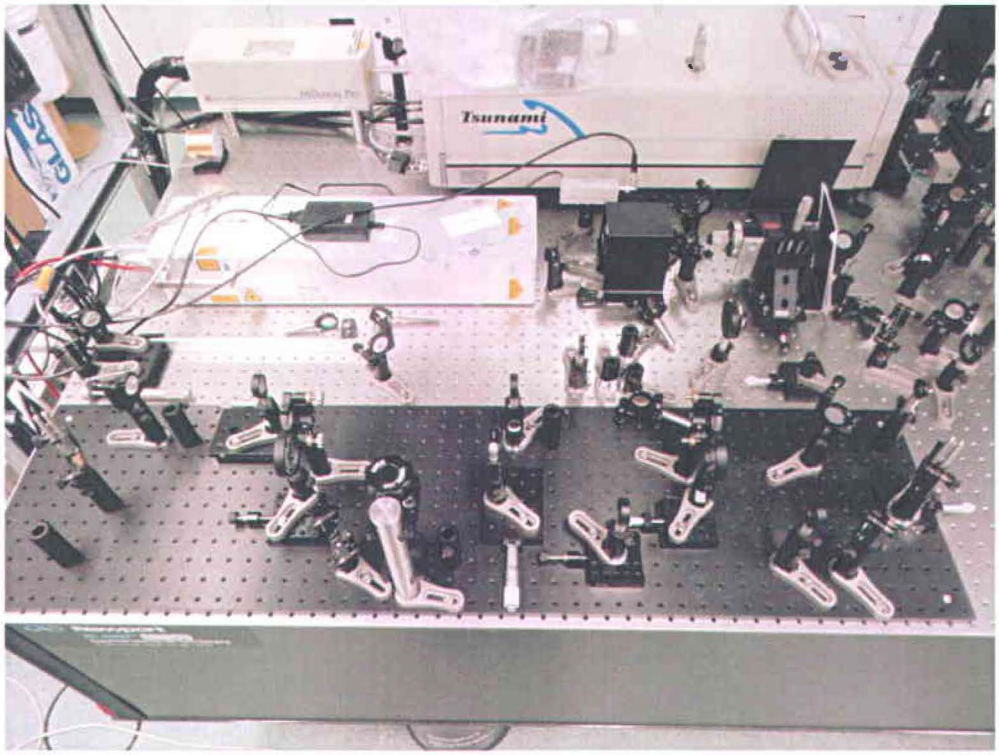
Figure 3.5 – Illustration de la boucle de blocage de phase du *lok-to-clock.*

3.3 Montage expérimental

Tout d'abord, pour la mise en œuvre, nous utilisons un oscillateur laser accordable Titane: Saphir (~100 fs, ~800 nm) pour les impulsions pompes, soit un laser où nous pouvons régler la longueur d'onde de fonctionnement, dans notre cas entre 750 nm et 1050 nm, et un laser Vanguard (~12 ps, 1064 nm) pour les impulsions Stokes. Pour la microscopie CARS, une des plus grandes difficultés consiste à ce que ces deux lasers se recouvrent spatialement et temporellement. Pour recouvrir les lasers spatialement, cela réside principalement dans la dextérité de l'expérimentateur ainsi que de la précision du système optique. Pour recouvrir les lasers temporellement, nous utilisons une ligne à délai ainsi que la synchronisation électronique discutée à la section 3.2. Cette synchronisation est un dispositif électronique actif permettant d'assurer le même taux de répétition entre les lasers pompe et Stokes en jouant sur la longueur de cavité de l'oscillateur laser Titane: Saphir. La **Figure 3.6** démontre la mise en œuvre du montage de la microscopie CARS.


R
L
F
L
R
Microscope
PMT
F-CARS
Laser Titane : Saphir
Femtoseconde
I1
ω_p
M1
M2
M3
C
Échantillon
O
E-CARS
PMT
Électronique de
synchronisation
M5
M6
Ligne à délai
$\omega_p + \omega_s$
Laser 1064 nm
Picoseconde
I2
ω_s
M4
M7
MD
Balayage
laser XY

(A)


Tsunami

(B)

(C)

Figure 3.6 – Montage expérimental du système de microscopie CARS. **A)** Schéma de la mise en œuvre: M1-M7 sont les miroirs; le laser Titane: Saphir (pompe) traverse des réseaux (R), des lentilles (L) et une fente (F). Les deux faisceaux lasers sont synchronisés temporellement grâce à une ligne à délai (M4-M7) et l'électronique de synchronisation, recombinés sur un miroir dichroïque (MD) et envoyés sur des miroirs galvanométriques contrôlés par ordinateur (Balayage laser XY). I1 et I2 sont des isolateurs optiques insérés dans le montage car nous avons eu des problèmes avec les retours vers les cavités lasers. **B)** Photographie des oscillateurs lasers, filtre d'amplitude et de la ligne à délai. **C)** Photographie du microscope à balayage laser.

Le laser pompe de pulsation ω_P (en rouge) passe à travers un filtre d'amplitude basé sur un système 4f, où f est la longueur focale des lentilles L. Les réseaux (R) séparent les longueurs d'ondes, les lentilles (L) focalisent le faisceau et grâce à la fente (F), nous pouvons choisir la plage de longueurs d'ondes que nous voulons afin d'optimiser le contraste spectroscopique de l'image CARS pour l'échantillon imagé. Les deux lasers, pompe (ω_P en rouge) et Stokes (ω_S en vert), sont réfléchis par des miroirs

(M1-M7) et recombinés avec un miroir dichroïque (MD). Les deux faisceaux lasers sont alors combinés spatialement et temporellement et dirigés vers des miroirs galvanométrique contrôlés par ordinateur, soit un système de positionnement en XYZ (Balayage laser XY). Évidemment, le point de focalisation des faisceaux pompe et Stokes, soit le lieu de génération du signal CARS, est déplacé dans l'échantillon à l'aide de ces miroirs galvanométriques afin d'obtenir une image point par point. Le signal de l'anti-Stokes est détecté par les PMT vers l'avant (F-CARS) et vers l'arrière (E-CARS).

De plus, pour réaliser les autres techniques d'imagerie (seconde harmonique et fluorescence), il suffit tout simplement de bloquer un des deux oscillateurs (le Titane: Saphir pour le virus US78tdtomato et le 1064 nm pour les autres échantillons) et changer le filtre à l'intérieur du microscope afin de détecter le signal que nous désirons obtenir. Toutefois, des collègues de l'INRS Armand-Frappier voulaient avoir des images de fluorescence de virus exprimant le mCherry (voir le chapitre 4). Notre montage n'est pas optimiser pour obtenir ces résultats car cette protéine fluorescente doit être excitée avec une lumière de 1160 nm de longueur d'onde pour l'absorption à deux photons [54]. Pour l'imagerie du mCherry, nous avons donc utilisé un oscillateur paramétrique optique (OPO) afin d'accéder à cette longueur d'onde. À partir du laser Titane: Saphir qui agit comme laser pompe, cet oscillateur paramétrique produit deux fréquences: Le signal (ω_s) et le complémentaire (ω_I, *idler* en anglais). Vu la conservation de l'énergie, nous avons que $\omega_p = \omega_s+\omega_I$. La conversion de fréquences du laser pompe vers les deux ondes générées se fait au travers d'une interaction optique non-linéaire à l'intérieur de la cavité optique, dans un matériau qui est, dans notre cas, un cristal non-linéaire de triborate de lithium (LiB_3O_5, LBO). L'accord de phase se fait avec la température et nous changeons la longueur d'onde du Titane: Saphir afin d'accéder aux différentes régions spectrales de ω_s. La cavité optique a pour rôle de faire osciller le rayonnement et permettre son amplification par passages successifs dans le milieu non-linéaire.

La question que nous pouvons nous poser est pourquoi ne pas avoir utilisé un oscillateur paramétrique picoseconde afin de réaliser la microscopie CARS comme Saar et al. [55]. Il faut rappeler que pour la microscopie de fluorescence, de seconde

harmonique et de troisième harmonique, il est mieux d'utiliser des impulsions femtosecondes et le système OPO picoseconde utilisé par Saar et al. pour la microscopie CARS est mal adapté aux autres techniques de microscopie. En fait, notre objectif était de pouvoir être capable d'obtenir plusieurs techniques d'imagerie à l'aide d'un laser Titane: Saphir, d'une électronique de synchronisation et d'un laser 1064 nm afin que nos collaborateurs biomédicaux puissent avoir accès facilement à plusieurs techniques d'imagerie avec un même microscope.

3.4 Filtre d'amplitude basé sur un système dispersif

Un filtre d'amplitude basé sur un système dispersif et géométrie 4f (*pulse shaper* [56, 57]) est un montage optique particulièrement utilisé afin de changer la forme ou la durée d'une impulsion en projetant celle-ci sur un plan de Fourier où le filtre d'amplitude et de phase est placé. Ceci permet de séparer spatialement les différentes longueurs d'ondes pour les distribuer linéairement selon un axe perpendiculaire au faisceau incident. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé ce filtre d'amplitude afin de réduire la largeur spectrale de l'impulsion en soustrayant une partie des fréquences du spectre et ainsi, augmenter la durée de l'impulsion. Ce filtre d'amplitude est composé de réseaux et de lentilles de longueur focal f (pour notre cas, f = 25 cm). Le faisceau incident arrive sur un réseau qui diffracte les longueurs d'ondes à différents angles et traverse ensuite une lentille qui distribue linéairement les différentes longueurs d'ondes le long d'un axe perpendiculaire à sa propagation, dans le plan de Fourier (celui-ci positionné à 2 distances focales). En plaçant une fente avec une largeur variable, il est possible de sélectionner la largeur spectrale que nous désirons dans le faisceau ce qui permet de contrôler la durée de l'impulsion. De plus, la fente est installée sur une platine de translation, perpendiculaire au faisceau incident, ce qui nous permet de modifier la longueur d'onde centrale afin d'exciter un mode vibrationnel différent simplement en bougeant cette platine. La **Figure 3.7** représente un filtre d'amplitude de géométrie 4f.

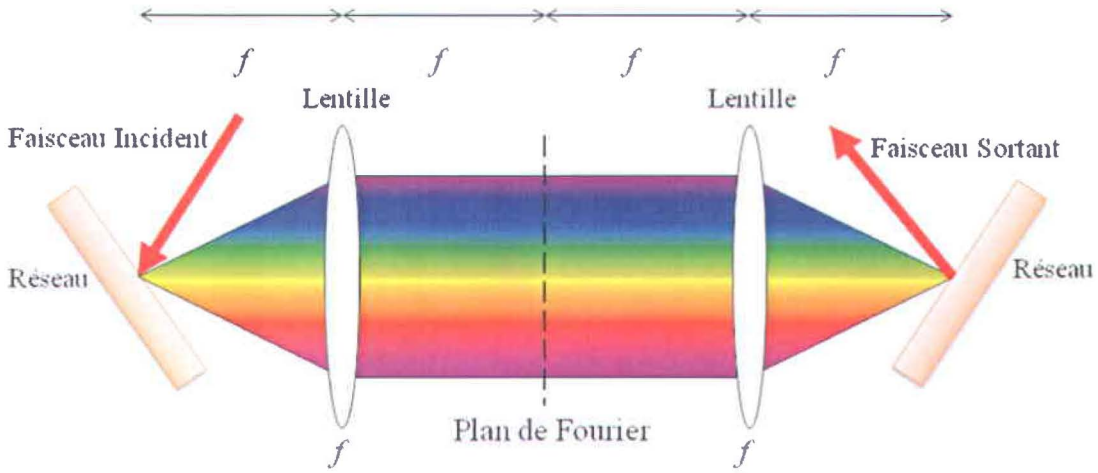


Figure 3.7 – Filtre d'amplitude basé sur un système dispersif de réseaux et géométrie 4f. Une fente mobile à largeur variable est placée au plan de Fourier.

Pour produire ce système optique, nous avons utilisés des réseaux, qui sont des composantes optiques qui permettent de diffracter un faisceau incident en plusieurs directions à l'aide de fentes pour les réseaux de transmission et à l'aide de rayures réfléchissantes pour les réseaux de diffractions, ce qui est notre cas ici. Lorsqu'un faisceau laser est incident sur un réseau, la lumière n'est réfléchie ou transmise qu'en certains points, soient les traits du réseau. Chacun de ceux-ci diffuse la lumière dans toutes les directions et ces ondes lumineuses interfèrent. Alors, il se produit de l'interférence constructive et destructive entre les différents fronts d'ondes incidents produits par la réflexion du réseau lui-même, ce qui crée des pics d'intensité à certains endroits. Nous obtenons des pics de diffraction si la largeur des fentes est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de l'onde réfléchissante. Également, nous pouvons obtenir les informations sur les ordres de diffraction avec la formule suivante :

$$d\left(\sin\theta_m + \sin\theta_i\right) = m\lambda \tag{3.4}$$

Où θ_i est l'angle d'incidence, θ_m est l'angle de diffraction, d est la distance entre deux fentes, m est l'ordre de diffraction et λ est la longueur d'onde.

3.5 Alignement du filtre d'amplitude

Les composants optiques ont plusieurs degrés de liberté, ce qui constitue l'alignement comme étant cruciale dans la réalisation du montage. Bien évidemment, la surface où est assemblé le filtre d'amplitude doit être droite, comme dans notre cas, sur une table optique. Voici les étapes à franchir pour l'alignement :

1) S'assurer tout d'abord que le **laser soit collimé** : Une technique pour collimer le laser est de visualiser le faisceau à une grande distance de son point initial, par exemple dix mètres, et observer la grandeur et la forme du faisceau.
2) S'assurer que, pour tous les miroirs à utiliser, le faisceau **se propage parallèlement à la table optique** : Il faut faire un miroir à la fois et envoyer le faisceau sur le miroir désiré et, par la suite, renvoyer le faisceau au loin (champs lointain). Par après, à l'aide d'un iris, positionner le miroir à ce que le faisceau reste parallèle à la table optique et ce, peu importe la distance. Alors, peu importe le cas, les miroirs seront déjà alignés verticalement.
3) **Aligner le premier réseau de diffraction** : Il faut que le plan de la surface du réseau soit perpendiculaire à la table optique, que les ordres du réseau diffractent tous parallèlement à la table et que les lignes du réseau soient bien alignées. Une bonne façon de pouvoir observer ceci est de trouver l'ordre zéro de diffraction et également, l'ordre de diffraction voulu, soit dans notre cas, l'ordre un. Par la suite, il faut s'assurer que les deux se propagent parallèlement à la table. Donc, avec l'alignement bien exécuté, la direction dans laquelle les fréquences optiques se séparent doit également être parallèle à la surface de la table.
4) **Insérer la première lentille** : Il faut placer la première lentille approximativement à une longueur focale du premier réseau, dans notre cas à 25 cm. La hauteur de la lentille devrait être ajustée pour assurer que le faisceau transmit se propage toujours parallèlement à la surface de la table.
5) **Introduire la fente** : La fente peut être insérée à la longueur focale de la première lentille, toujours à 25 cm dans notre cas, donc 50 cm du premier réseau. Il faut être certain que l'ouverture de celle-ci soit centrée au filtre d'amplitude.

Évidemment, dans notre montage, nous avons mit la fente sur une platine de translation, perpendiculaire au faisceau incident, afin de pouvoir sélectionner la longueur d'onde centrale et la bande spectrale, alors, nous pouvons toujours réitérer au besoin. Une fois alignée, la fente peut être retirée afin de continuer l'alignement des autres composants optiques, car celle-ci sera utile seulement une fois le montage complété.

6) **Positionner la deuxième lentille** : Celle-ci doit être insérée à deux longueurs focales de la première lentille, soit à 50 cm de cette dernière pour notre cas. Afin d'avoir un alignement plus précis, nous avons mit cette lentille sur une platine de translation parallèlement au faisceau incident. Donc, nous pouvons bouger la lentille au micromètre près afin d'obtenir un alignement optimal. Comme pour la première lentille, la hauteur de celle-ci devrait être ajustée pour assurer que le faisceau transmit se propage toujours parallèlement à la surface de la table.
7) **Déterminer l'emplacement du deuxième réseau** : Il faut insérer le deuxième réseau à une longueur focale (25 cm) de la deuxième lentille en ajustant celui-ci de la même façon que le premier réseau à l'étape 3 (plan de la surface du réseau perpendiculaire à la table optique et etc.). Par contre, il y a un point critique à cette étape. La rotation de l'axe verticale doit être jumelée parfaitement avec le premier réseau en étant certain qu'il n'y ait pas de dispersion spatiale (*spatial chirp*). Toutes les composantes en fréquences doivent se chevaucher toutes ensemble de façon optimale. Un bon moyen d'observer ce phénomène est de placer une carte au plan de Fourier et de bouger celle-ci afin d'enlever certaines composantes spectrales, soit le même endroit où est placé la fente. S'il n'y a pas de dispersion spatiale, seul l'intensité du faisceau sera atténuée après le filtre d'amplitude, la forme ne changera pas. Par contre, s'il y a de la dispersion spatiale, la forme du faisceau changera.
8) Maintenant, une fois les 7 premières étapes terminées, nous pouvons remettre la fente au plan de Fourier, l'ouverture doit être centrée au milieu de la région spectrale voulue.

3.6 Autocorrélateur d'intensité

Un autocorrélateur d'intensité a été utilisé afin de déterminer la durée de l'impulsion laser. L'impulsion arrive sur un séparateur 50-50, donc 50% transmit 50% réfléchit. Par la suite, à l'aide d'une ligne à délai, nous séparons temporellement les deux impulsions. Par après, nous les convergeons dans un cristal BBO (Beta BaB_2O_4) afin de générer de la seconde harmonique. Nous mesurons la puissance de la seconde harmonique générée par la combinaison des faisceaux provenant des deux trajets tout en faisant varier le délai entre les deux pour reconstituer l'autocorrélation d'intensité. Par la suite, nous faisons l'intégral du spectre point par point car nous sommes seulement intéressé par la durée de l'impulsion. Il est à noter que le détecteur est un spectromètre. Pour des impulsions femtosecondes, ce montage permet le SHG-FROG (*Second Harmonic Generation - Frequency Resolved Optical Gating*) [58]. La **Figure 3.8** présente un aperçu du montage.

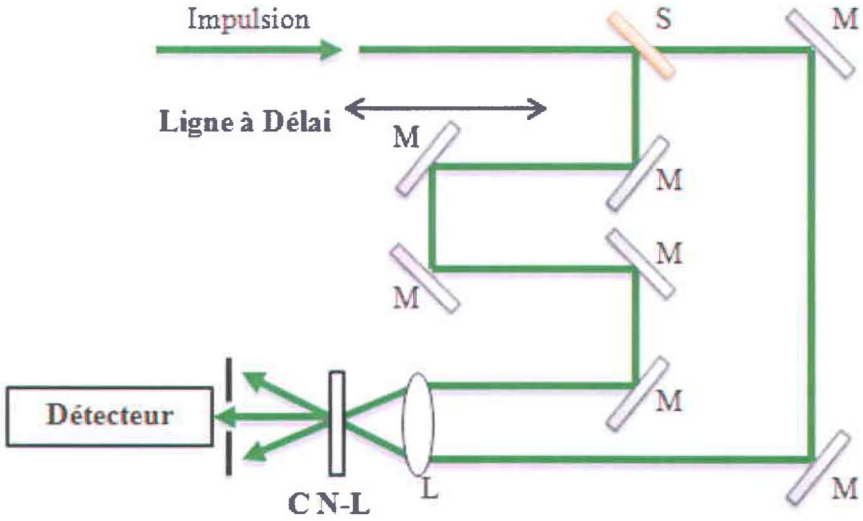


Figure 3.8 – Montage expérimental du système d'autocorrélation d'intensité : M sont les miroirs; S le séparateur 50 – 50, L la lentille et C N-L le cristal non-linéaire.

3.7 Durée d'impulsion selon l'ouverture de la fente

À l'aide de l'autocorrélateur d'intensité, nous pouvons maintenant obtenir la **Figure 3.9** qui présente la durée d'impulsion en fonction de l'ouverture de la fente. D'ailleurs, cette figure peut être expliquée à l'aide de l'équation 3.7 [59, 60] :

$$\tau_0 = \tau_i \sqrt{1 + \frac{16(\ln 2)^2 \{\phi^{(2)}(\omega_0)\}^2}{\tau_i^4}} \qquad (3.7)$$

où τ_0 est la durée de l'impulsion à la sortie de la composante optique, τ_i est la durée de l'impulsion transformée de Fourier et $\phi^{(2)}$ (ω_0) est le délai de dispersion de groupe (*group delay dispersion*, GDD).

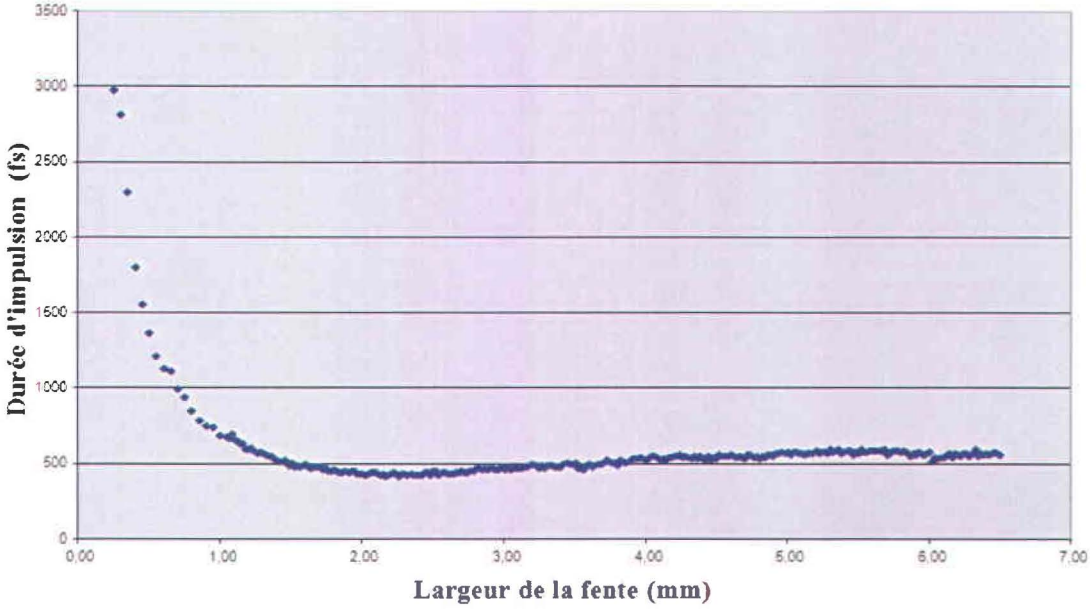


Figure 3.9 – Graphique de la durée de l'impulsion selon la largeur de la fente

Si le terme $\phi^{(2)}$ est non-nulle, ce qui est notre cas, nous avons deux cas possibles. Le terme $\phi^{(2)}$ est non-nulle car l'impulsion laser du Titane: Saphir passe au travers de l'isolateur optique et nous n'avons aucun montage optique pour compenser la dispersion introduite par cette composante au montage. Dans le premier cas, τ_i^4 est beaucoup plus élevé que $(\phi^{(2)})^2$. Dans ce cas, $\tau_0 = \tau_i$ et ceci explique la portion de la figure 3.9 où la

largeur de la fente est inférieure à ~1 mm. Dans cette portion de la figure, la durée de l'impulsion ne dépend que de la bande spectrale à la sortie du filtre d'amplitude. Dans le deuxième cas, où la fente est complètement ouverte et aucune composante spectrale n'est filtré, nous remarquons une durée d'environ 500 femtosecondes. Cette durée, supérieure à la limite par transformée de Fourier (100 femtosecondes), est due à la propagation linéaire de l'impulsion Titane: Saphir à travers l'isolateur optique. C'est le cas où $(\phi^{(2)})^2$ est plus élevé que τ_i^4.

3.8 Focalisation des faisceaux à l'intérieur du microscope

Afin de bien optimiser le signal CARS, il faut que les faisceaux lasers pompe et Stokes soient focalisés au même point dans notre échantillon. Pour ce faire, nous avons installé un cristal de quartz dans le microscope afin de générer un signal de seconde harmonique. Également, un télescope a été introduit dans le chemin optique du Titane: Saphir afin de pouvoir ajuster la focalisation de celui-ci afin de la mettre au même plan que le faisceau Stokes. En balayant dans la direction z, nous avons donc pu obtenir la **Figure 3.10** afin de confirmer que nos deux faisceaux sont optimisés afin d'être au même point.

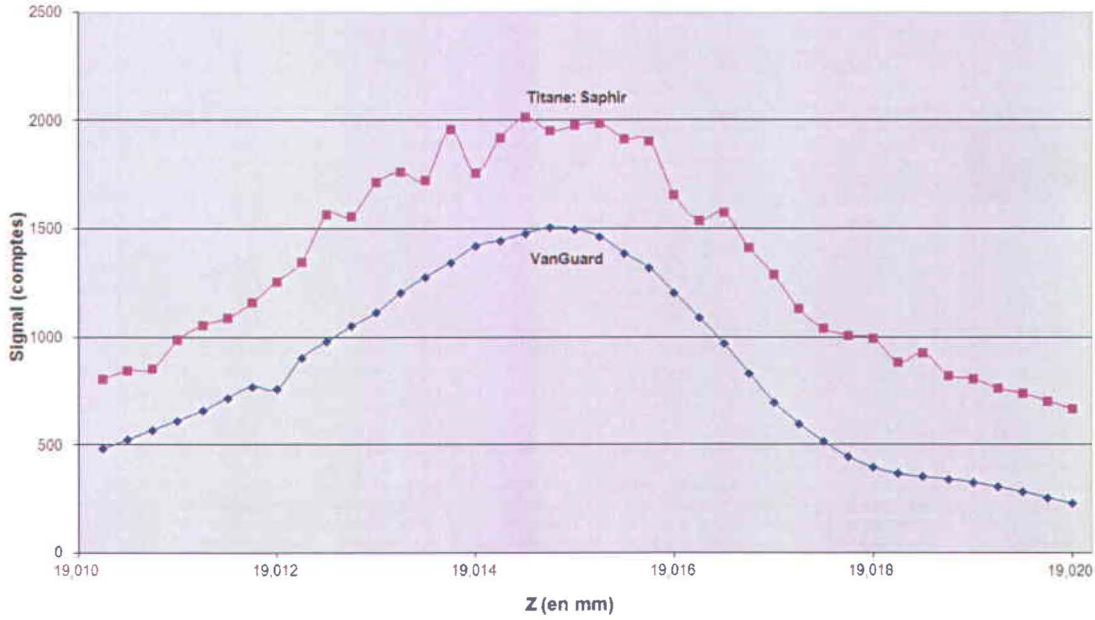


Figure 3.10– Signal obtenu selon z de la focalisation des faisceaux

3.9 Filtre et longueur d'onde pour l'imagerie CARS

La myéline est riche en lipides et ceux-ci ont beaucoup de liaisons CH_2. La vibration symétrique du CH_2 est à 2840 cm^{-1} [61]. Alors, la longueur d'onde du Titane: Saphir sortante du filtre d'amplitude que nous désirons obtenir est non loin de 816 nm pour l'imagerie de la myéline avec la microscopie CARS, car :

$$2840\ \text{cm}^{-1} \rightarrow 3521.13\ \text{nm et} \left(\frac{1}{816} - \frac{1}{1064}\right)^{-1} = 3500.90\ nm$$

Pour avoir une gamme de longueurs d'ondes suffisantes, nous voulons que le filtre CARS puisse laisser passer non loin de 20 nm de bande spectrale avec la fente du filtre d'amplitude, soit ± 10 nm à partir de 810 nm. Calculons alors pour 800 nm et 820 nm la fréquence du signal CARS.

$$\left(\frac{2}{800} - \frac{1}{1064}\right)^{-1} = 640.96\ nm;\ \left(\frac{2}{820} - \frac{1}{1064}\right)^{-1} = 667.03\ nm$$

Pour isoler le signal CARS des autres signaux, nous avons utilisé un filtre qui pouvait laisser passer cette gamme de longueurs d'ondes.

CHAPITRE 4
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.1 Biologie

4.1.1 La gaine de myéline

Un neurone a pour fonction primaire de transmettre de l'information. Le neurone s'étirera sur de longues distances en produisant des axones. Il est à noter qu'un axone est un long cylindre de cytoplasme qui s'étend du corps neuronal jusqu'à sa cible.

L'information est transmise par influx nerveux appelé le potentiel d'action. Cet influx est une onde de gradient de voltage ou potentiel électro chimique. Le neurone maintient activement une différence de voltage entre son cytoplasme et le milieu extracellulaire, c'est-à-dire que le neurone dépense de l'énergie pour séparer des charges. L'intérieur de la membrane cellulaire séparant le cytoplasme de l'extérieur est chargé négativement et l'extérieur positivement.

Lors d'un influx nerveux, des canaux s'ouvrent laissant entrer des ions de sodium (Na+), ce qui dépolarise la membrane. Cette dépolarisation locale active les canaux adjacents qui à leur tour laisse entrer des ions de sodium. Nous avons donc une vague de dépolarisation. La membrane s'est rapidement repolarisé en ouvrant des canaux qui expulsent les ions de potassium à l'extérieur de la cellule. Les canaux de potassium empêchent l'influx de revenir en arrière, dirigeant l'onde de dépolarisation dans une seule direction. Ces canaux sont situés tout au long d'un axone.

La vitesse de propagation d'un potentiel d'action dépend de la quantité de canaux à un endroit, et donc dépend du diamètre de l'axone. Plus l'axone est long, plus celui-ci doit avoir un gros diamètre pour que l'influx nerveux soit assez rapide. Afin d'augmenter

la vitesse de l'influx tout en conservant un petit diamètre, certains axones seront myélinisés.

La gaine de myéline est un recouvrement de l'axone par une autre cellule (cellule de Schwann en périphérie, oligodendrocyte dans le système nerveux centrale). Un axone myélinisé sera recouvert d'une gaine de myéline sur toute sa distance à l'exception de quelques petits segments à intervalles constants. Ces petits segments non-myélinisés sont appelé le « nœud de Ranvier ». C'est à ces nœuds que les échanges d'ions se produisent. L'influx nerveux peut donc se propager beaucoup plus vite puisque l'onde n'a pas besoin de passer par les régions myélinisées (un saut de nœud en nœud). Il y a beaucoup moins de perte d'ions dans ces régions.

Un axone myélinisé signifie donc pour une vitesse rapide un plus petit diamètre, moins de perte d'ions, moins de perte d'énergie pour transmettre de l'information. C'est donc un avantage intéressant côté évolutif. La cellule de Schwann ou les oligodendrocites joueront aussi un rôle au niveau de la survie du neurone en protégeant l'axone de dommages, ainsi qu'en aidant à sa réparation. Richard et *al.* ont publié [62] à propos de la formation, de la structure et de la biochimie de la myéline.

4.1.2 La gaine de myéline en pathologie

La myéline est donc très importante au bon fonctionnement du système nerveux chez les animaux. Les cellules produisant la gaine de myéline peuvent être impliquées dans certaine pathologies.

1) <u>Les accidents physiques :</u> Un stress physique peut causer des dommages au niveau des nerfs et de la colonne vertébrale. Un premier stress peut venir déchirer l'axone. Dans ce cas-ci, si la cellule de Schwann a survécue, elle peut régénérer l'axone et rétablir la connexion. Par la suite, le système immunitaire sera activé et recruté à la région endommagée, il y aura donc de l'inflammation. Cette inflammation produit une augmentation importante de la pression locale. La pression est un second stress

physique qui peut endommager, voir tuer les cellules. Suite à un accident de route, l'inflammation secondaire est plus souvent la cause de dommage à la colonne vertébrale, paralysant les gens, puisque la pression tue les cellules et détruit la gaine de myéline. Sans celle-ci, le neurone ne peut pas se régénérer et la personne demeure paralysée.

2) Les maladies auto-immunitaires : Le système immunitaire est présent pour reconnaitre des intrus dangereux et les détruire. Dans certain cas, le système immunitaire peut reconnaitre le « soi » et attaquer le corps de la personne. Nous appelons ces maladies « auto-immunitaire ». Le Lupus est une maladie auto-immunitaire où une grande variété de cellules sont reconnues et détruites. La sclérose en plaque (*Multiple Sclerosis* : MS en anglais) est une autre maladie auto-immunitaire. Celle-ci implique la destruction de la gaine de myéline par les cellules immunitaires de l'hôte. Cette maladie est compliquée et implique des vagues de réponse immunitaire et de démyélinisation entrecoupée par des périodes de remyélinisation. Avec le temps, les dommages deviennent trop sévères, les gaines de myéline ne reviennent plus et les neurones sont détruits. Il y a donc soit paralysie des membres en périphérie, soit également dans le cerveau une réduction des capacités intellectuelles allant jusqu'à un état végétatif et même la mort. Les causes de la sclérose en plaques ne sont pas connues. Cela pourrait être due à un défaut au niveau du génome de la personne causant le système immunitaire à reconnaitre de façon naturelle la myéline, ou due à un agent externe.

3) La démyélinisation et les virus : La sclérose en plaque n'a pas encore de cause connue. Une hypothèse a été avancée disant que cette maladie pourrait être causée par une infection virale avec un mécanisme appelé « mimétisme moléculaire ». Lors d'une infection, le système immunitaire reconnait des protéines virales, et produit une réponse immunitaire contre elle. Toutes cellules exprimant ces protéines virales seront alors ciblées et tuées. Si la protéine virale ressemble à une protéine de l'hôte, il se peut que le système immunitaire commence à attaqué le « soi » parce qu'il croit que c'est une protéine virale.

Dans d'autre cas, les virus peuvent être impliqués de façon plus directe dans le processus de démyélinisation. Certains virus peuvent infecter une grande variété de cellules. Le virus du rhume (coronavirus), de la même famille que le virus du SRAS, cause principalement des symptômes respiratoires. Cependant, il a été découvert que ce virus peut aussi infecter le système nerveux, et que l'infection du cerveau par ce virus peut engendrer une perte de la myéline. Une infection virale dans un tissu nerveux peut alors causer directement des dommages multiples, dont la mort neuronale ou la démyélinisation. Richard et *al.* ont publié [63] au sujet des maladies impliquant la myéline.

4.1.3 Mise en contexte des virus

Les virus sont des organismes qui ne sont pas vivants, c'est-à-dire que ces particules à elles seules sont incapables de se répliquer et ne démontrent aucune réactions métaboliques (des réactions chimiques à l'intérieur du virus pour maintenir un équilibre : homéostasie).

Un virus (une particule virale) est composé d'une capside (comme une boîte) qui possède différentes protéines ainsi que son génome (de l'ADN ou de l'ARN qui code pour des protéines). Parfois, un virus sera recouvert d'une enveloppe (une boite contenu dans un sac). Suite à l'infection d'une cellule, le virus utilisera ses ressources pour se reproduire. Dans le génome viral, il y a des gènes précédés de leur promoteur. Le promoteur est nécessaire pour recruter des protéines qui vont soit activer l'expression du gène, soit l'inhiber. Un promoteur peut recruter soient des protéines cellulaires, soient des protéines virales. Un promoteur pourrait être spécifique à un type de cellule, donc recrute des protéines activatrices de gènes présentes seulement dans un neurone. Cela signifierait que ce gène serait exprimé seulement dans les neurones.

Le virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) est un virus qui possède une enveloppe. Ce virus infecte d'abord la peau, puis infecte les neurones sensitifs présents dans un ganglion neuronal. Lorsque l'infection se déroule au niveau du visage, le virus infectera

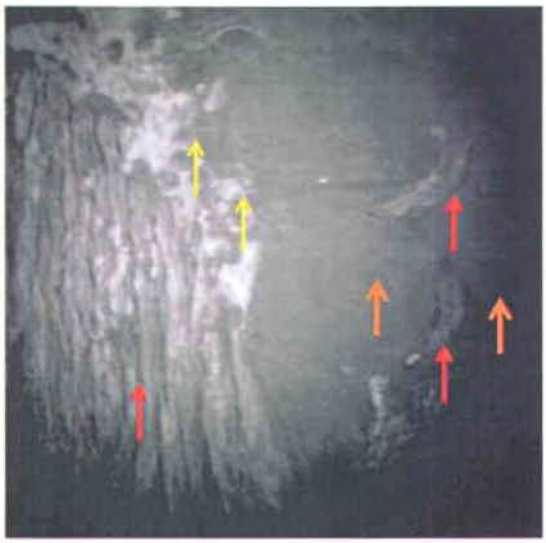
les neurones présents dans le ganglion trigéminal (TG). Ce tissu abrite différents types de cellules, dont une grande variété de neurones, ainsi que des cellules dites gliales, jouant un rôle au niveau de la réponse immunitaire locale, de la régulation de l'influx nerveux, ainsi qu'au niveau de la survie et de l'homéostasie neuronale.

Pour pouvoir identifier les cellules infectées présentes dans le TG, Pierre-Alexandre Rochette de l'INRS Armand-Frappier a construit deux virus qui contiennent une cassette d'expression pour une protéine fluorescente rouge, soient le US78tdtomato et le mCherry. Il est à noter qu'une cassette d'expression est composée d'un promoteur suivi d'un gène. Le promoteur utilisé recrute des protéines présentes dans toutes les cellules eucaryotes (une cellule avec un noyau, contrairement à une bactérie), ainsi que le gène de la RFP (*Red Fluorescence Protein*) du US78tdtomato ou du mCherry. Lorsque ce virus infecte une cellule, celle-ci activera le promoteur eucaryote, ce qui induira l'expression de celui-ci. Par fluorescence, nous pourrons facilement identifier les cellules infectées puisque seulement elles exprimeront le virus choisi.

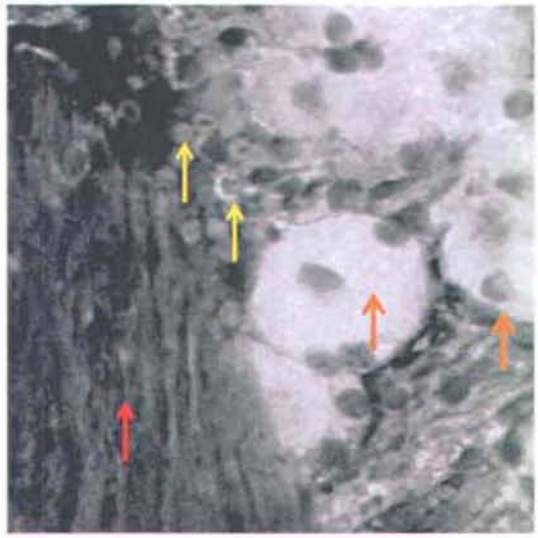
4.2 Imagerie CARS

4.2.1 CARS et fluorescence - myéline

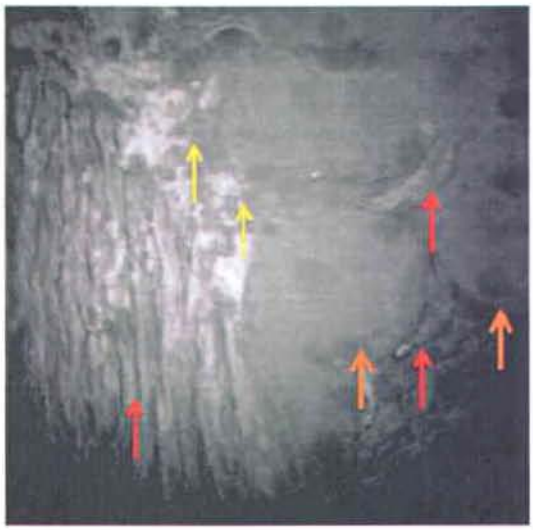
Grâce à ce montage, nous avons pu prendre des images CARS de myéline, soit d'un tissu biologique non infecté, et nous pouvons les comparer avec l'imagerie par fluorescence et ainsi, combiner ces deux types d'imagerie. Les axones sont les bras d'un neurone pour aller chercher de l'information et pour en transmettre. Les cellules satellites sont des petits neurones, des cellules de support (cellules gliales) ou des cellules du système immunitaire. Enfin, les stromas de neurones pseudomonopolaire sont le corps du neurone. Il est à noter que les flèches de ces figures représentent les projections axonales en rouges, les cellules satellites en jaunes et les stromas de neurones en bruns.



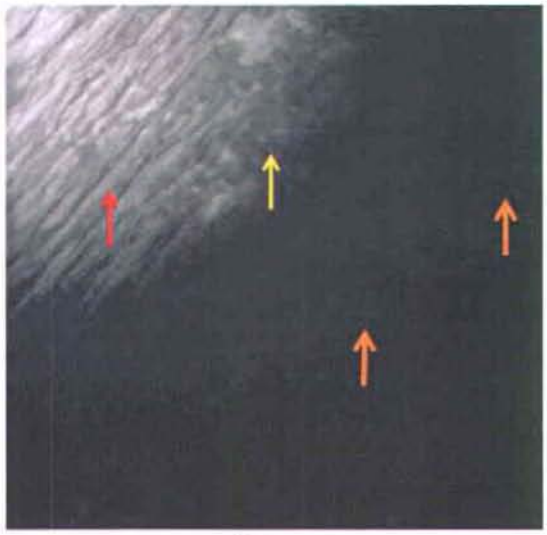
A



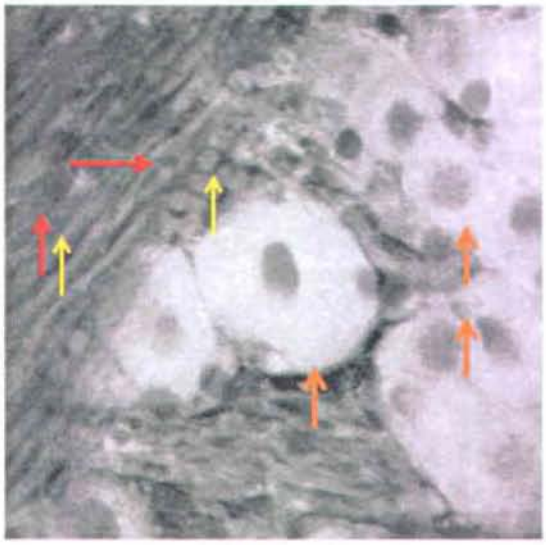
B



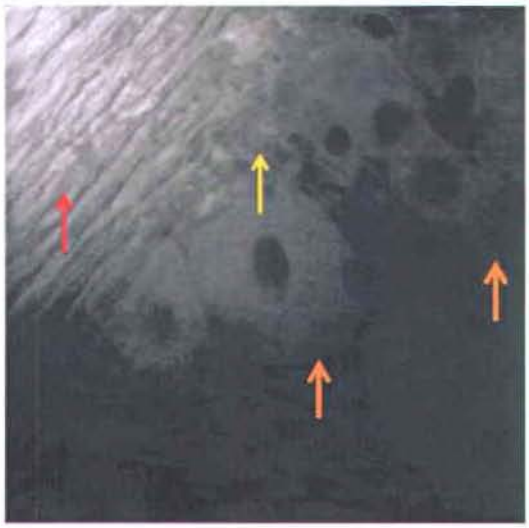
C



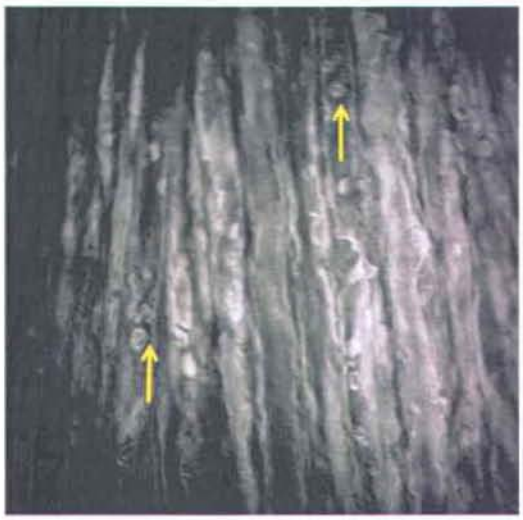
D



E



F



G

H

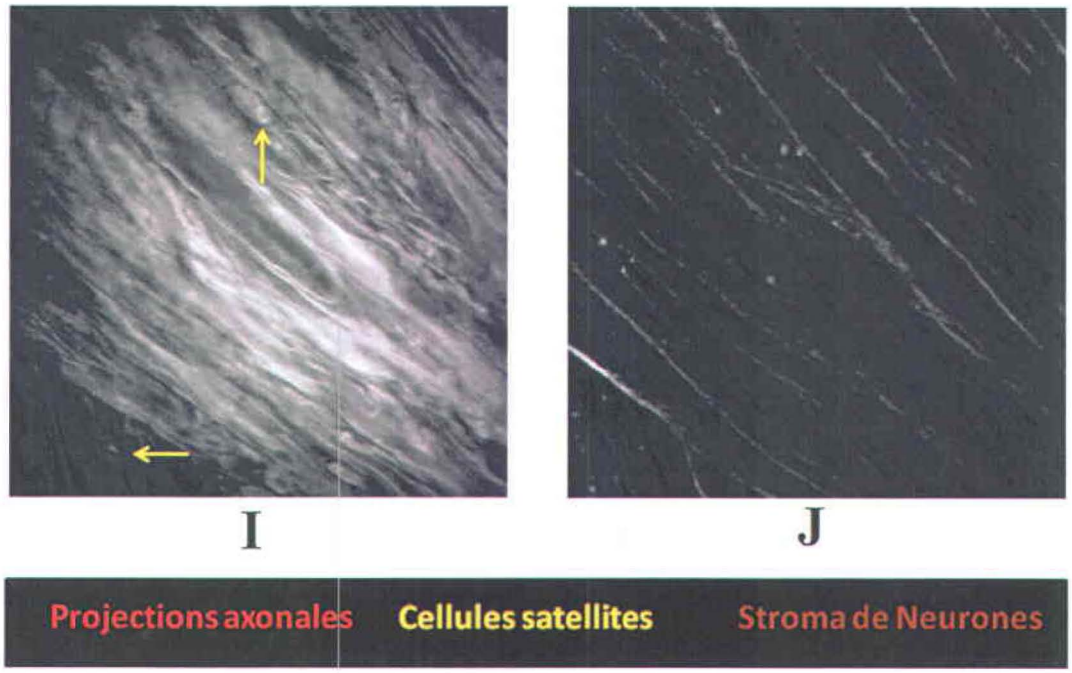


Figure 4.1 – Images obtenues des techniques CARS et de fluorescence pour des échantillons de myéline. L'objectif utilisé est de 40x 1.15. Le tube photomultiplicateur est à 650 V pour A à F et 900 V pour G à J. Les puissances du Titane: Saphir et du Vanguard sont respectivement 50 mW et 80 mW pour A à F et 100 mW et 110 mW pour G à J. La longueur d'onde du Titane: Saphir utilisée est de 816 nm pour A à F et 812 nm pour G à J. **A-C** : Zone 1 de l'échantillon ; A et B sont respectivement l'imagerie CARS et la Fluorescence. C est la combinaison des deux techniques. **D-F** : Zone 2 de l'échantillon ; D et E sont respectivement l'imagerie CARS et la Fluorescence. F est la combinaison des deux techniques. **G-H** : Zone 3 de l'échantillon ; G et H sont respectivement l'imagerie CARS et la Fluorescence. **I-J** : Zone 4 de l'échantillon ; I et J sont respectivement l'imagerie CARS et la Fluorescence.

Nous savons que les neurones sont des cellules impliquées dans le transport de l'information par influx nerveux. Ce sont des cellules pouvant mesurer de quelques microns à plusieurs mètres et sont composées d'un corps neuronal abritant le noyau et un gros cytoplasme. Nous observons que les projections axonales sont très faciles à distinguer avec le CARS. Les régions sombres des images CARS vont être les corps cellulaires (de petites ou de grosses cellules). Les cellules satellites sont les petites

cellules autour des gros neurones. Également, nous observons que la fluorescence nous donne des informations sur le corps des cellules. Nous pouvons facilement distinguer que les gros neurones sont très autofluorescents (**Figure 4.1 A-F**). Nous pouvons voir également que les cellules satellites sont encore visibles pour les images de la **Figure 4.1 G-J**, un peu moins cette fois-ci à la fluorescence. De plus, nous pouvons mentionner que les projections axonales sont clairement visibles au CARS.

4.2.2 CARS et fluorescence – US78tdtomato

Également, grâce à la technique CARS, nous pouvons observer un échantillon infecté par le gène US78tdtomato inséré dans un virus. Alors, lorsque ce dernier aura infecté la cellule, il va commencer à produire la protéine tdtomato. La cellule devient donc une usine à produire ce virus et cette protéine est fluorescente. L'excitation et l'émission de l'échantillon infecté sont respectivement à 554 nm et 581 nm. Pour ce qui est de la fluorescence induite par absorption à deux photons, ce qui est notre cas, l'excitation est à 1064 nm [64]. Il est à noter que celle-ci a été composé des gènes US7 et US8. Le US78tdtomato est le nom du virus produit. Toutefois, dans la nature, celui-ci non-modifié est l'herpès simplex 1, soient les feux sauvages.

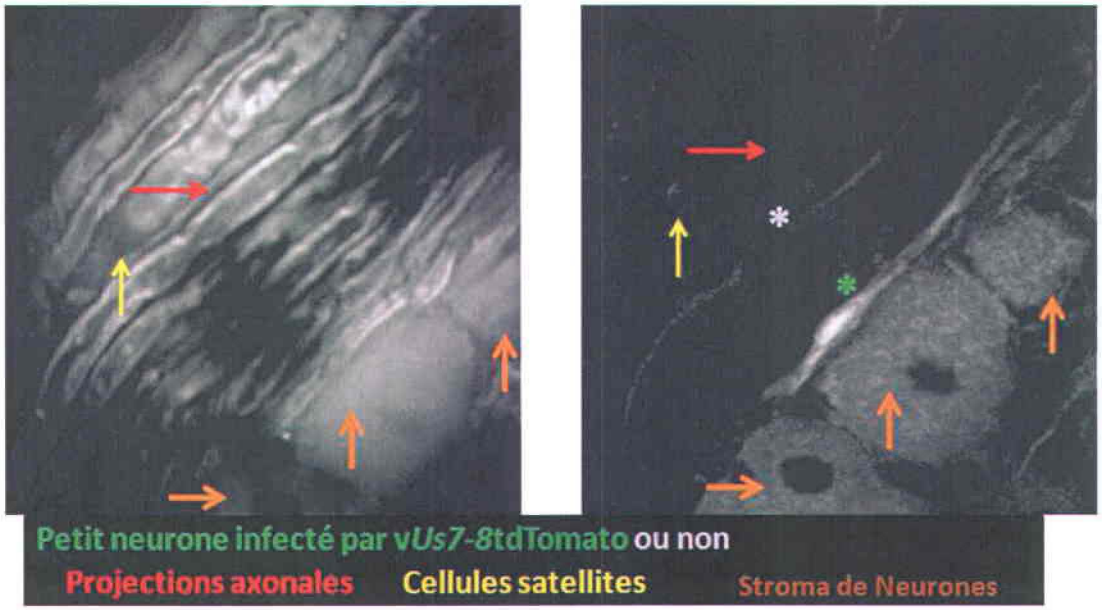


Figure 4.2 – Images obtenues des techniques CARS (gauche) et de fluorescence (droite) pour un échantillon de US78tdtomato. Le tube photomultiplicateur est à 900 V. Les puissances du Titane: Saphir et du Vanguard sont respectivement 100 mW et 110 mW. La longueur d'onde du Titane: Saphir utilisée est de 812 nm.

Il est à noter qu'un petit neurone satellite non infecté est identifié avec un astérix gris et un petit neurone satellite infecté avec un astérix vert. Nous pouvons bien distinguer le neurone infecté avec la fluorescence. Ailleurs dans ce ganglion trigéminaux, il y a des gros neurones d'infectés. Il faut suivre les axones fluorescents pour en trouver le corps. De fait, les ganglions trigéminaux s'appellent ainsi parce qu'ils se divisent en trois branches, ce sont les trois nerfs sensoriels qui innerveront (détecteurs d'informations) le devant de la figure (le froid et le chaud, la pression, le touché, etc.). Nous avons deux ganglions trigéminaux, un de chaque côté de la tête. À travers ces ganglions, il y a aussi des petits neurones ainsi que des cellules satellites.

L'imagerie CARS permet d'analyser l'environnement autour des neurones infectés ainsi que donne de l'information supplémentaire à la structure du tissu. Combinée avec la fluorescence, ces deux techniques se complètent en donnant différentes informations sur les échantillons observés. D'ailleurs, la gaine de myéline d'un axone est riche en membranes de phospholipides, donc l'imagerie CARS est excellente pour pouvoir observer ces structures.

4.2.3 CARS et autofluorescence – mCherry

Comme mentionné à la section 4.1.3, mCherry est une protéine fluorescente rouge. Cette protéine, lorsqu'excitée par de la lumière à une longueur d'onde de 587nm, émettra de la lumière à une longueur d'onde de 610 nm. Pour ce qui est de la fluorescence induite par absorption à deux photons, ce qui est notre cas, la pointe d'excitation survient à 1160 nm [54]. Une protéine fluorescente peut être exprimée librement dans une cellule afin de l'identifier par fluorescence. Une protéine fluorescente peut aussi être liée à une autre protéine non-fluorescente afin de localiser cette dernière

dans une cellule. De plus, il est à noter qu'en biologie, nous distinguons entre les termes fluorescence et autofluorescence par rapport à la fonction primaire d'un objet observé. Si une protéine ou un composé a comme fonction primaire d'être fluorescente, nous mentionnons que nous observons sa fluorescence. Si une protéine ou un élément peut générer de la fluorescence sans que celui-ci fasse parti de sa fonction primaire, nous allons alors parler de son autofluorescence.

Nous voulons pouvoir visualiser le mCherry puisque dans notre étude, celui-ci n'est exprimé que par des cellules infectés. Ceci est donc un outil très pratique pour identifier les cellules infectées parmi un océan de cellules non-infectées. Les neurones possèdent des granules (lipofuscin) au niveau de leur cytoplasme (ce qui entoure le noyau cellulaire). Ces granules démontrent une autofluorescence naturelle près du jaune-rouge (540 à 570 nm). Dans le ganglion trigéminal, nous voulons visualiser la totalité des cellules présentent dans ce tissu, infectées ou non grâce à l'autofluorescence. Évidemment, il fallait prendre soin d'utiliser les bons filtres lorsque nous voulions observer le mCherry, pour ne pas identifier une cellule non-infectée comme étant infectée.

Le recouvrement multiple de membrane cellulaire signifie qu'il y a une grande concentration de membranes formées de phospholipides. Celles-ci peuvent être visualisées par CARS puisque les phospholipides possèdent plusieurs groupes CH_2. Nous voulons visualiser les axones par CARS afin de visualiser l'intégrité d'un neurone, soit son cytoplasme par autofluorescence, ou ses axones par CARS. Les **Figures 4.3 et 4.4** en témoignent.

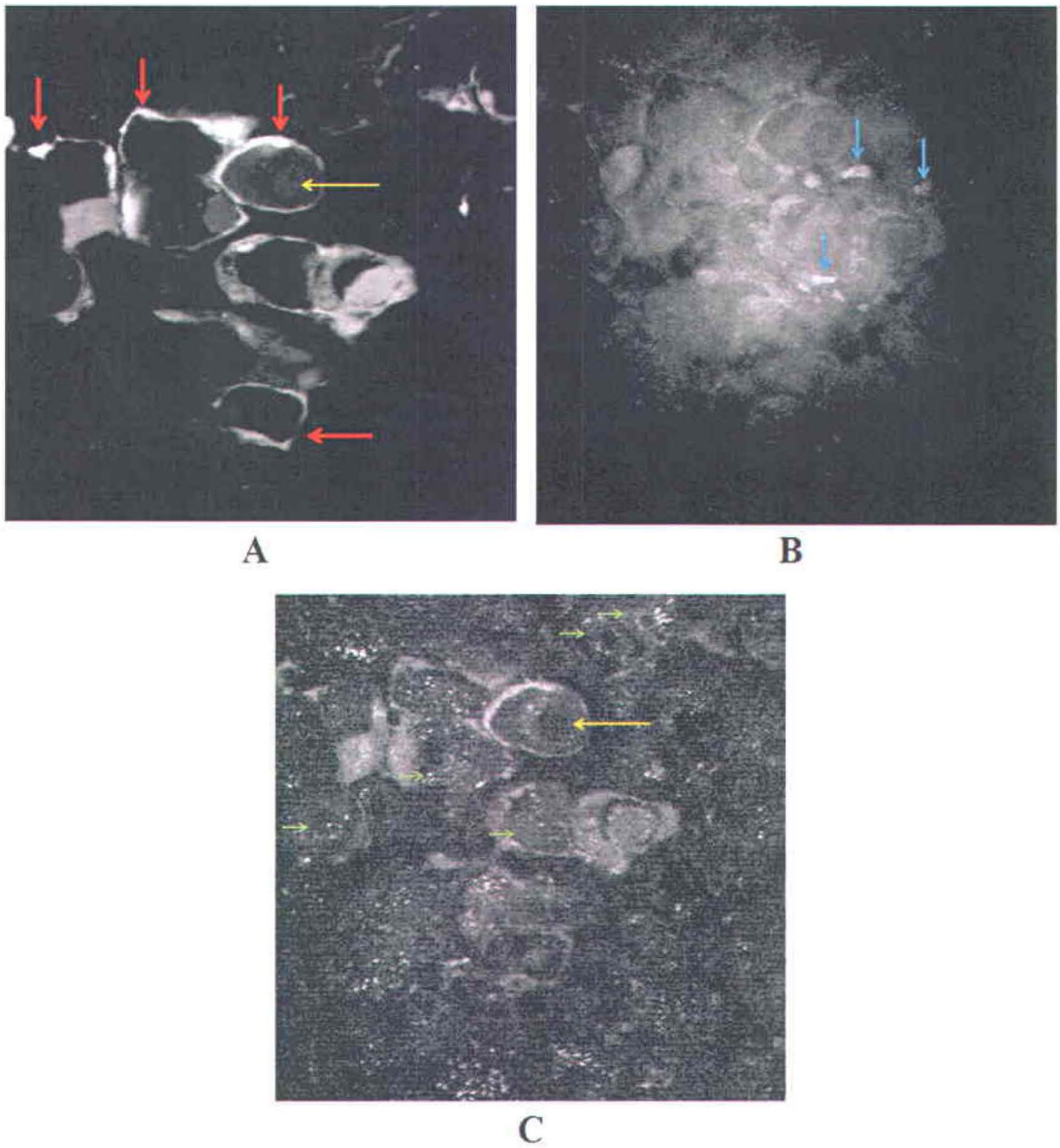


Figure 4.3 – 1ère zone d'images obtenues pour des échantillons tissulaires infectés par un virus exprimant mCherry. **A)** fluorescence du mCherry (cellules infectées). Les flèches indiquent des cellules infectées par le virus qui exprime mCherry. Les flèches rouges indiquent des cellules satellites (petit neurones, cellules gliales) qui semblent entourer de plus grosses cellules. La flèche jaune pointe vers un gros neurone infecté qui est entouré par une plus petite cellule, elle aussi infectée. **B)** CARS (la gaine de myéline et les membranes cellulaires) avec un peu d'autofluorescence. Les flèches bleues représentent du signal CARS avec lequel nous pouvons identifier des axones myélinisés. Des

cytoplasmes de cellules peuvent aussi être identifiés puisque de l'autofluorescence n'est pas totalement bloqué par le filtre utilisé. **C)** L'autofluorescence du tissu (toutes les cellules). Nous pouvons observer une multitude de « beignes » à travers l'image, certains identifiés par de petites flèches vertes. Ce sont des cytoplasmes de gros neurones. La flèche jaune représente le noyau du neurone pouvant être visualisé par mCherry.

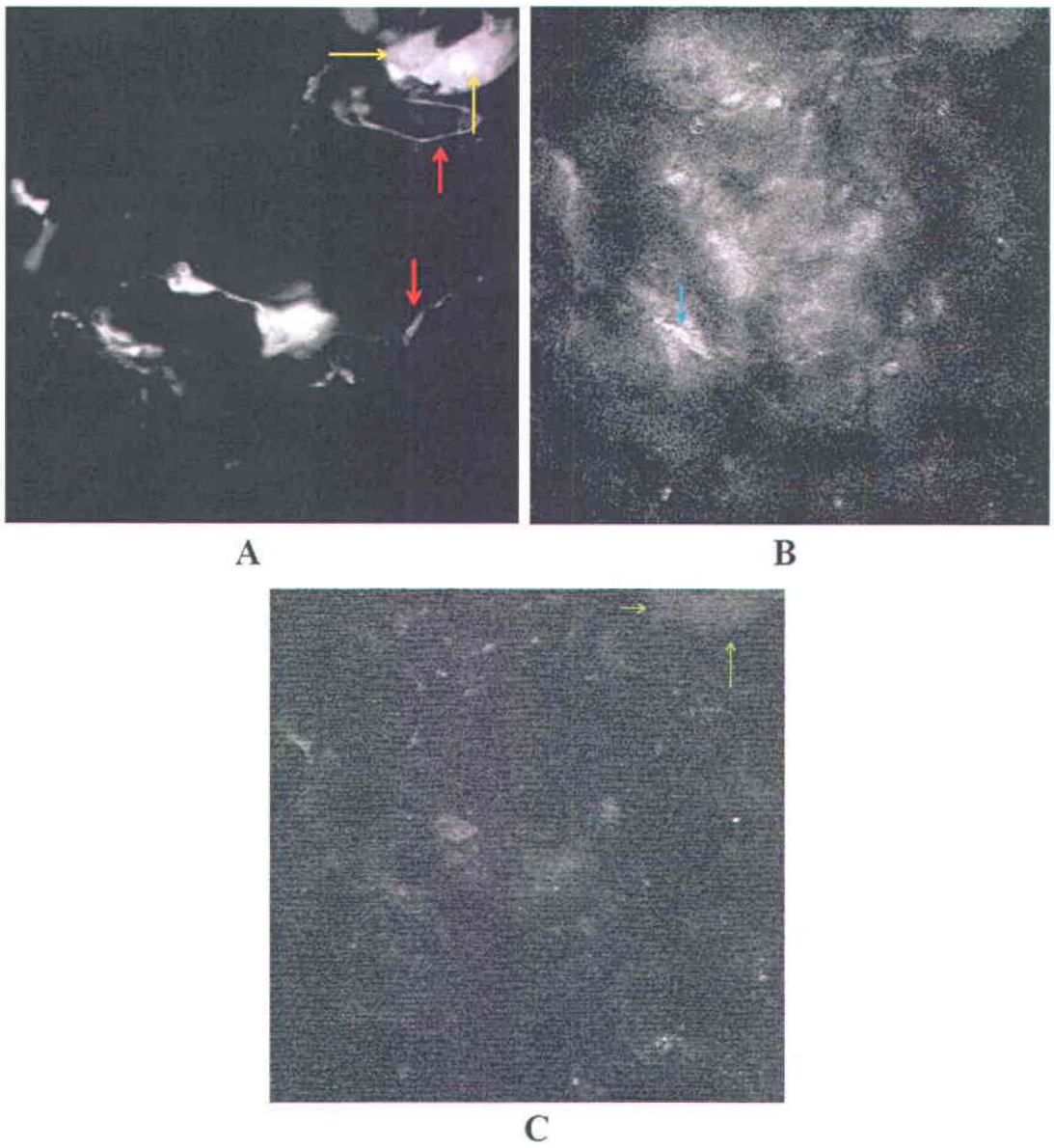


Figure 4.4 – 2ième zone d'images obtenues pour des échantillons de mCherry. **A)** fluorescence du mCherry (cellules infectées). Les flèches indiquent des cellules infectées

par le virus qui exprime mCherry. Les flèches rouges indiquent des cellules satellites (petit neurones, cellules gliales) qui semblent entourer de plus grosses cellules. Les flèches jaunes pointe vers deux gros neurones infectés, facilement identifiable. Le signal de mCherry est clairement plus brillant dans leur noyau que dans leur cytoplasme. **B)** CARS (la gaine de myéline et les membranes cellulaires) avec un peu d'autofluorescence. La flèche bleue représente du signal CARS avec lequel nous pouvons identifier un axone myélinisé. Des cytoplasmes de cellules peuvent aussi être identifiés puisque de l'autofluorescence n'est pas totalement bloqué par le filtre utilisé. **C)** L'autofluorescence du tissu (toutes les cellules). Le cytoplasme des neurones peut être identifié par autofluorescence. Les flèches vertes pointent vers les cellules infectées pouvant être distinguées par rapport aux autres par mCherry. Cette image témoigne donc de la spécificité des filtres pour visualiser mCherry par rapport à l'autofluorescence des cellules totales.

4.2.4 CARS et seconde harmonique – fascia

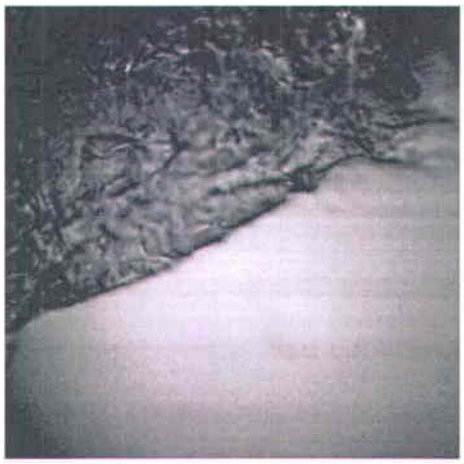
L'imagerie CARS peut également être combinée avec l'imagerie de seconde harmonique, comme le démontre les images suivantes dans le fascia, soit un tissu connectif riche en collagène de type 1.

A

B

C

D



E

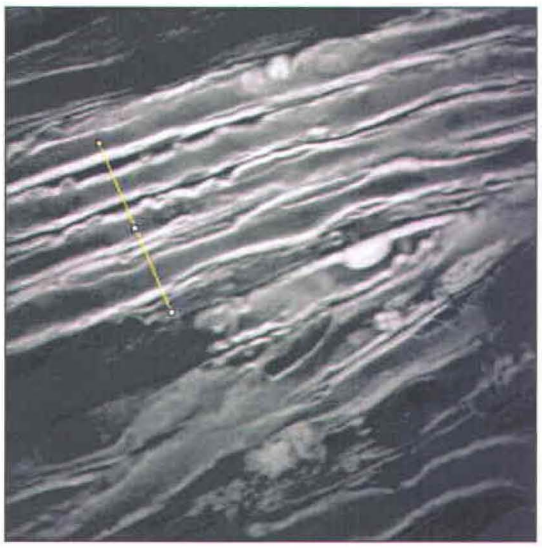
Figure 4.5 – Images obtenues des techniques CARS et de seconde harmonique. Les puissances du Titane: Saphir et du Vanguard sont respectivement 50 mW et 80 mW. L'objectif utilisé est de 40x 1.15. La longueur d'onde du Saphir : Titane utilisée pour les images A à D est de 816 nm. **A-B** : Zone 1 de l'échantillon Fascia ; PMT à 500 V ; les images A et B sont respectivement la seconde harmonique et l'image CARS. **C-E** : Zone 2 de l'échantillon fascia ; à 700 V ; les images C, D et E sont respectivement la seconde harmonique suivis de deux images CARS. La figure E est une image CARS avec une longueur d'onde de 807 nm pour le Titane: Saphir.

Nous pouvons observer l'alignement des fibrilles de collagène grâce à la microscopie de seconde harmonique et nous pouvons observer les feuillets de collagène

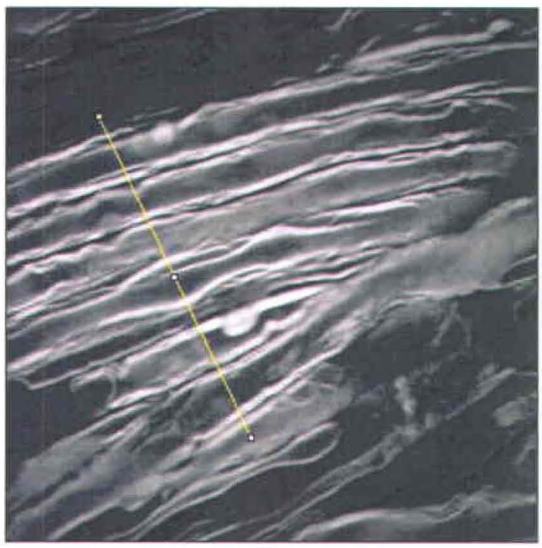
avec la microscopie CARS comme discuté par Pfeffer et al. [65]. En changeant la longueur d'onde du Titane: Saphir avec la fente du filtre d'amplitude, nous pouvons facilement observer des contrastes entre les différentes longueurs d'ondes utilisées. Nous observons que le signal semble plus élevé en bas sur la **Figure 4.5.E** que sur la **Figure 4.5.D**, alors que c'est le même signal. Ce qu'il faut visualiser est le ratio entre le signal de la partie du haut et le signal de la partie du bas de ces deux figures, simplement qu'en haut, il y a une sélectivité spectrale plus élevée, que nous allons discuter plus en détail à la section 4.2.5.

4.2.5 Contraste CARS selon la longueur d'onde de la pompe

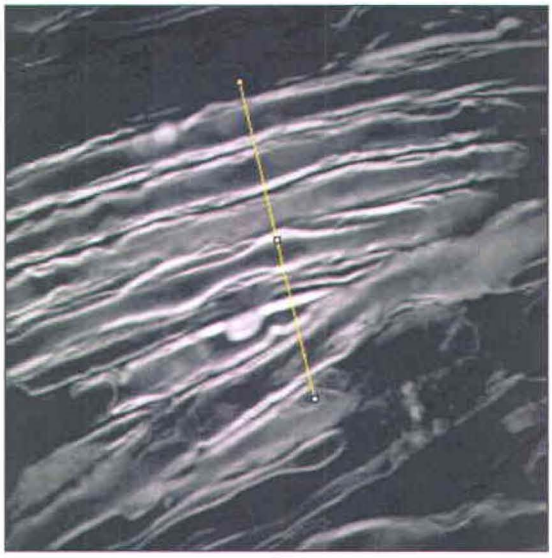
Lorsque nous sélectionnons la longueur d'onde du Titane: Saphir à 816 nm avec le filtre d'amplitude, la fréquence vibrationnelle coïncide avec la différence de fréquence des champs excitateurs pompes et Stokes. Les molécules possédant ce mode vibrationnel oscillent entre leur état fondamental (V=0) et un état réel (V=1). Si nous bougeons la fente hors de la résonance, la contribution vibrationnelle au signal CARS est diminuée. Nous pouvons observer un graphique de la valeur du signal obtenue le long de la ligne jaune visualisée (**Figure 4.6**), ce qui nous donne le ratio entre le signal que nous désirons obtenir et le signal non-résonant. Il est à noter que, pour les images suivantes, la puissance du Titane: Saphir et du Vanguard sont respectivement 50 mW et 80 mW et l'objectif utilisé est le 40x d'ouverture numérique 1.15.



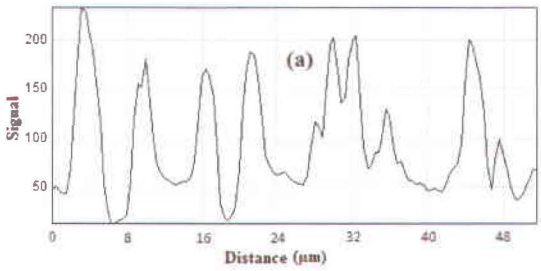
A

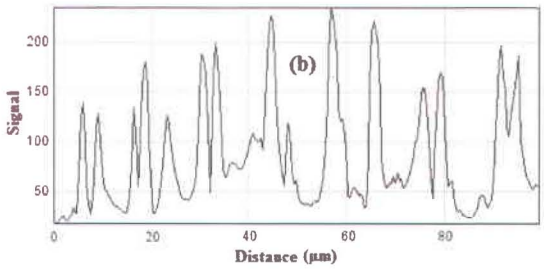


B



C


(a)
Signal
200
150
100
50
0
8
16
24
32
40
48
Distance (µm)


(b)
Signal
200
150
100
50
0
20
40
60
80
Distance (µm)

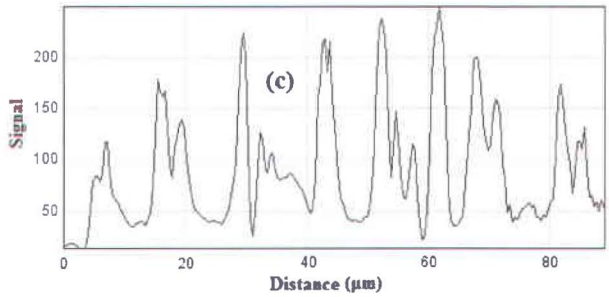
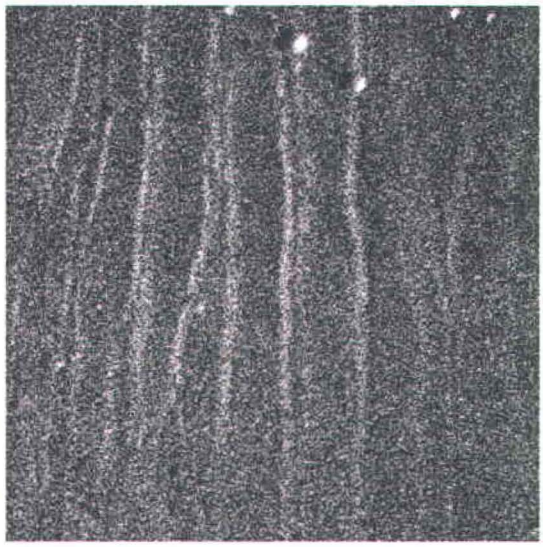


Figure 4.6 – Images et graphiques obtenues de la technique CARS dans la myéline à 816 nm.

Évidemment, à l'aide du filtre d'amplitude, nous pouvons changer la longueur d'onde centrale du Titane: Saphir afin d'observer des contrastes différents selon les longueurs d'ondes utilisées. Nous avons pris des images de 811 nm à 816 nm et nous avons également tracé une ligne jaune afin de visualiser le ratio entre le signal que nous désirons obtenir et le signal non-résonant. Les **Figures 4.7 à 4.12** en témoignent.

811 nm



812 nm

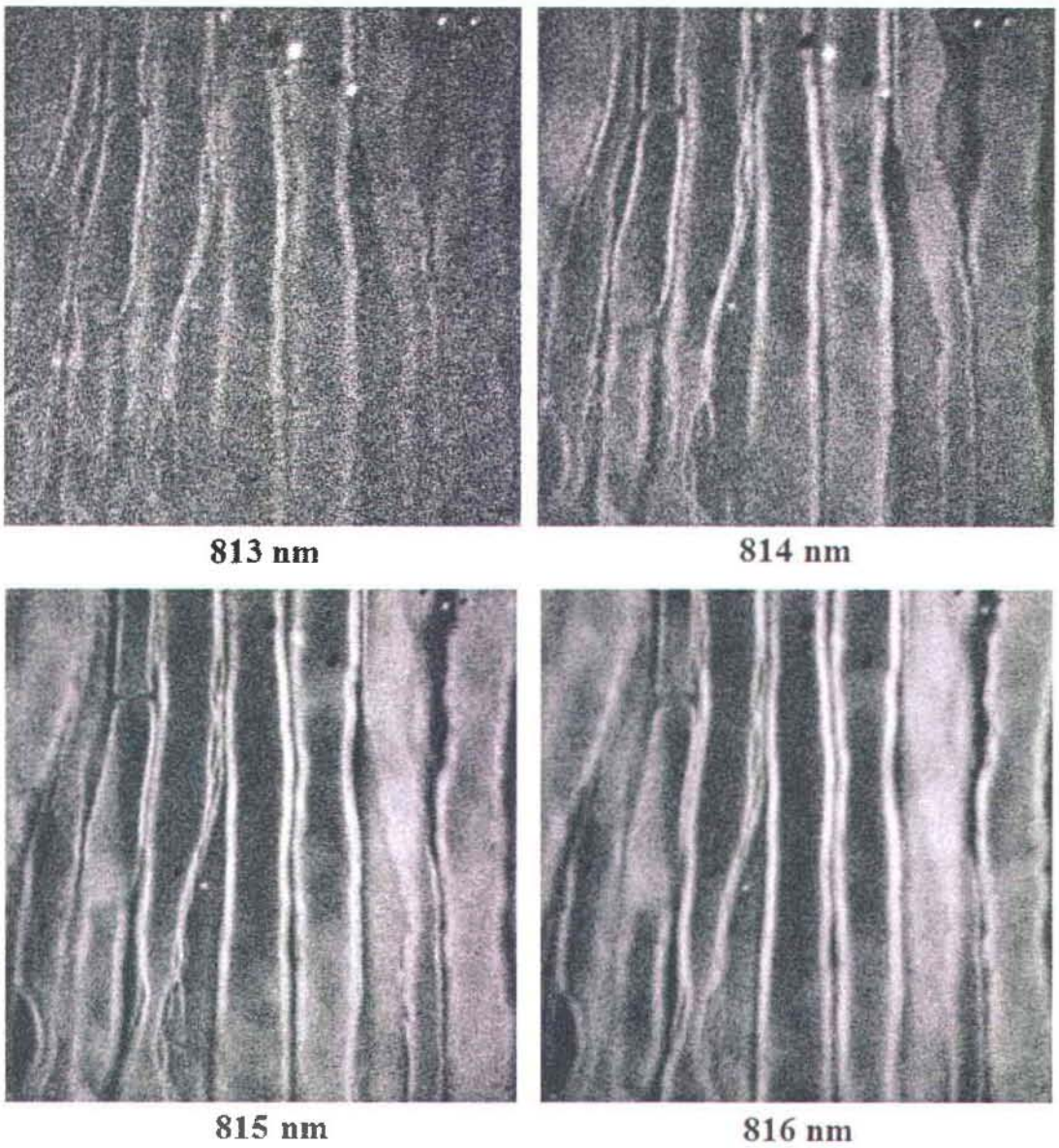


Figure 4.7 – 1ère zone d'images CARS dans la myéline à différentes longueurs d'ondes.

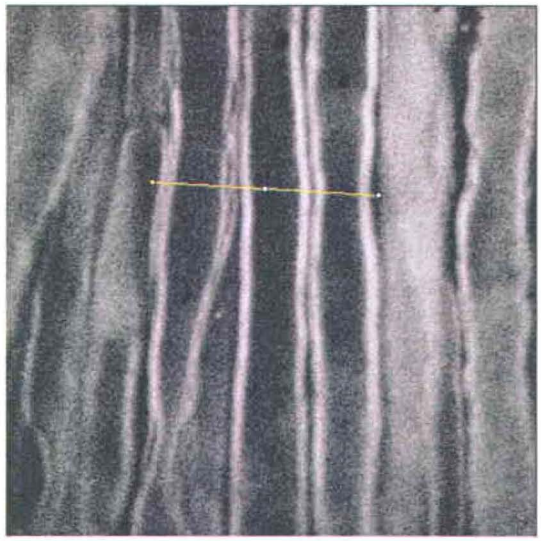


Figure 4.8 – Ligne tracée pour la 1ère zone d'images CARS à différentes longueurs d'ondes.

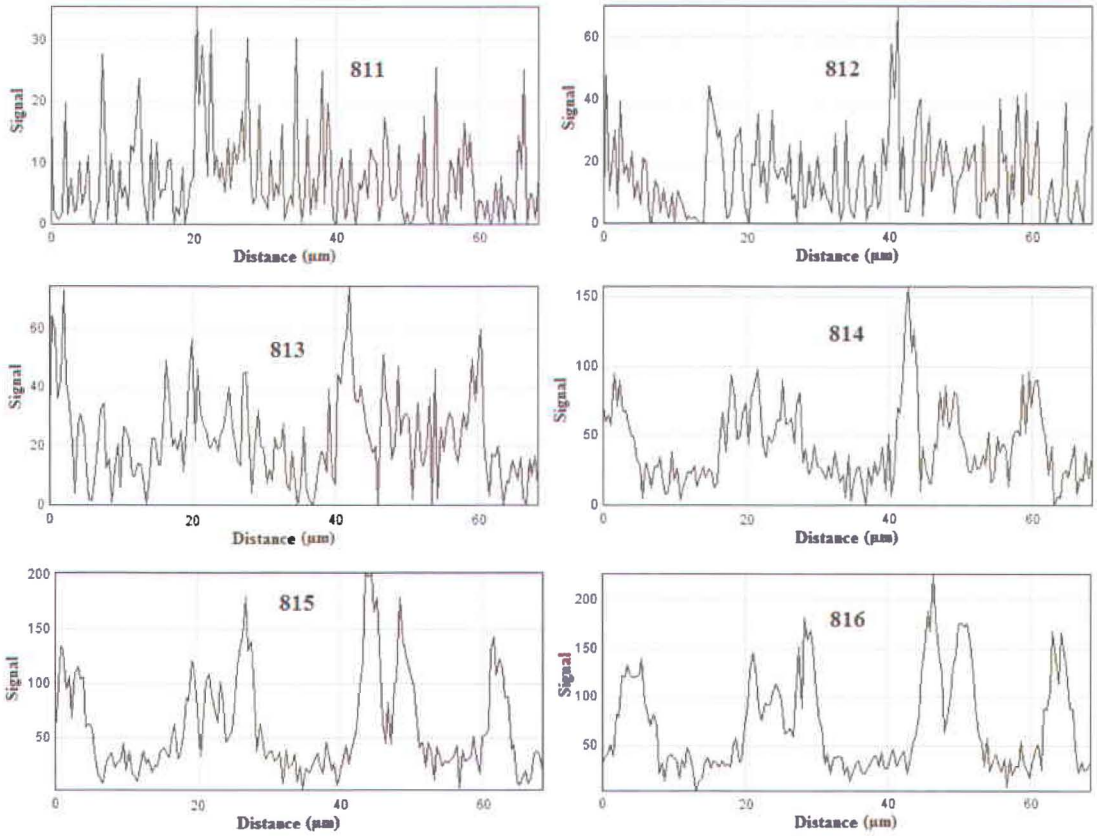
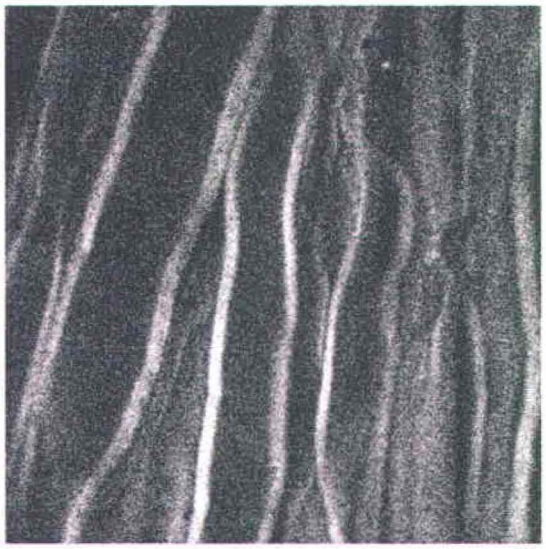


Figure 4.9 – Graphiques obtenus de la 1ère zone CARS dans la myéline à différentes longueurs d'ondes.

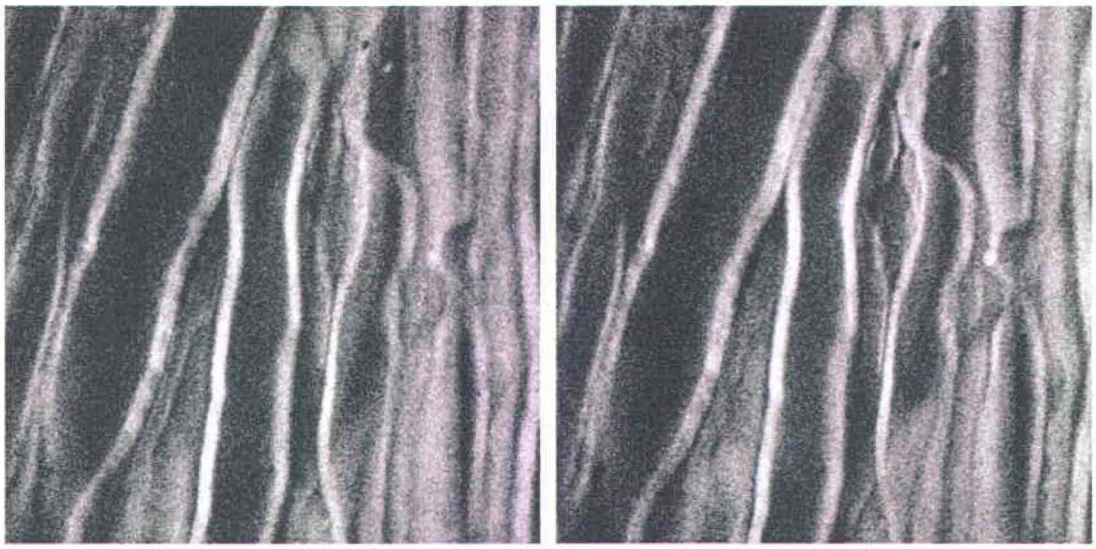
811 nm

812 nm

813 nm



814 nm



815 nm **816 nm**

Figure 4.10 – 2ième zone d'images CARS dans la myéline à différentes longueurs d'ondes.

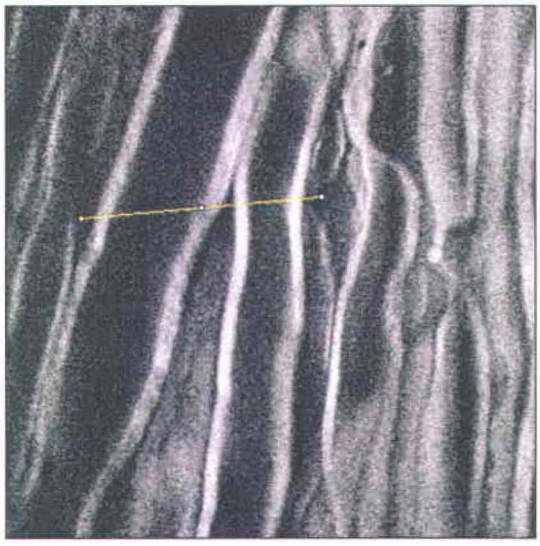


Figure 4.11 – Ligne tracée pour la 2ième zone d'images CARS à différentes longueurs d'ondes.

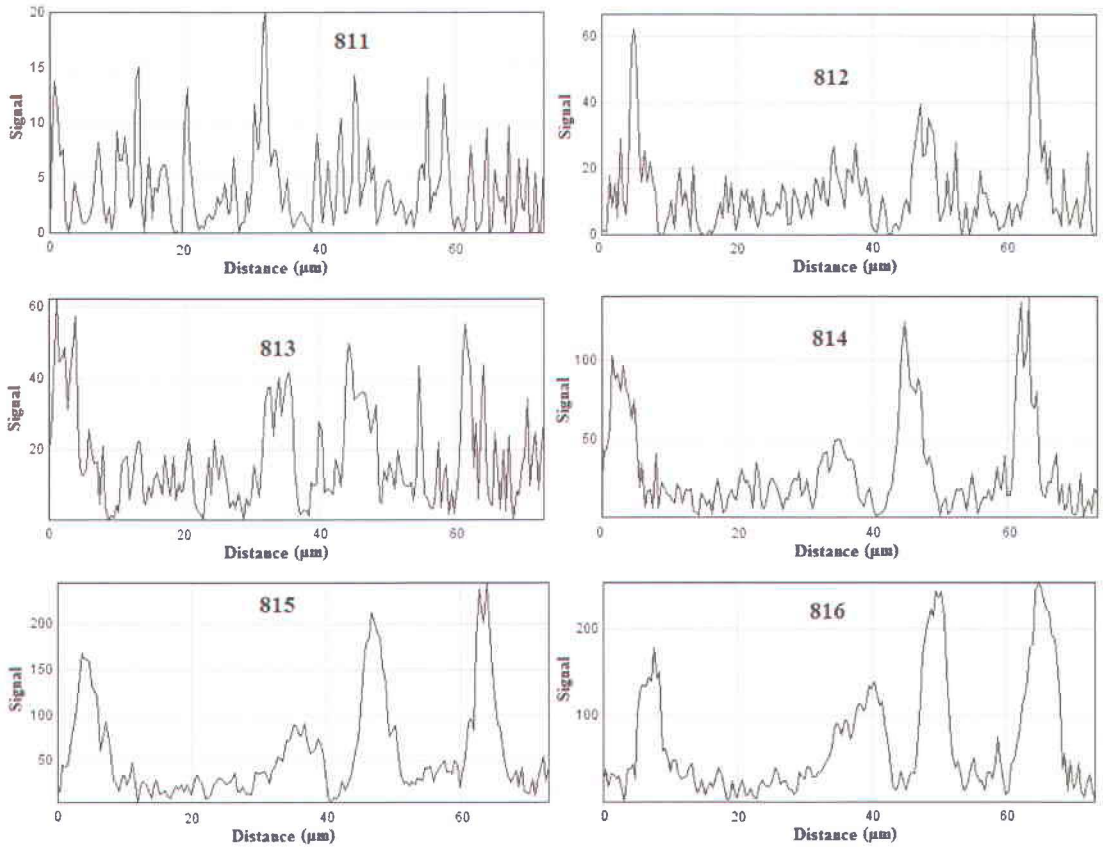
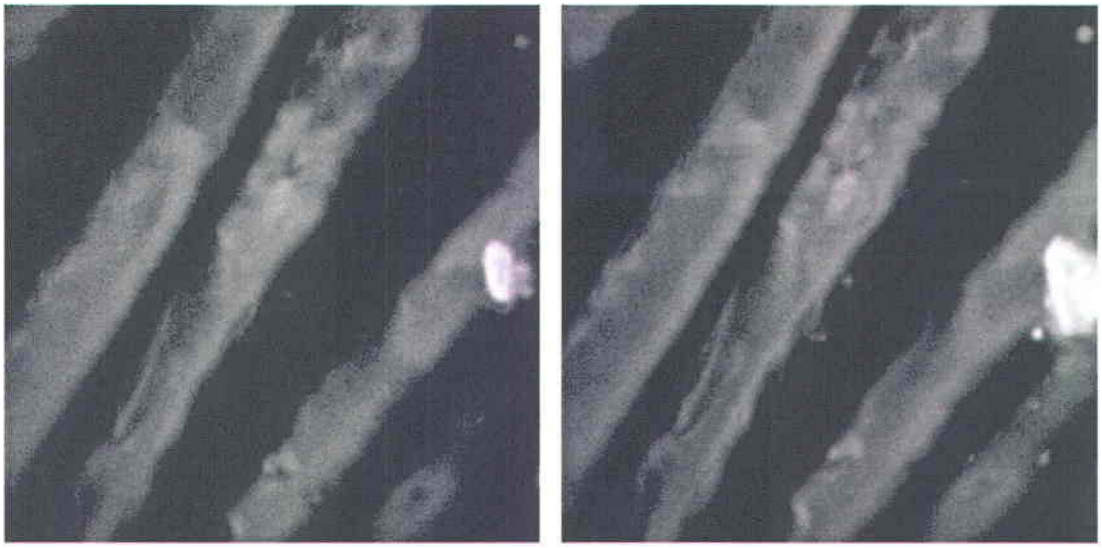


Figure 4.12 – Graphiques obtenus de la 2ième zone CARS dans la myéline à différentes longueurs d'ondes.

Comme nous pouvons l'observer d'après les images précédentes, le signal CARS provenant de la myéline est d'autant plus élevé que la longueur d'onde centrale du Titane: Saphir est proche de 816 nm. Le ratio entre les signaux maximum et minimum dans les images est plus élevé à cette longueur d'onde en raison de l'exaltation de la contribution vibrationnelle au signal CARS. Nous pouvons voir que plus nous nous éloignons de la fréquence vibrationnelle, plus ce ratio diminue. Le contraste dans les images obtenues à 816 nm est bien meilleur que lorsque nous nous éloignons de cette longueur d'onde. Cela démontre également la capacité du montage expérimental à pouvoir choisir la gamme de longueurs d'ondes désirée du laser pompe pour la microscopie CARS.

4.2.6 Photo-dommage dans la myéline

Ici, la plupart des images de myéline ont été prises lorsque la puissance du Titane: Saphir est à environ 50 mW. Évidemment, si nous n'avions que quelques images à prendre, par exemple une dizaine, nous pouvions augmenter cette puissance afin d'avoir un signal CARS plus élevé dans les images observées. Par contre, lorsque nous devions prendre un grand nombre d'images, par exemple plus d'une cinquantaine, il était bien important de ne pas utiliser une puissance trop élevée afin de ne pas endommager le tissu biologique (photo-dommage). La **Figure 4.13** représente des images obtenues en augmentant la puissance du Titane: Saphir à 65 mW à différente profondeur de z.



Z = 1 **Z = 2**

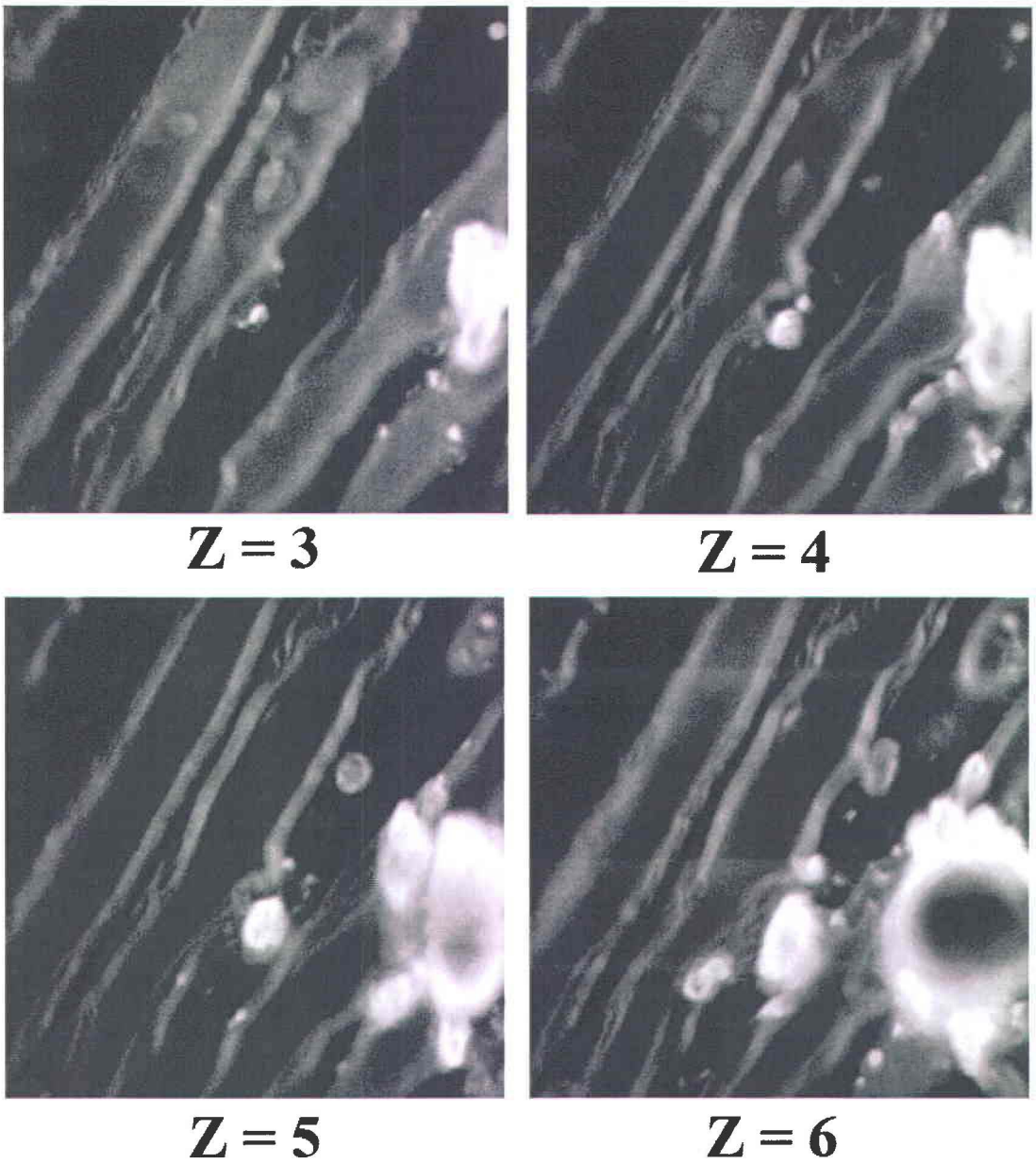


Figure 4.13 – Photo-dommage observé dans la myéline.

Comme nous pouvons le visualiser, chaque balayage du faisceau endommageait un peu plus la zone observée. Nous pouvons voir ces bulles blanches grossir à la figure précédente après chaque nouveau balayage. Il est à noter que nous avons pris une quinzaine d'images par profondeur de z. Nous allions de plus en plus profond dans le tissu de myéline observé, prenant des images l'une à la suite de l'autre, ce qui nous a amené à la conclusion du photo-dommage [66] avec les images obtenues et donc, de

définir une puissance maximale pour le faisceau laser Titane: Saphir qui est d'environ 50 mW. Par la suite, nous avons pu réaliser la microscopie CARS sans endommager l'échantillon, ce qui nous a donné les images vues précédemment. Il est à noter que le photo-dommage n'a aucun lien avec la profondeur du z, mais bien au temps et au nombre de fois que les lasers balayent l'échantillon biologique [66].

CONCLUSION

En conclusion, ce mémoire a présenté une nouvelle approche utilisant un oscillateur laser Titane: Saphir, un oscillateur laser 1064 nm, une électronique de synchronisation et un filtre d'amplitude de géométrie 4f afin de pouvoir intégrer l'imagerie CARS à un microscope optique non-linéaire pouvant faire de l'imagerie de fluorescence par absorption à deux photons ou de seconde harmonique. Nous avons pu réunir les deux lasers spatialement et temporellement dans le montage optique à l'aide d'une ligne à délai et d'un miroir dichroïque. Le filtre d'amplitude fut utilisé afin de réduire et pouvoir choisir la bande spectrale désirée pour le laser pompe et ainsi augmenter la durée de l'impulsion. De plus, nous avons pu caractériser l'intensité temporelle des impulsions lasers à l'aide d'un autocorrélateur d'intensité et ainsi calculer la durée des impulsions.

La réalisation de ce projet de recherche passait nécessairement par la compréhension théorique de différentes techniques d'imagerie de microscopie non-linéaire, soient la fluorescence par absorption à deux photons, la seconde harmonique, la troisième harmonique et l'imagerie CARS. Les trois premières techniques de microscopie mentionnées sont optimisées par l'utilisation d'impulsions femtosecondes car ces processus dépendent seulement de l'intensité laser. Pour la microscopie CARS, nous devions réduire la bande spectrale des impulsions femtosecondes afin d'obtenir un excellent contraste spectroscopique pour l'imagerie des lipides [3]. Une fois la bande spectrale réduite, les impulsions ont une durée de l'ordre de 1.5 picoseconde. Nous avons donc réduit la bande spectrale du faisceau laser pompe vu que sa durée était d'une centaine de femtosecondes.

De fait, je devais acquérir des connaissances plus approfondi dans la microscopie CARS, commençant par la diffusion Raman et par la suite, démontrant les processus engendrant le comportement du tenseur χ^3, l'intensité anti-Stokes totale ainsi que la génération du signal anti-Stokes. Enfin, une fois la mise en œuvre effectuée, nous avons

pu obtenir des images avec les différentes techniques de microscopie et ce, pour les différents tissus analysés. Nous avons optimisé le montage de façon à ce que le ratio entre la contribution vibrationnelle de CARS par rapport à la contribution électronique de CARS soit le plus élevé possible. En effet, grâce au filtre d'amplitude et à l'autocorrélateur d'intensité, nous avons pu produire un graphique de la durée en fonction de l'ouverture de la fente. Les résultats démontrent qu'à 500 microns d'ouverture, la durée de l'impulsion est de 1.4 picoseconde et qu'à 400 microns, la durée est de 1.8 picoseconde.

Par la suite, nous avons pu imager des échantillons biologiques, soit le fascia et un tissu composé de nerfs qui sont riches en myéline. Pour l'imagerie du système nerveux, nous avons étudié trois possibilités : Un tissu prélevé chez une souris non-infecté, infecté par le virus exprimant mCherry et un autre infecté par le virus exprimant 78UStdtomato. Les images obtenues avec ce système démontrent très bien la complémentarité des techniques d'imagerie réalisées, soient la fluorescence, la seconde harmonique et la microscopie CARS. Toutes ces techniques de microscopie permettent d'obtenir des informations spécifiques sur l'échantillon biologique quant aux types de tissus et de molécules présentes et ce, sans modifier l'échantillon observé lors de l'acquisition des images. Nous avons pu facilement distinguer les cellules infectées avec la fluorescence. Les membranes de cellules sont des couches de phospholipides et un axone est enrobé de sa gaine de myéline, riche en membranes, donc la microscopie CARS est idéale pour pouvoir observer ces structures en utilisant le contraste spectroscopique basée sur la vibration symétrique CH_2. L'imagerie CARS permet d'analyser l'environnement autour des neurones infectés ainsi que de donner des informations supplémentaires sur la structure des tissus. Nous avons pu également observer l'alignement des fibrilles de collagène grâce à la technique de seconde harmonique et les feuillets grâce à la microscopie CARS.

Par la suite, nous avons observé différents contrastes de la microscopie CARS lorsque nous changions la longueur d'onde de la pompe à l'aide du filtre d'amplitude, ce qui a démontré le fonctionnement de celui-ci. Le signal CARS de la myéline est d'autant

plus élevé que la longueur d'onde centrale du Titane: Saphir est proche de 816 nm car le ratio entre les signaux élevés et minimum est plus élevé vu que c'est non loin de la résonance vibrationnelle. Nous avons pu observer que lorsque la différence de fréquences entre les faisceaux pompe et Stokes s'éloigne de la fréquence vibrationnelle, le contraste d'imagerie diminue. Il a également été possible de visualiser le photo-dommage du Titane: Saphir infligé aux échantillons biologiques lorsque la puissance de celui-ci était trop élevée.

Nous devions développer une plateforme commune pour plusieurs techniques de microscopie optique non-linéaire, que celles-ci soient optimales et disponibles avec les infrastructures que nous disposions dans le laboratoire et ce système a été réalisé avec succès. Les travaux présentés dans ce mémoire sur la microscopie CARS ne sont qu'un début et d'autres améliorations seront apportés au montage dans les années futures par l'équipe du Prof. François Légaré. D'une part, l'utilisation d'un filtre contrôlé par ordinateur qui remplacera le filtre d'amplitude qui a été construit, ce qui donnera une meilleure précision et une plus grande rapidité d'exécution vu que la sélection de la bande spectrale se fera électroniquement et non manuellement. Par la suite, une autre optimisation du système sera de réduire la durée d'impulsion du laser Vanguard 1064 nm à environ 2 picosecondes afin que la microscopie CARS puisse être optimale. Enfin, une autre perspective future sera de modifier le filtre d'amplitude, soit la fente de celui-ci, afin d'optimiser le montage et de pouvoir produire la microscopie CARS par modulation de fréquences.

ANNEXE A

Démonstration de l'équation d'onde de l'optique non-linéaire

Considérons la forme d'une équation d'onde pour la propagation de la lumière dans un système non-linéaire optique. Nous commençons avec les équations de Maxwell que nous écrivons en unités internationales :

$$\nabla \cdot \widetilde{D} = \widetilde{\rho} \tag{A.1}$$

$$\nabla \cdot \widetilde{B} = 0 \tag{A.2}$$

$$\nabla \times \widetilde{E} = -\frac{\partial \widetilde{B}}{\partial t} \tag{A.3}$$

$$\nabla \times \widetilde{H} = \frac{\partial \widetilde{D}}{\partial t} + \widetilde{J} \tag{A.4}$$

Nous sommes d'abord intéressés par la solution de ses équations dans la région de l'espace qui ne contient pas de charges libres et aucun courant libre, alors :

$$\widetilde{\rho} = 0 \tag{A.5}$$

$$\widetilde{J} = 0 \tag{A.6}$$

Il est à noter que le symbole ~ dénote une quantité qui varie très rapidement avec le temps. Nous supposons également que le matériel est non-magnétique :

$$\widetilde{B} = \mu_0 \widetilde{H} \tag{A.7}$$

Aussi, nous émettons que le matériel est non-linéaire dans le sens où $\widetilde{D}$ et $\widetilde{E}$ sont reliés avec la formule :

$$\widetilde{D} = \varepsilon_0 \widetilde{E} + \widetilde{P} \tag{A.8}$$

où en général le vecteur de polarisation $\widetilde{P}$ dépend non-linéairement de la valeur locale du champ électrique $\widetilde{E}$. Maintenant, nous procédons aux démonstrations des équations. Nous prenons le rotationnel du rotationnel de l'équation A.3, nous changeons

l'ordre des dérivées en espace et en temps du côté droit de l'équation de l'équation résultante et nous utilisons les équations A.4, A.6 et A.7 pour obtenir l'équation :

$$\nabla\times\left(\nabla\times\widetilde{E}\right)=\nabla\times\left(-\frac{\partial\widetilde{B}}{\partial t}\right)=\nabla\times\left(-\frac{\partial\left(\mu_0\widetilde{H}\right)}{\partial t}\right)=\left(-\frac{\partial\left(\mu_0\left(\frac{\partial\widetilde{D}}{\partial t}+\widetilde{J}\right)\right)}{\partial t}\right)=\mu_0\left(-\frac{\partial\frac{\partial\widetilde{D}}{\partial t}}{\partial t}\right)=-\mu_0\frac{\partial^2\widetilde{D}}{\partial t^2}$$

$$\nabla\times\left(\nabla\times\widetilde{E}\right)+\mu_0\frac{\partial^2\widetilde{D}}{\partial t^2}=0 \qquad \text{(A.9a)}$$

Nous utilisons l'équation A.8 pour éliminer $\widetilde{D}$ de cette équation. D'ailleurs, nous savons que $\mu_0=1/\varepsilon_0c^2$, ce qui nous donne :

$$\mu_0\frac{\partial^2\left(\varepsilon_0\widetilde{E}+\widetilde{P}\right)}{\partial t^2}=\frac{1}{\varepsilon_0c^2}\frac{\partial^2\left(\varepsilon_0\widetilde{E}+\widetilde{P}\right)}{\partial t^2}=\frac{1}{c^2}\frac{\partial^2\left(\widetilde{E}\right)}{\partial t^2}+\frac{1}{\varepsilon_0c^2}\frac{\partial^2\left(\widetilde{P}\right)}{\partial t^2}$$

$$\nabla\times\left(\nabla\times\widetilde{E}\right)+\frac{1}{c^2}\frac{\partial^2\widetilde{E}}{\partial t^2}=-\frac{1}{\varepsilon_0c^2}\frac{\partial^2\widetilde{P}}{\partial t^2} \qquad \text{(A.9b)}$$

Nous utilisons l'identité A.10 pour minimiser l'équation A.9.b.

$$\nabla\times\left(\nabla\times\widetilde{E}\right)=\nabla\left(\nabla\cdot\widetilde{E}\right)-\nabla^2\widetilde{E} \qquad \text{(A.10)}$$

Dans l'optique linéaire de source libre isotropique, le premier terme du côté droit de l'équation disparaît à cause de l'équation de Maxwell $\nabla\cdot\widetilde{D}=0$ impliquant $\nabla\cdot\widetilde{E}=0$. En optique non-linéaire, ce terme ne disparaît pas même pour un matériel isotropique, ce qui est une conséquence de la relation de l'équation A.8 entre $\widetilde{D}$ et $\widetilde{E}$. Évidemment, en optique non-linéaire, le premier terme du côté droit de l'équation A.10 peut être enlevé pour les cas qui nous intéressent. Par exemple, si $\widetilde{E}$ est la forme d'une transverse, d'une onde plane infini, $\nabla\cdot\widetilde{E}$ se volatilise complètement. De manière plus générale, le premier terme peut être identifié pour être petit, même quand il ne disparaît pas complètement,

spécialement quand l'approximation de la variation d'amplitude est valide (voir section 1.4). Donc, nous supposons que la contribution du terme $\nabla(\nabla \cdot \widetilde{E})$ est négligeable dans l'équation A.10, ce qui nous donne l'équation :

$$\nabla \times (\nabla \times \widetilde{E}) + \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{E}}{\partial t^2} = -\nabla^2 \widetilde{E} + \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{E}}{\partial t^2} = -\frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{P}}{\partial t^2}$$

$$\nabla^2 \widetilde{E} - \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{P}}{\partial t^2} \tag{A.11}$$

Également, l'équation d'onde peut se mettre sous la forme :

$$\nabla^2 \widetilde{E} - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{D}}{\partial t^2} = 0 \tag{A.12}$$

où $\widetilde{D} = \varepsilon_0 \widetilde{E} + \widetilde{P}$. De ce fait, séparons les termes linéaire et non-linéaire :

$$\widetilde{P} = \widetilde{P}^{(1)} + \widetilde{P}^{NL} \tag{A.13}$$

où $\widetilde{P}^{(1)}$ est la partie de $\widetilde{P}$ qui dépend linéairement au champ électrique $\widetilde{E}$. De façon similaire, nous pouvons décomposer l'induction électrique $\widetilde{D}$ en termes linéaire et non-linéaire :

$$\widetilde{D} = \widetilde{D}^{(1)} + \widetilde{P}^{NL} \tag{A.14a}$$

où la partie linéaire est donnée par :

$$\widetilde{D}^{(1)} = \varepsilon_0 \widetilde{E} + \widetilde{P}^{(1)} \tag{A.14b}$$

En ces termes, nous pouvons réécrire l'équation A.11 comme :

$$\nabla^2 \widetilde{E} - \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{P}}{\partial t^2}$$

$$\nabla^2 \widetilde{E} - \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2 \frac{\left(\widetilde{D}^{(1)} - \widetilde{P}^{(1)}\right)}{\varepsilon_0}}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \left(\widetilde{P}^{(1)} + \widetilde{P}^{NL}\right)}{\partial t^2}$$

$$\nabla^2 \widetilde{E} - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \left(\widetilde{D}^{(1)} - \widetilde{P}^{(1)}\right)}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \left(\widetilde{P}^{(1)} + \widetilde{P}^{NL}\right)}{\partial t^2}$$

$$\nabla^2 \widetilde{E} - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \left(\widetilde{D}^{(1)}\right)}{\partial t^2} + \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \left(\widetilde{P}^{(1)}\right)}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \left(\widetilde{P}^{NL}\right)}{\partial t^2} + \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \left(\widetilde{P}^{(1)}\right)}{\partial t^2}$$

$$\nabla^2 \widetilde{E} - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{D}^{(1)}}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{P}^{NL}}{\partial t^2} \qquad \text{(A.15)}$$

Nous pouvons exprimer la relation entre $\widetilde{D}^{(1)}$ et $\widetilde{E}$ en terme réel avec le tenseur diélectrique $\varepsilon^{(1)}$ comme :

$$\widetilde{D}^{(1)} = \varepsilon_0 \varepsilon^{(1)} \cdot \widetilde{E} \qquad \text{(A.16a)}$$

Pour le cas d'un matériel isotropique, nous réduisons l'équation à :

$$\widetilde{D}^{(1)} = \varepsilon_0 \varepsilon^{(1)} \widetilde{E} \qquad \text{(A.16b)}$$

Où $\varepsilon^{(1)}$ est une quantité scalaire. Nous utilisons la convention $\varepsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$ F/m comme étant une constante fondamentale, la permittivité diélectrique du vide, où $\varepsilon^{(1)}$ est la permittivité relative qui est différente pour chaque matériau. L'équation A.15 devient alors :

$$-\nabla^2\widetilde{E}+\frac{\varepsilon^{(1)}}{c^2}\frac{\partial^2\widetilde{E}}{\partial t^2}=-\frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2\widetilde{P}^{NL}}{\partial t^2} \tag{A.17}$$

Cette équation a la forme d'une équation d'onde inhomogène. La réponse non-linéaire de l'espace agit, comme une source, comme étant le côté droit de l'équation. Sachant la vitesse c/n, où n est l'indice linéaire de réfraction qui satisfait $n^2=\varepsilon^{(1)}$. Pour le cas d'un système dispersif, nous devons considérer chaque composante de fréquences du champ séparément. Nous représentons le champ électrique, le déplacement linéaire et la polarisation du champ comme une somme des variations de composantes de fréquences :

$$\widetilde{E}(r,t)=\sum_n \widetilde{E}_n(r,t) \tag{A.18a}$$

$$\widetilde{D}^{(1)}(r,t)=\sum_n \widetilde{D}_n^{(1)}(r,t) \tag{A.18b}$$

$$\widetilde{P}^{NL}(r,t)=\sum_n \widetilde{P}_n^{NL}(r,t) \tag{A.18c}$$

Où la somme est pour les fréquences positives seulement et nous représentons chaque composante de fréquences en des termes d'amplitude complexe :

$$\widetilde{E}_n(r,t)=E_n(r)e^{-i\omega_n t}+c.c. \tag{A.19a}$$

$$\widetilde{D}_n^{(1)}(r,t)=D^{(1)}{}_n(r)e^{-i\omega_n t}+c.c. \tag{A.19b}$$

$$\widetilde{P}_n^{NL}(r,t)=P^{NL}{}_n(r)e^{-i\omega_n t}+c.c. \tag{A.19c}$$

Il est à noter que c.c. représente le complexe conjugué de l'équation en question. Si la dissipation peut être négligée, la relation entre $\widetilde{D}_n^{(1)}$ et $\widetilde{E}_n$ peut être exprimé en termes réels à l'aide du tenseur diélectrique :

$$\widetilde{D}_n^{(1)}(r,t)=\varepsilon_0\varepsilon^{(1)}(\omega_n)\cdot\widetilde{E}_n(r,t) \tag{A.20}$$

Quand les équations A.18a et A.20 sont introduit dans l'équation A.15, nous obtenons une équation d'onde analogue à l'équation A.17 qui est valide pour chaque composante de fréquences du champ :

$$\nabla^2 \widetilde{E}_n - \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_n)}{c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{E}_n}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{P}_n^{NL}}{\partial t^2} \tag{A.21}$$

Le cas général d'un système dissipatif traité avec le tenseur diélectrique pour être une quantité complexe reliée à l'amplitude du champ complexe est :

$$D_n^{(1)}(r) = \varepsilon_0 \varepsilon^{(1)}(\omega_n)\cdot E_n(r) \tag{A.22}$$

Cette relation, avec les équations A.17 et A.18, peut être introduite dans l'équation d'onde A.15 pour obtenir :

$$\nabla^2 \widetilde{E} - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{D}^{(1)}}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 \widetilde{P}^{NL}}{\partial t^2}$$

$$\nabla^2 E_n(r) - \frac{\varepsilon^{(1)}}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2\left(\varepsilon_0 \varepsilon^{(1)}(\omega_n)\cdot E_n(r)\right)}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 P_n^{NL}(r)}{\partial t^2}$$

$$\nabla^2 E_n(r) - \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2\left(\varepsilon^{(1)}(\omega_n)\cdot E_n(r)\right)}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial^2 P_n^{NL}(r)}{\partial t^2}$$

$$\nabla^2 E_n(r) - \frac{-i\omega_n}{c^2}\frac{\partial\left(\varepsilon^{(1)}(\omega_n)\cdot E_n(r)\right)}{\partial t} = \frac{-i\omega_n}{\varepsilon_0 c^2}\frac{\partial P_n^{NL}(r)}{\partial t}$$

$$\nabla^2 E_n(r) - \frac{(-i\omega_n)^2}{c^2}\varepsilon^{(1)}(\omega_n)\cdot E_n(r) = \frac{(-i\omega_n)^2}{\varepsilon_0 c^2}P_n^{NL}(r)$$

$$\nabla^2 E_n(r) + \frac{(\omega_n)^2}{c^2}\varepsilon^{(1)}(\omega_n)\cdot E_n(r) = \frac{-(\omega_n)^2}{\varepsilon_0 c^2}P_n^{NL}(r)$$

$$\nabla^2 E_n(r) + \frac{\omega_n^2}{c^2}\varepsilon^{(1)}(\omega_n)\cdot E_n(r) = -\frac{\omega_n^2}{\varepsilon_0 c^2}P_n^{NL}(r) \tag{A.23}$$

RÉFÉRENCES

[1] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, *Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope*, Optics Letters, Vol. **7**, No. 8, (1982).

[2] A. Zumbusch, Gary R. Holtom, and X. Sunney Xie, *Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*, Physical Review Letters, Vol. **82**, No 20 (1999).

[3] J.-X. Cheng, A. Volkmer, L. Book, and X. 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).

[4] E.A. Jares-Erijman and T.M. Jovin, *FRET imaging*, *Nat. Biotech.* **21**, 1387-1395 (2003).

[5] F. Helmchen and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*, *Nat. Meth.* **2**, 932-940 (2005).

[6] P.J. Campagnola and L.M. Loew, *Second-Harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms*, *Nat. Biotech.* **21**, 1356-1360 (2003).

[7] D. Débarre, W. Suppato, A.M. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, *Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy*, *Nat. Biotech.* **3**, 47-53 (2006).

[8] C.L. Evans, E.O. Potma, M. Puoris'haag, D. Côté, C.P. Lin, and X.S.Xie, *Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16807-16812 (2005).

[9] Ji-Xin Cheng and X. Sunney Xie, *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications*, J. Phys. Chem., Vol. **108**, No. 3 (2004).

[10] M. Müller and A. Zumbusch, *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*, Chem. Phys. Chem., **8**, 2156-2170 (2007).

[11] H. Wang, Yan Fu, P. Zickmund, Riyi Shi and Ji-Xin Cheng, *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Imaging of Axonal Myelin in Live Spinal Tissues*, Biophysical Journal, Vol. **89**, 581-591 (2005).

[12] http://www.exchem.fr/Dossiers/TherapiePDT.pdf.

[13] W. Denk, J. Strickler, and W. Web *Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy*», Science **248**(4951), 73-76 (1990).

[14] R. Gauderon, P. Lukins, and C.Sheppard, *Three-dimensional second-harmonic generation imaging with femtosecond laser pulses*, Optics Letters **23**(15), 1209-1211 (1998).

[15] Y. Barad, H Eisenberg, M.Horowitz, and Y.Silberberg, *Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation*, Applied Physics Letters **70**(8), 922-924 (1997).

[16] F. Gravier and B. Boulanger, *Cubic parametric frequency generation in rutile single crystal*, Opt. Express **14** (24), 11715 (2006).

[17] K. Miyata *et al.*, *Phase-matched pure $\chi^{(3)}$ third-harmonic generation in noncentrosymmetric BiB_3O_6*, Optics Letters **34** (4), 500 (2009).

[18] L. Moreaux, O. Sandre, and J.Mertz, *Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy*, Journal of the Optical Society of America B **17**(10), 1685-1694 (2000).

[19] L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M.Blanchard-Desce, and J.Mertz, *Coherent Scattering in Multi-Harmonic Light Microscopy*, Biophysical Journal **80**, 1568-1574 (2001).

[20] Robert W, Boyd. *Nonlinear Optics*, Third Edition, Section 1.4, p 21-33.

[21] M. Müller, J. Squier, R. Wilson, and G. Brakenhoff, *3D microscopy of transparent objects using third-harmonic generation,* Journal of Microscopy **191**(3), 266-274 (1998).

[22] D. Débarre, W. Supatto, and E Beaurepaire, *Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy*, Optics Letters **30**(16) (2005).

[23] A. Laubereau and W. Kaiser, *Vibrational dynamics of liquids and solid investigated by picosecond light pulses*, Reviews of Modern Physics **50**(3), 607-665 (1978).

[24] Robert W, Boyd. *Nonlinear Optics*, Third Edition, Chapter 1, p 1-65.

[25] Robert W, Boyd. *Nonlinear Optics*, Third Edition, Figure 2.1.1, p 70.

[26] Robert W, Boyd. *Nonlinear Optics*, Third Edition.

[27] Robert W, Boyd. *Nonlinear Optics*, Third Edition, Section 1.5.7, p 41.

[28] Robert W, Boyd. *Nonlinear Optics*, Third Edition, Section 1.5.6, p 39.

[29] L. Gouy, *Sur une propriété nouvelle des ondes lumineuses»*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris) **110**, 1251 (1890).

[30] L. Gouy, *Sur la propagation anormale des ondes*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris) **111**, 33 (1890).

[31] M. Rivard, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, C. Harnagea, C. 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, Vol. **2**, Issue 1, pp. 26-36 (2011).

[32] Ji-Xin Cheng and X. Sunney Xie, *Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy*, J. Opt. Soc. Am. B **19**, 1604-1610 (2002).

[33] K. I. Popov, A.F. Pegoraro, A. Stolow, and L. Ramunno, *Image formation in CARS microscopy: effect of the Gouy phase shift*, Optics Express, Vol. **19**, No. 7 (2011).

[34] R. Boyd, *Intuitives explanation of the phase anomaly of focused light beams*, Journal of the Optical Society of America **70**(7), 877-880 (1980).

[35] S. Feng and H.Winful, *Physical origin of the Gouy phase shift*, Optics Letters **26**(8), 485-487 (2001).

[36] C. Raman and K. Krishnan, *A New Type of Secondary Radiation*, Nature (London) **121**, 501-502 (1928).

[37] G. Eckhardt, R. Hellwarth, F. McClung, S. Schwarz, D. Weiner, and E. Woodbury, *Stimulated Raman Scattering From Organic Liquids,* Physical Review Letters **9**(11), 455-457 (1962).

[38] A glossary of terms in nuclear science and technology: a series of nine sections By National Research Council (U.S.). Conference on Glossary of Terms in Nuclear S American Society of Mechanical Engineers, 1953, page 61.

[39] P. Maker and R.Terhune, *Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength*, Physical Review **137**(3A), 801-818 (1965).

[40] Thèse de David Gachet, Microscopie CARS. *Génération du signal au voisinage d'interfaces et à l'intérieur d'une cavité Fabry-Perot*, p33-44 et p182-187 (Université Paul Cézanne, 2007).

[41] Y. Prior, *A Complete Expression for the Third-Order Susceptibility ($\chi^{(3)}$)-Perturbative and Diagrammatic Approches*, IEEE Journal of Quantum Electronics **QE-20**(1), 37-42 (1984).

[42] M. Levenson and N Bloembergen, *Dispersion of the nonlinear optical susceptibility tensor in centrosymmetric media*, Physical Review A **10**(10), 4447-4463 (1974).

[43] H. Lotem, J. R.T. Lynch, and N. Bloembergen, *Interference between Raman resonances in four-wave difference mixing*, Physical Review A **14**(5), 1748-1755 (1976).

[44] Eric O. Potma, Conor L. Evans, and X. Sunney Xie, *Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging*, Optics Letters, Vol. **31**, No. 2 (2006).

[45] Y. Shen, The Principles of Nonlinear Optics (Wiley Interscience, 1984).

[46] Andreas Volkmer, Ji-Xin Cheng, and Sunney Xie, *Vibrational Imaging with High Sensitivity via Epidetected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*, Physical Review Letters, Vol. **87**, No 2 (2001).

[47] J.-X. Cheng. L. Book, and X. Xie, *Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*, Optics Letters **26**(17), 1341-1343 (2001).

[48] J. Song, G. Easley, and M. Levenson, *Background suppression in Coherent Raman spectroscopy*, Applied Physics Letters **29**(9), 567-569 (1976).

[49] S. Akhmanov, A. Bunkin, S. Ivanov, and N. Koroteev, *Polarization active Raman spectroscopy and coherent Raman ellipsometry*, Soviet Physics JETP **47**(4), 667-677 (1978).

[50] J.-L. Oudar, R. Smith, and Y. Shen, *Polarization-sensitive coherent anti-Stokes Raman spectroscopy*, Applied Physics Letters **34**(11), 758-760 (1979).

[51] F. Kamga and M. Sceats, *Pulse-sequenced coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy : a method for suppression of the nonresonant background*, Optics Letters **5**(3), 126-128 (1980).

[52] A. Volkmer, L. Book, and X. Xie, *Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy : Imaging based on Raman free induction decay*, Applied Physics Letters **80**(9), 1505-1507 (2002).

[53] F. Ganikhanov, C. Evans, B Saar, and X. S. Xie, *High-sensitivity vibrationnal maging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering (Fm CARS) microscopy*, Optics Letters **31**(12), 1872-1874 (2006).

[54] Tegy J. Vadakkan, James C. Culver, Liang Gao, Tiemo Anhut, and Mary E. Dickinson, *Peak Multiphoton Excitation of mCherry Using an Optical Parametric Oscillator (OPO)*, Journal of Fluorescence, November; **19**(6): 1103–1109, 2009.

[55] Brian G. Saar, Gary R. Holtom, Christian W. Freudiger, Chrisita Achermann, Winfield Hill and X. Sunney Xie, *Intracavity wavelength modulation of an optical parametric oscillator for coherent Raman microscopy*, Optics Express, Vol. **17**, No. 15 (2009).

[56] A. Präkelt, M. Wollenhaupt, A. Assion, Ch. Horn, C. Sarpe-Tudoran, M. Winter, and T. Baumert, *Compact, robust, and flexible setup for femtosecond pulse shaping*, Review of Scientific Instruments, Vol. **74**, No. 11 (2003).

[57] A. M. Weiner, *Femtosecond pulse shaping using spatial light modulators*, Review of Scientific Instruments, Vol. **71**, No. 5 (2000).

[58] R. Trebino, K. W. Delong, D. N. Fittinghoff, J. N. Sweetser, M. A. Krumbügel, B.A. Richman, D.J. Kane, *Measuring ultrashort laser pulses in the time-frequency domain using frequency-resolved optical gating*, Review of Scientific Instruments **68**, 3277-3295, 1997.

[59] Ian Walmsley, Leon Waxer, Christophe Dorrer, *The role of dispersion in ultrafast optics*, Review of Scientific Instruments, Vol. **72**, No. 1, 2001.

[60] Siegman, A. E., Lasers. 1986, University Science Book: California.

[61] Ian W., Alan P. Kennedy, Jonathan Sutcliffe, and Ji-Xin Cheng, *Molecular Composition and Orientation in Myelin Figures Characterized by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*, Langmuir, Vol. **21**, No. 14, 2005.

[62] Richard H. Quarles, Wendy B. Macklin, and Pierre Morell, *Myelin Formation, Structure and Biochemistry*, Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 0-12-088397-X, p. 51-71 (2006).

[63] Richard H. Quarles, Pierre Morell, Henry F. McFarland, *Diseases Involving Myelin*, Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 0-12-088397-X, p. 639-652 (2006).

[64] M. Drobizhev, S. Tillo, N. S. Makarov, T. E. Hughes and A. Rebane, *Absolute Two-Photon Absorption Spectra and Two-Photon Brightness of Orange and Red Fluorescent Proteins*, J. Phys. Chem. B, **113** (4), pp 855–859, 2009.

[65] Christian P. Pfeffer, Bjorn R. Olsen, Feruz Ganikhanov, François Légaré, *Multimodal nonlinear optical imaging of collagen arrays*, Journal of Structural Biology, Volume 164, Issue 1, October 2008, Pages 140-145.

[66] Yan Fu, Haifend Wang, Riyi Shi, Ji-Xin Cheng, *Characterization of photodamage in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*, *Optics Express*, Vol. **14**, No. 9 (2006).