

Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
Centre Énergie, Matériaux et Télécommunication

**AMÉLIORATION DE LA MICROSCOPIE “STIMULATED  
RAMAN SCATTERING” (SRS) ET APPLICATIONS AUX  
SCIENCES DE LA TERRE**

Par

Marie-Andrée Houle

Thèse présentée pour l’obtention du grade de  
*Philosophiæ Doctor*, PhD.  
en sciences de l’énergie et des matériaux

Janvier 2017

**Jury d’évaluation**

Examineur externe	Hervé Rigneault Institut Fresnel
Examineur externe	Caroline Boudoux École Polytechnique de Montréal
Examineur interne	José Azaña INRS-ÉMT
Directeur de recherche	François Légaré INRS-ÉMT
Co-directeur de recherche	Albert Stolow Université d’Ottawa



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes co-directeurs de recherche: François Légaré et Albert Stolow pour leur soutien tout au long de mon doctorat. Vos généreux conseils et explications ont grandement contribué à la réussite de mon doctorat. La passion pour votre travail et le souci que vous portez à vos étudiants fait de vous des superviseurs hors pair.

J'aimerais également remercier Hervé Rigneault, Caroline Boudoux et José Azaña d'avoir pris le temps de lire et corriger ma thèse de doctorat.

Je remercie également l'équipe de laboratoire du CARSLab pour son appui tout au long de mon doctorat: Andrew Ridsdale, Douglas Moffatt, Aaron Barlow, Marco Andreana et Rune Lausten. Aaron m'a aidé à me familiariser avec le laboratoire durant le début de mon doctorat et Marco était un excellent collègue durant son stage postdoctoral, spécialement pour le projet de filtre adapté et le projet de microscopie SRS par modulation de la polarisation. Andrew m'a beaucoup aidé au niveau du microscope et de la préparation de certains échantillons tandis que Douglas était d'une aide immense pour tout ce qui touche l'informatique. Finalement, Rune fournit sa sagesse infinie en ce qui concerne les optiques et les lasers.

J'aimerais également dire un grand merci aux collaborateurs de mes projets sans qui beaucoup n'auraient pu aboutir. Robert Burruss est la personne qui a amorcé le projet de la microscopie CRS dans les échantillons géologiques en prenant contact avec Prof. Stolow pour essayer d'imager ses échantillons avec le microscope CARS. De plus, il a fourni la plupart des échantillons utilisés pour l'imagerie d'échantillons géologiques et ses connaissances en géologie furent très utiles pour l'interprétation des résultats. Lora Ramunno, Jarno Van

der Kolk et Konstantin Popov ont fourni les simulations numériques qui ont permis d'améliorer grandement l'article sur l'analyse du collagène de type I et II. Stéphane Bancelin et Charles-André Couture furent également d'une grande aide pour l'écriture et la correction de l'article sur l'imagerie SHG du collagène. Je voudrais également remercier Éric Potma dont les judicieux conseils ont grandement facilité l'avancement de notre montage expérimental SRS.

Ensuite, j'aimerais remercier les personnes au CNRC qui ne faisaient pas partie directement de mon équipe de laboratoire, mais avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à interagir. Magdalena Zawadzki, Varun Suresh Makhija, Ruaridh Forbes, Andrey Boguslavskiy, Michael Spanner, Kevin Veyrinas, Duncan England, Philip Bustard, Jennifer Erskine, Andrew Rytwinski et Iain Wilkinson, vous fûtes d'une très bonne compagnie durant mon séjour à Ottawa.

Merci aux organismes subventionnaires du CRSNG et du FQRNT pour leur soutien financier tout au long de mon doctorat.

De plus, je voudrais remercier les amis qui ont continué à faire partie de ma vie même lors de mon exil à Ottawa. Andrée-Anne, merci beaucoup pour ton amitié et pour les nombreuses randonnées pédestres dans lesquelles tu m'as entraînée. Kathryn, Jocelyn et Dominic, merci pour votre amitié constante durant ces quatre années. J'aimerais finalement remercier infiniment mes parents et ma sœur Catherine pour leur soutien constant et leurs encouragements.



# Résumé

Cette thèse porte sur le développement de techniques servant à l'amélioration de la sensibilité de détection de la microscopie "Stimulated Raman Scattering" (SRS) et l'utilisation de plusieurs types de microscopie optique non-linéaire pour l'imagerie d'échantillons géologiques et biologiques.

L'amélioration de la sensibilité de détection de la microscopie SRS est étudiée de deux façons: par l'utilisation des filtres adaptés comme outil de détection du signal SRS et par la diminution du signal non-résonant présent lors de l'acquisition de spectres SRS en modulant la polarisation du faisceau Stokes. Les filtres adaptés montrent une efficacité légèrement plus élevée en utilisant des ondes carrées comme forme du filtre qu'avec l'utilisation d'un amplificateur à détection synchrone. Nous présentons ainsi une preuve de concept de l'utilisation des filtres adaptés en microscopie SRS mais les résultats montrent que leur utilisation n'est pas, à ce stade, adapté pour l'imagerie en temps réel. Également, nous faisons une preuve de concept d'une technique de microscopie SRS par modulation de la polarisation qui réduit le signal non-résonant causé par la modulation de phase croisée (XPM) en modulant la polarisation du faisceau Stokes plutôt que l'amplitude, comme c'est habituellement le cas. Nous démontrons que cette technique permet une diminution significative du signal de XPM lors de l'acquisition de spectres SRS de DMSO-d<sub>6</sub> à de très basses concentrations. L'utilisation de la microscopie SRS par modulation de la polarisation dans un contexte d'imagerie est également démontrée.

De plus, trois types de microscopie sont utilisés pour l'imagerie d'échantillons dans cette thèse: la microscopie SRS, la microscopie à génération de seconde harmonique (SHG) et la microscopie à fluorescence à deux photons (TPF). Les techniques de microscopie SRS, SHG et TPF sont utilisées pour l'imagerie d'échantillons géologiques d'intérêt incluant de la matière organique contenue dans des échantillons géologiques. Contrairement à la microscopie Raman conventionnelle, nous démontrons que la microscopie SRS peut être utilisée pour faire l'imagerie rapide d'échantillons géologiques à une fréquence Raman spécifique, pour l'acquisition de volumes 3D et lorsque l'échantillon génère de la fluorescence. De larges spectres SRS couvrant plusieurs centaines de  $\text{cm}^{-1}$  furent acquis dans la matière organique contenue dans les échantillons géologiques dans la région CH et la région de "fingerprints" (environ 800 à 1700  $\text{cm}^{-1}$ ). Ceci est, à notre connaissance, la première utilisation de la microscopie SRS pour l'imagerie d'échantillons géologiques. Également, la microscopie SHG est utilisée pour l'imagerie d'échantillons de collagène provenant d'os et de cartilage. Une comparaison

de l'organisation des fibrilles du collagène de type I et de type II est faite et la taille des fibrilles de collagène a pu être estimée en fonction du ratio forward/backward du signal SHG.

**Mots clés:** microscopie “Stimulated Raman Scattering”; microscopie à génération de seconde harmonique; microscopie par fluorescence à deux photons; microscopie optique non-linéaire; biophotonique; collagène; géologie; filtre adapté; spectroscopie Raman.

# Abstract

This thesis focuses on the enhancement of detection sensitivity in Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy and the application of multi-modal nonlinear optical microscopy techniques to the imaging of geological and biological samples.

The enhancement of detection sensitivity in SRS microscopy is studied in two ways: by using a matched filters approach to optimize the signal-to-noise ratio in SRS microscopy and by reducing the nonresonant background signal in SRS microscopy by modulating the polarisation of the Stokes beam. Using matched filters, we show a slight improvement of the detection sensitivity when square waves are used as the coded excitation for a matched filter, compared to using a lock-in amplifier. We show a proof of concept of the application of matched filters in SRS microscopy but the unoptimized electronics used here are not suitable for real time imaging. Furthermore, we present a proof of concept of a polarization-modulated SRS microscopy technique that decreases the nonresonant background signal caused by cross-phase modulation (XPM) by modulating the polarization of the Stokes beam as opposed to the more conventional amplitude modulation. We show a significant decrease of the XPM signal when SRS spectra of DMSO-d<sub>6</sub> at low concentration are acquired and demonstrate the application of polarization-modulated SRS microscopy in an imaging context.

For the application to the imaging of real samples, three nonlinear optical microscopy techniques are used in this thesis: SRS microscopy, Second Harmonic Generation (SHG) microscopy and Two Photon Fluorescence (TPF) microscopy. The SRS, SHG and TPF microscopy techniques are used to image geological samples of interest, including organic matter contained in these samples. In an improvement over conventional Raman microscopy, we show that SRS microscopy can be used to rapidly image geological samples at a specific Raman frequency, to acquire 3D volumes of the samples, and, importantly, still applies even when the sample generate significant fluorescence. Large SRS spectra spanning hundreds of  $\text{cm}^{-1}$  in the CH and fingerprint regions were acquired from organic matter contained in geological samples. This is, to our knowledge, the first application of SRS microscopy to geological samples. Finally, SHG microscopy is used to image collagen samples from bones and cartilage. A comparison of the fibril organization of type I and type II collagen is done and the fibril diameter is estimated as a function of the forward/backward ratio of the SHG signal.

**Keywords:** Stimulated Raman Scattering microscopy; Second Harmonic Generation microscopy; Two-Photons Fluorescence microscopy; nonlinear optical microscopy; biophotonic; collagen; geology; matched filter; Raman spectroscopy.



# Table des matières

Remerciements . . . . .	iii
Résumé . . . . .	v
Abstract . . . . .	vii
<b>Table des matières</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>xiii</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xvii</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>xix</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Mise en contexte . . . . .	1
1.2 Organisation de la thèse . . . . .	5
<b>2 Microscopie Optique Non-linéaire: Notions théoriques</b>	<b>9</b>
2.1 Microscopie à Génération de Seconde Harmonique . . . . .	12
2.2 Microscopie Raman Cohérente . . . . .	15
2.2.1 Microscopie “Coherent Anti-Stokes Raman Scattering” . . . . .	15
2.2.2 Microscopie “Stimulated Raman Scattering” . . . . .	23
2.3 Fluorescence à deux photons . . . . .	30
2.4 État de l’art . . . . .	31
2.4.1 Microscopie Raman Cohérente . . . . .	31
2.4.2 Microscopie à Génération de Seconde Harmonique . . . . .	34
<b>3 Utilisation des filtres adaptés appliqués à la microscopie SRS</b>	<b>35</b>
3.1 Théorie sur les filtres adaptés et les codes de Golay . . . . .	36
3.1.1 Filtre adapté . . . . .	36
3.1.2 Code de Golay . . . . .	40
3.2 Montage expérimental . . . . .	42
3.2.1 Trajet Optique . . . . .	42
3.2.2 Microscope et échantillons . . . . .	44
3.2.3 Acquisition, modulation et code de Golay . . . . .	45
3.3 Résultats utilisant les ondes carrées . . . . .	47
3.3.1 Simulations . . . . .	47
3.3.2 Résultats expérimentaux . . . . .	53

3.4	Résultats utilisant les codes de Golay . . . . .	55
3.4.1	Simulations . . . . .	55
3.4.2	Résultats expérimentaux . . . . .	62
3.5	Conclusion . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Microscopie SRS multimodale utilisant l'imagerie spectrale</b>	<b>67</b>
4.1	Microscopie par imagerie spectrale . . . . .	68
4.2	Calcul de la dérive de fréquences optimale . . . . .	69
4.2.1	Composante électrique . . . . .	70
4.2.2	Équation d'interaction des champs pompe et Stokes . . . . .	73
4.2.3	Dérive de fréquences optimale . . . . .	75
4.2.4	Simulations . . . . .	78
4.3	Montage expérimental . . . . .	83
4.3.1	Système laser . . . . .	83
4.3.2	Montage optique . . . . .	83
4.3.3	Microscope . . . . .	85
4.3.4	Électronique . . . . .	86
4.3.5	Acquisition et traitement des images . . . . .	88
4.4	Calibration de l'imagerie spectrale . . . . .	90
4.5	Caractérisation du laser . . . . .	94
4.6	Conclusion . . . . .	101
<b>5</b>	<b>Microscopie SRS par modulation de la polarisation (PM-SRS)</b>	<b>103</b>
5.1	Introduction . . . . .	103
5.2	Montage expérimental . . . . .	107
5.2.1	Système Laser . . . . .	107
5.2.2	Montage Optique . . . . .	108
5.2.3	Microscope . . . . .	109
5.3	Comparaison de la microscopie CARS et SRS . . . . .	110
5.4	Identification du signal non-résonant de la microscopie SRS . . . . .	112
5.4.1	Absorption à deux photons . . . . .	112
5.4.2	Absorption des états excités . . . . .	113
5.4.3	Lentille thermique . . . . .	114
5.4.4	Susceptibilité non-linéaire et ratio de dépolarisation . . . . .	115
5.4.5	Modulation de phase croisée . . . . .	117
5.5	Modulation de la polarisation . . . . .	118
5.6	Comparaison de la microscopie SRS par modulation de l'amplitude (AM) et polarisation (PM) . . . . .	120
5.6.1	Capacité d'enregistrement de spectres Raman . . . . .	120
5.6.2	Dépendance de la concentration sur l'intensité du signal . . . . .	122
5.6.3	Imagerie de structures . . . . .	124
5.6.4	Limitations . . . . .	126
5.7	Conclusion . . . . .	128
<b>6</b>	<b>Application de la microscopie SRS à l'imagerie d'échantillons géologiques</b>	<b>129</b>

6.1	Problématique . . . . .	130
6.2	Préparation des échantillons . . . . .	132
6.3	Imagerie de minéraux . . . . .	134
6.4	Imagerie de matière organique . . . . .	145
6.5	Conclusion . . . . .	156
<b>7</b>	<b>Comparaison de la structure du collagène de types I et II</b>	<b>159</b>
7.1	Mise en contexte . . . . .	160
7.2	Montage expérimental . . . . .	161
7.2.1	Montage optique . . . . .	161
7.2.2	Préparation des échantillons . . . . .	163
7.2.3	Simulations numériques . . . . .	163
7.3	Résultats et discussion . . . . .	165
7.3.1	Comparaison entre le signal SHG dans les directions forward et backward	165
7.3.2	Microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG) dans l'os et le cartilage	168
7.3.3	Mesure du diamètre des fibrilles de collagène en utilisant le ratio forward sur backward (F/B) . . . . .	172
7.4	Conclusion . . . . .	177
<b>8</b>	<b>Conclusion</b>	<b>179</b>
8.1	Résultats . . . . .	179
8.1.1	Amélioration la sensibilité de détection de la microscopie SRS . . . . .	179
8.1.2	Application de la microscopie optique non-linéaire dans des échantillons géologiques et biologiques . . . . .	181
8.2	Ouverture . . . . .	183
	<b>Bibliographie</b>	<b>187</b>





# Liste des figures

2.1	Localisation de la fluorescence. . . . .	11
2.2	Diagramme de Jablonski. . . . .	13
2.3	Géométrie de la seconde harmonique. . . . .	14
2.4	Diagrammes représentant les processus CARS et SRS. . . . .	16
2.5	Graphique de l'intensité du signal CARS. . . . .	22
2.6	Description du processus SRS . . . . .	25
2.7	Schéma du transfert d'énergie du signal SRS. . . . .	28
3.1	Schéma des signaux utilisés. . . . .	36
3.2	Forme du signal et du filtre adapté. . . . .	39
3.3	Complémentarité des codes de Golay. . . . .	40
3.4	Adaptation d'un code bipolaire en code unipolaire. . . . .	41
3.5	Montage expérimental utilisé pour la microscopie SRS utilisant le filtre adapté. . . . .	43
3.6	Représentation de la résolution d'une séquence en fonction du nombre de points par bit. . . . .	46
3.7	Schéma représentant les différentes étapes menant à la création du signal SRS. . . . .	48
3.8	Forme d'une onde carrée à la sortie du filtre adapté . . . . .	49
3.9	SNR à la sortie du filtre adapté en fonction de la longueur de la séquence et du SNR à l'entrée du filtre adapté. . . . .	50
3.10	SNR à la sortie du filtre adapté en fonction de la durée de la séquence et de la fréquence de l'onde carrée. . . . .	51
3.11	SNR à la sortie du filtre adapté en fonction de la durée de la séquence et du taux d'échantillonnage. . . . .	52
3.12	Graphique représentant le SNR du signal SRS en fonction de la fréquence de l'onde carrée modulant le faisceau pompe. . . . .	53
3.13	Graphiques de l'intensité normalisée du signal à la sortie du filtre adapté pour un signal sans bruit. . . . .	56
3.14	Graphiques de l'intensité normalisée du signal à la sortie du filtre adapté dont le SNR à l'entrée du filtre adapté est de -20 dB. . . . .	57
3.15	Graphiques de l'intensité normalisée du signal à la sortie du filtre adapté dont le SNR à l'entrée du filtre adapté est de -30 dB. . . . .	58
3.16	Graphiques de l'intensité normalisée du signal à la sortie du filtre adapté dont le SNR à l'entrée du filtre adapté est de -40 dB. . . . .	59
3.17	Graphique du bruit à la sortie du filtre adapté en fonction du bruit à l'entrée. . . . .	60

3.18	Graphique du SNR à la sortie du filtre adapté en fonction du nombre de points par bit pour différent niveau de bruits à l'entrée du filtre adapté. . . . .	61
3.19	SNR à la sortie du filtre adapté en fonction de la durée de la séquence du code de Golay. . . . .	63
3.20	Signal à la sortie du générateur de fonction en fonction du temps. . . . .	64
4.1	Représentation de l'imagerie spectrale utilisant des impulsions affectées par la dérive de fréquences. . . . .	69
4.2	Représentation du balayage spectral et des niveaux d'énergies du signal SRS.	70
4.3	Représentation de la dérive de fréquences des faisceaux pompe et Stokes . .	76
4.4	Simulations: Paramètres de l'intensité et de la fréquence de la différence de fréquences des faisceaux pompe et Stokes. . . . .	78
4.5	Simulations: Paramètres de fréquence lors de balayage spectral. . . . .	80
4.6	Simulations: Paramètre de la largeur spectrale en fonction de la dérive de fréquences. . . . .	81
4.7	Montage expérimental de la microscopie SRS . . . . .	84
4.8	Schéma du système électronique. . . . .	87
4.9	Calibration de la région CH du spectre Raman avec de l'Octadécène. . . . .	92
4.10	Calibration de la région des "fingerprints" en utilisant du 4-acetamidophenol.	94
4.11	Caractérisation de la puissance du laser. . . . .	95
4.12	Caractérisation de la durée de l'impulsion laser. . . . .	96
4.13	Caractérisation du bruit mesuré par le système de détection synchrone. . . .	100
5.1	Représentation des signaux non-résonant affectant le signal SRS dans une configuration SRL. . . . .	104
5.2	Représentation de la modification de la géométrie de collection causée par la modulation à phase croisée. . . . .	105
5.3	Représentation des trains d'impulsions des faisceaux pompe et Stokes pour les différentes techniques de modulation utilisées pour obtenir le signal SRS.	106
5.4	Montage expérimental utilisé pour la microscopie CARS et SRS modulée en polarisation. . . . .	108
5.5	Graphiques des spectres SRS et CARS de DMSO-d6 utilisant la microscopie CARS et SRS. . . . .	111
5.6	Spectre SRS d'un échantillon de DMSO-d6 à 0,6 % et de l'eau pure. . . . .	113
5.7	Représentation graphique de la décroissance du signal causée par l'ESA. . . .	114
5.8	Spectre SRS de l'eau pure en utilisant les configurations AM et PM. . . . .	121
5.9	Spectre SRS d'une solution de DMSO-d6 utilisant la configuration AM-SRS et PM-SRS . . . . .	122
5.10	Graphique log log du signal AM-SRS et PM-SRS en fonction de la concentration de DMSO-d6. . . . .	123
5.11	Imagerie SRS hyperspectrale à très basse concentration. . . . .	125
5.12	Profile d'intensité du signal SRS d'une gouttelette de DMSO-d6. . . . .	126
5.13	Représentation du signal SRS dans le cas d'une biréfringence induite. . . . .	127
6.1	Échantillon WPA. . . . .	135

6.2	Images 3D de l'échantillon WPA. . . . .	137
6.3	Poudre de calcite et de quartz. . . . .	138
6.4	Échantillon M-K5A . . . . .	139
6.5	Échantillon B-1. . . . .	141
6.6	Échantillon B-2 . . . . .	143
6.7	Spectre SRS de l'huile minérale dans la région des "fingerprints". . . . .	146
6.8	Images SRS d'un échantillon d'algues Prasinophycées <i>Tasmanite</i> . . . . .	147
6.9	Spectres SRS d'un échantillon d'algues Prasinophycées <i>Tasmanite</i> . . . . .	149
6.10	Images d'un échantillon d'algues Prasinophycées <i>Tasmanite</i> . . . . .	150
6.11	Images d'une inclusion de fluide composée de pétrole brut dans un échantillon de fluorite. . . . .	151
6.12	Spectre SRS d'une inclusion de fluide composée de pétrole brute dans un échantillon de fluorite. . . . .	153
6.13	Volume 3D d'une inclusion de fluide composée de pétrole brute dans un échantillon de fluorite. . . . .	154
7.1	Montage expérimental utilisé pour les expériences. . . . .	162
7.2	Image typique de seconde harmonique (SHG) du collagène de types I et II. . . . .	166
7.3	Image SHG du cartilage articulaire. . . . .	168
7.4	Image SHG de l'os. . . . .	170
7.5	Graphiques polarimétriques représentant la directionnalité du signal SHG dans l'os. . . . .	171
7.6	Analyse du ratio F/B du signal SHG. . . . .	173
7.7	Simulations numériques du ratio F/B du signal SHG. . . . .	176



# Liste des tableaux

4.1	Stabilité de la puissance du signal de la somme de fréquences entre le faisceau ajustable et le faisceau à 1040 nm. . . . .	99
-----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----



# Liste des abréviations

ADC	Analogue to Digital Converter
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Scattering
CRS	Raman cohérente (“Coherent Raman Scattering”)
CT	Tomodensitométrie (“Computed Tomography”)
DMSO-d6	diméthylsulfoxyde deutéré
ESA	Absorption des États Excités (“Excited State Absorption”)
F/B	Forward sur Backward
FWHM	Pleine largeur à mi-hauteur (“Full Width Half Maximum”)
FWM	Mélange à quatre ondes (“Four Wave Mixing”)
GVD	Dispersion de la vitesse de groupe (“Group Velocity Dispersion”)
LIA	Amplificateur à Détection Synchrone (“Lock-in Amplifier”)
LSCM	Microscopie confocal à balayage laser (“Laser Scanning Confocal Microscopy”)
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
OPO	Oscillateur Paramétrique Optique
PMT	Tube photomultiplicateur (“Photomultiplier Tube”)
ROI	Région d’intérêt (“Region of Interest”)
SHG	Génération de Seconde Harmonique (“Second Harmonic Generation”)
SNR	Ratio Signal sur Bruit (“Signal over Noise Ratio”)
SRG	Stimulated Raman Gain
SRL	Stimulated Raman Loss
SRS	Stimulated Raman Scattering
TPF	Fluorescence à deux Photons (“Two Photon Fluorescence”)





# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 Mise en contexte

L'être humain a depuis longtemps tenté d'observer ce qu'il ne peut voir à l'œil nu. Que ce soit regarder plus loin, grâce à des télescopes, ou regarder ce qui est plus petit avec un microscope, ou même regarder des couleurs que nos yeux sont incapables de voir en créant des détecteurs sensibles aux infrarouges et aux ultraviolets. Les premiers microscopes furent inventés il y a plus de 400 ans [74] et depuis, plusieurs outils furent développés pour obtenir différentes informations et imager des objets à des ordres de grandeur toujours plus petits.

En microscopie optique conventionnelle, plusieurs types de configurations d'illumination de l'échantillon permettent d'obtenir un contraste d'imagerie différent pour mettre l'accent sur différentes particularités de l'échantillon. Nous retrouvons, entre autres, l'illumination en champ claire [154], l'illumination en champ sombre [59] et l'illumination en lumière polarisée [142]. La microscopie optique est cependant limitée par la limite de diffraction de la lumière qui est définie par  $d = \lambda/2NA$  [73]. Certaines techniques de microscopie permettent toutefois d'obtenir des résolutions encore plus basses [134]. Notamment, la microscopie à superrésolution permet d'obtenir, en microscopie optique, des images à des résolutions de l'ordre du nanomètre, ce qui est au-delà de la limite de diffraction de la lumière [83]. La

microscopie électronique à balayage (MEB) permet d’obtenir une résolution de l’ordre du nanomètre de la surface d’un matériau en utilisant le principe des interactions électrons-matière [144].

La lumière peut également être transformée en interagissant avec l’échantillon analysé pour obtenir de l’information supplémentaire sur ce dernier. La microscopie à fluorescence tire profit du phénomène de fluorescence généré par un matériau ou un marqueur [67]. Pour ce type de microscopie, la lumière est absorbée par le matériau et est réémise à une longueur d’onde plus grande que l’excitation initiale. La fluorescence à un photon est limitée par une très mauvaise résolution en 3D puisque le signal de fluorescence est émis sur toute la profondeur de l’échantillon (voir figure 2.1). Pour pallier ce problème, la microscopie confocale fut développée et permet de collecter seulement le signal qui est émis au point focal de l’échantillon [203]. Ce type de microscopie nécessite un balayage du faisceau laser sur l’échantillon.

L’interaction d’un champ électrique intense avec la matière peut mener à la génération d’effets non-linéaires qui peuvent être utilisés pour obtenir un contraste microscopique. La microscopie optique non-linéaire englobe plusieurs types de microscopie qui ont pour particularité d’obtenir leur contraste d’imagerie par la combinaison de plusieurs photons pour générer un photon à une longueur d’onde différente. Ces effets non-linéaires sont générés grâce à la modification des propriétés optiques de la matière en présence d’un champ électrique intense [15]. Ce champ électrique induit une polarisation qui peut être représentée par plusieurs termes, incluant des termes de second et troisième ordre, dont la magnitude est donnée par les tenseurs non-linéaires  $\chi^{(2)}$  et  $\chi^{(3)}$ . Lorsque le champ est faible, ces effets peuvent être négligés, mais lorsque l’amplitude du champ électrique est suffisamment élevée, ces termes doivent être pris en considération. Les types de microscopie optique non-linéaire qui sont pertinents dans cette thèse sont la microscopie à fluorescence à deux photons (TPF), la microscopie à génération de seconde harmonique (SHG) et la microscopie “Stimulated Raman Scattering” (SRS). Étant donné que de hautes intensités sont nécessaires pour produire les effets non-linéaires, le signal est généré seulement au point focal, rendant ces

techniques intrinsèquement confocale [214], procurant une résolution spatiale de l'ordre de  $300 \times 300 \times 1000$  nm.

La microscopie SHG dépend du tenseur non-linéaire du second ordre  $\chi^{(2)}$  et convertit deux photons en un photon ayant exactement la moitié de la longueur d'onde du faisceau incident. Le signal SHG est généré seulement dans les matériaux non-centrosymétriques. La microscopie TPF est dépendante du tenseur  $\chi^{(3)}$  et absorbe deux photons pour générer un signal de fluorescence. Le signal qui est émis a une longueur d'onde plus élevée que le signal SHG.

La microscopie SHG, générant un signal seulement en présence de molécules non-centrosymétriques, ne peut être utilisée que pour certains matériaux et tissus biologiques. Ainsi, parmi les tissus générant un signal SHG, nous retrouvons le collagène (principalement les types I et II), le fascia et le sarcomère. Le collagène est une famille de protéine dont sa fonction est de fournir une résistance à la tension dans le tissu. C'est la protéine la plus abondante dans le corps humain et une bonne connaissance de sa structure est importante pour avoir une meilleure compréhension du corps humain ou pour l'étude de certaines maladies tel que l'arthrose.

La microscopie SRS, quant à elle, se base sur l'effet Raman pour obtenir un contraste d'imagerie. L'effet Raman est, essentiellement, la diffusion inélastique d'un photon (c'est-à-dire un changement de sa fréquence) causée par l'excitation d'une molécule à un mode vibrationnel Raman. Lorsque le photon est diffusé, le changement de fréquence correspond à la différence d'énergie entre le niveau fondamental et le mode vibrationnel excité [34]. Ces modes vibrationnels ont des fréquences de résonance qui dépendent du regroupements chimiques détectés et les différents modes vibrationnels sondés forment un spectre Raman. La microscopie SRS utilise deux faisceaux lasers dont leur différence de fréquences correspond à un mode Raman spécifique. Ceci stimule l'excitation de ce mode Raman, augmentant sa sensibilité de plusieurs ordres de grandeur. Puisque cette technique est stimulée, elle est plusieurs ordres de grandeur plus sensible que la spectroscopie Raman, qui est une technique spontanée. Plus de détails sur la microscopie SRS sont présentés à la section 2.2.2. La

microscopie SRS est encore à ses débuts et beaucoup d'efforts sont mis pour augmenter sa sensibilité dans le but de l'utiliser comme technique de microscopie de manière plus étendue.

La microscopie SRS est principalement utilisée dans le domaine de la biologie, mais n'est actuellement pas utilisée dans le domaine de la géologie. Toutefois, une technique de microscopie similaire, la microscopie Raman, est largement utilisée pour l'étude d'échantillons géologiques. Cette technique, étant basé sur l'excitation spontanée des modes Raman, souffre d'un temps d'acquisition très long, nécessitant plusieurs heures pour faire l'acquisition d'une seule image. De plus, si l'échantillon génère de la fluorescence, cette dernière crée un bruit de fond qui rend l'acquisition du signal Raman impossible. Également, la microscopie Raman n'a pas la résolution axiale nécessaire pour faire l'acquisition d'un volume 3D. L'utilisation de la microscopie SRS permettrait de résoudre ces problèmes et pourrait ainsi devenir un outil précieux pour l'imagerie d'échantillons géologiques.

Dans cette thèse, la majeure partie de nos recherches sont concentrées sur la microscopie SRS. Dans le but d'augmenter la sensibilité de cette technique, l'utilisation des filtres adaptés, une technique largement utilisée en télécommunication, est examinée dans le but de détecter le signal SRS de manière plus précise. Également, nous explorons la possibilité de détecter le signal SRS en modulant la polarisation du faisceau laser en vue de réduire le signal non-résonant causé par la modulation de phase croisée. À l'aide du nouveau système laser, une plateforme multimodale est construite et combine la microscopie SRS, la microscopie SHG et la microscopie TPF. Cette plateforme multimodale est, entre autres, utilisée pour imager des échantillons géologiques. À notre connaissance, ceci est la première utilisation de la microscopie SRS pour l'imagerie d'échantillons géologiques. Cette technique est utilisée, à l'aide du balayage spectral, pour identifier les éléments présents dans les échantillons géologiques et faire l'acquisition de volumes 3D des échantillons. La microscopie SHG est utilisée pour révéler des informations sur la cristallographie d'échantillons contenant des molécules non-centrosymétriques telles que le quartz. La plateforme multimodale est également utilisée pour l'imagerie de matière organique contenue dans des échantillons géologiques. Les modes Raman CH ( $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ ) ainsi que des modes Raman dans la région des "fingerprints" ( $1000 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ), où se trouvent les modes Raman CC, ont ainsi été acquis.

Finalement, une analyse comparative de la structure du collagène de types I et II à l'aide de la microscopie SHG est également présentée. La section suivante présente l'organisation de la thèse.

## 1.2 Organisation de la thèse

Le chapitre 2 présente la théorie concernant la microscopie optique non-linéaire, plus spécifiquement la microscopie à génération de seconde harmonique (SHG), la microscopie à fluorescence à deux photons (TPF) et la microscopie Raman cohérente, qui englobe la microscopie “Coherent Anti-Stokes Raman Scattering” (CARS) et la microscopie “Stimulated Raman Scattering” (SRS). Une revue de l'état de l'art de la microscopie SHG, CARS et SRS est également présentée et met l'accent sur les améliorations techniques de ces types de microscopie.

Le chapitre 3 présente l'application des filtres adaptés en microscopie SRS. Il présente une brève revue théorique des filtres adaptés et des codes de Golay, décrit le montage expérimental utilisé et présente les résultats utilisant des ondes carrées et les codes de Golay. L'analyse des résultats démontre que la sensibilité de détection du signal SRS en utilisant les filtres adaptés sous forme d'ondes carrées est légèrement supérieure à celle utilisant un amplificateur à détection synchrone pour les mêmes conditions expérimentales. Toutefois, plusieurs limitations techniques nous empêchent d'obtenir un temps d'acquisition suffisamment court pour une application en imagerie en temps réel.

Le chapitre 4 présente le montage expérimental pour effectuer de la microscopie SRS. La théorie sur l'imagerie spectrale est présentée. De plus, la démarche mathématique menant à la dérive de fréquences optimale et des simulations numériques découlant de ces calculs sont présentées. Également, une description du montage expérimental de la plateforme multimodale est faite en plus de présenter la méthode utilisée pour calibrer les spectres SRS. Finalement, les résultats sur la caractérisation du laser sont présentés. Le laser fut récemment installé dans le laboratoire et une caractérisation de ses performances était nécessaire.

Le chapitre 5 présente les résultats concernant la microscopie SRS par modulation de la polarisation (PM-SRS). La microscopie PM-SRS est conçue dans le but de diminuer le signal non-résonant causé par la modulation de phase croisée (XPM) et la lentille thermique (TL). Le montage expérimental du microscope SRS est tout d'abord présenté, étant donné que les expériences sont effectuées sur un montage expérimental légèrement différent de celui présenté au chapitre 4. Par la suite, une comparaison de la microscopie CARS et SRS est faite, montrant que la microscopie SRS, dans les conditions expérimentales présentées, est beaucoup plus sensible que la microscopie CARS. Par la suite, une analyse présentant les différents signaux non-résonants est présentée, permettant d'identifier le signal non-résonant affectant notre système d'imagerie. Ensuite, une description de la faisabilité de l'utilisation de la modulation de la polarisation pour réduire le signal non-résonant est faite. Finalement, nous comparons la microscopie par modulation de l'amplitude (AM-SRS) et par modulation de la polarisation (PM-SRS).

Le chapitre 6 présente l'application de la microscopie SRS pour l'imagerie d'échantillons géologiques. L'imagerie de minéraux dont les modes Raman sont très bas ( $<1100\text{ cm}^{-1}$ ) est faite et la possibilité de faire de l'imagerie 3D ainsi qu'une analyse spectrale des échantillons sont démontrées. Nous démontrons également l'application de la microscopie SRS pour l'imagerie de matières organiques dans les échantillons géologiques. Nous faisons l'acquisition de spectres SRS dans la région CH et dans la région des "fingerprint".

Le chapitre 7 présente l'application de la microscopie SHG pour l'analyse de structures de collagène de types I et II. Ce chapitre est différent des autres chapitres puisqu'il ne porte pas sur la microscopie SRS, mais plutôt sur la microscopie SHG. Ces expériences sont une continuation de mon projet de maîtrise. Bien que ma maîtrise fût terminée, une opportunité s'est présentée me donnant la possibilité de faire ces expériences. Ces expériences furent effectuées dans un autre laboratoire que celui du reste de mon doctorat et, ainsi, le montage expérimental pour ces expériences est présenté. Par la suite, les résultats expérimentaux sont présentés où une comparaison entre le signal SHG dans la direction forward et backward est faite. Une analyse du signal SHG résolu en polarisation (P-SHG) dans l'os (contenant du collagène de type I) et le cartilage (contenant du collagène de type II) est également faite.

Finalement, des mesures expérimentales combinées à des simulations numériques permettent de prédire la taille des fibrilles en fonction du ratio forward sur backward du signal SHG.

Le chapitre 8 présente la conclusion de cette thèse. Il fait une revue de ce qui a été accompli et offre une analyse des améliorations techniques qui peuvent être apportées ainsi que des suggestions sur des futures expériences qui peuvent être accomplies.





# Chapitre 2

## Microscopie Optique Non-linéaire: Notions théoriques

Pour la plupart des interactions entre la lumière et la matière, la polarisation induite dans un milieu est linéairement proportionnelle à la composante électrique du champ électromagnétique de la lumière. Toutefois, lorsque l'intensité appliquée est suffisamment élevée, soit une composante électrique élevée, cette approximation n'est plus valide et il faut considérer la composante non-linéaire de la polarisation induite par la lumière. Celle-ci peut être représentée par une expansion en série de puissances de l'amplitude du champ électrique appliqué  $\vec{E}$  [160]. La polarisation induite du milieu peut donc être exprimée comme suit:

$$P(t) \propto \chi^{(1)} \cdot \vec{E}(t) + \chi^{(2)} \cdot \vec{E}(t) \cdot \vec{E}(t) + \chi^{(3)} \cdot \vec{E}(t) \cdot \vec{E}(t) \cdot \vec{E}(t) \quad (2.1)$$

Le développement des lasers rendent possible l'obtention de champs électromagnétiques suffisamment intenses permettant l'observation d'effets non-linéaires. La génération de seconde harmonique (SHG) fut d'abord observée en 1961 par Franken et *al.*, soit un an après la découverte du laser à rubis [51], et depuis, la possibilité d'utiliser cet effet non-linéaire pour imager des matériaux fut également démontrée [180]. Plus tard, il fut démontré qu'il est possible d'obtenir un contraste d'imagerie du signal de seconde harmonique dans les tis-

sus biologiques [53], ce qui ouvra la porte au développement de techniques de microscopie optique non-linéaire.

La microscopie CARS (“Coherent Anti-Stokes Raman Scattering”) et SRS (“Stimulated Raman Scattering”) sont toutes deux basées sur l’effet Raman, qui fut découvert en 1928 par Sir Chandrasekhara Venkata Raman [162] avant l’invention des sources lasers. La détection de l’effet Raman fut grandement améliorée par le développement des sources lasers [76]. Puisque l’effet Raman reflète les vibrations moléculaires et est spécifique pour chaque lien moléculaire, il est grandement utilisé comme outil spectroscopique. Cet effet est également utilisé en microscopie. La microscopie Raman nécessite plusieurs minutes, voir plusieurs heures, pour faire l’acquisition d’un champ de vue. Nécessitant un temps d’acquisition beaucoup plus petit pour l’imagerie en temps réel, d’autres techniques basées sur l’effet Raman telles que la microscopie CARS et SRS furent développées. Ces dernières sont des processus stimulés et offrent une sensibilité accrue, tandis que la microscopie Raman est un processus spontané et peu probable. La première observation de l’effet CARS fut documentée en 1965 par Terhune *et al.* [189] à la compagnie Ford Motor Company. La première utilisation de la microscopie CARS fut rapportée par Duncan *et al.* en 1982 [45]. Le phénomène SRS, quant à lui, fut observé pour la première fois en 1962 [206], mais son utilisation en microscopie fut popularisée seulement dans les dix dernières années grâce au développement de techniques de détection synchrone [52, 96, 139, 174].

La microscopie SHG, la microscopie CARS et la microscopie à fluorescence à deux photons (TPF) sont parmi les techniques de microscopie optique non-linéaires les plus utilisées. Ces trois techniques utilisent des lasers à impulsions dont leur durée va de l’ordre de la centaine de femtosecondes à quelques picosecondes. Celles-ci permettent d’obtenir une puissance crête suffisamment élevée pour la génération d’effets non-linéaires tout en gardant une puissance moyenne basse, ce qui prévient l’endommagement des tissus biologiques via des effets thermiques [160].

Contrairement à plusieurs techniques de microscopie à balayage laser tel que la microscopie à fluorescence à un photon (voir figure 2.1(c)), la microscopie optique non-linéaire offre

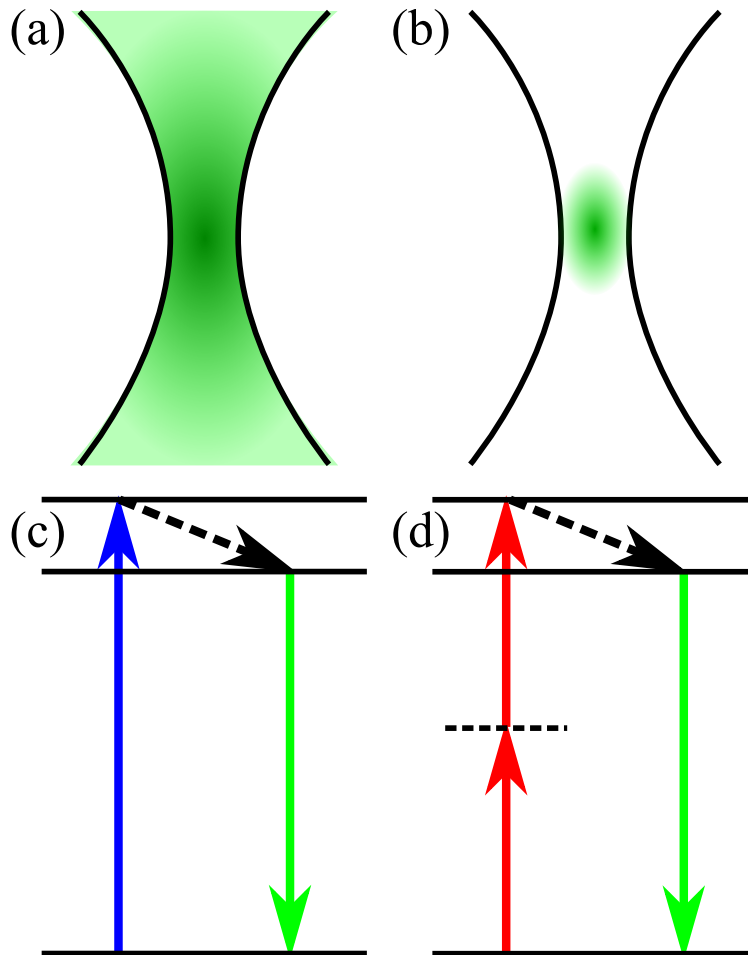


FIGURE 2.1 – Localisation de la fluorescence. (a) Signal émis par la fluorescence à un photon. (b) Signal émis par la fluorescence à deux photons, un processus non-linéaire de la conversion de la lumière. (c-d) Diagrammes de Jablonski correspondant à la fluorescence à (c) un et (d) deux photons.

une très bonne résolution spatiale ( $\sim 500$  nm). En effet, étant donné la grande puissance nécessaire pour produire les effets non-linéaires, ceux-ci sont générés seulement au plan focal de l'objectif, là où l'intensité est la plus élevée (voir figure 2.1(b)). Toutefois, dans le cas de la fluorescence à un photon, le signal est généré sur toute l'épaisseur de l'échantillon, générant ainsi du signal provenant d'éléments à l'extérieur du plan focal (voir figure 2.1(a)) et diminuant ainsi la résolution en profondeur de l'image. En microscopie TPF, cette forte dépendance de l'intensité du faisceau laser permet l'imagerie de sections épaisses d'échantillons et l'obtention d'images en trois dimensions de haute résolution. De plus, le signal produit par la plupart des techniques de microscopie optique non-linéaire provient d'une

propriété intrinsèque du matériau, leur utilisations ne nécessitant donc pas de marquage ou de coloration pour l'obtention d'un contraste d'imagerie, rendant possible leur utilisation *in vivo*.

## 2.1 Microscopie à Génération de Seconde Harmonique

La génération de seconde harmonique est un processus optique non-linéaire qui se produit lorsqu'un champ électromagnétique suffisamment intense interagit avec un milieu non centrosymétrique possédant une susceptibilité non-linéaire  $\chi^{(2)}$  [15, 51]. Pour utiliser cette technique de microscopie, un laser à impulsion de fréquence centrale  $\omega$  est focalisé dans un échantillon et l'interaction non-linéaire entraîne la génération de photons dont la fréquence est le double de la fréquence laser ( $2\omega$ ), soit la moitié de la longueur d'onde, comme le montre le diagramme de Jablonski à la figure 2.2(a). Étant donné que la génération de seconde harmonique n'implique pas d'absorption d'énergie (si l'intensité n'est pas trop élevée), il ne se produit pas de dommages thermiques ou de photoblanchiments si la longueur d'onde du faisceau laser est à l'extérieur de la bande d'absorption [160]. Il est très facile de discriminer le signal de seconde harmonique du faisceau pompe ou d'un signal d'autofluorescence puisqu'il possède une longueur d'onde correspondant à exactement la moitié de la longueur d'onde du faisceau pompe. La microscopie SHG ne peut être utilisée que dans un milieu ne possédant pas de centre d'inversion, son utilisation en imagerie nécessitant des milieux non centrosymétriques, des interfaces ou des environnements dont la non centrosymétrie a été induite par un champ électrique [160]. Cette contrainte de la génération du signal SHG peut être un avantage puisqu'elle permet de cibler un élément spécifique de l'échantillon étudié tel que le collagène, comme elle peut être un désavantage en rendant l'utilisation de la microscopie SHG peu versatile.

Lorsqu'un champ électrique élevé est appliqué à un matériau, la polarisation induite peut être décrite par l'équation 2.1 où  $\chi^{(1)}$  est la susceptibilité linéaire et  $\chi^{(2)}$  et  $\chi^{(3)}$  sont respectivement la susceptibilité optique non-linéaire du second et troisième ordre. Par mesure de simplicité, nous posons  $\tilde{P}^{(2)}(t) = \chi^{(2)}\tilde{E}^2(t)$  et  $\tilde{P}^{(3)}(t) = \chi^{(3)}\tilde{E}^3(t)$ . La composante électrique

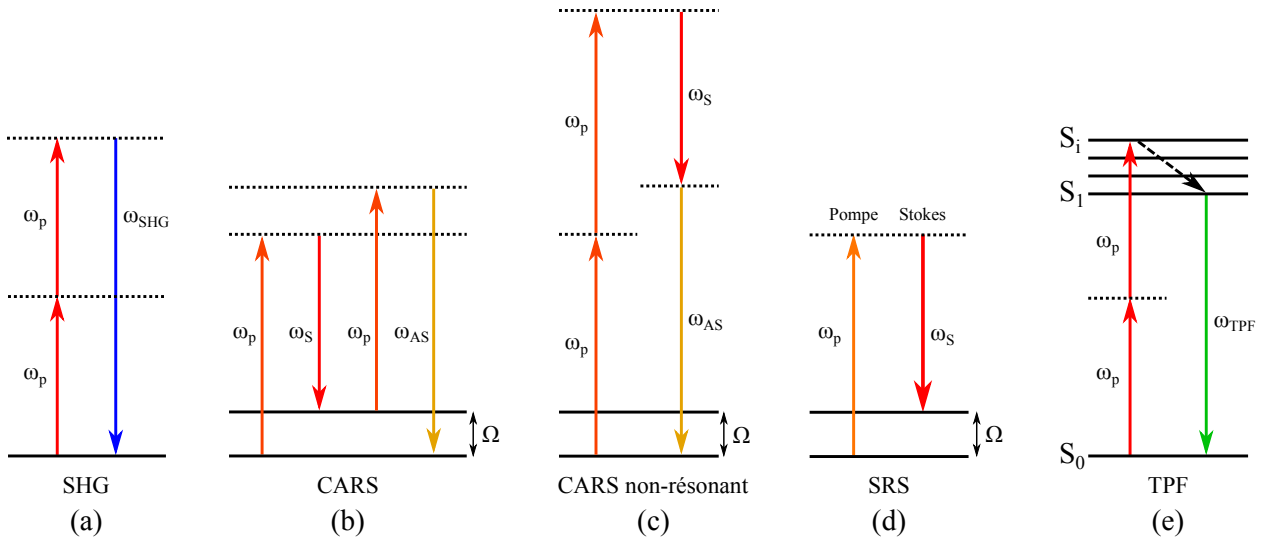


FIGURE 2.2 – Diagramme de Jablonski (a) de la génération de seconde harmonique SHG, (b) de la génération de signal CARS, (c) de la génération de signal CARS non-résonnant, (d) de la génération de signal SRS et (e) de la génération de fluorescence à deux photons (TPF).

du faisceau laser peut être représentée par:

$$\tilde{E}(t) = E e^{-i\omega t} + c.c. \quad (2.2)$$

et si la susceptibilité optique non-linéaire  $\chi^{(2)}$  est non nulle, nous obtenons une polarisation induite donnée par:

$$\tilde{P}^{(2)}(t) = \chi^{(2)} \tilde{E}^2(t) = 2\epsilon_0 \chi^{(2)} E E^* + (\epsilon_0 \chi^{(2)} E^2 e^{-i2\omega t} + c.c.). \quad (2.3)$$

Nous remarquons que cette équation contient un terme indépendant de la fréquence (la rectification optique) ainsi qu'un terme apportant une contribution à une fréquence  $2\omega$  (la contribution non-linéaire). Ainsi, ce second terme mène à la génération de radiation dont la fréquence est le double de la fréquence d'origine. Comme le montrent les figures 2.2(a) et 2.3(a), lors de la génération de seconde harmonique, deux photons de fréquence  $\omega$  sont annihilés et un photon de fréquence  $2\omega$  est créé simultanément.

Un élément très important à considérer lors de la création d'un signal de seconde harmonique est l'accord de phase entre le faisceau laser et le signal de seconde harmonique (voir

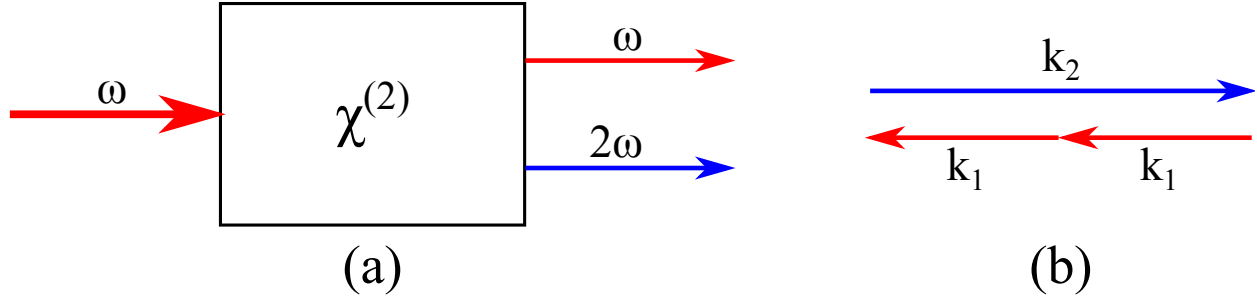


FIGURE 2.3 – Géométrie de la seconde harmonique. (a) Un faisceau de fréquence  $\omega$  passe à travers un milieu possédant une susceptibilité non-linéaire  $\chi^{(2)}$  et un faisceau de fréquence  $\omega$  ainsi qu'un faisceau ayant le double de la fréquence ( $2\omega$ ) en ressort. (b) Représentation de l'accord de phase entre le faisceau pompe ( $k_1$ ) et le signal de seconde harmonique ( $k_2$ ).

figure 2.3(b)). Le désaccord de phase est défini comme suit:

$$\Delta k = 2k_1(\omega) - k_2(2\omega) \quad (2.4)$$

où  $k_i$  est le nombre d'onde aux fréquences du faisceau laser  $\omega$  ( $i = 1$ ) et du signal de seconde harmonique  $2\omega$  ( $i = 2$ ). Dans le cas où l'accord de phase est satisfait,  $\Delta k = 0$ . Ceci implique que les dipôles atomiques du matériau ont la même phase. Les champs qui sont émis par chaque dipôle atomique s'additionnent de manière cohérente et il y a augmentation du signal de SHG. Toutefois, dans plusieurs cas, l'accord de phase n'est pas satisfait et les différents champs des dipôles atomiques créés causent de l'interférence destructive, ce qui diminue l'intensité totale du signal de SHG. Dans ces conditions, en négligeant la phase de Gouy, l'intensité totale du signal de SHG est donnée par:

$$I_2(L) \propto L^2 \operatorname{sinc} \left( \frac{\Delta k L}{2} \right)^2 \quad (2.5)$$

où  $L$  est la longueur d'interaction dans le matériau. Ainsi, il y a décroissance du signal SHG avec l'augmentation du terme  $\Delta k L$ . À ce point, il est utile de définir le terme de la longueur de cohérence:

$$L_{coh} = \frac{\pi}{\Delta k} \quad (2.6)$$

qui est définie comme une mesure de la longueur d'interaction dans le matériau avant qu'il n'y ait diminution de l'intensité du signal de SHG, soit lorsque l'intensité du signal de SHG est maximale.

## 2.2 Microscopie Raman Cohérente

La microscopie Raman cohérente (CRS: “Coherent Raman Scattering”) est un terme qui englobe la microscopie CARS ainsi que la microscopie SRS et sont deux techniques basées sur l'effet Raman pour obtenir un contraste d'imagerie. Elles peuvent être acquises en même temps puisque, à l'exception de quelques composantes (notamment, un modulateur d'intensité et un démodulateur sont nécessaires pour détecter le signal SRS), les mêmes fréquences lasers et composantes optiques sont nécessaires pour obtenir le contraste d'imagerie, seulement la méthode de détection du signal est différente. La microscopie CARS utilise habituellement un tube photomultiplicateur pour la détection du signal anti-Stokes tandis que la microscopie SRS utilise une photodiode et un amplificateur à détection synchrone pour détecter le transfert de modulation entre les faisceaux pompe et Stokes.

### 2.2.1 Microscopie “Coherent Anti-Stokes Raman Scattering”

La microscopie CARS (“Coherent Anti-Stokes Raman Scattering”) est un processus optique non-linéaire résonant du troisième ordre  $\chi^{(3)}$  qui permet d'effectuer de l'imagerie en utilisant un contraste spectroscopique basé sur l'effet Raman [48, 159]. Contrairement à la spectroscopie Raman, qui est un processus spontané, la microscopie CARS est un processus stimulé, permettant une amélioration de la sensibilité allant jusqu'à 4 ordres de grandeur [48]. Pour obtenir un contraste d'imagerie, deux faisceaux lasers, les faisceaux pompe et Stokes de fréquence  $\omega_p$  et  $\omega_S$  respectivement, génèrent un signal anti-Stokes de fréquence  $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_S$ . Soit un milieu composé de molécules ayant un mode vibrationnel de fréquence  $\Omega$  observé dans le spectre Raman, il est possible de stimuler ce mode vibrationnel en ajustant la fréquence des faisceaux pompe et Stokes de telle sorte que  $\omega_p - \omega_S = \Omega$ . Ainsi, en

stimulant le mode vibrationnel de la molécule à la fréquence Raman  $\Omega$ , il est possible d'obtenir un signal anti-Stokes à la fréquence  $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_S$  (figure 2.2(b)). Ce signal est généré seulement en présence du mode vibrationnel  $\Omega$  dans le volume focale, créant le contraste d'imagerie [160].

Un des avantages de la microscopie CARS est qu'elle ne requiert pas d'agents fluorescents, qui sont sujets au photoblanchiment, puisque le contraste vibrationnel Raman est inhérent à l'espèce moléculaire présente dans la structure biologique imagée [160]. De plus, la microscopie CARS est un processus cohérent et offre donc une meilleure sensibilité que le processus Raman spontané. Également, elle permet d'offrir une grande sélectivité chimique étant donné qu'il est possible de changer le mode Raman à exciter en modifiant la longueur d'onde des faisceaux pompe ou Stokes. Finalement, le signal CARS peut être détecté en présence de signal d'autofluorescence puisque la fréquence du signal CARS est très bien définie. La popularité de ce type de microscopie ne cesse d'augmenter depuis plusieurs années [30, 72, 136, 158, 196, 216] et les principales applications biologiques pour lesquelles elle est utilisée sont l'imagerie de la myéline [12, 199] et des cellules [30, 164, 196, 216]. Ces tissus offrent, en effet, un bon contraste d'imagerie étant donné la présence de liens C-H qui produisent un fort signal CARS.

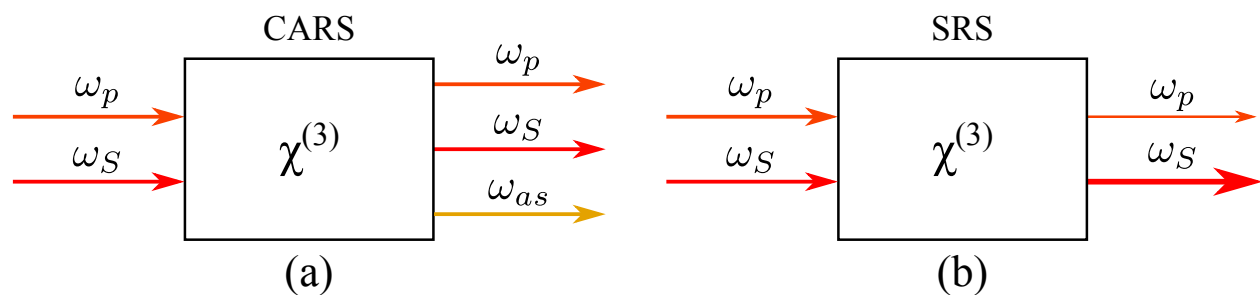


FIGURE 2.4 – Diagrammes représentant les processus CARS et SRS. (a) CARS: Les faisceaux pompe ( $\omega_p$ ) et Stokes ( $\omega_S$ ) interagissent avec le milieu pour produire le signal anti-Stokes ( $\omega_{as}$ ). À la sortie du milieu, nous retrouvons trois faisceaux; le faisceau pompe ( $\omega_p$ ), le faisceau Stokes ( $\omega_S$ ) et le faisceau anti-Stokes ( $\omega_{as}$ ). (b) SRS: Les faisceaux pompe et Stokes interagissent avec le milieu et suite à l'excitation d'un mode Raman, le faisceau pompe subit une baisse de l'intensité tandis que le faisceau Stokes subit une augmentation de l'intensité.



## Description classique des champs

Un mode vibrationnel Raman est excité lorsque deux champs incidents (pompe et Stokes) induisent des oscillations harmoniques aux molécules présentes dans le matériau [34]. Ces oscillations forment une force effective en direction des degrés de liberté de la molécule, ce qui excite les modes nucléaires. Ainsi, le mode nucléaire excité forme la source d'une modulation cohérente. Un troisième champ se propageant dans le matériau développe des bandes latérales dont la fréquence de décalage correspond à la fréquence de modulation du mode Raman. Nous considérons les deux champs électriques incidents pompe et Stokes ( $E_p$  et  $E_S$ ) donnés par:

$$E_i = A_i e^{-i\omega_i t} + c.c. \quad (2.7)$$

où les indices  $i = p, S$  et  $A_i$  est l'amplitude du champ électrique. Nous considérons que leur fréquence est beaucoup plus élevée que la fréquence de résonance  $\Omega$  et que  $\omega_p > \omega_S$ . Lorsque les champs sont suffisamment intenses, des mouvements d'électrons non-linéaires peuvent se produire à des fréquences correspondantes à des combinaisons de fréquence des champs incidents, incluant la différence de fréquence  $\omega_v = \omega_p - \omega_S$ . Sous ces conditions, le champ optique des fréquences combinées exerce une force donnée par:

$$F(t) = \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 [A_p A_S^* e^{-i\omega_v t} + c.c.] \quad (2.8)$$

où  $\alpha$  est la polarisabilité,  $Q$  est le mouvement des atomes et  $\delta\alpha/\delta Q$  décrit le changement de polarisabilité le long des modes nucléaires. La force varie en fonction du temps selon une fréquence donnée par  $\omega_v$ , ce qui est ressenti par les modes nucléaires. En présence des champs  $E_p$  et  $E_S$ , le déplacement des atomes  $Q$  est donné par l'équation du mouvement suivant:

$$\frac{d^2 Q(t)}{dt^2} + 2\gamma \frac{dQ(t)}{dt} + \Omega Q(t) = \frac{F(t)}{m} \quad (2.9)$$

où  $\gamma$  est une constante d'amortissement,  $m$  est la masse des oscillateurs et  $\Omega$  est la fréquence de résonance du mode nucléaire. Nous obtenons ainsi que le déplacement des atomes en

fonction du temps donné par:

$$Q(t) = Q(\omega_v)e^{-i\omega_v t} + c.c. \quad (2.10)$$

qui oscille à la fréquence  $\omega_v$  selon une amplitude:

$$Q(\Omega) = \frac{1}{m} \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 \frac{A_p A_S^*}{\Omega^2 - \omega_v^2 - 2i\omega_v \gamma}. \quad (2.11)$$

Ainsi l'amplitude du mouvement vibrationnel dépend de l'amplitude des champs incidents ( $A_p$  et  $A_S$ ) ainsi que de la différence de fréquences entre la fréquence d'entraînement effective  $\omega_v$  et la fréquence de résonance  $\Omega$ .

La présence d'un mouvement entraîné des atomes change les propriétés optiques du matériau. Par conséquent, l'application des champs  $E_p$  et  $E_S$  altère la polarisabilité du matériau. L'équation générale de la polarisation induite est donnée par:

$$\begin{aligned} P(t) &= \epsilon_0 \left[ \chi^{(1)} E(t) + \chi^{(2)} E^2(t) + \chi^{(3)} E^3(t) + \dots \right] \\ &= P^{(1)}(t) + P^{(2)}(t) + P^{(3)}(t) + \dots \end{aligned} \quad (2.12)$$

La polarisation induite peut également être exprimée en fonction du moment dipolaire  $\mu(t)$  selon:

$$P(t) = N\mu(t) \quad (2.13)$$

où  $N$  est le nombre de dipôles électriques par unité de volume. Le moment dipolaire peut être connecté à la polarisabilité  $\alpha(t)$  selon:

$$\mu(t) = \alpha(t)E(t). \quad (2.14)$$

En l'absence de nonlinéarité, la polarisabilité peut être estimée comme une constante. Toutefois, si un champ intense est appliqué, elle peut être développée en une série de Taylor en

fonction de  $Q$  et est donnée par:

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q(t) + \dots \quad (2.15)$$

Ainsi, la polarisation induite est donnée par:

$$P(t) = N \left[ \alpha_0 + \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q(t) \right] [E_p(t) + E_S(t)]. \quad (2.16)$$

où  $\alpha_0$  est le terme de la polarisabilité linéaire et  $(\delta\alpha/\delta Q)_0$  décrit la contribution du troisième ordre de la polarisation induite due à l'excitation des modes Raman. Cette dernière est la contribution non-linéaire de la polarisation induite, qui est donnée par:

$$P^{(3)}(t) = P^{(3)}(\omega_{cs})e^{-i\omega_{cs}t} + P^{(3)}(\omega_S)e^{-i\omega_S t} + P^{(3)}(\omega_p)e^{-i\omega_p t} + P^{(3)}(\omega_{as})e^{-i\omega_{as}t} + c.c. \quad (2.17)$$

où  $\omega_{cs} = 2\omega_S - \omega_p$  est la fréquence cohérente Stokes et  $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_S$  est la fréquence anti-Stokes. La polarisation non-linéaire contient des contributions provenant des fréquences fondamentales  $\omega_p$  et  $\omega_S$  ainsi que de nouvelles fréquences  $\omega_{cs}$  et  $\omega_{as}$ . En utilisant les équations 2.11, 2.16 et 2.17, nous obtenons que l'amplitude de la polarisation induite à la fréquence anti-Stokes est ainsi donnée par:

$$P^{(3)}(\omega_{as}) = \frac{N}{m} \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0^2 \frac{1}{\Omega^2 - \omega_v^2 - 2i\omega_v\gamma} A_p^2 A_S^* = 6\epsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_v) A_p^2 A_S^* \quad (2.18)$$

où  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide et  $\chi^{(3)}$  est la susceptibilité non-linéaire du troisième ordre et est donnée par:

$$\chi^{(3)}(\omega_v) = \frac{N}{6m\epsilon_0} \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0^2 \frac{1}{\Omega^2 - \omega_v^2 - 2i\omega_v\gamma}. \quad (2.19)$$

La polarisation non-linéaire induite des autres fréquences est donnée par:

$$P^{(3)}(\omega_{cs}) = 6\epsilon_0\chi^{(3)*}(\omega_v)A_S^2A_p^* \quad (2.20)$$

$$P^{(3)}(\omega_S) = 6\epsilon_0\chi^{(3)*}(\omega_v)|A_p|^2A_S \quad (2.21)$$

$$P^{(3)}(\omega_p) = 6\epsilon_0\chi^{(3)}(\omega_v)|A_S|^2A_p. \quad (2.22)$$

$P^{(3)}(\omega_{cs})$  est responsable de l'effet "Coherent Stokes Raman Scattering" (CSRS) tandis que  $P^{(3)}(\omega_S)$  et  $P^{(3)}(\omega_p)$  sont responsable des effets de "Stimulated Raman Gain" (SRG) et "Stimulated Raman Loss" (SRL) respectivement. Ces deux derniers effets sont étudiés plus en profondeur à la section 2.2.2.

Lorsqu'une polarisation induite est appliquée à un matériau, l'énergie de la radiation peut être redirigée de deux manières. Premièrement, il peut y avoir échange d'énergie avec le matériau où, généralement, le matériau absorbe de l'énergie et les champs incidents perdent de l'énergie. Deuxièmement, de nouveaux champs peuvent être créés sans échange d'énergie avec le matériau. Dans ce cas, l'échange d'énergie des champs incidents permet la création de nouveaux champs à une fréquence différente et le matériau, n'absorbant pas d'énergie, est utilisé comme intermédiaire. Ce processus est appelé "processus paramétrique" puisque l'énergie totale des différents champs impliqués est conservée [126]. C'est sur ce processus que se base la génération du signal CARS. En considérant que le signal anti-Stokes généré dans le matériau a une fréquence qui est différente des fréquences du champ incident et est donc une nouvelle fréquence, le champ non-linéaire est donné par:

$$E_{as}^{(3)} = A_{as}e^{-i\omega_{as}t} + c.c. \quad (2.23)$$

et l'intensité correspondante est donnée par:

$$I_{as} = \frac{\epsilon_0 c}{2} |A_{as}|^2. \quad (2.24)$$

Puisque la seule contribution du faisceau anti-Stokes provient de la polarisation non-linéaire oscillant à la fréquence  $\omega_{as}$ , l'intensité du faisceau anti-Stokes est donnée par:

$$I(\omega_{as}) \propto |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_S \quad (2.25)$$

où  $I_p$  et  $I_S$  sont les intensités des faisceaux pompe et Stokes respectivement. Le signal anti-Stokes est conséquemment homodyne, c'est-à-dire qu'il est proportionnel au carré de la susceptibilité non-linéaire.

### Signal non-résonant

La problématique majeure concernant la microscopie CARS est la présence de la contribution non-résonante du signal qui peut diminuer le contraste d'imagerie [37]. Ce dernier provient de plusieurs sources: la contribution électronique non résonante qui est présente même lorsque les conditions de résonance Raman ne sont pas remplies, la contribution du mélange à quatre ondes ("Four Wave Mixing": FWM) (voir figure 2.2(c)) et la contribution Raman du milieu environnant. En interférant avec le signal CARS lorsque la concentration de l'élément à imager est faible [158], la contribution non-résonante diminue le contraste d'imagerie [61], cause des artéfacts d'imagerie cohérents [6, 156, 157] et déforme le spectre mesuré comparé au spectre Raman [166].

Le signal non-résonant est représenté par la susceptibilité non-linéaire du troisième ordre  $\chi_{NR}^{(3)}$ , que nous pouvons considérer comme constant pour la bande spectrale environnant le mode vibrationnel. En considérant ce terme, la susceptibilité non-linéaire du troisième ordre est ainsi donnée par [15]:

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)} \quad (2.26)$$

et l'intensité correspondante du signal CARS est donnée par [133]:

$$I_{CARS} \propto \left| \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)} \right|^2 I_p^2 I_S = \left[ \left| \chi_R^{(3)} \right|^2 + \left| \chi_{NR}^{(3)} \right|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)} \operatorname{Re} \left( \chi_R^{(3)} \right) \right] I_p^2 I_S. \quad (2.27)$$

Nous remarquons que le carré de la susceptibilité non-linéaire est composé de trois termes: le terme résonant  $|\chi_R^{(3)}|^2$ , le terme non-résonant  $|\chi_{NR}^{(3)}|^2$  et le terme d'interférence  $2\chi_{NR}^{(3)} \text{Re}(\chi_R^{(3)})$ . Le comportement de chacun de ces termes près de la fréquence de résonance est présenté à la figure 2.5(a). La somme des termes présentés à la figure 2.5(a) est présenté à la figure 2.5(b). Ainsi, la figure 2.5(b) montre que la courbe du signal CARS en fonction de la fréquence est déformée par rapport à celui du signal Raman (courbe bleue de la figure 2.5(a)) et que la fréquence pour laquelle l'intensité est maximum est décalée par rapport à la fréquence de résonance  $\Omega$ . Ceci est causé par la présence du terme d'interférence  $2\chi_{NR}^{(3)} \text{Re}(\chi_R^{(3)})$  représenté par la courbe rouge sur la figure 2.5(a). Également, si le signal résonant est beaucoup plus petit que le signal non-résonant, il peut devenir difficile de le différencier de ce dernier (voir figure 2.5(c)).

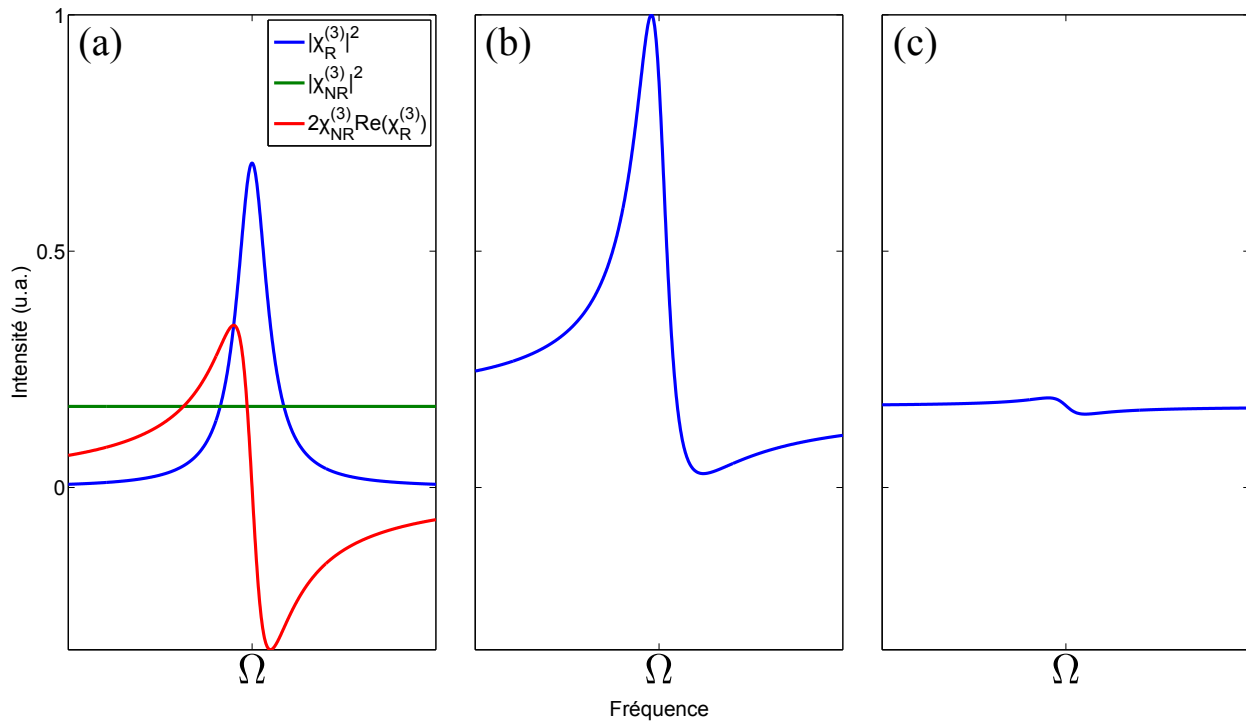


FIGURE 2.5 – Graphique de l'intensité du signal CARS. (a) Différentes composantes du carré de la susceptibilité non-linéaire avoisinant la fréquence de résonance. (b) Carré de la susceptibilité non-linéaire près de la fréquence de résonance. (c) Carré de la susceptibilité non-linéaire près de la fréquence de résonance dans le cas où le signal résonant est beaucoup plus petit que le signal non-résonant.

Pour la microscopie CARS, il est préférable d'utiliser des impulsions picosecondes plutôt que des impulsions femtosecondes puisqu'elles permettent d'obtenir un meilleur ratio du si-

gnal sur le bruit en excitant une largeur spectrale équivalant à celle d'un mode vibrationnel de Raman. Pour permettre une meilleure détection du signal CARS, spécialement lorsque celui-ci est petit par rapport au signal non-résonant, plusieurs techniques telles que la microscopie epi-CARS [30, 196], polarisation-CARS [28, 133], FM-CARS [61] et "time-resolve" CARS [33, 133, 195] furent développées pour permettre une meilleure sensibilité de détection.

### 2.2.2 Microscopie "Stimulated Raman Scattering"

Comme présentée plus tôt, la microscopie CARS possède le désavantage de générer un signal non-résonant qui peut diminuer grandement le contraste d'imagerie en plus d'avoir un spectre d'intensité déformé par rapport au spectre Raman (voir figure 2.5). Une technique alternative à la microscopie CARS est la microscopie stimulée Raman (SRS: Stimulated Raman Scattering) qui possède l'avantage de ne produire aucun signal non-résonant causé par le mélange à quatre ondes en plus de posséder un spectre de l'intensité non déformé par rapport au spectre Raman [52, 139, 147, 211]. Le phénomène de SRS fut découvert peu de temps après l'invention du laser [126]. Les principes de base de la microscopie SRS sont présentés dans cette section.

Contrairement à la microscopie CARS, qui détecte la cohérence vibrationnelle des molécules, la microscopie SRS sonde plutôt la population vibrationnelle. Lorsque la lumière interagit avec la matière, il se produit à la fois de la diffusion élastique et inélastique. La plupart des photons qui interagissent avec la matière sont diffusés élastiquement, ne modifiant pas l'énergie de ce dernier. Par contre, une faible proportion d'entre eux sont diffusés inélastiquement, c'est-à-dire qu'il y a transfert d'énergie entre le photon et la matière, causant une modification de la longueur d'onde du photon et une modification de l'état vibrationnel des molécules [50]. Si ce transfert d'énergie mène à l'excitation de la molécule vers un niveau Raman, il en résulte la destruction d'un photon à la fréquence du faisceau pompe  $\omega_p$  et la génération d'un photon à la fréquence du faisceau Stokes  $\omega_s$ . Si un seul faisceau laser est utilisé pour l'excitation des photons vers le mode Raman, seulement une petite partie des photons sont spontanément excités vers le mode Raman. Ce processus est appelé diffusion

Raman spontanée. Ayant un taux de conversion très faible, la diffusion Raman spontanée nécessite un temps d'acquisition très élevée.

Toutefois, si nous faisons coïncider deux faisceaux lasers dans un milieu et que la différence de fréquences entre ces deux faisceaux coïncide avec un mode vibrationnel Raman, il se produit une excitation vibrationnelle stimulée résultant d'une interaction non-linéaire (voir figure 2.2(d)). Celle-ci produit une excitation du mode Raman désiré à un taux bien plus élevé que la diffusion Raman spontanée, et ceci par un facteur donné par [126]:

$$\frac{r_{stim.Raman}}{r_{spont.Raman}} = n_{Stokes} + 1 \quad (2.28)$$

où  $n_{Stokes}$  est le nombre de photons dans le mode optique du faisceau Stokes. L'excitation vibrationnelle est accompagnée par un transfert d'énergie du faisceau pompe vers le faisceau Stokes. Comme le veut le principe de la conservation d'énergie, chaque quantum d'excitation vibrationnel qui devient excité est accompagné par la destruction d'un photon à la fréquence du faisceau pompe et simultanément par la création d'un photon à la fréquence du faisceau Stokes (voir figures 2.6(c) et (d)). Il en résulte une baisse d'intensité du faisceau pompe, appelée "Stimulated Raman Loss" (SRL), ainsi qu'un gain d'intensité du faisceau Stokes, appelé "Stimulated Raman Gain" (SRG) (voir figures 2.6 (a) et (b)). Lorsque la différence d'énergie entre les lasers ne correspond pas à la fréquence vibrationnelle moléculaire visée, il ne se produit aucun transfert d'énergie entre les faisceaux pompe et Stokes et donc aucun signal SRL et SRG est généré. Ainsi, la microscopie SRS ne produit théoriquement pas de bruit de fond non-résonant qui diminue le contraste d'imagerie. En effet, en l'absence de niveaux d'énergie réels pour contenir la population et l'énergie, le principe de conservation d'énergie veut que celle-ci ne puisse simplement pas être transférée du faisceau pompe vers le faisceau Stokes.

## Description classique des champs

La microscopie SRS peut être expliquée en utilisant la description classique des champs. Rappelons que la polarisation induite dans un matériau par un champ incident est donnée



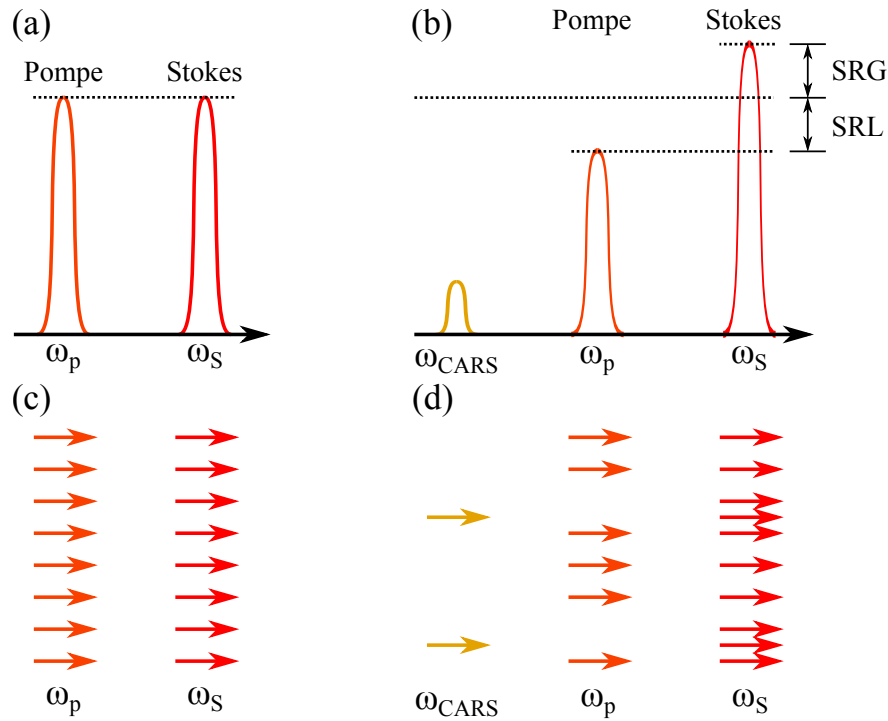


FIGURE 2.6 – Description du processus SRS. (a) Les faisceaux pompe et Stokes incidents ont une certaine intensité. (b) Après avoir interagi avec le milieu, le faisceau pompe subit une perte de l'intensité (SRL) tandis que le faisceau Stokes subit une augmentation de l'intensité (SRG). (c) Les photons pompe et Stokes avant l'interaction avec le milieu. (d) Les photons pompe, Stokes et CARS après interaction avec le milieu, une fraction des photons pompe sont détruits et un nombre égal de photons Stokes est créé.

par:

$$\begin{aligned}
 P(t) &= \epsilon_0 \left[ \chi^{(1)} E(t) + \chi^{(2)} E^2(t) + \chi^{(3)} E^3(t) + \dots \right] \\
 &= P^{(1)}(t) + P^{(2)}(t) + P^{(3)}(t)
 \end{aligned}
 \tag{2.29}$$

et que le champ électrique est relié à l'amplitude selon:

$$E_i(t) = A_i e^{-i\omega_i t} + c.c.
 \tag{2.30}$$

Comme mentionnée à la section 2.2.1 aux équations 2.21 et 2.22, la polarisation non-linéaire induite dans un matériau pour les contributions des fréquences  $\omega_S$  et  $\omega_p$  est donnée par [33]:

$$P^{(3)}(\omega_S) = 6\epsilon_0\chi^{(3)*}(\omega_v)|A_p|^2 A_S^* \quad (2.31)$$

$$P^{(3)}(\omega_p) = 6\epsilon_0\chi^{(3)}(\omega_v)|A_S|^2 A_p^*. \quad (2.32)$$

La polarisation non-linéaire  $P^{(3)}(\omega_S)$  est responsable de l'effet SRG tandis que  $P^{(3)}(\omega_p)$  est responsable de l'effet de SRL. Les polarisations non-linéaires sont les sources des champs non-linéaires  $E_S^{(3)}$  et  $E_p^{(3)}$  aux fréquences  $\omega_S$  et  $\omega_p$  respectivement. Ceux-ci ont la même fréquence que les champs incidents  $E_p$  et  $E_S$ . L'intensité totale détectée à la fréquence  $\omega_p$ , pour l'effet SRL, est donc la somme des deux champs et est donnée par:

$$I(\omega_p) = \frac{\epsilon_0 c}{2} |E_p^{(3)} + E_p|^2 \quad (2.33)$$

Puisque le champ non-linéaire  $E_p^{(3)}$  est proportionnel à la polarisation induite donnée par l'équation 2.32, l'intensité est donnée par:

$$I(\omega_p) \propto |E_p^{(3)}|^2 + |E_p|^2 + 2E_p E_p^{(3)} \quad (2.34)$$

$$\propto |E_p^{(3)}|^2 + |E_p|^2 + 2I_p I_S \left[ \text{Re}(\chi^{(3)}) \cos \Delta\phi + \text{Im}(\chi^{(3)}) \sin \Delta\phi \right] \quad (2.35)$$

où  $I_p = |E_p|^2$  et  $I_S = |E_S|^2$ . Dans le champ lointain, le déphasage  $\Delta\phi$  est de  $-\pi/2$ <sup>1</sup>, ce qui implique que la partie réelle de la réponse du matériau est déphasée de  $\pi/2$  par rapport à  $E_p$  et la partie imaginaire est déphasée de  $\pi$  par rapport à  $E_p$ . Ainsi, l'intensité devient:

$$I(\omega_p) \propto |E_p^{(3)}|^2 + |E_p|^2 - 2I_p I_S \text{Im}(\chi^{(3)}). \quad (2.36)$$

L'équation 2.36 démontre que l'intensité du champ à  $\omega_p$  est atténuée à cause de la présence d'un oscillateur local ( $E_p$ ). Cette perte est causée par une interférence destructive entre le champ incident  $E_p$  et le champ induit  $E_p^{(3)}$ . Pareillement, à la fréquence Stokes  $\omega_S$ , le champ incident  $E_S$  agit comme un oscillateur local. En utilisant  $\Delta\phi = \pi/2$  et  $\chi_{NL}^* = -\chi_{NL}$ , nous

---

1. Une explication brève du déphasage est présentée à la page 29.

obtenons:

$$I(\omega_S) \propto |E_S^{(3)}|^2 + |E_S|^2 + 2I_p I_S \operatorname{Im}(\chi^{(3)}). \quad (2.37)$$

Nous remarquons que l'intensité augmente en raison de l'interférence constructive entre le champ induit  $E_S^{(3)}$  et le champ incident  $E_S$ . La microscopie SRS est ainsi un processus hétérodyne puisque le champ émis  $E^{(3)}$  a la même fréquence que le champ incident  $E$  et l'intensité du signal est proportionnelle à  $|E^{(3)}+E|$ , qui contient un terme d'interférence  $E^{(3)*}E + E^{(3)}E^*$ . La contribution hétérodyne est définie comme ce terme d'interférence puisque le champ émis est "mêlé" avec un autre champ. Puisque seulement la partie imaginaire de la susceptibilité non-linéaire  $\chi_{NL}$  est utilisée pour obtenir le signal SRS, il n'y a pas de signal non-résonant provenant du mélange à quatre ondes, comme c'est le cas pour la microscopie CARS, car le signal non-résonant qui affecte la microscopie CARS est purement réel. De plus, il n'y a pas de déformation du spectre Raman causée par l'interférence entre le signal résonant et non-résonant et le spectre qui est détecté est le même que celui du spectre Raman.

En modulant l'intensité d'un des faisceaux incidents, l'intensité de l'interférence du second faisceau laser sera également modulée si un mode Raman est excité. Il est ainsi possible de le détecter en utilisant un processus de détection synchrone pour lequel l'intensité du signal détecté est donnée par:

$$\Delta I_{SRG}(\omega_S) \propto 2 \operatorname{Im}(\chi^{(3)}(\omega_v)) I_p I_S \quad (2.38)$$

$$\Delta I_{SRL}(\omega_S) \propto -2 \operatorname{Im}(\chi^{(3)}(\omega_v)) I_p I_S \quad (2.39)$$

dans les cas de SRG et SRL respectivement. La figure 2.7 représente schématiquement l'effet du transfert de modulation du faisceau pompe vers le faisceau Stokes dans le cas de la microscopie SRG. Pour diminuer le plus possible le bruit électronique et le bruit de l'intensité du laser qui est présent dans les basses fréquences (communément appelé bruit  $1/f$ ), une modulation à haute fréquence ( $> 1$  MHz) est préférable [126].

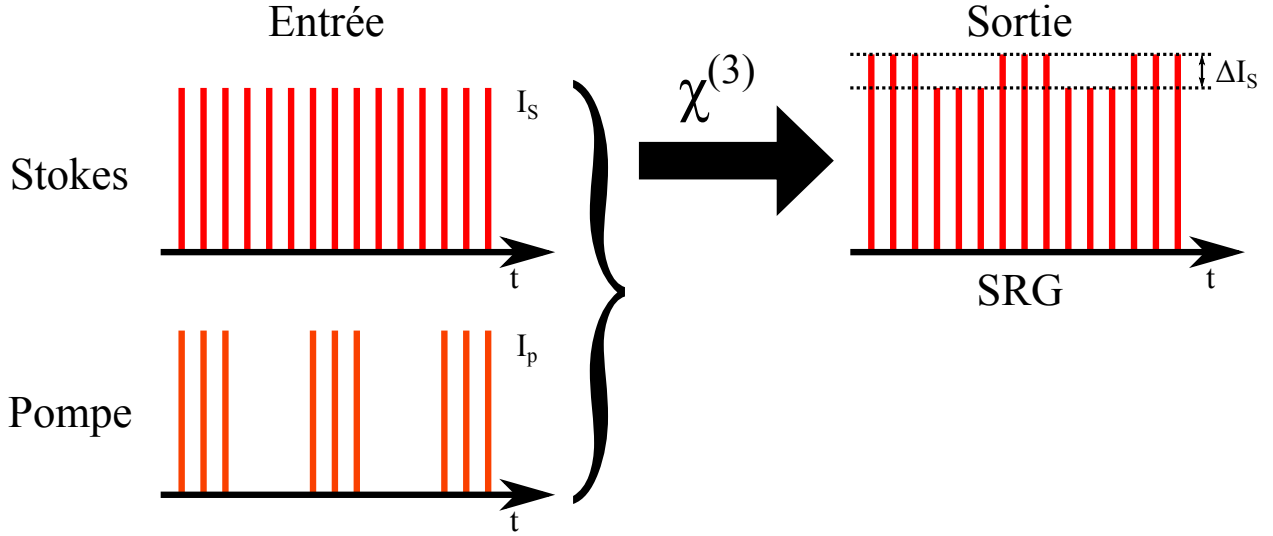


FIGURE 2.7 – Schéma du transfert d'énergie du signal SRS avec modulation où le faisceau pompe est modulé et le signal SRG ( $\Delta I_S$ ) est détecté par la modulation de l'intensité du faisceau Stokes.

### Sensibilité de la microscopie SRS

Le ratio signal sur bruit (SNR) de la microscopie SRS est donné par:

$$SNR_{SRS} = \frac{2 \operatorname{Im} [\chi_R^{(3)}(\Omega)] \cdot I_p \cdot I_S}{\alpha \cdot I_S + \sqrt{I_S}} \xrightarrow{\alpha \rightarrow 0} 2 \operatorname{Im} [\chi_R^{(3)}(\Omega)] \cdot I_p \cdot \sqrt{I_S} \quad (2.40)$$

où  $\alpha \cdot I_S$  est le bruit de l'intensité du laser et  $\sqrt{I_S}$  est le bruit de grenaille (“shot noise”) du laser Stokes. Si la fréquence à laquelle le faisceau pompe est modulé est très élevée ( $>1\text{MHz}$ ), le premier terme peut être négligé et le SNR approche la partie droite de l'équation. La limite du bruit de grenaille est ainsi atteinte et  $\Delta I_p/I_p$  devient détectable avec un ratio d'environ  $10^{-8}$  en une seconde d'acquisition [126]. De plus, la relation entre l'intensité et la concentration pour la microscopie CARS est quadratique pour les hautes concentrations et linéaire pour les faibles concentrations tandis que pour la microscopie SRS, la dépendance de la concentration sur l'intensité est linéaire, permettant une quantification fiable et directe. Également, puisque la microscopie SRS implique la mesure de la transmission du faisceau pompe, elle est automatiquement en accord de phase. Finalement, la fonction d'étalement des points est bien définie et peut être utilisée pour une déconvolution de l'image SRS, permettant cette dernière d'être facile à comprendre en l'absence d'artéfacts [126].

## Radiation SRS dans les champs lointains

À la page 26, il est mentionné que le déphasage entre le champ incident et le champ induit lors de l'excitation d'un mode Raman est de  $\pi/2$  [34]. Le déphasage de  $\pi/2$  entre le champ incident et le champ émis par le milieu lorsqu'un mode Raman est excité peut être expliqué comme suit. La polarisation du troisième ordre du processus SRL, par exemple, est donnée par:

$$P^{(3)}(t) = P^{(3)}(\omega_p)e^{-i\omega_p t} + c.c. \quad (2.41)$$

La polarisation induite est dépendante de la fréquence  $\omega_p$  et est proportionnelle à la susceptibilité non-linéaire  $\chi_{NL}^{(3)}$ , qui est purement imaginaire à la fréquence de résonance. Dans ce cas,  $P^{(3)}(\omega_p) \propto i \operatorname{Im}(\chi_{NL}^{(3)})$  et  $i \operatorname{Im}(\chi_{NL}^{(3)})$  étant une quantité positive, correspond à un déphasage de  $+\pi/2$ . La polarisation non-linéaire peut donc s'écrire comme suit:

$$P^{(3)}(t) \propto \operatorname{Im}(\chi_{NL}^{(3)}(\omega_p)) e^{i\pi/2} e^{-i\omega_p t} + c.c. = \operatorname{Im}(\chi_{NL}^{(3)}(\omega_p)) \cos(\omega_p t - \pi/2) \quad (2.42)$$

Étant donné que le champ incident est donné par  $E_p = A_p \cos(\omega_p t)$ , nous remarquons un déphasage de  $-\pi/2$  entre le champ incident et le champ émis par les dipôles du milieu. Similairement, dans le cas SRG, le déphasage est de  $\pi/2$ .

## Propriétés de la polarisation de la susceptibilité non-linéaire

La susceptibilité non-linéaire est hautement dépendante de l'état de la polarisation entre le faisceau pompe et le faisceau Stokes. Soit l'état de polarisation des différents champs indiqués par les indices  $\{i, j, k, l\}$ , la susceptibilité non-linéaire peut être représentée par  $\chi_{ijkl}^{(3)}(-\omega_4; \omega_1, \omega_2, \omega_3)$  où les indices  $\{i, j, k, l\}$  correspondent aux fréquences  $\{\omega_4, \omega_1, \omega_2, \omega_3\}$  respectivement. Pour une susceptibilité du troisième ordre, nous nous retrouvons avec un tenseur d'ordre 4 qui contient 81 éléments. Le nombre d'éléments qui sont non-zéro ou indépendants dépend de la symétrie du milieu. Pour un milieu isotropique, le nombre d'éléments qui sont non-zéro est réduit à 21 dont seulement 3 sont indépendants. Pour simplifier la no-

tation, nous exprimons les trois coordonnées cartésiennes orthogonales avec les trois chiffres  $\{1, 2, 3\}$ . Par exemple, le tenseur  $\chi_{1111}^{(3)}$  est l'élément où tous les champs ont la même orientation de la polarisation. Dans un milieu isotropique, l'orientation des axes est invariante et les propriétés de symétrie suivantes doivent être appliquées [15]:

$$\begin{aligned}
 \chi_{1111} &= \chi_{2222} = \chi_{3333} \\
 \chi_{1122} &= \chi_{1133} = \chi_{2211} = \chi_{2233} = \chi_{3311} = \chi_{3322} \\
 \chi_{1212} &= \chi_{1313} = \chi_{2323} = \chi_{2121} = \chi_{3131} = \chi_{3232} \\
 \chi_{1221} &= \chi_{1331} = \chi_{2112} = \chi_{2332} = \chi_{3113} = \chi_{3223}.
 \end{aligned} \tag{2.43}$$

Ces éléments du tenseur peuvent être catégorisés en quatre types d'éléments non-nuls, soit  $\chi_{1111}$ ,  $\chi_{1122}$ ,  $\chi_{1212}$  et  $\chi_{1221}$ . Ces éléments ne sont pas mutuellement indépendants et sont reliés selon:

$$\chi_{1111} = \chi_{1122} + \chi_{1212} + \chi_{1221}. \tag{2.44}$$

## 2.3 Fluorescence à deux photons

L'absorption à deux photons peut être décrite comme étant l'atteinte d'un niveau d'excitation réel par l'absorption de deux photons de manière presque simultanée. L'excitation est équivalent à l'absorption d'un photon ayant le double de l'énergie [214]. L'absorption à deux photons est un processus non-linéaire du troisième ordre et ne possède donc pas de restriction au niveau de la symétrie [160]. L'absorption de deux photons crée une excitation au niveau d'énergie  $S_i$  et cette excitation cascade jusqu'au niveau  $S_1$ . Le retour de l'excitation au niveau fondamental  $S_0$  mène à l'émission d'un photon de fluorescence dont l'énergie est plus élevée que celles du faisceau pompe (voir figure 2.2(e)). Contrairement à la génération de seconde harmonique, la fréquence du photon de fluorescence est moins que le double de la fréquence du faisceau pompe. De plus, le signal de fluorescence est incohérent (non directionnel) et possède un spectre très large.

La microscopie à fluorescence à deux photons utilise habituellement un faisceau pompe dont la fréquence se situe dans le proche infrarouge, générant un signal de fluorescence dans le spectre du visible. Le taux de transition pour un milieu est donné par [15]:

$$R = \frac{\sigma^{(2)} I^2}{\hbar\omega} \quad (2.45)$$

où  $\sigma^{(2)}$  est le coefficient qui décrit la force de la transition,  $I$  est l'intensité et  $\omega$  est la fréquence. Cette équation démontre que le signal de fluorescence a une dépendance quadratique avec l'intensité du faisceau pompe. Étant donné que l'intensité du laser dépend de la taille du faisceau, le signal de fluorescence est maximal au point focal du faisceau laser, tel que montré à la figure 2.1. Il est préférable d'utiliser un laser à impulsions ultra-brèves (picoseconde ou femtoseconde) puisque celles-ci permettent de générer une intensité moyenne plus basse, ce qui réduit le dommage thermique dans les tissus biologiques.

Contrairement à la fluorescence à un photon, la fluorescence à deux photons permet de pénétrer plus profondément dans les tissus biologiques puisqu'elle utilise des lasers aux longueurs d'onde plus élevées. Également, la résolution est plus élevée, car la dépendance quadratique de l'intensité permet d'éliminer le signal généré hors du point focal (voir figure 2.1).

## 2.4 État de l'art

Cette section présente brièvement l'état de l'art concernant l'instrumentation de la microscopie CARS et SRS ainsi que celle concernant la microscopie SHG, principalement appliquée dans les tissus biologiques.

### 2.4.1 Microscopie Raman Cohérente

Les recherches sur la microscopie CRS sont principalement concentrées sur (i) l'amélioration de la sensibilité de détection (c.-à-d. diminuer le bruit et le signal non-résonant), (ii)

l'amélioration de la facilité d'utilisation ou diminuer les coûts des instruments nécessaires à la microscopie CRS en vue de son utilisation par une communauté de biologistes et (iii) le développement de méthodes d'acquisition rapide de plusieurs fréquences Raman durant l'acquisition (appelé hyperspectral CARS ou SRS) [210]. Puisque les techniques de microscopie CARS et SRS sont semblables, l'état de l'art sera présenté pour les deux types de microscopie dans cette section.

L'utilisation de lasers picoseconde a prouvé être théoriquement et expérimentalement la source laser permettant d'obtenir le meilleur ratio entre le signal CARS et le signal non-résonant [30, 60]. Les sources d'excitation picoseconde ont été les principales sources lasers utilisées durant les jeunes années de la microscopie CARS. Plusieurs méthodes ont par la suite été développées pour réduire le signal non-résonant. Notamment, en contrôlant la polarisation des faisceaux incidents [28] ou en détectant le signal dans la direction backward [29, 30, 196]. Toutefois, bien qu'ils augmentent le ratio signal sur bruit, ces techniques s'accompagnent généralement d'une baisse significative du signal CARS. La détection du signal SRS dans la direction backward fut également développée en vue de détecter le signal SRS dans les échantillons épais [182, 183, 202].

Différentes techniques servant à simplifier le montage CRS furent proposées. Ainsi, des techniques CARS [44] et SRS [16, 46] utilisant seulement un système laser ont été développées en utilisant des impulsions laser ayant une largeur spectrale élevée. Également, la microscopie CARS à champ large ("widefield") fut développée [71, 90], permettant l'acquisition d'une image sans l'utilisation de système de balayage laser (miroirs galvanométriques). La microscopie SRS utilisant des lasers continus pour les faisceaux pompe et Stokes a également été réalisée [82].

La microscopie CARS multiplex utilise deux faisceaux lasers, un faisceau à large bande spectral et un autre dont la bande spectrale est étroite en vue de produire un spectre CARS dont l'acquisition se fait à l'aide d'un spectromètre [13, 31, 132]. Cette technique fut également utilisée pour la microscopie SRS [105]. Plusieurs avancées ont été faites dans ce domaine en utilisant des impulsions à très large bande spectrale produites à l'aide d'un superconti-



nuum [22, 23, 149, 173] généré par une fibre à cristal photonique et permet d'obtenir un très large spectre CARS (appelé B-CARS pour "Broadband CARS"). L'augmentation de la bande spectrale d'un des faisceaux en utilisant une plaque de saphir pour générer de la lumière blanche ("White Light") est aussi rapportée [121, 153]. Également, un autre concept utilisant des impulsions picosecondes et permettant de faire varier automatiquement et rapidement la longueur d'onde des impulsions lasers est présenté [10, 63]. De plus, un autre concept, appelé balayage spectral ("Spectral Focusing"), consiste à appliquer une dérive de fréquences aux faisceaux pompe et Stokes. La durée des impulsions, qui est de l'ordre de la centaine de femtosecondes, est augmentée pour être de l'ordre de la picoseconde. En ajustant la durée des impulsions pour qu'il y ait synchronisation de la dérive de fréquences, il est possible d'exciter différentes fréquences Raman en ajustant le délai entre les impulsions pompe et Stokes [27, 75, 100, 118, 150, 171]. La dernière méthode présentée dans ce texte consiste à effectuer une transformée de Fourier du signal CARS résolu dans le temps [145, 195]. À cause du signal non-résonant, le spectre CARS est souvent déformé par rapport au spectre Raman habituel. Il est alors nécessaire de traiter les données pour en extraire le spectre Raman. Pour ce faire, deux méthodes furent développées: la méthode d'entropie maximum [193] et la transformée de Kramers-Kronig [107].

Beaucoup d'efforts ont également été mis sur la microscopie SRS hyperspectrale, en partie parce que le spectre SRS n'est pas déformé par le signal non-résonant, contrairement à la microscopie CARS. Ainsi, utilisant la microscopie SRS, l'imagerie de plusieurs modes Raman fut effectuée avec des impulsions picoseconde en changeant la longueur d'onde du laser de manière continu [188]. En utilisant des impulsions femtosecondes, la microscopie hyperspectrale peut être utilisée sans avoir besoin de changer la cavité laser. Plusieurs méthodes sont basées sur ce principe. La première méthode consiste à utiliser un formeur d'impulsions pour sélectionner une bande très étroite de fréquences du spectre femtoseconde et ainsi exciter un mode Raman précis [200, 201, 212, 213]. Une seconde méthode consiste à utiliser un filtre optique variable pour varier la longueur d'onde centrale des impulsions d'un laser Ytterbium combiné avec un laser Titane:Saphir [148]. Une dernière méthode consiste à utiliser le balayage spectral [46, 55, 58, 106] comme discuté au paragraphe précédent. La sélection de

plusieurs longueurs d'onde dans le but d'exciter conjointement plusieurs modes Raman est également présentée [56].

## 2.4.2 Microscopie à Génération de Seconde Harmonique

La microscopie SHG est relativement simple à implémenter comparativement à la microscopie SRS puisque seulement un faisceau laser est nécessaire. Toutefois, l'interprétation du signal est plus complexe puisque le signal est dépendant de l'accord de phase du signal SHG généré par les différentes molécules. L'utilisation de la microscopie SHG dans des échantillons biologiques est limitée puisque seulement les molécules non centrosymétriques génèrent du signal de seconde harmonique et ainsi la microscopie SHG est possible pour peu de tissus biologiques. La microscopie SHG dans les tissus biologiques est essentiellement utilisée pour l'imagerie de la myosine [190], des microtubules [42] et du collagène [39, 186] (incluant le cartilage [17, 209] et les tendons [53, 104, 184]).

Plusieurs techniques furent développées dans le but d'obtenir de l'information supplémentaire sur le signal de seconde harmoniques dans les tissus biologiques. Ainsi la microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG) consiste à analyser l'intensité du signal en changeant l'angle de polarisation du faisceau laser et permet d'obtenir de l'information sur le niveau d'anisotropie et l'orientation des fibrilles [35, 69, 113, 119, 185, 205, 207, 208]. Également, la microscopie SHG interférométrique (I-SHG) permet d'obtenir la polarité des structures non centrosymétriques dans le tissu [5, 38, 167, 169].

# Chapitre 3

## Utilisation des filtres adaptés appliqués à la microscopie Stimulated Raman Scattering (SRS)

La microscopie Stimulated Raman Scattering (SRS) obtient son contraste d'imagerie du transfert de modulation d'un des faisceaux lasers incidents vers l'autre faisceau, dans ce cas-ci le faisceau pompe vers le faisceau Stokes. Cette variation de l'intensité est beaucoup plus faible que l'intensité totale du faisceau pompe. La méthode principalement utilisée pour détecter cette faible variation est d'utiliser un amplificateur à détection synchrone ("Lock-in Amplifier": LIA) pour isoler le signal du bruit. Une méthode alternative, que nous tentons d'appliquer, est l'utilisation de filtres adaptés pour retrouver le signal SRS parmi le bruit et ainsi augmenter le ratio signal sur bruit (SNR) [191]. Le filtre adapté est largement utilisé dans le domaine des télécommunications [95], en imagerie ultrason [128–131, 194], en traitement d'images [78, 88, 97, 112, 170, 179] et en technologie radar [66, 111, 114, 178], mais fut très peu utilisé en optique [7, 40, 86, 91, 115] et n'a jamais été utilisé, à notre connaissance, en microscopie optique non-linéaire.

Ce chapitre présente les résultats obtenus sur l'utilisation des filtres adaptés en microscopie SRS dans le but d'augmenter la sensibilité sur ce dernier en augmentant le SNR.

Tout d’abord, à la section 3.1, une revue théorique des filtres adaptés est présentée suivie par une description du montage expérimental à la section 3.2. Finalement, nous présentons les résultats expérimentaux de l’implantation des filtres adaptés en utilisant deux types de modulations: les ondes carrées à la section 3.3 et les codes de Golay à la section 3.4.

## 3.1 Théorie sur les filtres adaptés et les codes de Golay

### 3.1.1 Filtre adapté

Le filtre adapté fut autrefois appelé “North Filter”, d’après la première personne qui présenta le concept, D.O. North [143]. Il fut tout d’abord conçu durant la Deuxième Guerre mondiale dans le but d’augmenter la sensibilité des systèmes radars. Depuis, il est utilisé dans plusieurs autres domaines tels que l’imagerie par rayons X, l’imagerie par ultrason et en télécommunication. Le concept de filtre adapté a une efficacité linéaire et invariant du temps et permet d’augmenter le SNR d’un signal en présence d’un bruit blanc gaussien additif. Le bruit blanc gaussien se définit comme un bruit dont la puissance par unité de fréquence (densité spectrale) est constante et dont la distribution de l’amplitude du signal suit une distribution gaussienne.

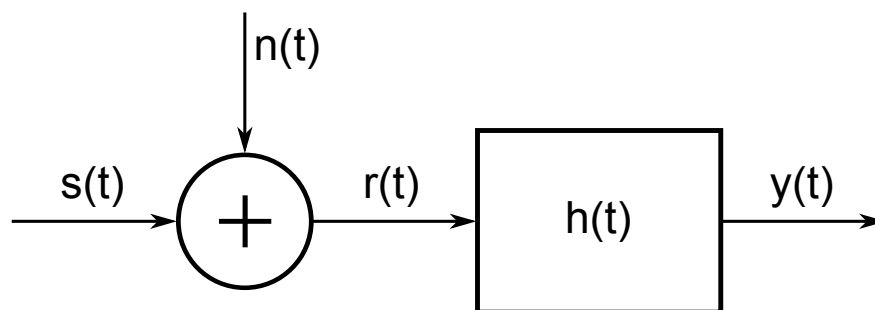


FIGURE 3.1 – Du bruit blanc gaussien  $n(t)$  est additionné au signal  $s(t)$  pour former l’entrée du filtre adapté,  $r(t)$ . La réponse impulsionnelle  $h(t)$  est appliquée à ce dernier pour former la sortie du filtre adapté qui est donné par  $y(t)$ , ayant un plus grand SNR.

Comme présenté à la figure 3.1, l’entrée d’un filtre adapté,  $r(t)$ , est composée d’un signal d’une durée finie dont la forme est connue,  $s(t)$ , et d’un bruit blanc gaussien,  $n(t)$ , de densité

de puissance  $N_0/2$ , de telle sorte que  $r(t) = s(t) + n(t)$ . Le filtre adapté a une réponse impulsionnelle représentée par  $h(t)$  et la sortie du filtre adapté,  $y(t)$ , est donnée par la convolution de l'entrée du filtre adapté et de la réponse impulsionnelle:

$$y(t) = \int_0^t r(u)h(t-u)du. \quad (3.1)$$

Puisque le bruit est additif, la partie de l'équation représentant le signal est donnée par:

$$y_s(t) = \int_0^t s(u)h(t-u)du \quad (3.2)$$

tandis que la partie du bruit est donnée par:

$$y_n(t) = \int_0^t n(u)h(t-u)du. \quad (3.3)$$

La fonction principale du filtre adapté est d'augmenter le SNR. Ce dernier est donné par:

$$SNR = \frac{y_s^2(t)}{E[y_n^2(t)]} = \frac{\left[\int_0^t s(u)h(t-u)du\right]^2}{E\left[\int_0^t n(u)h(t-u)du\right]^2} \quad (3.4)$$

où  $E\left[\int_0^t n(u)h(t-u)du\right]^2$  est la covariance du bruit. Transformons tout d'abord le dénominateur de cette équation. Celui-ci est donné par:

$$E\left[y_n^2(t)\right] = E\left\{\left[\int_0^t n(u)h(t-u)du\right]\left[\int_0^t n(v)h(t-v)dv\right]\right\} \quad (3.5)$$

que nous pouvons reformuler comme suit:

$$E\left[y_n^2(t)\right] = \int_0^t \int_0^t E[n(u)n(v)]h(t-u)h(t-v)dudv. \quad (3.6)$$

Selon les propriétés du bruit blanc, la covariance de ce dernier est donnée par:

$$E[n(u)n(v)] = \frac{N_0}{2}\delta(u-v). \quad (3.7)$$

Le dénominateur devient donc:

$$E [y_n^2(t)] = \int_0^t \int_0^t \frac{N_0}{2} \delta(u-v) h(t-u) h(t-v) du dv \quad (3.8)$$

et en effectuant l'intégrale selon  $v$ , nous obtenons:

$$E [y_n^2(t)] = \frac{N_0}{2} \int_0^t h^2(t-u) du, \quad (3.9)$$

en considérant que:

$$\int_0^t \delta(u-v) h(t-v) dv = h(t-u). \quad (3.10)$$

La SNR devient donc

$$SNR = \frac{[\int_0^t s(u) h(t-u) du]^2}{\frac{N_0}{2} \int_0^t h^2(t-u) du} \quad (3.11)$$

Pour résoudre cette équation, il est possible d'utiliser l'inégalité de Cauchy-Schwarz. Celui-ci stipule que, pour deux vecteurs se trouvant dans l'espace de Hilbert:

$$\langle S, Q \rangle^2 \leq |S|^2 |Q|^2. \quad (3.12)$$

où l'égalité est atteinte lorsque  $Q = cS$ , où  $c$  est une constante [98]. Appliquant cette inégalité pour des fonctions à valeurs complexes de carré intégrable, nous obtenons:

$$\left[ \int_0^t s(u) q(u) du \right]^2 \leq \int_0^t s^2(u) du \int_0^t q^2(u) du \quad (3.13)$$

dont l'égalité est atteinte lorsque  $cs(u) = q(u)$  où  $c$  est une constante. Si nous appliquons l'inégalité au numérateur du SNR, ce dernier est maximisé lorsqu'il y a égalité. Ceci est possible en posant  $h(t-u) = cs(u)$  et le SNR optimisé devient:

$$SNR^{opt}(t) = \frac{[c \int_0^t s^2(u) du]^2}{\frac{N_0 c^2}{2} \int_0^t s^2(u) du} = \frac{\int_0^t s^2(u) du}{\frac{N_0}{2}}. \quad (3.14)$$

Si le signal a une durée finit  $T$ , son énergie est donnée par:

$$\int_0^T s^2(u)du = \epsilon_s. \quad (3.15)$$

Le SNR optimisé est donc donné par:

$$SNR^{opt} = \frac{2\epsilon_s}{N_0}. \quad (3.16)$$

Nous voyons donc que pour optimiser le SNR, la réponse impulsionnelle optimale est composée du signal renversé dans le temps (voir figure 3.2) de telle sorte que

$$h(u) = cs(T - u). \quad (3.17)$$

où  $c$  est une constante. En utilisant une telle réponse impulsionnelle, le signal à la sortie du filtre adapté est maximum au temps  $t = 0$  et beaucoup plus bas partout ailleurs.

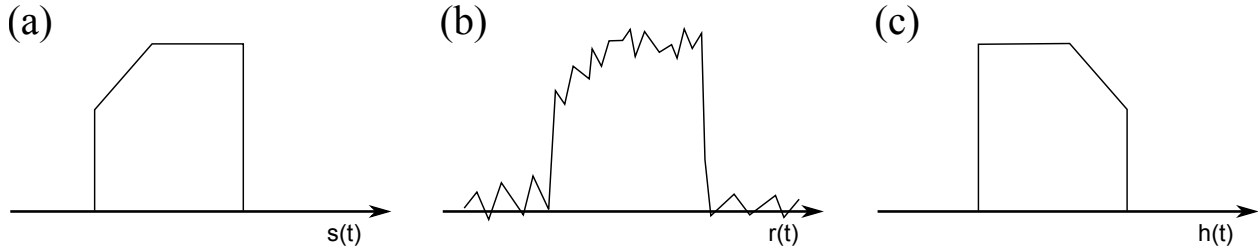


FIGURE 3.2 – Forme des différents signaux impliqués dans le processus de filtre adapté. (a) Forme du signal que nous souhaitons détecter. (b) Signal pour lequel un bruit a été additionné. Celui-ci forme l'entrée du filtre adapté. (c) Réponse impulsionnelle du filtre adapté qui consiste au signal inversé dans le temps.

En effectuant une analyse spectrale de la réponse impulsionnelle, nous obtenons la réponse suivante:

$$\begin{aligned} H(f) &= c \int_0^T s(T - u)e^{-j2\pi fu} du \\ &= c \int_T^0 s(r)e^{-j2\pi f(T-r)} (-dr) \\ &= ce^{-j2\pi fT} \int_T^0 s(r)e^{j2\pi fr} dr \\ &= ce^{-j2\pi fT} [S(f)]. \end{aligned} \quad (3.18)$$

Nous pouvons donc conclure que la réponse impulsionnelle possède une transformée de Fourier semblable au signal avec seulement un facteur  $c$  de différence.

### 3.1.2 Code de Golay

Il est possible d'augmenter le SNR en utilisant un code en configuration binaire en guise de modulation du signal de telle sorte que, lorsque décodé, il y a augmentation du SNR. Les codes de Golay sont une de ces familles de codes qui sont conçues pour augmenter le SNR [124]. Les codes de Golay complémentaires sont formés de paires qui doivent être additionnées [125].

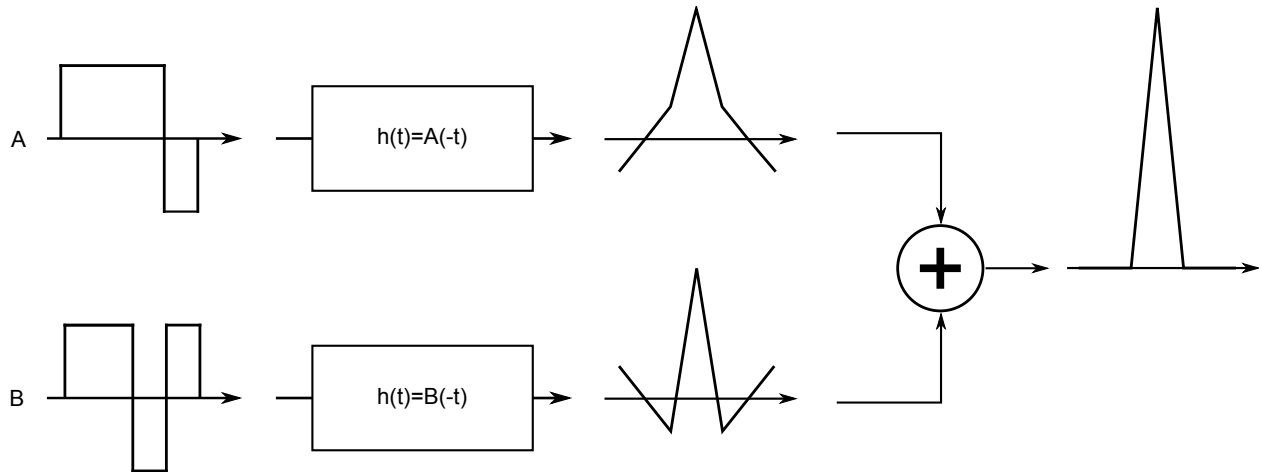


FIGURE 3.3 – Complémentarité des codes de Golay. Le filtre adapté est appliqué aux codes  $A$  et  $B$ , créant un sommet d'intensité au centre et entouré de points ayant une intensité généralement non nul. Lorsque ces deux courbes sont additionnées, la complémentarité des deux codes fait en sorte que le point central augmente d'intensité alors que les autres ont une valeur nulle.

Le code consiste donc en deux séquences ( $A$  et  $B$ ) de longueur  $N = 2^L$  données par:

$$A(k) = \sum_{m=0}^{N-1} a_m \delta(k - mT) \quad (3.19)$$

$$B(k) = \sum_{m=0}^{N-1} b_m \delta(k - mT). \quad (3.20)$$



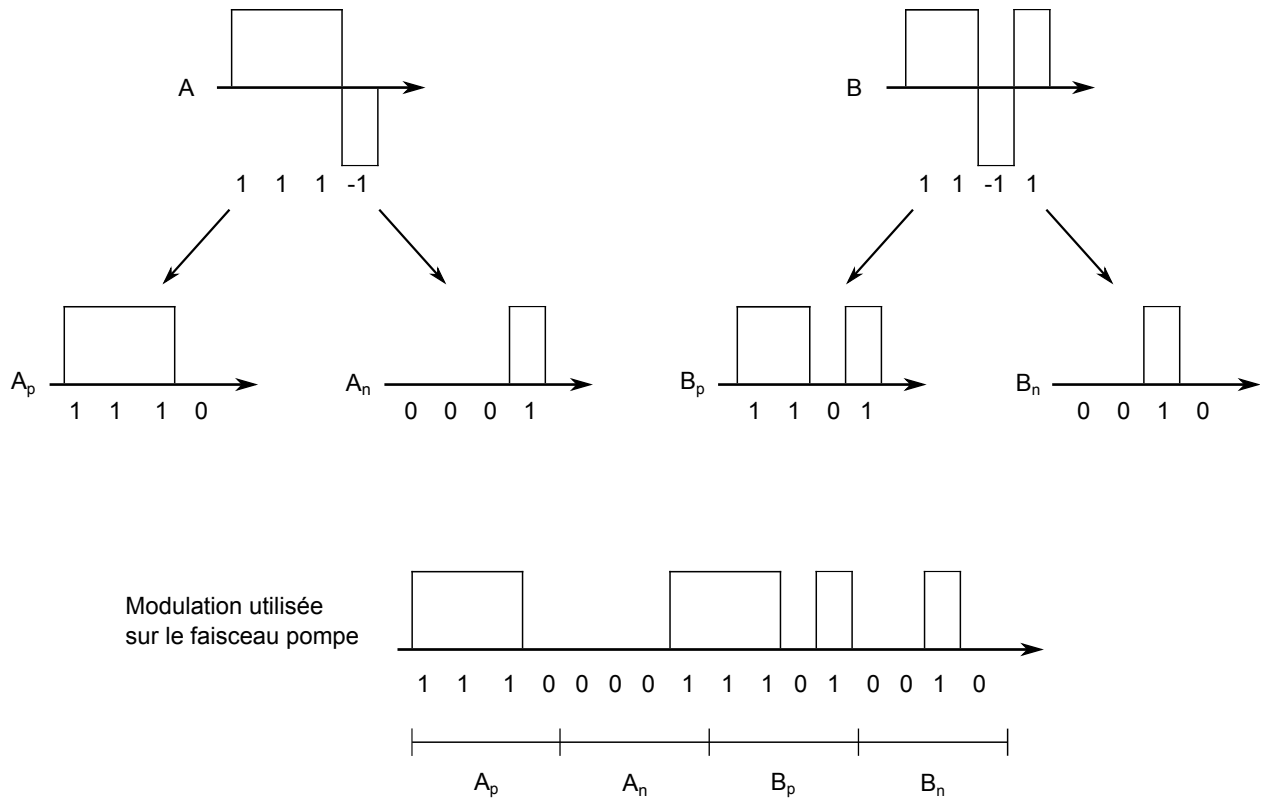


FIGURE 3.4 – Adaptation d’un code bipolaire en code unipolaire puisqu’un système laser ne peut avoir d’intensité négative. Haut de l’image: les deux codes bipolaires originaux ( $A$  et  $B$ ). Milieu de l’image: chacun de ces deux codes est séparé en deux codes, un contenant les bits positifs ( $A_p$  et  $B_p$ ) et le second les bits négatifs ( $A_n$  et  $B_n$ ). Bas de l’image: Ces quatre séquences sont mis bout à bout pour former la séquence finale qui formera le motif pseudoaléatoire utilisé pour moduler le faisceau pompe.

où  $a_m, b_m \in -1, 1$ ,  $\delta(k)$  est le delta de Kronecker,  $k$  est le temps et  $T$  est le délai temporel. La propriété clé de ce code est que la somme de leur autocorrélation respective est égale à zéro pour tous les délais temporels sauf le délai zéro (voir figure 3.3). Cette propriété, appelée la complémentarité, peut être exprimée comme suit:

$$A(k) * A(-k) + B(k) * B(-k) = 2N\delta(k) \quad (3.21)$$

Ce code est bipolaire, c’est-à-dire que les valeurs des bits varient entre -1 et 1. Or, un laser ne peut avoir une intensité négative. Il est alors nécessaire de transformer le code bipolaire

en un code unipolaire (voir figure 3.4), comme suit:

$$A_p(k) = (A(k) + 1)/2, \quad A_n(k) = (-A(k) + 1)/2 \quad (3.22)$$

$$B_p(k) = (B(k) + 1)/2, \quad B_n(k) = (-B(k) + 1)/2. \quad (3.23)$$

Les différentes parties du code sont donc mises bout à bout, ce qui forme la séquence utilisée pour moduler le laser. Il est alors possible de décoder le signal avec le filtre adapté. Pour ce faire, nous séparons le signal qui est détecté en quatre segments correspondants à  $A_p$ ,  $A_n$ ,  $B_p$  et  $B_n$ , nous soustrayons les segments positifs ( $A_p$  et  $B_p$ ) avec leurs segments négatives respectives ( $A_n$  et  $B_n$ ) pour obtenir des codes bipolaires et ensuite appliquer le filtre adapté approprié sur chacun d'eux. La réponse de chaque segment est finalement additionnée pour obtenir le SNR optimal.

En résumé, le filtre adapté est une technique utilisée pour augmenter le SNR d'un signal dont la forme est connue. Elle consiste à faire la convolution d'un signal affecté par du bruit et de la version inversée dans le temps de ce signal. Les codes de Golay sont un type de modulation complémentaire au filtre adapté qui permet d'augmenter le SNR.

## 3.2 Montage expérimental

Cette section décrit le montage expérimental utilisé pour la réalisation des expériences. Également, une description du microscope et des échantillons utilisés sera faite. Finalement, nous présentons les différents types de modulation ainsi que les codes de Golay utilisés pour les expériences.

### 3.2.1 Trajet Optique

La figure 3.5 présente le montage expérimental utilisé pour la réalisation des expériences. Un laser Titane:Sapphire (Mira 900, Coherent) produit un faisceau laser d'environ 150 fs dont

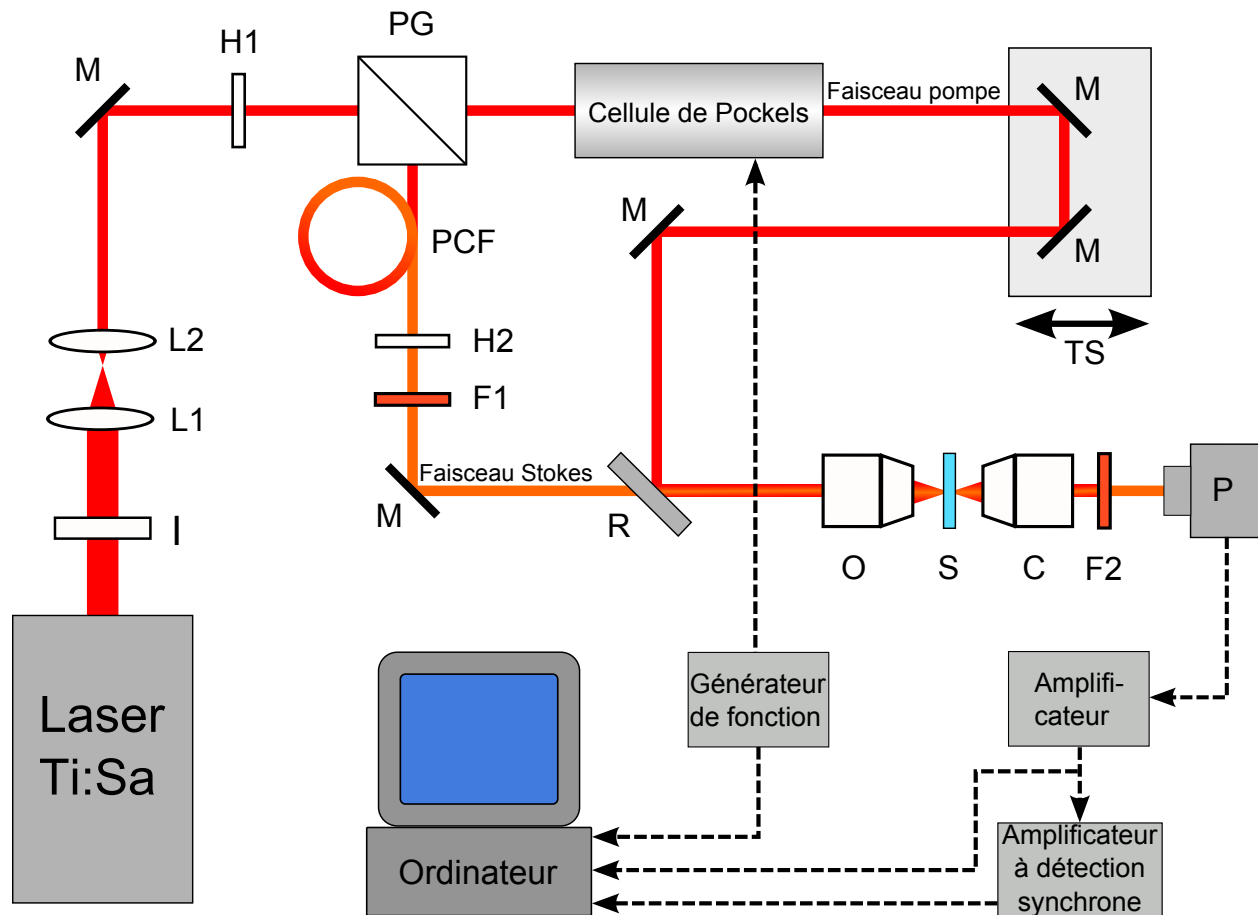


FIGURE 3.5 – Montage expérimental utilisé pour la microscopie SRS utilisant le filtre adapté. I: isolateur, L: lentille, H: lame demi-onde, PG: prisme de Glan, M: miroir, PCF: fibre à cristaux photoniques, F: filtre, R: miroir dichroïque, O: objectif, S: échantillon, C: condensateur, P: photodiode, TS: platine de translation.

la longueur d'onde centrale est ajustée à 815 nm. Un isolateur (EOT) est placé devant la sortie du laser pour éviter que des rétroreflexions ne viennent affecter la stabilité du système laser. Deux lentilles sont utilisées dans le but de réduire la taille du faisceau laser pour que la taille de celui-ci soit ajustée à l'entrée de la cellule de Pockels. Une lame demi-onde (WPH05M-808, Thorlabs) et un prisme de Glan sont utilisés pour ajuster la puissance des faisceaux pompe et Stokes. De la puissance totale, environ 150 mW est envoyé dans le trajet du faisceau Stokes tandis que le reste de l'intensité, soit environ 250 mW, est envoyé dans le trajet du faisceau pompe. Une cellule de Pockels est installée dans le trajet optique du faisceau pompe. La cellule de Pockels (350-160, Conoptics) est utilisée pour moduler l'intensité du faisceau pompe. Également, une platine de translation est utilisée pour synchroniser temporellement

le faisceau pompe et le faisceau Stokes. Dans le bras du faisceau Stokes, une fibre à cristaux photonique (NL-1.4-775, NKT photonics) est utilisée pour augmenter la largeur spectrale du faisceau Stokes, permettant d'atteindre des fréquences allant jusqu'à environ 1064 nm. Le taux de conversion de la puissance se situe autour de 36 %. À la sortie de la fibre, une lentille permet au faisceau laser d'être collimaté. Un filtre (RG850, Schott) permet de bloquer les longueurs d'onde en dessous de 850 nm et de transmettre les longueurs d'onde associées au faisceau Stokes et une lame demi-onde ajuste la polarisation du faisceau sortant. Les deux faisceaux, pompe et Stokes, sont combinés à l'aide d'un miroir dichroïque (950 DCXXR, AHF analysentechnik) qui transmet le faisceau Stokes et réfléchit le faisceau pompe. Les deux faisceaux sont finalement dirigés dans un microscope que nous avons fabriqué. À l'entrée du microscope, la puissance du faisceau pompe est généralement de 99 mW tandis que la puissance du faisceau Stokes est généralement de 13 mW.

### 3.2.2 Microscope et échantillons

Le microscope utilisé pour les expériences fut construit dans notre laboratoire. Il ne possède pas de système de balayage, le faisceau laser ne focalisant que sur un seul point. Un miroir dévie le faisceau laser de telle sorte que celui-ci se retrouve à la verticale. Un objectif de microscope (UPlanSapo, 20X, NA 0.75, Olympus) focalise le faisceau laser dans l'échantillon et un condensateur maison est utilisé pour collecter le signal SRS. Celui-ci est filtré par trois filtres (RG850, Schott; 1050-10, TFI Technologies; Razor Edge LP-830, Semrock) qui bloquent toutes les longueurs d'onde à l'exception de ceux du faisceau Stokes et ce dernier est focalisé sur une photodiode (DET410, Thorlabs) qui détecte le signal. Le montage peut être modifié pour que différents filtres soient installés et pour qu'une fibre optique soit utilisée plutôt qu'une photodiode pour collecter le signal. Plusieurs parties du microscope sont ajustables pour permettre une meilleure collection du faisceau laser. Ainsi, la hauteur du support à échantillon peut être ajustée ainsi que l'orientation fine du miroir déviant le faisceau laser à la verticale. De plus, le condensateur peut être ajusté en hauteur ainsi que sur un plan horizontal.

Pour aligner le faisceau laser de manière à collecter le maximum de signal, nous utilisons tout d'abord un agent fluorescent, la fluorescéine, diluée dans de l'eau. Celui-ci, une fois excité par un faisceau laser, produit un fort signal de fluorescence qui est visible à l'œil nu. Celui-ci permet d'ajuster la hauteur du porte-échantillon pour que le point focal se situe dans l'échantillon. Par la suite, cet échantillon est remplacé par de l'octadécène et le signal CARS est collecté à l'aide d'une fibre optique reliée à un spectromètre. En utilisant les filtres appropriés pour bloquer les faisceaux pompe et Stokes, il est possible de détecter le signal CARS. Celui-ci est optimisé en ajustant le condensateur, le délai temporel et le chevauchement entre les deux faisceaux lasers. Finalement, la fibre optique est remplacée par la photodiode et les filtres sont remplacés pour ne détecter que le faisceau Stokes. L'octadécène est encore une fois utilisé pour générer le signal SRS et une modulation est appliquée au faisceau pompe à l'aide de la cellule de Pockels.

### 3.2.3 Acquisition, modulation et code de Golay

Le signal SRS collecté par la photodiode est envoyé dans un amplificateur (SR560 Low-noise preamplifier, Stanford research system) qui amplifie le signal avec un gain de  $10^4$  et un filtre passe-bas bloque les fréquences plus élevées que 1 MHz. La sortie de l'amplificateur est envoyée tout d'abord à l'ordinateur dont l'acquisition du signal se fait par une carte "Analogue to Digital Converter" (ADC). Le taux d'échantillonnage maximale de l'ordinateur est de 5 MHz, ce qui signifie que la fréquence de modulation maximale du signal est limitée à 2,5 MHz. Or, étant donné que nous souhaitons obtenir une bonne résolution de l'onde carrée, la fréquence de la modulation sera moindre pour permettre l'acquisition de plus de points par période et ainsi obtenir une modulation mieux définie. Un générateur de fonction (DS345, Stanford research system) génère le signal envoyé à la cellule de Pockels pour moduler le faisceau pompe.

La sortie de l'amplificateur est également envoyée à un LIA (SR844 RF, Stanford research system). Celui-ci est utilisé à titre de comparaison lors de l'analyse de l'efficacité du filtre adapté. En effet, le LIA est l'appareil le plus souvent utilisé pour détecter le signal SRS. Il est

donc souhaité de faire une comparaison entre les performances du LIA et du filtre adapté. Le LIA peut seulement détecter le signal des ondes carrées et non des motifs pseudoaléatoires. Pour détecter les ondes carrées, le signal provenant du générateur de fonction est utilisé comme fréquence de référence pour détecter le signal SRS. La sortie du LIA est envoyée à l'ordinateur pour être acquis en même temps que le signal provenant de l'amplificateur.

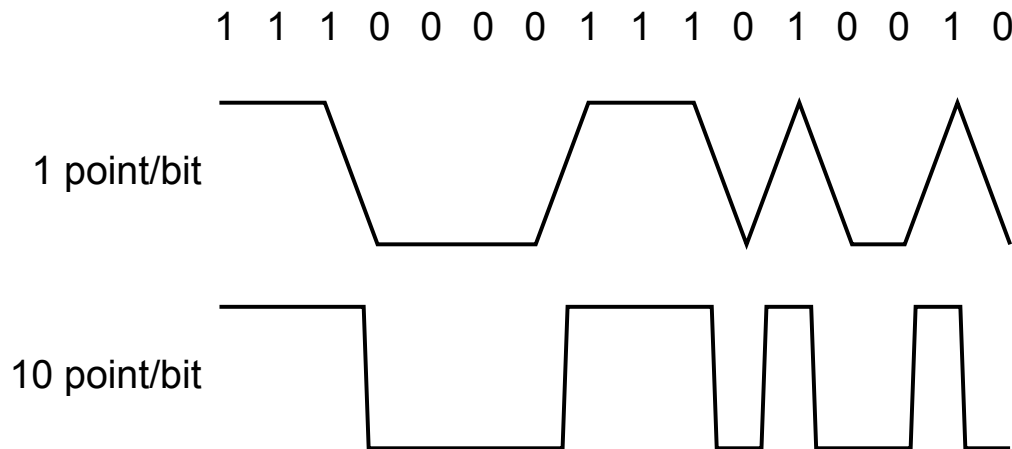


FIGURE 3.6 – Représentation de la résolution d’une séquence en fonction du nombre de points par bit. En haut de l’image se trouve la séquence en terme de 1 et de 0. En dessous se trouve une représentation en terme d’intensité de cette séquence en utilisant un point par bit. Cette figure montre que la transition entre un bit 1 et 0 se fait sur une longue distance, donnant une forme triangulaire au profil d’intensité. En bas de l’image se trouve une représentation en intensité de la séquence, mais cette fois-ci avec 10 points par bit, permettant une bien meilleure définition dans le temps d’un bit 1 et 0.

Deux types de modulations sont utilisés pour les expériences. Le premier est une onde carrée dont la fréquence varie entre 300 kHz et 25 kHz. Le second est un motif pseudoaléatoire composé de 1 (maximum de l’intensité) et de 0 (minimum de l’intensité). Celui-ci est créé à l’aide du programme “Arbitrary Waveform Composer” pour ensuite être téléchargé dans le générateur de fonction. Le programme pour construire le motif pseudoaléatoire ne permet que de créer une séquence d’un maximum de 1000 points, réduisant la longueur maximale de la séquence pseudoaléatoire à 1000 bits. Or, plus la séquence comprend de bits, moins ces derniers sont définis puisque la forme de chaque bit deviendrait triangulaire plutôt que carrée, comme présentée à la figure 3.6. Nous avons donc limité le nombre de bits contenu dans une séquence à 40. Comme présenté à la section 3.1, un code ayant une certaine longueur est traduit par une séquence ayant quatre fois cette longueur lors de la modulation du faisceau

laser. Pour nos expériences, trois longueurs de codes sont utilisées: 4, 8 et 10 bits, ce qui peut se traduire par des séquences de 16, 32 et 40 bits. Les fréquences de modulation en utilisant des codes de Golay se situent entre 10 000 séquences par seconde et 1 séquence par seconde.

### 3.3 Résultats utilisant les ondes carrées

Cette section présente les résultats de l'utilisation du filtre adapté en utilisant des ondes carrées en guise de modulation. Les résultats de simulations seront tout d'abord présentés et ensuite une présentation des résultats expérimentaux sera faite.

#### 3.3.1 Simulations

Les ondes carrées sont les premières formes de modulations que nous avons utilisées pour tester la validité du filtre adapté. Il est facile de les créer à l'aide d'un générateur de fonction et aucun étalonnage n'est nécessaire avec la cellule de Pockels. Nous avons effectué tout d'abord des simulations numériques pour connaître la performance théorique d'une onde carrée en guise de réponse impulsionnelle du filtre adapté. Pour ces simulations, une onde carrée d'une longueur et fréquence prédéfinie, faisant office de faisceau pompe ( $I_p$ ), fut générée ainsi qu'un signal de même longueur et d'intensité constante en guise de faisceau Stokes ( $I_S$ ). Un bruit blanc gaussien est ensuite additionné aux deux faisceaux pour simuler la présence de bruit de fond ( $n_1$  et  $n_2$ ) (voir figure 3.7). Par la suite, le SRG ( $\Delta I$ ) est construit en multipliant les faisceaux Stokes et pompe et un facteur de conversion, habituellement  $10^{-6}$ , puisque le SRG est très faible par rapport à l'intensité des faisceaux lasers. Le SRG est ensuite additionné au faisceau Stokes contenant du bruit. Pour simuler le bruit induit par les instruments de détection, un bruit gaussien blanc ( $n_3$ ) est également additionné à la somme du faisceau Stokes et du SRG. L'intensité totale du signal à l'entrée du filtre adapté est ainsi donnée par:

$$I_{in} = I_S + \Delta I + n_2 + n_3 \quad (3.24)$$

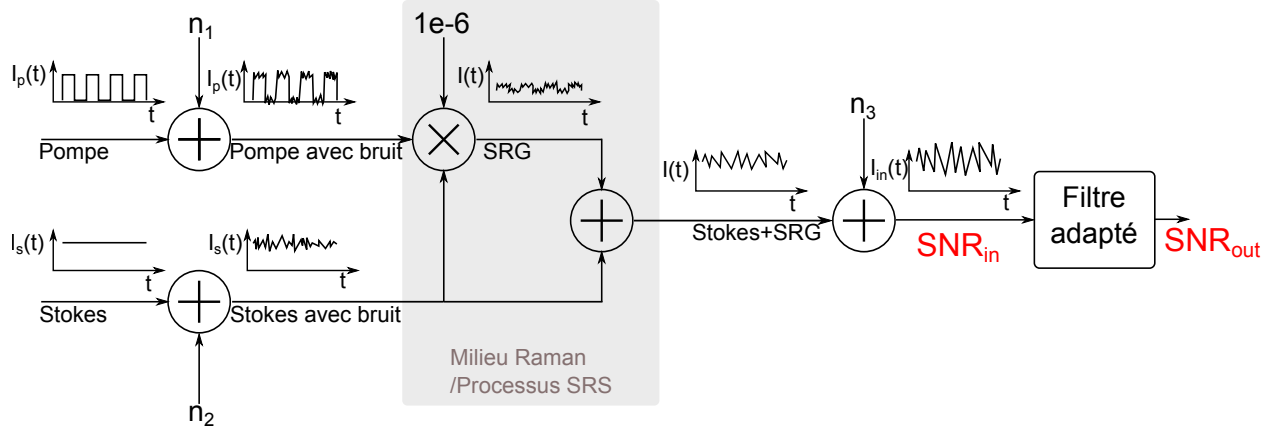


FIGURE 3.7 – Schéma représentant les différentes étapes menant à la création du signal SRS.

avec:

$$\Delta I = (I_S + n_1)(I_p + n_2) \cdot 1 \times 10^{-6}. \quad (3.25)$$

Finalement, la composante DC est soustraite du signal. Le filtre adapté est ensuite appliqué au signal SRS ( $I_{in}$ ) et la valeur centrale de la sortie du filtre adapté est utilisée comme valeur d'intensité pour cette séquence. En répétant ce processus pour plusieurs séquences, la moyenne des différentes valeurs d'intensités divisée par leur écart type nous permet d'obtenir le SNR, comme suit:

$$SNR_{out} = \frac{\mu}{\sigma}. \quad (3.26)$$

où  $\mu$  est la moyenne et  $\sigma$  est l'écart type. Le SNR à l'entrée du filtre adapté est obtenu en calculant la moyenne quadratique au carré du SRG sans bruit, divisé par la moyenne quadratique au carré du bruit total (le bruit du faisceau Stokes  $n_2$ , des instruments  $n_3$  ainsi que du SRG):

$$SNR_{in} = \left( \frac{A_{RMS,sig}}{A_{RMS,bruit}} \right)^2. \quad (3.27)$$

Répéter le code plusieurs fois permet d'obtenir plusieurs valeurs du SNR et leur moyenne permet d'obtenir une valeur plus constante du SNR. Plusieurs paramètres furent changés pour nous permettre de comprendre l'effet des différents paramètres sur le signal de sortie.

La forme du signal à la sortie du filtre adapté pour différentes longueurs de la séquence ainsi que pour différentes valeurs du SNR à l'entrée du filtre adapté est présentée à la



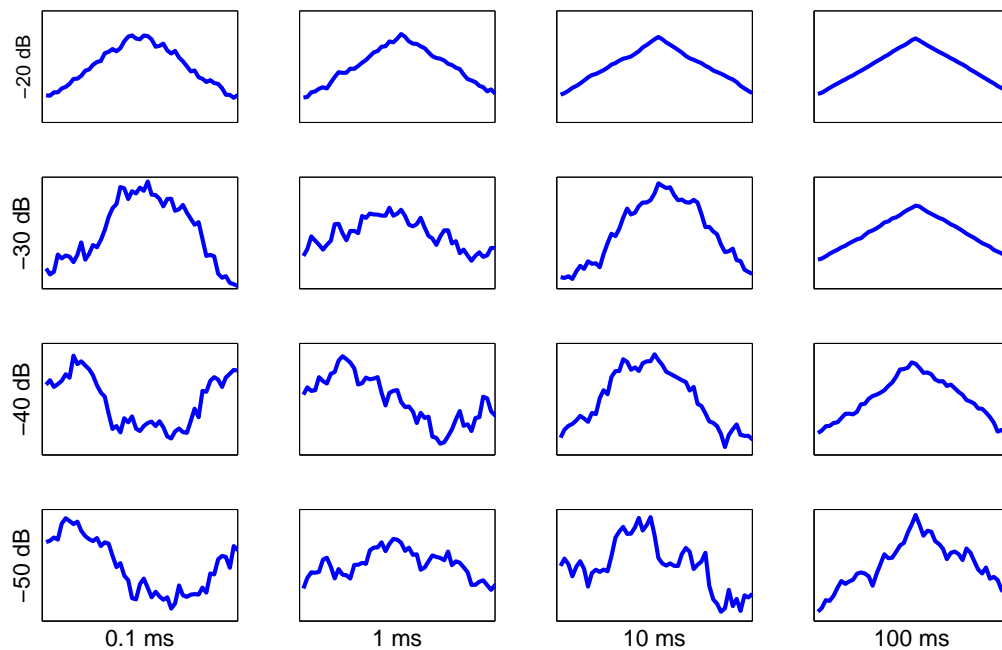


FIGURE 3.8 – Forme du signal SRS à la sortie du filtre adapté dont la modulation est une onde carrée. La convolution entre deux ondes carrées forme une onde triangulaire. De la ligne du haut vers la ligne du bas, le SNR à l’entrée du filtre adapté est, dans l’ordre, de -20, -30, -40 et -50 dB. De la colonne de gauche vers la colonne de droite, la longueur de la séquence est, dans l’ordre, de 0,1, 1, 10 et 100 ms.

figure 3.8. Les graphiques montrent seulement une période de l’onde carrée, soit une section de 10 ns de la séquence entière. Nous remarquons tout d’abord que la séquence la plus longue (100 ms) permet d’obtenir un meilleure définition de la sortie du filtre adapté. Étant donné que le taux d’échantillonnage est constant, les séquences dont la durée est la plus longue ont également un nombre de points total plus élevé, permettant une meilleure définition du signal. De même, sans surprise, la sortie du filtre adapté est également mieux définie lorsque le bruit à l’entrée du filtre adapté est plus bas (SNR à l’entrée plus élevé).

La figure 3.9 montre le graphique du SNR (en dB) à la sortie du filtre adapté en fonction de la durée de la séquence (en ms) et du SNR à l’entrée du filtre adapté (en dB). Nous remarquons tout d’abord, comme attendu, que le SNR à la sortie du filtre adapté diminue lorsque la durée de la séquence augmente et que le SNR à l’entrée augmente. La corrélation entre le SNR de l’entrée et le SNR de la sortie du filtre adapté est linéaire et la corrélation

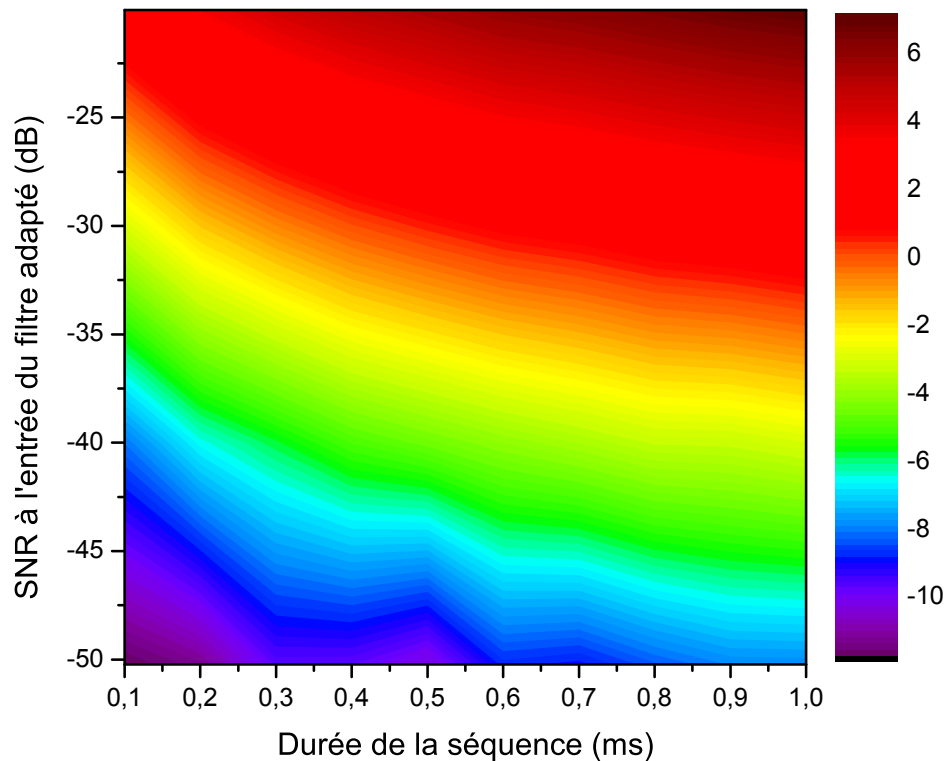


FIGURE 3.9 – SNR à la sortie du filtre adapté (en dB) en fonction de la longueur de la séquence (en ms) et du SNR à l’entrée du filtre adapté (en dB). La fréquence de l’onde carrée est de 100 kHz.

entre la durée de la séquence et le SNR est logarithmique. Toutefois, étant donné que le SNR est en décibel, la corrélation entre la durée de la séquence et le SNR à la sortie du filtre adapté, à une échelle linéaire, est linéaire.

Finalement, nous avons vérifié l’effet de la variation de la fréquence de modulation sur le SNR à la sortie du filtre adapté. La figure 3.10 montre que la fréquence de modulation semble n’avoir aucun effet sur le SNR à la sortie du filtre adapté. En effet, pour une durée de la séquence donnée, le SNR reste constant, peu importe la fréquence de modulation de l’onde carrée utilisée. Également, la corrélation entre le SNR à la sortie du filtre adapté et la durée de la séquence est la même, peu importe la fréquence de modulation utilisée. Il est possible que ces résultats changent dans un contexte expérimental puisque, pour ces simulations, le bruit est blanc et donc constant pour toute les fréquences de modulation. Toutefois,

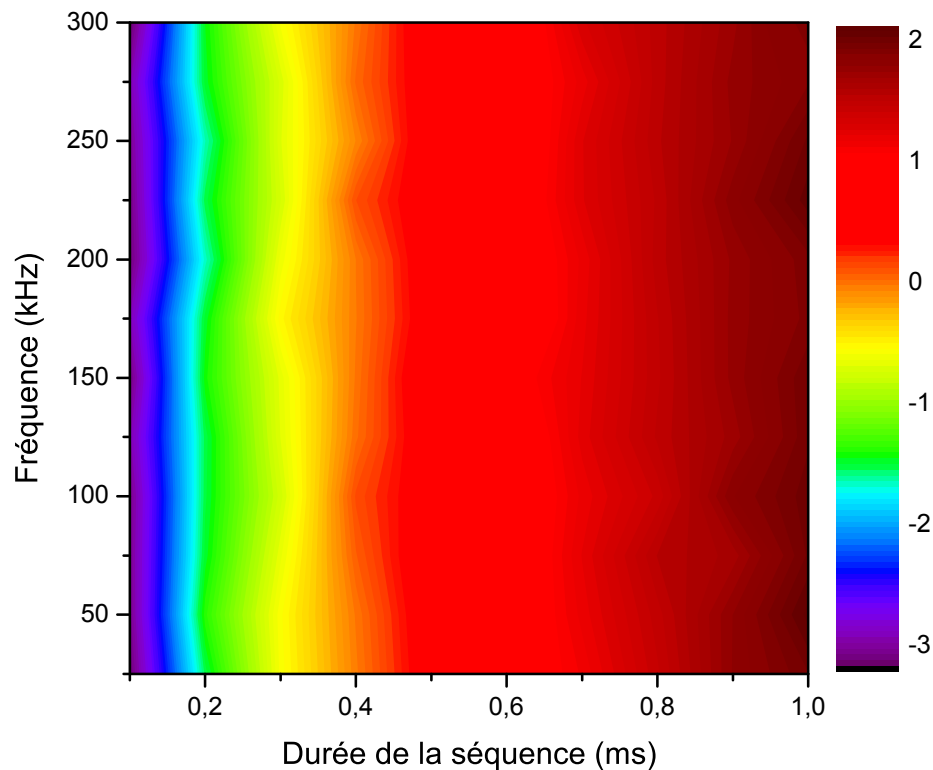


FIGURE 3.10 – SNR à la sortie du filtre adapté (en dB) en fonction de la durée de la séquence (en ms) et de la fréquence de l’onde carrée (en kHz). Le SNR à l’entrée du filtre adapté est de -30 dB.

dans un contexte expérimental, le bruit du système laser augmente lorsque la fréquence diminue [126] (ce bruit est communément appelé bruit  $1/f$ ), en plus d’autres sources de bruits dépendant de la fréquence qui risquent de s’ajouter à ce dernier. La figure 3.10 peut également être interprétée d’une autre manière. En effet, le niveau de bruit est constant pour chaque fréquence de modulation. Ainsi, un signal ayant une fréquence de modulation plus basse peut être interprétée comme étant un signal dont le taux d’acquisition est plus élevé et la longueur de la séquence est plus courte. Donc, il semble que ce soit le nombre de points compris dans le signal acquis qui ait une plus grande influence sur le SNR à la sortie du filtre adapté plutôt que la durée de la séquence ou la fréquence de modulation. La figure 3.11 montre le graphique du SNR à la sortie du filtre adapté en faisant varier le taux d’échantillonnage et la durée de la séquence. Nous remarquons ainsi qu’augmenter la durée de la séquence produit le même effet qu’augmenter le taux d’échantillonnage. Nous pouvons également remarquer que

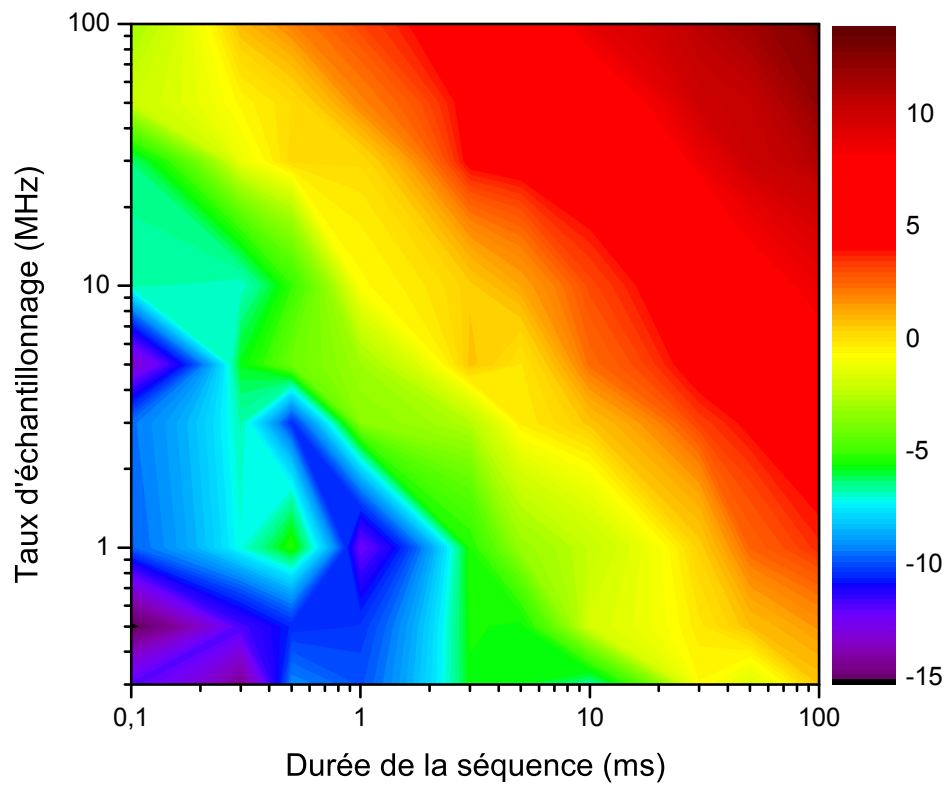


FIGURE 3.11 – SNR à la sortie du filtre adapté (en dB) en fonction de la durée de la séquence (en ms) et du taux d'échantillonnage (en MHz). Le SNR à l'entrée du filtre adapté est constant à -40 dB et la fréquence de modulation est de 100 kHz.

le SNR à la sortie du filtre adapté, pour un taux d'échantillonnage élevé et une courte durée de la séquence, est comparable à celui d'une durée de la séquence élevée et d'un faible taux d'échantillonnage, laissant supposer que, comme mentionné précédemment, c'est le nombre de points compris dans la séquence qui a la plus grande influence sur le SNR à la sortie du filtre adapté.

En conclusion, les simulations numériques indiquent que les principaux facteurs qui influencent l'efficacité des filtres adaptés sont la longueur de la séquence ainsi que le niveau de bruit à l'entrée du filtre adapté. Avoir un taux d'acquisition plus élevé permettrait de réduire la durée de la séquence tout en obtenant un SNR à la sortie du filtre adapté comparable (pour un même niveau de bruit à l'entrée du filtre adapté).

### 3.3.2 Résultats expérimentaux

Nous avons effectué plusieurs séries d'expériences dans le but de vérifier l'influence de la fréquence et du temps d'intégration sur la valeur du SNR à la sortie du filtre adapté. Parallèlement, nous avons également mesuré le signal SRS provenant d'un LIA dans le but de comparer les performances du filtre adapté avec celles du LIA. Les résultats de ces mesures sont présentés à la figure 3.12.

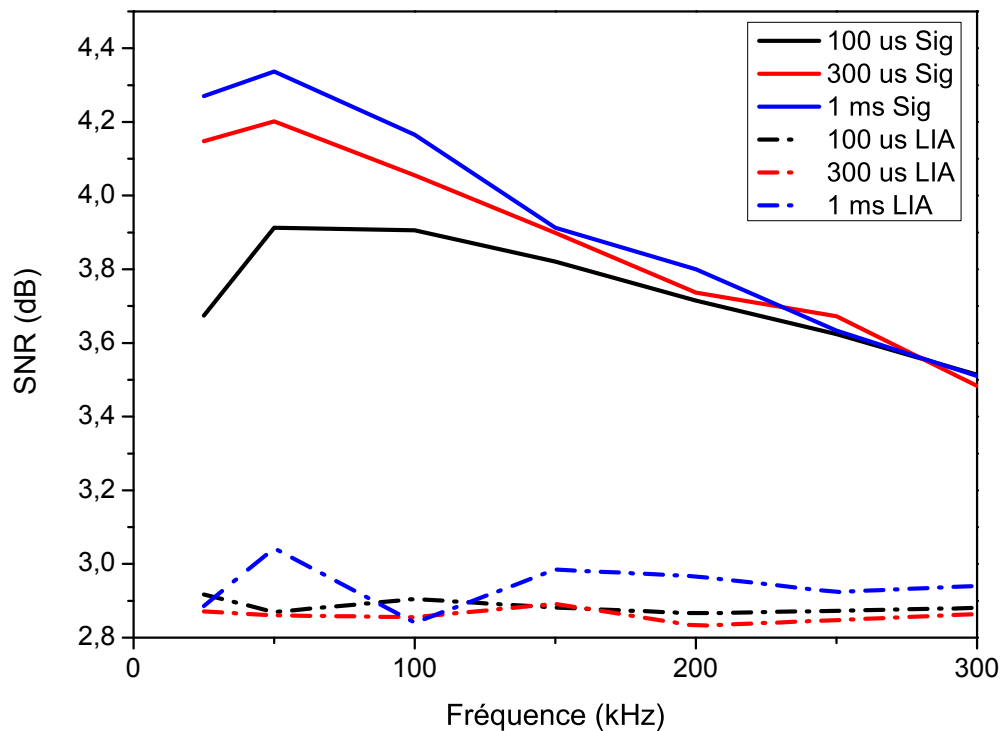


FIGURE 3.12 – Graphique représentant le SNR du signal SRS (en dB) en fonction de la fréquence de l'onde carrée utilisé pour moduler le faisceau pompe. Les lignes pleines représentent le SNR provenant du signal à la sortie du filtre adapté tandis que les lignes pointillées représentent le SNR du signal à la sortie du LIA. Les séquences ont des durées de 100  $\mu$ s (noir), 300  $\mu$ s (rouge) et 1 ms (bleu).

La figure 3.12 montre le graphique du SNR à la sortie du filtre adapté pour des temps d'acquisitions de 100  $\mu$ s, 300  $\mu$ s et 1 ms. Nous remarquons que, pour toute les durées d'acquisitions, le SNR à la sortie du filtre adapté est plus élevé que celui du LIA. De plus, la valeur du SNR à la sortie du filtre adapté diminue lorsque la fréquence augmente tandis que la valeur du SNR provenant du LIA reste relativement constante avec l'augmentation de la fréquence de modulation. La fréquence de modulation offrant le meilleur SNR est de

50 kHz. Nous pouvons également remarquer que lorsque le temps d'intégration augmente, la valeur du SNR de la sortie du filtre adapté augmente également pour les basses fréquences de modulation. Toutefois, la valeur du SNR provenant du LIA ne semble pas augmenter significativement.

Les performances du filtre adapté dépendent fortement de l'intensité du bruit affectant le signal. Or, il est connu que le système laser produit du bruit ayant une dépendance inverse à la fréquence (communément appelé bruit  $1/f$ ) [126]. Ainsi, la valeur du SNR à la sortie du filtre adapté devrait augmenter avec l'augmentation de la fréquence de modulation, ce qui n'est pas le cas. Ceci peut être causé par plusieurs facteurs. Premièrement, le bruit provenant du système laser et le bruit de grenaille ne sont probablement pas les seules composantes du bruit présent dans le signal détecté. En effet, les instruments de mesure induisent également du bruit. En plus, la fibre à cristal photonique utilisée pour générer le faisceau Stokes produit probablement une grande quantité de bruit, causée par une instabilité dans le spectre, venant s'ajouter au bruit existant. Deuxièmement, une partie du bruit présent dans le signal détecté, suite au processus de mélange à quatre ondes produisant le signal SRS, n'est pas additif, mais multiplicatif. Or, le filtre adapté n'est pas conçu pour ce type de bruit et son efficacité s'en trouve réduite.

Un autre facteur pouvant affecter les performances du filtre adapté est le taux d'échantillonnage utilisé pour faire l'acquisition des données. Le concept de filtre adapté provient du domaine des télécommunications où un taux d'échantillonnage très élevé est nécessaire. Étant un filtre numérique, l'utilisation d'un taux d'échantillonnage trop bas lors de l'utilisation d'un filtre adapté peut fortement diminuer ses performances. En utilisant un taux d'échantillonnage de 5 MHz, la valeur maximale permise par notre système d'acquisition, il est fort probable que les performances du filtre adapté s'en trouvent affectées. Le bas taux d'échantillonnage ne nous permet également pas d'utiliser des fréquences de modulations plus élevées ( $>1$  MHz), ce qui nous empêche d'utiliser des fréquences élevées dans le but de diminuer le bruit provenant du système laser.

Pour conclure, les simulations numériques ainsi que les résultats expérimentaux ont démontré qu'utiliser des ondes carrées comme forme de modulation du faisceau pompe permet de retrouver le signal SRS en utilisant le filtre adapté. Les simulations numériques montrent que la longueur de la séquence et le niveau de bruit affectent sa performance. Les résultats expérimentaux montrent que le filtre adapté offre une meilleure performance que le LIA et que, dans l'intervalle de fréquences de modulation analysé, une fréquence de modulation de 50 kHz offre un meilleur SNR.

## 3.4 Résultats utilisant les codes de Golay

Cette section présente les résultats concernant l'utilisation du filtre adapté en microscopie SRS en utilisant les codes de Golay en guise de modulation. Premièrement, une présentation des simulations effectuées à l'aide de Matlab est faite et ensuite les résultats expérimentaux sont présentés.

### 3.4.1 Simulations

La fonction principale du filtre adapté et des codes de Golay est d'augmenter le SNR d'un signal entouré de bruit. Comme expliqué à la section 3.1, les codes de Golay sont conçus de telle sorte que le signal à la sortie du filtre adapté est maximum au centre de la séquence à la sortie du filtre adapté et nul partout ailleurs. C'est donc ce type de signal que nous cherchons à obtenir à la sortie du filtre adapté. Pour ce faire, une séquence pseudoaléatoire fut construite en se basant sur un code de Golay de longueur  $N=10$  (la longueur totale de la séquence étant de 40 bits). Un bruit blanc gaussien dont l'intensité est variable est ajouté à ce code. Le nombre de points par bit est également variable. En modifiant le nombre de points par bit ainsi que l'intensité du bruit, une variation du signal à la sortie du filtre adapté fut observée. Les résultats sont présentés aux figures 3.13, 3.14, 3.15 et 3.16.

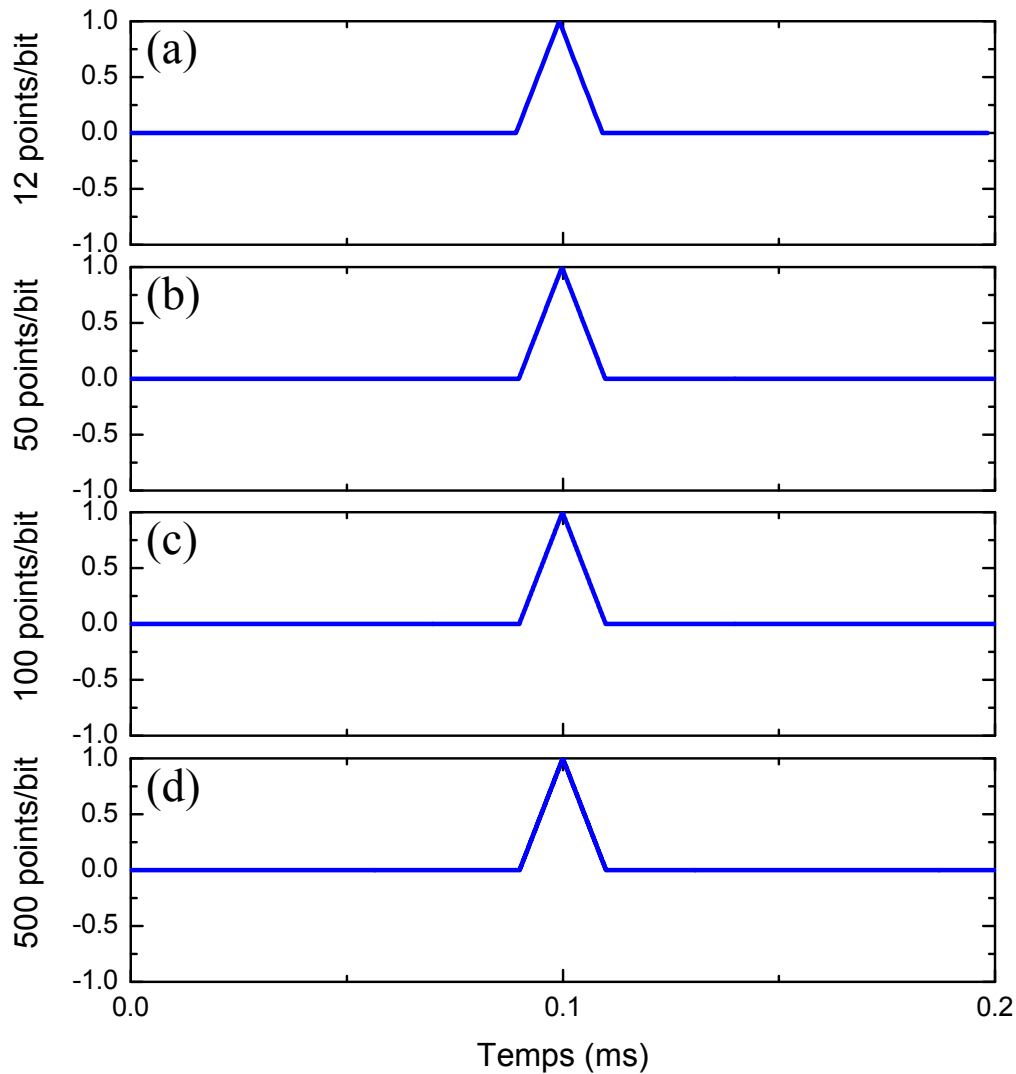


FIGURE 3.13 – Graphiques de l’intensité normalisée du signal à la sortie du filtre adapté en fonction du temps pour un signal sans bruit. Un code de Golay ayant 10 bits est utilisé et le nombre de points par bit utilisé est de (a) 12, (b) 50, (c) 100 et (d) 500.

Tout d’abord, la figure 3.13 montre que la forme du signal à la sortie du filtre adapté est indépendante du nombre de points par bit lorsqu’il n’y a pas de bruit additionné. En effet, les quatre graphiques sont identiques, peu importe le nombre de points par bit utilisé. Aux graphiques à la figure 3.14, un bruit a été additionné au signal de telle sorte que le SNR à l’entrée du filtre adapté est de -20 dB. Nous observons sur à cette figure que l’impulsion centrale à la sortie du filtre adapté devient moins définie. Ceci est d’autant plus visible avec un plus faible taux d’échantillonnage (nombre de points par bit moins élevé). En augmentant le niveau de bruit de telle sorte que le SNR à l’entrée du filtre adapté est de -30 dB (voir



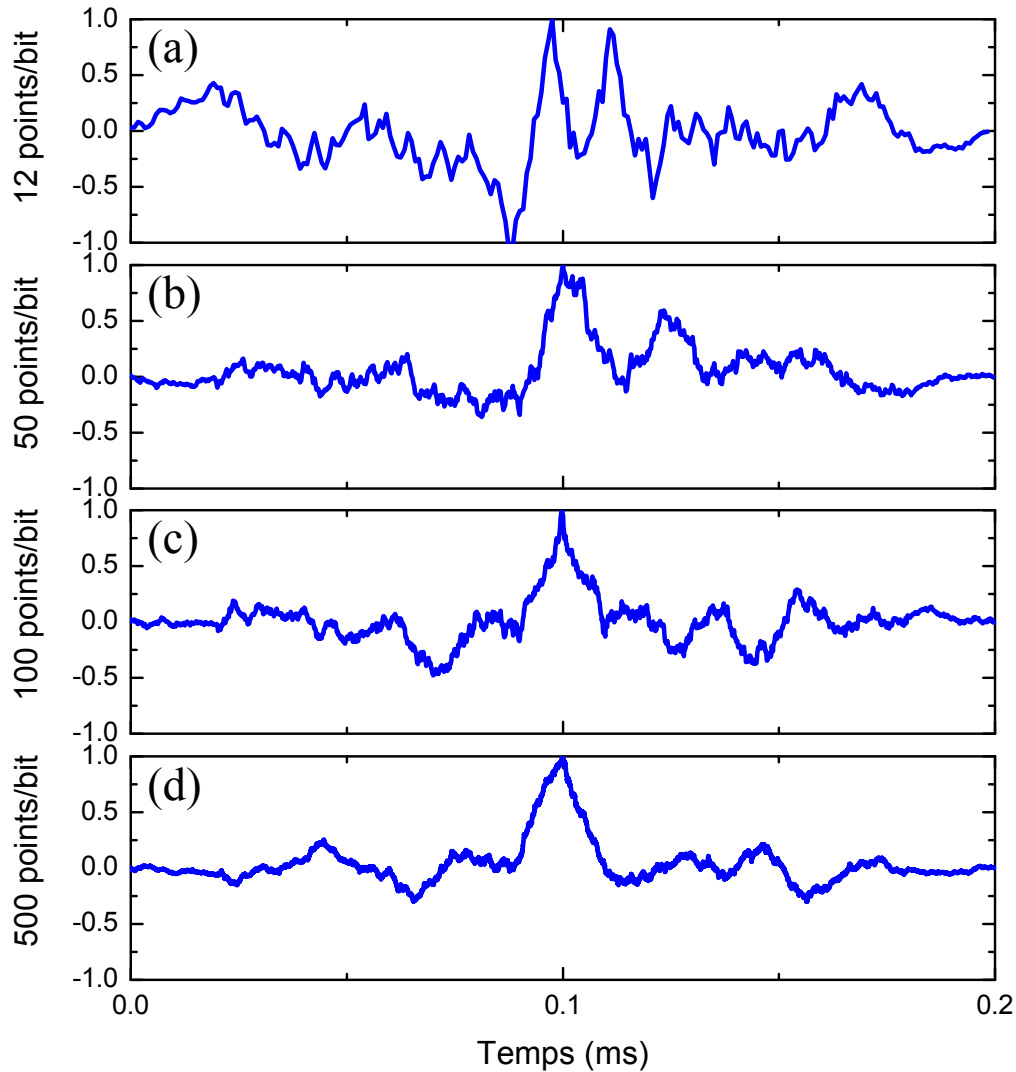


FIGURE 3.14 – Graphiques de l'intensité normalisée du signal à la sortie du filtre adapté en fonction du temps dont le SNR à l'entrée du filtre adapté est de -20 dB. Un code de Golay ayant 10 bits est utilisé et le nombre de points par bit utilisé est de (a) 12, (b) 50, (c) 100 et (d) 500.

figure 3.15) nous remarquons que les impulsions des figure 3.15(a) et (b) (avec 12 et 50 points par bit) ne sont plus du tout définies alors que les deux graphiques ayant le plus haut taux d'échantillonnage (figure 3.15(c) et (d)) ont une impulsion centrale bien visible. Toutefois, avec un SNR à l'entrée du filtre adapté de -40 dB (voir figure 3.16), aucune impulsion centrale n'est distinguable, peu importe le nombre de points par bit.

En répétant la séquence du code de Golay plusieurs fois, il est possible d'obtenir plusieurs valeurs de l'intensité. Ces valeurs peuvent être utilisées pour calculer le SNR à la sortie

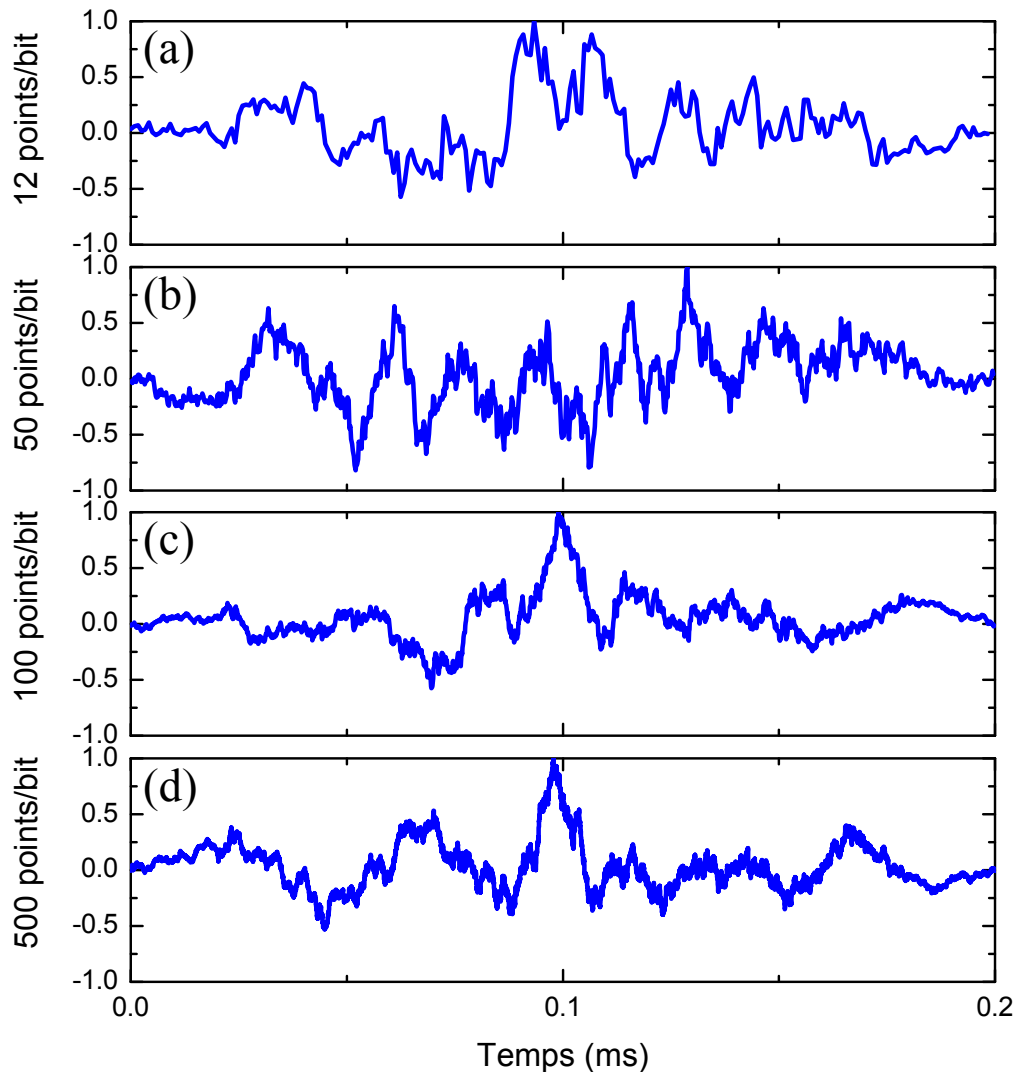


FIGURE 3.15 – Graphiques de l’intensité normalisée à la sortie du filtre adapté en fonction du temps dont l’entrée du filtre adapté a un SNR de  $-30$  dB. Un code de Golay ayant 10 bits est utilisé et le nombre de points par bit utilisé est de (a) 12, (b) 50, (c) 100 et (d) 500.

du filtre adapté. En effet, une méthode pour calculer le SNR d’un signal est de diviser la moyenne de celui-ci par son écart type (voir l’équation 3.26). L’entrée du filtre adapté est composée d’un certain nombre de séquences et le filtre adapté est appliqué sur chacune de ces séquences individuellement. La valeur centrale de chaque séquence à la sortie du filtre adapté est désignée comme étant l’intensité du signal SRS pour cette séquence. La moyenne des valeurs d’intensité du signal SRS divisé par l’écart type nous permet d’obtenir le SNR à la sortie du filtre adapté. Pour ces simulations, 500 séquences sont utilisées. Nous varions le niveau de bruit à l’entrée du filtre adapté ainsi que le nombre de points par bit. Ces

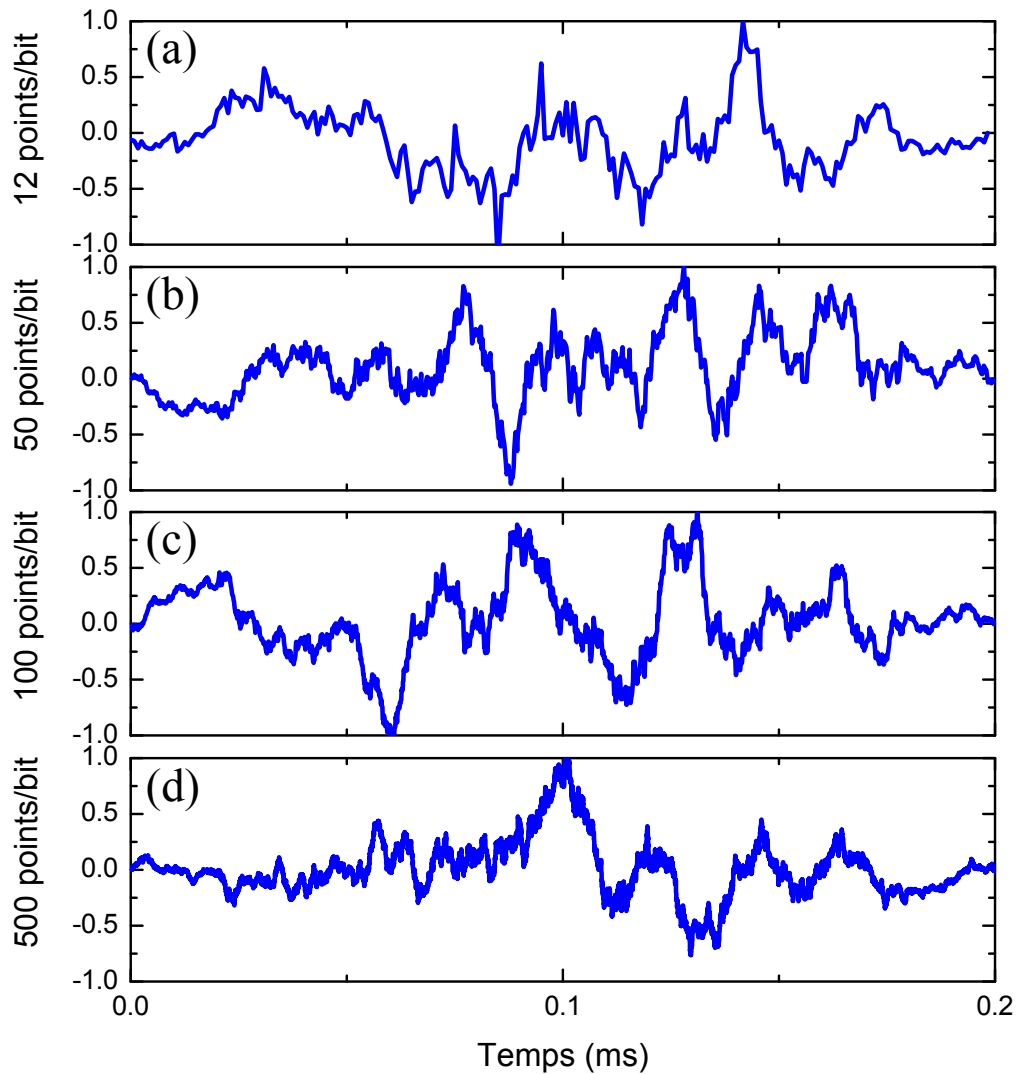


FIGURE 3.16 – Graphiques de l’intensité normalisée du signal à la sortie du filtre adapté en fonction du temps dont le SNR à l’entrée du filtre adapté est de  $-40$  dB. Un code de Golay ayant 10 bits est utilisé et le nombre de points par bit utilisé est de (a) 12, (b) 50, (c) 100 et (d) 500.

simulations sont répétées 200 fois pour obtenir une mesure plus stable du SNR à la sortie du filtre adapté.

Le graphique de la figure 3.17 présente la moyenne des SNR à la sortie du filtre adapté obtenus pour différentes valeurs du SNR à l’entrée du filtre adapté et du nombre de points par bit. Nous observons sur ce graphique, comme attendu, que le SNR à la sortie du filtre adapté diminue lorsque le bruit à l’entrée du filtre adapté augmente. De même, plus le nombre de points par bit (taux d’échantillonnage) augmente, plus le SNR à la sortie du filtre adapté est

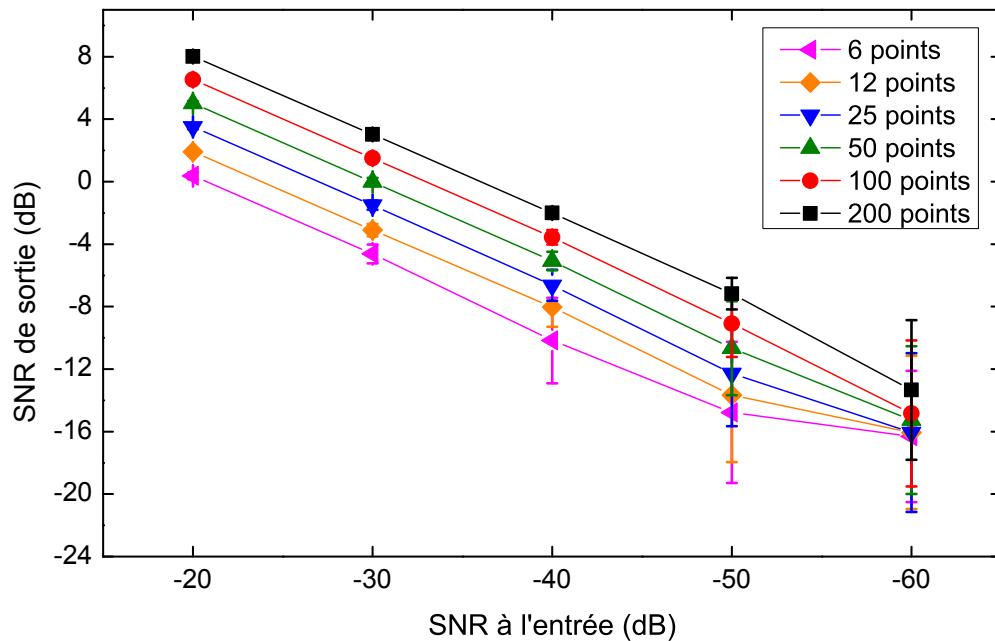


FIGURE 3.17 – Graphique des résultats des simulations numériques du SNR à la sortie du filtre adapté en fonction du SNR à l'entrée du filtre adapté. Le SNR est calculé à partir de 500 séquences et 200 mesures du SNR sont utilisées pour calculer les barres d'incertitudes. Ces mesures sont effectuées en utilisant un taux d'échantillonnage de 6, 12, 25, 50, 100 et 200 points par bit.

élevé. Toutefois, nous pouvons remarquer que la corrélation entre le SNR à l'entrée et à la sortie du filtre adapté est linéaire. De plus, l'incertitude sur la valeur du SNR est beaucoup plus élevée lorsque le bruit est élevé, laissant croire que le bruit à l'entrée du filtre adapté fait varier l'intensité du signal, affectant par le fait même la valeur du SNR.

Finalement, nous avons examiné plus spécifiquement la corrélation entre nombre de points par bits et le SNR à la sortie du filtre adapté (qui peut se traduire, dans un contexte expérimental, à faire varier le taux d'échantillonnage). Les résultats sont présentés à la figure 3.18. Pour ces simulations, le SNR à la sortie du filtre adapté est calculé à partir de 100 mesures d'intensité et les barres d'incertitudes sont calculées à partir de l'écart type de 100 mesures du SNR à la sortie du filtre adapté. Comme attendu, plus le nombre de points par bit est élevé, plus le SNR est élevé. De plus, nous pouvons remarquer que la corrélation entre le nombre de points par bit et le SNR à la sortie du filtre adapté est linéaire (les deux échelles sur le graphique sont logarithmiques). Également, nous remarquons que, pour un SNR à l'entrée du filtre adapté de -50 et -60 dB, la valeur du SNR à la sortie du filtre

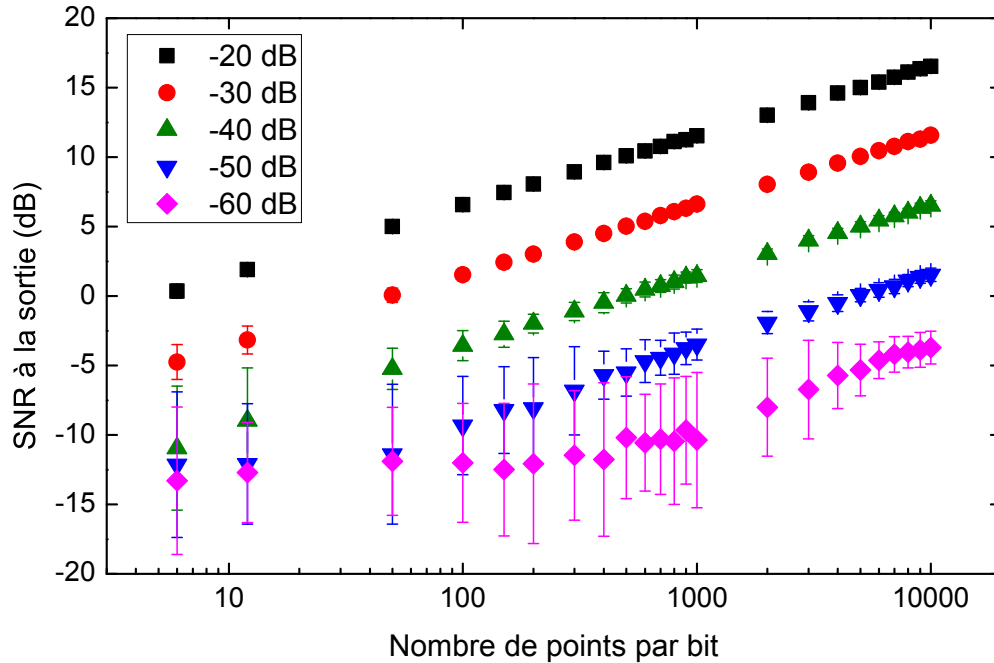


FIGURE 3.18 – Graphique des résultats des simulations du SNR à la sortie du filtre adapté en fonction du nombre de points par bit pour différents SNR à l’entrée du filtre adapté. 100 séquences sont utilisées pour calculer le SNR à la sortie du filtre adapté et les barres d’incertitudes sont calculées à l’aide de 100 mesures du SNR à la sortie du filtre adapté. Le SNR à l’entrée du filtre adapté se situe entre -20 et -60 dB et un taux d’acquisition se situant entre 6 et 10 000 points par bit est utilisé.

adapté stagne à environ -15 dB lorsque le nombre de points par bit est plus faible. Ceci peut être dû au fait que le niveau de bruit est beaucoup plus élevé que celui du signal et, par conséquent, la sortie du filtre adapté est principalement composée de bruit (tel que le montre les simulations à la figure 3.16). Ainsi, la valeur du SNR à la sortie du filtre adapté reste constante puisque la sortie du filtre adapté est essentiellement composée de bruit. De plus, nous remarquons que, plus le SNR est bas, plus l’incertitude sur sa mesure est élevée, probablement à cause du bruit qui affecte les mesures.

Les simulations numériques ont ainsi démontré que le nombre de points par bit (qui peut se traduire dans un contexte expérimental par le taux d’échantillonnage) a une grande influence sur la valeur du SNR à la sortie du filtre adapté et que plus celui-ci est élevé, plus le SNR à la sortie du filtre adapté est élevé. Il en va de même pour le niveau de bruit à l’entrée du filtre adapté.

### 3.4.2 Résultats expérimentaux

Les données expérimentales utilisant les codes de Golay furent acquises le même jour que pour l'acquisition des données utilisant les ondes carrées. Ainsi, les paramètres du système laser et d'acquisition furent conservés.

En utilisant des fréquences de modulation entre 100 et 10 000 séquences par seconde (ce qui peut se traduire par des séquences dont la durée se situe entre 10 et 0,1 ms), nous avons analysé le SNR à la sortie du filtre adapté. La figure 3.19 montre les résultats de cette analyse. Il est à noter que pour chaque type de séquence, le nombre de points par bits est différent. En effet, la durée de la séquence et le taux d'échantillonnage étant constants, changer le nombre de bits dans une séquence change nécessairement le nombre de points par bit. Plus le nombre de bits par séquence est faible, plus le nombre de points par bits est élevé. Toutefois, le nombre de points total pour une séquence d'une durée donnée est le même puisque le taux d'échantillonnage est constant, peu importe la longueur du code. Comme prédite lors de simulations numériques, plus la durée de la séquence est élevée (et ainsi plus le nombre de points par bits est élevée), plus le SNR à la sortie du filtre adapté est élevé. Également, nous notons que le SNR à la sortie du filtre adapté est plus élevé lorsque le code est de 8 et 10 bits, comparativement à un code de 4 bits. Ainsi, il semble plus avantageux que la longueur du code de Golay soit plus élevée pour obtenir un meilleur SNR à la sortie du filtre adapté. En comparant ces résultats avec ceux utilisant des ondes carrées comme forme de modulation, nous constatons que le SNR à la sortie du filtre adapté est plus faible en utilisant les codes de Golay.

Plusieurs facteurs concernant les mesures expérimentales ont néanmoins fait en sorte que les résultats n'aient pas été très concluants. Premièrement, le taux d'échantillonnage étant de 5 MHz, il ne permet pas d'avoir une fréquence du signal très élevée. Ainsi, la fréquence maximale à laquelle nous avons modulé le signal est de 10 000 séquences par seconde, ce qui peut se traduire par 400 000 bits par seconde pour un code dont  $N=10$ . Ceci limite le taux d'échantillonnage à 12,5 points par bit, limitant l'efficacité du filtre adapté (comme il a été démontré à la figure 3.18). Pour augmenter le nombre de points par bit, dans les conditions

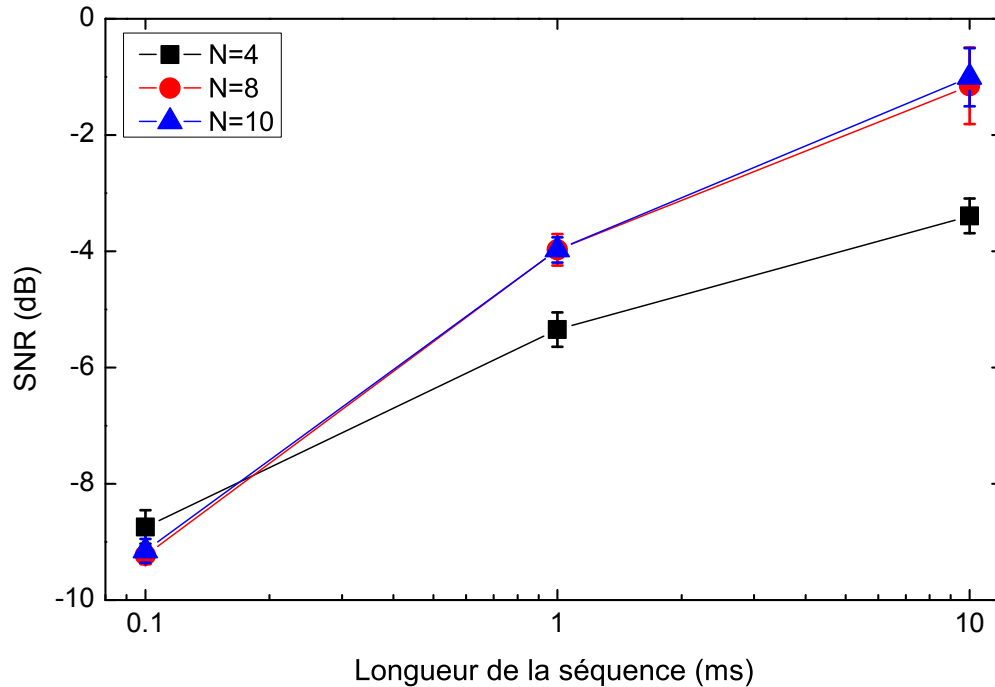


FIGURE 3.19 – SNR à la sortie du filtre adapté en fonction de la durée de la séquence du code de Golay. Les données sont présentées pour des codes de 4, 8 et 10 bits.

actuelles, la seule solution est de diminuer la fréquence de modulation. Toutefois, le bruit du système laser augmente avec la diminution de la fréquence [126]. Également, nous avons remarqué qu'à de basses fréquences, pour des modulations arbitraires telles qu'un code de Golay, la forme du signal envoyé à la cellule de Pockels est déformée, comme présenté à la figure 3.20. Ainsi, utiliser de basses fréquences dans le but d'augmenter le nombre de points par bit ne permet pas d'obtenir de meilleurs résultats.

Ces résultats montrent qu'utiliser de basses fréquences de modulation permet d'obtenir un meilleur SNR à la sortie du filtre adapté. Toutefois, plusieurs facteurs limitent ses performances, surtout à basses fréquences. Premièrement, le générateur de fonction déforme le signal à de basses fréquences et, deuxièmement, le bruit provenant du système laser, augmente lorsque la fréquence diminue [126]. Toutefois, utiliser une fréquence de modulation plus élevée mène à un autre problème, soit un taux d'échantillonnage trop bas. En effet, diminuer le nombre de points par bit diminue également considérablement le SNR. Il serait donc nécessaire d'augmenter le taux d'échantillonnage du système d'acquisition pour obtenir un signal de sortie avec une résolution suffisante. Toutefois, ce n'est actuellement pas

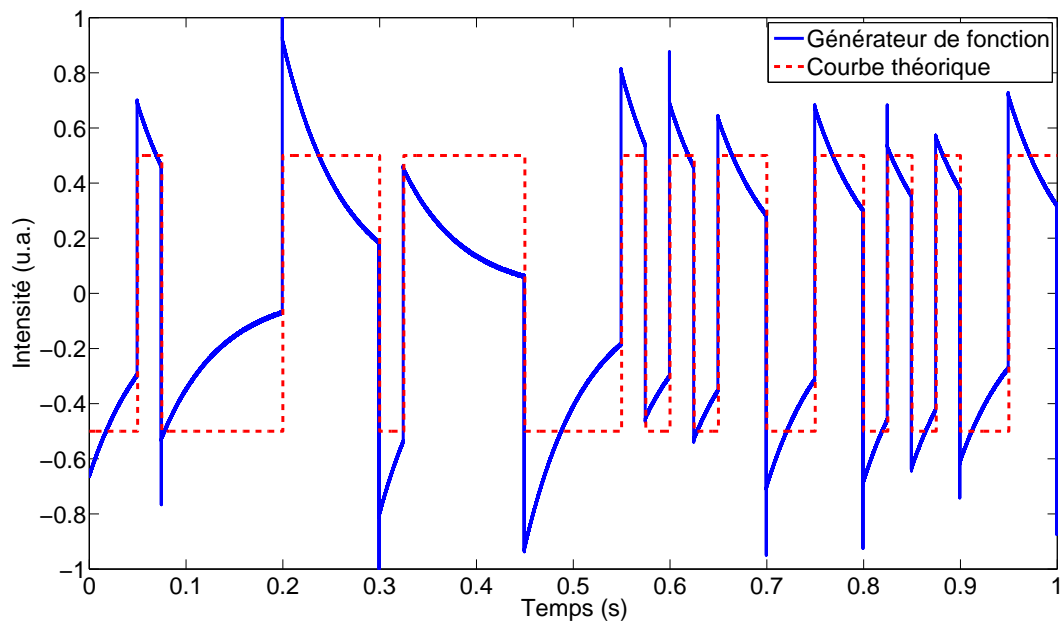


FIGURE 3.20 – Signal à la sortie du générateur de fonction en fonction du temps. Pour une séquence du code d'un Golay de 1 seconde, l'intensité des bits forme une série de pentes descendantes, bien qu'elle devrait être constante.

possible avec les équipements se trouvant dans le laboratoire et augmenter le taux d'acquisition augmente également le temps de traitement de l'ordinateur pour obtenir le signal à la sortie du filtre adapté. Une autre solution pour augmenter le SNR serait d'augmenter la longueur du code, c'est-à-dire d'avoir un code de plusieurs dizaines de bits plutôt qu'un code de 10 bits ou moins. Toutefois, ce n'est également pas possible puisque le générateur de fonction produisant la modulation pseudoaléatoire n'accepte que des séquences de 1000 points maximum.

L'utilisation des codes de Golay pour augmenter le SNR à la sortie du filtre adapté semble prometteuse, mais son utilisation en conditions expérimentales s'est révélée décevante. Ceci peut être dû à plusieurs facteurs et limitations de notre montage expérimental. La longueur du code utilisé, le fonctionnement du générateur de fonction ainsi que le bas taux d'acquisition sont les principaux facteurs qui peuvent être mis en cause.



## 3.5 Conclusion

La microscopie SRS est un type de microscopie optique non-linéaire en plein essor dont la détection reste une des difficultés majeures à pallier. L'utilisation du filtre adapté en microscopie SRS a pour but d'augmenter le SNR du signal détecté pour en extraire le signal SRS. Une première série d'expériences consistait à utiliser une onde carrée comme modulation du faisceau pompe. Les résultats ont révélé une augmentation de la performance (c'est-à-dire une augmentation du SNR) par rapport à celles d'un LIA. Augmenter la longueur de la séquence semble augmenter le SNR à la sortie du filtre adapté et une fréquence de modulation de 50 kHz dans un contexte expérimental permet d'obtenir le SNR à la sortie du filtre adapté maximum. Le montage expérimental pose plusieurs limitations qui affecte la performance du filtre adapté. Le plus important est le taux d'acquisition du système dont la fréquence maximale d'acquisition est de 5 MHz. Ceci nous empêche de moduler le signal SRS à des fréquences avoisinant le MHz, ce qui diminuerait le bruit produit par le système laser en plus de réduire les performances du filtre adapté en limitant le taux d'échantillonnage.

En vue d'améliorer les performances du filtre adapté en microscopie SRS, une modulation du faisceau pompe utilisant une technique de codage appelé code de Golay fut utilisée. Celle-ci a comme fonction d'augmenter le SNR une fois décodée. Les résultats obtenus sont moindre que ceux impliquant les ondes carrées. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce manque de performance par rapport aux résultats utilisant les ondes carrées. Premièrement, lorsque programmé pour produire le motif pseudoaléatoire, le générateur de fonction produit un signal déformé par rapport à celui attendu. Par la suite, le code devrait être plus long que 10 bits mais le générateur de fonction limite sa longueur. Il est également à noter que le temps nécessaire pour décoder le signal et obtenir la valeur de l'intensité du signal SRS est relativement élevé ce qui limite son utilisation en temps réel.

La manière dont le montage expérimental est construit réduit également l'intensité du signal SRS produit. En effet, le signal SRS est plus élevé lorsque l'intensité du faisceau dont nous détectons la modulation est élevée [126]. Pour notre montage, nous détectons le Gain Raman Stimulée (SRG), qui se trouve à être la variation de l'intensité du faisceau Stokes,

dont l'intensité est beaucoup plus faible que celui du faisceau pompe. Ceci est nécessaire puisque le faisceau Stokes est généré par une fibre à cristal photonique et sa polarisation de sortie fluctue légèrement. Or, la modulation de l'intensité est faite par une cellule de Pockels qui utilise la polarisation du faisceau laser pour varier son intensité. Nous ne pouvons donc pas faire varier l'intensité du faisceau Stokes avec la cellule de Pockels de manière constante. Il est donc préférable que la modulation du faisceau soit appliquée sur le faisceau pompe.

Bref, le filtre adapté semble être une technique dont l'utilisation en microscopie SRS semble prometteuse. Il reste toutefois plusieurs limitations techniques à régler avant que ceci soit possible. Plusieurs techniques d'encodage tel que les codes de Golay pourraient mener à une amélioration du SNR et à de meilleures performances.

# Chapitre 4

## Microscopie “Stimulated Raman Scattering” (SRS) multimodale utilisant l’imagerie spectrale

Ce chapitre traite du montage expérimental construit pour faire de l’imagerie utilisant la microscopie “Stimulated Raman Scattering” (SRS) comme mécanisme de contraste. Le montage de microscopie “Coherent Anti-Stokes Raman Scattering” (CARS) actuel dans notre laboratoire ne nous permet pas d’effectuer de la microscopie SRS puisque le faisceau Stokes est créé à partir d’une fibre à cristaux photoniques, ce qui produit une trop grande quantité de bruit pour détecter efficacement le signal SRS. Ainsi, un nouveau système laser fut acheté et le montage optique nécessaire pour faire de la microscopie SRS fut construit à partir de zéro. Ce montage est toutefois inspiré d’un montage de microscopie SRS similaire qui fut installé temporairement sur un autre système laser. Ce précédent montage fut utilisé pour les expériences présentées au chapitre 5 tandis que le montage présenté dans ce chapitre fut utilisé pour les expériences sur les échantillons minéralogiques présentées chapitre 6.

Ce chapitre est organisé comme suit. Premièrement, une description du concept d’imagerie spectrale (“Spectral Focusing”) est introduite. Ensuite, une démarche mathématique pour calculer la dérive de fréquences (“Chirp”) optimale à appliquer sur les deux faisceaux

lasers nécessaire pour obtenir la synchronisation en fréquence optimale est présentée. De plus, des simulations numériques servant à tester les différents paramètres des calculs sont présentées. Ensuite, le montage expérimental est présenté ainsi que le processus de calibration des spectres SRS. Finalement, puisque le montage expérimental est construit pour être utilisé avec un nouveau laser, une caractérisation du système laser est présentée.

## 4.1 Microscopie par imagerie spectrale

La propagation d'une impulsion dans un milieu induit une dérive de fréquences de l'impulsion. Ceci est causé par la dépendance de la fréquence sur l'indice de réfraction, ce qui cause une variation de la vitesse de propagation des différentes fréquences contenue dans l'impulsion laser. Ce phénomène a également pour effet d'augmenter la durée de l'impulsion. La dérive de fréquences peut être mis à profit pour diminuer la contribution non résonante du signal CARS produit par un laser femtoseconde en utilisant une approche d'imagerie spectrale. Puisque la microscopie SRS n'est pas affectée par le signal non résonant causé par le mélange à quatre ondes, la largeur spectrale des impulsions utilisées n'a pas d'influence sur le bruit. Toutefois, l'emploi d'un montage utilisant l'imagerie spectrale procure plusieurs avantages tels que l'ajustement rapide de la fréquence Raman à imager.

L'approche d'imagerie spectrale consiste à induire une dérive de fréquences optimale (synchronisation en fréquence) sur les faisceaux pompe et Stokes provenant de lasers femtosecondes pour obtenir une largeur spectrale effective correspondant à des durées d'impulsions picosecondes [4, 150, 151]. La dérive de fréquences est appliquée en utilisant du verre ayant une dispersion de vitesse de groupe élevée et la longueur de verre utilisée est soigneusement choisie de telle sorte que la variation de la dérive de fréquences (variation de la fréquence centrale instantanée en fonction du temps) est égale pour les faisceaux pompe et Stokes. Comme imagé à la figure 4.1, ceci permet ainsi d'exciter un intervalle de fréquences Raman beaucoup plus étroit et, par le fait même, augmente la résolution. Lorsque la variation de la dérive de fréquences n'est pas la même, l'intervalle de fréquences Raman excité est plus élevé et une augmentation du signal non-résonant est observée. De plus, ce type de montage

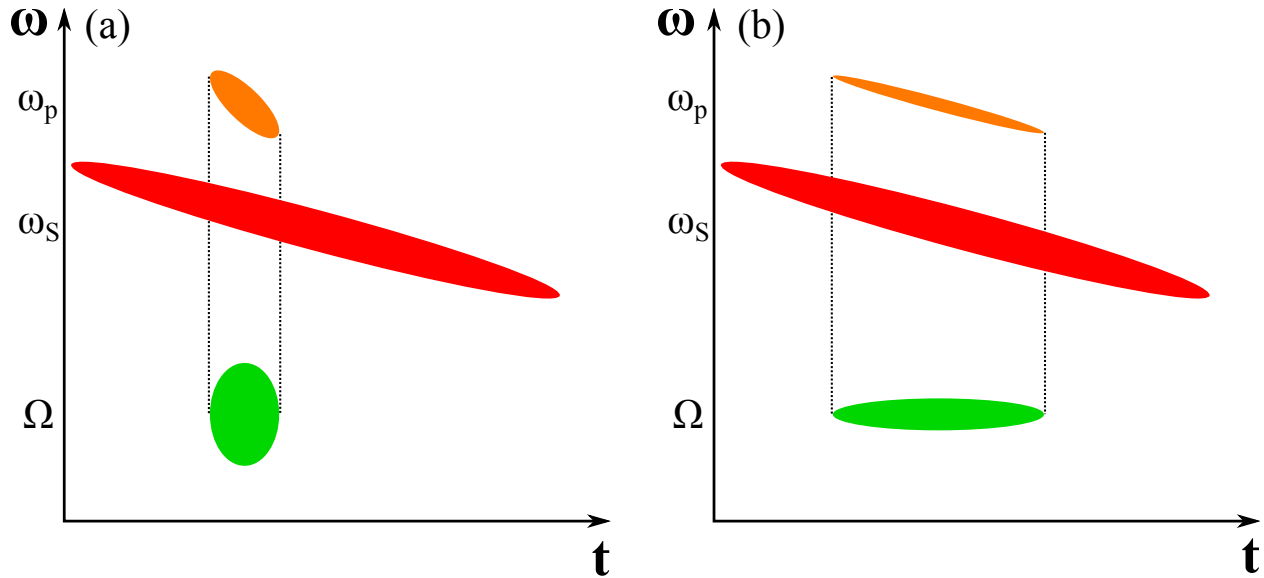


FIGURE 4.1 – Graphique de la fréquence en fonction du temps montrant les faisceaux pompe (orange) et Stokes (rouge) ainsi que le signal SRS (vert) dans les cas où (a) le faisceau pompe n’a pas une dérive de fréquences optimale et la largeur spectrale du signal SRS résultant est plus large et où (b) la dérive de fréquences est optimale et le spectre du signal SRS résultant est étroit.

permet de facilement et rapidement changer le mode Raman imagé en modifiant la position temporelle relative des faisceaux pompe et Stokes. En modifiant la position relative des deux faisceaux, la différence de fréquences centrale instantanée est également modifiée et une fréquence Raman différente est excitée (voir la figure 4.2). Ce montage permet également d’effectuer un balayage spectral (“Spectral Scan”) de l’échantillon pour obtenir une mesure de l’intensité du signal SRS en fonction de la fréquence Raman. L’imagerie spectrale est d’ailleurs déjà utilisé pour l’imagerie de cellules et tissus [26, 101, 181].

## 4.2 Calcul de la dérive de fréquences optimale

Comme présenté à la section 4.1, le montage expérimental que nous utilisons permet d’effectuer un balayage spectral des fréquences Raman dans le but d’obtenir un spectre Raman de l’échantillon analysé. Pour ce faire, une dérive de fréquences est appliquée aux faisceaux pompe et Stokes et il est possible de modifier la fréquence Raman excitée en

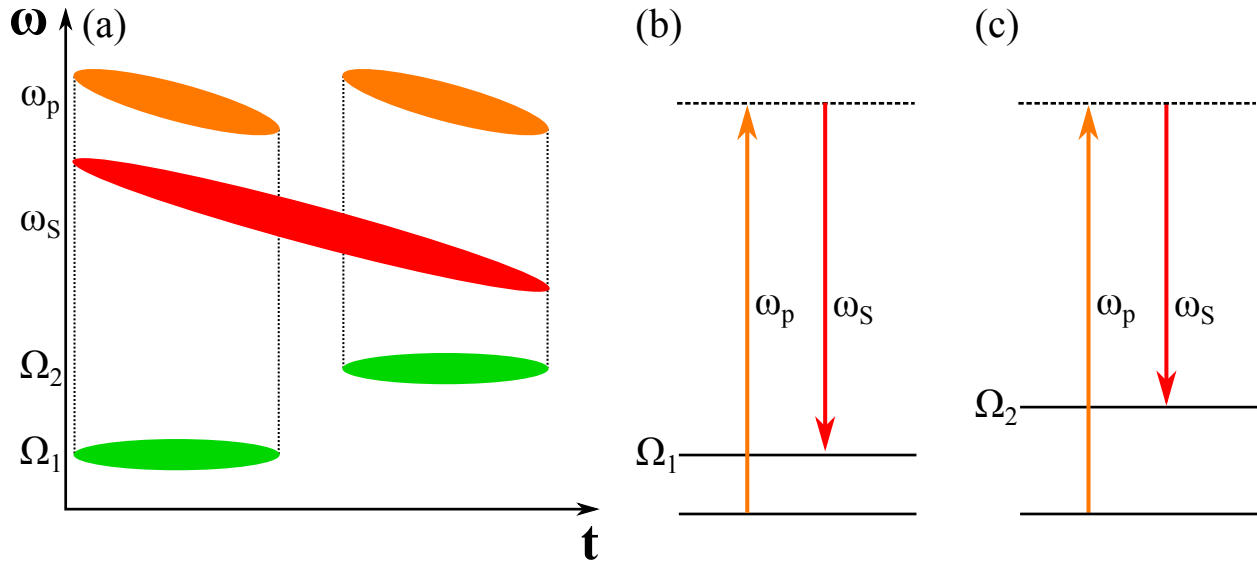


FIGURE 4.2 – (a) Graphique de la fréquence en fonction du temps montrant les faisceaux pompe (orange) et Stokes (rouge) et du signal SRS (vert) pour deux positions relatives dans le temps des faisceaux pompe et Stokes causant un changement de la fréquence centrale du signal SRS. (b-c) Diagrammes de Jablonski du processus SRS dans les cas où la position relative des faisceaux pompe et Stokes est modifiée, changeant la fréquence du signal SRS généré.

modifiant le délai temporel entre les deux faisceaux. Pour obtenir une résolution maximale, il doit y avoir une synchronisation des fréquences.

### 4.2.1 Composante électrique

La composante électrique d'une impulsion limitée en largeur de bande ("Transform Limited") est donnée par:

$$E(t) = \mathcal{E}(t) \exp(-i\omega_0 t) \quad (4.1)$$

où  $\omega_0$  est la fréquence centrale et la composante électrique de l'enveloppe de l'impulsion  $\mathcal{E}(t)$  est donnée par:

$$\mathcal{E}(t) = \mathcal{E}_0 \exp(-(t/\tau_G)^2). \quad (4.2)$$

où  $\tau_G$  est la durée d'une impulsion gaussienne. La pleine largeur à mi-hauteur (FWHM: "Full Width Half Maximum") de l'impulsion est donnée par:

$$\tau = \sqrt{2 \ln 2} \tau_G. \quad (4.3)$$

Lorsqu'une dérive de fréquences est appliquée sur une impulsion, l'équation de l'enveloppe de cette impulsion est donnée par:

$$\mathcal{E}(t) = \mathcal{E}_0 \exp(-(1 + ia)(t/\tau_G)^2) = \mathcal{E}_0 \exp(-(t/\tau_G)^2) \exp(i\varphi(t)) \quad (4.4)$$

où  $\varphi$  est la phase et  $a$  est le paramètre de la dérive de fréquences. Ce dernier est donné par:

$$a(L) = 2Lk''/\tau_{Gmin}^2 \quad (4.5)$$

où  $k''$  est le terme désignant la dispersion de la vitesse de groupe (GVD: "Group Velocity Dispersion") du milieu dispersif,  $L$  est la longueur du milieu dispersif et  $\tau_{Gmin}$  est la longueur d'une impulsion limitée en largeur de bande. S'il y a augmentation de la dérive de fréquences appliquée sur l'impulsion, il y a augmentation de la longueur de l'impulsion. Cette longueur de l'impulsion est liée au paramètre de la dérive de fréquences selon la relation suivante:

$$\tau_G = \tau_{Gmin} \sqrt{1 + a^2} \quad (4.6)$$

$$\tau = \tau_{min} \sqrt{1 + a^2}. \quad (4.7)$$

De plus, la bande spectrale de l'impulsion peut être reliée à la durée de l'impulsion minimale (c'est-à-dite une impulsion limitée en largeur de bande) en utilisant le produit du temps et de la largeur spectrale de l'impulsion selon:

$$\Delta\nu\tau \geq c_B. \quad (4.8)$$

Dans le cas d'une impulsion gaussienne,  $c_B = 2 \ln 2 / \pi = 0,441$ . Il est à noter que par mesure de simplicité, nous exprimons la bande spectrale en Hz de telle sorte que  $2\pi\Delta\nu = \Delta\omega$ . Ainsi, pour une impulsion limitée en largeur de bande:

$$\frac{1}{\tau_{min}} = \frac{\Delta\nu\pi}{2 \ln 2} \quad (4.9)$$

et en utilisant la relation de l'équation 4.3, nous obtenons:

$$\frac{1}{\tau_{Gmin}} = \frac{\Delta\nu\pi}{\sqrt{2 \ln 2}}. \quad (4.10)$$

Lorsqu'une dérive de fréquences est appliquée, l'équation 4.10 devient:

$$\frac{1}{\tau_G} = \frac{\Delta\nu\pi}{\sqrt{2 \ln 2} \sqrt{1 + a^2}}. \quad (4.11)$$

Pour obtenir une autre formulation de l'enveloppe d'une impulsion affectée par la dérive de fréquences, nous pouvons inclure l'équation 4.11 à l'équation 4.4 pour obtenir:

$$\mathcal{E}(t) = \mathcal{E}_0 \exp\left(-\frac{(1 + ia)(t\pi\Delta\nu)^2}{(2 \ln 2)(1 + a^2)}\right) \quad (4.12)$$

et la composante électrique total d'une impulsion affectée par la dérive de fréquences est donnée par:

$$E(t) = \mathcal{E}_0 \exp(-i\omega_0 t) \exp\left(-\frac{(t\pi\Delta\nu)^2}{(2 \ln 2)(1 + a^2)}\right) \exp\left(-\frac{ia(t\pi\Delta\nu)^2}{(2 \ln 2)(1 + a^2)}\right) \quad (4.13)$$

Le premier terme exponentiel est la fréquence centrale d'oscillation. Le second terme exponentiel est l'enveloppe de l'impulsion. Le troisième terme exponentiel est le terme de la dérive de fréquences, c'est-à-dire la variation de la phase en fonction du temps telle que:

$$\varphi(t) = -\frac{a(t\pi\Delta\nu)^2}{(2 \ln 2)(1 + a^2)}. \quad (4.14)$$



## 4.2.2 Équation d'interaction des champs pompe et Stokes

### Domaine du temps

L'équation de la composante électrique d'un faisceau affecté par une dérive fréquences, présenté à l'équation 4.13, montre que l'enveloppe de celle-ci est donné par le second terme exponentiel. Dans le cas d'un faisceau dont aucune dérive de fréquences n'est appliquée, la composante électrique  $E_{min}$  est donnée par:

$$E_{min}(t) = \mathcal{E}_0 \exp(-i\omega_0 t) \exp\left(-\frac{(t\pi\Delta\nu)^2}{(2\ln 2)}\right). \quad (4.15)$$

Le signal SRS provient de l'excitation des modes Raman vibrationnels lors de l'interaction de deux champs électriques lasers, soit les faisceaux pompe et Stokes. La fréquence d'excitation des modes Raman correspond à la différence entre la fréquence des faisceaux pompe et Stokes:  $\Omega = \omega_p - \omega_S$ . La composante électrique de l'interaction pompe-Stokes lorsque les impulsions ne sont pas affectées par la dérive de fréquences (c'est-à-dire limitées en largeur de bande) est donnée par:

$$E_{SRS}(t) = E_p(t)E_S^*(t) = \mathcal{E}_p\mathcal{E}_S \exp(-i(\omega_p - \omega_S)t) \exp\left(-\frac{(t\pi\Delta\nu_p)^2}{2\ln 2} - \frac{(t\pi\Delta\nu_S)^2}{2\ln 2}\right) \quad (4.16)$$

tandis que la composante électrique de l'interaction pompe-Stokes lorsqu'une dérive de fréquences est appliquée sur les impulsions est donnée par:

$$E_{SRS}(t) = E_p(t)E_S^*(t) = \mathcal{E}_p\mathcal{E}_S \exp(-i(\omega_p - \omega_S)t) \exp\left(-\frac{(t\pi\Delta\nu_p)^2}{(2\ln 2)(1+a_p^2)} - \frac{(t\pi\Delta\nu_S)^2}{(2\ln 2)(1+a_S^2)}\right) \exp\left(-\frac{ia_p(t\pi\Delta\nu_p)^2}{(2\ln 2)(1+a_p^2)} + \frac{ia_S(t\pi\Delta\nu_S)^2}{(2\ln 2)(1+a_S^2)}\right) \quad (4.17)$$

## Domaine des fréquences

Pour connaître la résolution spectrale de l'interaction pompe-Stokes, il est nécessaire d'appliquer une transformée de Fourier de l'enveloppe du signal SRS donnée par l'équation 4.17. Par souci de simplicité, nous définissons  $\tau_{Gi} = \frac{\sqrt{2 \ln 2} \sqrt{1+a_i^2}}{\Delta \nu_i \pi}$  où l'indice  $i$  correspond soit au faisceau pompe ( $p$ ) ou Stokes ( $S$ ). Le spectre de l'enveloppe de l'interaction pompe-Stokes est ainsi donné par:

$$\begin{aligned} \mathcal{F}(\mathcal{E}_{SRS}(t)) &\propto \exp\left(\frac{(2\pi\Delta\nu_{SRS})^2}{4\left(\frac{i(a_S+i)}{\tau_{GS}} - \frac{(ia_p+1)}{\tau_{Gp}}\right)}\right) \\ &\propto \exp\left(i\Phi + \frac{(2\pi\Delta\nu_{SRS})^2(\tau_{Gp}^2 + \tau_{GS}^2)}{4\tau_{Gp}^2\tau_{GS}^2\left(\left(\frac{a_S}{\tau_{GS}} - \frac{a_p}{\tau_{Gp}}\right)^2 + \left(\frac{1}{\tau_{GS}} + \frac{1}{\tau_{Gp}}\right)^2\right)}\right) \end{aligned} \quad (4.18)$$

où  $\Phi$  est la phase du spectre. La résolution spectrale (c'est-à-dire la bande spectrale de l'interaction) est ainsi donnée par:

$$\frac{(2\pi\Delta\nu_{SRS})^2}{4 \ln 2} = \frac{4\tau_{Gp}^2\tau_{GS}^2\left(\left(\frac{a_S}{\tau_{GS}} - \frac{a_p}{\tau_{Gp}}\right)^2 + \left(\frac{1}{\tau_{GS}} + \frac{1}{\tau_{Gp}}\right)^2\right)}{\tau_{Gp}^2 + \tau_{GS}^2} \quad (4.19)$$

$$\Delta\nu_{SRS} = \sqrt{\frac{4 \ln 2 \tau_{Gp}^2 \tau_{GS}^2 \left(\left(\frac{a_S}{\tau_{GS}} - \frac{a_p}{\tau_{Gp}}\right)^2 + \left(\frac{1}{\tau_{GS}} + \frac{1}{\tau_{Gp}}\right)^2\right)}{\pi^2(\tau_{Gp}^2 + \tau_{GS}^2)}} \quad (4.20)$$

Dans le cas spécial où la variation de la fréquence instantanée (c'est-à-dire la fréquence porteuse dépendante du temps) des faisceaux pompe et Stokes est la même en fonction du temps, c'est-à-dire que les faisceaux ont une dérive de fréquence identique (voir la section 4.2.3), le troisième terme exponentiel de l'équation 4.17 disparaît. La transformée de Fourier devient grandement simplifiée et est donnée par:

$$\mathcal{F}(\mathcal{E}_{SRS}(t)) \propto \exp\left(\frac{-(2\pi\Delta\nu_{SRS})^2}{4\left(\frac{\pi^2\Delta\nu_p^2}{(2\ln 2)(1+a_p^2)} + \frac{\pi^2\Delta\nu_S^2}{(2\ln 2)(1+a_S^2)}\right)}\right) \quad (4.21)$$

La résolution spectrale est alors donnée par:

$$\frac{(2\pi\Delta\nu_{SRS})^2}{4\ln 2} = 4 \left( \frac{\pi^2\Delta\nu_p^2}{(2\ln 2)(1+a_p^2)} + \frac{\pi^2\Delta\nu_S^2}{(2\ln 2)(1+a_S^2)} \right) \quad (4.22)$$

et peut être réduite en l'équation suivante:

$$\Delta\nu_{SRS} = \sqrt{2 \left( \frac{\Delta\nu_p^2}{1+a_p^2} + \frac{\Delta\nu_S^2}{1+a_S^2} \right)}. \quad (4.23)$$

L'équation peut être simplifiée une fois de plus pour obtenir l'équation suivante:

$$\Delta\nu_{SRS} = \sqrt{2 \left( \Delta\nu_{eff,p}^2 + \Delta\nu_{eff,S}^2 \right)}. \quad (4.24)$$

où  $\Delta\nu_{eff,i}$  est présenté à la section 4.2.3.

### 4.2.3 Dérive de fréquences optimale

#### Ajuster la fréquence instantanée

Pour obtenir la dérive de fréquences optimale entre les faisceaux pompe et Stokes, la différence entre la valeur de leurs fréquences instantanées doit rester la même tout au long de l'intervalle de temps où il y a chevauchement des impulsions. La fréquence instantanée pour les deux faisceaux est donnée par:

$$\omega(t) = \omega_i + \frac{d\varphi_i(t)}{dt}. \quad (4.25)$$

La fréquence instantanée en fonction du temps (en omettant la dispersion du troisième ordre) est donnée par une droite (voir la figure 4.3) avec pour origine  $\omega_{i0}$  et une pente qui, selon l'équation 4.14, est donnée par:

$$\frac{1}{t} \frac{d\varphi_i(t)}{dt} = -\frac{2a_i(\pi\Delta\nu_i)^2}{(2\ln 2)(1+a_i^2)}. \quad (4.26)$$

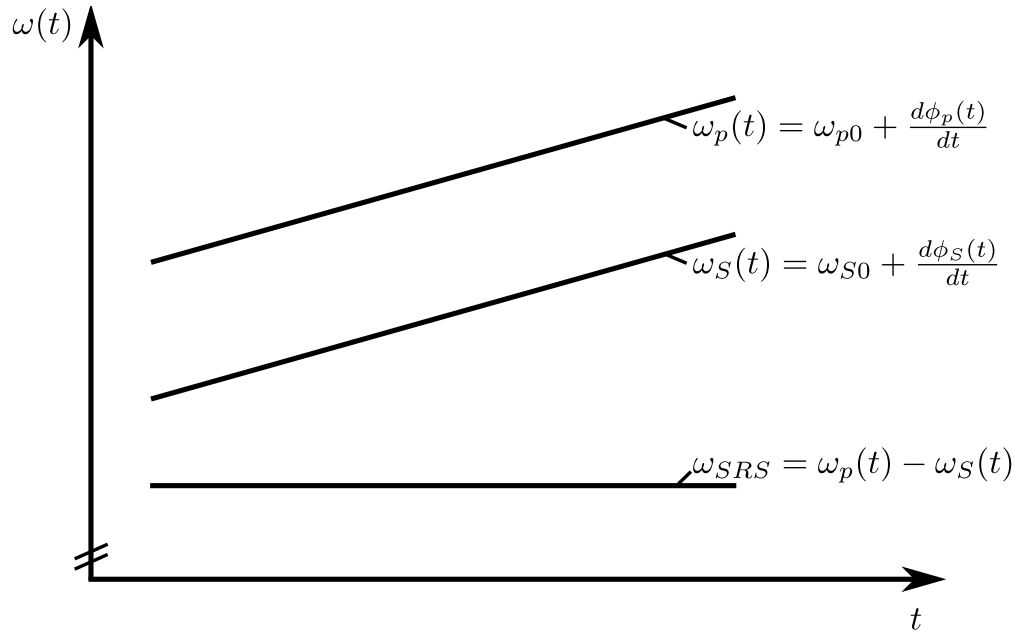


FIGURE 4.3 – Représentation de la fréquence instantanée des faisceaux pompe et Stokes affectés par une dérive de fréquences lorsqu'ils ont une dérive de fréquence identique ainsi que la fréquence instantanée du signal SRS issue de l'interaction des faisceaux pompe et Stokes.

L'indice  $i = S, p$  est utilisé pour décrire soit l'impulsion Stokes ( $S$ ) ou pompe ( $p$ ). Pour faire correspondre la dérive de fréquences des deux impulsions, la condition suivante doit être suivie:

$$\frac{2a_p(\pi\Delta\nu_p)^2}{(2\ln 2)(1+a_p^2)} = \frac{2a_S(\pi\Delta\nu_S)^2}{(2\ln 2)(1+a_S^2)}. \quad (4.27)$$

En supposant que la largeur de la bande spectrale de chaque impulsion est connue, il reste deux inconnues:  $a_S$  et  $a_p$ . Pour résoudre l'équation, un des inconnus peut être défini en lui attribuant une valeur arbitraire. Nous pouvons également lui attribuer une valeur correspondant au paramètre de la dérive de fréquences ( $a_i$ ) calculée à partir de la bande spectrale effective ( $\Delta\nu_{eff,i}$ ) d'une longueur d'impulsion ( $\tau_i$ ) désirée. Il est à noter que la bande spectrale effective ( $\Delta\nu_{eff,i}$ ) associée à une longueur d'impulsion ( $\tau_i$ ) donnée peut être calculée grâce à l'équation 4.7 et le paramètre de la dérive de fréquences ( $a_i$ ) correspondant peut être calculé à l'aide l'équation 4.31. Une fois qu'un des paramètres de la dérive de fréquences est défini (pour les besoins de cette discussion, supposons que  $a_p$  est défini), le seul inconnu restant est le paramètre de la dérive de fréquences du faisceau Stokes ( $a_S$ ) et l'équation 4.27 peut

être transformée pour obtenir l'équation suivante:

$$a_S^2 a_p \Delta \nu_p^2 - a_S \Delta \nu_S^2 (1 + a_p^2)^2 + a_p \Delta \nu_p^2 = 0. \quad (4.28)$$

Cette équation peut être résolue et le paramètre de dérive de fréquences est alors donné par:

$$a_S = \frac{\Delta \nu_S^2 (1 + a_p^2) + \sqrt{\Delta \nu_S^4 (1 + a_p^2)^2 - 4 a_p^2 \Delta \nu_p^4}}{2 a_p \Delta \nu_p^2}. \quad (4.29)$$

Il est à noter que les indices désignant les faisceaux pompe et Stokes peuvent être interchangés dans le but de calculer le paramètre de la dérive de fréquences du faisceau pompe ( $a_p$ ) en fixant la valeur de paramètre de la dérive de fréquences du faisceau Stokes ( $a_S$ ). Pour déterminer  $a_S$  avec l'équation 4.29,  $a_p$  doit être connue. Pour ce faire, la bande spectrale effective ( $\Delta \nu_{eff,p}$ ) doit être connue, ce qui est présenté à la prochaine section.

### Équilibrer la bande spectrale effective

Si les impulsions pompe et Stokes ont une dérive de fréquence identique lorsqu'ils interagissent, le troisième terme exponentiel de l'interaction pompe-Stokes de l'équation 4.17 disparaît. L'enveloppe de la composante électrique est ainsi mathématiquement équivalente à celle d'une impulsion limitée en largeur de bande (voir équation 4.16) de telle sorte que:

$$\exp\left(-\frac{(t\pi\Delta\nu_{eff})^2}{(2\ln 2)}\right) = \exp\left(-\frac{(t\pi\Delta\nu)^2}{(2\ln 2)(1+a^2)}\right) \quad (4.30)$$

Nous trouvons ainsi que la bande spectrale effective ( $\nu_{eff}$ ) est donnée par:

$$\Delta \nu_{eff} = \sqrt{\frac{\Delta \nu^2}{1 + a^2}} \quad (4.31)$$

La plupart des modes de résonance Raman ont une largeur spectrale équivalente à celle d'une impulsion picoseconde. Ainsi, pour avoir une meilleure résolution spectrale, il est préférable que la bande spectrale effective de l'impulsion dont une dérive de fréquences est appliquée soit également de cet ordre de grandeur.

#### 4.2.4 Simulations

Pour permettre de mieux comprendre l'effet de la dérive de fréquences sur l'interaction entre les faisceaux pompe et Stokes, des simulations numériques ont été effectuées en variant certains paramètres. Ces simulations ne tiennent pas en compte la présence d'un mode Raman, ils permettent seulement de mieux visualiser l'effet du changement de certains paramètres sur un champ électrique composé de la différence de fréquences des faisceaux pompe et Stokes (c'est-à-dire le champ électrique produisant le signal SRS).

Les simulations sont basées sur une impulsion pompe centrée à 800 nm dont la bande spectrale est de 6,79 nm, ce qui correspond à une impulsion minimale d'environ 150 fs, et d'une impulsion Stokes centrée à 1040 nm dont la bande spectrale est de 9,5 nm, ce qui correspond à une impulsion minimale d'environ 150 fs. Ces valeurs sont tirées des caractéristiques du laser utilisé pour effectuer de la microscopie SRS, dont les caractéristiques sont présentées à la section 4.3.1. Nous supposons que du verre hautement dispersif (SF11) est utilisé pour induire la dérive de fréquences sur les impulsions pompe et Stokes. À moins d'avis contraire, une dérive de fréquences est induite sur l'impulsion Stokes pour obtenir une impulsion de 1,2 ps et la dérive de fréquences sur le faisceau pompe est ajustée en conséquence pour que les deux impulsions aient une dérive de fréquence identique, c'est-à-dire pour que la durée du faisceau pompe soit d'environ 1,5 ps.

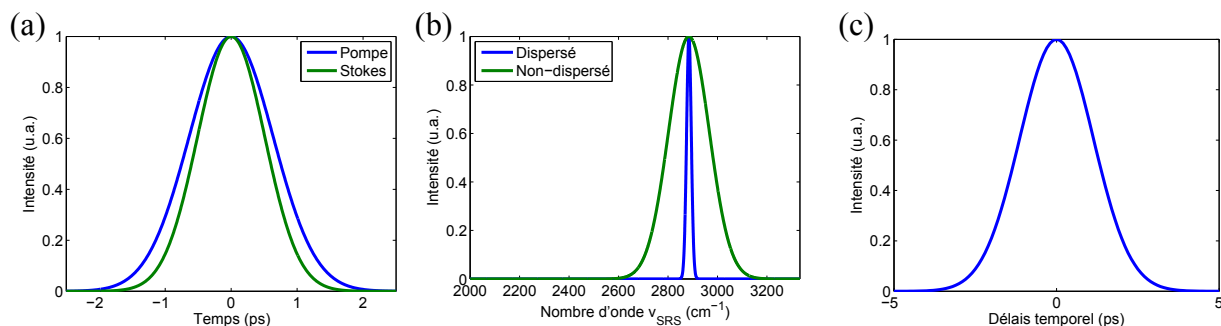


FIGURE 4.4 – Résultats de simulations: Paramètres de l'intensité et de la fréquence de la différence de fréquences des faisceaux pompe et Stokes. (a) Profil d'intensité des impulsions pompe et Stokes dont une dérive de fréquences est induite pour obtenir des longueurs d'impulsions de 1,5 et 1,2 ps respectivement. (b) Spectre de l'interaction des impulsions pompe et Stokes avec et sans dérive de fréquences au temps  $t = 0$ . (c) Profil d'intensité de l'interaction des impulsions pompe et Stokes.

La figure 4.4(a) montre les impulsions pompe et Stokes dont la pleine largeur à mi-hauteur du profil temporel des impulsions est augmentée par dérive de fréquences pour atteindre une durée de 1,5 et 1,2 ps respectivement. Lorsque les deux impulsions interagissent pour exciter un mode Raman, comme présenté à l'équation 4.17, le spectre de la différence de fréquences est différent selon la dérive de fréquences appliquée sur les impulsions pompe et Stokes. La figure 4.4(b) montre le spectre de la différence de fréquences des faisceaux pompe et Stokes dans le cas où une dérive de fréquences est appliquée sur les impulsions et dans le cas où la durée de l'impulsion est minimum (c'est-à-dire aucune dérive de fréquences n'est appliquée). Il est à noter que, dans les deux cas, les impulsions sont synchronisées temporellement (maximum de l'intensité de l'impulsion au même moment). Nous remarquons que, dans le cas où il y a une dérive de fréquences induite sur l'impulsion, le spectre de la différence de fréquences est beaucoup plus étroit que lorsqu'il n'y a pas de dérive de fréquences induite sur les impulsions. Ceci est dû au fait que, pour un temps donné, une plus petite portion des spectres pompe et Stokes interagissent entre eux, créant un spectre de la différence de fréquences moins large. Étant donné que les impulsions pompe et Stokes ont une dérive de fréquence identique (c'est-à-dire la variation de la fréquence instantanée par rapport au temps est la même), la différence de fréquences sur toute la durée de l'interaction pompe-Stokes reste la même. C'est sur ce principe que se base l'imagerie spectrale où seulement une petite portion du spectre Raman est sondé et changer le délai temporel entre les impulsions pompe et Stokes modifie la fréquence Raman sondée. La figure 4.4(c) montre le profil de l'intensité de la différence de fréquences des impulsions pompe et Stokes en fonction du délai temporel entre les deux impulsions. Nous remarquons un profil gaussien de l'intensité en fonction du temps dont la pleine largeur à mi-hauteur est de quelques picosecondes. Étant donné la grande variation de l'intensité de l'interaction pompe-Stokes en fonction du délai temporel, il est possible que la forme de certains modes Raman sondés soit déformée ou que l'intensité relative entre deux modes Raman acquis durant le même balayage spectral soit différente de la valeur réelle de leur intensité relative.

La figure 4.5(a) montre la valeur de la largeur spectrale de l'interaction pompe-Stokes (tel que le spectre présenté à la figure 4.4(b)) en fonction du délai temporel entre les deux

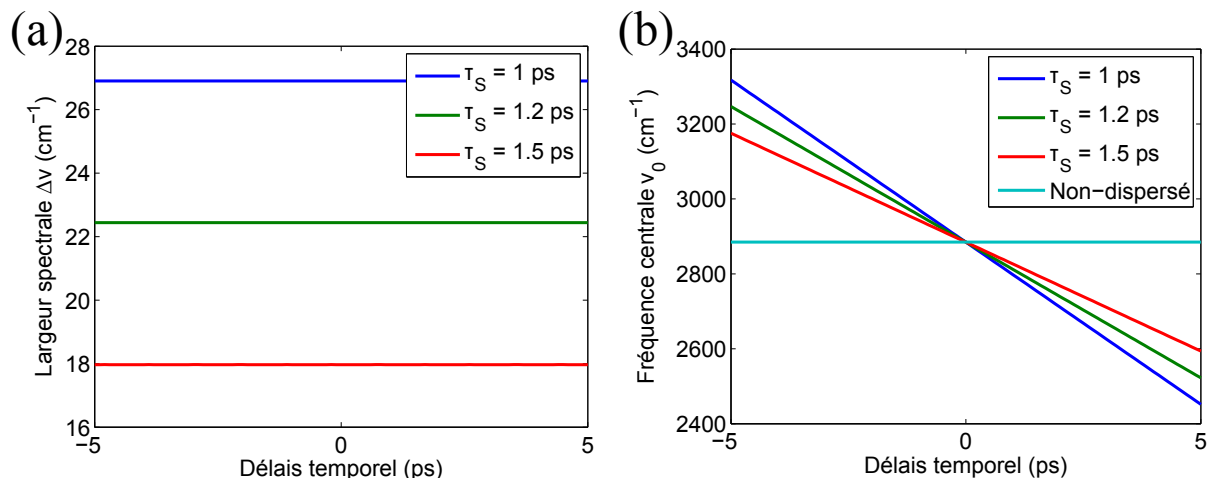


FIGURE 4.5 – Résultats de simulations: Paramètres de fréquence lors de balayage spectral. (a) Largeur spectrale de la différence de fréquences des impulsions pompe et Stokes en fonction du délai temporel entre les deux impulsions pour différentes durées d’impulsions du faisceau Stokes dans le cas où les impulsions ont une dérive de fréquence identique. (b) Fréquence centrale de la différence de fréquences des impulsions pompe et Stokes en fonction du délai temporel entre les impulsions pour différentes longueurs d’impulsions du faisceau Stokes et dans le cas où il n’y a pas de dérive de fréquences appliquée. Il est à noter qu’il y a une synchronisation en fréquence des impulsions pompe et Stokes.

impulsions. Celles-ci sont calculées pour différentes durées de l’impulsion Stokes, tout en prenant soin que la durée de l’impulsion pompe soit également ajustée pour que les impulsions pompe et Stokes aient une dérive de fréquence identique. La figure montre que la variation du délai temporel entre les deux impulsions ne modifie pas la largeur du spectre de l’interaction pompe-Stokes et que plus la durée des impulsions est élevée, plus la largeur spectrale de l’interaction pompe-Stokes est faible (et donc la résolution spectrale est plus élevée). La figure 4.5(b) montre la fréquence centrale du spectre de l’interaction pompe-Stokes en fonction du délai temporel entre les deux impulsions. Les données sont présentées pour plusieurs durées d’impulsions du faisceau Stokes, tout en prenant soin d’ajuster la durée de l’impulsion du faisceau pompe pour que les deux impulsions aient une dérive de fréquence identique. La figure montre une variation linéaire de la fréquence centrale en fonction du délai temporel. Plus la durée des impulsions est élevée, plus la variation de la fréquence en fonction du délai temporel est élevée. Lorsqu’il n’y a pas de dérive de fréquences induite sur les impulsions, il n’y a pas de variation de la fréquence lors de la modification du délai temporel.



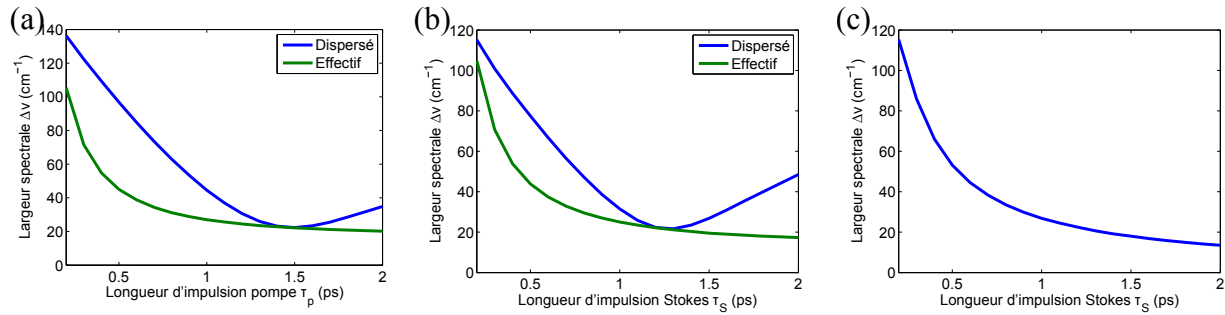


FIGURE 4.6 – Résultats de simulations: Paramètre de la largeur spectrale en fonction de la dérive de fréquences. (a) Largeur spectrale de la différence de fréquences entre les impulsions pompe et Stokes en fonction de la durée de l'impulsion du faisceau pompe  $\tau_p$  pour une durée de l'impulsion fixe du faisceau Stokes  $\tau_S = 1,2$  ps. (b) Largeur spectrale de la différence de fréquences entre les impulsions pompe et Stokes en fonction de la durée de l'impulsion du faisceau Stokes  $\tau_S$  pour une durée de l'impulsion fixe du faisceau pompe  $\tau_p = 1,5$  ps. Dans le cas de (a) et (b), la courbe bleue représente le cas où une dérive de fréquences est appliquée aux impulsions tandis que la courbe verte représente le cas où les impulsions sont limitées en largeur de bande et ont la durée spécifiée (le spectre des impulsions est donc moins large). (c) Largeur spectrale de la différence de fréquences entre les impulsions pompe et Stokes en fonction de la durée de l'impulsion du faisceau Stokes dans le cas où les deux impulsions ont une dérive de fréquence identique.

Expérimentalement, il peut être difficile d'obtenir une durée de l'impulsion des faisceaux pompe et Stokes de tel sorte que leur dérive de fréquence soit identique. Il peut ainsi être intéressant de sonder l'effet de la modification de la durée de l'impulsion sur la résolution spectrale. La figure 4.6(a) montre la résolution spectrale (c'est-à-dire la pleine largeur à mi-hauteur du spectre de la différence de fréquences entre les faisceaux pompe et Stokes) en fonction de la durée de l'impulsion du faisceau pompe tout en gardant la durée de l'impulsion Stokes constante à 1,2 ps. La figure 4.6(b) montre également la largeur spectrale, mais en fonction de la durée de l'impulsion du faisceau Stokes pour une impulsion du faisceau pompe d'une durée constante de 1,5 ps. La courbe bleue est le cas où les impulsions sont d'une durée d'environ 200 fs à leur durée minimale et une dérive de fréquences est induite, augmentant la durée de l'impulsion. La courbe verte est le cas où les impulsions sont limitées en largeur de bande et la durée de l'impulsion varie en faisant varier la bande spectrale (mais les impulsions restent limitées en largeur de bande). Nous remarquons que la durée de l'impulsion qui procure la plus grande résolution spectrale (c'est-à-dire la plus faible largeur spectrale) correspond à celle où les deux impulsions ont une dérive de fréquence identique et

la résolution spectrale diminue lorsqu'une des impulsions a une dérive de fréquences induite trop ou pas suffisamment élevée par rapport à l'autre. Nous remarquons également que la résolution minimale en utilisant des impulsions dont une dérive fréquences est induite est équivalente à la résolution spectrale en utilisant des impulsions de même durée mais limitées en largeur de bande. La figure 4.6(c) montre la résolution spectrale en fonction de la durée de l'impulsion du faisceau pompe dans le cas où les impulsions pompe et Stokes ont une dérive de fréquence identique. La figure montre une augmentation flagrante de la résolution spectrale lorsque la durée de l'impulsion augmente jusqu'à environ 1 ps pour ensuite augmenter plus lentement. Étant donné que pour augmenter la durée de l'impulsion, nous utilisons du verre à haut indice de réfraction, augmenter la durée de l'impulsion du faisceau Stokes à plus de 1,5 ps n'est probablement pas judicieux. En effet, dans ce cas, une très grande quantité de verre serait nécessaire pour induire une dérive de fréquences et l'augmentation de la résolution spectrale résultante serait peu considérable. De plus, des effets de dispersion d'ordres supérieurs risquent d'apparaître.

En conclusion, ces simulations montrent qu'utiliser des impulsions ultracourtes d'environ 150 fs et d'induire une dérive de fréquences permet d'augmenter la résolution spectrale en diminuant la largeur spectrale de l'interaction pompe-Stokes (c'est-à-dire la différence de fréquences des faisceaux pompe et Stokes). Ceci est comparable à l'utilisation d'impulsions picosecondes de même durée, mais limité en largeur de bande. Changer le délai temporel entre les impulsions pompe et Stokes permet de changer la fréquence centrale de l'interaction pompe-Stokes sans toutefois modifier la résolution spectrale. Finalement, la durée des impulsions qui permet d'atteindre la plus grande résolution spectrale est atteinte lorsque les impulsions pompe et Stokes ont une dérive de fréquence identique et induire une dérive de fréquences peu ou trop importante sur une impulsion par rapport à l'autre mène à une diminution de la résolution spectrale.

## 4.3 Montage expérimental

Cette section présente les détails techniques concernant le montage expérimental utilisé pour effectuer de la microscopie SRS. Premièrement, le système laser est décrit. Ensuite, le montage optique et le microscope sont présentés. Finalement, le branchement des différents appareils électroniques et les logiciels utilisés sont présentés.

### 4.3.1 Système laser

Le laser utilisé pour ce montage expérimental est un laser qui produit des impulsions ultrabrèves et génère deux faisceaux lasers (InSight DS+, Spectra Physics, É.-U.). Le premier faisceau produit des impulsions femtosecondes d'une durée d'environ 150 fs dont la longueur d'onde centrale est fixée à 1040 nm. Ce faisceau est utilisé comme faisceau Stokes. Le second faisceau produit des impulsions femtosecondes dont la longueur d'onde centrale est ajustable. La longueur d'onde centrale peut être ajustée dans un intervalle de longueur d'onde allant de 680 à 1300 nm. Ce faisceau est utilisé comme faisceau pompe. La longueur d'onde du faisceau pompe est typiquement ajustée à l'intérieur d'un intervalle de longueur d'onde allant de 790 à 992 nm, ce qui correspond à un intervalle de fréquences Raman allant de 3042 à 465  $\text{cm}^{-1}$ . Les impulsions sont d'une durée d'environ 180 fs. Une dérive de fréquences est induite sur les deux impulsions en utilisant des morceaux de verre à haut indice de réfraction (voir section 4.3.2) pour obtenir des impulsions de durée d'environ 1,1 ps pour le faisceau Stokes et 1,5 ps pour le faisceau pompe. La caractérisation du laser est présentée à la section 4.5.

### 4.3.2 Montage optique

Le montage optique utilisé pour ces expériences est présenté à la figure 4.7. L'intensité des faisceaux pompe et Stokes est ajusté pour chaque faisceau à l'aide d'une lame de demi-onde (AHWP05M-980, Thorlabs, É.-U.) et d'un séparateur de faisceau polarisant (PBS102, Thorlabs, É.-U.). Étant donné que la configuration SRL est adoptée pour ces expériences, la

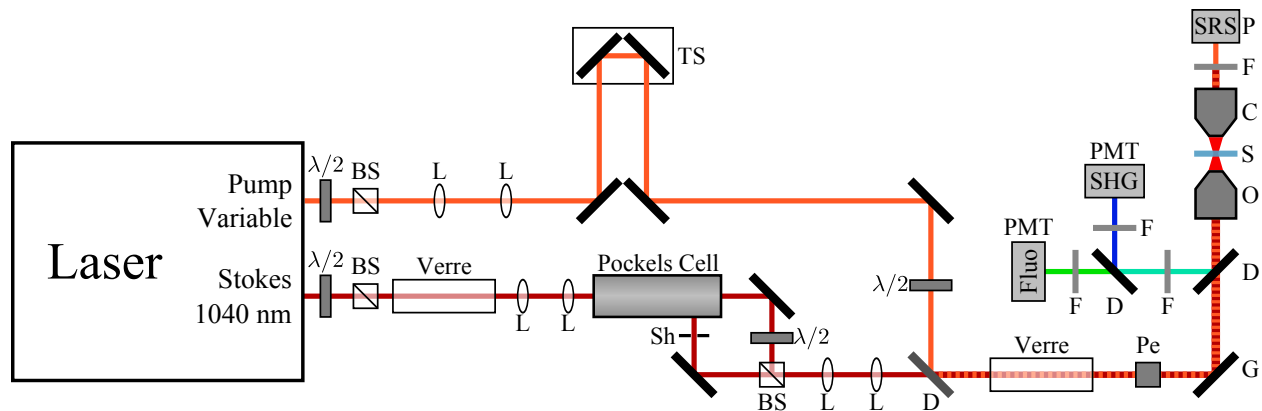


FIGURE 4.7 – Montage expérimental incluant le montage optique et le montage du microscope: ( $\lambda/2$ ) lame demi-onde, (BS) Séparateur de faisceau polariseur, (L) Lentille, (TS) Platine de translation, (Sh) Obturateur, (D) miroir dichroïque, (Pe) Périscope, (G) Miroirs galvanométriques, (O) Objectif de microscope, (S) Échantillon, (C) Condensateur, (P) Photodiode, (PMT) Tube photomultiplicateur, (F) Filtre.

modulation est appliquée sur le faisceau Stokes. Pour ce faire, nous utilisons une cellule de Pockels (350-160, Conoptics, É.-U.). Une fréquence de modulation de 1,4 MHz est utilisée. Devant la cellule de Pockels, deux lentilles ( $f_1 = 150$  mm,  $f_2 = -100$  mm) sont utilisées pour réduire la taille du faisceau Stokes pour que le diamètre du faisceau concorde avec la taille de l'entrée de la cellule de Pockels. À la sortie de la cellule de Pockels, nous obtenons deux faisceaux lasers: un faisceau dont la polarisation horizontale est parallèle à celle du faisceau pompe (que nous appelons *faisceau parallèle*) et le second dont la polarisation verticale est perpendiculaire au faisceau pompe (que nous appelons *faisceau perpendiculaire*). Un obturateur est placé dans le trajet du faisceau perpendiculaire pour permettre de sélectionner la configuration de modulation de l'amplitude (AM) (faisceau perpendiculaire bloqué) ou la configuration de modulation de la polarisation (PM) (faisceau perpendiculaire libre). Pour plus de détails sur la microscopie SRS par modulation de la polarisation, se référer au chapitre 5. Ces deux faisceaux sont combinés à l'aide d'un séparateur de faisceau polarisant (PBS252, Thorlabs, É.-U.) pour former le faisceau Stokes dont l'amplitude (configuration AM) ou la polarisation (configuration PM) est modulée selon une fréquence de modulation de 1,4 MHz (voir la figure 5.3 pour une représentation visuelle des configurations AM et PM). Une lame demi-onde est placée dans le trajet du faisceau parallèle pour permettre, en combinaison avec le séparateur de faisceau polarisant, de contrôler l'intensité du faisceau pa-

rallèle par rapport au faisceau perpendiculaire. La divergence des faisceaux pompe et Stokes est contrôlée à l'aide de deux lentilles dont la distance les séparant peut être variée pour un ajustement fin de la divergence. Une lame demi-onde est placée dans le trajet du faisceau pompe pour un ajustement fin de la polarisation entre les faisceaux pompe et Stokes dans l'éventualité où certaines optiques changent la polarisation ou que l'échantillon induise de la biréfringence. Les faisceaux Stokes et pompe sont combinés à l'aide d'un miroir dichroïque (ZT1040dmbp, Chroma, É.-U.). Le délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes est contrôlé à l'aide d'une platine de translation (ILS200CC, Newport, É.-U.) placée dans le trajet du faisceau pompe. Une dérive de fréquences est également induite sur les deux impulsions en utilisant du verre à haut indice de réfraction (SF11). Une longueur de 85 cm de verre est placée dans le trajet du faisceau Stokes et une longueur de 60 cm de verre est utilisée pour le faisceau pompe. Les faisceaux sont ensuite envoyés dans un microscope inversé dont les caractéristiques sont présentées à la section [4.3.3](#).

### 4.3.3 Microscope

Comme présenté à la figure [4.7](#), les faisceaux pompe et Stokes sont envoyés dans un microscope inversé (IX-71, Olympus, Japon). Des miroirs galvanométriques sont utilisés pour balayer le faisceau sur l'échantillon pour créer une image. Les faisceaux sont focalisés sur l'échantillon à l'aide d'un objectif de microscope (UPlanSapo, 20x, NA 0.75, Olympus, Japon). Le faisceau pompe est collecté dans la direction forward à l'aide d'un objectif de microscope (LUMPlanFI/IR, 40x, NA 0.8w, Olympus, Japon) et est ensuite détecté par une photodiode (FDS10X10, Thorlabs, É.-U.). Devant la photodiode, deux filtres (FF02-850/310-25, Semrock, É.-U. et 1064-71 NF, Iridian, Canada) sont utilisés pour bloquer les faisceaux autres que le faisceau pompe. Les signaux de fluorescence à deux photons (TPF) et de seconde harmonique (SHG) sont collectés dans la direction backward. Nous considérons que la quantité de lumière de seconde harmonique réfléchi par l'échantillon et les optiques présents dans la direction forward nous permettra d'obtenir un signal de SHG suffisamment élevé pour bien analyser les échantillons présentés dans cette thèse. Un miroir dichroïque dirige le signal de SHG et de TPF (720DCXXR, Chroma, É.-U.) à travers un filtre (750SP,

Chroma, É.-U.). Un second miroir dichroïque (540DCXR, Chroma, É.-U.) sépare le signal de SHG et le signal de TPF pour qu'ils soient détectés par une PMT individuellement. Pour éviter le bruit provenant des autres faisceaux, un filtre est placé devant chaque PMT pour sélectionner les longueurs d'onde appropriées (BP520/10, Chroma, É.-U. pour la SHG et BP HQ630/140, Chroma, É.-U. pour la TPF). Finalement, la position de l'échantillon est contrôlée à l'aide d'une platine de translation à 3 axes.

La collecte du signal dans la direction forward est délicate à effectuer. En effet, certains effets non-linéaires tels que la modulation de phase croisée et la lentille thermique peuvent être faussement interprétés comme un signal SRS si la collecte du signal n'est pas optimale. Ces effets, comme présentés à la section 5.4, modifient l'indice de réfraction perçu par le faisceau pompe dans l'échantillon et modifie ainsi l'angle de divergence du faisceau pompe à la sortie de l'échantillon. Ce changement de divergence peut être perçu soit par un gain ou une perte (voir figure 5.2). Pour cette raison, plusieurs précautions ont été prises pour optimiser la collection du faisceau pompe. Ainsi, la surface de la photodiode est très grande ( $1 \text{ cm}^2$ ) pour permettre à la totalité du faisceau d'être collecté. Également, la photodiode est placée le plus près possible de l'échantillon et la hauteur de l'objectif qui collecte le signal SRS est ajustée soigneusement pour optimiser la collecte du faisceau pompe. Finalement, l'ouverture numérique de l'objectif servant à la collecte du faisceau pompe est plus élevée (0,8 NA) que l'objectif servant à focaliser les faisceaux pompe et Stokes (0,75 NA) pour s'assurer que la totalité du faisceau pompe soit collecté.

#### 4.3.4 Électronique

Un aspect très important à considérer lorsque nous faisons de l'imagerie en utilisant la microscopie SRS est la configuration du système électronique. En effet, une grande partie du bruit qui peut diminuer la sensibilité de détection de notre système provient du bruit électronique. Les différents appareils nécessaires pour faire fonctionner le système de microscopie sont présentés dans cette section.

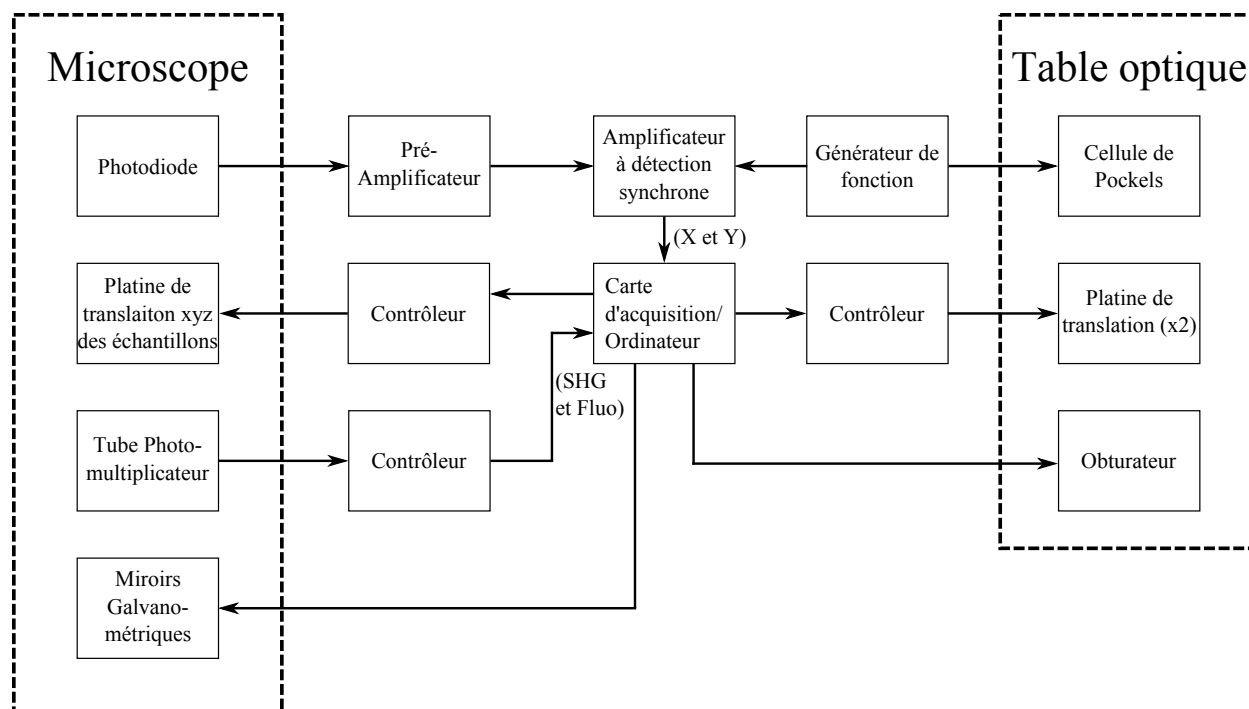


FIGURE 4.8 – Schéma du système électronique utilisé pour faire l'acquisition d'images avec la microscopie SRS.

La figure 4.8 présente le schéma des différents appareils électroniques utilisés pour les expériences. La photodiode utilisée pour acquérir le signal SRS est alimentée en courant à l'aide d'un bloc d'alimentation et une polarité inverse de 50 V est appliquée pour augmenter le temps de réponse. Le signal provenant de la photodiode est envoyé dans un pré-amplificateur (DHPCA-100, Femto Messtechnik GmgH, Allemagne) pour être amplifié d'un facteur 1000. Le signal de sortie est ensuite envoyé dans un amplificateur à détection synchrone. Ce dernier acquiert le signal provenant du pré-amplificateur et extrait le signal SRS dont la fréquence d'oscillation correspond à une fréquence de référence. Ce signal de référence provient d'un générateur de fonction (DS345, Stanford Research System, É.-U.) qui génère une onde carrée à une fréquence de 1,4 MHz. L'onde carrée est envoyée dans une cellule de Pockels qui est utilisée pour moduler le faisceau Stokes et la référence externe du générateur de fonction est envoyée à l'amplificateur à détection synchrone pour être utilisée comme fréquence de référence.

Pour la durée des expériences, une résistance de  $50 \Omega$  est utilisée à l'entrée de l'amplificateur à détection synchrone et l'intervalle de voltage est ajusté au minimum possible sans surcharger l'appareil (typiquement 200 mV). La sortie de l'amplificateur à détection synchrone peut être affichée selon 4 canaux différents:  $X$ ,  $Y$ ,  $R$  et  $\theta$ . Le canal  $R$  représente l'amplitude du signal, peu importe la phase  $\theta$  de celle-ci tandis que les canaux  $X$  et  $Y$  représentent la projection orthogonale du canal  $R$  et sont déphasés de  $90^\circ$  l'un par rapport à l'autre. Ainsi, les différents canaux sont reliés selon les équations suivantes:

$$R = \sqrt{X^2 + Y^2} \quad (4.32)$$

$$X = R \cos \theta \quad (4.33)$$

$$Y = R \sin \theta \quad (4.34)$$

Pour la durée de nos expériences, le canal  $X$  est utilisé pour afficher le signal SRS pour lequel la phase  $\theta$  est ajustée pour maximiser le signal. Le canal  $Y$  est parfois utilisé pour détecter des signaux complémentaires tels que le signal de lentille thermique, qui est déphasée par rapport au signal SRS sous certaines conditions. Une constante de temps de  $20 \mu\text{s}$  est utilisée pour l'acquisition du signal SRS et la sortie du signal est amplifiée selon une échelle se situant entre 2 et 10 kV/V.

Le signal de sortie de l'amplificateur à détection synchrone est envoyé vers une carte d'acquisition pour ensuite être envoyé à l'ordinateur. De même, les signaux de SHG et de TPF détectés par les PMT sont également envoyés vers cette même carte d'acquisition. L'ordinateur est également utilisé pour contrôler la platine de translation utilisée pour changer le délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes. Cette platine de translation est également utilisée pour effectuer les balayages spectraux.

### 4.3.5 Acquisition et traitement des images

Les images sont acquises à l'aide du programme *Scan Image* [155] qui fonctionne à l'aide du logiciel *Matlab*. *Scan Image* est utilisé pour le fonctionnement des miroirs galvanomé-



triques, l'acquisition des images ainsi que la position de la platine de translation à 3 axes qui détermine la position de l'échantillon. Plusieurs paramètres tels que la taille de la région imagée, la position de l'échantillon, le nombre de canaux acquis ainsi que le nombre d'images par scans sont contrôlés par ce programme. Le voltage des PMT ainsi que la platine de translation qui contrôle le délai entre les faisceaux pompe et Stokes sont contrôlés par des programmes construits sur *Labview*. Ce dernier programme détermine ainsi la position initiale et finale en plus de la vitesse de la platine de translation lors des balayages spectraux, déterminant ainsi la résolution du balayage spectral. L'amplificateur à détection synchrone, quant à lui, est contrôlé à l'aide d'un logiciel fourni par le fabricant. Un interface graphique maison fut également programmé sur *Matlab* et permet de contrôler le laser et la platine de translation servant à contrôler le délai temporel du faisceau pompe. Ce programme permet d'automatiser l'acquisition de plusieurs balayages spectrales à plusieurs longueurs d'onde dans le but d'obtenir un large spectre SRS composé de plusieurs de ces balayages spectrales mis bout à bout.

Les spectres SRS sont construits en faisant l'acquisition d'images SRS tout en variant lentement la position de la platine de translation du faisceau pompe. Varier la position de la platine de translation change par le fait même la fréquence Raman excitée. Pour chaque image, l'intensité du signal SRS à la région d'intérêt est mesurée et ces mesures sont utilisées pour construire le spectre SRS où chaque image correspond à l'intensité du signal pour une position de la platine de translation qui, à son tour, correspond à une fréquence Raman. Un graphique de l'intensité en fonction de la fréquence Raman peut donc être construit. La calibration des spectres SRS permettant de connaître la relation entre la position de la platine de translation et la fréquence Raman est présentée à la section 4.4.

La grande majorité du temps, les images sont traitées à l'aide du logiciel *Image J (Fiji)*. Plus précisément, les images en 3 dimensions sont construites à l'aide du module d'extension *3D viewer*. Les spectres SRS acquis à l'aide du balayage spectral sont générés à l'aide d'une interface graphique maison construite sur *Matlab*.

## 4.4 Calibration de l'imagerie spectrale

Comme expliquée précédemment, l'acquisition de spectres SRS est faite en changeant le délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes. Ceci permet de faire l'acquisition de spectres SRS dans un certain intervalle de longueurs d'onde. Toutefois, à l'état brut, les spectres sont présentés en fonction du délai temporel entre les deux faisceaux lasers (plus précisément, en fonction de la position de la platine de translation en modifiant le délai temporel du faisceau pompe). Il est ainsi nécessaire de faire une calibration du signal SRS pour obtenir une relation entre la position de la platine de translation et la fréquence correspondante dans le spectre Raman.

Sur l'ancien montage expérimental utilisé dans le laboratoire pour faire de la microscopie CARS, la technique utilisée pour calibrer le signal est de recueillir le signal du mélange à quatre ondes de l'astaxanthine. Cette molécule produit un fort signal de mélange à quatre ondes dont la longueur d'onde est la même que le signal CARS. Ce signal est suffisamment intense pour être collecté à l'aide d'un spectromètre. Il est à noter que, pour ce montage, le faisceau pompe provient d'un laser Titane:Saphir et le faisceau Stokes est généré en envoyant une partie du faisceau laser dans une fibre à cristaux photoniques. Le spectre du faisceau Stokes est ainsi très large par rapport à celui du faisceau pompe. Nous pouvons ainsi supposer que la longueur d'onde du faisceau pompe servant à générer le mélange à quatre ondes reste constante et changer le délai temporel entre les deux impulsions change seulement la fréquence centrale du faisceau Stokes qui interagit avec le faisceau pompe. Il est possible de retrouver la fréquence Raman en soustrayant la fréquence du mélange à quatre ondes collectée par le spectromètre et la fréquence du faisceau pompe ( $\Omega = \omega_{FWM} - \omega_p$ ). En faisant l'acquisition des fréquences du mélange à quatre ondes pour plusieurs positions de la platine de translation, il est possible d'obtenir une relation assez précise de la fréquence Raman en fonction de la position de la platine de translation.

Dans le montage SRS présenté dans ce chapitre, utiliser ce type de calibration donne des résultats beaucoup moins précis. Premièrement, puisque la largeur spectrale des faisceaux pompe et Stokes est semblable, nous ne pouvons pas supposer qu'une des longueurs

d'onde reste constante. Ainsi, lorsque la position de la platine de translation est modifiée, la longueur d'onde centrale des faisceaux pompe et Stokes produisant le signal de mélange à quatre ondes change également. Il est donc nécessaire de faire certaines approximations pour obtenir la calibration de la fréquence Raman et le résultat est souvent inexact de plusieurs nombres d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ ). Deuxièmement, avec ce montage expérimental, l'obtention d'un large spectre SRS est possible en faisant l'acquisition de plusieurs balayages spectraux à plusieurs longueurs d'onde du faisceau pompe. En effet, pour une longueur d'onde du faisceau pompe donnée, nous pouvons faire l'acquisition d'un spectre SRS dans un intervalle d'environ  $150 \text{ cm}^{-1}$ . Les différents balayages spectraux sont ainsi mis bout à bout pour obtenir un spectre SRS avec un intervalle de fréquences plus large. Une calibration des fréquences Raman est ainsi nécessaire pour toutes les longueurs d'onde utilisées, ce qui est un processus qui peut prendre plusieurs dizaines de minutes, voir plusieurs heures. Devant l'inexactitude et le temps nécessaire pour faire le processus de calibration, une méthode alternative pour effectuer la calibration des fréquences Raman est souhaitée.

Une méthode possible pour effectuer la calibration des fréquences Raman est de faire l'acquisition du spectre SRS d'un échantillon connu ayant deux modes de résonance Raman dans l'intervalle d'un balayage spectral, c'est-à-dire dans un intervalle d'environ  $150 \text{ cm}^{-1}$ . De ces deux modes Raman connus, il est ainsi possible de calculer la relation entre la position de la platine de translation et la fréquence Raman. Cette relation est donnée par:

$$wn = a \cdot pos + b \quad (4.35)$$

où  $wn$  est la fréquence en  $\text{cm}^{-1}$ ,  $pos$  est la position de la platine de translation et  $a$  et  $b$  sont les coefficients de la droite reliant ces deux quantités. Pour un balayage spectral donné, si deux modes de résonances Raman dont les nombres d'ondes sont connus (désignés par  $wn_1$  et  $wn_2$ ) sont visibles dans le spectre, nous pouvons retrouver la position de la platine de translation lors de l'excitation de ces modes (que nous désignons  $pos_1$  et  $pos_2$ ) en connaissant la position de départ et d'arrivée du balayage spectral. Les coefficients de la droite peuvent

ainsi être calculés selon:

$$a = \frac{wn_2 - wn_1}{pos_2 - pos_1} \quad (4.36)$$

$$b = wn_1 - a \cdot pos_1. \quad (4.37)$$

Deux régions principales du spectre Raman sont utilisées pour ces études et ont besoin d’être calibrées: la région des “fingerprints” ( $< 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) et la région des modes CH ( $2800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ ). Pour faire l’acquisition d’une de ces régions, plusieurs balayages spectraux sont nécessaires: habituellement quatre balayages spectraux sont utilisés pour la région CH et entre 8 et 12 balayages spectraux sont nécessaires pour la région des “fingerprints”. Les échantillons utilisés pour la calibration doivent avoir suffisamment de modes de résonance Raman dans la région étudiée pour que chaque balayage spectral utilisé pour reconstruire le spectre SRS puisse détecter au moins deux modes de résonance. Dans la région CH, nous avons choisi d’utiliser l’Octadécène pour faire la calibration puisqu’il possède quatre modes de résonances distincts dans cet intervalle de fréquence. Le spectre normalisé de l’Octadécène utilisant quatre longueurs d’onde du faisceau pompe est présenté à la figure 4.9. La figure 4.9(a) montre les spectres SRS sans calibration de l’intensité du signal SRS (voir le

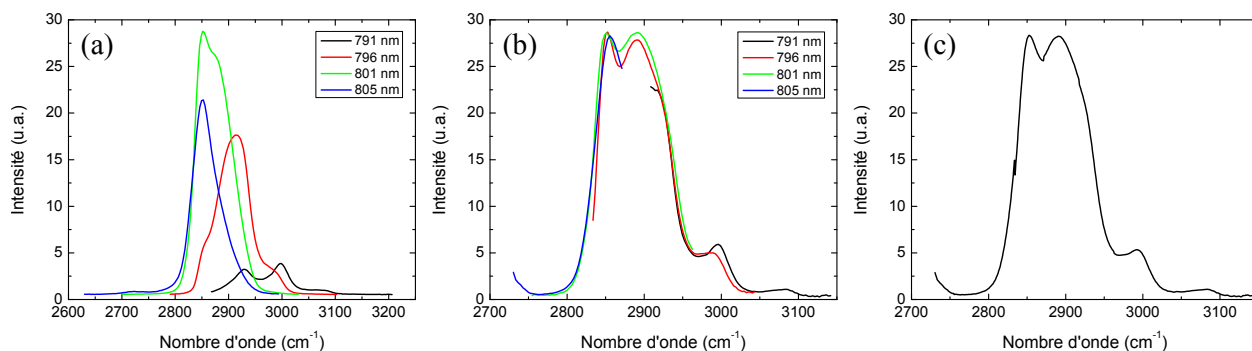


FIGURE 4.9 – Calibration de la région CH du spectre Raman avec de l’Octadécène. (a) Spectres SRS sans la calibration de l’intensité où les spectres SRS acquis sont déformés par la dépendance du délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes. La longueur d’onde centrale du faisceau pompe est de 791 (noir), 796 (rouge), 801 (vert) et 805 nm (bleu). (b) Spectres SRS avec la calibration de l’intensité où les différents modes de résonances Raman sont bien visibles. La longueur d’onde centrale du faisceau pompe est de 791 (noir), 796 (rouge), 801 (vert) et 805 nm (bleu). (c) Spectres SRS présentés en (b) mis bout à bout pour former un spectre SRS dont la gamme spectrale est de plus de  $300 \text{ cm}^{-1}$ .

dernier paragraphe de cette section), la figure 4.9(b) montre les spectres SRS où l'intensité est calibrée et les différents modes de résonance Raman de l'Octadécène sont bien visibles. La figure 4.9(c) montre la moyenne des spectres SRS de la figure 4.9(b), montrant le spectre SRS sur un intervalle de plus de  $300 \text{ cm}^{-1}$ .

Pour la région des "fingerprints", nous avons choisi d'utiliser du 4-acetamidophenol (molécule utilisée dans les Tylenol). Le spectre Raman de cette molécule est composé d'un nombre très élevé de modes de résonance Raman entre 0 et  $1650 \text{ cm}^{-1}$  et est utilisé comme standard de calibration des spectromètres Raman [122]. La figure 4.10 montre le spectre SRS du 4-acetamidophenol acquis avec notre microscope. La figure 4.10(a) montre les spectres SRS provenant de 8 longueurs d'onde du faisceau pompe différentes tandis que la figure 4.10(b) montre la combinaison de ces spectres, révélant un spectre SRS sur un intervalle de plus de  $900 \text{ cm}^{-1}$ . Étant donné qu'au moins deux modes de résonance Raman sont présents dans chaque spectre SRS, il est ainsi possible de calibrer les fréquences des spectres SRS acquis dans tout l'intervalle des "fingerprints" en utilisant seulement du 4-acetamidophenol. Il est à noter que dans l'intervalle entre  $900$  et  $1100 \text{ cm}^{-1}$  se trouvent des modes de résonance Raman qui sont très faibles. Il est donc nécessaire d'utiliser des puissances relativement élevées des faisceaux lasers pour les détecter correctement.

Un autre élément qui est important de considérer lorsque nous faisons l'acquisition de spectres SRS est la dépendance du délai temporel sur l'intensité du signal SRS. En effet, puisque les faisceaux pompe et Stokes ont des durées de quelques picosecondes, l'intensité de la corrélation croisée de ces deux faisceaux forme une gaussienne. Ainsi, en faisant l'acquisition de spectres SRS, changer le délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes mène également à la modification de l'intensité de l'interaction des faisceaux. Ceci déforme le spectre SRS acquis, comme présenté à la figure 4.9(a). Pour résoudre ce problème, nous faisons également l'acquisition du signal de TPF de la fluorescéine en fonction du délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes. La dépendance du délai temporel sur l'intensité du signal de TPF est semblablement la même que celle de la corrélation croisée entre les faisceaux pompe et Stokes. En divisant le signal SRS par le signal de fluorescence, nous ob-

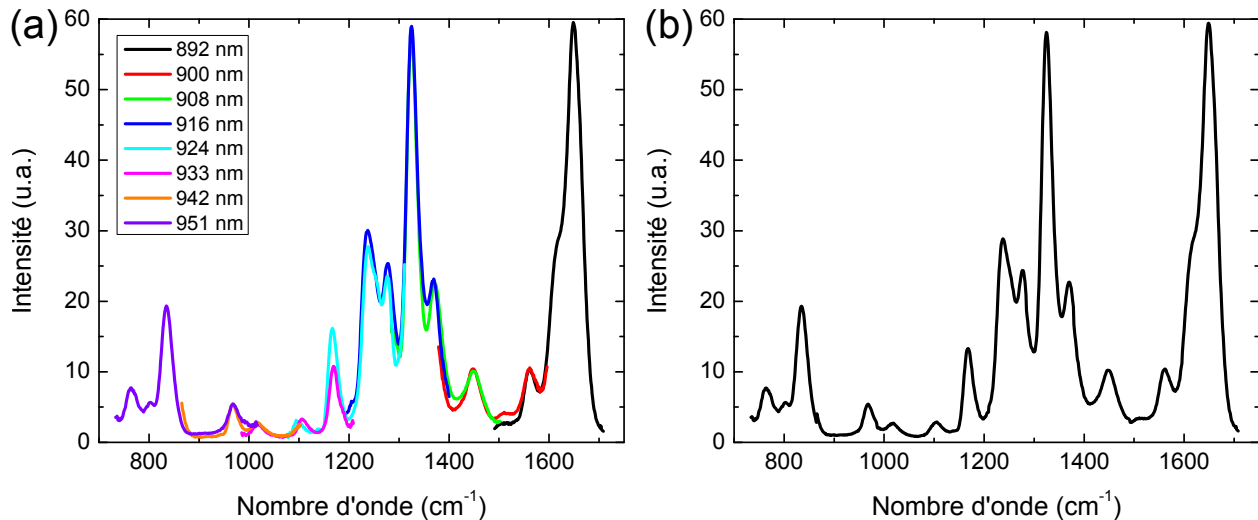


FIGURE 4.10 – Calibration de la région des “fingerprints” en utilisant du 4-acetamidophenol. (a) Spectres SRS dont l’intensité est calibrée où les différents modes de résonances Raman sont bien visibles. La longueur d’onde centrale du faisceau pompe est de 892 (noir), 900 (rouge), 908 (vert), 916 (bleu), 924 (cyan), 933 (rose), 942 (violet) et 951 nm (orange). (b) Spectres SRS présentés en (a) mis bout à bout pour former un spectre SRS dont la gamme spectrale est de plus de 900 cm<sup>-1</sup>.

tenons un spectre SRS dont l’intensité est normalisée et dont les modes de résonance Raman sont mieux visibles (voir figure 4.9(b)).

## 4.5 Caractérisation du laser

Les faisceaux pompe et Stokes provient d’un laser nouvellement acheté et installé dans le laboratoire et ainsi, une caractérisation de ses performances est nécessaire. Ces données ont été acquises peu de temps après la réception du laser et peuvent avoir changé au fil du temps. La plupart de ces données ont été acquises pour le faisceau dont la longueur d’onde est variable (que nous utilisons comme faisceau pompe).

La figure 4.11(a) montre la puissance du faisceau variable en fonction de la longueur d’onde, où la puissance varie entre 800 et 1600 mW. La puissance maximale se situe à la longueur d’onde de 900 nm. La polarisation du faisceau de sortie est linéaire et horizontale, selon les caractéristiques du fabricant. Pour confirmer cela, nous avons utilisé un séparateur

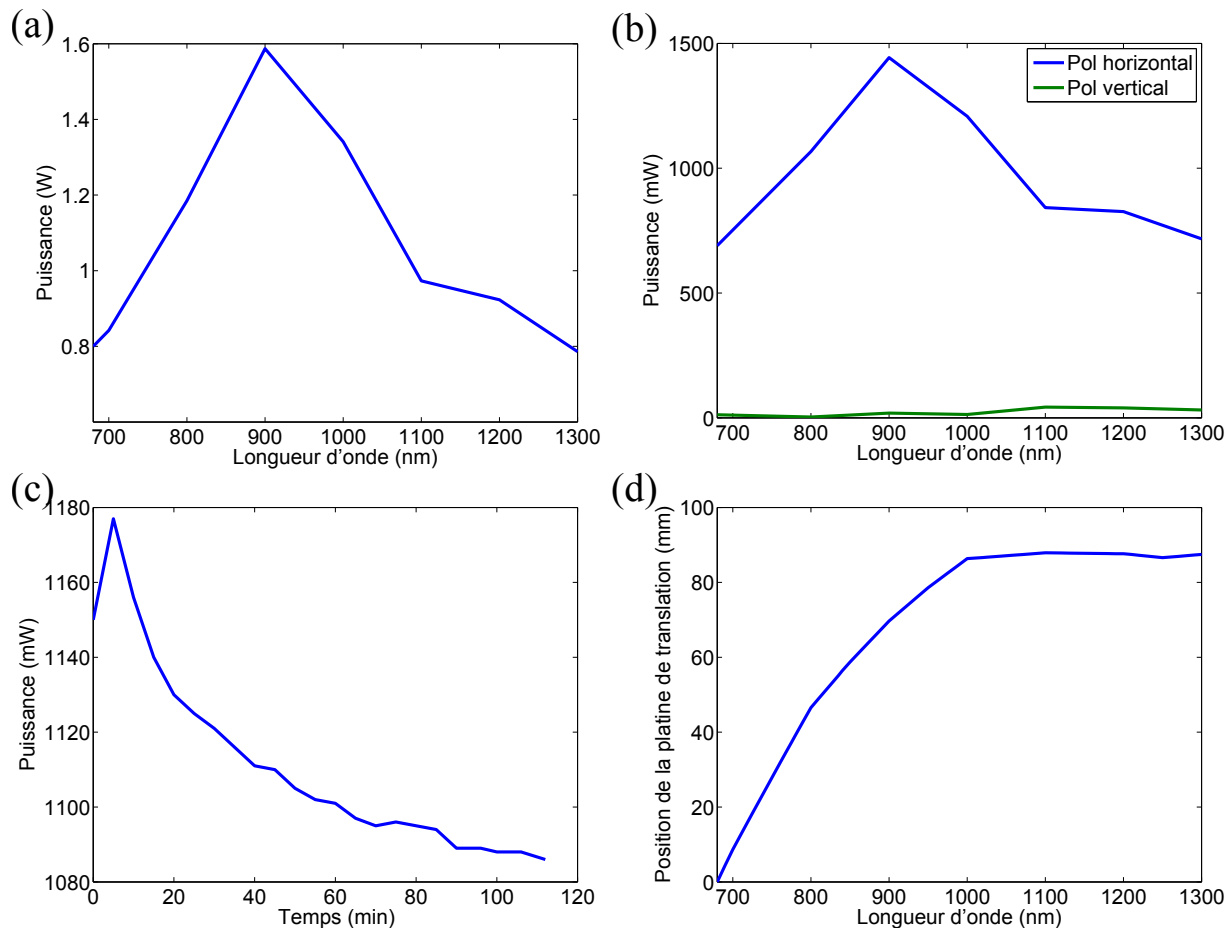


FIGURE 4.11 – Caractérisation de la puissance du laser. (a) Puissance du faisceau ajustable en fonction de la longueur d'onde. (b) Puissance du faisceau ajustable en fonction de la longueur d'onde pour les polarisations horizontale et verticale. Les mesures de polarisation furent effectuées à l'aide d'un séparateur de faisceau polariseur. (c) Puissance du faisceau ajustable à 800 nm en fonction du temps au démarrage du laser. (d) Position de la platine de translation en fonction de la longueur d'onde du faisceau pompe lorsque les impulsions pompe et Stokes se chevauchent.

de faisceau polariseur et nous avons vérifié la puissance pour chaque faisceau à la sortie du séparateur de faisceau (un faisceau est polarisé horizontalement et le second verticalement). Les résultats sont présentés à la figure 4.11(b) et montrent que la polarisation est effectivement horizontale. Il est à noter que l'augmentation de l'intensité pour le faisceau polarisé verticalement à des longueurs d'onde au-delà de 1000 nm peut être due à un revêtement antiréfléchissant inadéquat sur le séparateur de faisceau polariseur (le revêtement antiréfléchissant est conçu pour un intervalle se situant entre 620 à 1000 nm). La figure 4.11(c) montre la puissance du faisceau variable à une longueur d'onde de 800 nm en fonction du temps à

l'ouverture du laser. Ainsi, quelques minutes après l'ouverture, la puissance est maximale à 1180 mW pour ensuite se stabiliser à une puissance d'environ 1090 mW.

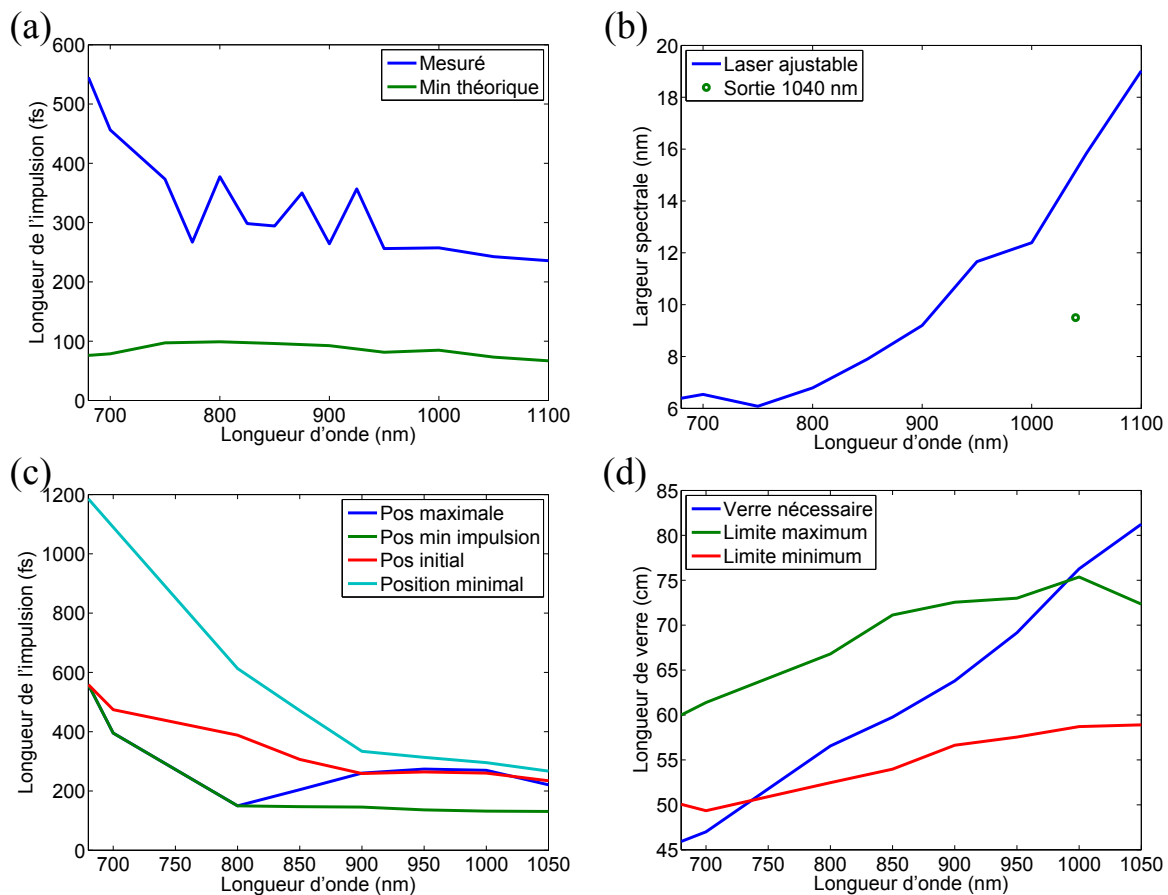


FIGURE 4.12 – Caractérisation de la durée de l'impulsion laser. (a) Durée de l'impulsion en fonction de la longueur d'onde sans ajustement du système de compensation du laser variable et durée théorique d'une impulsion limitée en largeur de bande en se basant sur sa largeur spectrale. (b) Largeur spectrale du laser en fonction de la longueur d'onde. (c) Durée de l'impulsion en fonction de la longueur d'onde pour différentes positions d'ajustement de la compensation de la dérive de fréquences du laser. Bleu: limite supérieure de l'intervalle de compensation interne du laser induisant la dérive de fréquences positive maximale. Vert: position du système de compensation interne du laser produisant les impulsions lasers les plus brèves possibles. Rouge: position par défaut du système de compensation interne du laser. Cyan: limite inférieure du système de compensation interne du laser induisant la dérive de fréquences négative maximale. (d) Longueur de verre nécessaire pour obtenir une synchronisation en fréquence des impulsions pompe et Stokes pour une impulsion Stokes de 1,2 ps ainsi que les limites supérieures (vert) et inférieures (rouge) du système de compensation interne du laser considérant que 60 cm de verre est initialement placé dans le trajet du faisceau pompe.



La durée de l'impulsion est également analysée. La figure 4.12(a) montre la durée de l'impulsion laser en fonction de la longueur d'onde mesurée à l'aide d'un autocorrélateur d'intensité. Il montre également la durée minimale théorique de la durée d'une impulsion limitée en largeur de bande calculée à partir de la largeur spectrale du faisceau laser pour les différentes longueurs d'onde (voir figure 4.12(b) pour les différentes largeurs spectrales). Le système laser inclut un système interne de compensation de la dispersion qui permet d'appliquer une dérive de fréquences positive ou négative sur l'impulsion laser. Ainsi, modifier la position d'une platine de translation à l'intérieur du système laser permet également de modifier la durée de l'impulsion en appliquant une dérive de fréquences positive ou négative. La figure 4.12(c) montre la durée de l'impulsion du faisceau laser variable en fonction de la longueur d'onde et ce, pour plusieurs positions du système de compensation de la dérive de fréquences. La courbe bleue est à la position maximale de la platine de translation ou la dérive de fréquences positive maximale est appliquée. La courbe verte est à la position où la durée de l'impulsion est minimale. Il est à noter que pour les longueurs d'onde entre 680 et 800 nm, la position de la platine de translation où l'impulsion est d'une durée minimale correspond également à la position maximale de la platine de translation puisqu'une dérive de fréquences positive plus élevée serait nécessaire pour atteindre la durée minimale de l'impulsion. La courbe rouge correspond à la durée de l'impulsion selon la position par défaut de la platine de translation du système de compensation. La courbe cyan correspond à la durée de l'impulsion à la position minimale du système de compensation où la dérive de fréquences positive minimal (ou la dérive de fréquences négative maximale) est appliquée. Il est à noter que dans les cas des courbes rouge et cyan, une dérive de fréquences négative est appliquée à l'impulsion laser. Ajouter du verre pour lequel la dispersion de vitesse de groupe est positive (comme c'est le cas pour la plupart des types de verre dans le proche infrarouge) réduirait la durée de l'impulsion. C'est une chose qui doit nécessairement être considérée dans le calcul de la longueur de verre nécessaire pour obtenir la durée d'impulsion requise.

À cause du système de compensation interne de la dérive de fréquences, lorsque la longueur d'onde est modifiée, le délai temporel entre les impulsions du laser variable et du laser à 1040 nm change également. Ainsi, nous avons installé une platine de translation dans

le trajet du faisceau variable et nous avons mesuré la position de la platine de translation lorsque les impulsions des deux laser se chevauchent pour différentes longueurs d'onde. Les résultats sont présentés à la figure 4.11(d). La forme de la courbe correspond à celle présentée par le logiciel contrôlant le laser montrant la position de la platine de translation du système de compensation interne de la dérive de fréquences en fonction de la longueur d'onde. Ainsi, ce système modifie le délai temporel entre le faisceau variable et le faisceau à 1040 nm. Changer la dérive de fréquences du faisceau variable pour une longueur d'onde donnée modifie également le délai temporel entre les deux impulsions. Pour cette raison, une platine de translation dont la distance de parcours maximale est de 200 mm est placée dans le trajet du faisceau variable pour permettre un ajustement de la synchronisation temporel du faisceau variable et du faisceau à 1040 nm lorsque la longueur d'onde est modifiée.

Puisque le système de compensation interne permet de modifier la durée de l'impulsion, pour chaque longueur d'onde, il est possible d'ajuster la magnitude de la dérive de fréquences appliquée pour maximiser la synchronisation en fréquence des faisceaux pompe et Stokes. La figure 4.12(d) montre la quantité de verre nécessaire calculée (courbe bleue) pour obtenir une synchronisation en fréquence entre le faisceau ajustable et celui à 1040 nm. Elles ont été calculées en supposant une durée d'impulsion du faisceau à 1040 nm de 1,2 ps et en se basant sur les données mesurées de la durée de l'impulsion et de la bande spectrale du faisceau ajustable (voir les figures 4.12(b) et (c)). La quantité de verre nécessaire dans l'intervalle se situant entre 790 à 1000 nm (qui est l'intervalle de longueurs d'onde utile pour nos applications) varie entre  $\sim 55$  cm à  $\sim 75$  cm. Puisqu'il ne serait pas pratique de changer la quantité de verre du montage optique chaque fois que la longueur d'onde est modifiée, nous utilisons le système de compensation de la dérive de fréquences interne du laser. En utilisant les valeurs de la durée des impulsions présentées à la figure 4.12(c), il est possible de convertir la durée des impulsions pour les différentes positions du système de compensation en longueur de verre (SF11) effective ajoutée dans le trajet laser. Ceci nous permet de connaître les quantités effectives de verre maximale et minimale qu'il est possible de modifier par le système de compensation interne du laser. En implantant une quantité de verre initiale de 60 cm, les limites maximale et minimale d'ajustement par le

système de compensation sont présentées à la figure 4.12(d) par les courbes verte et rouge respectivement. Il est ainsi théoriquement possible de faire une synchronisation en fréquence du faisceau ajustable et du faisceau à 1040 nm pour l'intervalle de longueurs d'onde utilisé pour faire de la microscopie SRS.

Longueur d'onde (nm)	Intensité moyenne (mV)	Écart-type ( $\mu$ V)
750	14.05	189
800	14.33	144
900	6.57	119
1000	22.47	142

Tableau 4.1 – Stabilité de la puissance du signal de la somme de fréquences entre le faisceau ajustable et le faisceau à 1040 nm. La longueur d'onde présentée est celle du faisceau ajustable. L'intensité moyenne et l'écart-type sont mesurés à l'aide d'une photodiode et d'un oscilloscope en utilisant plus de 6000 mesures.

Un paramètre très important à considérer lorsque nous faisons de la microscopie SRS est la stabilité du chevauchement temporel entre les faisceaux pompe et Stokes. S'il y a une fluctuation de la synchronisation temporelle entre les deux impulsions, que ce soit par une modification de la longueur de la cavité laser ou tout autre facteur, l'intensité du signal peut varier en plus de, potentiellement, modifier la fréquence Raman sondée (rappelons que notre montage expérimental utilise le principe d'imagerie spectrale pour changer la fréquence Raman sondée). Également, si l'intensité des impulsions varie, ceci peut se traduire par une variation de l'intensité du signal SRS. Pour vérifier que ceci ne soit pas un problème, nous avons mesuré la variation de l'intensité de la somme de fréquences du faisceau ajustable et du faisceau à 1040 nm dans un cristal bêta-borate de baryum (BBO). Le signal de la somme de fréquences entre les deux faisceaux est acquis à l'aide d'une photodiode et est envoyé dans un oscilloscope. La valeur de l'intensité de l'impulsion est ainsi mesurée et, en utilisant plus de 6000 mesures, la valeur moyenne de l'intensité ainsi que l'écart-type sont calculés. Les résultats sont présentés au tableau 4.1. Nous remarquons ainsi que l'écart-type est d'environ 1 % de l'intensité du laser, ce qui devrait être convenable pour l'application actuelle.

Dans le but de savoir si le bruit provenant du laser risque d'affecter les mesures et dans le but de connaître la fréquence de modulation optimale du faisceau Stokes, le bruit en fonction

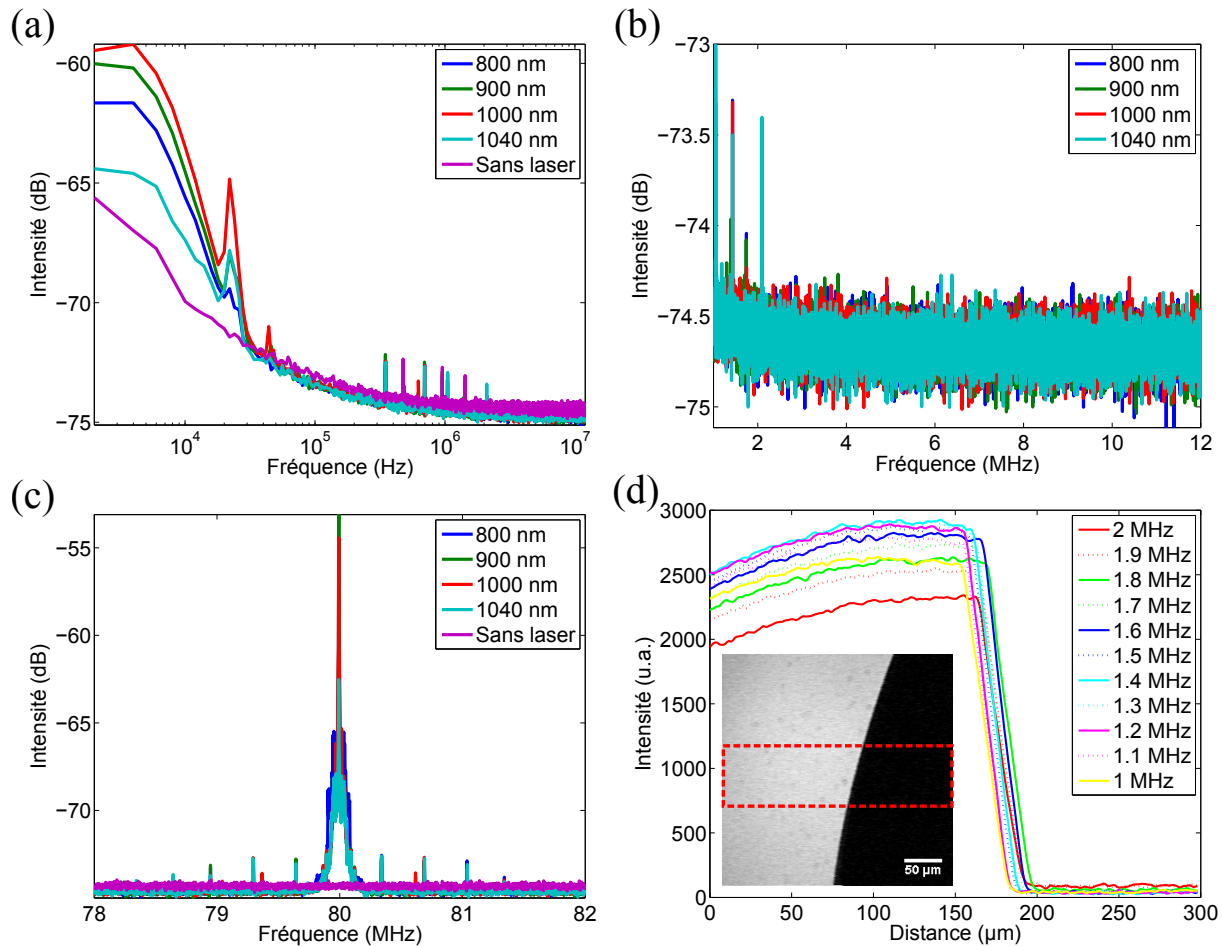


FIGURE 4.13 – Bruit mesuré du laser par le système de détection synchrone pour un intervalle de (a) 2 kHz à 12 MHz, (b) 1 MHz à 12 MHz et (c) 78 MHz à 82 MHz. (d) Intensité du signal SRS en fonction de la position latérale dans un échantillon à plusieurs fréquences de modulation où, à gauche, se trouve du méthanol et, à droite, se trouve une bulle d’air. La sous-figure montre une image type utilisée pour produire le graphique et le rectangle rouge montre la région de la figure utilisée pour produire la courbe de profil. La barre d’échelle est de 50  $\mu\text{m}$ .

de la fréquence fut mesuré. Les résultats sont présentés à la figure 4.13. Le signal fut acquis à l’aide d’une photodiode et envoyé dans l’amplificateur à détection synchrone. La fonction “sweep” de l’amplificateur à détection synchrone fut utilisée pour mesurer le bruit en fonction de la fréquence. Les graphiques de la figure 4.13 montrent le bruit pour différentes longueurs d’onde du faisceau ajustable, pour le faisceau à 1040 nm (en cyan) ainsi que lorsqu’aucun laser n’est envoyé sur la photodiode (en mauve pour (a) et (c)). La figure 4.13(a) montre qu’à de basses fréquences, le bruit est très élevé et semble atteindre des valeurs relativement constantes à des fréquences de l’ordre des MHz. La figure 4.13(b) montre le bruit dans un

intervalle moins large de 1 à 12 MHz. Nous remarquons que le bruit est constant entre 2 et 12 MHz et, entre 1 et 2 MHz, le bruit est beaucoup plus élevé pour certaines fréquences discrètes. La fréquence de modulation devrait donc, idéalement, être ajustée à des fréquences au-delà de 2 MHz. Toutefois, une cellule de Pockels est utilisée pour moduler l'amplitude du faisceau Stokes et peut difficilement utiliser une fréquence de modulation au-delà de 2 MHz. Puisque la cellule de Pockels risque d'être un facteur déterminant du ratio signal sur bruit du signal SRS et du choix de la fréquence de modulation, des images SRS de méthanol ont également été acquises à la fréquence de résonance ( $2835\text{ cm}^{-1}$ ) pour différentes fréquences de modulation de la cellule de Pockels, tel que le montre la figure 4.13(d). La sous-figure montre une image SRS typique qui a été acquise où, à la gauche, se trouve du méthanol et, à la droite, se trouve de l'air, qui ne produit aucun signal SRS. Le graphique est produit en moyennant l'intensité des pixels de chaque colonne inclus dans le rectangle rouge et est présenté en fonction de la position dans l'image allant de gauche à droite. Le graphique montre que la fréquence de modulation offrant le meilleur contraste est 1,4 MHz. Il est à noter que le contraste le moins élevé est à une fréquence de modulation de 2 MHz où la profondeur de modulation est probablement moindre à cause d'une fréquence de modulation trop élevée. La figure 4.13(c) montre le bruit autour de la fréquence de répétition du laser et n'indique aucun bruit anormal à cet intervalle de fréquence.

## 4.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le montage expérimental utilisant la dérive de fréquences utilisée pour l'imagerie d'échantillons géologiques présentés au chapitre 6. Les calculs théoriques et les simulations numériques prédisent qu'augmenter la durée des impulsions par dérive de fréquences à environ 1,2 et 1,5 ps permet d'obtenir une résolution spectrale satisfaisante. Une caractérisation du système laser est également présentée et montre qu'une longueur de verre initiale d'environ 60 cm devrait être installée dans le trajet du faisceau pompe et une fréquence de modulation de 1,4 MHz devrait être utilisée. Pour calibrer les

fréquences des spectres SRS, ils fut choisi d'utiliser de l'Octadécène dans la région CH et du 4-acetamidophenol dans la région des "fingerprints".

# Chapitre 5

## Microscopie “Stimulated Raman Scattering” par modulation de la polarisation (PM-SRS)

### 5.1 Introduction

Comme discuté au chapitre 2, un des avantages de la microscopie “Stimulated Raman Scattering” (SRS) est qu’il est exempt du signal non-résonant causé par le mélange à quatre ondes (FWM) qui peut diminuer le contraste d’imagerie de la microscopie “Coherent Anti-Stokes Raman Scattering” (CARS) [52, 139, 147, 211]. Toutefois, d’autres processus non-résonants peuvent créer un signal qui diminue le contraste d’imagerie de la microscopie SRS. En particulier, quatre types d’effet non-linéaire génèrent un signal indépendant des modes Raman [9]: l’absorption à deux photons (TPA), l’absorption des états excités (ESA), la lentille thermique (TL) et la modulation de phase croisée (XPM). Ces effets non-linéaires sont présentés schématiquement à la figure 5.1.

La TPA et l’ESA résultent de l’absorption de photons pompe et Stokes par le matériau (voir figures 5.1(a) et (b)). Ces processus se produisent seulement en présence des deux

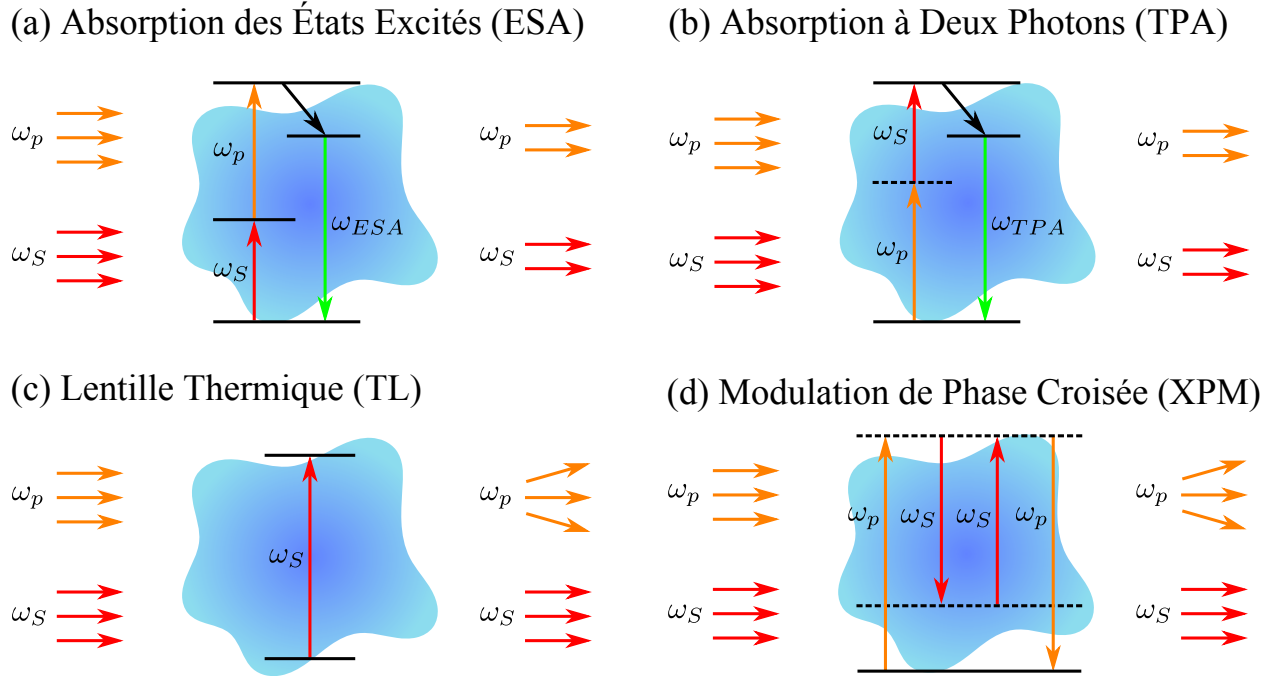


FIGURE 5.1 – Représentation des signaux non-résonant affectant le signal SRS dans une configuration SRL. (a) Processus d’absorption des états excités (ESA) où le milieu absorbe un photon Stokes, ce qui l’excite à un niveau réel et favorise l’absorption d’un photon pompe. Ce processus est perçu comme une perte par le système de détection (b) Processus d’absorption à deux photons (TPA) où un photon pompe et un photon Stokes sont absorbés par l’échantillon. Ce processus est perçu comme une perte par le système de détection. (c) Processus de lentille thermique (TL) où l’absorption à faible proportion de photons du faisceau Stokes moyennée sur plusieurs impulsions modifie l’indice de réfraction localement par effet thermique et change la divergence du faisceau pompe. (d) Processus de modulation de phase croisée (XPM), un processus non-linéaire instantané où la présence du faisceau Stokes modifie l’indice de réfraction par effet Kerr et change ainsi la divergence du faisceau pompe. Le changement de divergence peut être perçu comme un gain ou une perte.

faisceaux et créent une modulation de l’intensité du faisceau pompe à la même fréquence que la modulation de l’amplitude du faisceau Stokes. Ils sont ainsi perçus comme une perte par le système de détection [9, 57]. La TPA provient de l’absorption simultanée d’un photon pompe et d’un photon Stokes par l’échantillon. Toutefois, l’ESA est un processus qui implique des états intermédiaires réels [49]. Essentiellement, lorsque le faisceau Stokes interagit avec le milieu, il excite ce dernier à un état intermédiaire réel en absorbant un photon. Ceci favorise l’excitation du milieu à un niveau d’excitation plus élevé par l’absorption d’un photon pompe. Ainsi, ce processus est favorisé lorsque le faisceau Stokes est présent et crée une modulation de l’intensité du faisceau pompe lorsque le faisceau Stokes est modulé.



La TL, d'autre part, vient de l'absorption d'une faible partie de l'énergie du faisceau Stokes par le matériau et chauffe ce dernier, créant un effet de lentille en modifiant localement l'indice de réfraction [9, 135, 192]. Ce processus est moyenné sur plusieurs impulsions lasers et modifie la divergence du faisceau pompe (voir figure 5.1(c)), ce qui peut être interprété soit par un gain ou une perte en modifiant la proportion du faisceau pompe qui est collectée (voir figure 5.2). La XPM, quant à elle, est un effet instantané non-linéaire (voir figure 5.1(d)) dont la magnitude dépend de la susceptibilité non-linéaire du troisième ordre  $\chi^{(3)}$ . Pour cet effet, l'intensité du faisceau Stokes modifie l'indice de réfraction du faisceau pompe par effet Kerr [15, 47]. Ce changement de l'indice de réfraction modifie la divergence du faisceau pompe et peut être également perçu soit par un gain ou une perte par le système de détection (voir figure 5.2) en modifiant la proportion du faisceau pompe qui est collectée. La TPA peut être diminuée en utilisant des longueurs d'onde plus élevées [211] et les effets de TL et XPM peuvent être diminués en utilisant des objectifs de collection avec une ouverture numérique élevée [8, 52, 77, 211]. Toutefois, pour des raisons techniques, ces solutions ne sont parfois pas possibles et, à de basses puissances, les effets de TL et de XPM peuvent parfois être présents même en utilisant des objectifs à haute ouverture numérique.

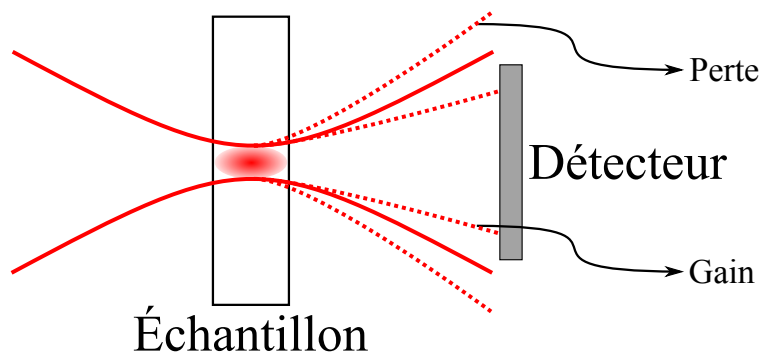


FIGURE 5.2 – Représentation de la modification de la géométrie de collection causée par la TL ou la XPM où une divergence plus prononcée du faisceau pompe est interprétée comme une perte de signal tandis qu'une divergence moins prononcée est représentée comme un gain par le système de détection.

Ce chapitre présente le développement d'une configuration du système optique permettant d'effectuer de la microscopie SRS en diminuant les effets de XPM qui peut diminuer le contraste spectroscopique. Ce système est basé sur la modulation de la polarisation du faisceau Stokes, tel que présenté à la figure 5.3(b). Ceci permet de diminuer le signal non-

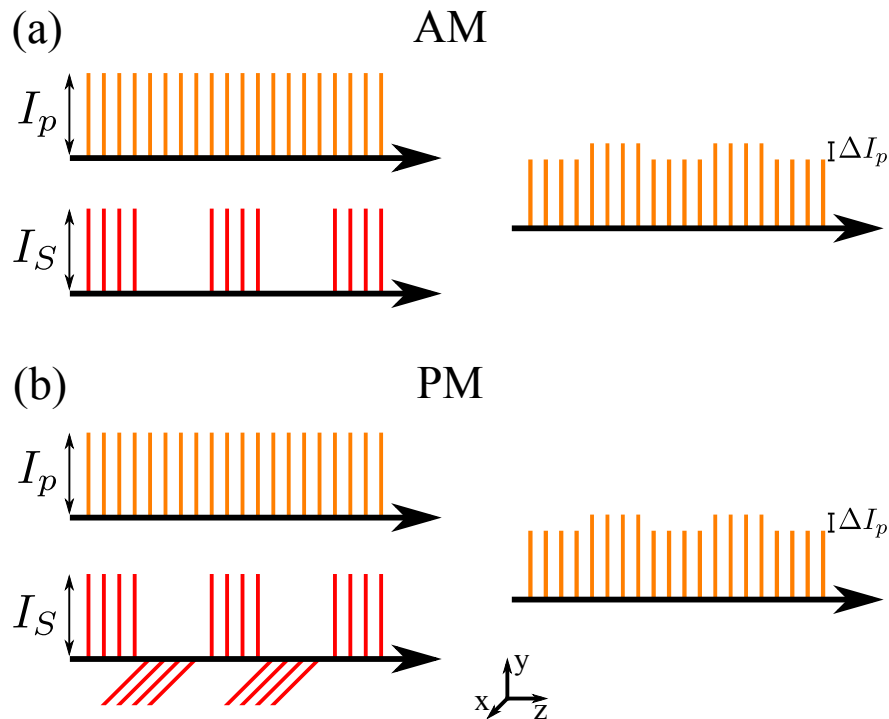


FIGURE 5.3 – Représentation des trains d’impulsions des faisceaux pompe et Stokes pour les différentes techniques de modulation utilisées pour obtenir le signal SRS. (a) Modulation de l’amplitude (AM) du faisceau Stokes et représentation de la modulation de l’intensité induite sur le faisceau pompe. (b) Modulation de la polarisation (PM) du faisceau Stokes et représentation de la modulation de l’intensité induite sur le faisceau pompe. Figure inspirée de [2].

résonant causé par les effets de XPM et TL sans diminuer le signal SRS. Le système développé permet de facilement changer le type de modulation utilisé, que ce soit une configuration de modulation de l’amplitude (AM) ou une modulation de la polarisation (PM), tel que présenté aux figures 5.3(a) et (b) respectivement.

Ce chapitre est divisé comme suit: la section 5.2 présente le montage expérimental utilisé pour les expériences. La section 5.3 présente une comparaison de la performance entre la microscopie CARS et SRS dans le contexte expérimental utilisé pour les expériences. La section 5.4 présente une analyse du signal non-résonant présent dans les échantillons observés. La section 5.6 présente une comparaison de la performance de la microscopie SRS pour les deux types de modulation, soit la modulation de l’amplitude et de la polarisation du faisceau Stokes et la section 5.7 présente la conclusion de notre étude.

## 5.2 Montage expérimental

Le montage expérimental est semblable à celui présenté au chapitre 4. La différence majeure est le système laser utilisé. En effet, ces expériences ont été effectuées sur une version plus ancienne du montage expérimental présenté à la section 4.3 et le montage expérimental fut construit sur un autre système laser. La détection du signal SRS peut être faite de deux manières. Soit détecter le gain d'intensité du faisceau Stokes (SRG: "Stimulated Raman Gain") ou détecter la perte d'intensité du faisceau pompe (SRL: "Stimulated Raman Loss"). Pour des raisons techniques, la configuration SRL sera utilisée. En effet, pour détecter le signal SRS, il est nécessaire d'induire une modulation sur un des faisceaux lasers pour détecter le changement d'intensité du signal de l'autre faisceau laser. Étant donné que nous utilisons une cellule de Pockels pour moduler le signal et que cette dernière est dotée d'un revêtement antiréfléchissant adapté aux longueurs d'onde du faisceau Stokes, c'est la configuration où l'intensité du faisceau Stokes est modulé qui est adopté (configuration SRL). Dans cette section, le système laser, le montage optique ainsi que l'installation du microscope seront présentés. Le système électronique ainsi que les logiciels utilisés pour l'acquisition et le traitement d'images ne sont pas présentés dans ce chapitre. En effet, leurs caractéristiques sont identiques à ceux du système de microscopie décrit au chapitre 4 et sont présentées aux sections 4.3.4 et 4.3.5.

### 5.2.1 Système Laser

Le laser utilisé pour ces expériences est un laser Titane:Saphire (Chameleon, Coherent, É.-U.) qui produit des impulsions ultrabrèves dont la durée est d'environ 200 fs. La longueur d'onde centrale est ajustée à 800 nm et une partie du faisceau est utilisée pour produire le faisceau Stokes. Cette portion du faisceau est envoyée dans un Oscillateur Paramétrique Optique (OPO) (OPO PP auto FAN, APE, Allemagne) et le signal de sortie, dont la longueur d'onde est centrée à 680 nm, est utilisé comme faisceau pompe. Les impulsions ont une durée d'environ 200 fs. Une dérive de fréquences est appliquée sur les deux impulsions en utilisant

des morceaux de verre à haut indice de réfraction (voir section 5.2.2 pour la théorie sur l'imagerie spectrale) pour obtenir des impulsions d'environ 1,3 ps pour le faisceau Stokes et 2,5 ps pour le faisceau pompe.

## 5.2.2 Montage Optique

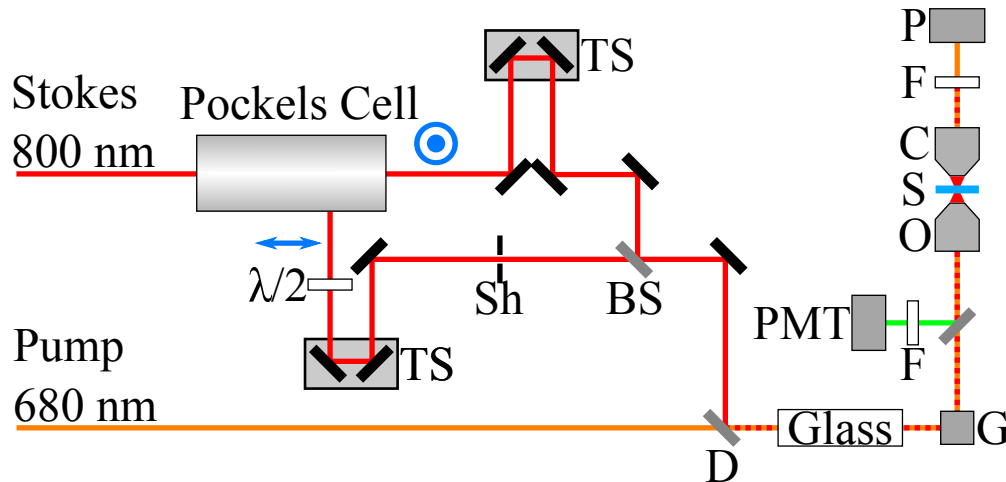


FIGURE 5.4 – Montage expérimental utilisé pour la microscopie CARS et SRS modulée en polarisation. Le faisceau Stokes est modulé à l'aide d'une cellule de Pockels et les faisceaux pompe et Stokes sont envoyés dans le microscope pour imager les échantillons par balayage récurrent à l'aide de miroirs galvanométriques. Une dérive de fréquences des faisceaux pompe et Stokes est induite à l'aide de blocs de verre (SF11). TS: Platine de translation,  $\lambda/2$ : lame demi-onde, Sh: Obturateur, BS: Séparateur de faisceau, D: Miroir dichroïque, G: Miroirs galvanométriques, F: filtre, O: Objectif, S: Échantillon, C: Objectif de collection, P: Photodiode, PMT: Tube photomultiplicateur. Figure inspirée de [2].

Le montage optique utilisé pour ces expériences est présenté à la figure 5.4. Étant donné que la configuration SRL est adoptée pour ces expériences, une modulation est appliquée sur le faisceau Stokes. Pour ce faire, nous utilisons une cellule de Pockels (350-160, Conoptics, É.-U.). Une fréquence de modulation de 2 MHz est utilisée. À la sortie de la cellule de Pockels, nous obtenons deux faisceaux lasers: un dont la polarisation verticale est parallèle à celle du faisceau pompe (que nous appelons *faisceau parallèle*) et un second dont la polarisation horizontale est perpendiculaire à celle du faisceau pompe (que nous appelons *faisceau perpendiculaire*). Une platine de translation est installée dans le trajet des deux faisceaux pour contrôler leur délai temporel. Un obturateur est placé dans le trajet du faisceau

perpendiculaire pour permettre de sélectionner la configuration de modulation, soit la modulation de l'amplitude (faisceau perpendiculaire bloqué) ou la modulation de la polarisation (faisceau perpendiculaire libre). La polarisation du faisceau perpendiculaire est également ajustée en utilisant une lame demi-onde (WPH05M-808, Thorlabs, É.-U.). Les deux faisceaux (parallèle et perpendiculaire) sont recombinaés en utilisant un séparateur de faisceau pour former le faisceau Stokes dont l'orientation de la polarisation change périodiquement de parallèle à perpendiculaire selon une fréquence de modulation de 2 MHz (voir figure 5.3(b)). Les faisceaux Stokes et pompe sont combinés à l'aide d'un miroir dichroïque. Une dérive de fréquences est appliquée sur les deux impulsions en utilisant du verre à haut indice de réfraction (SF11). Une longueur de 30 cm de verre est utilisée pour le faisceau Stokes et une longueur de 25 cm est utilisée pour le faisceau pompe. Les faisceaux sont ensuite envoyés dans un microscope inversé dont les caractéristiques sont présentées à la section suivante.

### 5.2.3 Microscope

Comme présenté à la figure 5.4, les faisceaux pompe et Stokes sont envoyés dans un microscope inversé (IX-71, Olympus, Japon). Des miroirs galvanométriques sont utilisés pour balayer les faisceaux sur l'échantillon pour créer une image par balayage récurrent. Les faisceaux sont focalisés sur l'échantillon à l'aide d'un objectif de microscope (UPlanSapo, 20x, NA 0,75, Olympus, Japon). Le faisceau pompe est collecté dans la direction forward à l'aide d'un objectif de microscope (LUMPlanFI/IR, 40x, NA 0,8w, Olympus, Japon). Le faisceau pompe est ensuite détecté par une photodiode (FDS10X10, Thorlabs, É.-U.). Devant la photodiode, deux filtres (BrightLight 750/SP, Semrock, É.-U. et HQ 680/60, Chroma, É.-U.) sont utilisés pour bloquer les longueurs d'onde autres que celles du faisceau pompe. Le signal CARS est collecté dans la direction backward. En effet, un miroir dichroïque dirige le signal CARS (Z660DCXR, Chroma, É.-U.) vers un tube photomultiplicateur (PMT). Un filtre (D605/55M, Chroma, É.-U.) s'assure que seulement le signal CARS atteint le PMT. Finalement, la position de l'échantillon est contrôlée à l'aide d'une platine de translation XYZ.

### 5.3 Comparaison de la microscopie CARS et SRS

Dans le but d'évaluer la performance de la microscopie SRS, nous avons décidé de la comparer avec la microscopie CARS, qui est une technique de microscopie utilisée dans le laboratoire depuis plusieurs années. Pour ce faire, nous avons utilisé des échantillons de diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d6) dilués dans de l'eau pure. Ces derniers possèdent deux modes de résonance distincts à  $\sim 2000 \text{ cm}^{-1}$  et  $\sim 2125 \text{ cm}^{-1}$  [117]. Les spectres SRS représentant les résultats sont présentés à la figure 5.5 (voir la section 4.1 pour plus de détails sur l'acquisition d'un spectre CARS et SRS par imagerie spectrale). La figure 5.5(a) montre le spectre SRS d'un échantillon de DMSO-d6 à une concentration de 10 %. Sur ce spectre, les deux pics correspondant aux modes de résonance du dMSO-d6 sont bien visibles et aucun signal non-résonant n'est visible. La figure 5.5(c) montre le spectre CARS pour un échantillon de DMSO-d6, également à une concentration de 10 %. Bien que le mode de résonance à  $2125 \text{ cm}^{-1}$  soit bien visible, le second mode n'est pas détectable à cause de la grande quantité de signal non-résonant présent. Il est à noter que le signal non-résonant forme une gaussienne et est donc dépendant de la fréquence. Ceci est dû au fait que les impulsions pompe et Stokes sont également des impulsions gaussiennes et, donc, en modifiant le délai temporel nécessaire pour effectuer le balayage spectral, il y a modification du chevauchement de l'intensité des impulsions. Ceci modifie l'intensité du signal non-résonant causé par le FWM. Il est possible de recouvrer le signal CARS à l'aide de techniques de récupération de la phase. Dans ce cas-ci, nous avons utilisé la transformée de Kramers-Kronig [107] pour obtenir le spectre CARS recouvert. La transformée de Kramers-Kronig permet essentiellement de trouver la relation entre la partie réelle et imaginaire d'une fonction et ainsi récupérer la partie résonante imaginaire du signal CARS. Le spectre CARS recouvert est présenté à la figure 5.5(e). Cette figure montre le mode distinctif du DMSO-d6 à  $2125 \text{ cm}^{-1}$ , mais le second mode à  $2000 \text{ cm}^{-1}$  n'est toujours pas distinguable.

La figure 5.5(d) montre le spectre CARS d'un échantillon de DMSO-d6 à une concentration de 1,25 %. De ce spectre, aucun mode de résonance du DMSO-d6 n'est visible puisque le signal non-résonant produit par le FWM est trop important par rapport au signal CARS.

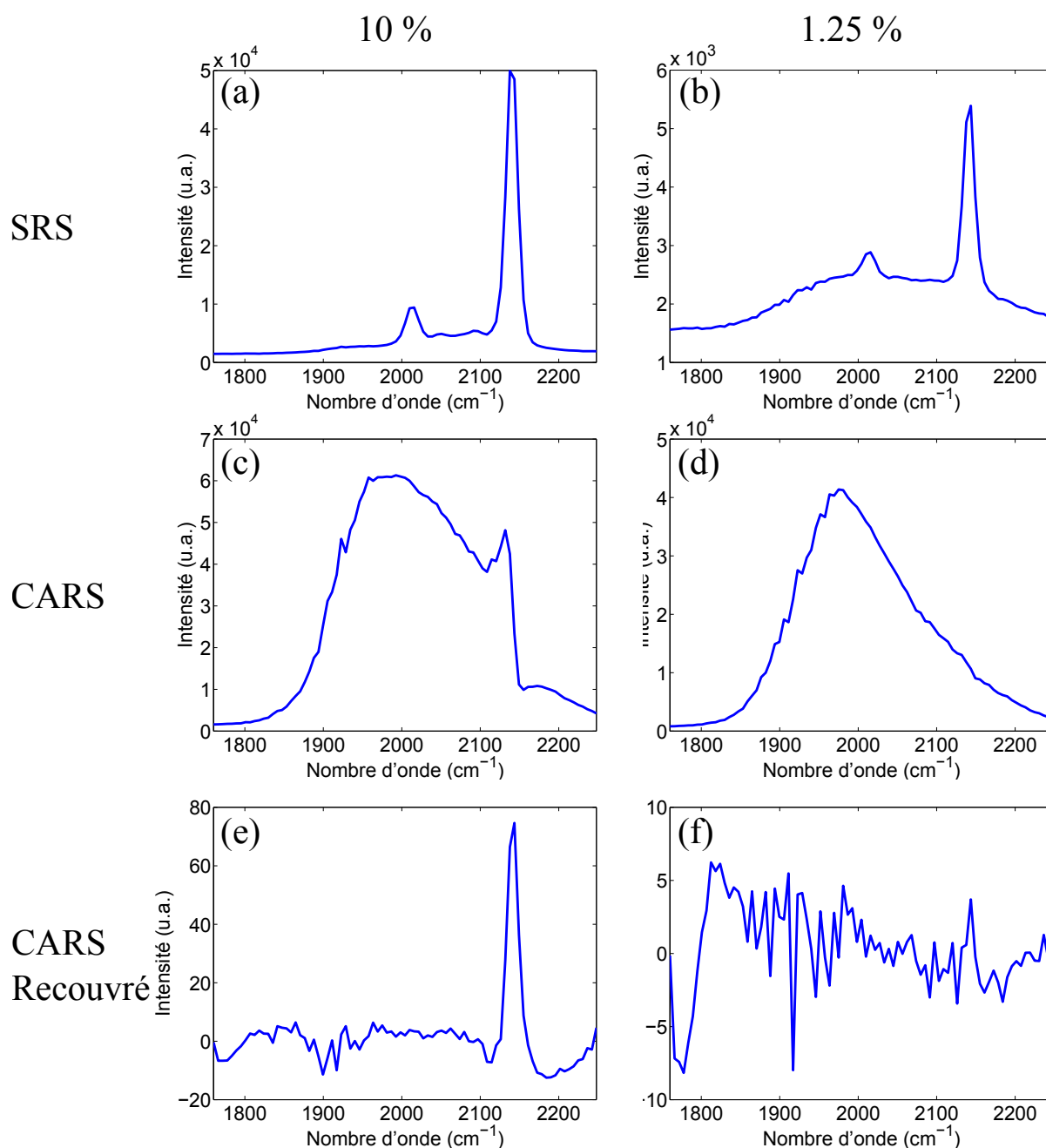


FIGURE 5.5 – Graphiques des spectres SRS et CARS de DMSO-d6 utilisant la microscopie CARS et SRS. (a-b) Spectres de microscopie SRS par modulation de l'amplitude (AM-SRS) pour des concentrations de DMSO-d6 de (a) 10 % et (b) 1,25 %. (c-d) Spectres de microscopie CARS pour des concentrations de DMSO-d6 de (c) 10 % et (d) 1,25 %. (e-f) Spectres recouverts des spectres CARS (c) et (d) pour des concentrations de DMSO-d6 de (e) 10 % et (f) 1,25 %. La puissance des faisceaux pompe et Stokes sont respectivement de  $I_p = 71$  mW et  $I_S = 146$  mW. Figure inspirée de [2].

Le spectre CARS recouvert à la figure 5.5(f) permet de distinguer un mode Raman à la fréquence de  $2125 \text{ cm}^{-1}$  mais celui-ci est peu visible par rapport au bruit ambiant. Toutefois, la figure 5.5(b) montre le spectre SRS du DMSO-d6 à la même concentration (1,25 %) et les modes Raman relatifs au DMSO-d6 sont toujours bien visibles. Ceci démontre que, dans les conditions actuelles, la microscopie SRS est plus sensible que la microscopie CARS et se retrouve moins affectée par le bruit non-résonant. Cependant, la figure 5.5(b), en plus de montrer les modes de résonance du DMSO-d6, montre également la présence d'un signal non-résonant qui, dans certaines conditions, peut potentiellement diminuer la sensibilité du signal SRS. Une analyse de ce signal non-résonant est présentée à la section 5.4.

## 5.4 Identification du signal non-résonant de la microscopie SRS

Comme présenté à la section 5.3, lorsque le spectre SRS d'un échantillon de DMSO-d6 à faible concentration est acquis, un signal non-résonant est également présent. Ce signal non-résonant peut provenir de quatre effets non-linéaires: la lentille thermique (TL), la modulation de phase croisée (XPM), l'absorption des états excités (ESA) et l'absorption à deux photons (TPA). La TL et la XPM proviennent tout deux d'un changement de l'indice de réfraction perçue par le faisceau pompe et induit par le faisceau Stokes tandis que la TPA et l'ESA proviennent de l'absorption par l'échantillon de photons pompe et Stokes. Ces effets sont expliqués plus en détailles à la section 5.1.

### 5.4.1 Absorption à deux photons

Dans le but de mieux comprendre ce qui cause le signal non-résonant visible à la figure 5.5(b), nous avons fait l'acquisition du spectre SRS de l'eau pure. Celui-ci ne présente aucun mode de résonance dans l'intervalle de fréquence observé. La figure 5.6(a) montre le spectre SRS provenant d'un échantillon de DMSO-d6 à une concentration de 0,6 % tandis que



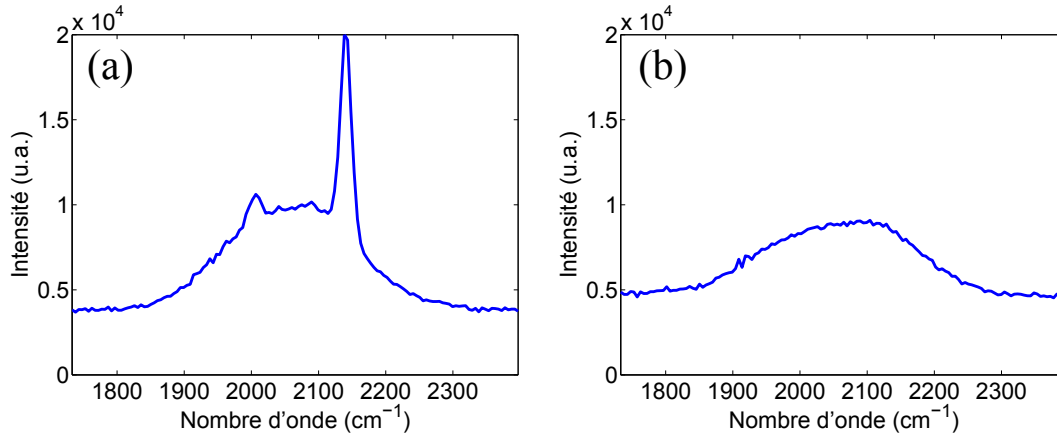


FIGURE 5.6 – (a) Spectre AM-SRS d’un échantillon de DMSO-d6 à une concentration de 0,6 % où un signal non-résonant est visible en plus des modes Raman spécifiques au DMSO-d6. (b) Spectre AM-SRS de l’eau pure qui révèle la présence d’un signal non-résonant similaire. La puissance des faisceaux pompe et Stokes sont respectivement de  $I_p = 56$  mW et  $I_S = 151$  mW. Figure modifiée de [2].

la figure 5.6(b) montre le spectre SRS de l’eau pure. Dans les deux cas, le signal non-résonant est visible. Il est connu qu’il n’y a pas de modes de résonance Raman ou d’absorption de photons dans l’eau pure pour les longueurs d’onde utilisées. Nous pouvons donc éliminer la TPA des sources possibles de ce signal non-résonant. Le signal non-résonant est donc causé soit par l’ESA, la TL ou par la XPM.

### 5.4.2 Absorption des états excités

Le processus d’ESA peut être détecté sur une échelle de temps de plusieurs picosecondes puisque les molécules excitées par le faisceau Stokes prennent un certain temps pour retourner à l’état fondamental. Ainsi, la forme du signal non-résonant causée par l’ESA est asymétrique puisque, lorsque le faisceau pompe interagit avec le milieu avant le faisceau Stokes, aucun signal causé par l’ESA n’est présent. Toutefois, lorsque le faisceau Stokes interagit avec le milieu avant le faisceau pompe, un signal causé par l’ESA peut être présent et la force du signal décroît graduellement avec l’augmentation du délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes (voir figure 5.7). Le signal de l’ESA peut être visible même lorsque les faisceaux pompe et Stokes sont séparés de quelques picosecondes. Or, la figure 5.6 montre une forme

symétrique du signal non-résonant qui affecte notre échantillon. Il est ainsi très improbable que nous nous trouvions en présence de signal causé par l'ESA. Le signal non-résonant est donc causé soit par la TL ou par la XPM.

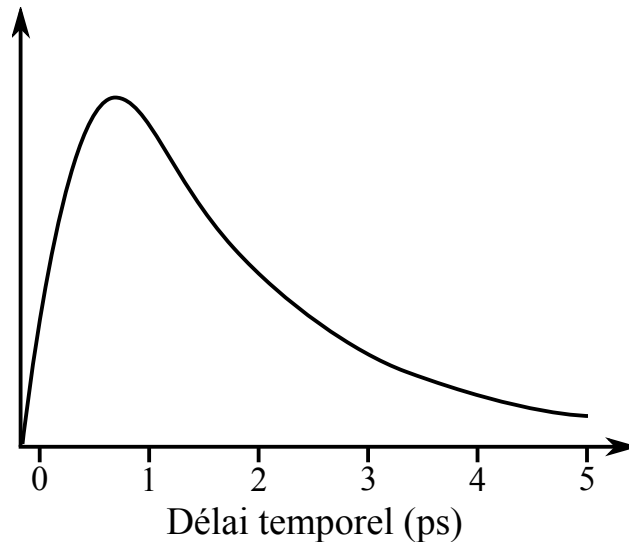


FIGURE 5.7 – Représentation graphique de la décroissance du signal causée par l'ESA en fonction du délai temporel entre les impulsions pompe et Stokes.

### 5.4.3 Lentille thermique

Nous pouvons noter sur la figure 5.6 que l'intensité du signal non-résonant dépend du délai temporel entre les impulsions pompe et Stokes puisque l'acquisition des spectres SRS par imagerie spectrale s'effectue en faisant varier ce délai temporel. Toutefois, l'effet de TL se produit sur une échelle de temps correspondant à plusieurs impulsions lasers et le changement de délai temporel de quelques picosecondes entre les impulsions pompe et Stokes ne devrait pas modifier aussi subitement l'intensité du signal non-résonant. En effet, le temps de dissipation de la chaleur induite par le faisceau Stokes devrait être de l'ordre de la nanoseconde et non de la picoseconde [110, 135]. Ainsi, il est improbable que le signal non-résonant présent dans ces échantillons soit causé par la lentille thermique. Il apparaît donc que le signal non-résonant est causé par l'effet de la XPM.

### 5.4.4 Susceptibilité non-linéaire et ratio de dépolarisation

Avant de discuter plus en détail du signal non-résonant causé par la XPM, il est approprié de présenter brièvement certaines notions concernant la susceptibilité non-linéaire du troisième ordre pour permettre une explication plus claire de l'élimination du signal non-résonant par la modulation de la polarisation.

L'indice de réfraction d'un matériau peut être représenté selon l'équation suivante [15]:

$$n = n_0 + n_2 I \quad (5.1)$$

où  $n_0$  est l'indice de réfraction lorsque le champ électrique est faible,  $n_2$  est l'indice de réfraction non-linéaire et  $I$  est l'intensité du champ électrique.  $n_0$  peut être représenté par:

$$n_0 = \sqrt{1 + \chi^{(1)}} \quad (5.2)$$

où  $\chi^{(1)}$  est la susceptibilité linéaire tandis que  $n_2$  peut être représenté par:

$$n_2 = \frac{3}{4n_0^2 \varepsilon_0 c} \chi^{(3)}. \quad (5.3)$$

où  $\varepsilon_0$  est la permittivité du vide,  $c$  est la vitesse de la lumière et  $\chi^{(3)}$  est la susceptibilité non-linéaire du troisième ordre. Lorsque l'intensité du champ électrique d'un faisceau laser est faible, l'indice de réfraction non-linéaire,  $n_2$ , est négligeable. Or, dans le cas présent, l'amplitude des champs électriques est suffisamment élevée pour qu'ils aient un impact sur la valeur de l'indice de réfraction. Ainsi, la variation de l'indice de réfraction en présence d'un champ électrique intense est donnée par:

$$\delta n = 3 \frac{\chi^{(3)} I}{n_0^2 \varepsilon_0 c}. \quad (5.4)$$

La susceptibilité non-linéaire du troisième ordre  $\chi^{(3)}$  est représentée par un tenseur dont la valeur est dépendante de la polarisation des différents champs impliqués selon:

$$\chi^{(3)} = \chi_{IJKL}^{(3)}(-\omega_4; \omega_1, \omega_2, \omega_3) \quad (5.5)$$

où  $I J K L$  sont les coordonnées cartésiennes  $x, y$  et  $z$  de la polarisation des champs électriques  $\omega_4, \omega_1, \omega_2$  et  $\omega_3$  respectivement. Ce tenseur possède 81 éléments mais certaines règles de symétrie permettent d'éliminer certaines d'entre elles. En effet, pour un milieu isotropique, le tenseur possède 21 éléments non nuls dont seulement trois sont indépendants. Les différents éléments du tenseur peuvent être reliés selon l'équation suivante:

$$\chi_{xxxx}^{(3)} = \chi_{xxyy}^{(3)} + \chi_{xyyx}^{(3)} + \chi_{xyxy}^{(3)} \quad (5.6)$$

Selon la convention de Butcher et Cotter [21], les différentes fréquences impliquées dans la génération du signal SRS ainsi que de l'effet de la XPM sont données par:

$$\chi_{SRS}^{(3)} = \chi_{IJKL}^{(3)}(-\omega_p; \omega_S, -\omega_S, \omega_p) \quad (5.7)$$

$$\chi_{XPM}^{(3)} = \chi_{IJKL}^{(3)}(-\omega_p; \omega_S, -\omega_S, \omega_p). \quad (5.8)$$

Ainsi, seulement deux tenseurs sont impliqués dans la génération des signaux SRS et XPM, soit les tenseurs  $\chi_{xxxx}^{(3)}$  et  $\chi_{xyyx}^{(3)}$ . Le tenseur  $\chi_{xxxx}^{(3)}$  implique que la polarisation des faisceaux pompe et Stokes soit parallèle l'un par rapport à l'autre tandis que le tenseur  $\chi_{xyyx}^{(3)}$  implique que la polarisation des faisceaux pompe et Stokes soit perpendiculaire l'un par rapport à l'autre. Une quantité qui a été introduite dans la littérature est le ratio de dépolarisation  $\rho$  [137, 138] et est définie comme le ratio entre les tenseurs de la susceptibilité non-linéaire lorsque la polarisation entre les faisceaux pompe et Stokes est perpendiculaire et parallèle, c'est à dire:

$$\rho = \frac{\chi_{xyyx}^{(3)}}{\chi_{xxxx}^{(3)}}. \quad (5.9)$$

Le ratio de dépolarisation mesure le degré de dépolarisation d'un champ électrique diffusé par rapport au champ électrique incident lorsqu'une molécule est excitée. La valeur du ratio de dépolarisation varie entre 0 et 0,75<sup>1</sup>. Lorsqu'une molécule est hautement symétrique,  $\rho = 0$ , tandis que lorsque la molécule est totalement dépolarisée à la fréquence excitée,  $\rho = 0,75$  [103, 109]. Il est à noter que, pour une molécule donnée, lorsque la fréquence excitée est loin d'une fréquence de résonance, la symétrie de Kleinmann s'applique de telle sorte que:

$$\chi_{xyyx}^{(3)} = \chi_{xyxy}^{(3)} = \chi_{xxyy}^{(3)} = \chi_{xxxx}^{(3)}/3 \quad (5.10)$$

$$\rho = 1/3. \quad (5.11)$$

### 5.4.5 Modulation de phase croisée

Comme mentionné précédemment, l'intensité du signal non-résonant causé par la XPM est proportionnelle au changement de l'indice de réfraction perçu par le faisceau pompe. Celui-ci est donné par [9]:

$$I_{XPM} \propto \delta n_p^a = 3 \frac{\chi_{XPM}^{(3)} I_S^a}{n_p n_{S \in C}} \quad (5.12)$$

où l'indice  $a = ||, \perp$  représente l'orientation de la polarisation du faisceau Stokes par rapport à celle du faisceau pompe. Les deux paramètres variables dans l'équation 5.12 sont  $\chi_{XPM}^{(3)}$  et  $I_S^a$ . Pour la présente discussion, nous supposons que le signal non-résonant causé par la XPM provient du solvant, soit de l'eau pure. Ce dernier, à la fréquence Raman observée, possède un ratio de dépolarisation d'environ 0,6 [41, 197]. De plus, les modes Raman du DMSO-d6 aux fréquences observées (2000 et 2125  $\text{cm}^{-1}$ ) ont un ratio de dépolarisation de près de zéro [177]. Dans le but de diminuer le signal non-résonant causé par la XPM, nous

---

1. Il existe une convention plus ancienne du ratio de dépolarisation où les valeurs se situent entre 0 et 0,87. Cette convention provient de la mesure du ratio de dépolarisation en utilisant la lumière naturelle. De nos jours, le ratio de dépolarisation est mesuré en utilisant des sources lasers et utilise la convention présentée dans cette thèse. Il se peut toutefois que l'ancienne convention soit utilisée dans de vieux articles ou textes de référence.

décidons d'adopter une technique de modulation basée sur la modulation de la polarisation plutôt que la modulation de l'amplitude, ce qui est expliqué à la section suivante.

## 5.5 Modulation de la polarisation

Comme il a été mentionné à la section 5.4.4, les modes de résonances Raman ont un ratio de dépolarisation qui dépend de la valeur de  $\chi_{xyyx}^{(3)}$  et  $\chi_{xxxx}^{(3)}$  tel que présenté à l'équation 5.9. Dans le cas de plusieurs modes Raman, le ratio de dépolarisation a une valeur près de zéro ( $\rho \approx 0$ ). Ceci signifie que le signal SRS est maximum lorsque la polarisation des faisceaux pompe et Stokes est parallèle et le que signal SRS est presque nul lorsque la polarisation des faisceaux est perpendiculaire. Toutefois, le ratio de dépolarisation du signal non-résonant causé par la XPM n'est pas égal à zéro ( $\rho \neq 0$ ). Ainsi, lorsque la polarisation relative entre les faisceaux pompe et Stokes est perpendiculaire, l'intensité du signal généré n'est pas égale à zéro. C'est sur ce principe que se base la modulation de la polarisation pour réduire le signal non-résonant.

En effet, la modulation de la polarisation consiste à faire pivoter périodiquement de 90 degrés la polarisation du faisceau Stokes (voir figure 5.3(b)). Ce faisant, le transfert de modulation relatif aux modes Raman demeure inchangé puisque lorsque la polarisation est parallèle, l'intensité du signal SRS est maximum et elle est nulle lorsque la polarisation est perpendiculaire. Or, dans le cas de la modulation de phase croisée, il y a diminution de l'intensité du signal (c'est-à-dire une diminution de l'amplitude de la modulation du signal de XPM) puisqu'il y a génération de signal non-résonant dans les deux états de polarisation. Ainsi, dans la configuration de la modulation de l'amplitude (AM), l'intensité du signal SRS et de XPM est donnée par:

$$I_{AM}^{SRS} \propto \chi_{xxxx,R}^{(3)} I_p I_S^{\parallel} \quad (5.13)$$

$$I_{AM}^{XPM} \propto \chi_{xxxx,XPM}^{(3)} I_S^{\parallel} \quad (5.14)$$

où  $I_S^{\parallel}$  est l'intensité du faisceau Stokes dont la polarisation est parallèle à celle du faisceau pompe. Dans la configuration de la modulation de la polarisation (PM), l'intensité du signal SRS et de XPM est donnée par:

$$I_{PM}^{SRS} \propto \chi_{xxxx,R}^{(3)} I_p I_S^{\parallel} - \chi_{xyyx,R}^{(3)} I_p I_S^{\perp} \quad (5.15)$$

$$I_{PM}^{XPM} \propto \chi_{xxxx,XPM}^{(3)} I_S^{\parallel} - \chi_{xyyx,XPM}^{(3)} I_S^{\perp} \quad (5.16)$$

où  $I_S^{\perp}$  est l'intensité du faisceau Stokes dont la polarisation est perpendiculaire à celle du faisceau pompe.

Par conséquent, les ratios de l'intensité du signal SRS et de XPM entre la modulation de la polarisation et de l'amplitude sont donnés par:

$$\Delta I^{SRS} = \frac{I_{PM}^{SRS}}{I_{AM}^{SRS}} = \frac{\chi_{xxxx,R}^{(3)} I_S^{\parallel} - \chi_{xyyx,R}^{(3)} I_S^{\perp}}{\chi_{xxxx,R}^{(3)} I_S^{\parallel}} = \frac{I_S^{\parallel} - \rho_R I_S^{\perp}}{I_S^{\parallel}} \quad (5.17)$$

$$\Delta I^{XPM} = \frac{I_{PM}^{XPM}}{I_{AM}^{XPM}} = \frac{\chi_{xxxx,XPM}^{(3)} I_S^{\parallel} - \chi_{xyyx,XPM}^{(3)} I_S^{\perp}}{\chi_{xxxx,XPM}^{(3)} I_S^{\parallel}} = \frac{I_S^{\parallel} - \rho_{XPM} I_S^{\perp}}{I_S^{\parallel}}. \quad (5.18)$$

Dans le cas du signal SRS, en présence d'un mode Raman polarisé où  $\rho = 0$ , le ratio de l'intensité ( $\Delta I^{SRS}$ ) est égal à 1. Toutefois, dans le cas du signal de XPM, le ratio de dépolarisation n'est pas nul et le ratio de l'intensité est par conséquent plus petit que 1. La valeur du ratio d'intensité ( $\Delta I^{XPM}$ ) dépend de deux facteurs: le ratio de dépolarisation du milieu produisant le signal de XPM ( $\rho_{XPM}$ ) et l'intensité relative entre les faisceaux Stokes parallèle et perpendiculaire ( $I_S^{\parallel}$  et  $I_S^{\perp}$ ). Le ratio de dépolarisation ( $\rho_{XPM}$ ) dépend de l'échantillon observé et est donc invariable pour un échantillon donné. Pour faire disparaître complètement le signal non-résonant causé par la XPM, il est nécessaire que le numérateur de l'équation 5.18 soit égal à zéro. Par conséquent, le ratio de l'intensité entre les faisceaux Stokes parallèle ( $I_S^{\parallel}$ ) et perpendiculaire ( $I_S^{\perp}$ ) doit être égal à:

$$\frac{I_S^{\parallel}}{I_S^{\perp}} = \rho_{XPM}. \quad (5.19)$$

Dans le présent cas, le ratio de dépolarisation de l'eau dans l'intervalle de fréquences Raman observé est d'environ 0,6 [41, 197]. Ainsi, pour une intensité du faisceau parallèle défini, l'intensité du faisceau Stokes perpendiculaire doit être 1,67 fois plus élevée. Il est à noter que, dans l'éventualité où le ratio de dépolarisation est inconnu, il est possible de le déterminer en mesurant l'intensité du signal de XPM dans les configurations AM et PM lorsque la puissance des deux faisceaux Stokes ( $I_S^{\parallel}$  et  $I_S^{\perp}$ ) est ajustée à des valeurs égales. De ces mesures, le ratio de dépolarisation peut être déterminé avec l'équation suivante:

$$\rho_{XPM} = 1 - \frac{I_{PM}^{XPM}}{I_{AM}^{XPM}} = 1 - \Delta I^{XPM}. \quad (5.20)$$

Dans le but de confirmer que le signal non-résonant observé lors de l'acquisition de spectres SRS provient bien du solvant (eau pure), nous faisons l'acquisition des spectres SRS dans les configurations AM et PM dans le cas où l'intensité des faisceaux Stokes (parallèle et perpendiculaire) est égale. Les spectres SRS correspondants sont présentés à la figure 5.8. Ainsi, dans la configuration AM, l'intensité maximale du signal de XPM est d'environ 4800 comptes tandis que l'intensité maximale du signal de XPM dans la configuration PM est d'environ 2100 comptes. Ainsi, le ratio de dépolarisation mesuré est de:

$$\rho_{XPM} = 1 - \frac{2100}{4800} = 0,56 \quad (5.21)$$

ce qui est près de la valeur théorique située à 0,6.

## 5.6 Comparaison de la microscopie SRS par modulation de l'amplitude (AM) et polarisation (PM)

### 5.6.1 Capacité d'enregistrement de spectres Raman

Dans le but de tester l'efficacité de la configuration PM à éliminer le signal de XPM tout en permettant l'acquisition des modes Raman, nous avons fait l'acquisition de spectres SRS



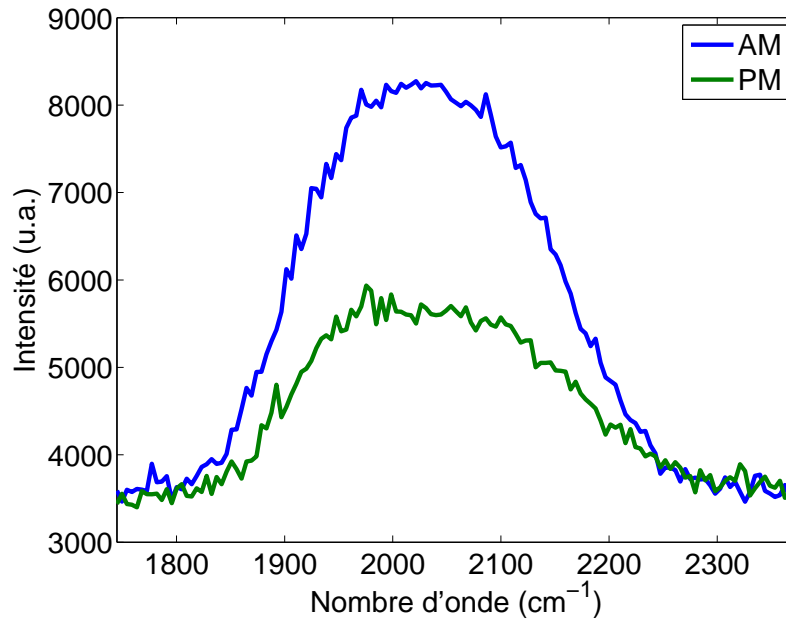


FIGURE 5.8 – Spectre SRS de l'eau pure en utilisant les configurations AM et PM. La puissance des faisceaux pompe et Stokes sont les suivantes:  $I_p = 62$  mW et  $I_S^{\parallel} = I_S^{\perp} = 152$  mW.

en utilisant les configurations AM et PM, tels que présentés à la figure 5.9. Pour ce faire, les spectres SRS d'une solution de DMSO-d6 à une concentration de 0,6 % ont été acquis en utilisant la configuration AM (voir figure 5.9(a)) et la configuration PM (voir figure 5.9(b)). Nous voyons ainsi qu'utiliser la configuration PM permet d'éliminer le signal non-résonant causé par la XPM sans affecter le signal Raman résonant. Il est à noter que le ratio de puissance entre les faisceaux Stokes parallèle ( $I_S^{\parallel}$ ) et perpendiculaire ( $I_S^{\perp}$ ) devrait être de 0,6. Toutefois, expérimentalement, le ratio de puissance permettant d'éliminer totalement le signal de XPM est de 0,545. Ceci peut être dû à certaines optiques présentes dans le microscope dont la réflectivité ou la transmissibilité est dépendante de la polarisation du faisceau laser, atténuant l'intensité d'un des faisceaux Stokes plus que l'autre. Ceci peut également expliquer la différence entre le ratio de dépolarisation théorique de l'eau et celui mesuré à la section 5.5.

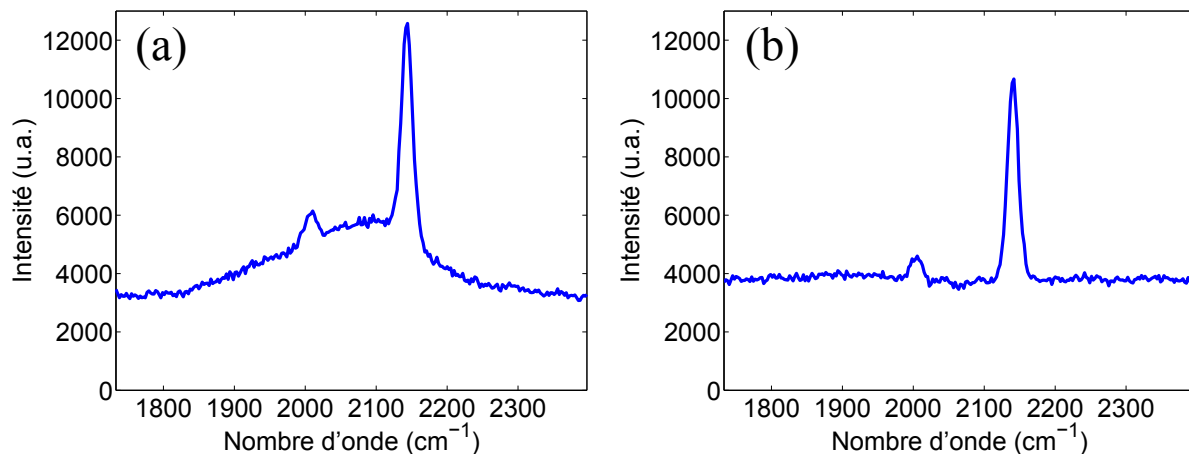


FIGURE 5.9 – Spectre SRS d’une solution de DMSO-d6 à une concentration de 0,6 % utilisant la configuration (a) AM-SRS et (b) PM-SRS. La puissance des faisceaux pompe et Stokes sont respectivement de  $I_p = 61$  mW,  $I_S^{\parallel} = 95$  mW et  $I_S^{\perp} = 174$  mW. Figure modifiée de [2].

### 5.6.2 Dépendance de la concentration sur l’intensité du signal

Dans le but de caractériser la méthode PM-SRS, nous avons effectué des mesures à diverses concentrations de DMSO-d6 dans le but de confirmer la linéarité du signal SRS en fonction de la concentration ainsi que sa limite de détection. Le graphique présentant l’intensité du signal SRS en fonction de la concentration de DMSO-d6 est présenté à la figure 5.10. Pour réaliser cette expérience, plusieurs échantillons de DMSO-d6 dilués dans de l’eau pure ont été préparés et la concentration de DMSO-d6 se situe entre 10 % et 0,039 %. Les conditions expérimentales sont les mêmes pour chaque mesure. L’intensité du signal est calculée en mesurant l’intensité du signal SRS au maximum de l’intensité du mode de résonance Raman à  $2150\text{ cm}^{-1}$  ainsi qu’à un décalage de  $\sim 50\text{ cm}^{-1}$  de part et d’autre de ce mode. Les mesures acquises de part et d’autre du mode Raman ont pour but d’obtenir une mesure du bruit de fond et du signal de XPM à la fréquence Raman. La moyenne de l’intensité de ces deux mesures en périphérie du mode Raman est ensuite soustraite de la mesure de l’intensité du mode Raman. Nous utilisons deux mesures de bruit, une mesure de chaque côté du mode Raman, puisque le signal non-résonant est dépendant de la fréquence dans le cas de la configuration AM (ou plus précisément, du chevauchement de l’intensité des impulsions pompe et Stokes). En utilisant ces deux mesures de bruit, il est possible d’obtenir

une approximation relativement bonne de la somme du signal non-résonant et du bruit de fond à la fréquence du mode Raman.

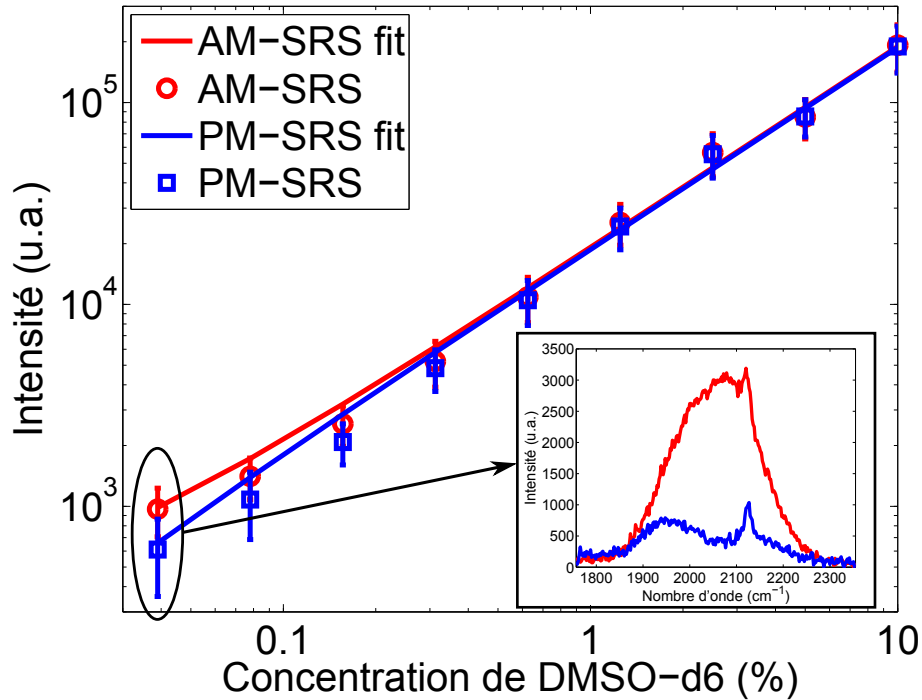


FIGURE 5.10 – Graphique log log du signal AM-SRS et PM-SRS en fonction de la concentration de DMSO-d6, se situant entre 0,039 % et 10 %. La puissance des faisceaux pompe et Stokes est respectivement de  $I_p = 64$  mW,  $I_S^{\parallel} = 106$  mW et  $I_S^{\perp} = 178$  mW. La sous-figure montre le spectre SRS brut du DMSO-d6 à une concentration de 0,039 % utilisant les configurations AM (rouge) et PM (bleu). Figure modifiée de [2].

Les résultats montrent une dépendance linéaire en fonction de la concentration de DMSO-d6, comme le prédit la théorie. Il est à noter que le graphique de la figure 5.10 est affiché selon une échelle double logarithmique (échelle logarithmique des axes  $x$  et  $y$ ) et l'apparente courbure des droites de tendance à de basses concentrations est causée par le fait que l'origine de ces droites n'est pas zéro et n'apparaissent donc pas comme une droite à une échelle logarithmique. De plus les mesures dans les configurations AM et PM à basses concentrations semblent diverger beaucoup plus qu'à hautes concentrations. Ceci est probablement causé par un ratio signal sur bruit beaucoup plus bas à de faibles concentrations et par la dominance du bruit causé par la XPM dans la configuration AM. À de faibles concentrations, le ratio signal sur bruit est près de 1 et le bruit électronique joue donc un rôle important sur les mesures

de l'intensité du signal SRS. L'encart présenté à la figure 5.10 montre les spectres Raman du DMSO-d6 à une concentration de 0,039 % pour les configurations AM (rouge) et PM (bleu). Ces spectres montrent que le mode Raman principal en utilisant la configuration PM est plus facilement visible qu'en utilisant la configuration AM, où l'intensité du mode Raman est à peine plus élevée que celui du signal de XPM. La variation du signal non-résonant visible sur le spectre SRS acquis avec la configuration PM est probablement causée par une faible variation du ratio de dépolarisation de l'eau pure utilisé comme solvant.

### 5.6.3 Imagerie de structures

En vue de démontrer la faisabilité de l'utilisation de la configuration PM pour l'imagerie hyperspectrale, nous avons fait l'acquisition d'images en utilisant les configurations AM et PM. Les images sont présentées à la figure 5.11 où la figure 5.11(a) montre la configuration AM et la figure 5.11(b) montre la configuration PM. Les images sont composées de gouttelettes de DMSO-d6 diluées dans de l'eau pure à une concentration de 0,3 % et dont le milieu entourant les gouttelettes est composé d'octadécane, qui est insoluble dans l'eau. L'octadécane ne produit également aucun signal Raman dans l'intervalle de fréquence analysé.

À première vue, nous remarquons que la configuration PM offre un meilleur contraste que la configuration AM, où le contraste entre les gouttelettes et le reste de l'image est plus faible. La figure 5.12 montre le profil d'intensité des gouttelettes indiquées par les flèches bleues aux figures 5.11(a) et (b). Ce graphique montre que le bruit de fond (qui peut être causé par le bruit électronique ou la XPM) est plus faible dans la configuration PM, résultant en un contraste plus élevé, bien que l'intensité du signal SRS de la gouttelette soit comparable en utilisant les deux configurations.

Également, les figures 5.11(c) et (d) montre les spectres SRS des gouttelettes indiquées par les flèches rouges aux figures 5.11(a) et (b) en utilisant les configurations AM et PM respectivement. La figure montre une nette amélioration de la visibilité du mode de résonance

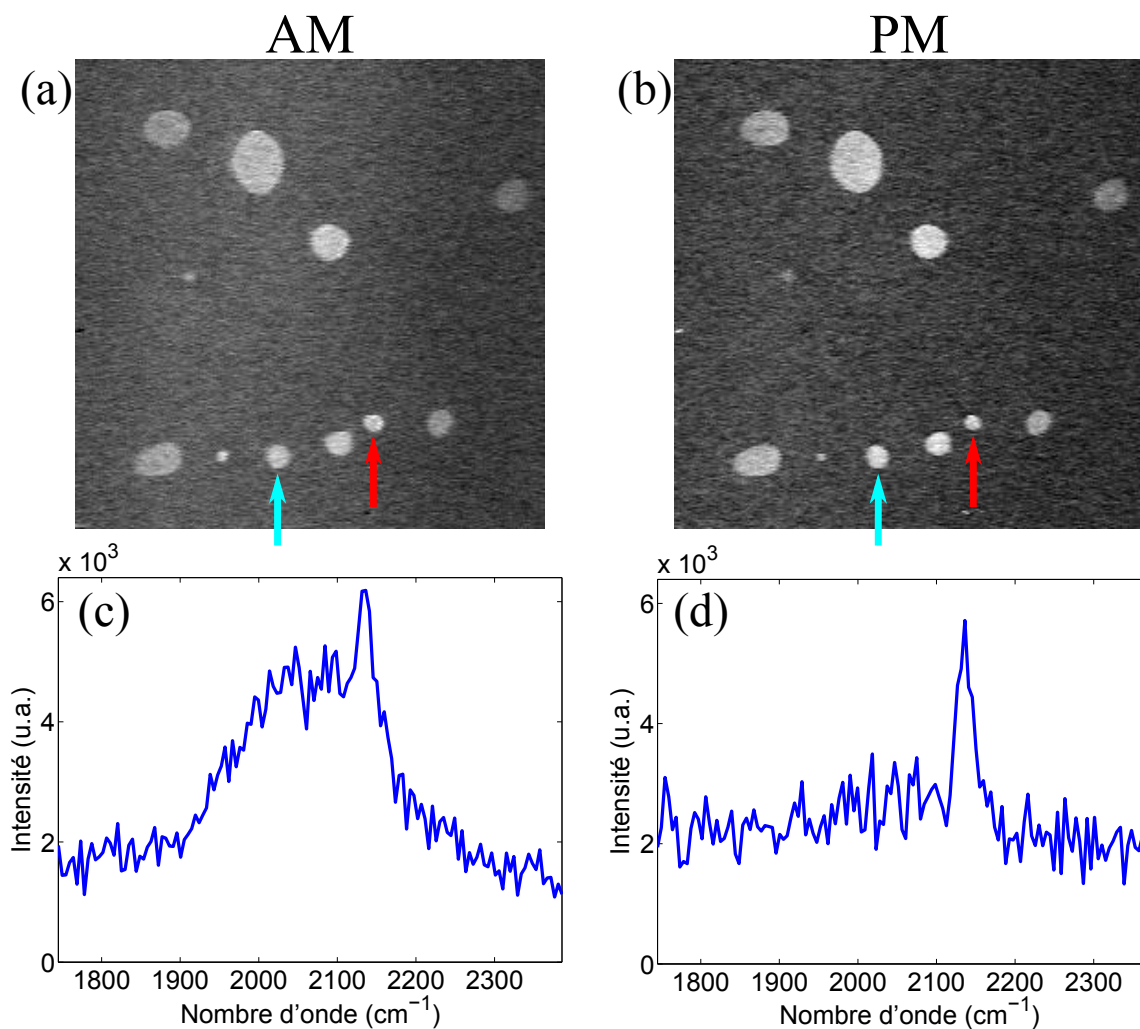


FIGURE 5.11 – Imagerie SRS hyperspectrale à très basse concentration. Image hyperspectrale de gouttelettes de DMSO-d6 diluées dans l'eau pure à une concentration de 0,3 % dans un milieu d'octadécane en utilisant la microscopie (a) AM-SRS et (b) PM-SRS. Les spectres SRS associés aux gouttelettes indiquées par les flèches rouges sont présentés aux figures (c) et (d) pour la microscopie AM-SRS et PM-SRS respectivement. Les flèches bleues dénotent les gouttelettes utilisées pour le graphique du profil d'intensité présenté à la figure 5.12. La puissance des faisceaux pompe et Stokes sont, respectivement:  $I_p = 57$  mW,  $I_S^{\parallel} = 110$  mW et  $I_S^{\perp} = 176$  mW. La taille des images est de  $270 \times 270$   $\mu\text{m}$ . Figure modifiée de [2].

Raman du DMSO-d6 en utilisant la configuration PM ainsi qu'une suppression du signal non-résonant causé par la XPM.

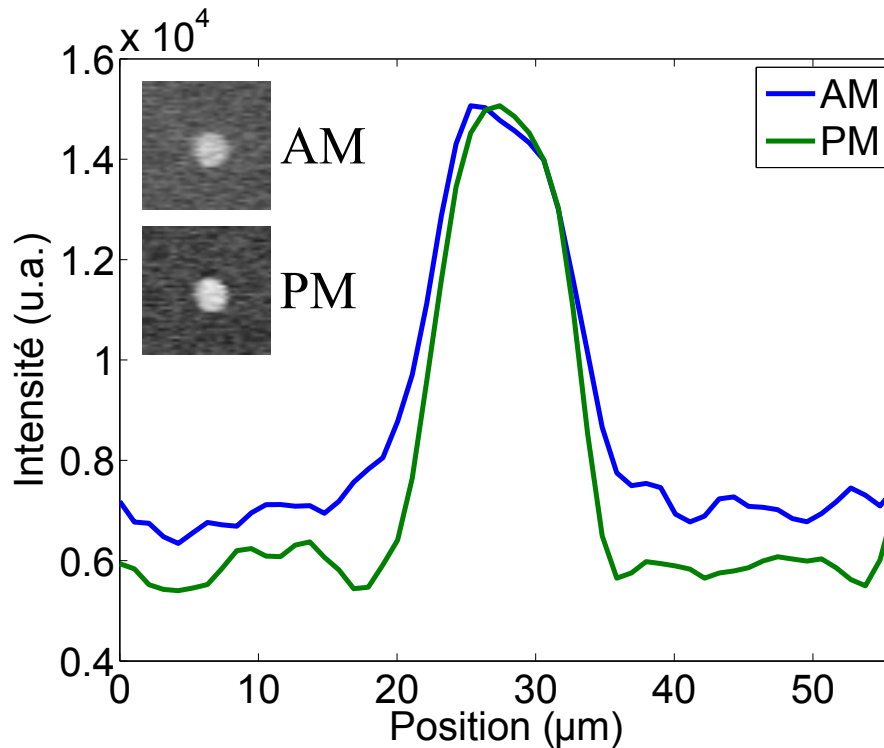


FIGURE 5.12 – Profil d’intensité du signal SRS d’une gouttelette de DMSO-d<sub>6</sub> diluée dans de l’eau pure à une concentration de 0,3 % dans un milieu d’octadécane. Les mesures proviennent des images présentées aux figures 5.11(a) et (b) où les gouttelettes utilisées pour les mesures sont indiquées par les flèches bleues. Les sous-figures montrent les images des gouttelettes utilisées en mesurant un profil horizontal de l’intensité. Les images des encarts ont une dimension de 50 × 50 μm.

#### 5.6.4 Limitations

Bien que la configuration PM soit efficace pour diminuer le signal non-résonant causé par la XPM, celle-ci n’est pas optimale pour tous les types d’échantillons. En effet, dans le cas où le mode Raman à imager est un mode dépolarisé ( $\rho \neq 0$ ), la technique PM-SRS n’est pas adaptée. Dans ce cas-ci, moduler la polarisation diminuerait l’intensité du signal SRS puisque le transfert d’intensité lorsque les faisceaux pompe et Stokes sont perpendiculaires n’est pas nul. Moduler la polarisation diminuerait donc l’intensité du signal SRS par rapport à l’utilisation d’une modulation de l’amplitude. De plus, dans le cas d’une compensation complète du signal XPM en utilisant la configuration PM, si le ratio de dépolarisation du mode Raman se trouve à être plus élevé que celui de la XPM, le signal SRS détecté se

retrouverait avec une valeur négative puisque la modulation serait déphasée par rapport au système de détection.

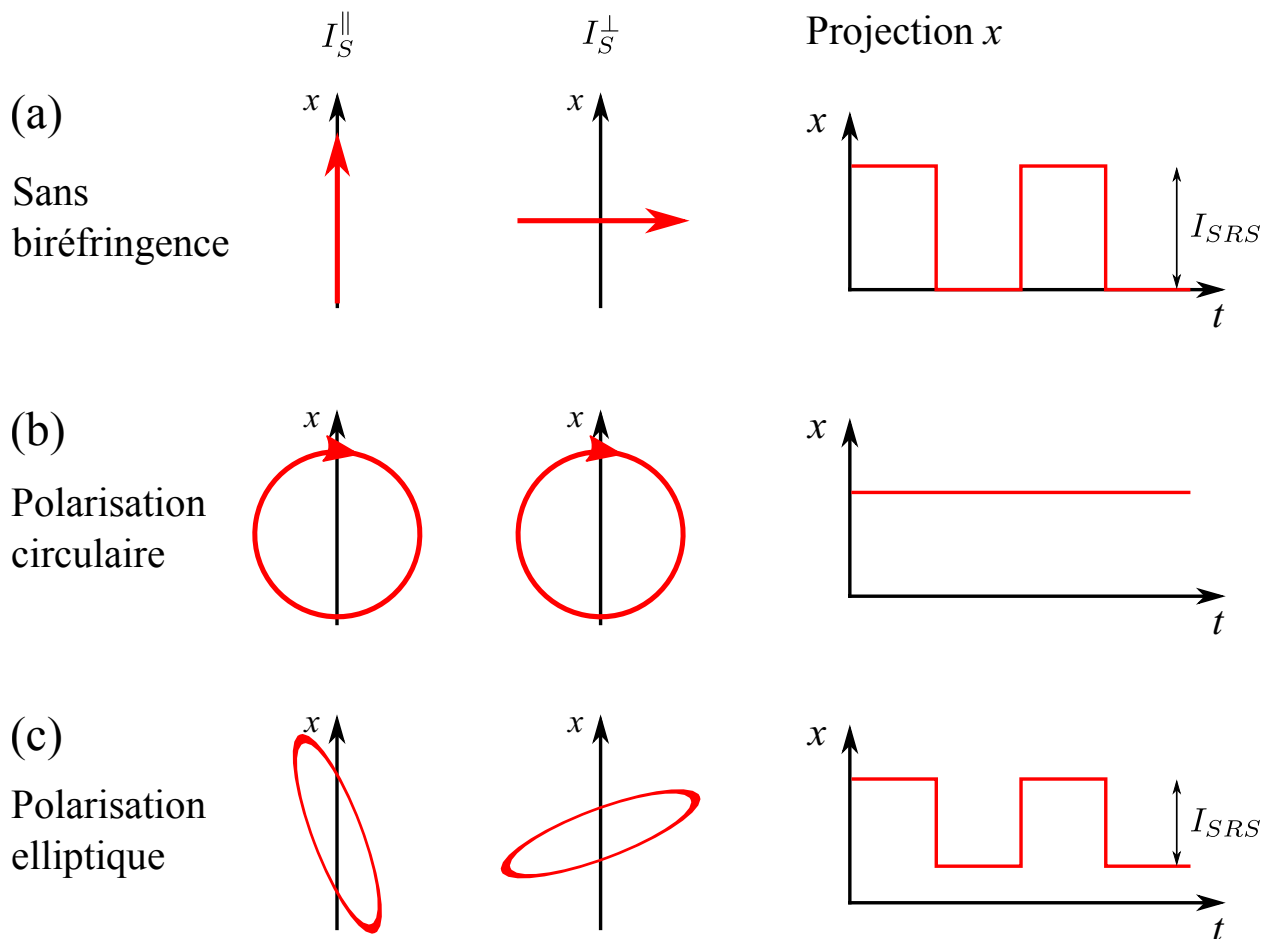


FIGURE 5.13 – Représentation du signal SRS dans le cas d’une biréfringence induite. (a) S’il n’y a aucune biréfringence, la polarisation des faisceaux Stokes parallèle  $I_S^{\parallel}$  et perpendiculaire  $I_S^{\perp}$  reste linéaire et l’intensité du signal SRS  $I_{SRS}$  est maximum. (b) Dans le cas extrême où la polarisation de  $I_S^{\parallel}$  et  $I_S^{\perp}$  devient circulaire, l’amplitude de la modulation devient nulle et le signal SRS disparaît. (c) Dans le cas où la polarisation devient elliptique, l’amplitude de la modulation deviendrait moins importante, mais ne disparaît pas complètement, diminuant le contraste d’imagerie.

Également, la microscopie PM-SRS n’est pas adaptée aux échantillons biréfringents. En effet, la biréfringence de ces échantillons diminuerait le contraste d’imagerie de la microscopie PM-SRS (voir figure 5.13). Par exemple, dans le cas extrême où la polarisation des faisceaux pompe et Stokes se retrouve circulaire, la modulation de l’intensité du signal SRS devient nulle et il n’y aurait pas de contraste d’imagerie. Dans le cas moins extrême où une faible ellipticité est induite, ceci créerait une modulation de l’amplitude moins importante. En

effet, une partie de l'intensité du faisceau Stokes perpendiculaire se retrouverait parallèle au faisceau pompe. Si la biréfringence n'est pas trop importante, il peut toutefois être possible de la compenser partiellement en ajustant finement la polarisation des faisceaux pompe et Stokes.

## 5.7 Conclusion

Ce chapitre présente l'implantation d'une méthode de microscopie Stimulated Raman Scattering (SRS) par modulation de la polarisation (PM) pour effectuer de la microscopie SRS de manière multimodale en utilisant la technique d'imagerie spectrale. En utilisant une configuration où il y a modulation de la polarisation plutôt que modulation de l'amplitude (AM), comme c'est habituellement le cas, une réduction du signal non-résonant causé par la modulation de phase croisée (XPM) est observée. En balançant l'intensité des faisceaux Stokes parallèle et perpendiculaire, une compensation complète du signal de XPM peut être atteinte. La configuration PM peut également être utilisée pour réduire le signal non-résonant causé par la lentille thermique (TL). Pour ce faire, ajuster l'intensité des faisceaux Stokes parallèle et perpendiculaire permet d'uniformiser l'intensité des faisceaux envoyés dans l'échantillon. Notre montage expérimental permet également la conversion rapide de la configuration PM vers la configuration AM. Ceci permet une utilisation du montage expérimental même lorsque la configuration PM n'est pas appropriée. Par exemple lorsque l'échantillon est biréfringent ou lorsque le mode Raman à imager est dépolarisé.



# Chapitre 6

## Application de la microscopie “Stimulated Raman Scattering” à l’imagerie d’échantillons géologiques

Ce chapitre présente, à notre connaissance, la première application de la microscopie SRS au domaine de la minéralogie. L’imagerie multimodale rapide en trois dimensions de modes Raman se situant entre 400 et 3700  $\text{cm}^{-1}$  est démontrée. Ceci permet l’imagerie de modes Raman spécifiques à de basses fréquences caractéristiques des minéraux ainsi que des matières organiques dans la région des “fingerprints” (800 – 1800  $\text{cm}^{-1}$ ) et la région CH ( $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ ). Ce chapitre introduit brièvement la problématique concernant l’imagerie d’échantillons géologiques à la section 6.1 et présente la préparation des échantillons à la section 6.2. La section 6.3 traite de l’imagerie de minéraux à l’aide de la microscopie SRS et la section 6.4 présente l’imagerie SRS de matières organiques dans les échantillons géologiques. Finalement, une conclusion est présentée à la section 6.5.

## 6.1 Problématique

L'imagerie en trois dimensions est largement appliquée aux Sciences de la Terre. Le type d'imagerie le plus communément utilisé est la tomodensitométrie (CT). Également, la résonance magnétique et la tomographie à neutron sont utilisées, mais avec des applications plus limitées [25]. Plusieurs progrès dans le développement de sources de rayonnement synchrotron à rayon X ont poussé l'imagerie hypervolumique de la microtomographie à rayons X à une échelle sous-microscopique. Ceci permet de fournir des détails sans précédents dans l'étude de la structure des fossiles, la géométrie des pores et la texture des minéraux. La microscopie confocal à balayage laser (LSCM) est appliquée en géomicrobiologie [141] et paléobiologie pour l'imagerie 3D d'interactions microbes-minéraux, de biofilms et de fossiles. L'imagerie confocale Raman, largement utilisée pour l'analyse pixel par pixel d'une région d'intérêt (ROI), commence à être plus fréquemment utilisée pour l'imagerie 2D de minéraux et de matières organiques fossiles. Contrairement à la LSCM qui se base sur la fluorescence pour obtenir un contraste d'imagerie, les images Raman 2D contiennent des informations vibrationnelles spectrales à chaque pixel, fournissant un contraste chimique nécessaire pour l'analyse d'images chimiométriques. Les applications en géosciences de la microscopie Raman sont en plein essor pour l'étude des plus vieilles roches sédimentaires de la terre. Ces roches sédimentaires sont utilisées pour la recherche de preuves concernant l'origine de la vie [140, 176], ainsi que pour l'étude de matériaux extraterrestres et terrestres qui sont probablement analogues à la surface de Mars dans le but de découvrir des preuves de la présence de processus biologiques [54, 198]. Des applications plus étendues de l'imagerie Raman, spécialement l'imagerie Raman 3D, sont limitées en grande partie par la durée nécessaire pour faire l'acquisition d'une seule image 2D, ce qui peut prendre de plusieurs dizaines de minutes jusqu'à plusieurs heures, et par la grande quantité de bruit de fond généré lorsque les échantillons produisent de la fluorescence. Dans ce chapitre, je présenterai l'utilisation de la microscopie "Stimulated Raman Scattering" (SRS) pour l'imagerie d'échantillons géologiques dans le but de résoudre certains de ces problèmes.

Pour pallier les limitations de la microscopie Raman conventionnelle, nous démontrons la preuve de concept de l'utilisation de la microscopie "Coherent Raman Scattering" (CRS) comme outil d'imagerie d'échantillons géologiques [3]. Puisque la microscopie CRS est un processus stimulé, l'efficacité du processus non-linéaire est plusieurs ordres de grandeur plus élevée que la microscopie Raman [32, 45]. La microscopie CRS inclut les techniques de microscopie "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering" (CARS) et "Stimulated Raman Scattering" (SRS). Bien que la microscopie SRS ait plusieurs avantages par rapport à la microscopie CARS, comme être exempte de signal non-résonant provenant du mélange à quatre ondes caractéristique de la microscopie CARS [62], le signal détecté en microscopie SRS peut également contenir du signal non-résonant. Les différents effets produisant un signal non-résonants sont présentés à la section 5.1. Pour ce chapitre, les signaux non-résonants qui sont pertinents sont l'absorption des états excités (ESA) [49] et la lentille thermique (TL) [9]. Essentiellement, l'ESA est l'absorption d'un photon Stokes par une molécule, amenant cette dernière à un état excité et favorisant l'absorption des photons pompe tandis que la TL est causée par un changement de l'indice de réfraction du milieu par effet thermique, modifiant la divergence du faisceau pompe. La plupart du temps, la TL est déphasée par rapport au signal SRS et peut être séparée du signal SRS en ajustant la phase de l'amplificateur à détection synchrone. L'ESA est, quant à elle, plus difficile à séparer du signal SRS puisqu'elle est en phase avec ce dernier. Ce qui la distingue des autres signaux non-résonants et du signal SRS est la durée de relaxation du premier état excité par le faisceau Stokes, qui est relativement longue. Ceci permet la génération d'un signal non-résonant même lorsque les impulsions pompe et Stokes ne se chevauchent pas.

La microscopie SRS possède plusieurs avantages par rapport à la microscopie Raman conventionnelle. Notamment, puisque la microscopie SRS est un processus stimulé plutôt que spontané, l'imagerie peut être plusieurs ordres de grandeur plus rapide (ou plus sensible) que la microscopie Raman. De plus, le signal SRS, de seconde harmonique (SHG) et de fluorescence à deux photons (TPF) peuvent être acquis simultanément, permettant une imagerie multimodale de l'échantillon. De plus, puisque l'intensité du signal SRS dépend du carré de l'intensité de la radiation incidents, le signal est généré seulement dans le volume

focal, rendant cette technique intrinsèquement confocale. Cette propriété de la microscopie SRS permet également l'imagerie 3D de l'échantillon. Finalement, la microscopie SRS n'est pas affectée par la fluorescence, ce qui est un désavantage majeur de la microscopie Raman conventionnel. En effet, le signal SRS est détecté à la longueur d'onde du faisceau pompe, qui est habituellement située dans le proche infrarouge.

La microscopie SRS et Raman sont toutes deux basées sur un contraste "chimique" à cause de la résonance Raman. La microscopie SRS peut rapidement produire une image avec un temps d'acquisition par pixel de l'ordre de la dizaine de microsecondes tandis que le temps d'acquisition par pixel de la microscopie Raman est de l'ordre de la dizaine de millisecondes, soit trois ordres de grandeur plus élevée [94]. De plus, la microscopie SRS possède une excellente résolution 3D, avec une résolution en profondeur de l'ordre du micron [214]. Il est à noter une différence majeure entre ces deux types d'imagerie. En effet, la microscopie SRS fait l'acquisition de seulement un mode de résonance Raman par image tandis que la microscopie Raman fait l'acquisition d'un spectre Raman entier. Également, la microscopie SRS est plus complexe à implémenter puisqu'elle nécessite deux sources lasers femtosecondes et beaucoup d'attention doit être portée à la réduction du bruit électronique. Comme mentionné plus tôt, le signal SRS peut également être accompagné par un signal non-résonant, ce qui peut réduire la sensibilité de détection et être faussement interprété comme un signal SRS. Pour éliminer l'ambiguïté entre le signal SRS et le signal non-résonant, le système d'imagerie spectral est idéal. En effet, il permet d'effectuer rapidement un balayage spectral d'un intervalle de fréquences d'intérêt et de confirmer que le signal acquis provient bel et bien d'un mode Raman. Un mode de résonance Raman est le plus souvent distinctif par ses pics étroits, tandis que le signal non-résonant apparaît habituellement comme une bande très large sur le spectre SRS.

## 6.2 Préparation des échantillons

À l'exception d'un échantillon, tous les échantillons étudiés pour l'imagerie de minéraux sont des sections minces de roches qui ont été utilisées auparavant dans l'étude de l'accu-

mulation de pétrole et de dépôt de minéraux métalliques. Les échantillons sont choisis pour démontrer le potentiel de la microscopie SRS. L'échantillon WPA est composé de quartz ( $\text{SiO}_2$ ) contenant des inclusions de fluides [172] de méthane. Cet échantillon permet de démontrer à la fois l'imagerie dans la région CH ainsi que dans les basses fréquences Raman (le mode Raman de Si-O est  $464 \text{ cm}^{-1}$ ). Dans le but de distinguer deux minéraux chimiquement différents dans un volume 3D, un échantillon de poudre de quartz et de calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) fixée avec de la colle de cyanoacrylate est préparé. L'échantillon M-K5A contient de larges cristaux de quartz avec des microcristaux de quartz qui ont envahi une partie de l'échantillon. Ceci teste la capacité multimodale (SRS et SHG) de notre microscope SRS, spécifiquement la capacité de la microscopie SRS à identifier les minéraux et la microscopie SHG à déterminer simultanément la structure cristallographique du minéral. Les échantillons B-1 et B-2 sont principalement composés de calcite, soit (B-1) sous la forme de roche sédimentaire à grains fins avec des foraminifères fossiles ou (B-2) sous la forme de larges cristaux entourant de petits cristaux d'anhydrite ( $\text{CaSO}_4$ ). Ces deux échantillons permettent de tester certains aspects spécifiques de l'imagerie spectrale de la microscopie SRS tels que le contraste "chimique" et l'effet de la présence du signal non-résonant.

Pour l'étude de l'imagerie de matière organique dans les minéraux, deux échantillons sont utilisés. Le premier est un échantillon contenant des algues Prasinophycées *Tasmanite* au stade de cyste [70]. L'échantillon provient du shale Huron datant de l'âge dévonien (il y a environ 400 millions d'années) collecté dans l'est de l'Ohio (États-Unis) depuis une carotte de forage. Le second échantillon est une tranche polie de fluorite violette coupée parallèlement à une des faces cubiques du cristal. L'échantillon provient d'une mine située dans le sud de l'Illinois (États-Unis) [165]. Les inclusions de fluides contiennent du pétrole brut emprisonné dans un défaut du cristal en croissance qui fut ensuite scellé lorsque le cristal a continué à croître. Le dépôt de minerai contenant ce cristal s'est formé durant le Permien, il y a environ 230 millions d'années.

Tous les échantillons sont préparés selon les méthodes standards de préparation d'échantillons minces pour pétrographie, soit par des laboratoires universitaires ou des compagnies commerciales. Les sections sont polies et montées sur des lames de verre, soit avec une colle

d'époxy ou de cyanoacrylate. L'épaisseur des échantillons varie entre 30  $\mu\text{m}$  et environ 100  $\mu\text{m}$ .

### 6.3 Imagerie de minéraux

Le montage expérimental du microscope SRS utilisé pour les manipulations est présenté au chapitre 4.

Le potentiel multimodal de notre montage de microscopie SRS est démontré aux figures 6.1 et 6.2. Ces figures montrent les images SRS et SHG de l'échantillon WPA, qui est composé de quartz ( $\text{SiO}_2$ ) et d'inclusions de fluides riches en méthane ( $\text{CH}_4$ ), comme présenté par l'image sur fond clair par transmission de lumière de la figure 6.1(a). Le quartz possède un mode Raman étroit à  $464 \text{ cm}^{-1}$  (mode vibratoire symétrique  $\nu_1$ ) tandis que le méthane possède un mode Raman à  $2917 \text{ cm}^{-1}$  (mode vibratoire symétrique  $A_1$ ) [93, 177]. En ajustant la longueur d'onde du faisceau pompe à 798 nm, nous pouvons générer un signal Raman à la fréquence du mode Raman du  $\text{CH}_4$  et en ajustant la longueur d'onde à 992 nm nous pouvons sonder le mode Raman du quartz. Ceci permet l'imagerie chimiquement spécifique de l'échantillon en ciblant un mode Raman spécifique. Le résultat peut être représenté par une image composite où les différentes couleurs représentent les différentes molécules impliquées, comme le montre la figure 6.1(d). Cette figure montre en rouge le quartz tandis que les inclusions de fluide contenant le méthane sont présentées en magenta. Plusieurs inclusions de fluides peuvent être repérées à différentes profondeurs telles que les montrent les figures 6.1(e) et (f). Les spectres SRS sont présentés aux figures 6.1(b) et (c), montrant clairement les modes de résonance Raman du méthane et du quartz respectivement. Ceci confirme que le signal acquis provient bel et bien du  $\text{CH}_4$  et du quartz. Il est à noter que la technique utilisée pour l'acquisition des spectres SRS est présentée au chapitre 4. Les spectres SRS sont générés à partir du signal SRS collecté dans les ROI désignées par les cercles pointillés à la figure 6.1(d).

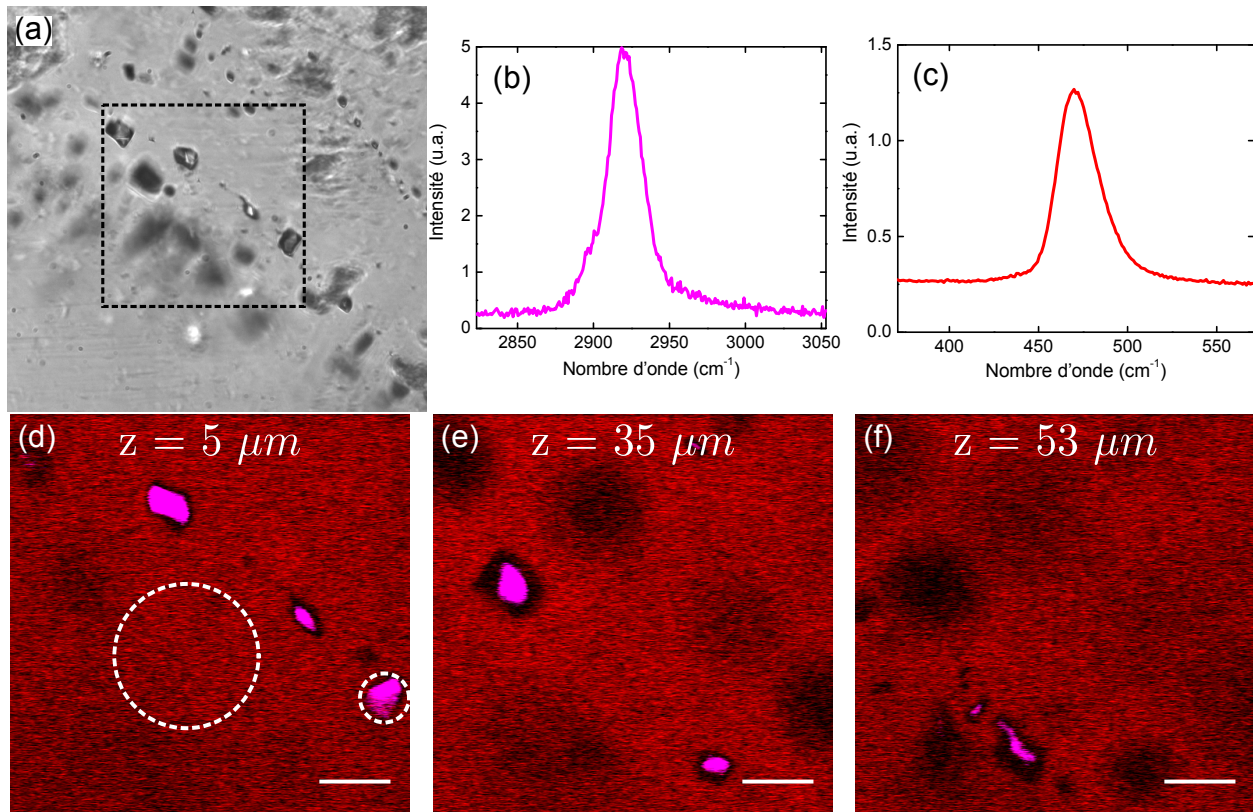


FIGURE 6.1 – Échantillon WPA. (a) Image sur fond clair par transmission de lumière d'un échantillon de quartz contenant des inclusions de fluides riches en méthane. Le carré indique la région imagée à l'aide de la microscopie SRS. (b-c) Spectre SRS (b) de méthane et (c) de quartz acquis à l'aide de la technique d'imagerie spectrale. Les ROI utilisées pour mesurer les spectres SRS sont présentées en (d). (d-f) Image SRS du quartz (rouge) et des inclusions de fluide de méthane (magenta) à une profondeur de (d) 5, (e) 35 et (f) 53  $\mu\text{m}$  à partir de la surface de l'échantillon.  $I_p = 30$  mW,  $I_S = 60$  mW. Temps d'acquisition des images: 2 s. Temps d'acquisition des spectres SRS: 9 min. Barre d'échelle: 20  $\mu\text{m}$ . Image modifiée de [80].

Un des avantages que la microscopie SRS possède par rapport à la microscopie Raman est sa rapidité relative à faire l'acquisition d'images 3D. Les figures 6.2(a) et (b) présentent des images du volume 3D ( $112 \times 112 \times 68 \mu\text{m}$ ) du signal SRS des inclusions de fluides (magenta) et du quartz (rouge). Les figures montrent la position en 3D des inclusions de fluide à l'intérieur de l'échantillon. Il est à noter que les figures 6.1(d) à (f) et 6.2(b) montrent la présence de régions plus sombres se trouvant "derrière" les inclusions de fluide où le signal SRS est plus faible. Ceci est causé par une légère modification de la divergence des faisceaux due à la propagation de ces derniers dans les inclusions de fluides, entraînant une génération moins importante de signal SRS. Tandis que le signal SRS peut déterminer le



volume occupé par le quartz en plus de chimiquement identifier ce dernier, il ne fournit pas d'informations supplémentaires sur sa structure locale. Aux figures 6.2(c) et (d), nous montrons des images du volume 3D du signal SRS provenant des inclusions de fluides contenant du méthane ( $2917\text{ cm}^{-1}$ ) en magenta et du signal SHG provenant du quartz en bleu. Ces images montrent que la distribution spatiale du signal SHG produit par le quartz est très différente du signal SRS de ce dernier visible aux figures 6.2(a) et (b). Puisque le quartz est un matériau non-centrosymétrique, sa structure permet la génération d'un signal de seconde harmonique. Toutefois, dans un matériau uniforme, à cause du déphasage de Gouy, la plus grande partie du signal de seconde harmonique est annulé par interférence destructive [184]. En effet, le déphasage de Gouy provoque le signal SHG généré devant et derrière le plan focal à être déphasé l'un par rapport à l'autre, annulant le signal SHG par interférence destructive. Toutefois, à une interface ou un plan de macle, il se produit une rupture de la symétrie du matériau au plan focal et le signal SHG généré n'est plus annulé par interférence destructive, permettant la détection de signal SHG. La microscopie SHG peut ainsi fournir des informations à propos de la structure locale du cristal tel que la présence de plan de macles et leur orientation, ce qui est complémentaire aux informations que fournit la microscopie SRS. L'imagerie multimodale en utilisant la microscopie CARS dans des inclusions de méthanes combinée à la microscopie SHG du quartz est présentée dans une autre publication [20]. Ceci est la première fois à notre connaissance que la microscopie SRS et SHG du quartz est utilisée simultanément dans des échantillons géologiques.

Une des applications possibles de la microscopie SRS est l'imagerie de plusieurs types de minéraux dans le but de les distinguer dans un volume imagé. La figure 6.3 montre les résultats de l'imagerie de poudre de quartz en rouge et de la calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) en vert dont la taille des grains varie entre quelques microns et quelques centaines de microns. La poudre est fixée avec de la colle cyanoacrylate. Étant donné la nature non-linéaire de la microscopie SRS, le signal SRS est formé seulement au point focal, permettant une haute résolution des images en 3D de l'échantillon. La calcite et le quartz possèdent chacun un mode Raman très étroit à  $1088\text{ cm}^{-1}$  (mode vibratoire symétrique  $A_{1g}$  du  $\text{CO}_3^{-2}$  [175]) et  $465\text{ cm}^{-1}$  respectivement, comme présenté par leur spectre SRS aux figures 6.3(b) et (c).



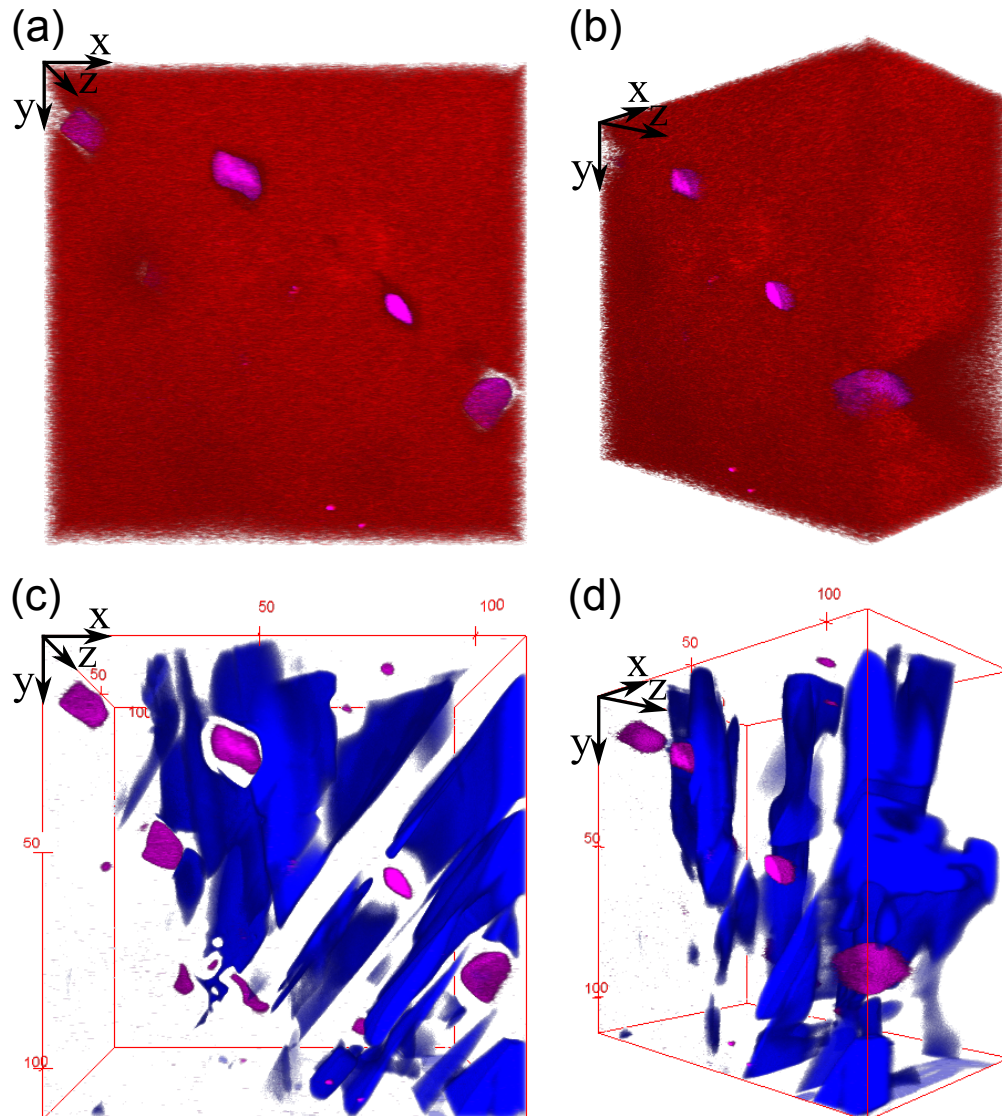


FIGURE 6.2 – Échantillon WPA. (a) Vue de devant et (b) vue orthogonale du volume 3D du signal SRS provenant du quartz (rouge) et des inclusions de fluide contenant du méthane (magenta) de l'échantillon présenté à la figure 6.1. (c) Vue de devant et (d) vue orthogonale du volume 3D du signal SHG provenant du quartz (bleu) et du signal SRS provenant des inclusions de fluide de méthane (magenta).  $I_p = 30$  mW,  $I_S = 60$  mW. Temps d'acquisition des images 3D: 28 min par longueur d'onde du faisceau pompe. Image modifiée de [80].

Les figures 6.3(d) et (e) montrent une sous-région de la ROI présentée à la figure 6.3(a) à deux différents angles de vue dans le but de démontrer la capacité de la microscopie SRS à imager en 3D avec une bonne résolution. Nous démontrons ainsi que des petits cristaux de quartz et calcite de quelques microns de diamètre peuvent être résolus spatialement et identifiés chimiquement.

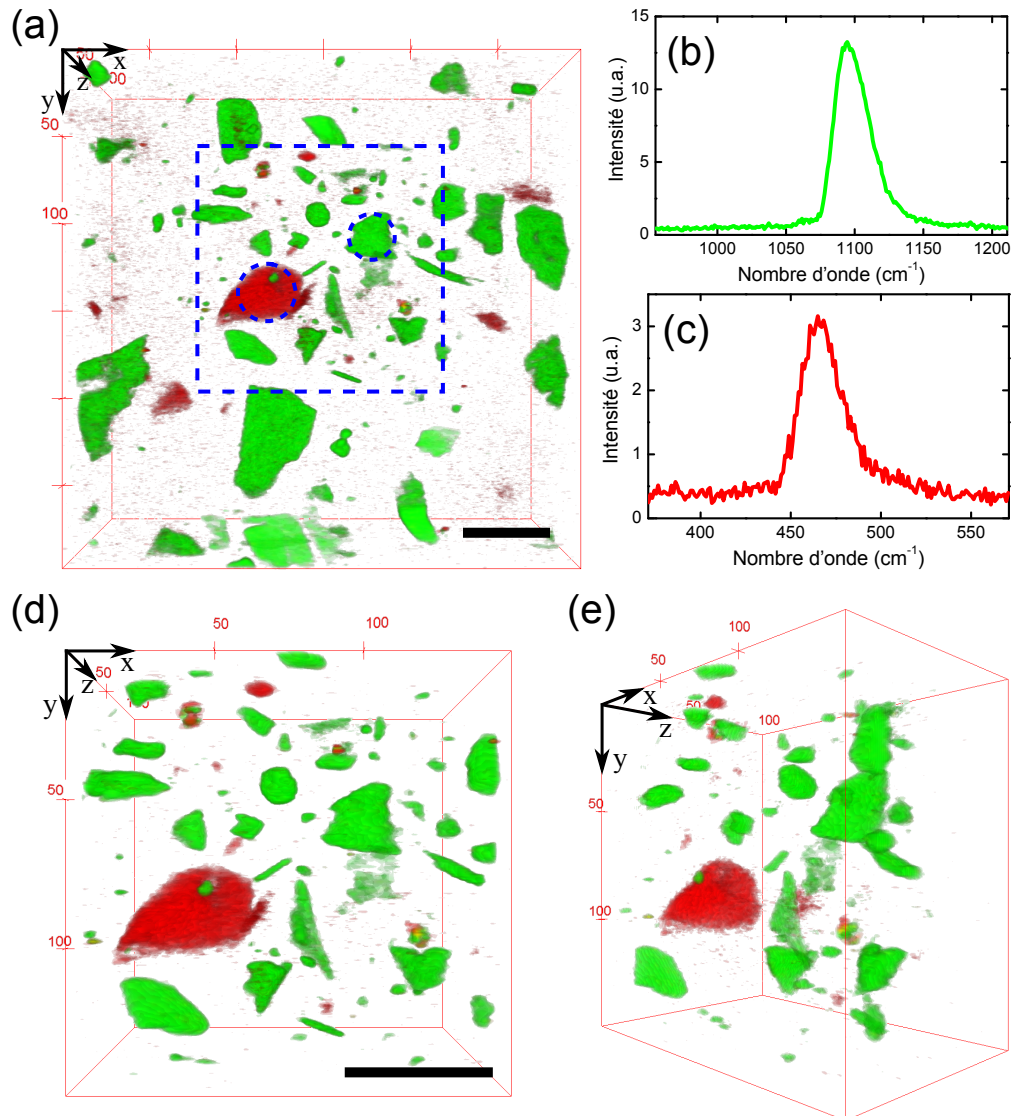


FIGURE 6.3 – Poudre de calcite et de quartz. (a) Image du volume 3D du signal SRS de poudre de calcite (vert) et de quartz (rouge) fixée à l'aide de cyanoacrylate. La ROI imagée est de  $300 \times 300 \times 100 \mu\text{m}$ . Le carré bleu désigne la sous-région présentée en (d) et (e). (b) Spectre SRS de la calcite. (c) Spectre SRS du quartz. (d-e) Images du volume 3D de la poudre de calcite (vert) et de quartz (rouge) affiché dans une vue (d) de devant et (e) orthogonale.  $I_p = 40 \text{ mW}$ ,  $I_S = 80 \text{ mW}$ . Temps d'acquisition des images 3D: 27 min par longueur d'onde du faisceau pompe. Temps d'acquisition des scans SRS : 7 min. Barres d'échelles:  $50 \mu\text{m}$ . Image modifiée de [80].

La microscopie multimodale SRS peut être utilisée pour étudier différentes structures à l'intérieur du volume d'une ROI et fournir des informations sur sa formation. En utilisant l'échantillon M-K5A à la figure 6.4, nous présentons des images d'un échantillon de quartz provenant d'un gisement de minerai métallique à l'intérieur duquel un cristal relativement

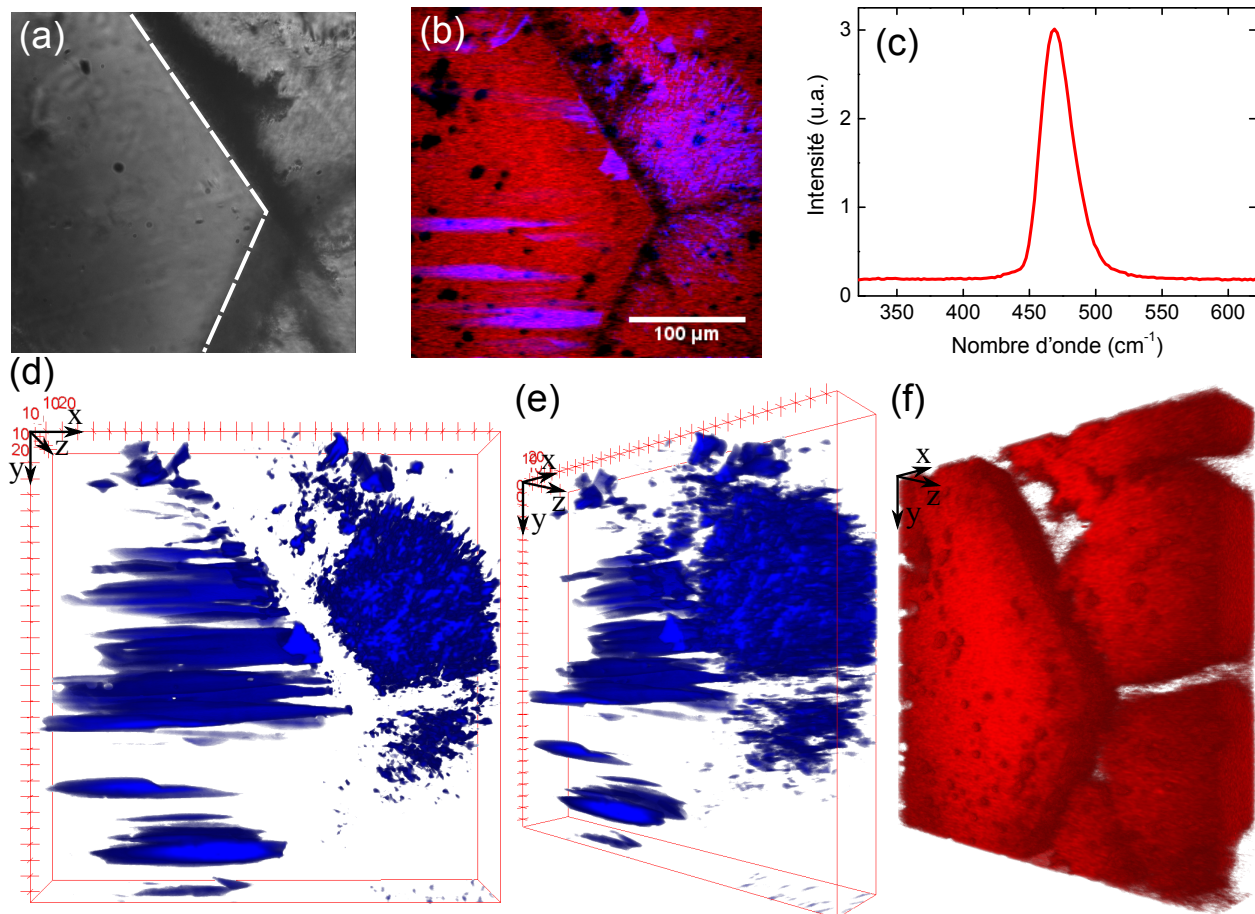


FIGURE 6.4 – Échantillon M-K5A. (a) Image sur fond clair par transmission de lumière d'un échantillon de quartz. La ligne pointillée marque la frontière d'un large cristal qui est envahi par des grains fins de quartz chalcédonite. (b) Image multimodale montrant le signal SRS (rouge) et SHG (bleu) à la surface de l'échantillon. La barre d'échelle est de  $100\ \mu\text{m}$ . (c) Spectre SRS du quartz acquis à l'aide de la technique d'imagerie spectrale de la microscopie SRS. La ROI utilisée pour la mesure est l'intégralité de l'image en (b). Image (d) de la vue de devant et (e) de la vue orthogonale du volume 3D du signal SHG montrant des plans de macles du Brésil allongés à l'intérieur d'un large cristal et les frontières de grain de microcristaux individuels à l'intérieur de la calcédoine. (f) Image de la vue orthogonale du volume 3D du signal SRS provenant du quartz.  $I_p = 50\ \text{mW}$ ,  $I_S = 100\ \text{mW}$ . Temps d'acquisition de l'image en (b): 4 s. Temps d'acquisition du scan SRS en (c): 5 min. Temps d'acquisition des images 3D: 10 min. Image modifiée de [80].

large de quartz est envahi par des grains fins de quartz chalcédonite. L'image sur fond clair par transmission de lumière de la ROI est présentée à la figure 6.4(a) et le spectre SRS acquis sur la ROI en entier est présenté à la figure 6.4(c). À la figure 6.4(b), nous présentons une image de la surface du volume 3D acquis où le signal SRS est affiché en rouge et le signal SHG en bleu. Alors que le signal SRS provenant du quartz est présent sur tout la

ROI, le signal SHG est généré seulement à des régions spécifiques. Les figures 6.4(d) et (e) montrent le signal SHG du volume 3D de la ROI. Ces images permettent de révéler les différentes particularités cristallographiques de l'échantillon. Du côté gauche des images, le signal SHG révèle des plans de macles du Brésil allongés tandis qu'au côté droit des images, l'apparence granulaire du signal SHG est causée par les différentes orientations optiques des microcristaux composant la chalcédonite. Ces structures ne sont pas visibles lorsque nous utilisons seulement la microscopie SRS (figure 6.4(f)) puisque ce dernier montre seulement le volume occupé par le quartz.

Contrairement à la microscopie CARS, la microscopie SRS n'est pas affectée par le signal non-résonant causé par le mélange à quatre ondes qui réduit la sensibilité de détection et déforme le spectre Raman. Toutefois, d'autres types de signaux non-résonants peuvent affecter l'imagerie SRS. En principe, il y a quatre sources possibles de signal non-résonant en microscopie SRS: la lentille thermique (TL), la modulation de phase croisée (XPM), l'absorption à deux photons (TPA) [9] et l'absorption à l'état excité (ESA) [49]. Une revue de ces types de bruits non-résonants est présentée à la section 5.1. À la figure 6.5, nous présentons des images SRS de l'échantillon B-1, un foraminifère fossilisé à l'intérieur d'un échantillon riche en calcite, qui est affecté par la présence de signal non-résonant. La longueur d'onde du laser pompe est ajustée à 934 nm pour sonder le mode Raman de la calcite à  $1088\text{ cm}^{-1}$ . L'image sur fond clair par transmission de lumière à la figure 6.5(a) montre la ROI utilisée pour l'analyse. À la figure 6.5(b), nous présentons une image SRS non traitée de la ROI dont les longueurs d'onde laser sont ajustées pour sonder le mode Raman de la calcite à  $1088\text{ cm}^{-1}$ . Nous pouvons observer sur l'image la présence de régions montrant un signal élevé. Nous pourrions croire que ce signal provient de la calcite puisque nous sondons l'échantillon à une fréquence de  $1088\text{ cm}^{-1}$ . Toutefois, comme mentionnée précédemment, cette image contient à la fois du signal SRS résonant et du signal non-résonant. Ces deux signaux ne sont pas distinguables en utilisant seulement une analyse de l'intensité. L'identification chimique de la calcite à l'intérieur de la ROI peut être effectuée en faisant l'acquisition du spectre SRS par balayage spectral, comme présenté aux figures 6.5(c) et (d). Les sous-régions utilisées pour produire les spectres SRS sont identifiées à la figure 6.5(b). Le spectre SRS de la fi-



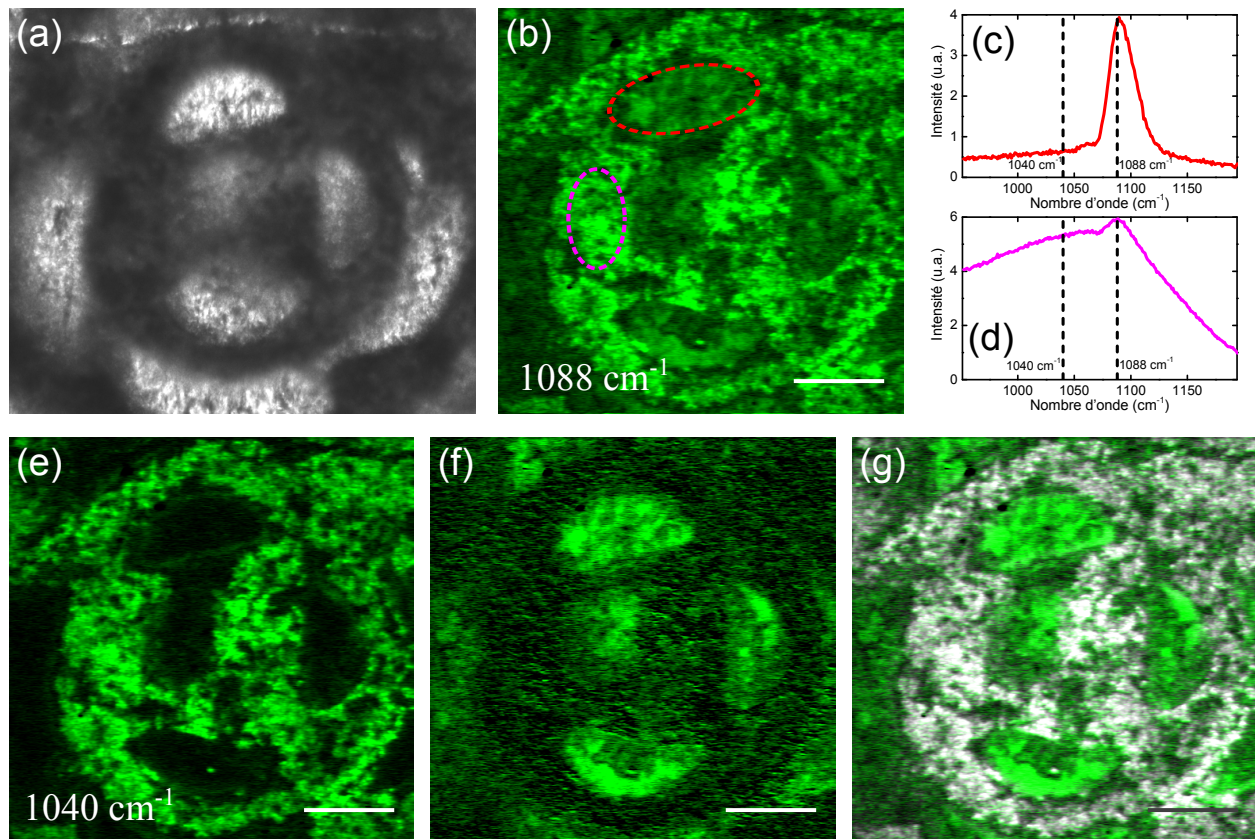


FIGURE 6.5 – Échantillon B-1. (a) Image sur fond clair par transmission de lumière d'un foraminifère fossilisé à l'intérieur d'un échantillon riche en calcite. (b) Image SRS non traité de l'échantillon de calcite montrant le signal SRS résonant provenant de la calcite ainsi que le signal non-résonant. (c-d) Spectre SRS (c) de la calcite et (d) du signal non-résonant. Les ROI utilisées pour les mesures sont montrés en (b) où le cercle rouge désigne la région utilisée pour mesurer le signal SRS et le cercle magenta désigne la région utilisée pour mesurer le signal non-résonant. (e) Image SRS dont la fréquence Raman ajustée à  $1040\text{ cm}^{-1}$  (hors de la résonance du mode Raman de la calcite) montrant seulement le signal non-résonant. (f) Soustraction des images (b) et (e) montrant seulement le signal SRS résonant provenant de la calcite. (g) Image composite de (e) et (f) montrant le signal SRS résonant de la calcite (vert) et le signal non-résonant (gris). Pour une meilleure visualisation des images, la luminosité du signal SRS de la calcite pour les images (f) et (g) est multipliée par un facteur de deux.  $I_p = 30\text{ mW}$ ,  $I_S = 60\text{ mW}$ . Temps d'acquisition des images SRS: 4 s. Temps d'acquisition des spectres SRS: 8 min. Les barres d'échelles sont de  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Image modifiée de [80].

gure 6.5(c) montre un pic étroit centré à  $1088\text{ cm}^{-1}$ , confirmant la présence de calcite à cet endroit. Au contraire, le spectre très large de la figure 6.5(d) révèle une réponse principalement non-résonante qui ne peut provenir de la calcite. Ce signal non-résonant peut être causé soit par la TL, la XPM, la TPA, ou l'ESA. Étant donné l'asymétrie du spectre du signal non-résonant et le fait qu'il y ait une faible décroissance de l'intensité du signal

dans la partie gauche du spectre qui s'étend au-delà de l'intervalle de fréquences où il y a chevauchement des impulsions pompe et Stokes, il est fort probable que, dans ce cas-ci, le signal non-résonant soit causé par l'ESA. Nous pouvons utiliser le contraste spectral de notre montage de microscopie SRS pour séparer le signal non-résonant du signal SRS à l'intérieur de l'image. En déplaçant la platine de translation pour modifier la fréquence Raman que nous sondons d'environ  $50 \text{ cm}^{-1}$ , le signal SRS de la calcite disparaît tandis que le signal non-résonant demeure inchangé (voir figure 6.5(e)). Cette figure présente le contraste d'imagerie du signal non-résonant seulement. En soustrayant l'image SRS à la fréquence Raman de la calcite ( $1088 \text{ cm}^{-1}$  à la figure 6.5(b)) et l'image SRS hors de la résonance de la calcite ( $1040 \text{ cm}^{-1}$  à la figure 6.5(e)), nous obtenons une image qui affiche seulement le signal SRS provenant de la calcite, tel que présenté à la figure 6.5(f). La figure 6.5(g) montre une image composite de la ROI avec le signal SRS résonant de la calcite affichée en vert et le signal non-résonant affiché en gris, contrastant les différentes caractéristiques de chaque signal. Cette étude démontre l'importance de l'imagerie spectrale en microscopie SRS puisqu'il permet de balayer rapidement le spectre Raman pour confirmer l'identité chimique des échantillons étudiés. L'imagerie SRS par un seul point spectral (c'est-à-dire à une fréquence Raman fixe) ne serait pas capable d'identifier la distribution spatiale de la calcite dans l'échantillon et de séparer le signal non-résonant provenant de l'ESA.

La microscopie SRS par balayage spectral est également un outil utile pour distinguer des minéraux dont les modes Raman ont une fréquence relativement près l'un de l'autre. La figure 6.6 montre les images de l'échantillon B-2 qui contient de petits cristaux d'anhydrite ( $\text{CaSO}_4$ ) intégrés dans un cristal de calcite ( $\text{CaCO}_2$ ). À la figure 6.6(a), nous présentons une image sur fond clair par transmission de lumière de la ROI utilisée pour l'analyse. Puisque la calcite et l'anhydrite ont un mode Raman à moins de  $100 \text{ cm}^{-1}$  l'un de l'autre, nous pouvons rapidement balayer le spectre Raman dans cet intervalle en utilisant la fonction d'imagerie spectrale de notre montage. Pour ce faire, nous ajustons la longueur d'onde du laser pompe à  $937 \text{ nm}$  de telle sorte que les deux modes Raman de la calcite ( $1088 \text{ cm}^{-1}$ ) et l'anhydrite ( $1017 \text{ cm}^{-1}$ , provenant du mode vibratoire symétrique  $\nu_1$  [108]) peuvent être détectés en balayant rapidement les fréquences Raman en variant le délai temporel entre les impulsions

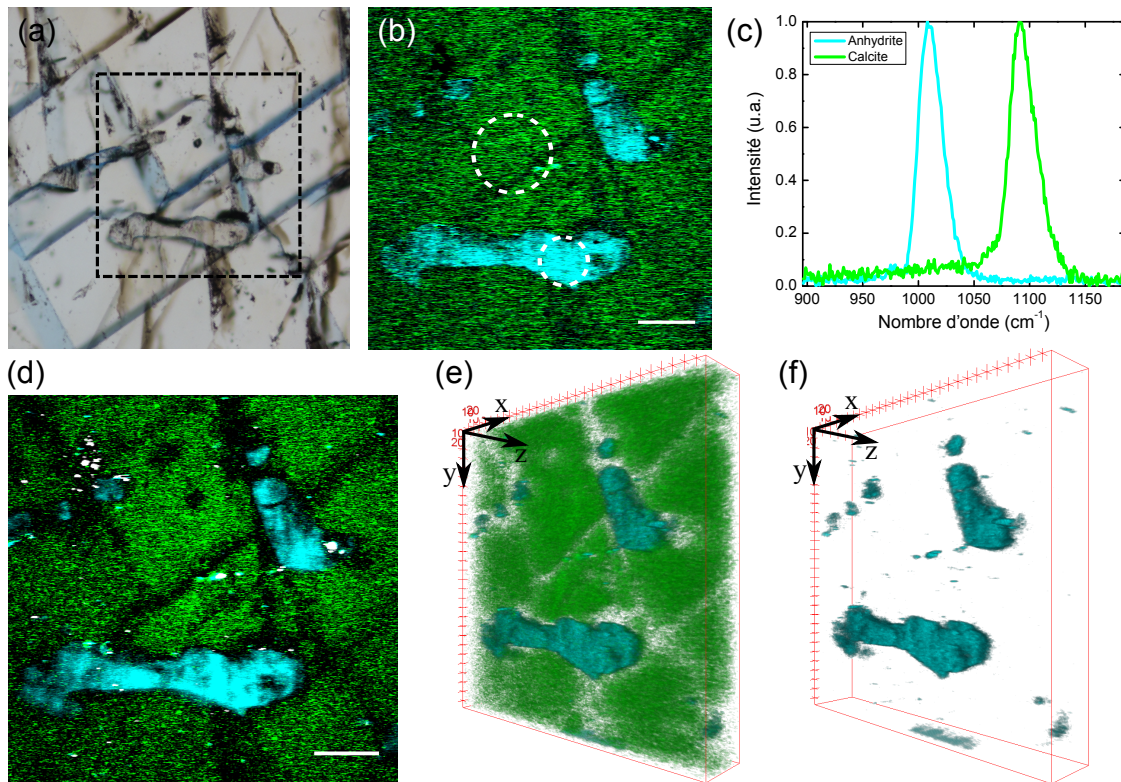


FIGURE 6.6 – Échantillon B-2 contenant des cristaux d’anhydrites isolées dans un large cristal de calcite. (a) Image sur fond clair par transmission de lumière de l’échantillon. Le carré représente la ROI imagée par le microscope SRS. (b) Image SRS de l’échantillon où la calcite est montrée en vert et l’anhydrite est affichée en cyan. La longueur d’onde du faisceau pompe est ajustée à 937 nm et le délai entre les impulsions pompe et Stokes est ajusté pour sonder la fréquence Raman de la calcite à  $1088\text{ cm}^{-1}$  ou la fréquence Raman de l’anhydrite à  $1017\text{ cm}^{-1}$ . (c) Spectre SRS des ROI présentées en (b). Les deux spectres sont acquis lors d’un seul balayage spectral SRS. Pour une meilleure visualisation, les spectres sont normalisés de telle sorte que leur intensité maximale est la même. (d) Image SRS de la projection maximale de l’intensité du volume acquis. Le signal provenant du canal Y de l’amplificateur à détecteurs synchrones est affiché en gris et représente le signal non-résonant provenant de la lentille thermique. (e) Image de la vue orthogonale du volume 3D de la ROI contenant le signal SRS de la calcite et de l’anhydrite. (f) Image de la vue orthogonale du volume 3D de la ROI présentant seulement le signal SRS provenant de l’anhydrite.  $I_p = 20\text{ mW}$ ,  $I_S = 40\text{ mW}$ . Temps d’acquisition des images SRS: 4s. Temps d’acquisition des spectres SRS: 9 min. Temps d’acquisition des images 3D: 20 minutes par longueur d’onde du faisceau pompe. Les barres d’échelles sont de  $50\text{ }\mu\text{m}$ .

pompe et Stokes. À la figure 6.6(b), nous présentons une image SRS composite où le signal SRS résonant provenant de la calcite est présenté en vert et le signal SRS provenant de l’anhydrite est présenté en cyan. Les spectres Raman des deux sous-régions désignées par les cercles pointillés à la figure 6.6(b) sont présentés à la figure 6.6(c). La figure 6.6(d) montre

une projection de l'intensité maximale du volume de l'échantillon, permettant d'obtenir une meilleure image de la forme des cristaux d'anhydrite. Le signal en gris montre le signal provenant du canal Y de l'amplificateur à détection synchrone. Ce canal est déphasé par rapport au canal X qui est utilisé pour acquérir le signal SRS (voir section 4.3.4). Le signal provenant du canal Y est le signal non-résonant provenant de la lentille thermique (TL). Étant donné que le signal non-résonant provenant de la TL est généralement déphasé par rapport au signal SRS, utiliser un amplificateur à détection synchrone permet de séparer ce signal non-résonant du signal SRS [135]. Le signal de TL est créé par de petites particules présentes dans l'échantillon qui absorbent la lumière et chauffent localement l'échantillon. Nous notons que le signal provenant de la TL peut apparaître dans le canal du signal SRS (canal X) et être faussement interprété comme de petits cristaux d'anhydrite. Encore une fois, un balayage spectral permet d'identifier sans ambiguïté la validité du signal SRS acquis. La figure 6.6(e) montre le volume 3D du signal SRS de la calcite et de l'anhydrite tandis que la figure 6.6(f) montre le volume 3D provenant du signal SRS de l'anhydrite seulement, permettant de bien identifier la forme et les frontières des cristaux.

À ce point dans la discussion, une comparaison entre le temps d'acquisition de la microscopie SRS et la microscopie Raman devrait être adressée. Le temps d'imagerie en microscopie Raman se situe habituellement entre plusieurs dizaines de minutes et quelques heures. Un microscope Raman moderne nécessite plusieurs heures pour faire l'acquisition d'une image de  $250 \times 250$  pixels avec un temps d'intégration d'au moins 0,02 s pour chaque pixel [94]. Ces images ont l'avantage de contenir un spectre Raman complet à chaque pixel. Pour obtenir le même résultat en utilisant la microscopie SRS, une quinzaine de spectres seraient nécessaires et le temps d'acquisition approcherait celui de la microscopie Raman conventionnelle. Toutefois, la microscopie SRS offre plusieurs autres options d'imagerie plus rapides telles que l'imagerie spectrale rapide d'une section précise du spectre Raman ou l'imagerie très rapide d'une région à une fréquence Raman fixe. Cette dernière possibilité permet l'imagerie d'un volume 3D en quelques minutes, ce qui n'est pas possible en microscopie Raman conventionnelle. L'imagerie rapide d'une section spécifique du spectre Raman peut rapidement se faire



dans un intervalle de temps se situant entre 5 et 10 minutes pour un intervalle de fréquence d'environ  $150 \text{ cm}^{-1}$ .

## 6.4 Imagerie de matière organique

L'imagerie par microscopie SRS de matières organiques dans les échantillons géologiques présente une difficulté supplémentaire par rapport à l'imagerie de minéraux. En effet, les minéraux ont souvent un spectre Raman composé seulement d'un mode Raman très étroit tandis que les matières organiques ont souvent des modes Raman très larges ou sont composées de plusieurs modes Raman très près les uns des autres. Ceci rend l'acquisition de spectres SRS plus difficile puisque, pour une longueur d'onde du faisceau pompe donné, l'acquisition d'un spectre SRS est limitée à un intervalle d'environ  $150 \text{ cm}^{-1}$ . Qui plus est, puisque les spectres Raman sont acquis par la corrélation croisée de deux impulsions gaussiennes, la forme des spectres acquis est déformée. De plus, dans la région des "fingerprints", plusieurs modes Raman peuvent être présents sur un intervalle se situant entre  $800$  et  $1700 \text{ cm}^{-1}$ . Il est ainsi nécessaire d'améliorer la méthode d'acquisition des modes Raman par rapport à ce qui est présenté à la section 6.3 dans le but de (i) faire l'acquisition de spectres Raman sur un plus grand intervalle de fréquences et (ii) calibrer l'intensité des différents spectres dans le but de mieux refléter la forme et l'intensité relative des différents modes Raman détectés. Nous avons ainsi construit une interface graphique sur Matlab permettant de faire automatiquement l'acquisition de plusieurs balayages spectraux à plusieurs longueurs d'onde du faisceau pompe. Cette interface graphique permet de faire l'acquisition d'un maximum de 12 balayages spectraux. Pour calibrer l'intensité des balayages spectraux, nous faisons l'acquisition du signal de TPF provenant de la fluorescéine dont la forme de l'intensité lors d'un balayage spectral est semblable à celui de la corrélation croisée des faisceaux pompe et Stokes. Le signal SRS collecté est ainsi divisé par le signal de TPF pour obtenir une courbe d'intensité plus près de la réalité.

Pour faire la preuve de concept de l'acquisition d'un large spectre SRS dans la région des "fingerprints", nous avons fait l'acquisition d'un spectre SRS d'huile minérale qui contient

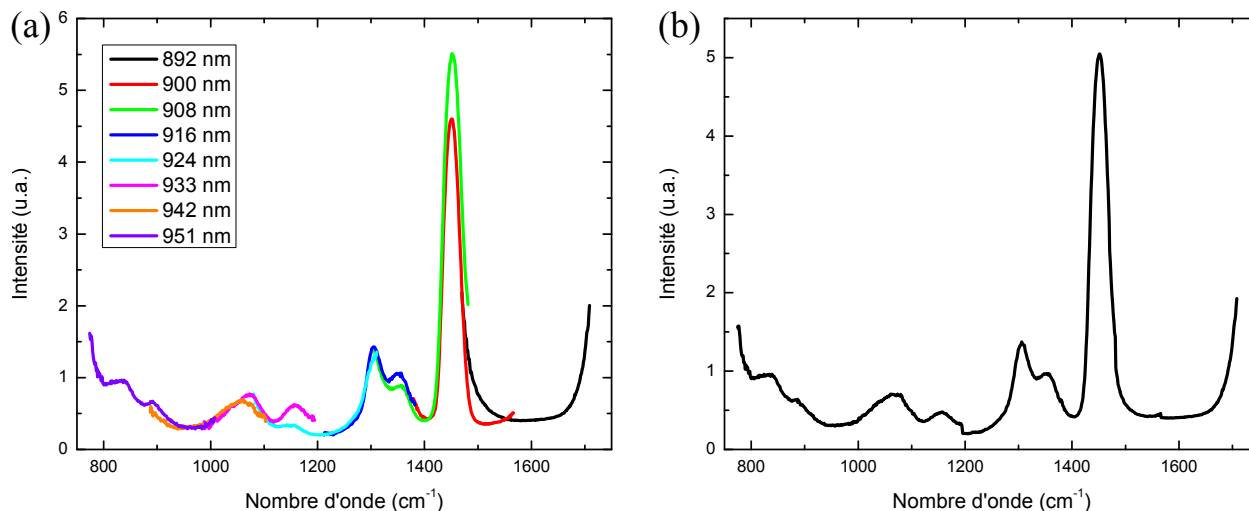


FIGURE 6.7 – Spectre SRS de l’huile minérale dans la région des “fingerprints”. (a) Spectre SRS entre 800 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  montrant les différents balayages spectraux acquis aux différentes longueurs d’onde du faisceau pompe. (b) Spectre SRS reconstruit à partir des différents balayages spectraux présentés en (a) et mis bout à bout.  $I_p = 50$  mW,  $I_S = 100$  mW. Temps d’acquisition du spectre SRS: 71 min.

plusieurs modes de résonance Raman dans cette région. Le spectre est présenté à la figure 6.7. La figure 6.7(a) montre les huit balayages spectraux individuels acquis à différentes longueurs d’onde du faisceau pompe. La longueur de chaque spectre est finement ajustée pour couper les extrémités des spectres où le bruit est trop important. Le décalage en hauteur est également finement ajusté pour que les différents spectres se rejoignent à leurs extrémités. La combinaison de ces différents spectres est présentée à la figure 6.7(b) pour former un spectre qui s’étend sur plus de 900  $\text{cm}^{-1}$ .

La figure 6.8 montre les spectres SRS d’un échantillon d’algues *Prasinophycées Tasmanite*. Cet échantillon génère également beaucoup de signaux non-résonants causés par l’ESA autour de l’échantillon d’algues. Ce type de signal non-résonant varie très lentement par rapport à la position de la platine de translation. La figure 6.8(a) montre l’image du signal SRS à la fréquence de résonance de l’algue ( $2867 \text{ cm}^{-1}$ ). La figure 6.8(b) montre l’image du signal SRS hors de la résonance de l’algue où le signal SRS provenant de l’algue est beaucoup plus faible tandis que le signal provenant de l’ESA est toujours présent. La figure 6.8(c) présente la soustraction des images (a) et (b), montrant le signal SRS provenant purement de l’algue. Il est à noter une ligne au centre de l’algue produit un signal plus élevé que le

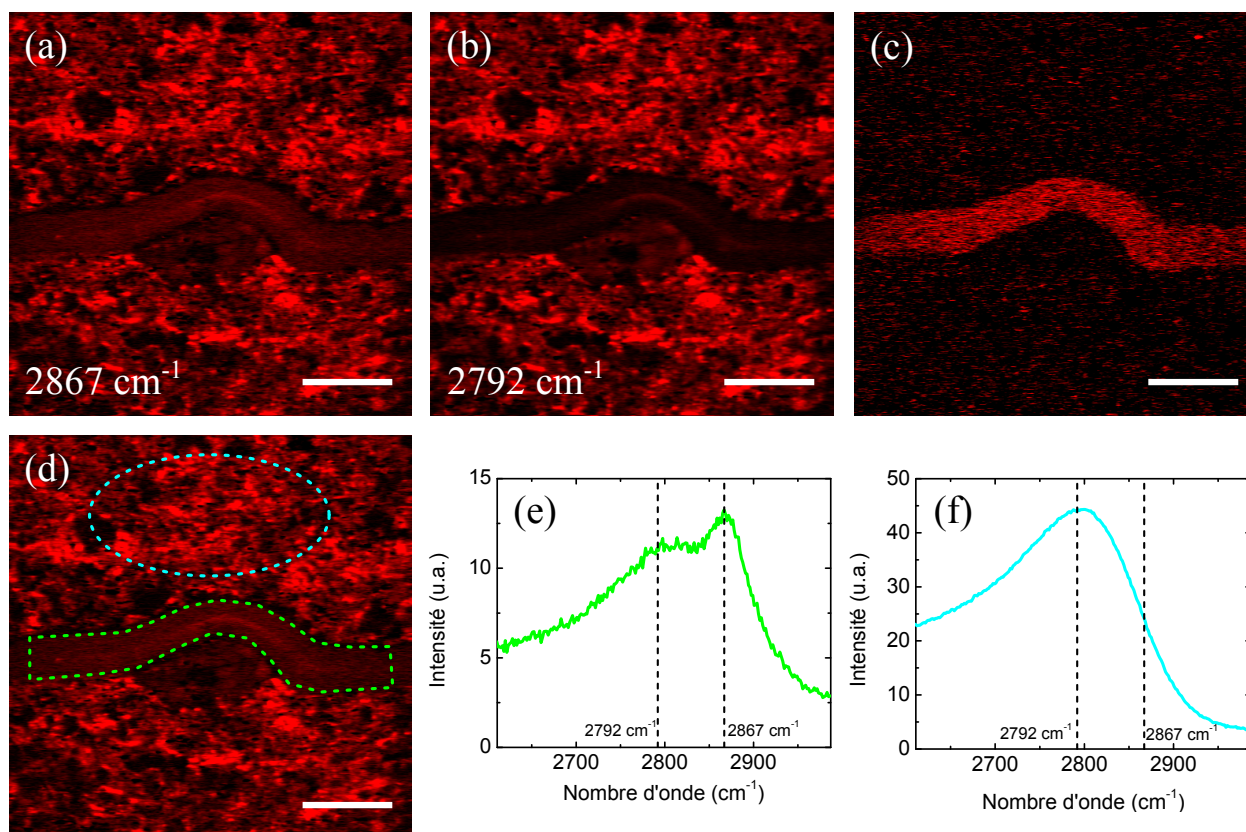


FIGURE 6.8 – Images SRS d'un échantillon d'algues Prasinophycées *Tasmanite*. (a) Image SRS à  $2867\text{ cm}^{-1}$  montrant le signal résonant provenant de l'algue ainsi que le signal non-résonant provenant de l'ESA. (b) Image SRS à  $2792\text{ cm}^{-1}$  où le signal SRS provenant de l'algue a disparu, mais le signal non-résonant est toujours visible. (c) Soustraction des images en (a) et (b) où le signal non-résonant est soustrait, mais le signal SRS résonant provenant de l'algue est toujours bien visible. (d) Images SRS montrant les régions utilisées pour construire les spectres SRS en (e) (vert) et (f) (bleu). (e) Spectre SRS brut de l'algue de la région indiquée en (d). Les lignes pointillées montrent les fréquences où les images en (a) et (b) ont été acquises. (f) Spectre SRS du signal non-résonant causé par l'ESA de la région indiquée en (d). Les lignes pointillées montrent les fréquences où les images en (a) et (b) ont été acquises.  $I_p = 15\text{ mW}$ ,  $I_S = 30\text{ mW}$ . Temps d'acquisition des images: 4 s. Temps d'acquisition des spectres SRS: 8 min. Barre d'échelle:  $50\text{ }\mu\text{m}$ .

signal SRS de l'algue. Cette ligne disparaît à la figure 6.8(c), indiquant que ce signal est produit par l'ESA. La figure 6.10(a) laisse supposer que ce signal provenant de l'ESA est produit par des particules plus foncées dans l'échantillon qui absorbe une partie de l'énergie du faisceau Stokes. Les figures 6.8(e) et (f) montrent les spectres SRS des régions indiqués à la figure 6.8(d). La figure 6.8(f) montre la forme asymétrique du spectre indiquant que le signal non-résonant est produit par l'ESA. Le spectre SRS de l'algue à la figure 6.8(e) montre qu'une

partie du signal collecté est générée par l'ESA. Ce spectre SRS montre également un mode Raman quelque peu étroit à  $2867\text{ cm}^{-1}$ . Puisque plusieurs types de matières organiques ont des spectres Raman très larges dans la région CH, il est possible que l'intervalle de fréquences que nous pouvons sonder sans changer la longueur d'onde du faisceau pompe implique que le spectre Raman dans la région CH ne peut pas être complètement acquis par un seul balayage spectral. Ainsi, plusieurs balayages spectraux sont nécessaires pour obtenir la forme complète du spectre SRS de l'algue dans la région CH.

Les figures 6.9(a) et (b) montrent le spectre SRS de l'échantillon d'algues dans la région CH. La figure 6.9(a) montre les différents balayages spectraux SRS acquis à plusieurs longueurs d'onde du faisceau pompe utilisé pour reconstruire le spectre SRS et celui-ci est reconstruit en calculant la moyenne de ces balayages spectraux, tel que présenté à la figure 6.9(b). Puisque la résolution spectrale de la méthode d'imagerie spectrale est moindre qu'en microscopie Raman conventionnelle ( $\sim 25\text{ cm}^{-1}$ ), il est possible que plusieurs modes de résonance Raman fusionnent pour former un spectre Raman très large avec des modes Raman vaguement distinguables. Ainsi, nous pouvons distinguer ce qui semble être trois modes de résonance Raman à  $\sim 2860\text{ cm}^{-1}$  (qui peut être visible par l'épaule à la gauche du spectre),  $\sim 2915\text{ cm}^{-1}$  (mode principal visible) et  $\sim 3040\text{ cm}^{-1}$  (faible épaule à droite du spectre). Le spectre SRS dans la région des "fingerprints" est également acquis et est présenté aux figures 6.9(c) et (d). La figure 6.9(c) montre huit balayages spectraux utilisant huit longueurs d'onde différentes tandis que la figure 6.9(d) montre le spectre SRS reconstruit à partir des balayages spectraux SRS de la figure 6.9(c). Quatre modes Raman distincts sont visibles sur ce spectre SRS à  $1096$ ,  $1306$ ,  $1440$  et  $1609\text{ cm}^{-1}$ . Entre  $800$  et  $1000\text{ cm}^{-1}$ , aucun mode Raman n'est visible. Il est toutefois possible que certains modes Raman soient présents, mais le bruit est trop important pour qu'ils soient détectables.

La figure 6.10 montre plusieurs types de signaux acquis par notre microscope multimodal et provenant de différents éléments de l'échantillon. La figure 6.10(a) montre une image sur fond clair par transmission de lumière de la ROI tandis que la figure 6.10(b) montre le signal de TPF de l'échantillon. La source principale de TPF provient de l'algue en tant que telle. Il est à noter que ce signal de TPF fait en sorte que la microscopie Raman ne peut être utilisée

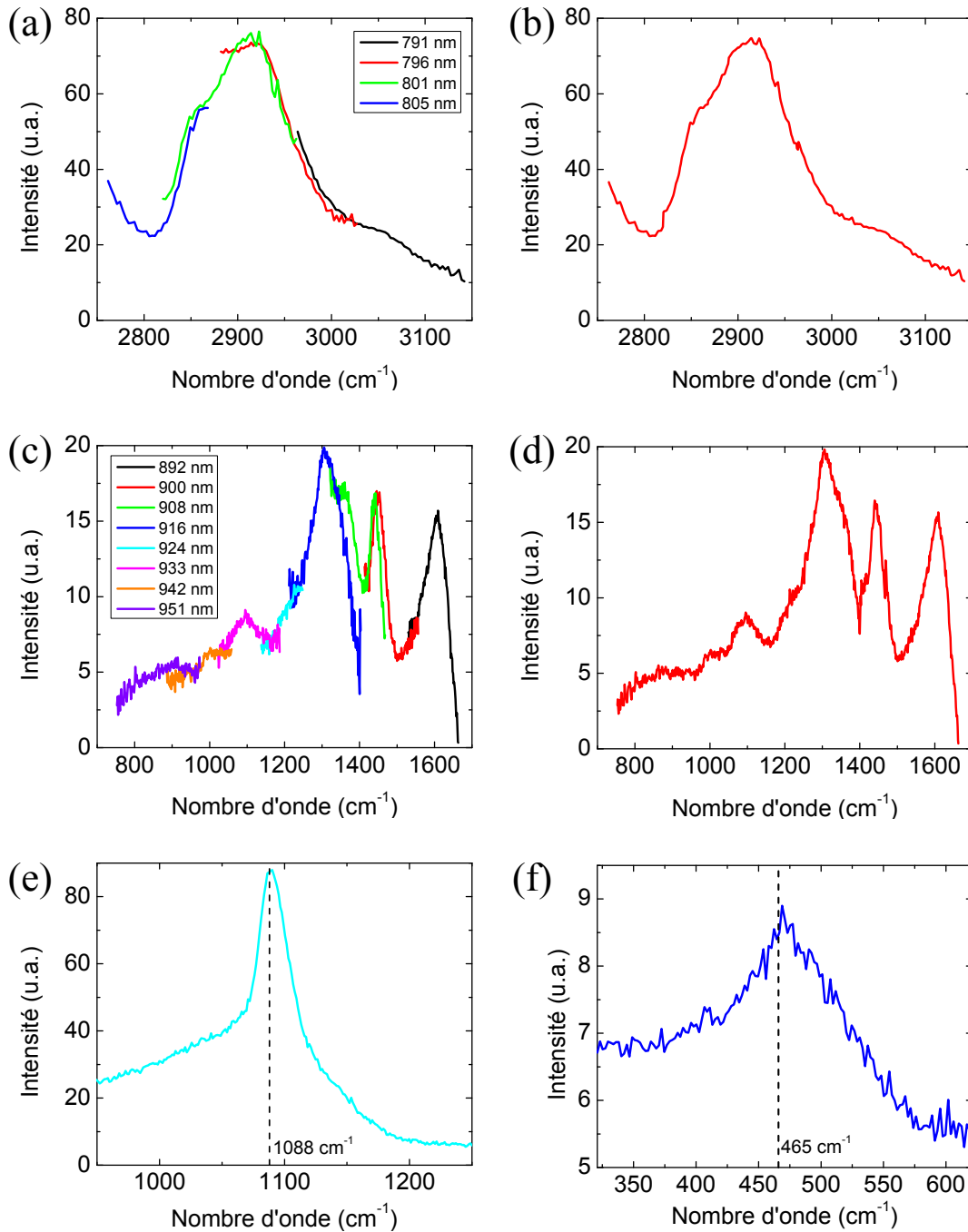


FIGURE 6.9 – Spectres SRS d'un échantillon d'algues Prasinophycées *Tasmanite*. (a) Spectre SRS dans la région CH montrant les différents balayages spectraux utilisés aux différentes longueurs d'onde du faisceau pompe. (b) Spectre SRS reconstruit à partir des balayages spectraux en (a) mis bout à bout. (c) Spectre SRS dans la région des "fingerprints" montrant les différents balayages spectraux utilisés aux différentes longueurs d'onde du faisceau pompe. (d) Spectre SRS reconstruit à partir des balayages spectraux de (c) mis bout à bout. (e) Spectre SRS de la calcite dans la région indiquée par un cercle à la figure 6.10(b). (f) Spectre SRS du quartz présent dans l'échantillon.  $I_p = 30$  mW,  $I_S = 50$  mW. Temps d'acquisition des spectres: (a-b) 17 min, (c-d) 71 min, (e) 9 min, (f) 5 min.



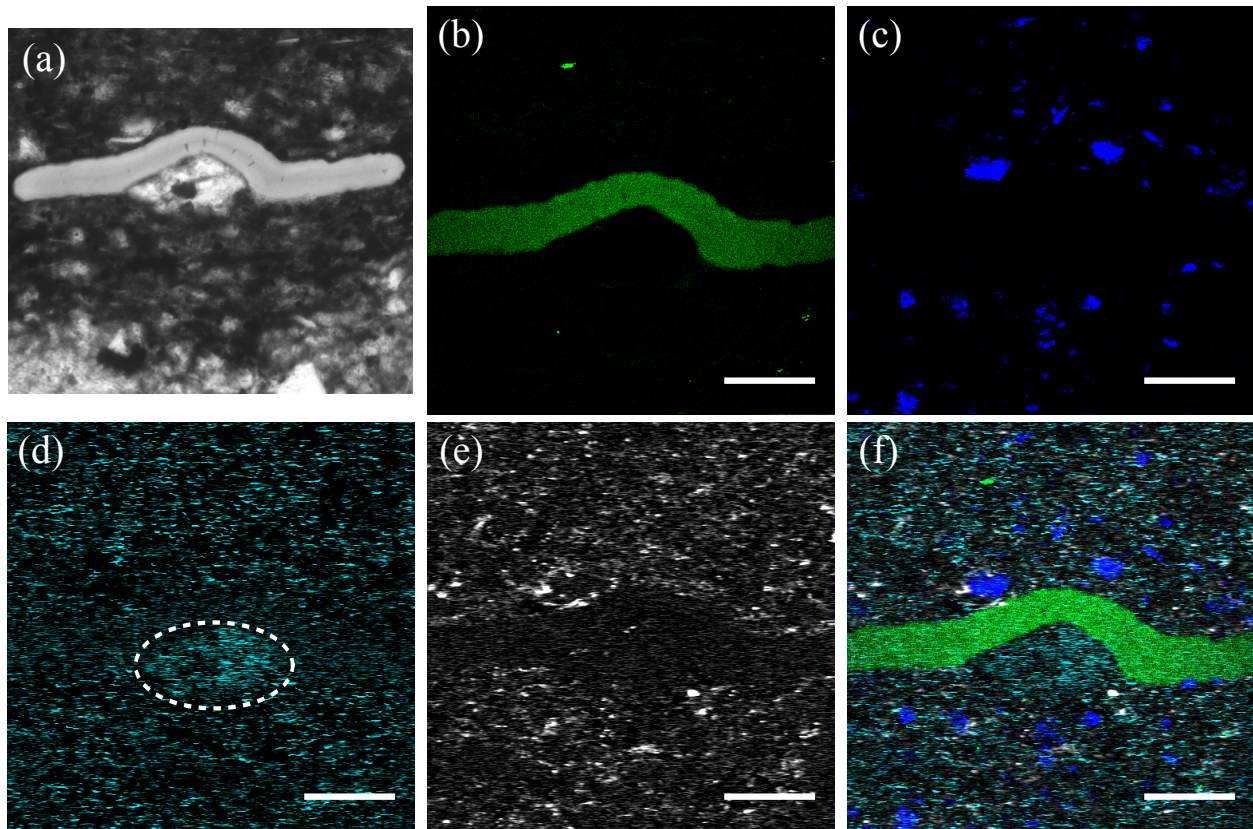


FIGURE 6.10 – Images d'un échantillon d'algues Prasinophycées *Tasmanite*. (a) Image sur fond clair par transmission de lumière de l'échantillon. (b) Image du signal de TPF montrant le signal produit par l'algue. (c) Image de seconde harmonique montrant le signal SHG produit par le quartz. (d) Image SRS montrant le signal produit par un cristal de calcite (région indiquée par le cercle). (e) Image du signal déphasé par rapport au signal SRS montrant le signal généré par le processus de TL. (f) Image composite des images (b) à (e).  $I_p = 10$  mW,  $I_S = 20$  mW. Temps d'acquisition des images: 4 s. Barre d'échelle: 50  $\mu\text{m}$ .

sur cet échantillon puisqu'il crée un bruit de fond qui rend l'acquisition du signal Stokes impossible. La microscopie SRS (ou CARS) devient ainsi la seule manière de détecter les modes Raman dans l'échantillon. La figure 6.10(c) montre le signal SHG provenant de petits cristaux de quartz. La présence de quartz est également démontrée en faisant l'acquisition du spectre SRS du quartz dans la ROI, ce qui est présenté à la figure 6.9(f). Un cristal de calcite est également présent en dessous de l'algue. Il est présenté à la figure 6.10(d) dans la région indiquée par le cercle pointillé. Le spectre SRS de la calcite dans la ROI est présenté à la figure 6.9(e). La figure 6.10(e) montre une image du signal déphasé par rapport au signal SRS et est collectée à partir du canal Y de l'amplificateur à détection synchrone (voir section 4.3.4). Le signal présenté sur cette image provient principalement du signal de

TL, qui est la plupart du temps déphasé par rapport au signal SRS [135]. La figure 6.10(e) montre la combinaison des images aux figures 6.9(b) à (e) et permet de mieux visualiser la superposition des différents signaux.

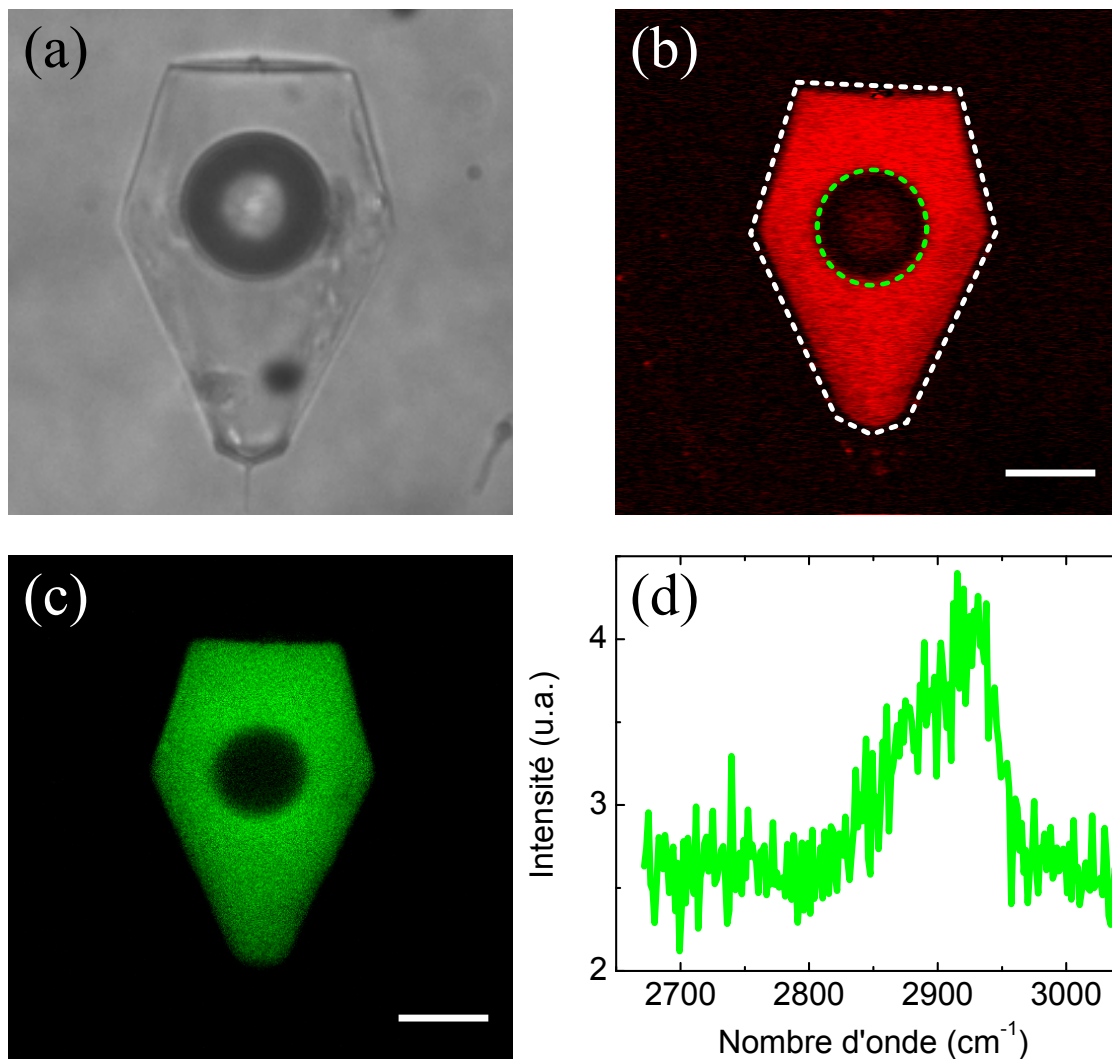


FIGURE 6.11 – Images d'une inclusion de fluide composée de pétrole brut dans un échantillon de fluorite. (a) Image sur fond clair par transmission de lumière de l'échantillon. (b) Image SRS de l'inclusion de fluide. Le cercle vert indique la région utilisée pour produire le spectre SRS en (d) et la région indiquée par la ligne pointillée blanche indique la région utilisée pour produire les spectres SRS à la figure 6.12. (c) Image de TPF de l'inclusion de fluide. (d) Spectre SRS de la bulle de gaz dans l'inclusion de fluides.  $I_p = 30$  mW,  $I_S = 60$  mW. Temps d'acquisition des images: 4 s. Temps d'acquisition du spectre SRS: 8 min. Barre d'échelle: 20  $\mu\text{m}$ .

La figure 6.11 présente les images du signal SRS et du signal de TPF d'une inclusion de pétrole brut présente dans un échantillon de fluorite. La figure 6.11(a) présente une

image sur fond clair par transmission de lumière de l'inclusion de fluide. Cette inclusion est principalement composée de liquides (pétrole brut), mais nous pouvons observer une bulle de gaz au centre de l'inclusion. La figure 6.11(b) présente une image du signal SRS provenant de l'inclusion de fluides à la fréquence Raman de  $2915\text{ cm}^{-1}$ . Bien que la majorité du signal provienne du liquide contenu dans l'inclusion de fluide, il semble qu'un faible signal soit également présent dans la bulle de gaz de l'inclusion. Le spectre SRS de la bulle de gaz dans la région incluse dans le cercle vert est présenté à la figure 6.11(d). Ce spectre SRS semble indiquer la présence de méthane qui est caractérisé par un mode de résonance Raman à  $2917\text{ cm}^{-1}$ . La figure 6.11(c) présente le signal de TPF de l'inclusion de fluide. Nous voyons que la TPS est principalement générée par le pétrole contenu dans l'inclusion de fluides. Encore une fois, à cause de la fluorescence générée par l'échantillon, l'imagerie spectrale de cet échantillon ne pourrait être faite en utilisant la microscopie Raman.

La figure 6.12 montre les spectres SRS de l'inclusion de fluide dans la région CH et dans la région des "fingerprints". La région utilisée pour l'analyse est indiquée par la ligne pointillée blanche de la figure 6.11(b). La figure 6.12(a) présente les différents balayages spectraux utilisés pour reconstruire le spectre SRS acquis à différentes longueurs d'onde du faisceau pompe. Le spectre SRS reconstruit en faisant la moyenne des différents balayages spectraux est présenté à la figure 6.12(b). Ce spectre semble indiquer la présence de deux modes de résonance principaux à  $\sim 2871$  et  $\sim 2905\text{ cm}^{-1}$ . Contrairement à l'échantillon d'algues, ce spectre SRS ne semble pas indiquer la présence de faibles modes de résonance Raman aux alentours des modes principaux. L'augmentation du signal SRS à  $< 2750\text{ cm}^{-1}$  est due à une augmentation du bruit causée par la normalisation du signal SRS. La figure 6.12(c) montre les différents balayages spectraux à différentes longueurs d'onde du faisceau pompe dans la région des "fingerprints". Huit spectres sont présentés et couvrent un intervalle de près de  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Le spectre SRS reconstruit à partir de ces balayages spectraux est présenté à la figure 6.12(d). Quatre modes de résonances Raman sont visibles sur ce spectre à  $1096$ ,  $1379$ ,  $1450$  et  $1618\text{ cm}^{-1}$ . Le mode Raman à  $1450\text{ cm}^{-1}$  est beaucoup plus intense que les autres modes Raman. Cet échantillon provient d'une région où de l'huile riche en alcanes (des hydrocarbures saturés) est commercialement extraite. L'huile minérale, dont le spectre



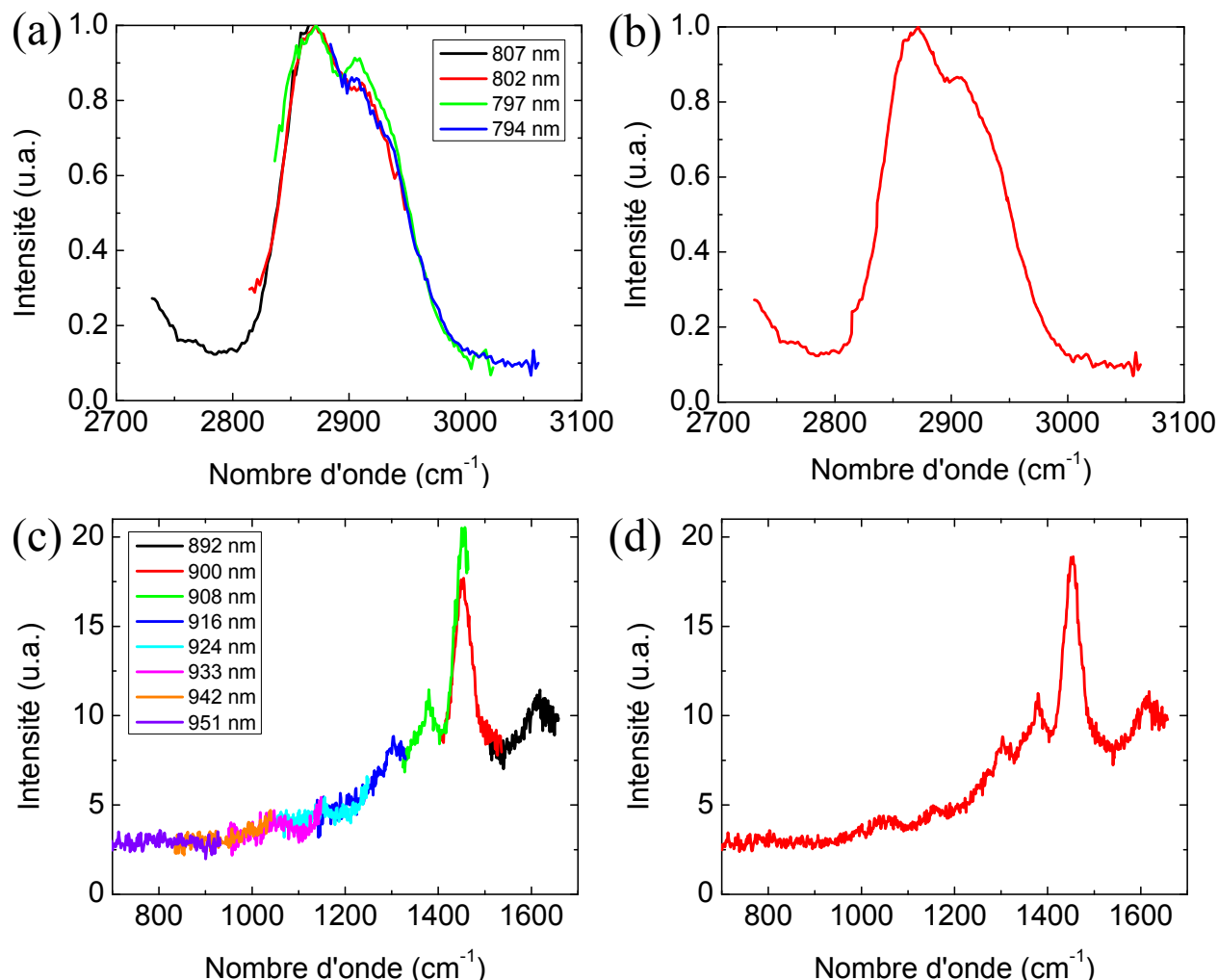


FIGURE 6.12 – Spectre SRS d’une inclusion de fluide composée de pétrole brut dans un échantillon de fluorite. (a) Spectre SRS dans la région CH montrant les différents balayages spectraux utilisés aux différentes longueurs d’onde du faisceau pompe. (b) Spectre SRS reconstruit en moyennant l’intensité des balayages spectraux présentés en (a). (c) Spectre SRS dans la région des “fingerprints” montrant les différents balayages spectraux utilisés aux différentes longueurs d’onde du faisceau pompe. (d) Spectre SRS reconstruit en prenant les spectres en (c) pour les mettre bout à bout.  $I_p = 30$  mW,  $I_S = 60$  mW. Temps d’acquisition des spectres: (a-b) 31 min, (c-d) 71 min.

SRS est présenté à la figure 6.7, est principalement composée d’alcane et montre un mode Raman très fort à  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Il est possible que ce mode Raman indique la présence d’alcane dans cette inclusion de fluide.

La figure 6.13 montre le potentiel de la microscopie SRS à enregistrer des volumes en trois dimensions. Les figures 6.13(a) et (b) montrent les vues de devant et de côté du volume 3D

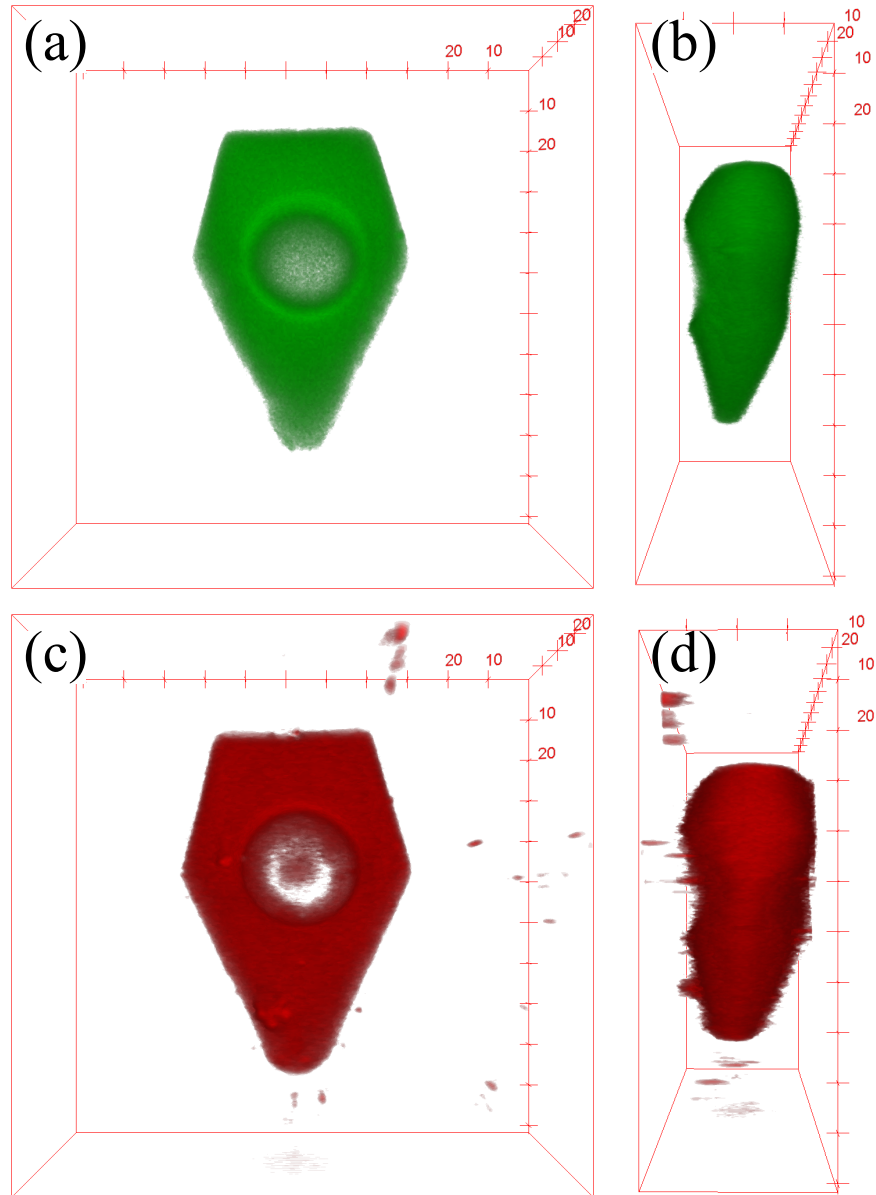


FIGURE 6.13 – Volume 3D d’une inclusion de fluide composée de pétrole brut dans un échantillon de fluorite. (a) Vu de devant et (b) de côté du volume 3D du signal de TPF d’une inclusion de fluide contenant de l’huile. (c) Vu de devant et (d) de côté (d) du volume 3D du signal SRS de l’inclusion de fluide. Le volume acquis est de  $112 \times 112 \times 40 \mu\text{m}$  et le temps d’acquisition est de 4 min.  $I_p = 20 \text{ mW}$ ,  $I_S = 40 \text{ mW}$ .

du signal de TPF tandis que les figures 6.13(c) et (d) présentent les vues de devant et de côté du signal de SRS à la fréquence Raman de  $2915 \text{ cm}^{-1}$ . Ces images permettent de bien voir la forme en trois dimensions de l’inclusion de fluide. La forme de l’inclusion provient des faces “négatives” du cristal de fluorite. Les différents petits points présents aux figures 6.13(c) et

(d) en dehors de l'inclusion de fluide sont des impuretés dans l'échantillon qui produisent du signal non-résonant.

Imager de la matière organique en utilisant la microscopie SRS pose certains défis supplémentaires par rapport à l'imagerie de minéraux. Premièrement, ces types d'échantillons ont une plus grande facilité à bruler et ainsi, la puissance des lasers pompe et Stokes ne doit pas être trop élevée. Ceci limite la sensibilité de détection du système de microscopie puisque le signal généré est moins élevé. Par exemple, le méthane présent dans l'inclusion de fluide à la figure 6.11 est très faible par rapport au bruit ambiant. Ensuite, spécialement dans la région CH, plusieurs modes de résonance Raman sont très larges et ne peuvent être complètement résolus en effectuant un seul balayage spectral puisque l'intervalle de fréquences qui peut être acquis est trop faible. Ainsi, plusieurs spectres SRS doivent être acquis à différentes longueurs d'onde du faisceau pompe, augmentant la durée d'acquisition et la complexité de l'analyse des images. Pour résoudre partiellement ce problème, des interfaces graphiques furent construites sur Matlab dans le but de (i) réduire le nombre de commandes manuelles nécessaire pour faire l'acquisition d'un spectre SRS et (ii) faciliter le traitement des images. De plus, à cause de la largeur des modes Raman et de la corrélation entre le délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes et l'intensité du signal pouvant être généré, les spectres SRS se trouvent souvent déformés. Pour résoudre ce problème, nous faisons également l'acquisition du signal de TPF de la fluorescéine en fonction du délai temporel. L'intensité du signal de TPF de celle-ci est semblable à l'intensité de la corrélation croisée entre les faisceaux pompe et Stokes. Le balayage spectral SRS est ensuite divisé par le signal de TPF en fonction du délai temporel pour obtenir le signal SRS normalisé en intensité. Un autre problème dont nous faisons face en imageant de la matière organique est la présence de certains types de signal non-résonant, notamment l'ESA. En faisant l'acquisition de balayages spectraux, le signal provenant du processus d'ESA est également acquis et présente une forme asymétrique (voir figures 6.8(e) et (f)). Ce signal est visible à la partie gauche du spectre même lorsque les impulsions pompe et Stokes ne se chevauchent pas. Ceci est d'autant plus problématique lorsqu'une calibration de l'intensité est appliquée sur les balayages spectraux et amplifie le signal provenant du processus d'ESA dans les fréquences plus basses des ba-

layages spectraux. Actuellement, pour limiter cet effet indésirable, nous réduisons la taille des balayages spectraux traités pour ne pas inclure la partie la plus à gauche des spectres. Toutefois, une méthode plus directe pour réduire le signal provenant de l'ESA serait la bienvenue. Des résultats préliminaires utilisant la modulation de la polarisation pour éliminer le signal provenant de l'ESA semblent prometteurs, mais une analyse plus poussée serait nécessaire. De plus, moduler la polarisation nécessite d'envoyer une plus grande puissance du faisceau Stokes dans l'échantillon, ce qui peut être problématique dans des échantillons où la matière organique brûle facilement.

## 6.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré la première utilisation de la microscopie SRS dans le but d'imager des échantillons minéralogiques, des inclusions de fluides et de la matière organique à l'intérieur d'échantillons minéralogiques. Contrairement à la microscopie Raman, la microscopie SRS peut produire des images 3D à haute résolution chimiquement spécifique en quelques minutes, même lorsque l'échantillon produit de la fluorescence. L'imagerie spectrale permet un balayage rapide d'une partie du spectre Raman dans un intervalle de  $\sim 150 \text{ cm}^{-1}$  sans avoir à changer la longueur d'onde du laser pompe, comme démontré par l'imagerie de minéraux ayant des fréquences Raman près l'un de l'autre (calcite et anhydrite). L'intervalle de fréquence Raman que nous pouvons sonder dans ce montage se situe entre 400 et 4500  $\text{cm}^{-1}$ . La microscopie SRS peut également être combinée à la microscopie SHG dans le but de fournir des informations sur la structure cristallographique de minéraux non-centrosymétriques. Nous pouvons détecter le signal de TPF provenant de la matière organique contenue dans certains échantillons géologiques. Nous avons démontré que, bien que la microscopie SRS ne soit pas affectée par le mélange à quatre ondes comme c'est le cas pour la microscopie CARS, elle est toutefois affectée par d'autres formes de signal non-résonant. Dans ce chapitre, nous avons identifié deux types de signaux non-résonants qui ont affecté l'imagerie de nos échantillons: l'absorption des états excités (ESA) et la lentille thermique (TL). Par exemple, l'imagerie de l'échantillon B-1 (foraminifère fossilisée, voir fi-

gure 6.5) est affectée par la présence de signal non-résonant provenant de l'ESA tandis qu'un signal provenant de la TL est détecté dans les images de l'échantillon B-2 (voir figure 6.6). Ainsi, nous soulignons qu'effectuer un balayage spectral du spectre SRS pour obtenir le spectre des modes Raman est nécessaire, dans ces cas, pour confirmer la nature chimique des éléments imagés. Le signal non-résonant causé par les signaux de TL, XPM, ESA et TPA peut contribuer à l'intensité du signal détecté par le système d'imagerie, mais leur spectre SRS n'est pas constitué de pics étroits tels que c'est habituellement le cas pour les modes Raman d'échantillons géologiques. L'imagerie SRS par point spectral unique qui est basée sur l'intensité du signal SRS à une fréquence Raman précise, pourrait ne pas être capable de distinguer le signal SRS résonant et le signal non-résonant. Un des désavantages du montage actuel est que les balayages spectraux sont limités à un intervalle spectral d'environ  $150 \text{ cm}^{-1}$ . Ceci est d'autant plus problématique lors de l'imagerie de matières organiques qui sont souvent composées de modes Raman larges dans la région CH en plus de posséder plusieurs modes Raman répandues dans la région de "fingerprints". Il est prévu d'augmenter la largeur spectrale du faisceau Stokes à l'aide d'une fibre non-linéaire. Ceci permettrait d'augmenter l'intervalle pour laquelle nous pouvons effectuer un balayage spectral sans avoir à changer la longueur d'onde du faisceau pompe. Ce chapitre démontre l'utilité de la microscopie SRS pour des applications dans les sciences de la Terre, particulièrement dans les domaines de la minéralogie, la pétrologie et les communautés de recherche minière.



# Chapitre 7

## Comparaison de la structure du collagène de types I et II à l'aide de la microscopie à génération de seconde harmonique (SHG)

Ce chapitre porte sur un sujet qui est légèrement différent des chapitres précédents, mettant l'accent sur la microscopie SHG plutôt que sur la microscopie SRS. En effet, cette étude est une continuité de mon projet de maîtrise [79] qui portait essentiellement sur la microscopie à génération de seconde harmonique (SHG) appliquée au cartilage articulaire. Alors que je débutais mon doctorat, une occasion s'est présentée de travailler sur ce projet, ce qui a mené à la publication d'un article scientifique [81] dont les résultats sont présentés dans ce chapitre.

## 7.1 Mise en contexte

Les tissus connectifs, tels que la peau, les tendons, l'os et la cornée, sont essentiellement composés de cellules et de la matrice extracellulaire. Plus de 90 % de cette matrice extracellulaire est composée de protéines, le collagène fibrillaire étant la composante principale. Synthétisées par les cellules en un hélix triple, les molécules de collagène s'assemblent pour former des fibrilles de diamètre et de distribution variable [11, 85]. La remarquable diversité de l'organisation moléculaire et supramoléculaire [92, 161] de ces protéines mène à la classification du collagène en plusieurs types. Chaque type de collagène possède une structure macromoléculaire et une fonction spécifique. Leur organisation dans la matrice extracellulaire des tissus connectifs est essentielle pour maintenir leur intégrité. Les changements structurels dans la matrice fibrillaire sont associés à des processus physiologiques durant le développement, le remodelage, le vieillissement, la guérison de blessures et la maladie des tissus [65, 116, 146]. Pour nos expériences, nous nous concentrons sur le collagène de types I et II. Le collagène de type I est le plus commun et est la principale composante de l'os tandis que le collagène de type II est moins abondant et est retrouvé presque essentiellement dans le cartilage articulaire.

La microscopie SHG est un processus non-linéaire multiphoton qui n'implique pas de transfert de population électronique, ce qui prévient le photoblanchiment et la phototoxicité. Le processus SHG se produit seulement en présence de molécules non-centrosymétriques tel que le collagène [53, 185, 186, 215]. Ceci fait de la microscopie SHG un outil de choix pour l'étude de la structure de collagène, à la fois *in vivo* et *ex vivo* [68, 168, 204]. Dans le but d'extraire des informations supplémentaires, la microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG) a été développée dans les dernières années [1, 43, 69, 120, 187, 190, 208]. Cette technique utilise un angle de polarisation variable du faisceau incident pour obtenir la distribution azimutale de l'orientation des fibrilles de collagène dans l'échantillon. Étant donné que le diamètre des fibrilles de collagène (10 à 300 nm) est beaucoup plus petit que la résolution optique, ils ne sont pas résolus individuellement dans l'image SHG, mais c'est plutôt l'addition cohérente du signal SHG des fibrilles se trouvant dans le volume focal qui est dé-



tecté. Il devient alors plus difficile d'utiliser le signal SHG pour interpréter l'arrangement du collagène à un niveau fibrillaire. En effet, à cause de la nature cohérente du processus SHG, le signal détecté est plus complexe à interpréter que le signal de fluorescence. En particulier, le signal SHG qui est émis conserve la phase de l'excitation et l'addition cohérente des différents photons émis joue un rôle clé dans l'intensité du signal SHG et sa direction [123]. En effet, les images acquises dans les directions forward et backward présentent des différences structurelles bien distinctes à cause de la différence des conditions d'accord de phase, ce qui offre l'opportunité d'obtenir des informations complémentaires à partir de la directionnalité du signal [36, 102, 104, 163].

Dans ce chapitre, nous étudions la différence structurelle entre le collagène de type I de l'os et le collagène de type II du cartilage articulaire. En particulier, nous utilisons la microscopie SHG résolue en polarisation et une analyse du ratio forward sur backward (F/B) du signal SHG pour caractériser l'organisation des fibrilles de collagène dans les deux tissus. Finalement, nous combinons les mesures du ratio F/B avec un modèle numérique pour mesurer la variation du diamètre des fibrilles de collagène dans le cartilage articulaire en fonction de la profondeur à partir de la surface.

## 7.2 Montage expérimental

### 7.2.1 Montage optique

Un schéma du montage optique utilisé est présenté à la figure 7.1. Un laser Titane:Saphir (Tsunami, Spectra Physics, USA) est utilisé pour générer des impulsions lasers d'environ 150 fs dont la fréquence centrale est fixée à 810 nm et le taux de répétition est de 80 MHz. La puissance du faisceau laser est ajustée à l'aide d'une lame demi-onde et d'un polariseur de Glan-Thomson. La taille du faisceau est agrandie à l'aide de deux lentilles pour permettre de remplir l'ouverture de l'objectif de microscope et maximiser l'ouverture numérique pour atteindre une résolution spatiale typique de 600 nm. Les images sont acquises à l'aide d'un

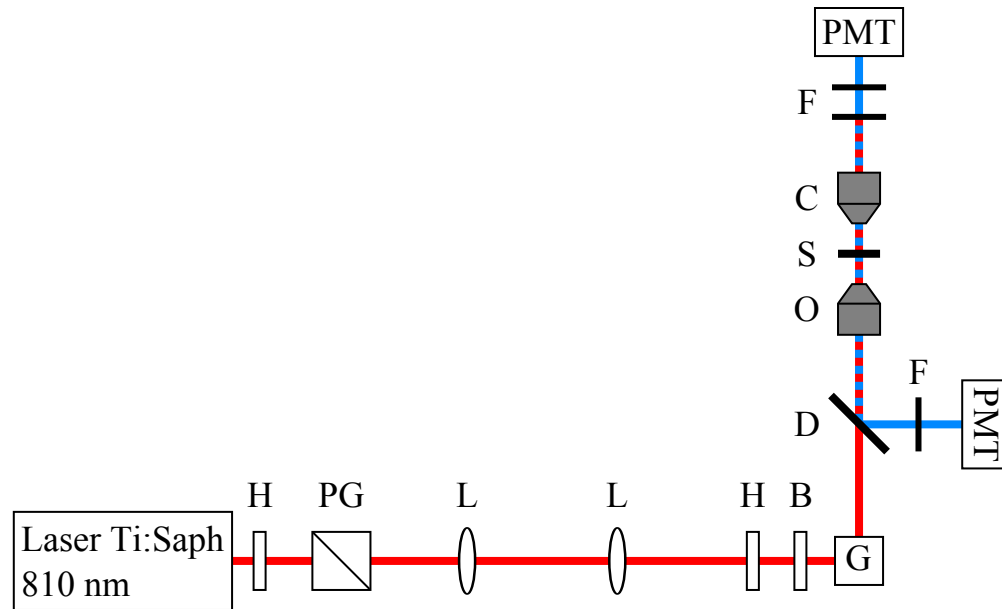


FIGURE 7.1 – Montage expérimental utilisé pour les expériences: (H) lame demi-onde, (PG) Polariseur de Glan, (L) Lentille, (B) Compensateur de Berrek, (G) Miroirs Galvanométriques, (D) Miroir Dichroïque, (F) Filtre, (O) Objectif, (S) Échantillon, (C) Condensateur, (PMT) Tube photomultiplicateur.

microscope à balayage laser (Till Photonics GmbH, Allemagne) basé sur des miroirs galvanométriques. L'objectif utilisé pour focaliser le faisceau laser a un grandissement de 20X et une ouverture numérique de 0,75 (UplanSApo, Olympus, Japon). Une platine de translation mécanique et piézoélectrique est utilisée pour un ajustement grossier et fin de la hauteur de l'objectif du microscope.

Le signal SHG est collecté dans les directions forward et backward et est détecté à l'aide de tubes photomultiplicateur (PMT) (R6357, Hamamatsu Corporation, New Jersey, É.-U.) dont le voltage est ajusté à 600 V. Des filtres sont utilisés devant les PMT pour bloquer la lumière du faisceau pompe (BP-380-700nm, SEMRock, Rochester, NY, É.-U.) et sélectionner la longueur d'onde d'intérêt (405/10, SEMRock, Rochester, NY, É.-U.). Dans la direction forward, le signal est collecté en utilisant un objectif avec une ouverture numérique de 0,8 (40X, Olympus, Japon). Nous nous sommes assuré que l'ouverture numérique est plus élevée que l'objectif de microscope pour faire en sorte que toute la lumière soit collectée dans la direction forward. Dans la direction backward, le signal SHG est collecté à l'aide de l'objectif

de microscope et réfléchi sur un miroir dichroïque (FF735-Di01-25x36, SEMRock, Rochester, NY, É.-U.) vers le PMT.

L'imagerie SHG résolue en polarisation est obtenue en ajustant l'angle de la polarisation du faisceau pompe à l'aide d'une lame demi-onde (Thorlabs, Newton, NJ, É.-U.) installée devant les miroirs galvanométriques. Un compensateur de Berek (Newport, Irvine, CA, É.-U.) est positionné immédiatement après la lame demi-onde dans le but de précompenser l'ellipticité induite par le miroir dichroïque située à l'intérieur du microscope. Pour chaque région d'intérêt (ROI), les images sont acquises en variant l'angle de la polarisation entre 0 et 180° avec des incréments de 10°.

### 7.2.2 Préparation des échantillons

Quatre échantillons sont obtenus à partir de plateau tibial humain de patients subissant une amputation au dessus du genou. Chaque échantillon est coupé perpendiculairement à la surface du cartilage et les sections sont fixées à l'aide d'une solution de formaline à une concentration de 10 % durant 12 heures. Les échantillons sont décalcifiés durant 24 heures en utilisant de l'acide nitrique et sont scellés dans de la cire. Les échantillons sont coupés en utilisant une microtome Leica rM2135 (Leica Microsystems, Allemagne) et des tranches de 10  $\mu\text{m}$  sont déposées entre une lame de microscope et une lamelle de microscope numéro 1. Les échantillons sont observés à l'aide du microscope SHG sans préparations supplémentaires ou coloration. Une goutte d'eau est déposée sur le dessus de la lamelle de microscope pour prévenir la réflexion du signal de SHG forward dans la direction backward, ce qui affecterait le ratio entre l'intensité du signal SHG dans les directions forward et backward.

### 7.2.3 Simulations numériques

Des simulations numériques sont utilisées pour calculer l'intensité du signal SHG dans les directions forward et backward en fonction du diamètre des fibrilles. Ceci nous permet de produire une analyse quantitative des images SHG en fonction de la structure de collagène

du tissu. Pour une description plus complète des calculs, se référer aux références [19, 169]. Les simulations ont été effectuées par l'équipe du Dr Lora Ramunno. Dr Konstantin Popov a écrit le code original et Jarno N. Van der Kolk l'adapta pour les besoins de ces recherches et fournit les résultats des simulations.

Brièvement, les échantillons étaient modélisés comme un assemblage de cylindres infiniment longs se trouvant au plan focal. Les fibrilles ont toutes le même diamètre  $d$ . La réponse non-linéaire de chaque cylindre est décrite par une susceptibilité non-linéaire  $\chi^{(2)}$  scalaire constante [168] dont le signe (c'est-à-dire l'orientation) est assigné de manière aléatoire. Dans ce modèle, toutes les fibrilles sont alignées parallèlement à la polarisation du faisceau laser, ce qui génère le maximum d'intensité du signal SHG à la fois dans les directions forward et backward. Le modèle est caractérisé par un ratio de remplissage ( $\rho$ ) qui indique la fraction du volume qui est occupé par les fibrilles dans le volume focal. Également, l'indice de réfraction est gardé constant à 1,4. Le faisceau laser utilisé dans le modèle est un faisceau de profil Gaussien dont la longueur d'onde est centrée à 810 nm et la largeur du faisceau au plan focal est de 1,25  $\mu\text{m}$ . Le tissu simulé est utilisé pour calculer l'intensité des signaux SHG dans les directions forward et backward. Le signal SHG de chaque fibrille individuelle a été calculé numériquement en utilisant une modification vectorielle de l'approche de la fonction de Green scalaire [14]. Ensuite, l'intégrale sur le volume entier de chaque cylindre est utilisée pour calculer le vecteur de Hertz dans le champ lointain et calculer l'amplitude totale du signal SHG.

Il est à noter que le maillage de collagène du cartilage articulaire est très désorganisé et ne présente pas la périodicité requise pour produire une contribution cohérente significative du signal SHG émis dans la direction forward et réfléchi dans la direction backward. De plus, la faible différence des indices de réfraction se solde par un coefficient de réflexion de Fresnel très bas. Finalement, les échantillons utilisés pour les expériences sont très minces et ne rétrodiffusent pas suffisamment de signaux SHG forward pour que celui-ci soit perceptible dans la direction backward. Ainsi, nous négligeons la contribution forward réfléchie et rétrodiffusée dans le calcul du signal SHG dans la direction backward.

Le signal SHG dans les directions forward et backward dans le tissu modélisé est entièrement décrit à travers les paramètres  $d$  (diamètre des fibrilles),  $\rho$  (ratio de remplissage) et le ratio de fibrilles ayant un  $\chi^{(2)}$  positif (ratio  $f$  [169]). Puisque le signal de SHG dépend de la structure locale du tissu, l'intensité moyenne est calculée à partir de 1000 modèles de tissu générés aléatoirement pour chaque valeur de  $\rho$  et  $d$ .

## 7.3 Résultats et discussion

### 7.3.1 Comparaison entre le signal SHG dans les directions forward et backward

La figure 7.2 montre des images SHG dans les directions forward (figure 7.2(a)) et backward (figure 7.2(b)) d'un échantillon à la jonction du cartilage articulaire et de l'os provenant de genoux humains. La partie supérieure des images présente le collagène de type II provenant du cartilage articulaire tandis que la partie inférieure des images présente le collagène de type I provenant de l'os. Ces images mettent en valeur les différents arrangements structuraux visibles par l'imagerie SHG du collagène de types I et II dans le tissu. Nous observons tout d'abord que l'intensité du signal SHG provenant du cartilage est plus uniforme que celui de l'os, à la fois dans les directions forward et backward. De plus, dans la direction forward, le signal SHG provenant de l'os semble significativement plus élevé que le signal SHG provenant du cartilage tandis que dans la direction backward, l'intensité provenant des deux types de collagène est du même ordre d'intensité.

Les figures 7.2(c) et (d) montrent les histogrammes de la distribution de l'intensité du signal SHG à partir d'une ROI de  $100 \times 100 \mu\text{m}$  d'os et de cartilage. Les ROIs sélectionnées ne contiennent pas, ou très peu, de cellules. La taille des ROIs sélectionnées est choisie pour assurer une relative planéité de l'échantillon. En effet, puisque les échantillons ont une épaisseur de  $10 \mu\text{m}$ , une légère ondulation de l'échantillon peut causer une partie de la ROI à se retrouver hors foyer. Sélectionner une ROI relativement petite nous permet

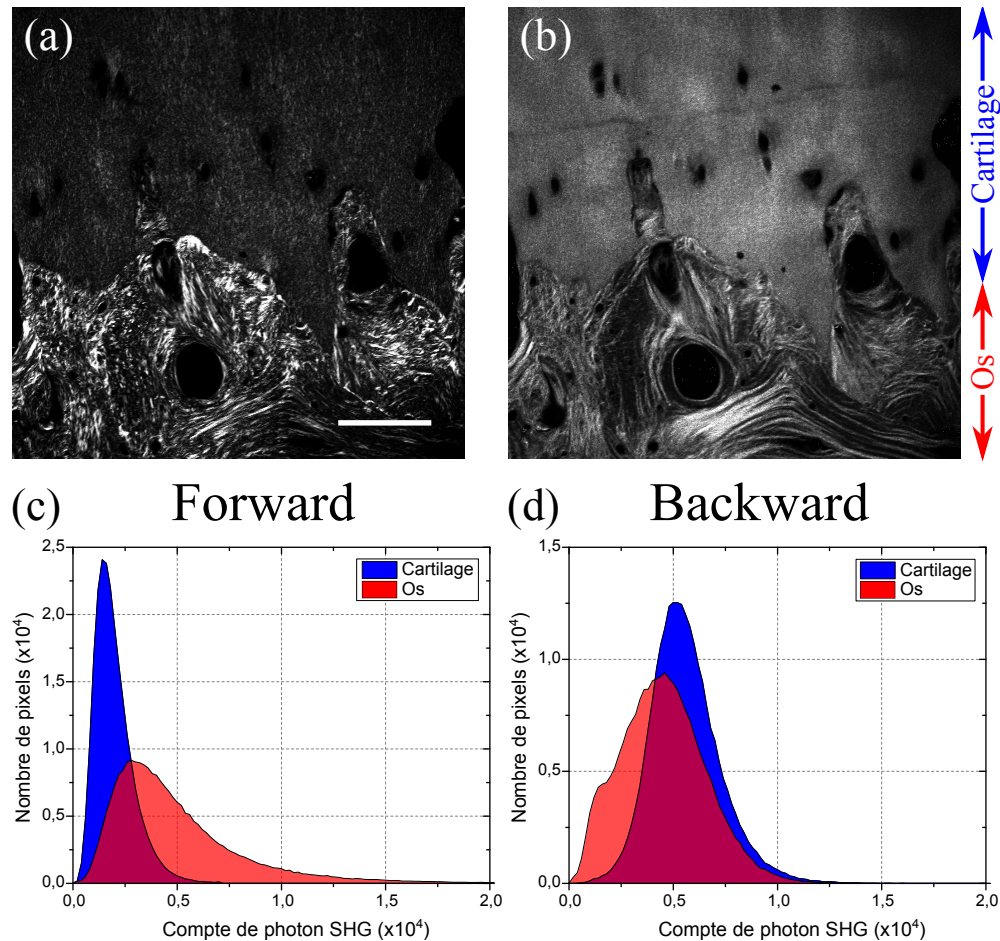


FIGURE 7.2 – (a-b) Image typique de seconde harmonique (SHG) du collagène de type I provenant de l’os (bas de l’image) et du collagène de type II provenant du cartilage articulaire (haut de l’image) acquis dans les directions (a) forward et (b) backward. (c-d) Histogramme de la distribution de l’intensité du signal SHG provenant du collagène dans l’os et le cartilage articulaire dans les directions (c) forward et (d) backward. Barre d’échelle: 100  $\mu\text{m}$ . Figure modifiée de [81].

d’éviter une variation de l’intensité due à une partie de l’échantillon se trouvant hors foyer ce qui diminuerait grandement la qualité du signal SHG généré. De plus, puisque nous utilisons différentes puissances du faisceau laser pour l’imagerie dans les directions forward et backward, l’intensité est normalisée en divisant l’intensité du signal par le carré de la puissance du faisceau laser. Les histogrammes confirment que l’intensité du signal SHG dans la direction backward est semblable pour les deux types de collagène, les deux distributions ayant un nombre similaire de comptes de photons moyens ( $\sim 5000$  comptes). Toutefois, la distribution du signal dans la direction forward change drastiquement selon le type de tissus.

En effet, le signal SHG dans le cartilage est relativement uniforme, ce qui est visible par la faible largeur de la courbe de l'histogramme de la figure 7.2(c) tandis que la variation de l'intensité du signal SHG dans l'os est très grande. En effet, le nombre de comptes moyen est plus élevé, le signal est distribué sur un intervalle bien plus grand et certains pixels présentent une intensité très élevée (plus de 10 000 comptes).

La différence de distribution de l'intensité du signal SHG dans les directions forward et backward peut être comprise en considérant l'organisation fibrillaire des deux tissus et l'accord de phase nécessaire pour obtenir un signal SHG. En effet, le signal SHG est directement affecté par l'organisation des fibrilles sur une échelle de longueur équivalant à la longueur de cohérence,  $l_c = \pi/\Delta k$ , où  $\Delta k$  est le désaccord de phase. À cause de la géométrie de détection, la longueur de cohérence dans la direction backward ( $\sim 70$  nm) [19] est plus petite que le diamètre typique d'une fibrille ( $\sim 100$  nm) [87]. Ainsi, l'organisation des fibrilles dans le tissu et la formation de regroupements de fibrilles n'influence pas l'intensité du signal. Ceci explique pourquoi le signal SHG dans la direction backward reste relativement uniforme, peu importe le type de collagène. Toutefois, dans la direction forward, la longueur de cohérence est de l'ordre du micron, ce qui est considérablement plus élevé que le diamètre d'une fibrille. Dans ce cas-ci, l'organisation des fibrilles joue un très grand rôle sur l'intensité du signal SHG. Ainsi, le signal SHG dans la direction forward résulte de la moyenne de la taille, de l'organisation et de l'orientation des fibrilles dans le volume focal. Ceci mène à une grande variation de l'intensité du signal SHG dans la direction forward, ce qui n'est pas visible dans la direction backward. En particulier, les pixels dont l'intensité est élevée (bas de la figure 7.2(a)) révèlent la présence de regroupements de fibrilles de collagène type I dont la polarité est la même. Les regroupements de fibrilles se soldent par un signal SHG dans la direction forward très élevé à cause de l'addition cohérente du signal SHG de plusieurs fibrilles dans le volume focal. Toutefois, le signal SHG dans la direction backward n'est pas affecté [123] puisque le diamètre des fibrilles est plus grand que la longueur de cohérence. Cet effet est peu visible dans le cartilage (collagène de type II), ce qui indique peu de regroupements fibrillaires dans ce tissu et une organisation quasi aléatoire des fibrilles de collagène à une échelle micrométrique.



### 7.3.2 Microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG) dans l'os et le cartilage

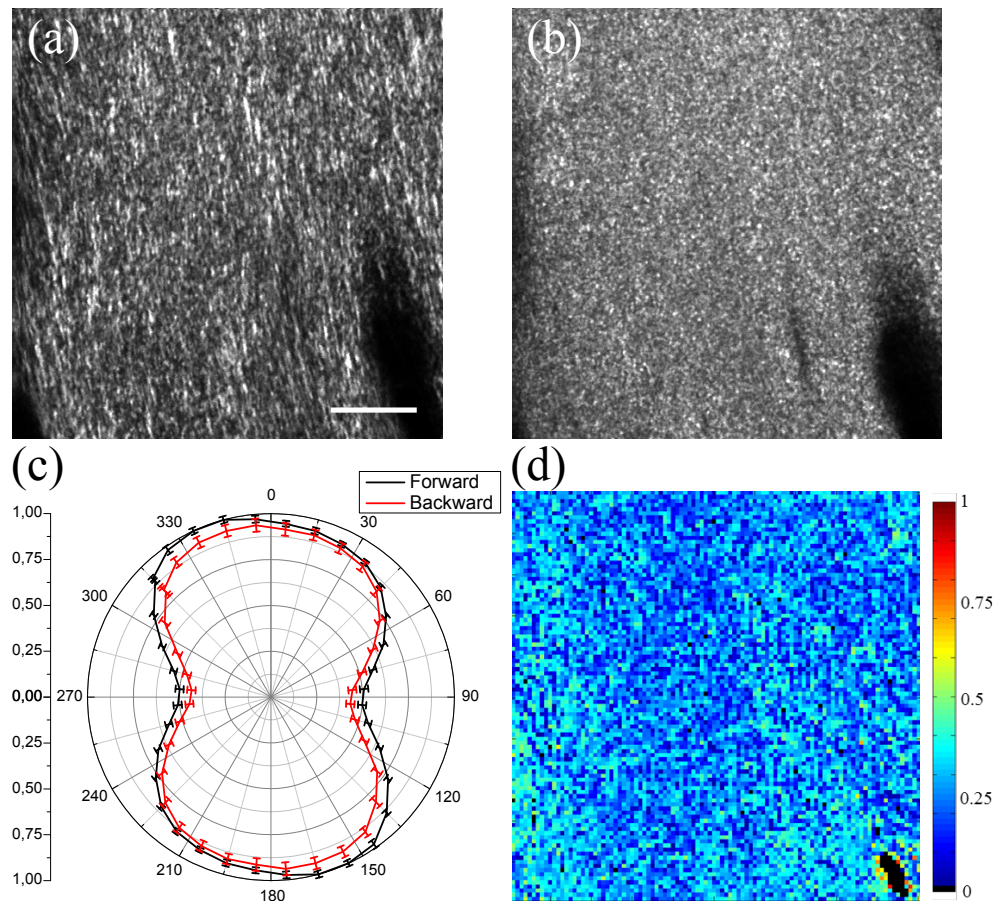


FIGURE 7.3 – Image SHG du cartilage articulaire dans les directions (a) forward et (b) backward. (c) Intensité du signal SHG de sous-régions du cartilage en fonction de l'angle de la polarisation du faisceau laser. La ROI représentée par les images (a) et (b) est divisée en sous-régions de  $2 \times 2 \mu\text{m}$  chacune. Pour chaque angle de la polarisation, l'intensité du signal SHG est moyennée sur toutes les sous-régions dans les directions forward (noir) et backward (rouge). L'intensité dans chaque direction est normalisée de telle sorte que la valeur de l'intensité se retrouve entre 0 et 1. Les barres d'incertitudes indiquent l'écart-type de l'intensité des 2500 sous-régions. (d) Carte du paramètre d'anisotropie ( $r$ ) calculé pour chaque sous-région. Barre d'échelle:  $20 \mu\text{m}$ . Figure modifiée de [81].

Les figures 7.3(a) et (b) montrent des images SHG de collagène type II dans le cartilage articulaire dans les directions forward et backward respectivement. Changer l'angle de la polarisation du faisceau laser incident nous permet de mesurer la réponse polarimétrique des fibrilles de collagène dans différentes régions du tissu. Comme démontré ailleurs [113,



[119, 209], le signal SHG dans le collagène est maximal lorsque l'angle de la polarisation du faisceau laser est parallèle à l'orientation des fibrilles et minimal lorsqu'il est perpendiculaire. Ceci permet de révéler l'alignement général des fibrilles dans la ROI. Ainsi, l'orientation générale des fibrilles dans la ROI peut être observée à l'aide d'un graphique polarimétrique (figure 7.3(c)) qui montre l'intensité du signal SHG des figures 7.3(a) et (b) en fonction de l'angle de la polarisation du faisceau laser. Pour chaque angle de la polarisation, un seuil d'intensité du signal SHG est fixé pour exclure les pixels sans signal SHG. Les mesures sont moyennées sur des sous-régions de  $2 \times 2 \mu\text{m}$ . Les barres d'incertitudes sur le graphique correspondent à l'écart-type de la distribution de toutes les sous-régions. Finalement, pour quantifier localement le degré d'alignement dans le tissu, nous avons calculé, dans chaque sous-région, le paramètre d'anisotropie ( $r$ ):

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (7.1)$$

tel que présenté précédemment par Campagnola et coll. [24]. La figure 7.3(d) montre la carte de l'anisotropie des figures 7.3(a) et (b) où le paramètre d'anisotropie ( $r$ ) est représenté par un code de couleur dans chaque sous-région, les couleurs plus chaudes représentant un degré plus élevé d'alignement.

Les figures 7.4(a) et (b) présente les images SHG, forward et backward respectivement, du collagène de type I provenant de l'os. La figure 7.4(c) présente l'intensité en fonction de la polarisation. L'intensité du signal du graphique est la moyenne de l'intensité de sous-régions de  $2 \times 2 \mu\text{m}$  des images des figures 7.4(a) et (b). Les barres d'incertitudes sont l'écart-types des mesures. La figure 7.4(d) montre la carte de l'anisotropie de l'os.

Les résultats des figures 7.3 et 7.4 montrent un arrangement des fibrilles de collagène à une échelle submicrométrique bien différente dans le collagène de types I et II. Le graphique polarimétrique de la figure 7.3(c) permet de déterminer, pour le collagène type II dans le cartilage, que la dépendance de la polarisation est la même dans les directions forward et backward, bien que les deux images SHG (figures 7.3(a) et (b)) aient une apparence différente. Toutefois, dans le cas du collagène de type I dans l'os (graphique polarimétrique à

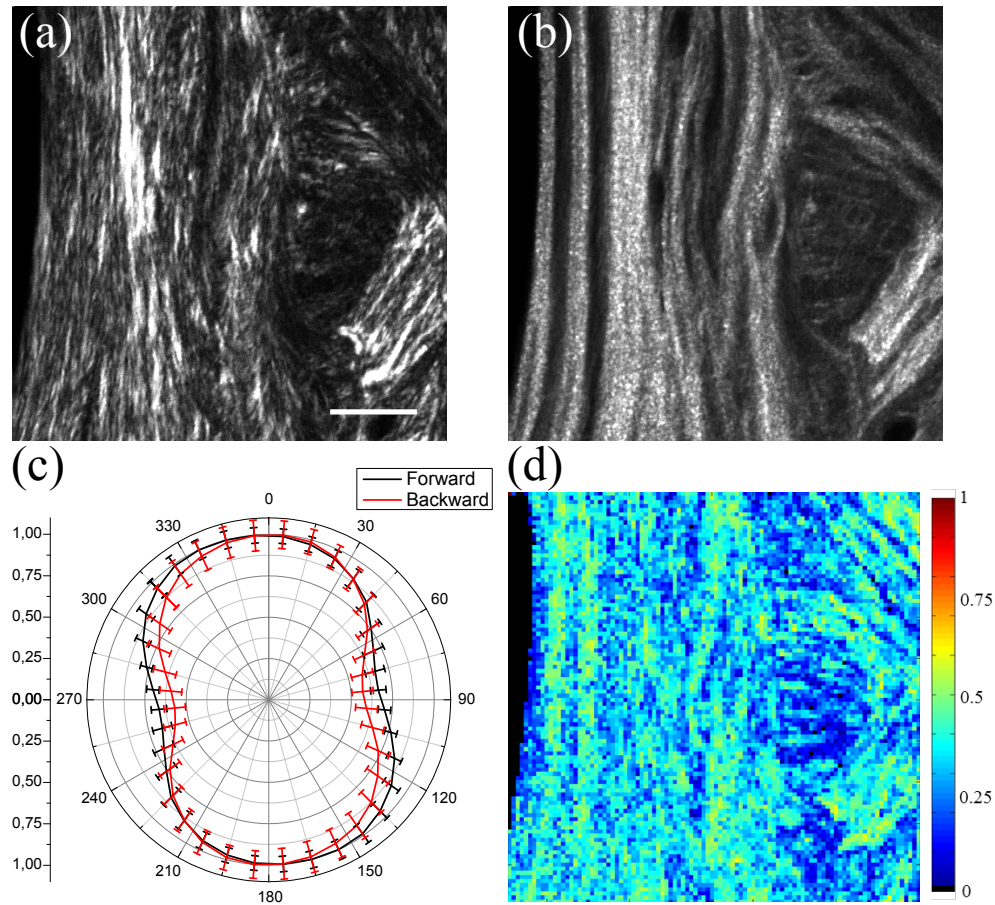


FIGURE 7.4 – Image SHG de l’os dans les directions (a) forward et (b) backward. (c) Intensité du signal SHG de sous-régions du cartilage en fonction de l’angle de la polarisation du faisceau laser. La ROI représentée par les images (a) et (b) est divisée en sous-régions de  $2 \times 2 \mu\text{m}$  chacune et, pour chaque angle de la polarisation, l’intensité du signal SHG est moyennée sur toutes les sous-régions dans les directions forward (noir) et backward (rouge). L’intensité dans chaque direction est normalisée de telle sorte que la valeur de l’intensité se retrouve entre 0 et 1. Les barres d’incertitudes indiquent l’écart-type de l’intensité des 2500 sous-régions. (d) Carte du paramètre d’anisotropie ( $r$ ) calculé pour chaque sous-région. Barre d’échelle:  $20 \mu\text{m}$ . Figure modifiée de [81].

la figure 7.4(c)), la dépendance en polarisation est différente entre les polarisations forward et backward, avec un angle général d’alignement différent pour chaque direction. De plus, l’incertitude (l’écart-type) des différentes valeurs est beaucoup plus élevée, démontrant une grande variation de la dépendance à la polarisation selon les sous-régions de la ROI. Ceci est causé par un changement général de l’alignement des fibrilles selon la région de la ROI, telle que présentée à la figure 7.5. Les cartes d’anisotropie des figures 7.3(d) et 7.4(d) montrent

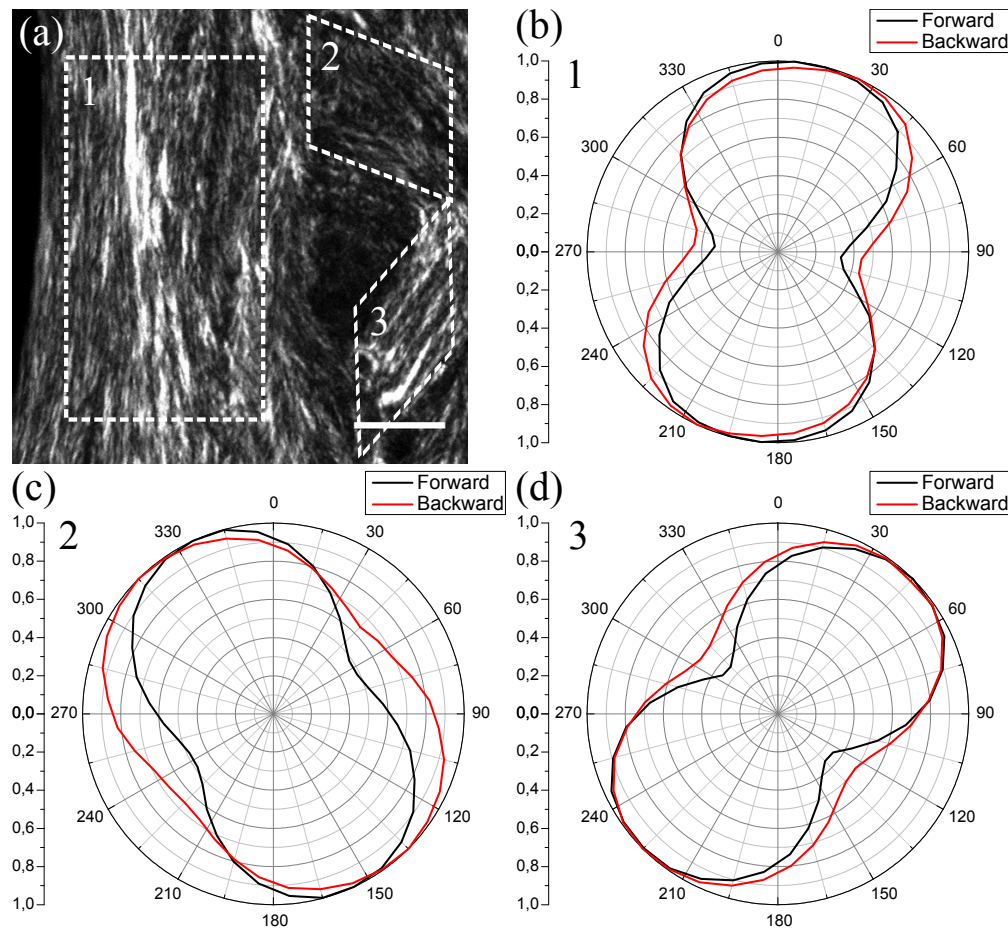


FIGURE 7.5 – Graphiques polarimétriques représentant la directionnalité du signal SHG dans l’os. (a) Image SHG forward de la ROI de l’os où sont représentées les sous-régions utilisées pour produire les graphiques polarimétriques. (b-d) Graphiques polarimétriques des sous-régions 1 à 3 de l’image SHG présenté en (a). Barre d’échelle: 20  $\mu\text{m}$ .

toutefois que le collagène de type I présente une anisotropie généralement plus élevée que le collagène de type II.

En considérant l’intensité élevée du signal SHG dans la direction forward, ces résultats démontrent que les fibrilles du collagène de type I forment des regroupements de fibrilles à une échelle micrométrique [64] pour lesquels les fibrilles présentent la même orientation et la même polarité, révélant une anisotropie élevée. À une échelle plus élevée ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ), l’orientation de ces regroupements de fibrilles varie au travers de la ROI. Cette structure spécifique permet de fournir une grande résistance à la force de traction, ce qui est cohérent avec la fonction physiologique de l’os. Au contraire, pour le cartilage articulaire, le ratio

d'anisotropie peu élevé et relativement uniforme indique que le collagène type II est organisé à l'échelle micrométrique en un maillage de fibrilles quasi aléatoire. La basse intensité du signal SHG est due à l'interférence destructive partielle du signal SHG provenant des différentes fibrilles. Toutefois, à une échelle plus élevée, la faible distribution de la réponse en polarisation et le faible écart-type visible à la figure 7.3(c) indiquent une orientation générale quasi constante des fibrilles de chaque sous-région ( $2 \times 2 \mu\text{m}$ ) l'une par rapport à l'autre, et ce, sur toute la ROI ( $100 \times 100 \mu\text{m}$ ). L'orientation générale des fibrilles est perpendiculaire à la surface articulaire, ce qui est compatible avec la structure en arcade des fibrilles de collagène dans le cartilage [84, 89]. La structure en maillage quasi aléatoire fournit une grande résistance au gonflement osmotique et à la pression, ce qui est compatible avec la fonction du cartilage articulaire [18].

### 7.3.3 Mesure du diamètre des fibrilles de collagène en utilisant le ratio forward sur backward (F/B)

Les figures 7.6(a) et (b) montrent les images du ratio forward sur backward (F/B) pour chaque pixel dans le cartilage et l'os respectivement. Pour compenser la différence d'efficacité de collection dans les directions forward et backward, l'intensité du signal dans chaque direction est tout d'abord mesurée en utilisant la fluorescence à deux photons d'une solution de Coumarin 440 et en utilisant exactement les mêmes filtres que pour la microscopie SHG. Étant donné que le signal de fluorescence est isotropique, cette mesure permet de calibrer le ratio F/B mesuré dans le microscope. Nous utilisons conséquemment cette mesure pour corriger les mesures du ratio F/B dans le collagène, ce qui nous permet d'obtenir des informations sur la direction d'émission du signal SHG. La figure 7.6(c) montre un histogramme du ratio F/B des images des figures 7.6(a) et (b). Cette figure indique une grande différence entre le ratio F/B dans le cartilage et l'os. En effet, le ratio F/B dans l'os est beaucoup plus élevé que dans le cartilage, les valeurs de cette dernière étant relativement constantes avec un ratio F/B moyen d'environ 5. Toutefois, pour l'os, une grande disparité des valeurs du ratio F/B existe pour différentes régions du tissu, avec des valeurs allant de 1 à 70.

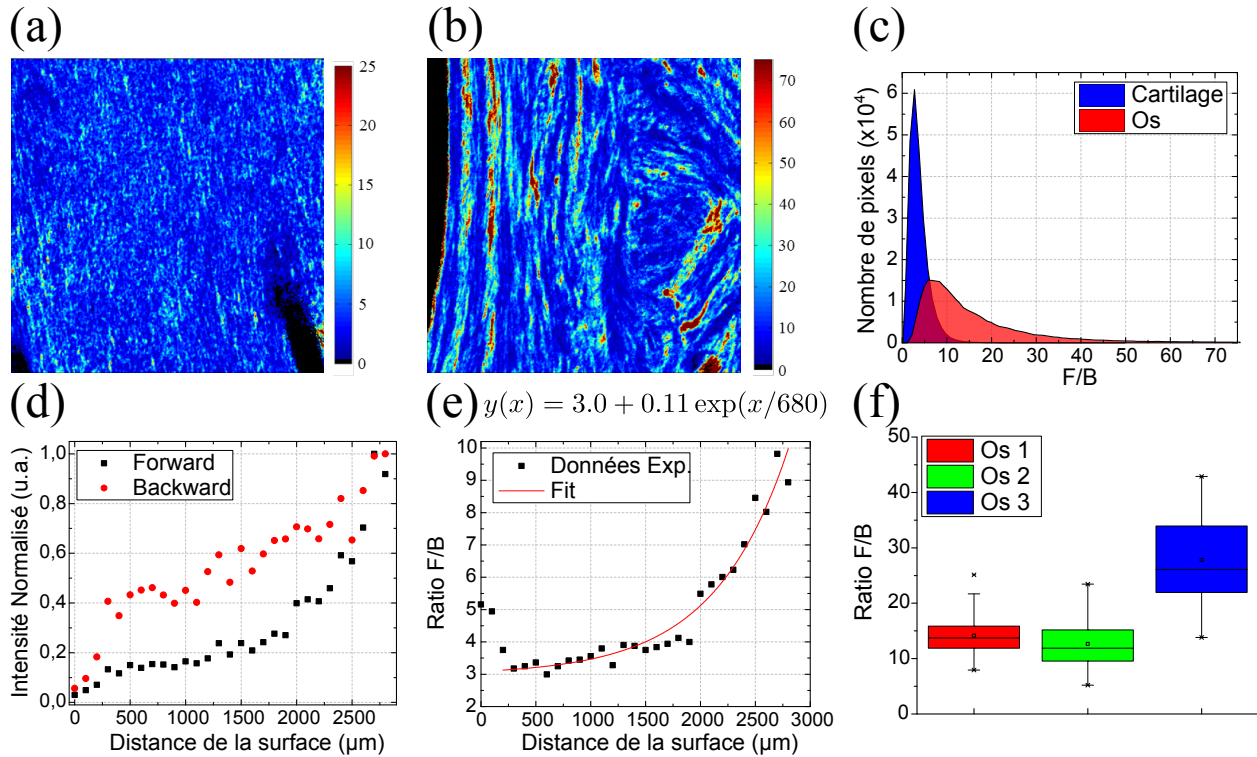


FIGURE 7.6 – Image du ratio forward sur backward (F/B) de l'intensité du signal SHG dans (a) le cartilage articulaire et (b) l'os. Les ROIs utilisées sont les mêmes que pour les figures 7.3 et 7.4. (c) Histogramme du ratio F/B dans le cartilage articulaire (bleu) et l'os (rouge). (d) Intensité normalisée du signal SHG dans les directions forward (noir) et backward (rouge) en fonction de la distance par rapport à la surface du cartilage. Il est à noter que l'intensité du signal SHG dans la direction backward semble plus élevée à cause de la normalisation. (e) Ratio F/B de l'intensité du signal SHG dans le cartilage articulaire en fonction de la distance par rapport à la surface du cartilage. L'origine ( $0 \mu\text{m}$ ) correspond à la surface du cartilage et la position finale ( $3000 \mu\text{m}$ ) correspond à la limite entre l'os et le cartilage. Une courbe de tendance exponentielle est calculée à partir des données expérimentales à l'exception des 3 premières données. (f) Distribution statistique du ratio F/B du signal SHG dans trois différentes régions de l'os. Chaque région de  $100 \times 100 \mu\text{m}$  est divisée en sous-régions de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  pour le calcul du ratio F/B. Figure modifiée de [81].

La figure 7.6(d) montre la valeur de l'intensité du signal SHG dans les directions forward (carrés noirs) et backward (cercles rouges) dans le cartilage en fonction de la distance par rapport à la surface articulaire. Le signal est mesuré en acquérant des images en progressant de la surface articulaire jusqu'à la jonction entre le cartilage et l'os. Puisque les échantillons que nous utilisons sont coupés perpendiculairement à la surface du cartilage, la totalité de la profondeur du cartilage peut être imagée dans les mêmes conditions expérimentales sans atténuation du signal, diffusion ou biréfringence. Dans le but de maximiser le ratio signal



sur bruit (SNR), nous illuminons l'échantillon avec une polarisation linéaire perpendiculaire à la surface articulaire, ce qui correspond au signal SHG le plus élevé sur le graphique polarimétrique (voir figure 7.3(c)). L'origine du graphique ( $0 \mu\text{m}$ ) représente la surface du cartilage et chaque donnée représente une mesure de l'intensité moyenne des images SHG d'une ROI de  $100 \times 100 \mu\text{m}$ . Pour chaque mesure, l'échantillon est déplacé de  $100 \mu\text{m}$  et la dernière mesure est acquise lorsque la jonction entre le cartilage et l'os est atteinte (tel que présenté aux figures 7.2(a) et (b)). Ceci correspond à une profondeur d'environ  $3000 \mu\text{m}$ , variant selon l'échantillon analysé. Il est à noter que les intensités présentées sur le graphique sont normalisées selon une échelle d'intensité allant de 0 à 1 pour une meilleure visualisation. Nous observons une augmentation graduelle de l'intensité du signal SHG à la fois dans les directions forward et backward lorsque nous progressons en profondeur dans l'échantillon. En particulier, pour les premiers  $300 \mu\text{m}$ , nous remarquons une augmentation plus prononcée de l'intensité à la fois dans les directions forward et backward. Ceci peut être attribué à la structure en arcade du cartilage [18, 84, 89]. En effet, ces trois images sont acquises près de la surface, ce qui correspond à la région superficielle et transitionnelle du cartilage où les fibrilles de collagène courbent pour être parallèles à la surface du cartilage. Cette modification de l'angle azimutal implique que, pour les trois premières images, une composante de l'orientation des fibrilles est perpendiculaire à la polarisation, ce qui diminue l'intensité du signal SHG dans les directions forward et backward, mais n'affecte toutefois pas le ratio F/B.

La figure 7.6(e) présente le ratio F/B en fonction de la distance de la surface articulaire. Il semble que le signal SHG dans la direction forward augmente à un taux plus élevé que le signal SHG dans la direction backward lorsque nous approchons la jonction de l'os, ce qui mène à une augmentation graduelle du ratio F/B en progressant de la surface articulaire jusqu'à l'os. Encore une fois, nous remarquons une exception pour les premiers  $300 \mu\text{m}$  après la surface articulaire où il y a une diminution du ratio F/B. Ceci est causé par une diminution plus abrupte du signal SHG dans la direction backward à l'approche de la surface articulaire, ce qui cause une augmentation du ratio F/B. Ceci ne peut être expliqué seulement par un changement de l'angle azimutal des fibrilles. En effet, il affecte le signal dans les

directions forward et backward pareillement, sans affecter le ratio F/B. Ce changement du comportement du ratio F/B à la surface articulaire peut toutefois être attribué à l'orientation globale du maillage de collagène dans cette région. En effet, une fraction significative des fibrilles possède un angle polaire [18, 89, 99], causant une orientation des fibrilles dont une composante est parallèle à la direction de propagation du faisceau laser. Ceci cause une décroissance considérable du signal dans la direction backward et une décroissance beaucoup plus faible dans la direction forward [19], comme observée à la figure 7.6(c).

La figure 7.6(f) présente le ratio F/B moyen du collagène type I dans l'os. Trois différentes mesures ont été prises de trois différentes ROIs ( $100 \times 100 \mu\text{m}$ ) dans l'échantillon, chacune d'elle étant ensuite divisée en sous-régions de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  où le ratio F/B est mesuré. Le graphique affiche la distribution du ratio F/B de chaque sous-région des trois ROIs. Nous observons une grande variation du ratio F/B dans l'os et dont les valeurs du ratio F/B se situent entre 5 et 45. Ceci est probablement causé par les rassemblements de fibrilles de collagène de type I à l'intérieur de l'os, ce qui augmente le signal SHG dans la direction forward sans modifier le signal SHG dans la direction backward à cause des différentes conditions d'accord de phase dans les directions forward et backward.

Il est à noter que le ratio F/B mesuré dans ces expériences ne se traduit pas aisément pour des mesures *in situ* dans des échantillons épais. En effet, dans ces types d'échantillons, le signal SHG dans la direction backward est combiné au signal SHG émis dans la direction forward rétrodiffusé. Toutefois, certaines approches ont été proposées pour découpler ces deux signaux [104, 152], ce qui pourrait étendre le potentiel d'analyse à des études *in situ* dans des tissus épais.

Dans le but de mieux comprendre la relation entre le ratio F/B, à l'échelle micrométrique, et la structure de collagène, des simulations numériques furent développées pour calculer le signal SHG dans les directions forward et backward dans le tissu. Les simulations numériques furent développées par l'équipe du Dr Lora Ramunno de l'Université d'Ottawa. Dr Konstantin Popov développa le code et Jarno Van der Kolk l'adapta pour les besoins de ces travaux. La figure 7.7(a) montre le ratio F/B en fonction du taux de remplissage  $\rho$  (c'est-à-dire la

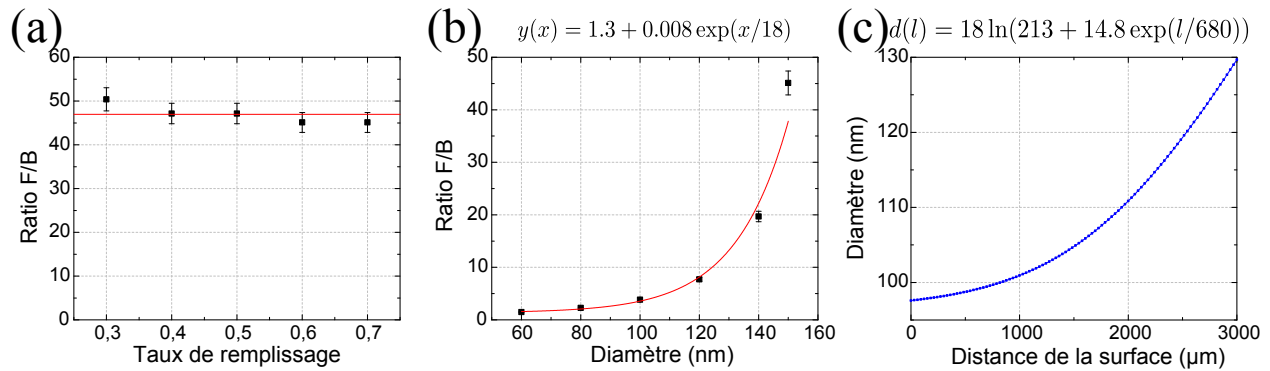


FIGURE 7.7 – Simulations numériques du ratio F/B du signal SHG en fonction (a) du taux de remplissage ( $\rho$ ) pour un diamètre des fibrilles ( $d$ ) de  $d = 150$  nm et (b) du diamètre des fibrilles pour  $\rho = 0,6$ . Les barres d'incertitudes indiquent l'écart-type du signal moyen de 1000 modèles de tissus générés aléatoirement pour chaque valeur de  $\rho$  et  $d$ . (c) Évolution du diamètre des fibrilles à l'intérieur du cartilage articulaire en fonction de la distance par rapport à la surface articulaire comme prédit par le ratio F/B de l'intensité du signal SHG mesuré (figure 7.6(e)) et les simulations numériques. Figure modifiée de [81].

fraction du volume focal occupée par les fibrilles) et la figure 7.7(b) présente le ratio F/B en fonction du diamètre des fibrilles. Nous remarquons que, d'après ces simulations, le ratio F/B n'est pas dépendant du taux de remplissage puisque la dépendance de  $\rho$  pour le signal dans les directions forward et backward est linéaire pour les deux directions. Nous remarquons également que le ratio F/B en fonction du diamètre des fibrilles a une corrélation exponentielle, tout comme le ratio F/B en fonction de la profondeur. L'augmentation de l'intensité du signal dans les directions forward et backward visible à la figure 7.6(d) indique une augmentation du ratio de remplissage. Toutefois, ce paramètre n'affecte pas le ratio F/B. Le comportement de celui-ci à la figure 7.6(e) indique que le diamètre des fibrilles augmente également en progressant de la surface articulaire jusqu'à la jonction entre l'os et le cartilage, puisque le ratio F/B augmente pour aller de 3,2 (près de la surface du cartilage) à 9,8 (à la jonction de l'os et du cartilage). À partir des valeurs du ratio F/B en fonction de la distance par rapport à la surface articulaire de la figure 7.6(e) et des simulations numériques de la figure 7.7(b), nous pouvons estimer le diamètre des fibrilles en fonction de la profondeur dans le tissu, tel que présenté à la figure 7.7(c). Ainsi, d'après ces simulations, le diamètre des fibrilles de collagène augmente de 85 nm (près de la surface articulaire) jusqu'à 125 nm à la jonction de l'os et du cartilage. Ces observations sont en accord avec la littérature [84, 127], que ce soit à propos de la valeur du diamètre des fibrilles dans le tissu que pour sa variation



en fonction de la profondeur dans le tissu. En effet, il est connu que le diamètre des fibrilles du collagène de type II dans le cartilage devient progressivement plus large à mesure que nous progressons en profondeur dans le tissu. Dans l'os, le ratio F/B est généralement plus élevé ( $\sim 15$ ) mais présente une très grande variation de sa valeur (variant de 5 à 45 tel que le montre la figure 7.6(f)) ce qui indique la présence de larges fibrilles (diamètre d'environ 150 nm) et de larges regroupements de fibrilles partageant la même polarité [19].

## 7.4 Conclusion

Dans ce chapitre, l'utilisation de la microscopie à génération de seconde harmonique (SHG) pour obtenir de l'information sur la structure macromoléculaire du collagène de types I et II dans l'os et le cartilage articulaire est démontrée. En particulier, nous avons utilisé la microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG) pour analyser des images SHG acquises dans les directions forward et backward. Dans le cartilage articulaire, le signal SHG est relativement uniforme dans les régions analysées, révélant que les fibrilles de collagène sont distribuées de manière quasi aléatoire dans le volume focal du faisceau laser. Ceci est en accord avec la fonction du collagène de type II qui est de contrer la pression causée par le gonflement des agrécanes lors de port de charge. Au contraire, la grande variation du signal SHG du collagène de type I dans l'os montre que les fibrilles forment des regroupements dont l'orientation et la polarité est constante à une échelle micrométrique, indiquant un rôle de renforcement plus conventionnel des fibrilles de collagène. Finalement, dans le cartilage, nous observons une augmentation du ratio F/B en progressant de la surface à la jonction entre le cartilage et l'os. Combiner ces résultats avec des simulations numériques nous permet de démontrer que le ratio F/B suit l'évolution du diamètre des fibrilles de collagène et ainsi fournit des informations sur la structure de collagène à une échelle microscopique. Ce travail illustre l'utilité de la microscopie SHG pour étudier l'architecture à l'échelle nanométrique des tissus connectifs et présente un grand potentiel pour une large variété d'applications tel que la caractérisation des interactions entre les cellules et le collagène et l'étude des mécanismes de fibrillation dans les tissus pathologiques.



# Chapitre 8

## Conclusion

Mon projet de doctorat présenté dans cette thèse a deux objectifs principaux: (i) apporter une amélioration technique à la microscopie SRS dans le but d'augmenter la sensibilité de détection et réduire le signal non-résonant et (ii) appliquer la microscopie "Stimulated Raman Scattering" (SRS) multimodale dans l'étude d'échantillons géologiques. De plus, une série d'expériences est faite à l'aide de la microscopie à génération de seconde harmonique (SHG) dans le but d'imager le collagène. Ces expériences sont une continuation directe de mon projet de maîtrise. Ce chapitre fait une revue des résultats obtenus et offre une ouverture en suggérant plusieurs améliorations techniques et quelques expériences à tenter.

### 8.1 Résultats

#### 8.1.1 Amélioration la sensibilité de détection de la microscopie SRS

Deux principales améliorations techniques à la microscopie SRS sont présentées dans cette thèse: l'application des filtres adaptés dans le but d'augmenter la sensibilité de détection du signal SRS et le développement de la microscopie SRS par modulation de la polarisation

(PM-SRS) dans le but de réduire certains signaux non-résonant présents lors de la détection du signal SRS.

L'utilisation des filtres adaptés en microscopie SRS eut des résultats peu concluants. Nos mesures indiquent une légère amélioration du ratio signal sur bruit en utilisant des ondes carrées en tant que filtres adaptés par rapport à l'utilisation d'un amplificateur à détection synchrone. Toutefois, en utilisant des codes de Golay comme forme des filtres adaptés, nous observons des performances nettement moindres. Les nombreuses contraintes techniques que nous avons rencontrées rendent son utilisation en imagerie en temps réel peu efficace pour plusieurs raisons. En effet, les filtres adaptés sont utilisés dans le domaine des télécommunications et fonctionnent en utilisant un taux d'acquisition généralement très élevée. Or, pour ces recherches, le taux d'acquisition de la carte "Analogue to Digital Converter" (ADC) est de 5 MHz, ce qui limite grandement la vitesse d'acquisition et la fréquence de modulation du faisceau laser (la fréquence de modulation étant ainsi limitée à, au plus, 2,5 MHz). L'utilisation de basses fréquences d'acquisition a également le désavantage d'introduire du bruit  $1/f$  dans le signal détecté [126]. Finalement, un post-traitement du signal est nécessaire pour extraire le signal SRS et la longue durée du traitement des données rend actuellement son utilisation en temps réel impossible.

La microscopie SRS utilisant la modulation de la polarisation eut plus de succès. Habituellement, pour détecter le signal SRS, une modulation de l'intensité est appliquée au faisceau Stokes (si la configuration "Stimulated Raman Loss" (SRL) est choisie) et un transfert de modulation est détecté sur le faisceau pompe. Toutefois, un signal non-résonant est parfois présent lors de la détection du signal SRS. Certains de ces effets, notamment la modulation de phase croisée (XPM) et la lentille thermique (TL), sont causés par un changement de l'indice de réfraction du milieu induit par le faisceau Stokes et perçu par le faisceau pompe, ce qui change la divergence du faisceau pompe. Ce changement périodique de la divergence crée une modulation de la proportion du faisceau pompe qui est détectée par la photodiode. Ceci mène à une modulation de l'intensité du faisceau pompe qui est détecté et ce signal est faussement interprété comme du signal SRS par le système de détection. Pour résoudre ce problème, nous proposons une technique de modulation de la polarisation pour

réduire, voire éliminer, le signal non-résonant provenant de la XPM et de la TL. Puisque les modes Raman sont habituellement hautement polarisés, moduler la polarisation ne résulte pas en une diminution de l'intensité du signal SRS puisqu'aucun transfert de modulation ne se produit lorsque la polarisation entre les faisceaux pompe et Stokes est perpendiculaire. Toutefois, dans le cas du signal non-résonant provenant de la XPM, le solvant créant le signal non-résonant est habituellement plus faiblement polarisé à la fréquence Raman analysée et utiliser une modulation de la polarisation mène à une diminution de l'intensité du signal de XPM. En effet, lorsque la polarisation entre les faisceaux pompe et Stokes est perpendiculaire, l'effet de XPM se produit tout de même à une proportion qui dépend du ratio de dépolarisation. En ajustant l'intensité des faisceaux parallèle et perpendiculaire du faisceau Stokes, il est possible d'éliminer ce signal non-résonant sans affecter significativement l'intensité du signal SRS. Nous avons déterminé que la source d'un signal non-résonant provenant d'un échantillon de DMSO-d6 et nous avons pu l'éliminer avec succès sans affecter le signal SRS provenant des modes Raman du DMSO-d6. Cette technique est également testée dans des conditions d'imagerie en éliminant avec succès le signal de XPM présent dans un échantillon d'octadécène où des gouttelettes de DMSO-d6 étaient présentes.

### **8.1.2 Application de la microscopie optique non-linéaire dans des échantillons géologiques et biologiques**

Durant mon doctorat, la microscopie optique non-linéaire est utilisée pour imager deux principaux types d'échantillon: des échantillons géologiques à l'aide de la microscopie SRS, SHG et de fluorescence à deux photons (TPF) et des échantillons de collagène à l'aide de la microscopie SHG.

La microscopie optique non-linéaire multimodale est utilisée pour l'imagerie et l'acquisition d'informations à propos d'échantillons géologiques. Parmi ces types de microscopie optique non-linéaires, la microscopie SRS, SHG et TPF est utilisée. La microscopie SRS est utilisée de deux façons: pour l'analyse spectrale d'une région d'intérêt et pour l'imagerie du volume d'un échantillon. L'analyse spectrale est faite à l'aide de la technique d'imagerie

spectrale présentée au chapitre 4 et permet d'identifier les éléments chimiques présents dans la région d'intérêt. Ceci permet d'identifier des minéraux tels que du quartz, de la calcite et de l'anhydrite. De la matière organique contenue dans des échantillons géologiques est également étudiée. Ces matières organiques, telles que des algues ou du pétrole brut contenu dans des inclusions de fluides, sont plus délicates à analyser puisque leur spectre Raman est souvent large et contiennent plusieurs modes Raman. Ainsi, plusieurs balayages spectraux sont nécessaires pour obtenir le spectre SRS complet dans une région précise (la région CH ou la région des "fingerprints"). De plus, en faisant l'acquisition d'images à plusieurs profondeurs à une fréquence Raman précise, il est possible d'obtenir un volume en trois dimensions (3D) de la région d'intérêt. Ainsi, des volumes en 3D de plusieurs échantillons furent acquis. L'acquisition de volume 3D est d'autant plus intéressante lorsque combinée avec la microscopie SHG. En effet, le signal SHG est seulement généré dans des matériaux composés de molécules non-centrosymétriques telles que le quartz. De plus, à cause de la phase de Gouy, le signal SHG est généré seulement là où il y a une brisure dans la symétrie du matériau tel qu'à des interfaces ou à des plans de macles. La microscopie SHG permet ainsi d'obtenir de l'information sur la structure cristallographique de l'échantillon tandis que la microscopie SRS permet d'obtenir de l'information sur le volume occupé par la molécule d'intérêt dans l'échantillon. Ainsi, des volumes 3D de plusieurs échantillons sont acquis et les volumes 3D du signal SHG dans des échantillons de quartz sont également acquis simultanément avec le signal SRS. Finalement, un signal de fluorescence à deux photons (TPF) est souvent détecté en présence de matière organique dans les échantillons géologiques. Ceci est d'autant plus intéressant puisqu'en présence de fluorescence, la microscopie Raman conventionnelle est souvent incapable de détecter le signal Raman à cause du bruit trop important causé par la fluorescence, mais la microscopie SRS en est tout à fait capable.

La microscopie SHG est également utilisée pour l'analyse de deux types de collagène, le collagène de type I et de type II, présent dans l'os et le cartilage respectivement. À l'aide d'une analyse polarimétrique du signal SHG et de la comparaison du ratio forward sur backward (F/B) du signal SHG, une étude plus poussée de leur structure est faite. La microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG) permet de révéler que, dans le collagène

de type II, les fibrilles sont orientées de manière aléatoire avec une direction générale définie et ont pour but de contrer la pression causée par le gonflement des agrégates lors du port de charge. Dans le cas du collagène de type I, les fibrilles sont orientées dans différentes directions sur une échelle de plusieurs dizaines de microns, mais ont la même orientation à l'échelle micrométrique, indiquant que les fibrilles forment des regroupements de fibrilles dont la fonction est de résister la force de tension induite sur le tissu. De plus, une analyse du ratio F/B dans le collagène de type II en fonction de la profondeur dans le tissu révèle une augmentation du ratio F/B en fonction de la distance par rapport à la surface. Combiné avec des simulations numériques, nous avons déterminé que ceci indique une augmentation du diamètre des fibrilles, ce qui est compatible avec la théorie. L'analyse du ratio F/B peut donc être utilisée pour déterminer le diamètre de fibrilles de collagène dans le tissu et la microscopie P-SHG peut être utilisée pour déterminer l'organisation des fibrilles dans le tissu.

## 8.2 Ouverture

De ces recherches, certaines améliorations peuvent être apportées sur le montage expérimental, qui n'ont pas été faites par faute de temps. De plus, ces techniques de microscopie ouvrent la porte à plusieurs opportunités de recherche dans le domaine de la biologie et géologie.

Le montage SRS est en ce moment parfaitement fonctionnel et permet l'acquisition d'un large spectre Raman en faisant l'acquisition de plusieurs spectres par balayage spectral et en les joignant par post-traitement. Toutefois, le post-traitement est un processus laborieux et il serait grandement utile d'augmenter la bande spectrale d'un des faisceaux pour permettre l'acquisition d'un plus grand intervalle de fréquences dans un seul balayage spectral. Ceci pourrait être fait à l'aide d'une fibre optique non-linéaire qui augmenterait la bande spectrale par automodulation de phase. L'augmentation de la bande spectrale permettrait de faire l'acquisition d'un plus grand intervalle de fréquences Raman pour un seul balayage spectral

et ainsi un nombre moins élevé de balayages spectraux seraient nécessaires pour obtenir un spectre SRS complet.

Les échantillons géologiques se trouvent à être plus facilement affectés par le signal non-résonant causé par l'absorption des états excités (ESA) que les échantillons biologiques. Il est encore discutable si ce signal est indésirable ou s'il permet d'obtenir des informations supplémentaires sur l'échantillon. D'une manière ou d'une autre, il peut s'avérer utile de pouvoir éliminer ou séparer le signal d'ESA du signal résonant SRS. Plusieurs techniques sont envisageables. Le signal provenant de l'ESA est relativement indépendant de la fréquence, mais dépend plutôt du délai temporel entre les faisceaux pompe et Stokes (une forme du signal d'ESA en fonction du délai temporel est présentée à la figure 5.7). Moduler la fréquence ou la polarisation du faisceau Stokes serait des options à explorer pour éliminer ce type de signal. Des résultats très préliminaires utilisant la modulation de la polarisation semblent prometteurs, mais une analyse plus poussée est nécessaire.

Puisque, à notre connaissance, ces travaux sont la première application de la microscopie SRS sur des échantillons géologiques, le potentiel de cette technique de microscopie en géologie est très vaste. En effet, la capacité de cette technique à faire l'imagerie d'un volume 3D de l'échantillon peut être très utile pour étudier plusieurs problématiques en géologie comme déterminer la porosité d'un minéral ou la composition d'un échantillon composé de plusieurs grains contenant plusieurs types minéraux. De plus, l'aptitude de la microscopie SRS, SHG et TPF à acquérir des images simultanément permettrait d'analyser la composition cristallographique de certains minéraux et de donner des informations supplémentaires sur leur formation. Ceci est d'autant plus utile puisqu'une grande partie des minéraux présents sur terre sont composés de quartz, qui peut générer un signal de seconde harmonique. Finalement, la microscopie SRS peut être d'un grand intérêt pour l'analyse de matières organiques. En effet, dans plusieurs cas, la matière organique dans des échantillons géologiques produit de la fluorescence et ne peut donc pas être analysée à l'aide de la microscopie Raman conventionnelle. Toutefois, la microscopie SRS est insensible à ce type de fluorescence. Ainsi, la capacité de la microscopie SRS à analyser la matière organique dans les échantillons géologiques peut être grandement utile dans le domaine des ressources naturelles.



Finalement, une étude plus poussée du signal SHG dans les échantillons géologiques produisant du signal de SHG est une option à explorer. En effet, la microscopie SHG interférométrique [169] permet d'identifier l'orientation du tenseur  $\chi^{(2)}$ . Utiliser cette technique sur certains échantillons pourrait révéler l'orientation des différents cristaux et la direction de leur croissance afin de mieux comprendre les stress mécaniques que ceux-ci ont subis lors de leur formation.



# Bibliographie

- [1] Amat-Roldan I, Psilodimitrakopoulos S, Loza-Alvarez P & Artigas D (2010). Fast image analysis in polarization SHG microscopy. *Optics Express*, 18(16):17209.
- [2] Andreana M, Houle MA, Moffatt DJ, Ridsdale A, Buettner E, Légaré F & Stolow A (2015). Amplitude and polarization modulated hyperspectral Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Optics Express*, 23(22):28119–28131.
- [3] Andreana M & Stolow A (2014). Multimodal Nonlinear Optical Microscopy: From Biophotonics to Geophotonics. *Optics and Photonics News*, 25(3):42.
- [4] Andresen ER, Berto P & Rigneault H (2011). Stimulated Raman scattering microscopy by spectral focusing and fiber-generated soliton as Stokes pulse. *Optics Letters*, 36(13):2387–2389.
- [5] Bancelin S, Couture CA, Légaré K, Pinsard M, Rivard M, Brown C & Légaré F (2016). Fast interferometric second harmonic generation microscopy. *Biomedical Optics Express*, 7(2):399.
- [6] Barlow AM, Popov K, Andreana M, Moffatt DJ, Ridsdale A, Slepko AD, Harden JL, Ramunno L & Stolow A (2013). Spatial-spectral coupling in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics Express*, 21(13):15298.
- [7] Bashkansky M, Lucke RL, Funk E, Rickard LJ & Reintjes J (2002). Two-dimensional synthetic aperture imaging in the optical domain. *Optics Letters*, 27(22):1983–1985.

- [8] Berciaud S, Lasne D, Blab GA, Cognet L & Lounis B (2006). Photothermal heterodyne imaging of individual metallic nanoparticles: Theory versus experiment. *Physical Review B*, 73(4):045424.
- [9] Berto P, Andresen ER & Rigneault H (2014). Background-Free Stimulated Raman Spectroscopy and Microscopy. *Physical Review Letters*, 112(5):053905.
- [10] Bégin S, Burgoyne B, Mercier V, Villeneuve A, Vallée R & Côté D (2011). Coherent anti-Stokes Raman scattering hyperspectral tissue imaging with a wavelength-swept system. *Biomedical Optics Express*, 2(5):1296–1306.
- [11] Birk DE & Bruckner P (2005). Collagen Suprastructures. *Collagen*. Brinckmann J, Notbohm H & Müller PK (éditeurs), Springer Berlin Heidelberg, numéro 247 de Topics in Current Chemistry, pages 185–205.
- [12] Bélanger E, Bégin S, Laffray S, De Koninck Y, Vallée R & Côté D (2009). Quantitative myelin imaging with coherent anti-stokes raman scattering microscopy: alleviating the excitation polarization dependence with circularly polarized laser beams. *Optics Express*, 17(21):18419–18432.
- [13] Bonn M, Müller M, Rinia HA & Burger KN (2009). Imaging of chemical and physical state of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(7):763–769.
- [14] Born M & Wolf E (1999). *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [15] Boyd RW (2008). *Nonlinear Optics*. Academic Press, Amsterdam; Boston, 3e édition.
- [16] Bremer MT & Dantus M (2013). Standoff explosives trace detection and imaging by selective stimulated Raman scattering. *Applied Physics Letters*, 103(6):061119.
- [17] Brockbank KGM, MacLellan WR, Xie J, Hamm-Alvarez SF, Chen ZZ & Schenke-Layland K (2008). Quantitative second harmonic generation imaging of cartilage damage. *Cell and Tissue Banking*, 9(4):299–307.

- [18] Brown CP, Houle MA, Chen M, Price AJ, Légaré F & Gill HS (2012). Damage initiation and progression in the cartilage surface probed by nonlinear optical microscopy. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 5(1):62–70.
- [19] Brown CP, Houle MA, Popov K, Nicklaus M, Couture CA, Laliberté M, Brabec T, Ruediger A, Carr AJ, Price AJ, Gill HS, Ramunno L & Légaré F (2013). Imaging and modeling collagen architecture from the nano to micro scale. *Biomedical Optics Express*, 5(1):233.
- [20] Burruss RC, Slepko AD, Pegoraro AF & Stolow A (2012). Unraveling the complexity of deep gas accumulations with three-dimensional multimodal CARS microscopy. *Geology*, 40(12):1063–1066.
- [21] Butcher PN & Cotter D (1990). *The Elements of Nonlinear Optics*. Cambridge University Press, Cambridge ; New York.
- [22] Camp Jr CH & Cicerone MT (2015). Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering. *Nature Photonics*, 9(5):295–305.
- [23] Camp Jr CH, Lee YJ, Heddleston JM, Hartshorn CM, Walker ARH, Rich JN, Lathia JD & Cicerone MT (2014). High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues. *Nature Photonics*, 8(8):627–634.
- [24] Campagnola PJ & Loew LM (2003). Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotechnology*, 21(11):1356–1360.
- [25] Carlson WD (2006). Three-dimensional imaging of earth and planetary materials. *Earth and Planetary Science Letters*, 249(3–4):133–147.
- [26] Chen BC, Sung J & Lim SH (2010). Chemical Imaging with Frequency Modulation Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy at the Vibrational Fingerprint Region. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(50):16871–16880.

- [27] Chen BC, Sung J, Wu X & Lim SH (2011). Chemical imaging and microspectroscopy with spectral focusing coherent anti-Stokes Raman scattering. *Journal of Biomedical Optics*, 16(2):021112.
- [28] Cheng JX, Book LD & Xie XS (2001a). Polarization coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Optics Letters*, 26(17):1341–1343.
- [29] Cheng JX, Jia YK, Zheng G & Xie XS (2002a). Laser-scanning coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology. *Biophysical journal*, 83(1): 502–509.
- [30] Cheng JX, Volkmer A, Book LD & Xie XS (2001b). 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.
- [31] Cheng Jx, Volkmer A, Book LD & Xie XS (2002b). Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy and Study of Lipid Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(34):8493–8498.
- [32] Cheng JX, Volkmer A & Xie XS (2002c). Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *JOSA B*, 19(6):1363–1375.
- [33] Cheng JX & Xie XS (2004). Coherent anti-stokes raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3):827–840.
- [34] Cheng JX & Xie XS (éditeurs) (2012). *Coherent Raman Scattering Microscopy*. Cheng JX & Xie XS (éditeurs). CRC Press, Boca Raton, 1er édition.
- [35] Chu SW, Tai SP, Sun CK & Lin CH (2007). Selective imaging in second-harmonic-generation microscopy by polarization manipulation. *Applied Physics Letters*, 91(10): 103903.
- [36] Cicchi R, Kapsokalyvas D, Troiano M, Campolmi P, Morini C, Massi D, Cannarozzo G, Lotti T & Pavone FS (2014). In vivo non-invasive monitoring of collagen remodelling

- by two-photon microscopy after micro-ablative fractional laser resurfacing. *Journal of Biophotonics*, 7(11-12):914–925.
- [37] Clark RJH & Hester RE (1988). *Advances in Non-Linear Spectroscopy*. John Wiley & Sons Inc, Chichester; New York.
- [38] Couture CA, Bancelin S, Van der Kolk J, Popov K, Rivard M, Légaré K, Martel G, Richard H, Brown C, Laverty S, Ramunno L & Légaré F (2015). The Impact of Collagen Fibril Polarity on Second Harmonic Generation Microscopy. *Biophysical Journal*, 109(12): 2501–2510.
- [39] Cox G, Kable E, Jones A, Fraser I, Manconi F & Gorrell MD (2003). 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *Journal of structural biology*, 141(1):53–62.
- [40] Davis JA, Cottrell DM, Campos J, Yzuel MJ & Moreno I (1999). Encoding amplitude information onto phase-only filters. *Applied Optics*, 38(23):5004–5013.
- [41] De Santis A, Frattini R, Sampoli M, Mazzacurati V, Nardone M, Ricci M & Ruocco G (1987). Raman spectra of water in the translational and librational regions. *Molecular Physics*, 61(5):1199–1212.
- [42] Dombeck DA, Kasischke KA, Vishwasrao HD, Ingelsson M, Hyman BT & Webb WW (2003). Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 7081–7086.
- [43] Duboisset J, Aït-Belkacem D, Roche M, Rigneault H & Brasselet S (2012). Generic model of the molecular orientational distribution probed by polarization-resolved second-harmonic generation. *Physical Review A*, 85(4):043829.
- [44] Dudovich N, Oron D & Silberberg Y (2002). Single-pulse coherently controlled nonlinear Raman spectroscopy and microscopy. *Nature*, 418(6897):512–514.

- [45] Duncan MD, Reintjes J & Manuccia TJ (1982). Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. *Optics Letters*, 7(8):350–352.
- [46] Dunlap B, Richter P & McCamant DW (2014). Stimulated Raman spectroscopy using chirped pulses. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(10):918–929.
- [47] Ekvall K, Meulen Pvd, Dhollande C, Berg LE, Pommeret S, Naskrecki R & Mialocq JC (2000). Cross phase modulation artifact in liquid phase transient absorption spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, 87(5):2340–2352.
- [48] Evans CL & Xie XS (2008). Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1(1):883–909.
- [49] Fischer MC, Wilson JW, Robles FE & Warren WS (2016). Invited Review Article: Pump-probe microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 87(3):031101.
- [50] Folick A, Min W & Wang MC (2011). Label-free imaging of lipid dynamics using coherent anti-stokes raman scattering (CARS) and stimulated raman scattering (SRS) microscopy. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(5):585–590.
- [51] Franken P, Hill A, Peters C & Weinreich G (1961). Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters*, 7(4):118–119.
- [52] Freudiger CW, Min W, Saar BG, Lu S, Holtom GR, He C, Tsai JC, Kang JX & Xie XS (2008). Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Science*, 322(5909):1857–1861.
- [53] Freund I & Deutsch M (1986). Second-harmonic microscopy of biological tissue. *Optics letters*, 11(2):94–96.
- [54] Fries M & Steele A (2010). Raman Spectroscopy and Confocal Raman Imaging in Mineralogy and Petrography. *Confocal Raman Microscopy*. Dieing T, Hollricher O & Toporski J (éditeurs), Springer Berlin Heidelberg, numéro 158 de Springer Series in Optical Sciences, pages 111–135.



- [55] Fu D, Holtom G, Freudiger C, Zhang X & Xie XS (2013). Hyperspectral Imaging with Stimulated Raman Scattering by Chirped Femtosecond Lasers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(16):4634–4640.
- [56] Fu D, Lu FK, Zhang X, Freudiger C, Pernik DR, Holtom G & Xie XS (2012). Quantitative Chemical Imaging with Multiplex Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 134(8):3623–3626.
- [57] Fu D, Ye T, Matthews TE, Chen BJ, Yurtserver G & Warren WS (2007). High-resolution in vivo imaging of blood vessels without labeling. *Optics Letters*, 32(18):2641.
- [58] Fu D, Zhou J, Zhu WS, Manley PW, Wang YK, Hood T, Wylie A & Xie XS (2014). Imaging the intracellular distribution of tyrosine kinase inhibitors in living cells with quantitative hyperspectral stimulated Raman scattering. *Nature Chemistry*, 6(7):614–622.
- [59] Gage SH (1920). Modern dark-field microscopy and the history of its development. *Transactions of the American Microscopical Society*, 39:95–141.
- [60] Ganikhanov F, Carrasco S, Sunney Xie X, Katz M, Seitz W & Kopf D (2006a). Broadly tunable dual-wavelength light source for coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics letters*, 31(9):1292–1294.
- [61] Ganikhanov F, Evans CL, Saar BG & Xie XS (2006b). High-sensitivity vibrational imaging with frequency modulation coherent anti-stokes raman scattering (FM CARS) microscopy. *Optics Letters*, 31(12):1872.
- [62] Gao F, Shuang F, Shi J, Rabitz H, Wang H & Cheng JX (2012). Optimal coherent control of coherent anti-Stokes Raman scattering: Signal enhancement and background elimination. *The Journal of Chemical Physics*, 136(14):144114.
- [63] Garbacik ET, Herek JL, Otto C & Offerhaus HL (2012). Rapid identification of heterogeneous mixture components with hyperspectral coherent anti-Stokes Raman scattering imaging. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(5):651–655.

- [64] Gartner LP & Hiatt JL (2006). *Color Textbook of Histology*. WB Saunders Co., Philadelphia, 3 edition edition.
- [65] Gordon MK & Olsen BR (1990). The contribution of collagenous proteins to tissue-specific matrix assemblies. *Current Opinion in Cell Biology*, 2(5):833–838.
- [66] Green J, Marcus S & Colella BD (1995). Synthetic-aperture-radar imaging with a solid-state laser. *Applied Optics*, 34(30):6941–6949.
- [67] Gu M (1996). *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. World Scientific.
- [68] Guo Y, Savage HE, Liu F, Schantz SP, Ho PP & Alfano RR (1999). Subsurface tumor progression investigated by noninvasive optical second harmonic tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(19):10854–10856.
- [69] Gusachenko I, Latour G & Schanne-Klein MC (2010). Polarization-resolved Second Harmonic microscopy in anisotropic thick tissues. *Optics Express*, 18(18):19339.
- [70] Hackley PC & Kus J (2015). Thermal maturity of Tasmanites microfossils from confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Fuel*, 143:343–350.
- [71] Hajek KM, Littleton B, Turk D, McIntyre TJ & Rubinsztein-Dunlop H (2010). A method for achieving super-resolved widefield CARS microscopy. *Optics Express*, 18(18):19263.
- [72] Hashimoto M, Araki T & Kawata S (2000). Molecular vibration imaging in the fingerprint region by use of coherent anti-stokes raman scattering microscopy with a collinear configuration. *Optics Letters*, 25(24):1768–1770.
- [73] Hecht E (2001). *Optics*. Addison-Wesley, Reading, 4th edition.
- [74] Helden AV, Dupré S, Gent Rv & Zuidervaart H (éditeurs) (2011). *The Origins of the Telescope*. Helden AV, Dupré S, Gent Rv & Zuidervaart H (éditeurs). Amsterdam University Press, Amsterdam.

- [75] Hellerer T, Enejder AMK & Zumbusch A (2004). Spectral focusing: High spectral resolution spectroscopy with broad-bandwidth laser pulses. *Applied Physics Letters*, 85(1): 25–27.
- [76] Hendra PJ & Stratton PM (1969). Laser-Raman spectroscopy. *Chemical Reviews*, 69(3):325–344.
- [77] Hiki S, Mawatari K, Hibara A, Tokeshi M & Kitamori T (2006). UV Excitation Thermal Lens Microscope for Sensitive and Nonlabeled Detection of Nonfluorescent Molecules. *Analytical Chemistry*, 78(8):2859–2863.
- [78] Horner JL & Gianino PD (1984). Phase-only matched filtering. *Applied Optics*, 23(6): 812–816.
- [79] Houle MA (2013). Microscopie à génération de seconde harmonique appliquée à l'imagerie de l'ostéo-arthrite. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
- [80] Houle MA, Burruss RC, Ridsdale A, Moffatt DJ, Légaré F & Stolow A (2017). Rapid 3D chemical-specific imaging of minerals using Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. DOI:10.1002/jrs.5098.
- [81] Houle MA, Couture CA, Bancelin S, Van der Kolk J, Auger E, Brown C, Popov K, Ramunno L & Légaré F (2015). Analysis of forward and backward Second Harmonic Generation images to probe the nanoscale structure of collagen within bone and cartilage. *Journal of Biophotonics*, 8(11-12):993–1001.
- [82] Hu CR, Slipchenko MN, Wang P, Wang P, Lin JD, Simpson G, Hu B & Cheng JX (2013). Stimulated Raman scattering imaging by continuous-wave laser excitation. *Optics Letters*, 38(9):1479.
- [83] Huang B, Bates M & Zhuang X (2009). Super resolution fluorescence microscopy. *Annual review of biochemistry*, 78:993–1016.

- [84] Hughes LC, Archer CW & ap Gwynn I (2005). The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *European Cells & Materials*, 9:68–84.
- [85] Hulmes DJS (2002). Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. *Journal of Structural Biology*, 137(1–2):2–10.
- [86] Humblet PA (1991). Design of optical matched filters. *Global Telecommunications Conference, 1991. GLOBECOM '91. 'Countdown to the New Millennium. Featuring a Mini-Theme on: Personal Communications Services*, pages 1246–1250.
- [87] Hwang WS, Li B, Jin LH, Ngo K, Schachar NS & Hughes GNF (1992). Collagen fibril structure of normal, aging, and osteoarthritic cartilage. *The Journal of Pathology*, 167(4):425–433.
- [88] Javidi B (1989). Nonlinear joint power spectrum based optical correlation. *Applied Optics*, 28(12):2358–2367.
- [89] Jeffery AK, Blunn GW, Archer CW & Bentley G (1991). Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 73(5):795–801.
- [90] Jesacher A, Roider C, Khan S, Thalhammer G, Bernet S & Ritsch-Marte M (2011). Contrast enhancement in widefield CARS microscopy by tailored phase matching using a spatial light modulator. *Optics Letters*, 36(12):2245.
- [91] Kadkly AA (1979). Performance of optical matched filters. *Optica Acta: International Journal of Optics*, 26(4):461–482.
- [92] Kadler KE, Baldock C, Bella J & Boot-Handford RP (2007). Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(12):1955–1958.
- [93] Kingma KJ & Hemley RJ (1994). Raman spectroscopic study of microcrystalline silica. *American Mineralogist*, 79(3–4):269–273.

- [94] Korsakov AV, Toporski J, Dieing T, Yang J & Zelenovskiy PS (2015). Internal diamond morphology: Raman imaging of metamorphic diamonds: Raman imaging of metamorphic diamonds. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(10):880–888.
- [95] Kramer JE (2009). PSK shift timing information detection using image processing and a matched filter. Mémoire de maîtrise, Naval Postgraduate School.
- [96] Kukura P, McCamant DW & Mathies RA (2007). Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 58(1):461–488.
- [97] Kumar BVKV & Bahri Z (1989). Phase-only filters with improved signal to noise ratio. *Applied Optics*, 28(2):250–257.
- [98] Kurepa S (1966). On the buniakowsky-cauchy-schwarz inequality. *Glasnik Mat. Ser. III*, 1(21):147–158.
- [99] Lane JM & Weiss C (1975). Review of articular cartilage collagen research. *Arthritis & Rheumatism*, 18(6):553–562.
- [100] Langbein W, Rocha-Mendoza I & Borri P (2009a). Coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing: theory and experiment. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(7):800–808.
- [101] Langbein W, Rocha-Mendoza I & Borri P (2009b). Single source coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing. *Applied Physics Letters*, 95(8):081109.
- [102] Latour G, Gusachenko I, Kowalczyk L, Lamarre I & Schanne-Klein M (2012). In vivo structural imaging of the cornea by polarization-resolved second harmonic microscopy. *Biomedical Optics Express*, 3(1):1–15.
- [103] Levenson MD (1982). *Introduction to Nonlinear Laser Spectroscopy*. Academic Press, New York.
- [104] Légaré F, Pfeffer C & Olsen BR (2007). The Role of Backscattering in SHG Tissue Imaging. *Biophysical Journal*, 93(4):1312–1320.

- [105] Liao CS, Slipchenko MN, Wang P, Li J, Lee SY, Oglesbee RA & Cheng JX (2015). Microsecond scale vibrational spectroscopic imaging by multiplex stimulated Raman scattering microscopy. *Light: Science & Applications*, 4(3):e265.
- [106] Liu B, Lee HJ, Zhang D, Liao CS, Ji N, Xia Y & Cheng JX (2015). Label-free spectroscopic detection of membrane potential using stimulated Raman scattering. *Applied Physics Letters*, 106(17):173704.
- [107] Liu Y, Lee YJ & Cicerone MT (2009a). Broadband CARS spectral phase retrieval using a time-domain Kramers–Kronig transform. *Optics letters*, 34(9):1363–1365.
- [108] Liu Y, Wang A & Freeman JJ (2009b). Raman, MIR, and NIR Spectroscopic Study of Calcium Sulfates: Gypsum, Bassanite, and Anhydrite. *40th Lunar and Planetary Science Conference*, volume 40, 2128 pages.
- [109] Long DA (2002). *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. John Wiley and Sons, Chichester; New York, 1er edition.
- [110] Lu S, Min W, Chong S, Holtom GR & Xie XS (2010). Label-free imaging of heme proteins with two-photon excited photothermal lens microscopy. *Applied Physics Letters*, 96(11):113701.
- [111] Lucke RL, Rickard LJ, Bashkansky M, Reintjes J & Funk EE (2002). Synthetic aperture ladar (SAL): fundamental theory, design equations for a satellite system, and laboratory demonstration. Naval Research Laboratory.
- [112] Maestre RA, Garcia J & Ferreira C (1997). Pattern recognition using sequential matched filtering of wavelet coefficients. *Optics Communications*, 133(1–6):401–414.
- [113] Mansfield JC, Winlove CP, Moger J & Matcher SJ (2008). Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 13(4):044020.
- [114] Marcus S, Colella BD & Green J (1994). Solid-state laser synthetic aperture radar. *Applied Optics*, 33(6):960–964.

- [115] Marom E (1978). Optical delay line matched filters. *IEEE Transactions on Circuits and Systems*, 25(6):360–364.
- [116] Maroudas A (1976). Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature*, 260(5554):808–809.
- [117] Martens WN, Frost RL, Kristof J & Theo Klopogge J (2002). Raman spectroscopy of dimethyl sulphoxide and deuterated dimethyl sulphoxide at 298 and 77 K. *Journal of Raman Spectroscopy*, 33(2):84–91.
- [118] Masia F, Glen A, Stephens P, Borri P & Langbein W (2013). Quantitative Chemical Imaging and Unsupervised Analysis Using Hyperspectral Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Analytical Chemistry*, 85(22):10820–10828.
- [119] Matcher SJ (2009). A review of some recent developments in polarization-sensitive optical imaging techniques for the study of articular cartilage. *Journal of Applied Physics*, 105(10):102041.
- [120] Matteini P, Cicchi R, Ratto F, Kapsokalyvas D, Rossi F, de Angelis M, Pavone FS & Pini R (2012). Thermal Transitions of Fibrillar Collagen Unveiled by Second-Harmonic Generation Microscopy of Corneal Stroma. *Biophysical Journal*, 103(6):1179–1187.
- [121] McCamant DW, Kukura P & Mathies RA (2003). Femtosecond Broadband Stimulated Raman: A New Approach for High-Performance Vibrational Spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 57(11):1317–1323.
- [122] McCreery R (2014). *National Institute for Nanotechnologies: Raman shift frequency standards*. <http://www.chem.ualberta.ca/~mccreery/raman.html>. Consulté le 27 Juillet 2016.
- [123] Mertz J & Moreaux L (2001). Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers. *Optics Communications*, 196(1–6):325–330.
- [124] Mienkina M, Friedrich CS, Gerhardt N, Wilkening W, Hofmann M & Schmitz G (2010a). Experimental evaluation of photoacoustic coded excitation using unipolar Go-

- lay codes. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 57(7):1583–1593.
- [125] Mienkina MP, Friedrich CS, Gerhardt NC, Beckmann MF, Schiffner MF, Hofmann MR & Schmitz G (2010b). Multispectral photoacoustic coded excitation imaging using unipolar orthogonal Golay codes. *Optics Express*, 18(9):9076–9087.
- [126] Min W, Freudiger CW, Lu S & Xie XS (2011). Coherent nonlinear optical imaging: Beyond fluorescence microscopy. *Annual review of physical chemistry*, 62:507–530.
- [127] Minns RJ & Steven FS (1977). The collagen fibril organization in human articular cartilage. *Journal of Anatomy*, 123(2):437–457.
- [128] Misaridis A (2001). *Ultrasound imaging using coded signals*. Thèse de doctorat, Technical University of Denmark, Center for Fast Ultrasound Imaging.
- [129] Misaridis T & Jensen J (2005a). Use of modulated excitation signals in medical ultrasound. part i: basic concepts and expected benefits. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 52(2):177–191.
- [130] Misaridis T & Jensen J (2005b). Use of modulated excitation signals in medical ultrasound. part II: design and performance for medical imaging applications. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 52(2):192–207.
- [131] Misaridis T & Jensen J (2005c). Use of modulated excitation signals in medical ultrasound. part III: high frame rate imaging. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 52(2):208–219.
- [132] Müller M & Schins JM (2002). Imaging the Thermodynamic State of Lipid Membranes with Multiplex CARS Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(14):3715–3723.
- [133] Müller M & Zumbusch A (2007). Coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *ChemPhysChem*, 8(15):2156–2170.



- [134] Moerner WE (2015). Single-Molecule Spectroscopy, Imaging, and Photocontrol: Foundations for Super-Resolution Microscopy (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 54(28):8067–8093.
- [135] Moger J, Garrett NL, Begley D, Mihoreanu L, Lalatsa A, Lozano MV, Mazza M, Schatzlein A & Uchegbu I (2012). Imaging cortical vasculature with stimulated Raman scattering and two-photon photothermal lensing microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(5):668–674.
- [136] Muller M, Squier J, Lange D & Brakenhoff G (2000). CARS microscopy with folded BoxCARS phasematching. *Journal of Microscopy*, 197(2):150–158.
- [137] Munhoz F, Brustlein S, Gachet D, Billard F, Brasselet S & Rigneault H (2009). Raman depolarization ratio of liquids probed by linear polarization coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(7):775–780.
- [138] Munhoz F, Brustlein S, Hostein R, Berto P, Brasselet S & Rigneault H (2012). Polarization resolved stimulated raman scattering: probing depolarization ratios of liquids. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(3):419–424.
- [139] Nandakumar P, Kovalev A & Volkmer A (2009). Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy. *New Journal of Physics*, 11(3):033026.
- [140] Nasdala L, Beyssac O, Schopf JW & Bleisteiner B (2012). Application of Raman-based images in the Earth sciences. *Raman Imaging*. Zoubir A, éditeur, Springer Berlin Heidelberg, numéro 168 de Springer Series in Optical Sciences, pages 145–187.
- [141] Nehrke G & Nouet J (2011). Confocal Raman microscope mapping as a tool to describe different mineral and organic phases at high spatial resolution within marine biogenic carbonates: case study on *Nerita undata* (Gastropoda, Neritopsina). *Biogeosciences*, 8(12):3761–3769.
- [142] Nesse W (2012). *Introduction to Optical Mineralogy*. Oxford University Press, New York, 4th edition.

- [143] North D (1963). An analysis of the factors which determine signal/noise discrimination in pulsed-carrier systems. *Proceedings of the IEEE*, 51(7):1016–1027.
- [144] Oatley CW, Nixon WC & Pease RFW (1966). Scanning Electron Microscopy. *Advances in Electronics and Electron Physics*. Marton L, éditeur, Academic Press, volume 21, pages 181–247.
- [145] Ogilvie JP, Beaurepaire E, Alexandrou A & Joffre M (2006). Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics Letters*, 31(4):480.
- [146] Olsen BR (1995). New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(5):720–727.
- [147] Ozeki Y, Dake F, Kajiyama S, Fukui K & Itoh K (2009). Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy. *Optics Express*, 17(5):3651.
- [148] Ozeki Y, Umemura W, Sumimura K, Nishizawa N, Fukui K & Itoh K (2012). Stimulated Raman hyperspectral imaging based on spectral filtering of broadband fiber laser pulses. *Optics Letters*, 37(3):431.
- [149] Parekh SH, Lee YJ, Aamer KA & Cicerone MT (2010). Label-Free Cellular Imaging by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Biophysical Journal*, 99(8):2695–2704.
- [150] Pegoraro AF, Ridsdale A, Moffatt DJ, Jia Y, Pezacki JP & Stolow A (2009). Optimally chirped multimodal CARS microscopy based on a single ti:sapphire oscillator. *Optics Express*, 17(4):2984–2996.
- [151] Pegoraro AF, Slepko AD, Ridsdale A, Moffatt DJ & Stolow A (2012). Hyperspectral multimodal CARS microscopy in the fingerprint region. *Journal of Biophotonics*, 7(1-2):49–58.
- [152] Pfeffer CP, Olsen BR & Légaré F (2007). Second harmonic generation imaging of fascia within thick tissue block. *Optics Express*, 15(12):7296.

- [153] Ploetz E, Laimgruber S, Berner S, Zinth W & Gilch P (2007). Femtosecond stimulated Raman microscopy. *Applied Physics B*, 87(3):389–393.
- [154] Pluta M (1988). *Advanced Light Microscopy: Principles and Basic Properties, Volume 1*. Elsevier, Amsterdam.
- [155] Pologruto TA, Sabatini BL & Svoboda K (2003). ScanImage: flexible software for operating laser scanning microscopes. *Biomed. Eng. Online*, 2(1):13.
- [156] Popov KI, Pegoraro AF, Stolow A & Ramunno L (2011). Image formation in CARS microscopy: effect of the Gouy phase shift. *Optics Express*, 19(7):5902.
- [157] Popov KI, Pegoraro AF, Stolow A & Ramunno L (2012). Image formation in CARS and SRS: effect of an inhomogeneous nonresonant background medium. *Optics letters*, 37(4):473–475.
- [158] Potma EO, Evans CL & Xie XS (2006). Heterodyne coherent anti-stokes raman scattering (CARS) imaging. *Optics Letters*, 31(2):241–243.
- [159] Potma EO & Xie XS (2004). CARS microscopy for biology and medicine. *Optics and photonics news*, 15(11):40–45.
- [160] Prasad P (2003). *Introduction to biophotonics*. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.
- [161] Prockop DJ & Kivirikko KI (1995). Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1):403–434.
- [162] Raman C (1928). A new radiation. *Indian Journal of Physics*, 2:387–398.
- [163] Reshak AH (2009). Enhancing the resolution of the forward second harmonic imaging using the two-photon laser scanning microscope. *Micron*, 40(7):750–755.
- [164] Rhee D, Greenfield D, Chen P & Schiffman J (2001). Reproducibility of retinal nerve fiber layer thickness measurements using scanning laser polarimetry in pseudophakic eyes. *Ophthalmic surgery and lasers*, 33(2):117–122.

- [165] Richardson CK & Pinckney DM (1984). The chemical and thermal evolution of the fluids in the Cave-in-Rock fluorspar district, Illinois; mineralogy, paragenesis, and fluid inclusions. *Economic Geology*, 79(8):1833–1856.
- [166] Rinia HA, Bonn M & Müller M (2006). Quantitative Multiplex CARS Spectroscopy in Congested Spectral Regions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(9):4472–4479.
- [167] Rivard M, Couture CA, Miri AK, Laliberté M, Bertrand-Grenier A, Mongeau L & Légaré F (2013). Imaging the bipolarity of myosin filaments with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy. *Biomedical Optics Express*, 4(10):2078–2086.
- [168] Rivard M, Laliberte M, Bertrand-Grenier A, Harnagea C, Pfeffer CP, Vallieres M, St-Pierre Y, Pignolet A, El Khakani MA & Legare F (2010). The structural origin of second harmonic generation in fascia. *Biomedical Optics Express*, 2(1):26–36.
- [169] Rivard M, Popov K, Couture CA, Laliberté M, Bertrand-Grenier A, Martin F, Pépin H, Pfeffer CP, Brown C, Ramunno L & Légaré F (2014). Imaging the noncentrosymmetric structural organization of tendon with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy. *Journal of Biophotonics*, 7(8):638–646.
- [170] Roberge D & Sheng Y (1994). Optical wavelet matched filter. *Applied Optics*, 33(23):5287–5293.
- [171] Rocha-Mendoza I, Langbein W & Borri P (2008). Coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing with glass dispersion. *Applied Physics Letters*, 93(20):201103.
- [172] Roedder E & Ribbe PH (1984). *Fluid Inclusions: Reviews in Mineralogy*. volume 12. Mineralogical Society of America, Washington, D.C.; Chelsea, Michigan.
- [173] Ryu IS, Camp CH, Jin Y, Cicerone MT & Lee YJ (2015). Beam scanning for rapid coherent Raman hyperspectral imaging. *Optics Letters*, 40(24):5826.
- [174] Saar BG, Freudiger CW, Reichman J, Stanley CM, Holtom GR & Xie XS (2010). Video-Rate Molecular Imaging in Vivo with Stimulated Raman Scattering. *Science*, 330(6009):1368–1370.

- [175] Sathyanarayana DN (2004). *Vibrational Spectroscopy: Theory and Applications*. New Age International, New Delhi.
- [176] Schopf JW, Kudryavtsev AB & Sergeev VN (2010). Confocal Laser Scanning Microscopy and Raman Imagery of the Late Neoproterozoic Chichkan Microbiota of South Kazakhstan. *Journal of Paleontology*, 84(3):402–416.
- [177] Schrader B & Meier W (1976). *Raman/IR Atlas of Organic Compounds 1976*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- [178] Shen XA, Bai YS & Kachru R (1992). Reprogrammable optical matched filter for biphas-coded pulse compression. *Optics Letters*, 17(15):1079–1081.
- [179] Sheng Y, Roberge D, Szu H & Lu T (1993). Optical wavelet matched filters for shift-invariant pattern recognition. *Optics Letters*, 18(4):299–301.
- [180] Sheppard CJR & Kompfner R (1978). Resonant scanning optical microscope. *Applied Optics*, 17(18):2879.
- [181] Slepkov AD, Ridsdale A, Pegoraro AF, Moffatt DJ & Stolow A (2010). Multimodal CARS microscopy of structured carbohydrate biopolymers. *Biomedical Optics Express*, 1(5):1347.
- [182] Slipchenko MN, Chen H, Ely DR, Jung Y, Carvajal MT & Cheng JX (2010). Vibrational imaging of tablets by epi-detected stimulated Raman scattering microscopy. *The Analyst*, 135(10):2613.
- [183] Slipchenko MN, Oglesbee RA, Zhang D, Wu W & Cheng JX (2012). Heterodyne detected nonlinear optical imaging in a lock-in free manner. *Journal of Biophotonics*, 5(10):801–807.
- [184] Stoller P, Celliers PM, Reiser KM & Rubenchik AM (2003). Quantitative second-harmonic generation microscopy in collagen. *Applied Optics*, 42(25):5209.
- [185] Stoller P, Reiser KM, Celliers PM & Rubenchik AM (2002). Polarization-Modulated Second Harmonic Generation in Collagen. *Biophysical Journal*, 82(6):3330–3342.

- [186] Strupler M, Pena AM, Hernest M, Tharoux PL, Martin JL, Beaurepaire E & Schanne-Klein MC (2007). Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Optics Express*, 15(7):4054.
- [187] Su PJ, Chen WL, Chen YF & Dong CY (2011). Determination of Collagen Nanostructure from Second-Order Susceptibility Tensor Analysis. *Biophysical Journal*, 100(8):2053–2062.
- [188] Suhaimi JL, Chung CY, Lilledahl MB, Lim RS, Levi M, Tromberg BJ & Potma EO (2012). Characterization of Cholesterol Crystals in Atherosclerotic Plaques Using Stimulated Raman Scattering and Second-Harmonic Generation Microscopy. *Biophysical Journal*, 102(8):1988–1995.
- [189] Terhune RW, Maker PD & Savage CM (1965). Measurements of Nonlinear Light Scattering. *Physical Review Letters*, 14(17):681–684.
- [190] Tiaho F, Recher G & Rouède D (2007). Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy. *Optics Express*, 15(19):12286.
- [191] Turin G (1960). An introduction to matched filters. *IRE Transactions on Information Theory*, 6(3):311–329.
- [192] Uchiyama K, Hibara A, Kimura H, Sawada T & Kitamori T (2000). Thermal Lens Microscope. *Japanese Journal of Applied Physics*, 39(Pt. 1, No. 9A):5316–5322.
- [193] Vartiainen EM, Rinia HA, Müller M & Bonn M (2006). Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Optics Express*, 14(8):3622.
- [194] Veres IA, Cleary A, Thursby G, McKee C, Armstrong I, Pierce G & Culshaw B (2013). Golay code modulation in low-power laser-ultrasound. *Ultrasonics*, 53(1):122–129.
- [195] Volkmer A, Book LD & Xie XS (2002). Time-resolved coherent anti-stokes raman scattering microscopy: Imaging based on raman free induction decay. *Applied Physics Letters*, 80(9):1505.

- [196] Volkmer A, Cheng JX & Sunney Xie X (2001). Vibrational imaging with high sensitivity via epidetectered coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Physical Review Letters*, 87(2).
- [197] Walrafen GE (1990). Raman spectrum of water: transverse and longitudinal acoustic modes below  $\approx 300 \text{ cm}^{-1}$  and optic modes above  $\approx 300 \text{ cm}^{-1}$ . *The Journal of Physical Chemistry*, 94(6):2237–2239.
- [198] Wang A, Korotev RL, Jolliff BL & Ling Z (2015). Raman imaging of extraterrestrial materials. *Planetary and Space Science*, 112:23–34.
- [199] Wang H, Fu Y, Zickmund P, Shi R & Cheng JX (2005). Coherent anti-stokes raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues. *Biophysical Journal*, 89(1):581–591.
- [200] Wang K, Zhang D, Charan K, Slipchenko MN, Wang P, Xu C & Cheng JX (2013a). Time-lens based hyperspectral stimulated Raman scattering imaging and quantitative spectral analysis. *Journal of Biophotonics*, 6(10):815–820.
- [201] Wang P, Li J, Wang P, Hu CR, Zhang D, Sturek M & Cheng JX (2013b). Label-Free Quantitative Imaging of Cholesterol in Intact Tissues by Hyperspectral Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(49):13042–13046.
- [202] Wang P, Slipchenko MN, Zhou B, Pinal R & Cheng JX (2012). Mechanisms of Epi-Detected Stimulated Raman Scattering Microscopy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 18(1):384–388.
- [203] Webb RH (1996). Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics*, 59(3):427.
- [204] Williams RM, Zipfel WR & Webb WW (2001). Multiphoton microscopy in biological research. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(5):603–608.
- [205] Williams RM, Zipfel WR & Webb WW (2005). Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophysical Journal*, 88(2):1377–1386.

- [206] Woodbury E & Ng W (1962). Ruby laser operation in near ir. *Proceedings of the Institute of Radio Engineers*, 50(11):2367.
- [207] Yasui T, Sasaki K, Tohno Y & Araki T (2006). Tomographic Imaging of Collagen Fiber Orientation in Human Tissue Using Depth-Resolved Polarimetry of Second-Harmonic-Generation Light. *Optical and Quantum Electronics*, 37(13-15):1397–1408.
- [208] Yasui T, Tohno Y & Araki T (2004). Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light. *Applied Optics*, 43(14):2861.
- [209] Yeh A, Hammerwilson M, Vansickle D, Benton H, Zoumi A, Tromberg B & Peavy G (2005). Nonlinear optical microscopy of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(4):345–352.
- [210] Zhang C, Zhang D & Cheng JX (2015). Coherent Raman Scattering Microscopy in Biology and Medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17(1):415–445.
- [211] Zhang D, Slipchenko MN & Cheng JX (2011). Highly Sensitive Vibrational Imaging by Femtosecond Pulse Stimulated Raman Loss. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(11):1248–1253.
- [212] Zhang D, Slipchenko MN, Leaird DE, Weiner AM & Cheng JX (2013a). Spectrally modulated stimulated Raman scattering imaging with an angle-to-wavelength pulse shaper. *Optics Express*, 21(11):13864.
- [213] Zhang D, Wang P, Slipchenko MN, Ben-Amotz D, Weiner AM & Cheng JX (2013b). Quantitative Vibrational Imaging by Hyperspectral Stimulated Raman Scattering Microscopy and Multivariate Curve Resolution Analysis. *Analytical Chemistry*, 85(1):98–106.
- [214] Zipfel WR, Williams RM & Webb WW (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11):1369–1377.
- [215] Zoumi A, Yeh A & Tromberg BJ (2002). Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17):11014–11019.



- [216] Zumbusch A, Holtom GR & Xie XS (1999). Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering. *Physical Review Letters*, 82(20):4142–4145.