POLYPUBLIE
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Conception d'un microscope multiphoton fibré et compact incorporant un coupleur à fibre à double gaine
Auteur: Author:	Thomas Perrillat-Bottonet
Date:	2017
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Perrillat-Bottonet, T. (2017). Conception d'un microscope multiphoton fibré et compact incorporant un coupleur à fibre à double gaine [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/2580/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/2580/
Directeurs de recherche: Advisors:	Caroline Boudoux
Programme: Program:	Génie physique

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CONCEPTION D'UN MICROSCOPE MULTIPHOTON FIBRÉ ET COMPACT INCORPORANT UN COUPLEUR À FIBRE À DOUBLE GAINE

THOMAS PERRILLAT-BOTTONET
DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE PHYSIQUE)
JUIN 2017

© Thomas Perrillat-Bottonet, 2017.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

CONCEPTION D'UN MICROSCOPE MULTIPHOTON FIBRÉ ET COMPACT INCORPORANT UN COUPLEUR À FIBRE À DOUBLE GAINE

présenté par : PERRILLAT-BOTTONET Thomas
en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. MEUNIER Michel, Ph. D., président
Mme BOUDOUX Caroline, Ph. D., membre et directrice de recherche
M. STOLOW Albert, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

À Noémie et Chloé

REMERCIEMENTS

Cet échange entre l'École polytechnique (Paris) et l'École Polytechnique de Montréal m'a donné l'opportunité de découvrir le monde de la recherche en biophotonique au travers du projet de maitrise présenté dans ce mémoire. J'aimerais remercier les personnes qui m'ont permis de vivre cette expérience et qui ont contribué à la rendre enrichissante. Tout d'abord, je tiens à remercier Pre. Caroline Boudoux pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et accepté de diriger mes travaux. Merci pour votre temps, votre disponibilité et votre soutien. Merci également pour toutes ces belles opportunités que vous m'avez données : conférences internationales, bourses, livre... Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres présents et passés du Laboratoire d'Optique Diagnostique et d'Imagerie (LODI) que j'ai pu côtoyer au cours de ce projet, en particulier à :

— Xavier Attendu : Pour toutes ces discussions sur des sujets divers et variés, pour ton humour et ta bonne humeur qui m'ont redonnés le sourire quand je doutais et pour avoir été plus qu'un simple collègue de bureau mais un véritable ami. Les râlements du français vont te manquer, tu verras. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau dans le futur.

— Mathias Strupler : Pour avoir pris le temps de répondre à toutes les questions que je me posais, et il y'en avait quelques unes, sans jamais perdre patience. J'ai énormément appris grâce à toi.

— Robin Guay-Lord : Pour m'avoir aidé et formé au code Labview et pour avoir réalisé des canaux microfluidiques pour mon projet. Mais également pour toutes ces pauses discussions à trois avec Xavier.

— Wendy-Julie Madore, Étienne de Montigny et Fouzi Benboujja : Pour avoir été des mentors de tous les jours, que ce soit sur les appareils que je ne maitrisais pas en arrivant ou pour vos conseils tirés de vos expériences passées.

— Kathy Beaudette : Pour m'avoir épaulé en conférence où je me sentais un peu perdu dans cette marée humaine au début.

J'aimerai également remercier le Pr. Nicolas Godbout pour avoir répondu à mes interrogations sur les effets non linéaires ainsi que Mikaël Leduc pour m'avoir formé et aidé avec le laser Ti :S et pour tes conseils pratiques lors des manipulations. Merci au Pr. Stéphane Kéna-Cohen et à son équipe de m'avoir laissé accéder à leur laser Ti :S. Je remercie également Lucas Majeau (Castor Optics) pour m'avoir fabriqué et aidé avec le coupleur. Enfin, je remercie les organismes qui ont financé ce projet : le CRSNG, le GRSTB, la Fondation Canadienne pour l'Innovation, le SPIE ainsi que la compagnie MenloSystems pour le prêt d'un laser fibré.

RÉSUMÉ

La microscopie multiphotonique est une technique d'imagerie basé sur la génération d'effets d'optique non linéaires dans les tissus biologiques possédant de nombreux avantages comparativement à la microscopie confocal à laquelle elle est souvent associée. En effet, en plus de fournir des images tridimensionnelles d'échantillon biologique avec une haute résolution ainsi qu'une profondeur de pénétration importante, elle permet d'extraire des informations propres aux tissus observés, par exemple la présence de collagène ou de structure fibrillaire. Elle reste aujourd'hui une technique principalement utilisée en laboratoire, à cause de la taille d'un tel appareil et de la propagation hors fibre du faisceau laser d'excitation et des signaux collectés. Ainsi, son transfert vers la clinique dans une application endoscopique nécessite de relever deux défis majeures : la propagation et la collection fibrées de l'excitation et des signaux et l'élaboration de sondes endoscopiques adaptées à l'imagerie multiphotonique.

L'objectif principal de ce projet de maitrise est de réaliser un microscope multiphoton complètement fibré en utilisant un coupleur à fibre à double gaine (DCFC), à une longueur d'onde d'excitation 1550 nm, afin d'apporter une solution technologique à la réalisation d'un système complètement fibré, robuste et compact. Ce type de composant fibré doit permettre de remplacer l'utilisation d'un miroir dichroïque, composant non-fibré, utilisé dans la plupart des dispositifs actuels. L'utilisation d'une fibre à double gaine (DCF) est intéressante car elle permet de délivrer l'excitation laser par le coeur et une collection des signaux non linéaires par la gaine interne plus large, augmentant l'efficacité de collection.

Dans un premier temps, des simulations numériques ont été réalisées afin de mieux cerner les effets liés à la propagation fibré des impulsions femtosecondes dans différents régimes pour les différents lasers utilisés dans ce projet. Ensuite, l'élaboration du circuit de fibre, incluant le DCFC, et sa compensation de dispersion fibré ont été réalisées. Enfin, en combinant ce circuit de fibre à une tête optique et à un système d'acquisition développé en parallèle, un microscope multimodale couplant imagerie confocale et multiphotonique a été réalisé. L'utilisation d'un laser fibré femtoseconde comme source d'excitation termine de rendre le microscope entièrement fibré, compact et robuste. Le système d'imagerie développé a été ensuite caractérisé et des échantillons biologiques ont pu être imagés.

Ainsi, ce projet de maitrise démontre qu'il est possible de réaliser un tel microscope complètement fibré, adapté à l'imagerie multiphotonique, en se basant sur un coupleur à fibre à double gaine (DCFC).

ABSTRACT

Multiphoton microscopy is an imaging technique based on the nonlinear interactions of light with biological tisuses such as second harmonic generation (GSH) and two-photon excitation fluorescence (2PEF). It provides high-resolution three-dimensional imaging through the intrinsic optical sectioning of nonlinear signals with a high penetration depth compared to that of reflectance confocal microscopy. Nonlinear signals can reveal the tissue composition and sub-micrometric organization like the fibrillar structure of collagen bundles. Multiphoton microscopy has already shown its impact in biological research, namely in the fields of neurobiology, immunology, cancer research and embryology. Typically, these microscopes operate under free space propagation, using a dichroic mirror to separate the nonlinear signals from the excitation laser, confining this technology to a laboratory setting. Moving towards clinical application needs solving two main issues : propagating the pulsed laser excitation and collecting nonlinear signals through a fiber-based endoscopic probe.

The main topic of this project is to realize an all-fiber multiphoton microscope using a double-clad fiber coupler (DCFC) at 1550 nm to answer the first issue mentioned above. This fiber component replaces the need for a dichroic mirror and allows for multiplexing second harmonic generation and 2PEF, collected from the inner cladding using a double-clad fiber coupler; and reflectance confocal microscopy, detected from the core acting as a confocal pinhole.

First, numerical simulation were performed to understand pulse propagation through fibers and how it impacts nonlinear signals. Chromatic dispersion and self phase modulation are the main effects considered. Then, we elaborated a fiber circuit, including the DCFC, and achieved fiber dispersion compensation. Finally, combined to an optical microscope head and a custom acquisition system, an all-fiber multimodal microscope, multiplexing confocal and multiphoton imaging, was demonstrated. Using a femtosecond fiber laser as the excitation source, this all-fiber system prooved to be more compact and less sensitive to alignment. This new imaging system was characterized and some biological tissue were imaged.

This master's thesis shows that it is possible to achieve such an all-fiber multiphoton microscope, based on a double-clad fiber coupler (DCFC).

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE iii

REMERCIEMENTS iv

RÉSUMÉ v

ABSTRACT vi

TABLE DES MATIÈRES vii

LISTE DES TABLEAUX ix

LISTE DES FIGURES x

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xii

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 4
- 2.1 La microscopie multiphotonique 4
  - 2.1.1 Les effets non linéaires 4
  - 2.1.2 Excitation et détection 8
  - 2.1.3 Le microscope multiphoton classique 11
- 2.2 Des avantages pour l'imagerie biomédicale 14
  - 2.2.1 Une profondeur de pénétration importante 15
  - 2.2.2 Un confinement de l'excitation 16
  - 2.2.3 Une information organisationnelle 17
- 2.3 De nouvelles implémentations technologiques 18
  - 2.3.1 Au-delà des standards 18
  - 2.3.2 Vers l'endoscopie multiphotonique 19
  - 2.3.3 Sujet de recherche 24

CHAPITRE 3 SIMULATION DE LA PROPAGATION D'IMPULSIONS FIBRÉE ET GÉNÉRATION D'EFFETS NON LINÉAIRES 27
- 3.1 Régime impulsionnel et fibres optiques 27
  - 3.1.1 Description d'une impulsion 27

3.1.2 Propagation fibrée d'impulsion femtoseconde 34
3.2 Génération de signaux multiphoton du deuxième ordre 40
3.2.1 La fluorescence par absorption de deux photons 40
3.2.2 La génération de seconde harmonique 46
3.3 Conclusion 50

CHAPITRE 4 RÉALISATION DU MICROSCOPE MULTIPHOTON FIBRÉE . . 52
4.1 Compensation de la dispersion 52
4.1.1 Ensemble Ti :S + OPO 52
4.1.2 Laser fibré femtoseconde 56
4.2 Design et réalisation du microscope 59
4.2.1 Coupleur à fibre à double gaine (DCFC) 59
4.2.2 Tête optique du microscope 63
4.2.3 Acquisition et contrôle 65
4.2.4 Montages expérimentaux 66
4.3 Imagerie confocale et multiphotonique 68
4.3.1 Caractérisation 68
4.3.2 Imagerie d'échantillons 71
4.3.3 Discussion et limitations actuelles 75
4.4 Conclusion 76

CHAPITRE 5 CONCLUSION 78
5.1 Synthèse des travaux 78
5.1.1 Propagation fibrée d'impulsion et compensation de la dispersion . . . 78
5.1.2 DCFC et collection de signaux non-linéaires 79
5.1.3 Réalisation du système d'imagerie 79
5.1.4 Caractérisation du microscope et imagerie d'échantillons biologiques . 80
5.2 Limitations de la solution proposée 80
5.3 Améliorations futures 81

RÉFÉRENCES 83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Sections efficaces d'actions pour différents fluorophores 7
Tableau 2.2 Caractéristiques d'un microscope confocal et d'un microscope multi-photon standard 15
Tableau 3.1 Caractéristiques des lasers impulsionnels utilisés 33
Tableau 3.2 Caractéristiques des différentes fibres optiques utilisées 45
Tableau 4.1 Caractéristiques des impulsions pour l'ensemble Ti :S + OPO 57
Tableau 4.2 Caractéristiques des impulsions pour le laser fibré (ELMO+ELMA) . 60
Tableau 4.3 Caractéristiques du coupleur DCFC utilisé 62
Tableau 4.4 Caractéristiques du système final 77

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure et organisation du mémoire 3
Figure 2.1 Diagramme de Jablonski des processus du deuxième ordre 6
Figure 2.2 Diagramme de Jablonski de processus du troisième ordre 9
Figure 2.3 Spectre d'excitation et d"émission 1PEF, 2PEF, 3PEF, GSH et GTH. 10
Figure 2.4 Détecteurs utilisés en microscopie multiphotonique 11
Figure 2.5 Le microscope multiphoton classique 13
Figure 2.6 Confinement de l'excitation et information organisationnelle en microcopie multiphotonique 17
Figure 2.7 Schémas de différents types de fibres optiques 20
Figure 2.8 Extraction des modalités d'imagerie confocale et non linéaire 22
Figure 2.9 Microscope multiphotonique fibré incorporant un coupleur à fibre à double gaine 26
Figure 3.1 Profils temporels du champ et de la puissance d'une impulsion gaussienne 29
Figure 3.2 Autocorrélation et spectre d'une impulsion en sortie d'OPO. 32
Figure 3.3 Lasers impulsionnels utilisés 35
Figure 3.4 Simulation de la propagation d'une impulsion dans une fibre optique avec dispersion chromatique 36
Figure 3.5 Simulation de la propagation d'une impulsion dans une fibre optique avec automodulation de phase 38
Figure 3.6 Simulation de la propagation d'une impulsion dans une fibre optique avec automodulation de phase et dispersion d'ordre deux. 39
Figure 3.7 Génération de troisième harmonique dans la fibre optique 39
Figure 3.8 Schémas du circuit de fibres optiques 44
Figure 3.9 Simulations du nombre de photons N_{2PEF} émis en fonction de la puissance moyenne P_{moy} 46
Figure 3.10 Spectre d'émission (2PEF) de deux fluorophores : ICG et DTTCI . . 47
Figure 3.11 Signal de GSH sur un cristal de BBO 49
Figure 4.1 Compensation de la dispersion : schéma du montage expérimental avec source Ti :S+OPO 53
Figure 4.2 Compensation de la dispersion pour l'ensemble Ti :S+OPO 54
Figure 4.3 Spectres mesurés pour différentes configurations de fibres optiques pour l'ensemble Ti :S + OPO 55

Figure 4.4 Compensation de la dispersion : schéma du montage expérimental avec source ELMO 56
Figure 4.5 Compensation de la dispersion pour le laser fibré (ELMO) 58
Figure 4.6 Coupleur à fibre à double gaine (DCFC) utilisé 60
Figure 4.7 Étendue optique et transmission multimodale du DCFC 62
Figure 4.8 DCFC et propagation d'impulsion femtoseconde 64
Figure 4.9 Design Zemax de la tête optique 65
Figure 4.10 Tête optique du microscope 66
Figure 4.11 Interface Labview pour l'acquisition 67
Figure 4.12 Montage d'imagerie avec source Ti :S et OPO 69
Figure 4.13 Montage d'imagerie avec source fibrée 70
Figure 4.14 Caractérisation en résolution de l'imagerie confocale 72
Figure 4.15 Caractérisation en résolution de l'imagerie 2PEF 72
Figure 4.16 Imagerie confocale d'échantillons 74
Figure 4.17 Imagerie GSH d'échantillons 74
Figure 4.18 Imagerie 2PEF d'échantillons 76

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

1PEF	Fluorescence par excitation à un photon, de l'anglais *1 photon excitation fluorescence*
2PEF	Fluorescence par excitation à deux photons, de l'anglais *2 photons excitation fluorescence*
3PEF	Fluorescence par excitation à trois photons, de l'anglais *3 photons excitation fluorescence*
APD	PhotoDiode à avalanche, de l'anglais *avalanche photodiode*
CARS	Diffusion cohérente Raman Anti-Stokes, de l'anglais *coherent anti-Stokes Raman*
DCF	Fibre à double gaine, de l'anglais *double-clad fiber*
DCFC	Coupleur à fibre à double gaine, de l'anglais *double-clad fiber coupler*
FLIM	Imagerie par mesure du temps de vie de fluorescence, de l'anglais *fluorescence lifetime imaging*
GSH	Génération de Seconde Harmonique
GTH	Génération de Troisième Harmonique
MMF	Fibre multimodale, de l'anglais *multimode fiber*
ON	Ouverture numérique
OPO	Oscillateur paramétrique optique
PCF	Fibre à cristaux photoniques, de l'anglais *photonic-crystal fiber*
PD	Photodiode
PMT	Tube Photo-Multiplicateur, de l'anglais *photomultiplier tube*
RSB	Ratio Signal sur Bruit
SMF	Fibre unimodale, de l'anglais *single-mode fiber*
Ti : S	Laser Titane : Saphir

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La microscopie multiphotonique est une modalité d'imagerie basée sur les intéractions non linéaires entre la lumière et les tissus biologiques. Cette modalité d'imagerie à haute résolution latérale ($\sim 1\ \mu m$) offre de nombreux avantages comme son sectionnement optique intrinsèque permettant de reconstruire des images tridimensionnelles d'échantillons observés. L'origine du contraste permet de sonder la présence de molécule dans les tissus, sans l'ajout de fluorophore, ou encore d'observer son organisation sub micrométrique, comme c'est le cas pour les fibres de collagène. Ce dernier point est très intéressant notamment dans le cas de l'étude des cordes vocales et de leurs développements (Deterre, 2012).

Les deux effets les plus couramment utilisés sont la génération de seconde harmonique (GSH) et la fluorescence par absorption à deux photons (2PEF). Ces deux modalités sont régulièrement couplées à une autre modalité d'imagerie : la microscopie confocale en réflectance (RCM). En effet, cette dernière, dont le sectionnement optique est assuré par la présence d'un trou sténopé, possède des résolutions similaires à celles de la microscopie multiphoton. Exploitant les interactions linéaires entre la lumière et les tissus biologiques, le microscope confocale permet d'apporter une information structurelle complémentaire. L'intensité du signal reçu, nettement plus élevée que pour les signaux non linéaires, permet un positionnement rapide de l'échantillon en vue de l'imagerie multiphotonique.

Bien que la microscopie non linéaire possède un fort potentiel pour la recherche notamment en neurobiologie, en cancérologie ou en immunologie, elle reste trop souvent cantonnée à une utilisation en laboratoire. En effet, ces systèmes d'imagerie sont volumineux et se basent sur une propagation non fibrée du faisceau. Un transfert clinique pérenne de l'imagerie multiphotonique nécessite de relever deux défis majeurs :

- développer un système fibré, compact et robuste permettant à la fois la transmission de l'illumination pulsée et la collection efficace des signaux d'imagerie ;
- réaliser des sondes endoscopiques spécifiques à la zone que l'on souhaite imager en s'adaptant aux contraintes de la microscopie multiphotonique.

Comme cela est discuté en détail dans le Chapitre 2, le développement de sonde endoscopique adapté à l'imagerie multiphotonique a été proposé par quelques groupes. Bien qu'ils soient basés sur l'utilisation d'une fibre optique en amont d'une sonde, les systèmes proposés ne sont jamais complètement fibrés. En effet, l'utilisation de miroir dichroïque permettant de séparer l'excitation des signaux non linéaires collectés persiste. Afin de répondre à la contrainte d'alignement et de robustesse énoncée précédemment, ce projet de recherche consiste à réaliser un

microscope multiphoton complètement fibré incorporant un coupleur DCFC à une longueur d'onde d'excitation de 1550 nm. Ce composant fibré nous permettra, en plus de séparer excitation et signaux non linéaires directement dans la fibre, de combiner les deux modalités d'imagerie confocal et multiphotonique. Le choix de la longueur d'onde des télécommunications nous permet de profiter de nombreux composants fibrés (fibre à compensation de dispersion, laser fibré femtoseconde,...) ainsi qu'une profondeur de pénétration accrue (Horton et al., 2013). En revanche, ce choix laisse une incertitude sur l'intensité des effets non linéaire attendus.

Le Chapitre 2 de ce mémoire fait un tour des connaissances de la microscopie multiphotonique en commençant par les principes expliquant les effets non linéaires en jeux avant de s'attarder sur la réalisation technologique des microscopes commerciaux utilisés en laboratoire. Les avantages pour l'imagerie biomédicale sont ensuite détaillés. Enfin, les développements technologiques récents de la microscopie multiphotonique sont passés en revue, particulièrement celles conduisant à des applications endoscopiques de l'imagerie multiphotonique. Ce dernier point permettra ensuite d'identifier les objectifs spécifiques de ce projet et d'ébaucher une proposition préliminaire du microscope. Comme cela est expliqué au Chapitre 2, la microscopie multiphotonique requiert l'utilisation d'impulsion temporellement courte (régime femtoseconde). La propagation fibrée de ces impulsions est étudiées théoriquement dans le Chapitre 3. Les effets majeurs perturbant la propagation de l'excitation y sont détaillés et simulés. En couplant ces résultats sur la propagation des impulsions aux théories de la 2PEF et de la GSH abordées en seconde partie de chapitre, nous pouvons identifier différents régimes de propagation optimale pour le système final : compensation de la dispersion et propagation solitonique. Les premiers résultats de génération et de collection des effets non linéaires à travers le DCFC sur des échantillons "simples" (cristal et fluorophore) sont également présentés. Le Chapitre 4 présente dans un premier temps la compensation de dispersion fibrée et la caractérisation du circuit de fibres dans son ensemble. Le design du microscope dans son ensemble est ensuite abordé : le DCFC, la tête optique du microscope et le système d'acquisition. Les montages expérimentaux réalisés pour chacune des deux sources lasers utilisées dans le cadre de ce projet de maitrise sont ensuite détaillés. La dernière partie expose la caractérisation du microscope et les images obtenues pour chacune des modalités confocale, GSH et 2PEF. Enfin, le Chapitre 5 présente une synthèse des travaux et une discussion des résultats obtenus dans le cadre de ce projet. Les limitations actuelles du système et des pistes d'améliorations possibles sont également énoncées comme la possibilité de migrer vers d'autres plages de longueur d'onde au voisinage de 800 nm ou de 1700 nm. La figure 1.1 présente la structure de ce mémoire et résume le contenu des chapitres.

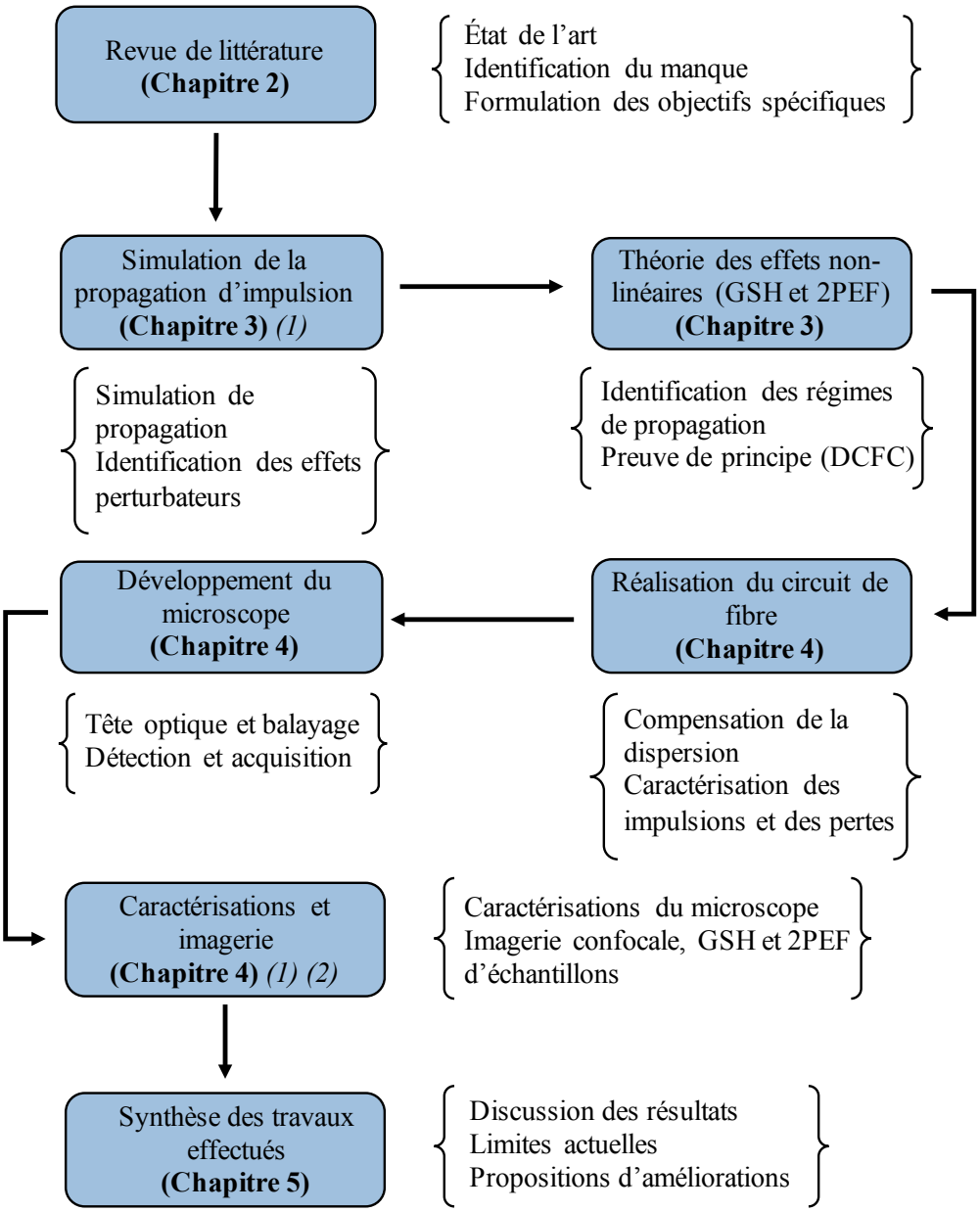


Figure 1.1 Structure et organisation du mémoire - (1) Ces chapitres ont fait l'object d'un article de conférence (Perrillat-Bottonet et al., 2017) - (2) Ce chapitre fait l'objet d'un manuscrit en préparation (Perrillat-Bottonet et al., Journal of Biomedical Optics)

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

La microscopie multiphotonique, également appelée microscopie non linéaire, est une technique d'imagerie qui a connu un grand essor dans le domaine biomédical au cours de ces trente dernières années (Zipfel et al., 2003). Bien que la fluorescence par excitation à deux photons (2PEF), au coeur de ce type de microscopie, ait été théoriquement prédite dès 1931 par Maria Göppert-Mayer (Göppert-Mayer, 1931), il fallut attendre 1996 pour voir apparaitre le premier microscope multiphoton commercial (BioRad Microscience, Royaume-Uni). Pourquoi aura-t-il fallu attendre près de 60 ans entre les prédictions théoriques et les premiers systèmes cliniques commerciaux ? Pourquoi un tel engouement apparait-il aujourd'hui dans le domaine de l'imagerie médicale ? Quelle place et quelle direction la microscopie multiphotonique prend-t-elle ? Comment ce projet de maitrise s'inscrit-il dans cette logique ? Afin de répondre à ces questions, ce chapitre retrace dans un premier temps l'émergence et l'évolution de cette technique jusqu'à son utilisation médicale. Dans une seconde partie, nous nous intéresserons davantage à son application biomédicale, à la variété des tissus imagés et à son apport clinique. Dans un troisième temps, nous nous concentrerons sur l'aspect technologique, les nouvelles approches possibles et comment ce projet de maitrise s'inscrit dans ce cadre.

2.1 La microscopie multiphotonique

Comme tout système d'imagerie optique, la microscopie multiphotonique repose sur trois éléments primordiaux :

- une source de contraste lié à un effet optique,
- une source lumineuse capable de le générer,
- un détecteur capable de discerner ses variations.

Cette section décrit ces trois éléments ainsi que les caractéristiques et l'implémentation d'un microscope multiphoton tarditionnel.

2.1.1 Les effets non linéaires

Au sein d'un milieu exposé sous un champ électrique, $\vec{\mathcal{E}}$, des moments dipolaires sont susceptibles d'apparaitre localement. L'ensemble de ces moments dipolaires accumulés peut être représenté de façon macroscopique par un vecteur densité de polarisation, $\vec{\mathcal{P}}$. La dépendance de ce vecteur au champ électrique peut être décrite à l'aide d'une expansion de Taylor géné-

ralisée en écriture tensorielle (Boyd, 2003) :

$$\vec{\mathcal{P}} = \vec{\mathcal{P}}_0 + \underbrace{\epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(1)} \vec{\mathcal{E}}}_{\vec{\mathcal{P}}^{(1)}} + \underbrace{\epsilon_0 \underline{\underline{\underline{\chi}}}^{(2)} \vec{\mathcal{E}}\vec{\mathcal{E}}}_{\vec{\mathcal{P}}^{(2)}} + ..., \tag{2.1}$$

où $\underline{\underline{\chi}}^{(1)}$ est un tenseur d'ordre deux décrivant la dépendance linéaire du vecteur polarisation au champ électrique et $\underline{\underline{\underline{\chi}}}^{(2)}$, un tenseur d'ordre trois décrivant sa dépendance quadratique au champ électrique. Ce dernier tenseur, nommé tenseur de susceptibilité électrique d'ordre deux, encode cette non-linéarité du milieu et sa capacité à générer des effets non linéaires d'ordre deux. Pour des cristaux (KDP, $LiNb0_3$,...), la valeur de ses composantes non nulles varie entre quelques pm/V à quelques centaines de pm/V (Boyd, 2003). Ce développement peut être poursuivi afin de faire apparaitre des ordres supérieurs.
Dans un milieu homogène et isotrope, le champ électrique et le vecteur densité de polarisation sont reliés d'autre part par l'équation d'onde dérivant des équations de Maxwell (Saleh et al., 1991) :

$$\vec{\nabla}^2 \vec{\mathcal{E}} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{\mathcal{E}}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{\mathcal{P}}}{\partial t^2}, \tag{2.2}$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide et μ_0 la perméabilité électrique du vide. En injectant l'équation 2.1 dans l'équation 2.2, il est possible d'obtenir une équation aux dérivées partielles régissant l'évolution spatiale et temporelle du champ électrique. Cette description ondulatoire est utilisée afin de traiter les processus non linéaires paramétriques tels que la génération d'harmonique et les mélanges à plusieurs ondes. Elle a été originellement formalisée par Bloembergen (1965). Historiquement, c'est un processus non paramétrique qui a été prédit pour la première fois par Göppert-Mayer (1931).

Fluorescence par excitation à deux photons (2PEF)

En effet, dans ses travaux, Göppert-Mayer étudie l'interaction de deux photons identiques, de pulsation ω_1, interagissant avec un atome de façon quasi simultanée (en dessous d'un temps caractéristique de quelques femtosecondes). À l'aide de la formalisation de la mécanique quantique, de l'interaction lumière-matière et de la théorie des perturbations, elle prédit théoriquement que deux photons peuvent être simultanément absorbés par un atome en transitant via un état virtuel (V), peuplant alors un niveau d"énergie plus élevée (Masters and So, 2008). Cet atome peut alors se relaxer et émettre dans un second temps un photon de pulsation ω_2 supérieure à celles des photons absorbés. Une telle transition est représentée

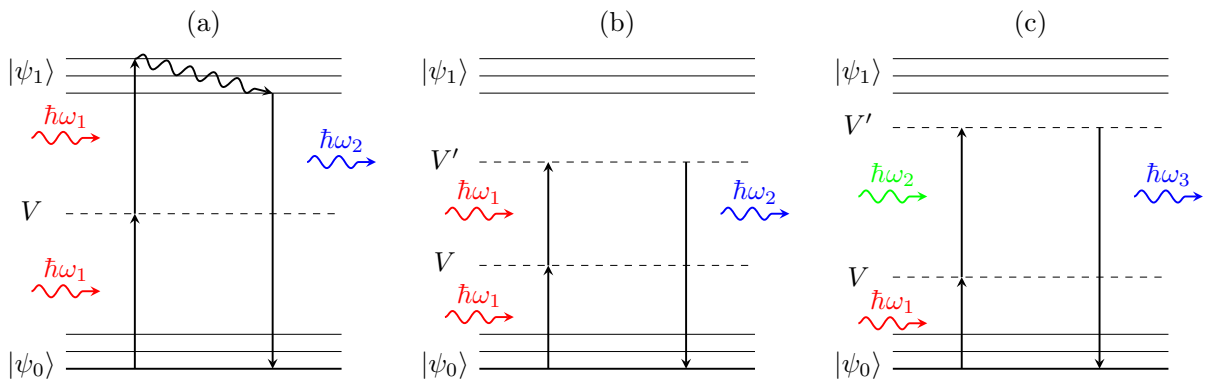


Figure 2.1 Diagramme de Jablonski des processus du deuxième ordre : (a) fluorescence par excitation à deux photons (2PEF), (b) génération de seconde harmonique (GSH), (c) mélange à trois ondes.

sur la figure 2.1 (a) et se traduit énergétiquement par les relations :

$$\hbar\omega_1 < \hbar\omega_2, \tag{2.3}$$

$$\hbar\omega_2 < \hbar\omega_1 + \hbar\omega_1. \tag{2.4}$$

L'équation 2.3 traduit le fait que le photon émis est plus énergétique qu'un photon absorbé, ce qui diffère de la fluorescence à un photon. L'équation 2.4 quant à elle encode le fait qu'une partie de l'énergie absorbée est diffusée de façon non radiative. Comme cela est décrit en détail au Chapitre 3, l'une des particularités des processus non linéaires d'ordre deux est que le nombre moyen de photons émis, $\langle N_{emis}(t)\rangle$, varie avec le carré de l'intensité d'illumination moyenne, $\langle \mathcal{I}(t)\rangle$ (Masters and So, 2008) :

$$\langle N_{emis}(t)\rangle \propto \langle \mathcal{I}(t)\rangle^2. \tag{2.5}$$

Afin de décrire l'efficacité de ces processus intervenant dans le coefficient de proportionnalité de l'équation 2.5, on utilise une section efficace d'action $\eta\sigma_2$, produit de l'efficacité quantique η et de la section efficace d'absorption à deux photons σ_2. Le tableau 2.1 liste quelques valeurs de section efficace d'action à deux et trois photons pour différents flurophores. Ces processus sont très peu efficaces et c'est pourquoi il faut attendre l'invention du laser et l'expérience de Kaiser and Garrett (1961) pour pouvoir observer cet effet sur un cristal de CaF_2 :Eu^{2+}. Suite à l'invention du laser Titane Saphire, Denk et al. (1990) a démontré la possibilité de l'utiliser à des fins d'imagerie biomédicales.

Tableau 2.1 Sections efficaces d'actions pour différents fluorophores - longueur d'onde d'excitation indiquée entre parenthèses (Cheng et al., 2014; Xu et al., 1996).

Fluorophore	$\eta\sigma_2$ $10^{-50}\ cm^4 s/photon$	$\eta\sigma_3$ $10^{-84}\ cm^6 s^2/photon^2$
Fluoresceine	32.8 (800nm)	16.3 (1300nm)
Sulforhodamine-101	20.6 (800nm)	65.5 (1680nm)
wtGFP	21.6 (800nm)	15.9 (1300nm)
Fura-2+Ca^{2+}	12 (700nm)	300 (1000nm)
Indo-1+Ca^{2+}	1.5 (700nm)	60 (1000nm)

Génération de seconde harmonique (GSH)

La génération de seconde harmonique a été observée la première fois par Franken et al. (1961) suite à l'invention du laser en 1960. Afin de comprendre l'origine de cet effet, on explicite la dépendance électrique du champ électrique d'un laser, de pulsation ω_1, sous la forme :

$$\vec{\mathcal{E}}(t) = \vec{\mathcal{U}} e^{-i\omega_1 t} + c.c., \tag{2.6}$$

où $\vec{\mathcal{U}}$, l'amplitude du champ électrique, contient la dépendance spatiale. En injectant cette dernière équation dans l'équation 2.1, on obtient le vecteur densité de polarisation d'ordre deux suivant (Boyd, 2003) :

$$\vec{\mathcal{P}}^{(2)}(t) = 2\epsilon_0 \underline{\underline{\underline{\chi}}}^{(2)} \vec{\mathcal{U}}\vec{\mathcal{U}}^* + (\epsilon_0 \underline{\underline{\underline{\chi}}}^{(2)} \vec{\mathcal{U}}\vec{\mathcal{U}} e^{-i2\omega_1 t} + c.c.). \tag{2.7}$$

On observe alors l'apparition d'une nouvelle pulsation, $\omega_2 = 2\omega_1$, dans l'expression du vecteur densité de polarisation d'ordre deux, qui couplé à l'équation 2.2 provoque l'apparition d'un champ électrique à fréquence double (Boyd, 2003). D'un point de vue énergétique, cet effet est représenté par la figure 2.1 (b) et se traduit par la relation :

$$\hbar\omega_2 = 2\hbar\omega_1. \tag{2.8}$$

Comme dans le cas de la fluorescence par excitation à deux photons (2PEF), le nombre de photons de seconde harmonique varie quadratiquement avec l'intensité de l'illumination. En revanche, alors que les processus de fluorescence sont isotropes, la GSH est un processus cohérent et donc fortement anisotrope, préférentiellement générée vers l'avant. Usuellement utilisé sur des cristaux afin de réaliser du doublage de fréquence (Driscoll et al., 1986), son application à l'imagerie de tissus biologiques est démontrée par Freund and Deutsch (1986).

Effets du troisième ordre

La fluorescence par excitation à trois photons (3PEF) et la génération de troisième harmonique (GTH), représentées sur la figure 2.2 (a) et (b) respectivement, sont des extensions de la 2PEF et de la GSH. À la différence de la GSH, la GTH peut se produire dans des milieux présentant un centre de symétrie (Boyd, 2003). Le nombre de photons émis varie cette fois avec le cube de l'intensité d'illumination :

$$\langle N_{emis}(t)\rangle \propto \langle \mathcal{I}(t)\rangle^3. \tag{2.9}$$

L'efficacité de ces deux processus est en revanche très faible (Xu et al., 1996; Cheng et al., 2014; Boyd et al., 2014) ce qui nécessite d'avoir recours à des détecteurs à très faible niveau de bruit (Hell et al., 1996).
Un autre effet exploité en imagerie biomédicale est un type de mélange à quatre ondes particulier : la diffusion cohérente Raman anti-Stokes (CARS). Comme indiqué sur la figure 2.2 (c), cet effet nécessite d'utiliser deux lasers à des pulsations différentes, ω_1 et ω_2. En notant $\hbar\omega_\nu$ l'énergie associée à la transition entre le mode fondamental et un mode vibratoire de la molécule, l'émission d'un photon anti-Stokes, de pulsation ω_a, est résonante si :

$$\hbar\omega_\nu = \hbar\omega_1 - \hbar\omega_2. \tag{2.10}$$

On en déduit qu'en jouant sur les longueurs d'onde des lasers, on peut sonder les modes vibratoires Raman d'une molécule et par conséquent en déduire sa présence ou son absence dans un échantillon biologique (Potma et al., 2002; Volkmer, 2005).

Pour synthétiser l'ensemble de ces effets, la figure 2.3 les représente sur un spectre dont l'amplitude est purement arbitraire. Dans le cadre de ce projet, nous nous intéresserons uniquement aux processus du deuxième ordre (2PEF, GSH).

2.1.2 Excitation et détection

Cette section passe en revue les principales sources lasers et systèmes de détection d'usage en microscopie multiphotonique.

Lasers

Pour maximiser l'efficacité des interactions multiphotoniques dans les tissus biologiques, les sources utilisées sont des lasers pulsés à blocage de mode (*mode-locked*). En effet, ces derniers permettent l'obtention d'impulsions très courtes temporellement, de l'ordre de quelques

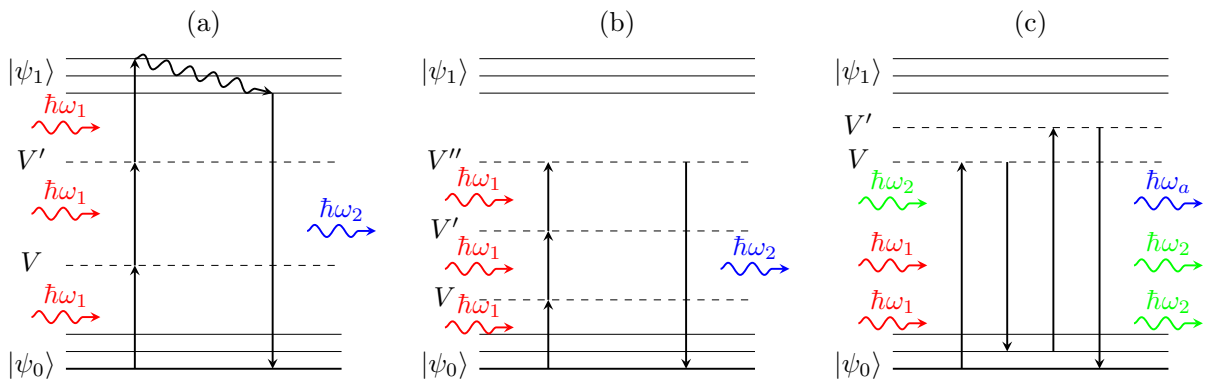


Figure 2.2 Diagramme de Jablonski de processus du troisième ordre : (a) fluorescence par excitation à trois photons (3PEF), (b) génération de troisième harmonique (GTH), (c) diffusion cohérente Raman anti-Stokes (CARS).

femtosecondes à quelques centaines de femtosecondes (Saleh et al., 1991), ce qui accroit la probabilité que deux photons interagissent quasi simultanément. Par rapport à un laser continu à même puissance moyenne, l'utilisation d'un laser pulsé avec un taux de répétition R, et des impulsions de largeurs τ, accroit l'efficacité d'un processus à deux photons de l'ordre de (Denk et al., 1990) :

$$\eta \sim \frac{1}{\tau R}. \tag{2.11}$$

Le laser Titane : Saphir, abrégé Ti : S, est basé sur un cristal de Saphir dopé avec des ions titane servant de milieu amplificateur. Il possède la propriété d'être accordable au voisinage de 800 nm ([700 nm ; 1000 nm]), plage de longueur d'onde où de nombreux fluorophores ont leur pic d'efficacité d'absorption à deux photons. Suite à la démonstration de son utilisation dans le cas de la microscopie multiphotonique (Curley et al., 1992), il s'est imposé comme le laser standard utilisé en microscopie multiphotonique (Zipfel et al., 2003). De par sa capacité à générer des impulsions extrêmement courtes ($\tau \in$ [10 fs, 1 ps]) avec un taux de répétition relativement élevé ($R \in$ [60 MHz, 100 MHz]), il permet d'accroitre les effets non linéaires dans l'échantillon sans pour autant risquer de le dégrader par effet photothermique. Depuis son invention (1982), il a connu de nombreuses améliorations : boitier unique, contrôle par ordinateur, alignement et blocage de mode automatique... Le coût d'un tel laser reste cependant important ($\sim$ 100 000 USD, en 2016), ce qui rend les microscopes multiphoton commerciaux particulièrement coûteux.

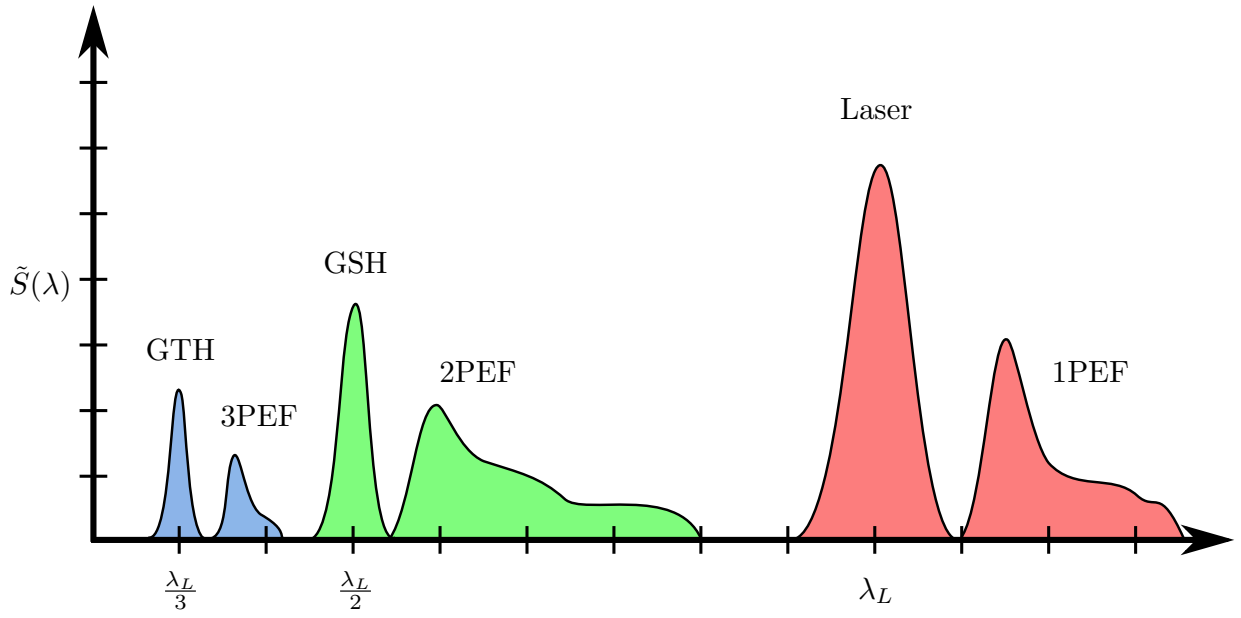


Figure 2.3 Spectre du laser d'excitation et spectres d'émission de la fluorescence à un, deux et trois photons (1PEF, 2PEF et 3PEF) ainsi que ceux de la génération de seconde et troisième harmonique (GSH et GTH).

Détecteurs

La microscopie non linéaire étant une méthode d'imagerie point par point, elle utilise quasi exclusivement des détecteurs ponctuels possédant un gain interne important avec un niveau de bruits faibles. Les tubes photomultiplicateurs (PMTs, de l'anglais *photomultiplier tubes*) se sont imposés comme les détecteurs standards en microscopie multiphotonique de par leur grande surface de détection ($\sim$ 10 mm $\times$ $\sim$ 10 mm), leur gain élevé ([10^5, 10^7] A/W) et leur faible bruit (Masters and So, 2008). En effet, certains PMTs sont uniquement limités par le bruit de grenaille ce qui les rend capables de détecter et compter des événements correspondant à l'arrivée d'un seul photon sur le détecteur. On parle alors de détection en mode comptage de photon (Masters et al., 1997). Plusieurs types de PMTs existent (Hamamatsu, 2016) avec différentes compositions de cathodes ce qui leur permet de couvrir une grande plage de longueurs d'onde utile en microscopie multiphotonique ([400 nm, 900 nm]). Les photodiodes à avalanche (APDs, de l'anglais *avalanche photodiodes*) peuvent également être utilisées, mais nécessitent l'utilisation de lentilles supplémentaires afin de concentrer le signal sur leur petite zone de détection ($<$ 1 mm, voir figure 2.4 gauche) (Tan et al., 1999). Certaines d'entre elles sont suffisamment sensibles pour fonctionner en régime de comptage de photons (IDQuantique, 2016)

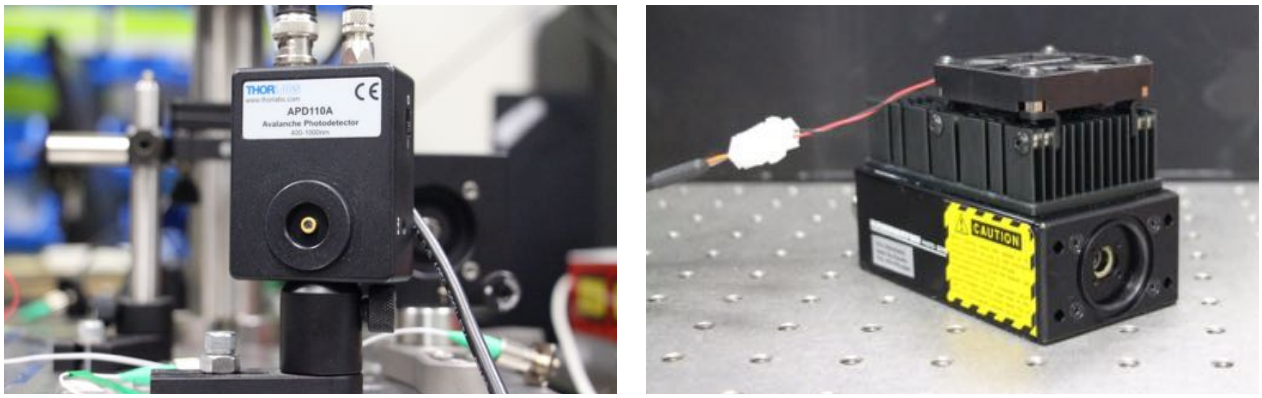


Figure 2.4 Photographies des détecteurs utilisés en microscopie multiphotonique - figure de gauche : photodiode à avalanche (APD, Thorlabs) - figure de droite : tube photomultiplicateur (PMT, Hamamatsu).

2.1.3 Le microscope multiphoton classique

En pratique, la construction d'un système multiphoton standard suit souvent un schéma général. Cette section le détaille dans un premier temps en expliquant son fonctionnement avant de s'attarder aux caractéristiques principales d'un tel système : résolution, sectionnement optique, profondeur de pénétration,...

Principe de fonctionnement

La figure 2.5 (bas) représente schématiquement un microscope multiphotonique classique. Un laser impulsionnel Titane Saphir (Ti : S) pompé par un laser continu génère des impulsions laser femtosecondes. Ce faisceau est ensuite contrôlé en puissance à l'aide d'un atténuateur composé d'une lame demi-onde ($\lambda/2$) et d'un cube séparateur de polarisation (CSP). Les éléments optiques que le faisceau va traverser vont provoquer un phénomène de dispersion, élargissant les impulsions et diminuant l'efficacité de génération des effets non linéaires. Cela peut être corrigé en précompensant initialement cette dispersion (β_2), avec l'aide de prisme par exemple (Muller et al., 1998). En passant au travers d'une lame séparatrice (LS) permettant la collecte d'un signal confocal, une partie du faisceau peut être utilisé afin de réaliser du contrôle ($\mathcal{P}$) : mesure de puissance, autocorrélation, spectre... Le faisceau parvient ensuite au dispositif optique : deux miroirs galvanométriques (G) et deux lentilles (L_i) réalise un balayage télecentrique point par point et un objectif (Obj.) le focalise alors dans l'échantillon. Une platine de translation motorisée trois axes permet de déplacer l'échantillon. La détection des signaux non linéaires est réalisée au plus proche de l'échantillon afin de maximiser l'efficacité de collection. Des miroirs dichroïques (MD_i) et un jeu de filtres (F_L et F_i) relaient

les différents signaux (GSH et 2PEF) jusqu'au PMTs. Un signal de microscopie confocal en réflexion peut également être obtenu en amont des galvanomètres à l'aide d'une lame séparatrice (LS) et d'un trou sténopé (TS) en avant d'une photodiode (PD). Comme détaillé dans les prochains paragraphes, ces deux modalités d'imagerie, confocale et non linéaire, possèdent des résolutions du même ordre de grandeur, permettant la construction d'images composites, et un sectionnement optique, permettant une reconstruction tridimensionnelle de l'échantillon.

Résolution latérale

En microscopie multiphotonique, les résolutions théoriques sont décrites par les pleines largeurs à mi-hauteur (FWHM, de l'anglais *full width at half maximum*) de la fonction d'étalement du point de l'illumination au carré (IPSF^2) (Masters and So, 2008). Par une approximation gaussienne de cette fonction, la résolution latérale théorique, υ_r^{2PEF} peut être approchée par (Zipfel et al., 2003) :

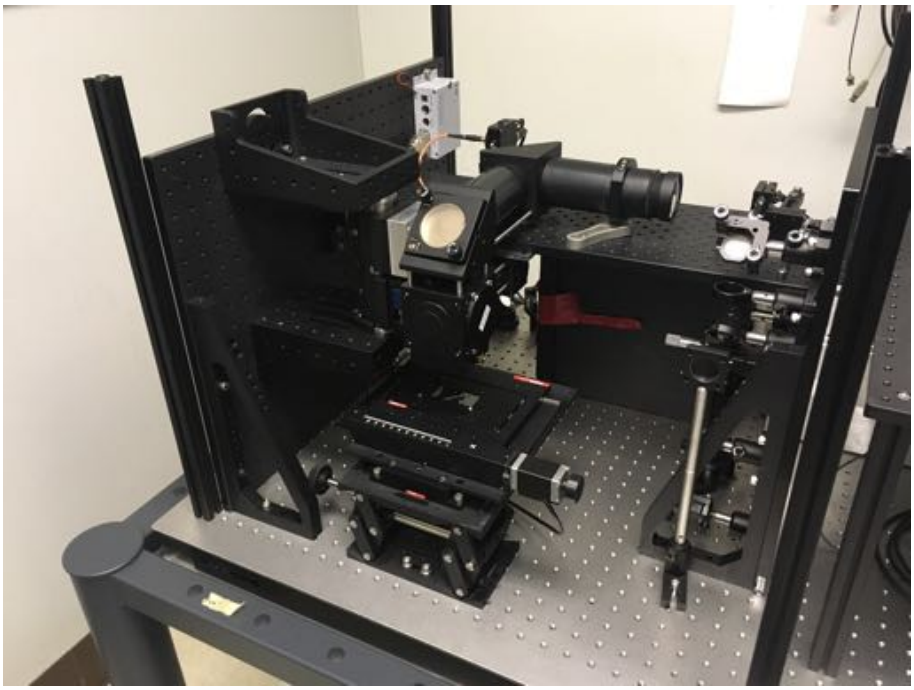
$$\upsilon_r^{2PEF} = \begin{cases} \frac{0.377\lambda}{\text{ON}} & \text{si} \quad \text{ON} < 0.7, \\ \frac{0.383\lambda}{\text{ON}^{0.91}} & \text{si} \quad \text{ON} > 0.7. \end{cases} \tag{2.12}$$

où ON est l'ouverture numérique de l'objectif et λ la longueur d'onde d'excitation. Pour comparaison, en microscopie confocale, dans le cas d'un trou sténopé infiniment petit , la résolution latérale théorique, υ_r^{conf}, est donnée par (Kino and Corle, 1996) :

$$\upsilon_r^{conf} = \frac{0.4\lambda}{\text{ON}}. \tag{2.13}$$

Sectionnement optique et résolution axiale

L'excitation d'un signal non linéaire n'est efficace que si le faisceau est focalisé sur une petite zone à l'aide d'un objectif à haute ouverture numérique (ON$>$ 0.5). En dehors de cette zone, l'efficacité décroit drastiquement permettant d'obtenir un confinement tridimensionnel de la source des effets non linéaires (Masters and So, 2008). Cette propriété des effets non-linéaire permet l'obtention d'un sectionnement optique intrinsèque. En effet, contrairement à l'imagerie confocale, le signal collecté n'a pas besoin d'être *dé-scanné* par le système de balayage et ne requiert pas l'utilisation d'un trou sténopé pour obtenir le sectionnement optique. La résolution axiale théorique (FWHM) en microscopie multiphotonique, υ_z^{2PEF}, est



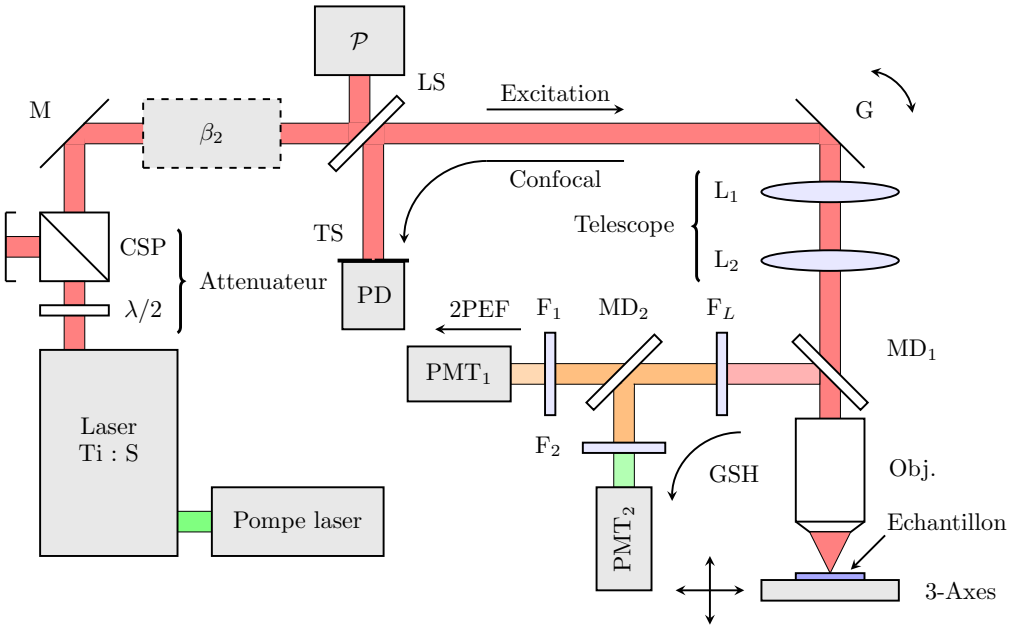


Figure 2.5 Le microscope multiphoton classique - figure du haut : Photographie du système d'imagerie multiphotonique du laboratoire - figure du bas : schéma de principe du microscope : ($\lambda/2$) Lame demi-onde ; (CSP) Cube séparateur de polarisation ; (β_2) Contrôleur de dispersion ; (LS) Lame séparatrice ; ($\mathcal{P}$) Contrôleur de puissance ; (G) Miroirs galvanométriques ; (L$_i$) Lentilles ; (MD$_i$) Miroirs dichroïques ; (Obj.) Objectifs ; (F$_L$) Filtre laser ; (F$_i$) Filtres ; (TS) Trou sténopé ; (PD) Photodiode ; (PMT$_i$) Tubes photomultiplicateurs.

donnée par (Zipfel et al., 2003) :

$$\upsilon_z^{2PEF} = \frac{0.626\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \mathrm{ON}^2}}, \tag{2.14}$$

où n est l'indice de réfraction du milieu et λ, la longueur d'onde d'excitation. Pour comparaison, en microscopie confocale dans le cas d'un trou sténopé infiniment petit, la résolution axiale théorique , υ_z^{conf}, s'exprime comme (Kino and Corle, 1996) :

$$\upsilon_z^{conf} = \frac{0.64\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \mathrm{ON}^2}}. \tag{2.15}$$

Le sectionnement optique permet la construction d'une image tridimensionnelle de l'échantillon en combinant des images prises à différentes profondeurs.

Champ de vue, profondeur de champ et vitesse d'acquisition

En microscopie multiphotonique tout comme en microscopie confocale, les résolutions étant micrométriques voir submicrométriques, le champ de vue par image excède rarement le millimètre (Masters and So, 2008). La profondeur de pénétration est quant à elle fonction de l'atténuation dans le milieu imagée et de la longueur d'onde d'excitation. Les valeurs typiques trouvées dans la littérature pour des microscopes multiphotons classiques sont de l'ordre de la centaine de micromètres (Xu et al., 1996). Le faible niveau du signal impose des contraintes en termes de vitesse d'acquisition, afin de conserver un rapport signal sur bruit (RSB) acceptable. Elles sont typiquement de 1 à 10 μs/pixel (Zipfel et al., 2003). Une synthèse de ces différents éléments est fournie dans le tableau 2.2. Les résolutions en microscopie multiphoton apparaissent plus importantes d'un facteur deux par rapport à la microscopie confocale parce que les plages de longueurs d'onde d'excitation utilisées classiquement diffèrent également d'un facteur deux. Certaines de ces caractéristiques typiques peuvent être améliorées comme cela sera discuté dans la section 2.3. Cependant, elles permettent tout de même de définir un cadre d'application de la microscopie multiphotonique à la recherche biomédicale.

2.2 Des avantages pour l'imagerie biomédicale

La microscopie multiphotonique a permis la compréhension et la mise en évidence de nombreux phénomènes biologiques depuis son développement au début des années 1990, que ce soit en neurobiologie (Trachtenberg et al., 2002), cancérologie (Brown et al., 2001) ou en immunologie (Cahalan et al., 2002). En effet, elle présente un certain nombre de bénéfices

Tableau 2.2 Caractéristiques d'un microscope confocal et d'un microscope multiphoton standard (Xu et al., 1996; Zipfel et al., 2003; Pawley, 2006; Masters and So, 2008) - La profondeur de pénétration est donnée à titre indicatif et dépend fortement de l'échantillon.

Caractéristiques	Confocal	Multiphoton
Longueurs d'onde	400 - 600 nm	700 - 1000 nm
Résolution latérale	< 500 nm	< 1 μm
Résolution axiale	< 1 μm	~ 1 μm
Champ de vue	$\sim 200 \times 200$ μm	$\sim 200 \times 200$ μm
Profondeur de pénétration	~ 50 μm	> 200 μm
Vitesse d'acquisition	1-10 μs/pixel	1-10 μs/pixel

par rapport à la microscopie confocale. Cette section présente ses avantages et les apports associés en recherche biomédicale.

2.2.1 Une profondeur de pénétration importante

Comme mentionné dans la section précédente, la profondeur de champ en microscopie non linéaire est importante, comparativement à la microscopie confocale. La limitation de la profondeur de pénétration résulte des effets combinés de l'absorption et de la diffusion dans les tissus. Ces deux phénomènes sont dominants dans deux plages distinctes de longueurs d'onde. L'absorption dans les tissus biologiques étant principalement dominée par l'absorption de l'eau, elle devient importante à haute longueur d'onde ($\lambda > 1000$ nm). En revanche, la section efficace de diffusion, σ_s, variant comme :

$$\sigma_s \propto \frac{1}{\lambda^4}, \tag{2.16}$$

domine à faible longueur d'onde ($\lambda <$1000 nm). Dans le cas de microscopes travaillant dans le visible ou le proche infrarouge, la diffusion est donc le facteur limitant. La longueur d'onde d'excitation utilisée en microscopie non linéaire étant usuellement plus grande que celle de la microscopie confocale, l'atténuation de l'excitation dans le tissu est donc moindre, augmentant alors sensiblement la profondeur de pénétration.

Cet avantage est grandement exploité dans l'imagerie par fluorescence à deux photons des tissus neuronaux. Elle permet notamment d'étudier les connexions physiques entre neurones et leurs activités électriques, à l'échelle de réseaux neuronaux entiers, là ou l'imagerie confocale ne permettrait qu'une étude en surface. L'activité neuronale étant reliée à la concentration en ions calcium (Ca^{2+}) intracellulaire, des marqueurs exogènes fluorescents sensibles aux varia-

tions de cette concentration peuvent être injecté afin de reconstruire l'activité neurale (Grynkiewicz et al., 1985). Il a été démontré grâce à l'imagerie multiphotonique que les connexions physiques entre neurones ne sont pas fixes, mais sont modifiées en fonction de leurs activités (Trachtenberg et al., 2002). Cette profondeur de pénétration permet également l'étude du développement, sur plusieurs jours, des vaisseaux sanguins au sein de tumeurs (Brown et al., 2001). Les vaisseaux sanguins se développant au sein des tumeurs le font de façon très désorganisée et ont souvent un débit sanguin faible, réduisant l'impact de traitements thérapeutiques administrés par voie sanguine (Jain, 1988). L'imagerie multiphotonique à permis de mettre en évidence certains processus permettant de retrouver une vascularisation normale et améliorer ainsi l'efficacité des traitements par injection sanguine (Tong et al., 2004).

2.2.2 Un confinement de l'excitation

La microscopie multiphotonique permet également d'atteindre des résolutions latérales et axiales du même ordre de grandeur que celles de la microscopie confocale (tableau 2.2). En approchant l'IPSF^2 à l'aide d'une gaussienne tridimensionnelle, le volume effectif dans lequel l'absorption à deux photons est efficiente, V_{eff}^{2PEF}, est donnée par la relation (Zipfel et al., 2003) :

$$V_{eff}^{2PEF} = \pi^{3/2}(\upsilon_r^{2PEF})^2\upsilon_z^{2PEF}. \tag{2.17}$$

Pour une lentille objectif d'ouverture numérique unitaire, une longueur d'onde de $\lambda = 800$ nm et un milieu d'indice $n = 1.3$, ce volume est de l'ordre de $V_{eff}^{2PEF} \sim 0.558\ \mu\text{m}^3$.

La finesse de ce confinement (figure 2.6 gauche) permet l'activation photochimique de certaines molécules dans des tissus biologiques (Xu et al., 1996). Par exemple, la formation de dérivées de l'oxygène hautement réactif tel que l'oxygène dans son état singulet (O_2^*) peut être controlée par l'excitation lumineuse d'un type de molécules : les porphyrines. L'oxygène dans son état singulet est cytotoxique. En thérapie photo-dynamique (PDT), on cherche à le générer via les porphyrines au sein de cellules cancéreuses afin de les détruire. La microscopie multiphotonique permet cette photo-activation des porphyrines via l'absorption à deux photons ($\lambda \sim 780$ nm) tout en offrant la possibilité d'un traitement très localisé (König, 2000).

Le confinement de l'absorption peut aussi être utilisé à des fins d'ablation par photo-disruption, avec une précision sub micrométrique permettant d'éviter une détérioration des cellules avoisinant la zone d'irradiation. En pratique, la puissance du laser femtoseconde, utilisé par le dispositif de microscopie multiphotonique classique, est augmentée afin de dépasser le seuil de dommage dans les zones à disséquer. Un suivi de la dissection est fait par microscopie mul-

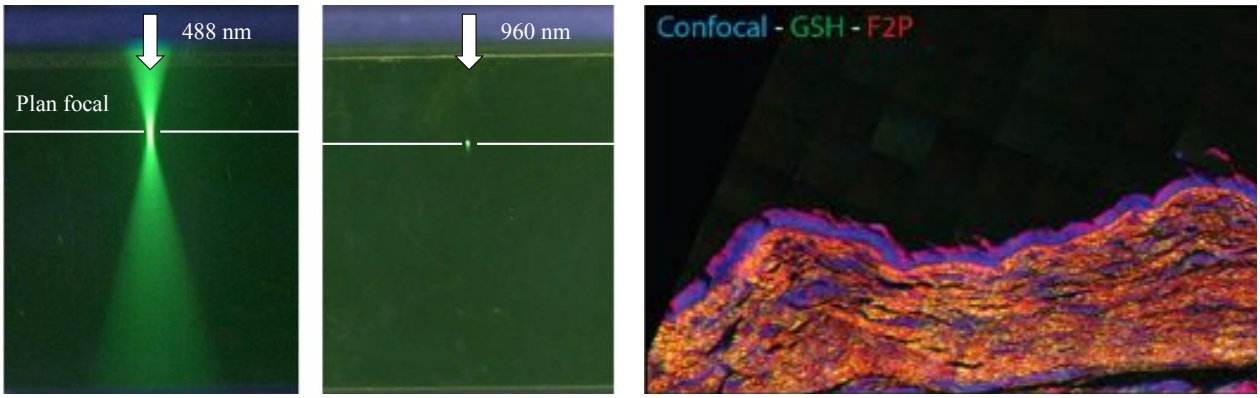


Figure 2.6 Confinement de l'excitation et information organisationnelle en microcopie multiphotonique - figure de gauche : excitation à un photon (a) et à deux photons (b) de fluorescéine démontrant le confinement de l'excitation et la localisation de la réponse non linéaire (2PEF). Adapté avec autorisation de Boudoux (2016) - figure de droite : imagerie d'une corde vocale combinant les modalités confocal, GSH et 2PEF simultanément. Elle révèle la présence de fibrilles de collagène à l'origine de la GSH dans la couche située juste sous l'épithélium (lamina propria). Excitation centrée autour de 800 nm. Reproduit avec autorisation à partir de Deterre (2012).

tiphotonique. En neurobiologie, l'ablation multiphotonique permet par exemple de disséquer les dendrites sans modifier la structure neurale voisine (Sacconi et al., 2007). En ophtalmologie, la chirurgie multiphotonique permet une découpe précise de la cornée (König et al., 2005).

2.2.3 Une information organisationnelle

À la différence de la fluorescence multiphotonique, la génération de seconde harmonique est un processus basé sur la diffusion et non sur l'absorption. Par conséquent, il est davantage lié à l'organisation structurelle du milieu qu'à son contenu chimique. En effet, son efficacité, représentée par la susceptibilité électrique d'ordre deux du matériau, $\underline{\underline{\underline{\chi}}}^{(2)}$, est intimement liés à la structure du milieu sondé : très efficaces dans certains cristaux (BBO, KDP,...) et absent dans les milieux centrosymétriques. Une grande variété de tissus révèlent en imagerie GSH des structures micrométriques absentes à l'imagerie confocale (Chu et al., 2003). La source de contraste purement endogène ne nécessite alors aucune injection de fluorophores.

L'organisation fibrillaire du collagène est un exemple de structure générant naturellement de la GSH (figure 2.6 droite). Cette structure présente dans la couche de *lamina proria* des cordes vocales peut être reliées à certaines pathologies. L'imagerie multiphotonique se révèle alors être un outil pertinent afin d'observer cette organisation (Deterre, 2012). La combinaison de la microscopie confocale et non linéaire permet également de différencier

des structures plus globales : épithélium, muscle, collagène, nerf, ... D'autre part, la GSH est une technique sensible à la polarisation. Il est possible de jouer sur la polarisation du faisceau d'excitation et de comparer les différents niveaux de signal de GSH collectés pour chaque polarisation incidente. Une reconstruction numérique permet alors de connaitre les directions préférentielles du collagène dans l'échantillon observé (Ávila et al., 2015).

2.3 De nouvelles implémentations technologiques

Ces dernières années, de nombreuses approches novatrices ont été proposées. Cette section en fait un bref tour d'horizon en commençant par les implémentations dépassant les standards d'un microscope multiphotonique classique. Ensuite, la construction de systèmes d'imagerie fibrés, davantage orientés vers l'exploitation clinique sera abordée. Enfin, les motivations et objectifs du sujet de recherche concluront ce chapitre.

2.3.1 Au-delà des standards

Comme cela a été détaillé dans la section précédente, l'un des principaux avantages de la microscopie multiphotonique est la profondeur de pénétration. Les travaux de Kobat et al. (2009) montre qu'en augmentant la longueur d'onde dans l'infrarouge ($\sim 1300\ nm$), réduisant alors la diffusion, la profondeur d'imagerie sur des tissus biologique peut être augmenté considérablement ($\sim 1\ mm$, échantillon : cerveau de souris). Le décalage en longueur d'onde peut être réalisé en utilisant un oscillateur paramétrique optique (OPO) à la suite d'un laser Ti : S, permettant de conserver des impulsions femtosecondes. De plus, à puissance équivalente, les longueurs d'onde aux voisinages de 1300 nm sont nettement moins phototoxiques pour les tissus biologiques que celles autour de 800 nm (Chen et al., 2002). En revanche, conformément aux équations 2.12 et 2.14, l'augmentation de la longueur d'onde d'excitation entraine une dégradation des résolutions latérales et axiales.

La vitesse d'acquisition est également un élément clé pour tout système d'imagerie désirant observer des effets dynamiques rapides. Afin d'accroître cette dernière, Egner et al. (2002) propose l'utilisation d'un système multiphotonique avec plusieurs faisceaux simultanés. Le désavantage de cette technique est la nécessité d'avoir recours à un détecteur multipoints tel qu'une caméra CCD, les différents pixels acquis pour chaque illumination devant être enregistrés simultanément.

Une autre technique couramment utilisée en fluorescence à un photon peut être transposé à la microscopie multiphotonique : l'imagerie par mesure du temps de vie de fluorescence (FLIM, de l'anglais *fluorescence-lifetime imaging microscopy*) (Becker et al., 2004). De fa-

çon générale, pour un ensemble de molécules fluorescentes identiques, l'évolution de nombre de photons de fluorescence émis décroit exponentiellement avec le temps. Chaque type de molécule fluorescente peut alors être caractérisé par un temps de vie qui lui est propre, τ_n. Il peut s'avérer à première vue inutile d'utiliser le temps de vie afin de discriminer deux fluorophores différents par leurs temps de vie dans la mesure où cette discrimination peut être faite sur le spectre d'émission. En biologie, de nombreux fluorophores sont endogènes et présent simultanément dans l'organisme et nos connaissances de leurs spectres d'émission sont relativement limitées. De plus dans le cas de recouvrement spectraux, le temps de vie est un excellent élément de discrimination. L'utilisation du FLIM devient alors pertinente. L'utilisation de fluorescence multiphotonique (2PEF, 3PEF) en FLIM permet d'utiliser de nouvelles transitions, d'augmenter la profondeur de pénétration et de limiter les dommages sur l'échantillon. En revanche, les faibles niveaux de signal, typiquement inférieurs à un photon en moyenne par impulsion laser, et la résolution temporelle, usuellement entre 50 ps et 10 ns, en jeux nécessitent d'utiliser des moyens de détection capable de réaliser du comptage de photon rapidement. La technique du comptage de photon unique corrélé temporellement (TCSPC) permet de relever ces deux défis (Masters and So, 2008).

La dépendance en polarisation des effets non linéaires est désormais régulièrement exploitée en microscopie multiphotonique (Ávila et al., 2015). En effet, elle permet d'obtenir de l'information sur l'organisation spatiale de structure sub micrométrique. D'un point de vue pratique, l'ajout d'un polariseur et d'une lame demi d'onde devant le faisceau d'excitation et un polariseur en amont du détecteur suffit à obtenir un microscope multiphotonique sensible en polarisation (Masters and So, 2008).

Une autre avenue possible en microscopie multiphotonique est l'utilisation du mélange à trois ondes représenté sur la figure 2.1 (c). Mahou et al. (2012) en utilisant des impulsions femtosecondes à deux longueurs d'onde différentes et synchronisées, générés à l'aide du laser Ti : S et d'un OPO, ont réussi à obtenir des images combinant les trois transitions possibles : un signal de GSH pour chaque longueur d'onde d'excitation et un signal de mélange à trois ondes couplant les deux longueurs d'onde d'excitation. Cette approche permet la détection simultanée de trois fluorophores différents avec un temps d'acquisition comparable à système possédant un seul canal de détection.

2.3.2 Vers l'endoscopie multiphotonique

Depuis quelques années, les microscopes multiphotons sont commercialisés à grande échelle (Thorlabs, 2016; Leica, 2016) et se retrouvent dans la plupart des laboratoires de recherches biomédicales afin d'imager des échantillons *ex vivo*. Le transfert vers l'endoscopie et l'imagerie

d'échantillon *in vivo* impose un cahier des charges avec des contraintes supplémentaires à adresser :

— une robustesse améliorée et une faible sensibilité à toutes contraintes d'alignement ;
— une vitesse d'acquisition rapide : plusieurs images par secondes ;
— être sécuritaire pour le patient et l'utilisateur ;
— s'adapter aux contraintes chirurgicales : taille de la sonde, stérilité, système compact...

Cette section propose un rapide tour d'horizon des solutions technologiques proposées dans la littérature.

Fibre optique et coupleur

Le premier défi à résoudre est la propagation des impulsions de la sortie du laser jusqu'à la zone à imager ainsi que la collection du signal. Le guidage par fibre optique s'impose comme la solution technologique à l'heure actuelle (Gu et al., 2010). En revanche, de nombreux effets tels que la dispersion chromatique et l'automodulation de phase interviennent lors de la propagation d'impulsions femtosecondes dans une fibre optique (Saleh et al., 1991). Ces effets tendent à modifier l'impulsion originale en l'élargissant temporellement et/ou spectralement, réduisant ainsi l'efficacité de la génération des effets non linéaires (cf. Éq 2.11). La littérature propose de nombreuses façons de compenser la dispersion chromatique induite par une fibre optique : jeux de réseaux (Bao et al., 2010), fibre à dispersion anomale (Murari et al., 2011) ou encore un réseau combiné à une lentille cylindrique dans un montage afocal (Durst et al., 2009). La propagation d'impulsions sera traitée en détail dans le Chapitre 3.

Dans la littérature, différents types de fibres sont utilisées :

— les fibres unimodale à saut d'indice (SMF) ;

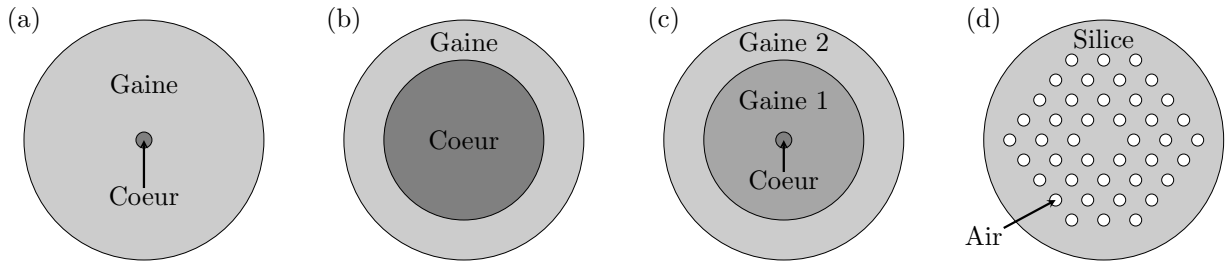


Figure 2.7 Schéma de différents types de fibres optiques : (a) Fibre optique unimodale (SMF) ; (b) Fibre optique multimodale (MMF) ; (c) Fibre optique à double gaine (DCF) ; (d) Fibre à cristaux photoniques (PCF).

— les fibres multimodales (MMF) ;
— les fibres à double gaine (DCF) ;
— les fibres à cristaux photoniques (PCF).

Les fibres standards sont les fibres unimodales (figure 2.7 (a)) à saut d'indice composé d'un coeur et d'une gaine. Elles sont sujettes aux différents effets mentionnés précédemment, limitant alors la génération des effets non linéaires. De plus, leur faible ouverture numérique dégrade fortement la collection des signaux, le coeur agissant comme un trou sténopéïque pourtant caduc en microscopie multiphotonique. Les fibres multimodales (figure 2.7 (b)) ont un coeur plus grand et une ouverture numérique plus élevée : elles possèdent donc une meilleure efficacité de collection. Du côté de l'excitation, le caractère multimodal empêche l'obtention d'une focalisation proche des limites de diffraction ce qui est pénalisant en termes de résolution. Les fibres à doubles gaines (figure 2.7 (c)) combinent au sein de la même fibre les avantages des fibres unimodales et multimodales. Le coeur permet la transmission unimodale de l'excitation alors que la gaine interne, d'un diamètre plus important, permet une collection efficace des signaux non linéaires (Murari et al., 2011). Comme cela a été mentionné, il existe diverses méthodes permettant de compenser la dispersion chromatique induite par les fibres optiques. En revanche, il n'existe pas de méthodes simples permettant de corriger les effets de l'automodulation de phase (SPM). À défaut de corriger cet effet, on peut le limiter en se plaçant dans un régime à faible puissance où il devient négligeable. Dans le cas de forte puissance, une autre façon de limiter la SPM consiste à augmenter la surface effective du coeur de la fibre, tout en conservant son caractère unimodal. Les fibres à cristaux photoniques (figure 2.7 (d)) répondent à cette problématique : une microstructure périodique de trous d'air entourant le coeur entraine un guidage unimodal de la lumière en son sein. Le développement des fibres à cristaux photoniques (PCF) permet la transmission d'impulsion femtosecondes à hautes puissances tout en minimisant l'impact de la SPM. Pour finir, des fibres hybrides combinant les caractéristiques de la double gaine et des cristaux photoniques ont été proposées dans la réalisation d'endoscope multiphoton (Fu et al., 2006).

La plupart des dispositifs endoscopiques proposés dans la littérature font appel à un miroir dichroïque afin d'extraire le signal multiphoton (Fu et al., 2006; Murari et al., 2011) du signal confocal (figure 2.8 (a)). Cette solution implique la présence d'un dispositif d'injection qui est extrêmement sensible au positionnement. Une autre solution technologique permet de réaliser cette extraction directement dans la fibre optique et de s'affranchir des contraintes de positionnement : le coupleur à fibre à double gaine (DCFC) proposé par Lemire-Renaud et al. (2010). Madore et al. (2013) en utilisant deux fibres différentes (coupleur asymétrique composé d'une DCF et d'une MMF) ont montré qu'il est possible d'atteindre des taux d'extraction supérieurs à 50 %. L'utilisation d'un DCFC asymétrique à des fins d'extraction d'un

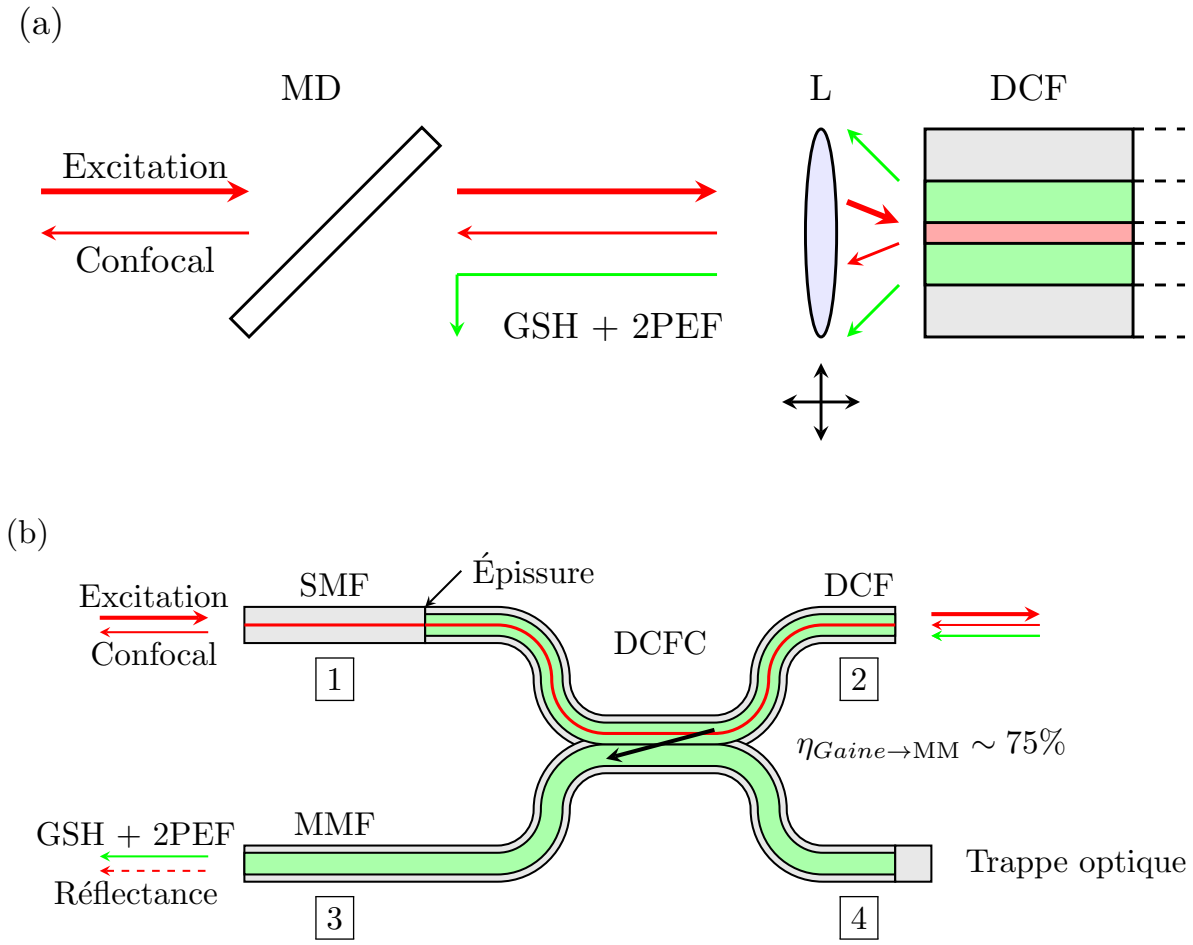


Figure 2.8 Extraction des modalités d'imagerie confocale et non linéaire : (a) Solution hors fibre : un miroir dichroïque (MD) réalise l'extraction en discriminant en longueur d'onde ; (b) Solution fibrée : un coupleur à fibre à double gaine (DCFC) permet l'extraction des deux modalités - Un signal confocal couplé dans le coeur de la DCF (agissant comme trou sténopé) revient dans le port 1 ; Une fibre SMF est utilisée en amont afin de s'assurer que les différents signaux présents dans le coeur ne se couplent pas avec la gaine interne - Le signal non linéaire présent dans la gaine interne de la DCF (port 2) est couplé dans la branche MMF (port 3) où il peut ensuite être filtré afin d'éliminer un signal de réflectance parasite - Le port 4 n'est pas utilisé - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017).

signal de fluorescence à un photon a déjà été démontrée citeplorenser2013. En imagerie multiphotonique, Bao et al. (2010) utilise un coupleur DCFC symétrique à des fins d'extraction. Au-delà de l'extraction, le coupleur DCFC offre la possibilité de combiner deux modalités d'imagerie : l'une transporté dans le coeur alors que la seconde est guidée dans la DCF et couplée dans la MMF. Les travaux de Guay-Lord et al. (2016), combinant la tomographie par cohérence optique (OCT) et l'imagerie hyper spectrale (HSI) à l'aide d'un DCFC asymétrique, s'inscrive dans cette logique. Fu and Gu (2006) proposent quant à eux un coupleur utilisant une fibre PCF à double gaine. A priori, cette technologie semble profiter à la fois des avantages des DCF et des PCF. En pratique, la fabrication d'un tel coupleur par le processus de fusion étirage est complexe et peu maitrisé.

Source laser

En fonction du domaine de longueur d'onde choisie, deux types de sources laser sont utilisés. Au voisinage de 800 nm, le laser Ti : S est la source la plus courante (Bao et al., 2010; Fu et al., 2006). Ce laser a l'avantage d'être accordable, mais présente le défaut de générer le faisceau laser hors d'une fibre optique : un dispositif d'injection est alors utilisé avec les inconvénients que cela implique. De plus ce type de laser est relativement volumineux et n'est donc pas véritablement adapté au contexte clinique.

Dans le cas de longueur d'onde au-delà de 1000 nm, des lasers femtosecondes fibrés deviennent disponibles. Murari et al. (2011) ont montré qu'il est possible de les utiliser à des fins de microscopie multiphotonique. Le principe de génération de l'excitation laser au sein même d'une fibre dopée les rend insensibles à toutes contraintes de vibrations. Ils sont très compacts et simples d'utilisation. En revanche, contrairement aux Ti : S, ils ne sont pas accordables.

Sondes endoscopiques

Dans le souci d'être minimalement invasif, la conception de la sonde doit respecter des critères de dimensions drastiques. La taille maximale permise dépend évidemment de l'application chirurgicale visée. Cette partie propose un tour d'horizon rapide des diverses solutions possibles. Afin de réaliser le balayage du faisceau, il est nécessaire de recourir à une technologie différente des miroirs galvanométriques. En effet, le moteur est classiquement d'une taille trop importante ($\sim$ 2 cm, Thorlabs (2016)) pour qu'il puisse être inséré au sein de l'organisme. Une autre approche consiste à déplacer directement la fibre à l'aide d'actionneurs piézoélectriques cylindriques. Ces actionneurs peuvent être très compacts ($\varnothing_{Piezo} < 1$ mm). Rivera et al. (2011) utilisent un tel système avec un balayage rectiligne : leur vitesse est alors limitée à 4.1 images/s. Wu et al. (2009) utilisent quant à eux un profil de balayage

en spirale : la vitesse de balayage est alors limitée autour de 3 images/s mais un important post-traitement est nécessaire pour s'affranchir de la non linéarité du balayage en spiral. Ces vitesses se rapprochent du critère de plusieurs images par secondes. En revanche, le fait de déplacer directement la fibre introduit des aberrations dans l'image brute qui doit alors être post-traitée. Le développement de miroirs MEMS (de l'anglais *MicroElectroMechanical Systems*) capable d'atteindre des angles de balayage important ($\sim 120°$, FraunhoferIPMS (2016)) avec une fréquence suffisante ([100 Hz; 50 kHz], FraunhoferIPMS (2016)) a permis de les utiliser au sein de sondes endoscopiques adaptées à la microscopie non linéaire (Fu et al., 2006). À la manière des miroirs galvanométriques, le faisceau est balayé directement ce qui limite les aberrations. Cependant, les dimensions de l'actionneur sont typiquement plus grandes ($l \times L \sim 3 \times 3$ mm) que celles d'un tube piézo-électrique.

Le second élément clé des sondes est le choix des optiques utilisées afin de relayer et focaliser le faisceau dans l'échantillon. L'utilisation des assemblages de lentille à gradient d'indice (GRIN, de l'anglais *GRadient INdex*) est présente dans la plupart des solutions proposées dans la littérature (Fu et al., 2006; Wu et al., 2009; Rivera et al., 2011). En effet, leur faible diamètre ($\varnothing \sim 1$ mm) ainsi que les importantes ouvertures numériques possibles ($O.N. \sim 0.8$) les rendent particulièrement attractives pour l'endoscopie multiphotonique.

2.3.3 Sujet de recherche

Ce tour d'horizon laisse apparaitre un manque dans la littérature : aucun des systèmes d'endoscopie multiphotonique présentés dans la littérature n'est entièrement fibré. En effet, l'ensemble des propositions ont recours soit à un miroir dichroïque afin d'extraire le signal multiphoton, soit à un système de compensation de dispersion hors fibre. De façon systématique un dispositif d'injection, extrêmement sensible aux vibrations, persiste dans l'ensemble des montages proposés. Afin de répondre à la contrainte d'alignement et de robustesse énoncée précédemment, ce projet de recherche consiste à réaliser un système d'imagerie multiphotonique complètement fibré incorporant un coupleur DCFC à une longueur d'onde d'excitation de 1550 nm.

Problématique et objectifs

Pour parvenir à un système entièrement fibré, trois points critiques sont à traiter. Tout d'abord, l'extraction du signal multiphotonique doit être réalisé dans la fibre. Pour cela, nous proposons l'utilisation d'un coupleur DCFC asymétrique. Il doit permettre l'extraction efficace du signal multiphotonique dans sa branche multimodale mais également la collection d'un signal confocal dans le coeur de la DCF. L'utilisation de coupleur DCFC n'a été rap-

portée qu'une seule fois dans la littérature (Bao et al., 2010) et aucune implémentation avec un coupleur DCFC asymétrique à ce jour. Les sondes endoscopiques évoquées dans la section précédente sont basées sur l'utilisation de fibre DCF et sont donc entièrement compatibles avec l'utilisation d'un DCFC. Le second point important à traiter est la propagation des impulsions dans la fibre. Nous proposons une compensation de la dispersion en utilisant une fibre à dispersion anormale. Cela impose un calibrage en longueurs de la fibre utilisée ainsi qu'un contrôle du régime de puissance afin de limiter l'automodulation de phase. Enfin, le choix de la longueur d'onde de 1550 nm n'est pas courant dans littérature (Murari et al., 2011). Ce choix de la longueur d'onde des télécommunications nous permet de profiter de nombreux composants fibrés à coût moindre ainsi qu'une profondeur de pénétration théorique accrue. Il laisse en revanche une incertitude sur l'amplitude des effets non linéaire attendus.

Dans le but de répondre à la problématique, les objectifs spécifiques (OS) suivants ont été identifiés :

- OS1 : compenser la dispersion et calibrer en longueur une fibre à dispersion anormale ;
- OS2 : démontrer qu'un coupleur DCFC asymétrique permet de collecter efficacement des signaux non linéaires (GSH et 2PEF) et confocaux simultanément et de les démultiplexer ;
- OS3 : réaliser le système d'imagerie : optiques, système de balayage et système d'acquisition ;
- OS4 : caractériser le microscope multiphoton ;
- OS5 : imager des échantillons biologiques.

Proposition préliminaire

Afin de répondre aux différents objectifs spécifiques, l'architecture préliminaire du système que l'on se propose de concevoir est présentée sur la figure 2.9. Un laser fibré génère des impulsions femtosecondes centrées autour de 1550 nm. Ces impulsions sont relayées jusqu'à la tête optique du microscope dans le coeur des différentes fibre optiques. Une fibre à compensation de dispersion (Disp. Comp. Fib.) de longueur calibrée permet de pré-compenser la dispersion du système. La tête optique du microscope est composée de deux lentilles asphériques (AL) permettant de collimer et focaliser le faisceau d'excitation, de miroirs galvanométrique (G) assurant le balayage du faisceau et de lentilles achromatiques (AcL) jouant le rôle de télescope. Les signaux multiphotons sont collectés dans la gaine interne d'une fibre à double gaine (DCF) et extrait dans une fibre multimodale (MMF) à l'aide d'un coupleur à fibre à double gaine (DCFC). Ils sont ensuite collimés (AL), filtrés (F) et séparés à l'aide d'un miroir dichroïque (MD) avant d'être détectés à l'aide de tubes photomultiplicateurs (PMT).

Un signal confocal peut être quant à lui collecté en insérant un circulateur (CRC) en amont du coupleur DCFC et détecté à l'aide d'une photodiode (PD).

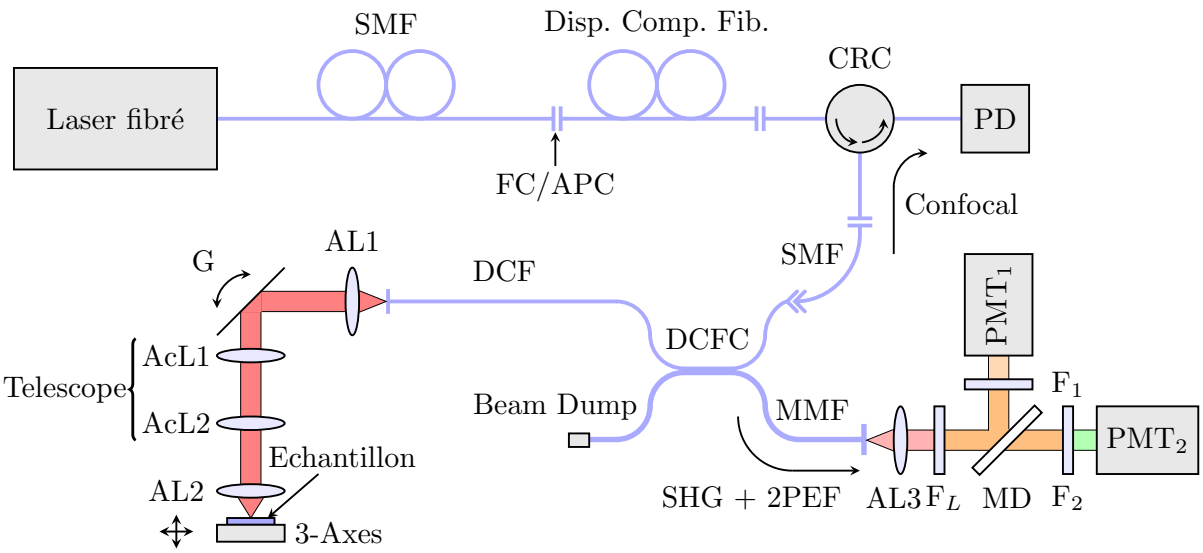


Figure 2.9 Microscope multiphotonique fibré incorporant un coupleur à fibre à double gaine : (FC/APC) Connecteurs à fibre optique clivés à 8 degrés ; (Disp. Comp. Fib.) Fibre à compensation de dispersion ; (CRC) Circulateur ; (PD) Photodiode ; (SMF) Fibre unimodale ; (DCFC) Coupleur à fibre à double gaine ; (DCF) Fibre à double gaine ; (MMF) Fibre multimodale ; (AL) Lentille asphérique ; (G) Miroirs galvanométriques ; (AcL) Lentille achromatique ; (F) Filtre ; (PMT) Tube photomultiplicateur.

CHAPITRE 3 SIMULATION DE LA PROPAGATION D'IMPULSIONS FIBRÉE ET GÉNÉRATION D'EFFETS NON LINÉAIRES

L'utilisation de sources laser impulsionnelles est requise afin de générer des effets non linéaires observables dans les tissus biologiques. Ce chapitre présente dans un premier temps le formalisme décrivant ces impulsions lumineuses et leur propagation dans une fibre optique. Cette description permettra d'appréhender les deux phénomènes que sont la dispersion et l'automodulation de phase. Comme cela sera discuté, ces deux effets jouent un rôle clé dans la propagation des impulsions et par conséquent sur l'efficacité de génération des effets non linéaires que nous souhaitons observer : la fluorescence par absorption à deux photons (2PEF) et la génération de seconde harmonique (GSH). La deuxième partie du chapitre est consacrée à la description respective de ces deux effets non linéaires du second ordre.

3.1 Régime impulsionnel et fibres optiques

Cette section introduit les éléments nécessaires à la compréhension des phénomènes entrant en jeu lors de la propagation d'impulsions dans une fibre optique. Dans un premier temps, le formalisme permettant de décrire une impulsion laser est présenté. Nous nous intéresserons ensuite à l'évolution de cette impulsion se propageant dans une fibre optique et aux effets influençant sa propagation.

3.1.1 Description d'une impulsion

Une impulsion lumineuse n'est rien de plus qu'une onde électromagnétique dont l'amplitude est modulée dans le temps. Le formalisme des ondes électromagnétiques est donc naturellement utilisé pour la décrire.

Champ électrique réel et complexe

Une impulsion est complètement définie par la donnée du champ électrique réel $\vec{\mathcal{E}}(x, y, z, t)$. En considérant une onde monochromatique se propageant dans la direction z avec une amplitude variant lentement par rapport aux oscillations rapides du champ, le champ électrique peut se décomposer sous la forme :

$$\vec{\mathcal{E}}(x, y, z, t) = A(t)F(x, y)\cos(\beta z - \omega_0 t + \phi(t))\vec{\epsilon}(t), \tag{3.1}$$

avec :

- $A(t)$, son amplitude réelle, fonction réelle du temps variant lentement par rapport aux oscillations du champ ;
- $F(x, y)$, sa distribution dans le plan transverse ;
- β, sa constante de propagation selon l'axe z ;
- ω_0, sa pulsation centrale ;
- $\phi(t)$, sa phase temporelle ;
- $\vec{\epsilon}(t)$, un vecteur unitaire portant la direction du champ.

Les représentations complexes simplifiant souvent les calculs, on définit le champ électrique complexe associé au champ réel, $\underline{\vec{\mathcal{E}}}(t)$, comme :

$$\underline{\vec{\mathcal{E}}}(x, y, z, t) = A(t)e^{i\phi(t)}F(x, y)e^{i(\beta z-\omega_0 t)}\vec{\epsilon}(t) = \mathcal{U}(t)F(x, y)e^{i(\beta z-\omega_0 t)}\vec{\epsilon}(t), \tag{3.2}$$

où l'on a défini l'amplitude complexe du champ, $\mathcal{U}(t)$, comme :

$$\mathcal{U}(t) = A(t)e^{i\phi(t)}. \tag{3.3}$$

Les dérivations mathématiques suivantes sont réalisées en notation complexe et le retour au champ réel s'obtient en ne conservant que la partie réelle du champ complexe :

$$\vec{\mathcal{E}}(x, y, z, t) = \Re\left[\underline{\vec{\mathcal{E}}}(x, y, z, t)\right]. \tag{3.4}$$

L'amplitude complexe du champ est complètement définie par la donnée du profil d'amplitude $A(t)$ et de la phase temporelle $\phi(t)$. La dépendance de la phase avec le temps, si elle existe, est nommée piaillement (*chirp* en anglais). Ce phénomène conduit à l'apparition d'une modulation de la fréquence d'oscillation de l'onde le long du profil d'impulsion. On utilise alors la notion de pulsation instantanée, $\omega_{\text{inst}}(t)$, pour la décrire. Elle se définit comme :

$$\omega_{\text{inst}}(t) = \omega_0 - \frac{d\phi}{dt}. \tag{3.5}$$

Le profil de l'impulsion est quant à lui déterminé par l'amplitude $A(t)$. Un exemple typique est le profil gaussien :

$$A(t) = A_0 e^{-\frac{t^2}{2T_0^2}}, \tag{3.6}$$

où T_0 est un temps caractéristique décrivant la largeur temporelle de l'impulsion. La figure 3.1 (gauche) présente le profil temporel d'un champ électrique impulsionnel gaussien .

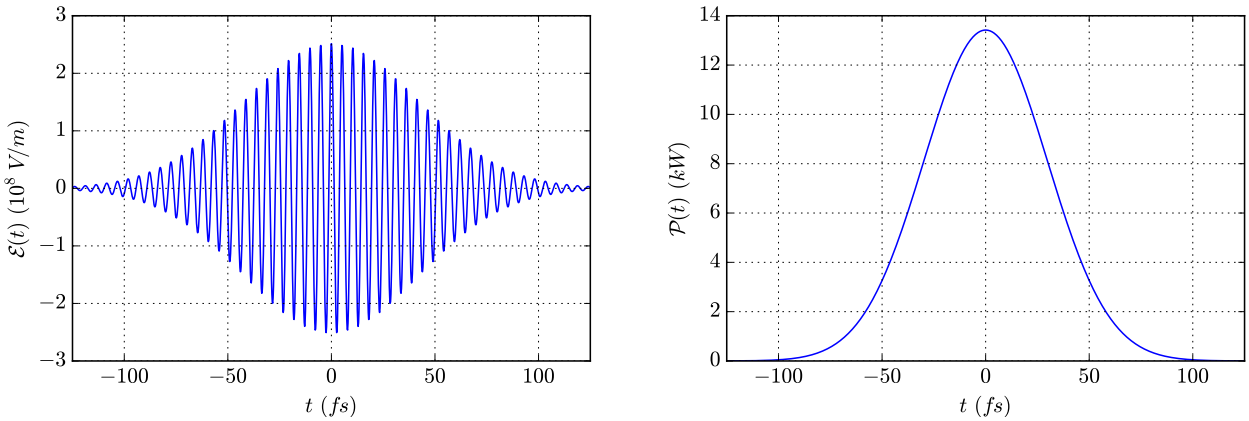


Figure 3.1 Profils temporels du champ et de la puissance d'une impulsion gaussienne - figure de gauche : profil du champ électrique $\mathcal{E}(t)$ - figure de droite : profil de puissance $\mathcal{P}(t)$ calculé en utilisant une surface effective de mode $A_{\text{eff}} = 80\ \mu m^2$ - paramètres de l'impulsion gaussienne simulée : $T_0 = 42\ fs$, $A_0 = 2.51 \times 10^8\ V/m$ et $\lambda_0 = 1565\ nm$. Ces valeurs correspondent aux caractéristiques du laser femtoseconde commercial utilisé lors des expériences (tableau 3.1).

Puissance et intensité

Aux fréquences optiques, le champ électrique n'est pas une grandeur aisément accessible ou mesurable. En effet, on a régulièrement recours à la puissance ou l'intensité, et non au champ électrique directement. L'intensité instantanée, $\mathcal{I}(t)$, est directement proportionnelle au module carré du champ complexe :

$$\mathcal{I}(x,y,t) = \frac{nc\epsilon_0}{2}|\underline{\vec{\mathcal{E}}}(x,y,z,t)|^2 = \frac{nc\epsilon_0}{2}|\mathcal{U}(t)F(x,y)|^2. \tag{3.7}$$

On peut s'affranchir du préfacteur en choisissant une normalisation telle que :

$$\mathcal{I}(x,y,t) = |\mathcal{U}(t)F(x,y)|^2, \tag{3.8}$$

auquel cas le champ n'est plus exprimé dans son unité usuelle, le V/m, mais en $W^{\frac{1}{2}}/m$. Dans la mesure où nous travaillons davantage avec des unités de puissance, ce choix de normalisation est fait pour la suite. La puissance instantanée, $\mathcal{P}(t)$ est quant à elle définit comme le produit de l'intensité par la surface transverse sur laquelle le mode considéré s'étend, appelée surface effective, A_{eff} :

$$\mathcal{P}(t) = A_{\text{eff}}\mathcal{I}(t). \tag{3.9}$$

Avec les notations introduites ci-dessus, la définition de la surface effective de mode est la suivante :

$$A_{\text{eff}} = \frac{(\iint |F(x,y)|^2 dxdy)^2}{\iint |F(x,y)|^4 dxdy}. \tag{3.10}$$

Dans le cas de la propagation dans des fibres optiques, le champ électrique est confiné dans le plan transverse. Les distributions transverses, $F_m(x,y)$, propre à chaque mode m s'y propageant, peuvent être calculées (Bures, 2009). Un cas particulier est l'utilisation de fibre unimodale où seul le mode fondamental est présent. Bien que rigoureusement, le profil transverse est décrit par une fonction de Bessel ($J_0(x,y)$) dans le coeur de la fibre et par une exponentielle décroissante dans la gaine, il est usuellement approché par une fonction gaussienne. L'étalement de cette gaussienne est décrit par le diamètre effectif de mode, noté MFD (de l'anglais *Mode Field Diameter*). Il nous permet de déterminer la surface effective simplement :

$$A_{\text{eff}} = \pi \frac{\text{MFD}^2}{4}. \tag{3.11}$$

La figure 3.1 (droite) montre le profil temporel de puissance correspondant au champ montré sur cette même figure (gauche).

Largeur temporelle et autocorrélation

Une caractéristique essentielle d'une impulsion est la largeur de son profil temporel. On exprime usuellement cette largeur sur l'intensité ou la puissance, et non pas sur le champ électrique. Nous utilisons la largeur à mi-hauteur ou FWHM (de l'anglais *Full Width Half Max*), Δt_{FWHM}, pour la caractériser. Pour une impulsion à profil gaussien (équation 3.6), on a la relation suivante avec la largeur temporelle du champ, T_0 :

$$\Delta t_{FWHM} = 2\sqrt{\ln(2)} T_0. \tag{3.12}$$

Il n'existe aucun détecteur suffisamment rapide pour mesurer des variations sur des échelles de temps de l'ordre de la femtoseconde. Un moyen de mesure est de recourir à une mesure d'autocorrélation en intensité. L'impulsion est scindée en deux et focalisée au sein d'un cristal produisant un signal de seconde harmonique qui est mesuré à l'aide d'un détecteur. Une ligne à délai permet de retarder d'une durée τ l'arrivée de la seconde impulsion sur le cristal et produit un signal de seconde harmonique variant comme :

$$I_{SHG}(t,\tau) \propto \mathcal{I}(t)\mathcal{I}(t-\tau). \tag{3.13}$$

Le détecteur n'étant pas suffisamment rapide, le résultat mesuré est alors l'intégrale temporelle du signal de seconde harmonique, nommé autocorrélation en intensité, $A^{(2)}(\tau)$:

$$A^{(2)}(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{I}(t)\mathcal{I}(t-\tau)dt. \tag{3.14}$$

La mesure étant une mesure en intensité, l'information sur la phase temporelle, $\phi(t)$, est perdue sur ce type de mesure. De plus afin de procéder à la déconvolution de l'équation 3.14 permettant de retrouver $\mathcal{I}(t)$ à partir de $A^{(2)}(\tau)$, il est nécessaire de faire une présupposition sur la forme de l'impulsion. Pour une impulsion de forme gaussienne, on a le lien suivant entre la largeur à mi-hauteur de la fonction d'autocorrélation, $\Delta\tau_{FWHM}$, et la largeur à mi-hauteur de l'intensité, Δt_{FWHM} :

$$\Delta\tau_{FWHM} = \sqrt{2}\Delta t_{FWHM}. \tag{3.15}$$

Comme cela a été mentionné, les *chirps* ne sont pas visibles sur ce type d'autocorrélation. Il existe d'autres techniques d'autocorrélation interférométrique plus sophistiqués (FROG ou XFROG) permettant de reconstruire l'information sur la phase et s'affranchissant de l'hypothèse faite sur la forme de l'impulsion (Trebino, 2012). Dans le cadre de ce projet, j'ai utilisé un autocorrélateur en intensité pour déterminer les largeurs d'impulsions. La figure 3.2 (gauche) montre une trace d'autocorrélation en intensité mesurée en sortie d'un oscillateur paramétrique accordable (OPO) utilisé comme première source d'excitation dans le cadre de ce projet.

Analyse spectrale

Le dernier paramètre caractéristique d'une impulsion est son spectre. Pour le définir, nous calculons la transformée de Fourier du champ complexe :

$$\tilde{E}(x,y,z,\omega) = \frac{1}{2\pi}\int \underline{\mathcal{E}}(x,y,z,t)e^{i\omega t}dt. \tag{3.16}$$

La transformée de Fourier n'est finalement qu'une définition d'un signal sur une base particulière, la base des ondes monochromatiques. Il suffit d'écrire la transformée de Fourier inverse pour voir apparaître cette décomposition.

$$\underline{\mathcal{E}}(x,y,z,t) = \int \tilde{E}(x,y,z,\omega)e^{-i\omega t}d\omega. \tag{3.17}$$

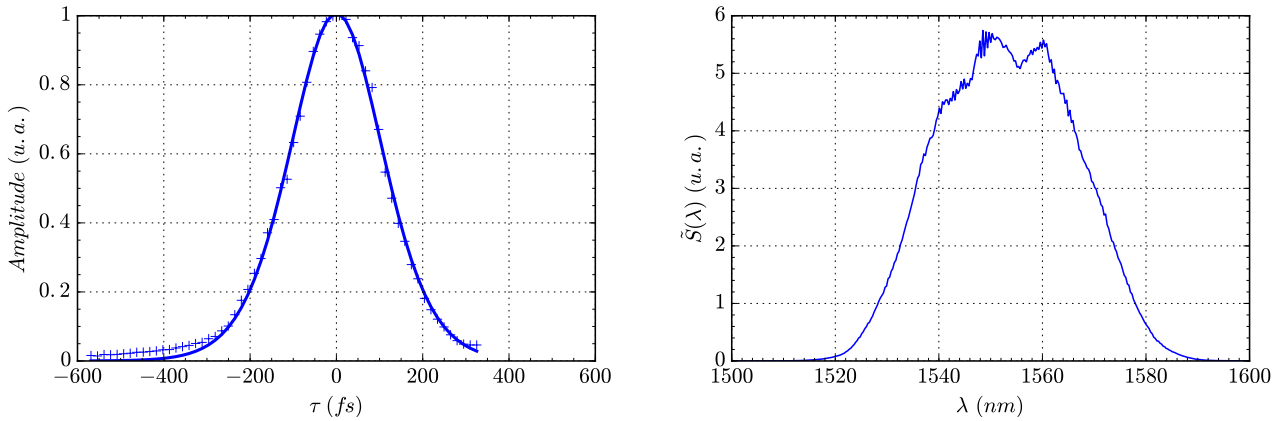


Figure 3.2 Autocorrélation et spectre d'une impulsion en sortie d'OPO - figure de gauche : mesure de l'enveloppe de l'autocorrélation (point) avec régression gaussienne (ligne) ; $\Delta\tau_{FWHM} = 254\ fs$ - figure de droite : spectre de l'impulsion ; $\lambda_0 = 1550\ nm$ et $\Delta\lambda_{FWHM} = 38\ nm$.

L'intensité spectrale normalisée, $\tilde{S}(\omega)$, est définie comme le module carré de cette transformée de Fourier :

$$\tilde{S}(\omega) = \frac{|\tilde{E}(\omega)|^2}{\int |\tilde{E}(\omega)|^2 d\omega}, \tag{3.18}$$

et la phase spectrale comme son argument :

$$\tilde{\phi}(\omega) = \arg\left[\tilde{E}(\omega)\right]. \tag{3.19}$$

La largeur à mi-hauteur du spectre, notée $\Delta\omega_{FWHM}$ ainsi que la largeur temporelle, Δt_{FWHM} vérifie donc le principe d'incertitude de Fourier :

$$\Delta t_{FWHM}\Delta\omega_{FWHM} \geq 4\ln(2). \tag{3.20}$$

Cette inégalité traduit le fait qu'une impulsion temporellement courte possède nécessairement un spectre large. La saturation de cette inégalité conduit à des impulsions dites transformées limitées. La figure 3.2 (droite) montre le spectre d'une impulsion mesuré en sortie d'OPO.

Facteur de cohérence

Les impulsions pouvant être ultra-brèves, le temps de réponse des détecteurs ne permet pas généralement de renvoyer une mesure de l'intensité instantanée, $\mathcal{I}(t)$, mais seulement sa moyenne, $\langle\mathcal{I}(t)\rangle$. Cela implique de prendre la moyenne des relations faisant intervenir la puissance ou l'intensité, ce qui ne pose fondamentalement pas de véritable problème. Les

phénomènes étudiés étant non linéaires, il apparaîtra par la suite des termes en $\langle \mathcal{I}(t)^n \rangle$ avec n un entier supérieur ou égal à deux. Il est alors utile de relier ce terme, a priori non connu, à $\langle \mathcal{I}(t) \rangle^n$, qui lui peut être déterminé simplement par une mesure. Par définition, le lien entre ces deux grandeurs est le facteur de cohérence temporelle d'ordre n, $g^{(n)}$:

$$g^{(n)} = \frac{\langle \mathcal{I}(t)^n \rangle}{\langle \mathcal{I}(t) \rangle^n} = (T_{cycle})^n \frac{\int_{T_{cycle}} \mathcal{I}(t)^n dt}{(\int_{T_{cycle}} \mathcal{I}(t) dt)^n}, \tag{3.21}$$

où T_{cycle} est la durée entre deux impulsions laser. Elle est reliée aux taux de répétition du laser, R, par :

$$T_{cycle} = \frac{1}{R}. \tag{3.22}$$

Pour des impulsions de formes gaussiennes, le facteur de cohérence temporelle d'ordre deux est approché par :

$$g^{(2)} \approx \frac{0.66}{R \times \Delta t_{FWHM}}. \tag{3.23}$$

Ainsi l'impact de la largeur de l'impulsion dans les équations décrivant la fluorescence par excitation à deux photons (2PEF) se trouvera contenu dans le facteur de cohérence.

Lasers impulsionnels

Un laser Ti :S (Mira-900, Coherent) suivi d'un OPO (Mira-OPO, Coherent) a été utilisé dans un premier temps pour sa disponibilité afin de réaliser une preuve de principe. Nous avons ensuite eu recours à un laser fibré (ELMO, MenloSystems) permettant de rendre l'ensemble du système fibré. Les caractéristiques des impulsions produites par ces lasers sont synthétisées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 Caractéristiques des lasers impulsionnels utilisés.

Caractéristiques	Ti :S + OPO (Coherent)	ELMO (MenloSystems)
λ_0	1550 nm	1565 nm
Δt_{FWHM}	200 fs	90 fs
$\Delta \lambda_{FWHM}$	35 nm	80 nm
R	80 MHz	100 MHz
$\langle \mathcal{P}(t) \rangle$	300 mW	100 mW

La figure 3.3 montre les photographies des deux systèmes lasers utilisés. L'ensemble Ti :S et OPO occupe la moitié d'une table optique ($\sim 2\ m \times 2\ m$) et nécessité de lourde protection du fait de la propagation libre du faisceau. Le laser fibré est quant à lui beaucoup plus compact

($\sim 40\ cm \times 40\ cm$) et plus sécuritaire dans son utilisation : l'impulsion étant confinée dans une fibre optique.

3.1.2 Propagation fibrée d'impulsion femtoseconde

Le formalisme mathématique présenté précédemment permet de décrire simplement une impulsion. Nous allons désormais nous intéresser aux effets liés à sa propagation dans une fibre optique. Comme cela sera discuté dans la section suivante, le contrôle de ces effets est déterminant sur l'efficacité de génération des signaux multiphotons.

Constante de propagation, vitesse de phase et vitesse de groupe

Considérons une impulsion se propageant dans une fibre suivant un axe z comme cela est présenté dans l'équation 3.2. La constante de propagation, β, apparaissant dans cette équation dépend en théorie du mode guidée dans la fibre. Dans le cas de fibre unimodale seul le mode fondamental est guidé. On considère dans ce cas uniquement la constante de propagation associée au mode fondamental. Cette constante dépend de la pulsation. On utilise alors un développement en série de Taylor autour de la pulsation centrale pour exprimer cette dépendance :

$$\beta(\omega) = \beta_0 + \beta_1(\omega - \omega_0) + \frac{\beta_2}{2}(\omega - \omega_0)^2 + \frac{\beta_3}{6}(\omega - \omega_0)^3 + ... \tag{3.24}$$

Le premier terme permet de définir la vitesse de phase, vitesse d'évolution de la phase lors de la propagation :

$$v_\phi(\omega_0) = \frac{\omega_0}{\beta_0}. \tag{3.25}$$

Le second quant à lui définit la vitesse groupe, ou vitesse de propagation de l'enveloppe de l'impulsion :

$$v_g(\omega_0) = \frac{1}{\beta_1}. \tag{3.26}$$

Le temps t est un temps s'écoulant depuis le début de la propagation. En se propageant de z, l'impulsion se déplace dans ce système de référence temporelle de $\beta_1 z$. À des fins de commodités, on se place par la suite dans un référentiel temporel ou les impulsions restent centrées autour de l'origine. Le changement de variable suivant permet de définir un tel référentiel :

$$T = t - \beta_1 z. \tag{3.27}$$

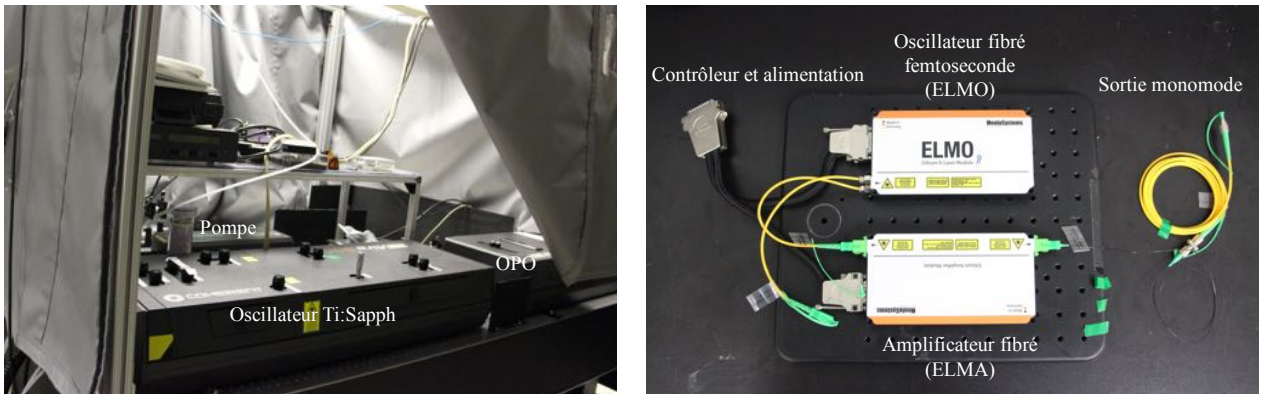


Figure 3.3 Photographies des lasers impulsionnels utilisés - figure de gauche : laser Ti :S (Mira, Coherent) suivie de l'OPO - figure de droite : laser fibré femtoseconde constitué d'un oscillateur (ELMO) et d'un amplificateur (ELMA) fibrés (MenloSystems), installé sur une plaque de 30 $cm \times 30$ cm.

Dispersion chromatique

Le premier phénomène auquel est sujet une impulsion se propageant dans une fibre optique est le phénomène de dispersion chromatique. Ce phénomène trouve son origine dans le fait qu'une impulsion temporellement très courte, possède une certaine largeur spectrale, conformément au principe d'incertitude de Fourier. Comme expliqué précédemment, l'impulsion peut être vue comme la superposition d'ondes monochromatiques. Dès lors, si la vitesse de groupe dépend de la fréquence, pour se propager de z, chaque composante spectrale de l'onde mettra un certain temps, qui lui est propre, pour y parvenir. L'impulsion s'en trouvera donc étalée temporellement. Mathématiquement, la vitesse de groupe ne dépendra pas de la fréquence si les termes β_n $(n \geq 2)$ se trouvent être tous nuls. Or il se trouve que dans le cas de fibres optiques, même les termes de plus bas ordre, β_2 et β_3 ne sont pas systématiquement nuls. Les valeurs du coefficient β_2 sont usuellement exprimées en ps^2/km. On parle alors de dispersion du deuxième ordre. Le signe de ce coefficient définit deux régimes de dispersion différents : normale $(\beta_2 > 0)$ et anormale $(\beta_2 < 0)$. Dans le premier cas, les fréquences hautes $(\omega > \omega_0)$ se déplacent plus vite alors que dans le second cas, l'inverse se produit. La dispersion du troisième ordre est caractérisée par le coefficient β_3 (ps^3/km). En présence d'un terme de dispersion d'ordre deux et d'ordre trois, la propagation d'une impulsion peut être décrite par l'équation différentielle suivante sur son amplitude complexe, $\mathcal{U}(T)$ (Agrawal, 2007) :

$$\frac{\partial \mathcal{U}}{\partial z} + \frac{i}{2}\beta_2 \frac{\partial^2 \mathcal{U}}{\partial T^2} - \frac{1}{6}\beta_3 \frac{\partial^3 \mathcal{U}}{\partial T^3} = 0. \tag{3.28}$$

J'ai développé un programme de résolution par différence finie sous Python afin de ré-

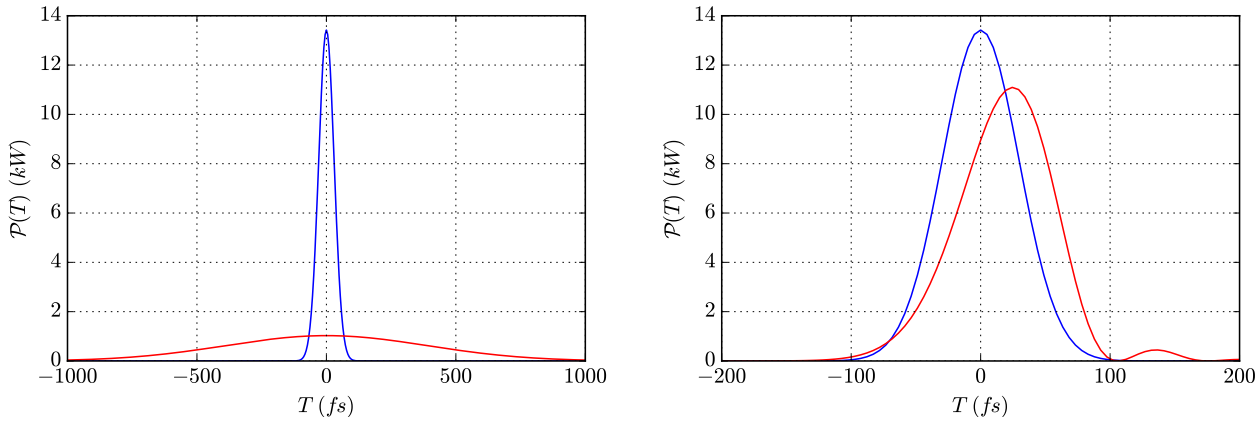


Figure 3.4 Simulation de la propagation d'une impulsion gaussienne dans une fibre optique avec dispersion chromatique - Profil temporel de puissance initiale (bleu) et finale (rouge) - figure de gauche : dispersion d'ordre deux avec $\beta_2 = -23\ ps^2/km$ - figure de droite : dispersion d'ordre trois avec $\beta_3 = 0.13\ ps^3/km$ - Paramètres de simulation : $L_{fibre} = 1\ m$ et impulsion initiale gaussienne avec $\langle \mathcal{P}(t) \rangle = 100\ mW$, $\Delta t_{FWHM} = 90\ fs$ et $\lambda_0 = 1565\ nm$.

soudre les différentes équations de propagation présentées dans cette section. Les résultats de simulations de propagation pour un régime de dispersion d'ordre deux et d'ordre trois sont présentés sur la figure 3.4. La dispersion d'ordre deux produit un élargissement symétrique alors que celle d'ordre trois produit un élargissement asymétrique de l'impulsion. Les deux régimes de dispersions élargissent le profil temporel de l'impulsion comme cela est prévu. En revanche, pour les valeurs typiques de la fibre SMF-28 (Corning), la dispersion d'ordre trois a un impact limité sur l'élargissement temporel de l'impulsion comparativement à celle d'ordre deux.

Automodulation de phase

Le second effet majeur intervenant dans la propagation d'impulsion dans des fibres optiques est l'automodulation de phase. Son origine est liée à un effet non linéaire du troisième ordre, nommé l'effet Kerr. Cet effet induit une dépendance en intensité de l'indice de réfraction qui se décompose désormais en deux parties distinctes :

$$n(\omega, T) = n_0(\omega) + n_{2I} \times \mathcal{I}(T), \tag{3.29}$$

où $n_0(\omega)$ représente l'indice de réfraction classique et sa dépendance en pulsation, et n_{2I}, un coefficient non linéaire caractéristique de la fibre s'exprimant en m^2/W. Dans le cas où l'intensité $\mathcal{I}(T)$, présente un pic de puissance suffisamment important pour compenser

le faible ordre de grandeur de n_{2I}, il devient nécessaire de tenir compte de cet effet. Cette variation d'indice entraîne alors l'apparition d'une phase temporelle supplémentaire, $\phi_{NL}(T)$, que l'on nomme phase non linéaire :

$$\phi_{NL}(T) = n_{2I}\mathcal{I}(T)\frac{\omega_0}{c}L = \gamma\mathcal{P}(T)L, \tag{3.30}$$

où le coefficient γ s'identifie à :

$$\gamma = \frac{\omega_0 n_{2I}}{cA_{eff}}. \tag{3.31}$$

Cette nouvelle phase possède une dépendance temporelle qui conduit à un changement de la fréquence instantanée, $\omega_{inst}(T)$, le long de l'impulsion (équation 3.5). Le spectre, $\tilde{S}(\omega)$, défini par transformée de Fourier est également affecté alors que le profil temporel demeure inchangé. L'équation d'évolution de l'amplitude complexe du champ normalisé (équation 3.8) en présence d'automodulation de phase s'écrit (Agrawal, 2007) :

$$\frac{\partial\mathcal{U}}{\partial z} = i\gamma|\mathcal{U}|^2\mathcal{U}. \tag{3.32}$$

La résolution de l'équation 3.32 par la méthode des différences finies permet d'obtenir les courbes de la figure 3.5. La figure de gauche confirme l'apparition d'une dépendance non linéaire de la phase avec le temps, $\phi(T)$, lors de la propagation. La fréquence instantanée devient elle aussi dépendante du temps : le front de l'impulsion est décalé vers le rouge alors que la queue de l'impulsion est décalée vers le bleu. En conséquence, le spectre est élargi de façon symétrique (figure 3.5 droite) et on observe l'apparition d'oscillations caractéristiques de l'automodulation de phase.

Équation de propagation non-linéaire

En considérant uniquement l'automodulation de phase et la dispersion d'ordre deux, on peut alors résumer l'évolution d'une impulsion dans une fibre optique, sous l'équation de propagation non linéaire suivante :

$$\frac{\partial\mathcal{U}}{\partial z} + \frac{i}{2}\beta_2\frac{\partial^2\mathcal{U}}{\partial T^2} = i\gamma|\mathcal{U}|^2\mathcal{U}. \tag{3.33}$$

Cette équation est également résolue numériquement afin d'observer comment l'impulsion se modifie après la propagation sur une certaine longueur L de fibre dont les caractéristiques sont connues (figure 3.6). Ces résultats de simulation montrent que la forme temporelle de l'impulsion est beaucoup moins élargie que dans le cas où seule la dispersion est considérée. Cela s'explique par le fait que l'automodulation de phase et la dispersion d'ordre deux se

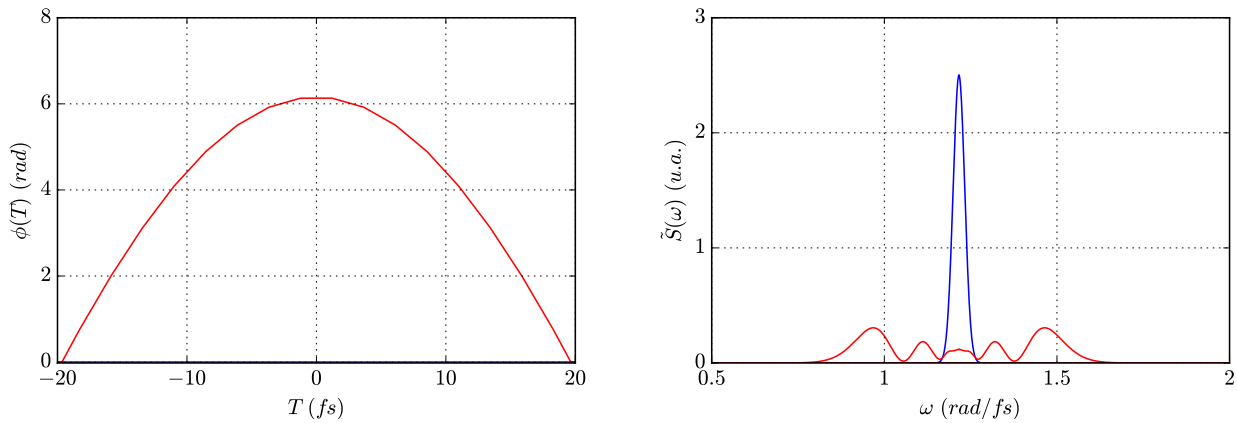


Figure 3.5 Simulation de la propagation d'une impulsion gaussienne dans une fibre optique avec automodulation de phase - figure de gauche : Phase temporelle $\phi(T)$ de l'impulsion initiale (bleu) et finale (rouge) - figure de droite : Spectres $\tilde{S}(\omega)$ de l'impulsion initiale (bleu) et finale (rouge) - paramètres de simulation : $n_{2I} = 2.3 \times 10^{-20}\ m^2/W$, $L_{fibre} = 1\ m$ et impulsion initiale gaussienne avec $\langle \mathcal{P}(t) \rangle = 100\ mW$, $\Delta t_{FWHM} = 90\ fs$ et $\lambda_0 = 1565\ nm$.

compensent partiellement dans ce cas-ci : la phase temporelle redevient quasi-constante dans la zone où l'impulsion est non nulle. Il existe un régime dans lequel cette compensation est parfaite : le régime solitonique. La condition sur la puissance crête du signal pour pouvoir se placer dans ce régime est la suivante :

$$\mathcal{P}_{max}^{sol} = \frac{|\beta_2|}{\gamma T_0^2}. \tag{3.34}$$

Ce régime n'est atteignable que pour des puissances crêtes dépassant cette valeur $\mathcal{P}_{max}^{sol}$ et une dispersion anormale ($\beta_2 < 0$).

Effets négligés

Les équations précédentes ne tiennent pas compte de nombreux phénomènes non linéaires tels que la diffusion Raman et Brillouin ainsi que la génération de troisième harmonique (GTH). Ce dernier phénomène (figure 2.2 (b)) a été observé au sein du circuit de fibres comme le montre la figure 3.7. Dans le cas où l'on souhaiterait observer des effets du troisième ordre dans des échantillons, cet effet pourrait s'avérer limitant (fond et bruit supplémentaire). De plus, il est implicitement assumé que la propagation se fait sans perte ce qui n'est évidemment pas le cas du système réel. Les pertes totales du circuit de fibre, montré à la figure 3.8, sont présentées et discutées dans le chapitre suivant. Ces pertes influencent directement l'automodulation de phase et la propagation d'un éventuel soliton. Un autre effet de dispersion

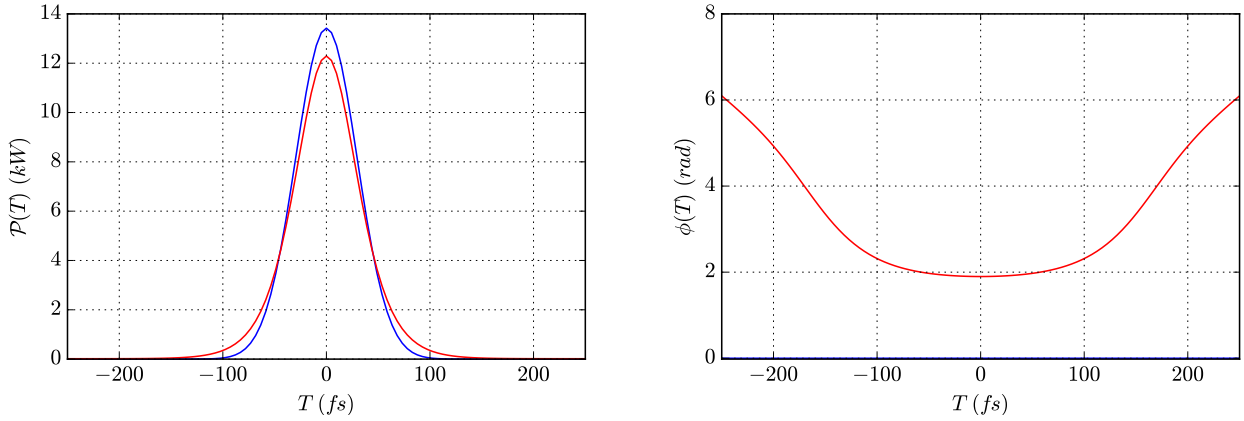


Figure 3.6 Simulation de la propagation d'une impulsion dans une fibre optique avec automodulation de phase et dispersion d'ordre deux - figure de gauche : profil temporel de puissance initiale (bleu) et finale (rouge) - figure de droite : phase temporelle $\phi(T)$ de l'impulsion initiale (bleu) et finale (rouge) - paramètres de simulation : $\beta_2 = -23\ ps^2/km$, $n_{2I} = 2.3 \times 10^{-20}$ m^2/W, $L_{fibre} = 1\ m$ et impulsion initiale gaussienne avec $\langle \mathcal{P}(t) \rangle = 100\ mW$, $\Delta t_{FWHM} = 90$ fs et $\lambda_0 = 1565\ nm$.

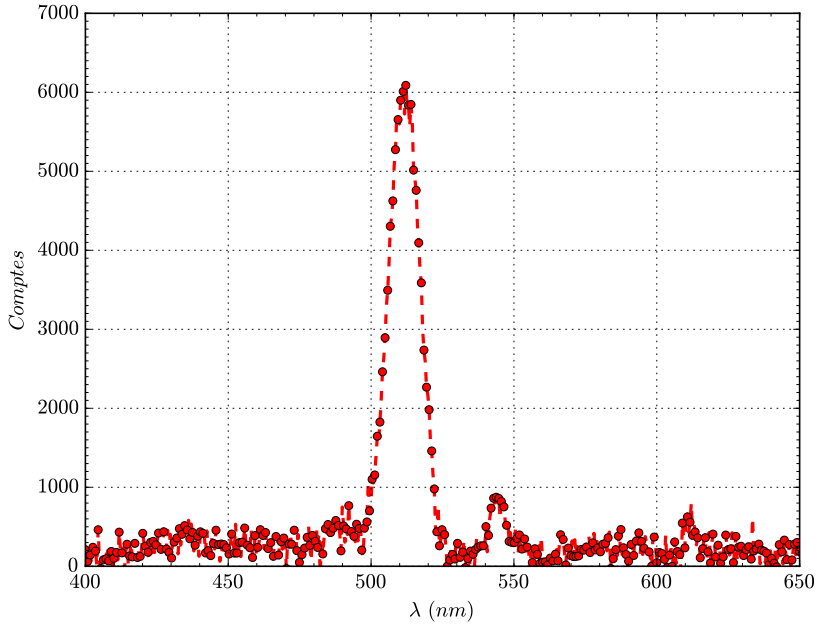


Figure 3.7 Génération de troisième harmonique dans la fibre optique - Spectre mesuré en sortie de fibre à compensation de dispersion (DCF38) à l'aide d'un spectromètre MayaPro 2000 - Temps d'intégration de 20 s - Impulsion initiale : $\langle \mathcal{P}(t) \rangle_{fibre} \sim 60\ mW$, $\Delta t_{FWHM} = 254$ fs et $\lambda_0 = 1550\ nm$ (OPO) - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017).

est également négligé : la dispersion du mode de polarisation (PMD). Ce type de dispersion caractérise le retard apparaissant entre deux états de polarisations se propageant à différentes vitesses dans la fibre. L'origine de ces différences de vitesse de propagation est liée aux anisotropies dans la fibre, entraînant une variation d'indice locale et aléatoire à l'origine d'une légère biréfringence. Cet écart élargit alors l'impulsion d'un facteur, Δt_{FWHM} :

$$\Delta t_{FWHM} = 2\sqrt{2\ln(2)}D_{PMD}\sqrt{L}, \tag{3.35}$$

avec D_{PMD}, un coefficient de dispersion de polarisation de mode propre à chaque fibre, et L la longueur de fibre. Pour la SMF-28 ($D_{PMD} \sim 0.1\ ps/\sqrt{km}$, source : Corning), on obtient un élargissement de $\Delta t_{FWHM} \sim 7.5\ fs$ pour une longueur $L = 1\ m$ de fibre. Cet élargissement temporel étant nettement inférieur à ceux causés par la dispersion chromatique, on négligera cet effet par la suite.

Nous avons vu au travers de cette section la théorie décrivant les phénomènes susceptibles de se produire lorsqu'une impulsion se propage dans une fibre optique. La résolution de l'équation de propagation non linéaire (équation 3.33) permets de déterminer le profil temporel de l'impulsion en sortie de fibre. La section suivante présente le lien existant entre ce profil temporel et l'efficacité de génération des signaux non linéaires que l'on souhaite observer (2PEF, GSH).

3.2 Génération de signaux multiphoton du deuxième ordre

Cette section présente la théorie nécessaire à la compréhension des deux phénomènes non linéaires du deuxième ordre que nous souhaitons générer et observer dans les tissus biologiques : la fluorescence par absorption de deux photons (2PEF) et la génération de seconde harmonique (GSH).

3.2.1 La fluorescence par absorption de deux photons

La fluorescence par absorption de deux photons (2PEF) est un processus non linéaire conduisant à l'émission spontanée d'un photon suivant le diagramme de la figure 2.1 (a). Contrairement à la fluorescence standard, les photons émis sont plus énergétiques que les photons d'excitation. Cette partie reprend la théorie de ce processus non paramétrique afin d'identifier la relation liant l'efficacité d'un tel processus aux paramètres de l'impulsion en sortie de fibre. Nous estimerons alors le nombre de photons de fluorescence (2PEF) émis pour les différents lasers du tableau 3.1 pour différentes configurations de fibres optiques.

Théorie

L'origine quantique de la fluorescence multiphotonique n'est pas abordée ici (Masters and So, 2008). La vision simplifiée décrivant le fait qu'un état électronique d'une molécule peut transiter de différentes façons entre ses niveaux d'énergies en passant par des états virtuels intermédiaires est adoptée ici (figure 2.1 : V).

La probabilité que deux photons soient absorbés pour réaliser une telle transition est décrite par une section efficace d'absorption à 2 photons, σ_2. Cette dernière est calculée comme le produit des sections efficaces d'absorption à 1 photons entre les différents états de la transition, σ_{0v} et σ_{v1}, et de la durée de vie de l'état virtuel, τ_v (Masters and So, 2008) :

$$\sigma_2 = \sigma_{0v} \times \tau_v \times \sigma_{v1}. \tag{3.36}$$

Ainsi, σ_2 à une unité exprimé en $cm^4 s/photons$. Il a été défini une unité, le Goeppert-Mayer, valant 1 $GM = 10^{-50} cm^4 s/photons$, qui correspond à l'ordre de grandeur des sections efficaces d'absorption à deux photons. En effet, l'état virtuel possède une durée de vie, τ_v de l'ordre de 10^{-15} s (Masters and So, 2008). Le nombre de photons absorbés pour une transition à 2 photons, $N_{abs}(t)$ est alors donné par :

$$N_{abs}(t) = \int_V d\vec{r} \sigma_2 C(\vec{r}, t) \mathcal{I}^2(\vec{r}, t). \tag{3.37}$$

où :

- $C(\vec{r}, t)$ représente la concentration du principal fluorophore et sa distribution. Pour un milieu homogène et sans dégradation du fluorophore avec le temps, elle peut être prise comme une constante, C_0.
- $\mathcal{I}(\vec{r}, t) = \mathcal{I}(t) S(\vec{r})$ est l'intensité d'illumination en $photons/(s.cm^2)$ qui se décompose comme le produit de l'intensité temporelle définit précédemment, $\mathcal{I}(t)$, et d'une distribution spatiale normalisée, $S(\vec{r})$,

La désexcitation dans le cas de la fluorescence à deux photons se fait en combinant des transitions non radiatives et radiatives conduisant à l'émission d'un photon d'énergie plus élevée que les photons d'excitations absorbés. Le nombre de photons de fluorescence émis suite à une absorption à 2 photons s'écrit :

$$N_{emis}(t) = \frac{1}{2} \eta N_{abs}(t), \tag{3.38}$$

où η le rendement quantique du processus de fluorescence. En réalité, les mesures de sections efficaces d'absorption à plusieurs photons sont des mesures de section efficace d'actions des

processus multiphotons, c'est à dire du produit $\eta\sigma_2$ (tableau 2.1). Un système optique ne collectera qu'une partie de ces photons émis, qui arriveront finalement sur le détecteur. En notant ϕ l'efficacité de la collection du système, le nombre de photons collectés s'écrit alors comme :

$$N_{coll}(t) = \phi N_{emis}(t). \tag{3.39}$$

Au regard des échelles de temps en jeu ici (10^{-15} s), le temps de réponse d'un détecteur est tel que la mesure renvoyée par ce dernier n'est pas la valeur instantanée, $N_{coll}(t)$, mais sa moyenne temporelle $\langle N_{coll}(t)\rangle$:

$$\langle N_{coll}(t)\rangle = \frac{1}{2}\phi\eta\sigma_2 C_0 \langle \mathcal{I}^2(t)\rangle \int_V d\vec{r} S^2(\vec{r}). \tag{3.40}$$

Le terme $\langle \mathcal{I}^2(t)\rangle$ peut s'exprimer en termes de $\langle \mathcal{I}(t)\rangle^2$ à l'aide du coefficient de cohérence temporelle d'ordre 2, $g^{(2)}$ définit précédemment (équation 3.21). L'expression du nombre de photons collectés pour un processus à 2 photons peut s'écrire alors comme :

$$\langle N_{coll}(t)\rangle = \frac{1}{2} g^{(2)} \phi\eta\sigma_2 C_0 \langle \mathcal{I}(t)\rangle^2 \int_V d\vec{r} S^2(\vec{r}). \tag{3.41}$$

Afin de calculer le nombre de photons de fluorescence collectés, il nous faut préciser la distribution spatiale, $S(\vec{r})$, autour du point focal dans l'échantillon. Cette fonction peut être très complexe du fait de la lentille focalisante. En effet, elle conduit à une déformation du front d'onde par diffraction. Deux régimes limites peuvent alors être utilisés afin de déterminer la valeur de l'intégrale :

— le diamètre du faisceau incident est petit devant l'ouverture : $D_{ouverture} >> D_{faisceau}$;

— le diamètre du faisceau incident est grand devant l'ouverture :$D_{ouverture} << D_{faisceau}$.

Dans le premier cas, les effets de la diffraction peuvent être négligés et un profil spatial gaussien peut être utilisé si l'ouverture numérique de la lentille est petite (approximation paraxiale). Dans le second cas, la lentille est décrite par sa fonction d'étalement du point (PSF, de l'anglais *Point Spread Function*). Les optiques du système ont été choisies afin de se placer dans ce second régime, nommé limite de diffraction permettant d'obtenir de meilleures résolutions. Sous les hypothèses que l'approximation paraxiale est vérifiée et que l'épaisseur de l'échantillon est grande devant la longueur focale ($V \to \infty$), on obtient (Masters and So, 2008) :

$$\mathcal{I}(t) = \frac{\pi(ON)^2}{\lambda_0^2}\mathcal{P}(t), \tag{3.42}$$

$$\int_{V\to\infty} d\vec{r} S^2(\vec{r}) = a_2 \frac{n_0 \lambda_0^3}{8\pi^3 (ON)^4}, \tag{3.43}$$

où :

— ON est l'ouverture numérique de la lentille de focalisation ;
— λ_0 est la longueur d'onde centrale d'excitation ;
— a_2 est un coefficient valant pour la fluorescence à deux photons, $a_2 \approx 70$;
— n_0 est l'indice de réfraction dans l'échantillon.

Ainsi, le nombre de photons collecté par le système, dans la limite de diffraction, s'exprime comme :

$$\langle N_{coll}(t)\rangle \approx \frac{1}{2} g^{(2)} \phi \eta \sigma_2 C_0 n_0 \frac{8.8 \langle \mathcal{P}(t)\rangle^2}{\pi \lambda_0}. \tag{3.44}$$

On peut ainsi identifier les deux paramètres essentiels de l'impulsion à maximiser : son facteur de cohérence d'ordre 2, $g^{(2)}$, et sa puissance moyenne, $\langle \mathcal{P}(t)\rangle$. Afin d'estimer le nombre de photons de fluorescence à deux photons (équation 3.44), nous allons déterminer ces paramètres en simulant la propagation d'impulsion au travers un modèle de circuit de fibre dont les caractéristiques correspondent à celles du circuit utilisé en pratique.

Modélisation du circuit de fibres optiques

La figure 3.8 présente un schéma du circuit réel (a) correspondant à la propagation de l'excitation et le modèle simplifié utilisé (b). Les hypothèses derrière ces simplifications sont les suivantes :

— l'effet de la dispersion du mode de polarisation est négligé ;
— la fibre DCF (DCF-13, Thorlabs) utilisée a les mêmes propriétés que la SMF-28 pour sa partie unimodale ;
— la dispersion d'ordre 3 est négligée, au vu de son impact limité sur l'élargissement de l'impulsion (figure 3.4) ;
— les connexions n'introduisent aucune perte ;
— la présence du coupleur n'affecte pas la propagation unimodale de l'impulsion.

L'utilisation d'une fibre à compensation de dispersion (DCF38, Thorlabs) a été modélisée afin de compenser la dispersion d'ordre deux. Les caractéristiques des différentes fibres utilisées sont résumées dans le tableau 3.2. Les longueurs des fibres montrées sur la figure 3.8 sont mesurées à $L_{CRC} = 205\ cm$ et $L_{DCFC} = 251\ cm$. La longueur de fibre à compensation de dispersion, L_{DCF-38}, est ajusté afin de retrouver l'impulsion initiale en sortie du circuit.

Résultats des simulations

En utilisant le modèle simplifié de la figure 3.8 (b) et les paramètres de fibres du tableau 3.2, nous calculons le profil temporel de l'impulsion en sortie de système en résolvant numérique-

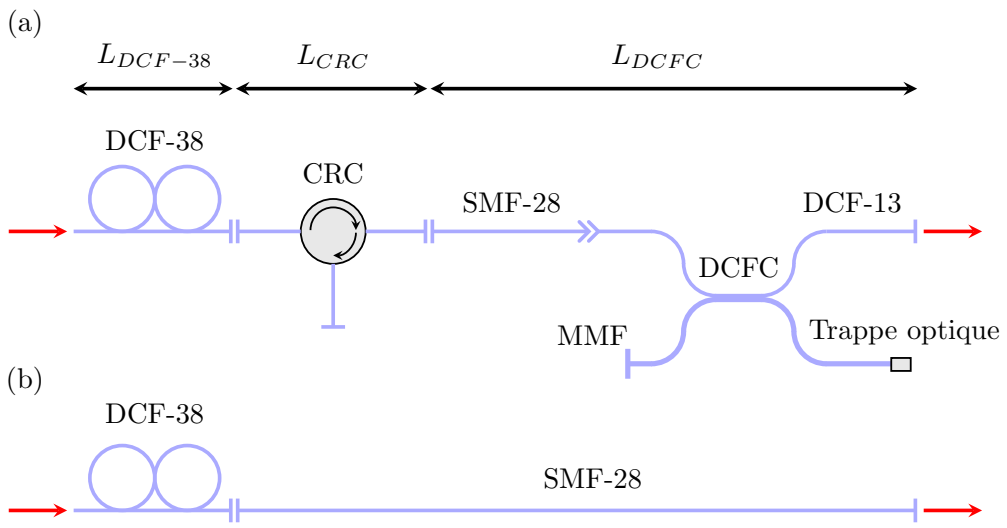


Figure 3.8 Schémas du circuit de fibres optiques : (a) circuit réel et (b) modèle utilisé pour les simulations - les caractéristiques de chaque fibre sont données dans le tableau 3.2.

ment l'équation 3.33 et en assumant un profil gaussien en entrée. Ce profil temporel final nous permet de calculer le facteur de cohérence du second ordre $g^{(2)}$ en intégrant l'équation 3.21. En utilisant des paramètres normalisés et d'ordre de grandeur comparable à la réalité ($\eta\sigma_2$=1 GM, $C_0 = 1.0$ $\mu mol/L$, $n_0 = 1$), nous pouvons estimer le nombre de photons de fluorescence à deux photons émis pour un fluorophore donné (ϕ=1) à l'aide de l'équation 3.44. En faisant varier la puissance moyenne, nous obtenons les résultats de simulations de la figure 3.9 pour les caractéristiques des deux lasers utilisés (tableau 3.1). Les simulations ont été réalisées pour quatre régimes différents : propagation hors fibre (aucun effet ne modifie l'impulsion, courbe bleu), propagation avec dispersion d'ordre deux uniquement (courbe verte), propagation avec dispersion d'ordre deux et automodulation de phase (courbe rouge) et propagation avec dispersion d'ordre deux, automodulation de phase et compensation de la dispersion (courbe jaune). Seule cette dernière simulation tient compte de l'ajout d'une fibre DCF-38 afin de compenser la dispersion du circulateur et du DCFC. La longueur théorique permettant de compenser cette dispersion est calculée à $L_{DCF-38} = 205$ cm.

Les courbes correspondant au régime de propagation libre et au régime dispersif sont des droites de pente 2 en échelle logarithmique comme cela est attendu d'après l'équation 3.33. La dispersion élargissant l'impulsion, le facteur de cohérence $g^{(2)}$ s'en trouve réduit (équation 3.23) et l'efficacité de génération des photons de fluorescence est réduite. Les deux autres régimes correspondent à des régimes où l'automodulation de phase est prise en compte. Dans le cas où la dispersion n'est pas compensée, la dispersion domine à faible puissance (courbes

Tableau 3.2 Caractéristiques des différentes fibres optiques utilisées - Les paramètres non connus sont notés *n.c.*

Fibre	Mode/Gaine	$D_{coeur/gaine}$ (μm)	A_{eff} (μm^2)	β_2 (ps^2/km)	β_3 (ps^3/km)	n_{2I} (m^2/W)	λ_{cut} (nm)
SMF-28 Corning	Mono/Simple	8.2/125	84.9	-23	0.13	2.3×10^{-20}	1260
DCF-38 Thorlabs	Mono/Simple	6.3/125	31.2	50	*n.c.*	*n.c.*	1520
DCF-13 Thorlabs	Mono/Double	9/105/125	75.4	-23	*n.c.*	*n.c.*	1250

rouge et verte confondues). En dépassant la puissance solitonique, on observe l'apparition d'un soliton conduisant à retrouver l'impulsion initiale en sortie de système (courbes rouge et bleue confondues). Les lignes pointillées représentent la puissance solitonique calculée à l'aide de l'équation 3.34 et reconvertie en puissance moyenne. Cet effet est rendu possible par le fait que la dispersion est anormale dans ce segment de fibre. Lorsque la compensation de dispersion est implémentée, le régime à faible puissance se rapproche du comportement en propagation libre (courbe jaune et bleue confondue). À plus haute puissance, l'automodulation de phase combinée à la dispersion normale de la fibre à compensation modifie très fortement l'impulsion et réduit l'efficacité de génération. En effet, l'automodulation de phase et la dispersion ne se compensent plus dans une fibre à dispersion normale mais se cumulent. On remarque alors qu'il peut être avantageux de compenser ou non la dispersion suivant le régime de puissance dans lequel on travaille.

Fluorescence endogène et exogène

L'origine de la fluorescence peut être de deux natures distinctes. Le tissu biologique imagé peut contenir directement des molécules susceptibles d'être excitées par de l'absorption à deux photons : on parle de fluorescence endogène. Cette fluorescence endogène est généralement très faible et difficile à observer. L'injection de fluorophore externe marquant certains types de tissus, cellules ou protéines peut également permettre d'obtenir un contraste : on parle dans ce cas de fluorescence exogène. En se basant sur les travaux de Yazdanfar et al. (2010), nous avons identifié deux fluorophores prometteurs : l'indocyanine green (ICG) ainsi que le 3,3'-diethylthiatricarbocyanine (DTTCI). À l'aide du système développé dans le chapitre suivant, nous avons mesuré leurs spectres d'émission suite à l'absorption de deux photons. Ces spectres de fluorescence sont montrés sur la figure 3.10. Ces spectres sont bien situés au-delà du pic de seconde harmonique ($\sim 775\ nm$) comme cela est attendu pour la 2PEF.

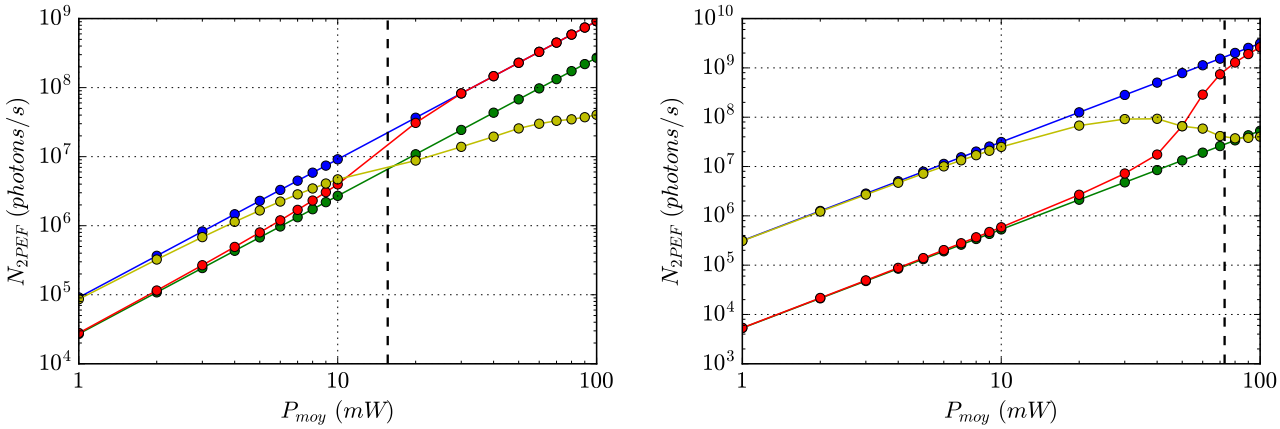


Figure 3.9 Simulations du nombre de photons N_{2PEF} émis en fonction de la puissance moyenne P_{moy} - figure de gauche : Impulsion typique de l'OPO - figure de droite : Impulsion typique de l'ELMO - Bleu : Propagation en espace libre - Vert : Propagation avec dispersion uniquement - Rouge : Propagation avec dispersion et automodulation de phase - Jaune : Propagation avec compensation de dispersion, dispersion et automodulation de phase - Lignes pointillées : Puissance solitonique - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017)

3.2.2 La génération de seconde harmonique

La GSH est le second effet non linéaire que nous souhaitons observer dans les tissus à l'aide du système. Cette section présente dans un premier temps la résolution de l'équation d'onde non linéaire dans le cas simplifié des ondes planes. Cette résolution va nous permettre d'identifier les éléments caractéristiques de la GSH et de discuter de la condition d'accord de phase. Enfin, nous discuterons de la GSH émise dans le cas des tissus biologiques comparativement à celle émise dans le cas de cristaux.

Résolution de l'équation d'onde dans le cas des ondes planes

Pour comprendre la génération de seconde harmonique et ses implications, il est utile de résoudre l'équation d'onde dans un matériau non linéaire dans le cas simplifié des ondes planes (Boyd, 2003). En injectant l'équation 2.1 dans l'équation 2.2 et en se limitant à un développement à l'ordre deux, nous obtenons l'équation d'onde suivante :

$$\vec{\nabla}^2\vec{\mathcal{E}} - \frac{\underline{\underline{n}}^2}{c^2}\frac{\partial^2\vec{\mathcal{E}}}{\partial t^2} = \mu_0\frac{\partial^2\vec{\mathcal{P}}^{(2)}}{\partial t^2}, \tag{3.45}$$

où le tenseur $\underline{\underline{n}}^2$ s'identifie à :

$$\underline{\underline{n}}^2 = \underline{\underline{1}} + \underline{\underline{\chi}}^{(1)}. \tag{3.46}$$

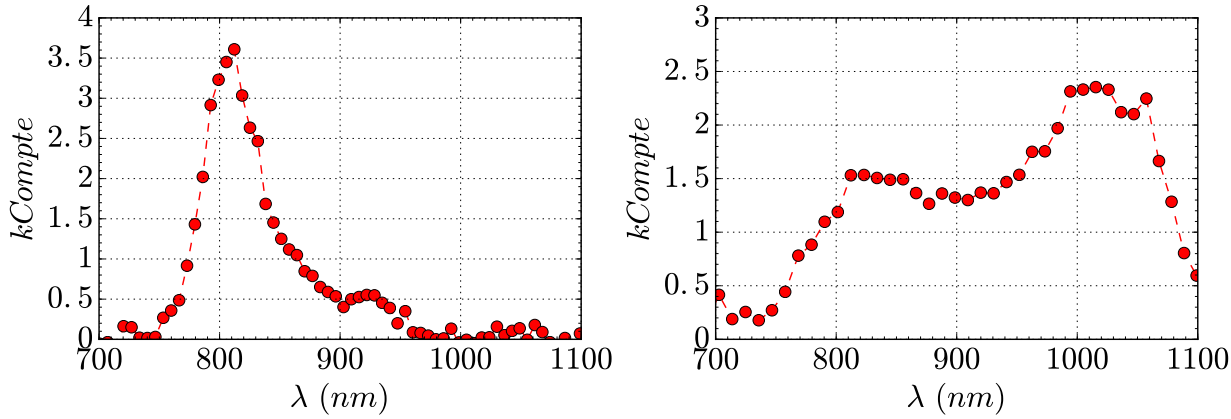


Figure 3.10 Spectre d'émission (2PEF) de deux fluorophores seuls - figure de gauche : spectre d'émission de l'ICG - figure de droite : spectre d'émission du DTTCI - spectres mesurés à l'aide d'un spectromètre ultra-sensible (Maya2000Pro, Ocean Optics) avec un temps d'intégration de 20 s - excitation par des impulsions provenant de l'ensemble Ti :S + OPO (cf. tableau 3.1) - le signal 2PEF est extrait via le port multimodal du coupleur à fibre à double gaine (DCFC) - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017).

En utilisant une décomposition sur une base fréquentielle :

$$\vec{\mathcal{E}}(\vec{r},t) = \sum_n \vec{E}_n(\vec{r})e^{-i\omega_n t} + c.c., \tag{3.47}$$

$$\vec{\mathcal{P}}^{(2)}(\vec{r},t) = \sum_n \vec{P}_n^{(2)}(\vec{r})e^{-i\omega_n t} + c.c., \tag{3.48}$$

on obtient la relation suivante sur les composantes fréquentielles :

$$\vec{\nabla}^2\vec{E}_n + \frac{\underline{\underline{n_n}}^2\omega_n^2}{c^2}\vec{E}_n = -\frac{\omega_n^2}{\epsilon_0 c^2}\vec{\mathcal{P}}_n^{(2)}. \tag{3.49}$$

Dans le cas de la GSH, seulement deux fréquences nous intéressent, la fréquence d'excitation, noté ω_1 (associée au champ $\vec{E}_1$) et la fréquence du signal de GSH, $\omega_2 = 2\omega_1$ (associée au champ $\vec{E}_2$). En cherchant les solutions sous la forme d'onde plane :

$$\vec{E}_1(z) = \vec{A}_1 e^{ik_1 z} + c.c., \tag{3.50}$$

$$\vec{E}_2(z) = \vec{A}_2 e^{ik_2 z} + c.c., \tag{3.51}$$

on arrive à l'équation suivante en utilisant la relation de dispersion $k_2 = \frac{\omega_2 n_2}{c}$:

$$\left[\frac{\partial^2\vec{A}_2}{\partial z^2} + 2ik_2\frac{\partial\vec{A}_2}{\partial z}\right]e^{ik_2 z} + c.c. = -\frac{\omega_2^2}{\epsilon_0 c^2}\vec{\mathcal{P}}_2^{(2)}. \tag{3.52}$$

Or d'après l'équation 2.1, $\vec{\mathcal{P}}_2^{(2)}$ est un vecteur densité de polarisation résultant de l'application du champ d'excitation $\vec{E}_1$, soit :

$$\vec{\mathcal{P}}_2^{(2)} = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)} \vec{A}_1 \vec{A}_1 e^{i2k_1 z} + c.c. \tag{3.53}$$

Cette équation vectorielle correspond à trois équations scalaires pour chacune des composantes du champ. Afin de s'affranchir du produit tensoriel et par souci de simplification, on ne considérera qu'une seule des projection et on supposera qu'une seule composante du $\underline{\underline{\chi}}^{(2)}$ est non nulle et sera nommée $\chi_{eff}^{(2)}$ par la suite. Ainsi on obtient l'équation d'évolution de l'amplitude du champ de seconde harmonique, A_2 :

$$\left[\frac{\partial^2 A_2}{\partial z^2} + 2ik_2 \frac{\partial A_2}{\partial z}\right] = -\frac{\chi_{eff}^{(2)} \omega_2^2 A_1^2}{c^2} e^{i(2k_1 - k_2)z}. \tag{3.54}$$

Dans le cas où l'onde varie lentement dans l'espace, on peut négliger le premier terme de l'équation et obtenir directement l'expression de A_2 sous la forme intégrale (Boyd, 2003) :

$$A_2 = \int_0^L dz \frac{i\chi_{eff}^{(2)} \omega_2^2 A_1^2}{2k_2 c^2} e^{i(2k_1 - k_2)z}. \tag{3.55}$$

Dans le cas où le faisceau d'excitation reste fort par rapport au signal de seconde harmonique générée, on peut supposer que l'amplitude A_1 est constante et le résultat de l'intégration fourni :

$$A_2 = \frac{\chi_{eff}^{(2)} \omega_2^2 A_1^2}{2k_2 c^2} \frac{e^{i(2k_1 - k_2)L} - 1}{2k_1 - k_2}. \tag{3.56}$$

En posant $\Delta k = 2k_1 - k_2$, on obtient l'équation décrivant l'évolution de l'intensité du signal de seconde harmonique, I_{GSH} en fonction de l'intensité d'excitation I_{exc} :

$$I_{GSH} = \frac{{\chi_{eff}^{(2)}}^2 \omega_2^2}{2n_2 n_1^2 \epsilon_0 c^3} L^2 \mathrm{sinc}^2(\Delta k L/2) I_{exc}^2. \tag{3.57}$$

Cette formulation simplifiée nous apprend différents éléments importants sur la GSH :

- elle varie quadratiquement avec la puissance de l'excitation ;
- doubler la durée des impulsions sans changer la puissance moyenne diminue l'intensité d'excitation de moitié, conduit a priori à une baisse du signal d'un facteur 4 mais augmente la durée de l'interaction d'un facteur 2 : le signal de GSH est donc simplement divisé par 2. Comme dans le cas de la fluorescence à deux photons, le signal de GSH est inversement proportionnel à la largeur des impulsions ;

— elle dépend quadratiquement du $\chi^{(2)}_{eff}$ qui lui-même dépend du matériau imagé, de la fréquence du champ d'excitation, de la structure de la maille cristalline et de son orientation par rapport à la polarisation du champ d'excitation ;
— elle est modulée par un $sinc^2$ dont l'amplitude dépend du Δk et de la longueur d'interaction L.

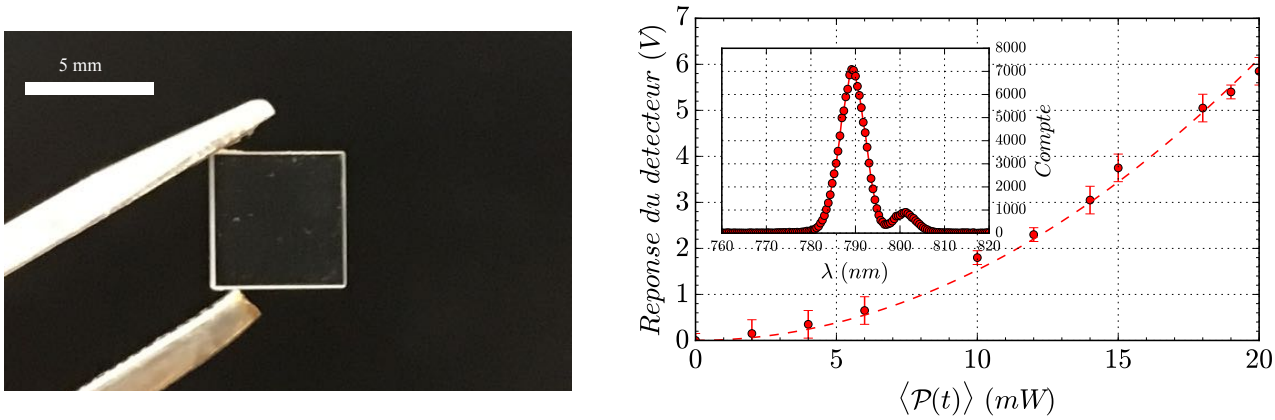


Figure 3.11 Signal de GSH sur un cristal de BBO - figure de gauche : photo du cristal de BBO utilisé - figure de droite : variation du signal de GSH avec la puissance moyenne d'excitation. La ligne pointillée représente le résultat d'une régression quadratique. Le spectre de GSH est présenté dans l'insert. Le léger décalage du maximum en longueur d'onde par rapport à $\lambda_{th}^{max} = 775\ nm$ est dû au fait que l'ensemble Ti :S+OPO n'était pas centré exactement autour de 1550 nm - Le signal de GSH est extrait via le port multimodal du coupleur à fibre à double gaine.

Accord de phase

Ce dernier point est extrêmement important car le dernier terme en sinc^2 peut complètement détruire l'intensité du signal de GSH. On parle alors de condition d'accord de phase. D'un point de vue physique, cela peut être vu en termes de dipôles. L'onde d'excitation à la fréquence ω_1 va exciter des dipôles émettant l'onde de seconde harmonique. À mesure que l'onde d'excitation progresse dans le matériau, du fait de sa différence de vitesse avec l'onde de seconde harmonique, un déphasage apparaîtra entre ces deux ondes et donnera lieu à des interférences destructives, détruisant le signal de GSH nouvellement créée. Dans le cas où $\Delta k = 0$, le terme en sinc^2 est maximal et vaut l'unité. Dans le cas contraire, on peut définir une longueur de cohérence, tel que le sinc^2 reste suffisamment grand (> 0.7) :

$$L_{coh} = \frac{2}{\Delta k}. \tag{3.58}$$

Dans le cas de signaux se propageant vers l'avant, cette longueur de cohérence est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres à quelques centaines de micromètres (Rivard, 2016). Dans le cas de signal de GSH émis vers l'arrière ($\Delta k = 2k_1 + k_2$), cette longueur de cohérence est beaucoup plus faible, de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Ainsi, contrairement à la fluorescence émise de façon isotrope, le signal de GSH est préférentiellement émis vers l'avant. Dans le cas de structure hétérogène, une émission de GSH vers l'arrière plus important peut être observée et est reliée à des effets d'interfaces. Dans les tissus biologiques, milieu diffusant par excellence, la GSH émise vers l'avant peut être rétrodiffusée dans la direction arrière et peut ainsi être observée du même côté que la source d'excitation. C'est ce dernier effet qui contribue principalement au signal de GSH arrière que nous souhaitons observer.

Cristaux et tissus biologiques

Les développements précédents basés sur le tenseur de susceptibilité sont fortement utilisés dans le cas des cristaux. Dans ce cas, la forme du tenseur de susceptibilité peut être déduite des paramètres de la maille cristalline et en se basant sur les symétries du cristal. En revanche, dans le cas des tissus biologiques, il n'existe pas un tenseur de susceptibilité unique et global décrivant le comportement du tissu dans son ensemble. En effet, un tissu biologique est un milieu très hétérogène. Les principaux constituants émettant de la GSH sont le collagène et la myosine (Rivard, 2016). Le cas du collagène est très intéressant car il est présent dans de nombreux tissus, tels que les tendons, le cartilage, le fascia ou encore les cordes vocales. La myosine est quant à elle présente dans les muscles et permet l'observation des sarcomères. Il existe ainsi une source de contraste en GSH endogène dans de nombreux tissus biologiques. Les conséquences explicitées en utilisant le développement précédent sont toujours valides. En faisant varier la polarisation, on peut sonder ainsi les éléments du tenseur de susceptibilité du tissu mais en gardant à l'esprit qu'il n'est cette fois que local. L'orientation des fibres de collagène peut être déduite d'une telle approche par exemple (Ávila et al., 2015).

3.3 Conclusion

Nous avons vu à travers ce chapitre le formalisme décrivant des impulsions lasers et les effets liés à sa propagation dans une fibre optique. La dispersion chromatique et l'automodulation de phase sont les deux effets que nous devons considérer en première approximation. Les simulations réalisées dans le cadre de la fluorescence par absorption à deux photons montrent qu'il est pertinent, selon le régime de puissance, de compenser ou non la dispersion à l'aide d'une fibre à dispersion normale. De plus, nous avons vu que cette fibre à compensation de dispersion émet un spectre de troisième harmonique (GTH) susceptible de perturber des

mesures éventuelles d'effets du troisième ordre dans les tissus biologiques. La génération et la collecte de signaux GSH et 2PEF ont pu être réalisée sur un cristal de BBO et sur des fluorophores respectivement, en utilisant le circuit de fibre de la figure 3.8 et l'ensemble Ti :S et OPO comme source d'excitation. Par conséquent, un coupleur à fibre à double gaine asymétrique (DCFC) peut a priori être utilisé afin d'extraire des signaux non linéaires via son port multimodal. Le chapitre suivant décrit en précision la compensation de dispersion réalisée et la réalisation du système de microscopie dans son ensemble pour l'imagerie multiphotonique d'échantillons biologiques, ainsi que les résultats d'imagerie obtenus.

CHAPITRE 4 RÉALISATION DU MICROSCOPE MULTIPHOTON FIBRÉE

Ce chapitre présente et discute les résultats expérimentaux de ce projet de maîtrise. Dans un premier temps, en se basant sur les simulations théoriques du chapitre précédent, la compensation de dispersion réalisée sur le système fibré est présentée pour les deux types de sources utilisées dans le cadre de ce projet. Le design et le développement des éléments constitutifs du microscope dans son ensemble seront détaillés ensuite. Enfin, les trois modalités d'imagerie (confocal, 2PEF et GSH) du microscope seront caractérisées et utilisées afin de réaliser des images de divers échantillons biologiques. Une discussion de ces résultats d'imagerie et des limitations actuelles du système sont présentées en fin de chapitre.

4.1 Compensation de la dispersion

Les résultats de simulations présentées à la figure 3.9 prédisent s'il est pertinent de compenser la dispersion suivant le régime de puissance. Dans le cadre de ce projet, deux lasers ont été utilisés comme source d'impulsion femtosecondes (cf. tableau 3.1). Cette section présente les résultats de compensation de la dispersion pour chacune des deux sources utilisées.

4.1.1 Ensemble Ti :S + OPO

L'ensemble Ti :S + OPO est la première source que nous avons utilisée. Dans ce cas, les puissances moyennes se propageant effectivement dans le circuit de fibre optique sont limitées à la trentaine de milliwatts ($P_{moy} \sim 30\ mW$). Le contrôle de la puissance est fait en sortie d'OPO par un assemblage d'une lame demi-onde suivi d'un cube séparateur de polarisation.

Montage expérimental

Dans le cas où cette source est utilisée, il est nécessaire de coupler le faisceau sortant de l'OPO dans la fibre optique. Pour cela, j'ai utilisé un système d'injection constitué d'une lentille asphérique (C110TME-C, Thorlabs) et d'une plateforme 3 axes afin de maximiser le couplage du faisceau dans la fibre à compensation de dispersion (DCF-38, Thorlabs) clivée à angle nul (figure 4.1). Le reste du système est le circuit de fibre déjà présenté à la figure 3.8. L'autocorrélation et le spectre sont mesurés en sortie de la fibre DCF du coupleur. Par un sectionnement itératif de la fibre, la longueur de la fibre à compensation de dispersion est

ajustée afin de retrouver la largeur d'impulsion originelle en sortie du système. Les résultats de cette compensation de dispersion sont présentés dans les paragraphes suivants.

Mesure des pertes du circuit de fibre

Les pertes dans le circuit de fibre ainsi que le coefficient de couplage ont été évalués par des mesures de puissances à différents points du circuit de fibre :

— Le coefficient de couplage maximal du faisceau dans la fibre a été mesuré à $C = 62.8\%$.

— Les pertes liées au connecteur de la DCF-38 ainsi que les pertes liées au circulateur sont mesurées à 30.4% soit une atténuation de 1.57 dB.

— Les pertes liées au DCFC pour la transmission unimodale, incluant les pertes des connecteurs, sont mesurées à 9.8% soit une atténuation de 0.45 dB.

Ainsi le circuit de fibres au complet présente des pertes de 2.02 dB, n'incluant pas les pertes liées au couplage. La majorité des pertes sont concentrées au niveau de la connexion entre la fibre DCF-38 et la fibre SMF-28 du circulateur.

Mesures des traces d'autocorrélations

Par un ajustement itératif de la longueur de la fibre à compensation de dispersion (DCF-38), les impulsions en sortie de système peuvent être recompressées. La figure 4.2 (gauche) montre cette recompression de l'impulsion en fonction de la longueur de fibre à compensation de dispersion. Les sauts dans cette courbe quasi linéaire sont dus à l'ajustement de la gamme dynamique de l'autoccorrélateur. Ces mesures ont été réalisées en maintenant une puissance de sortie du DCFC au voisinage de 8 mW, assurant que la puissance moyenne dans la fibre n'excède pas la quinzaine de milliwatts en entrée. La longueur expérimentale de la fibre à compensation de la dispersion permettant de retrouver la largeur d'impulsion originelle est

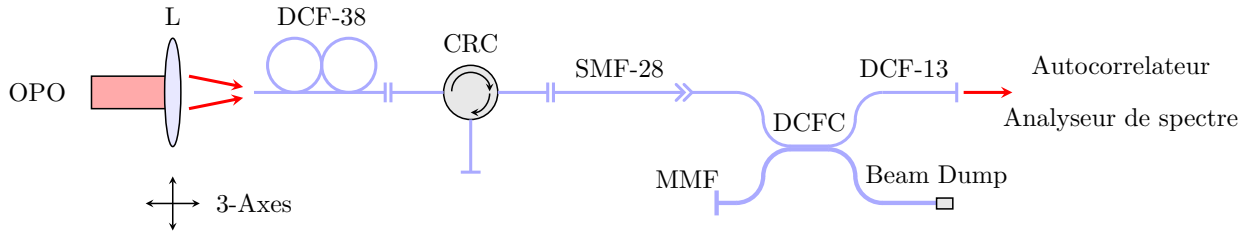


Figure 4.1 Compensation de la dispersion : schéma du montage expérimental avec source Ti :S+OPO - Une lentille asphérique (L) et une plateforme 3-axes permettent le couplage du faisceau de sortie de l'OPO dans le circuit de fibre.

de $L^{exp}_{DCF-38} = 203\ cm$. Cette mesure est en parfait accord avec la valeur théorique calculée dans le chapitre précédent ($L^{th}_{DCF-38} = 205\ cm$). La figure 4.2 (droite) montre les traces d'autocorrélations relevées pour différentes configurations du circuit de fibres. L'autocorrélation en sortie d'OPO (en bleu) peut ainsi être retrouvée en compensant exactement la dispersion (en orange) en ajustant la longueur de DCF-38 à la valeur mesurée précédemment. Dans le cas où la fibre à compensation de dispersion est absente, l'impulsion est nettement élargie (en rouge). On peut dans ce cas particulier, réussir à compresser l'impulsion en dessous de sa largeur initiale (en vert) en diminuant encore la longueur de fibre à compensation de dispersion. Cet effet est lié à la combinaison de l'automodulation de phase avec la dispersion d'ordre deux dans le circuit de fibre. Les largeurs des traces d'autocorrélation et d'impulsion sont synthétisées dans le tableau 4.1.

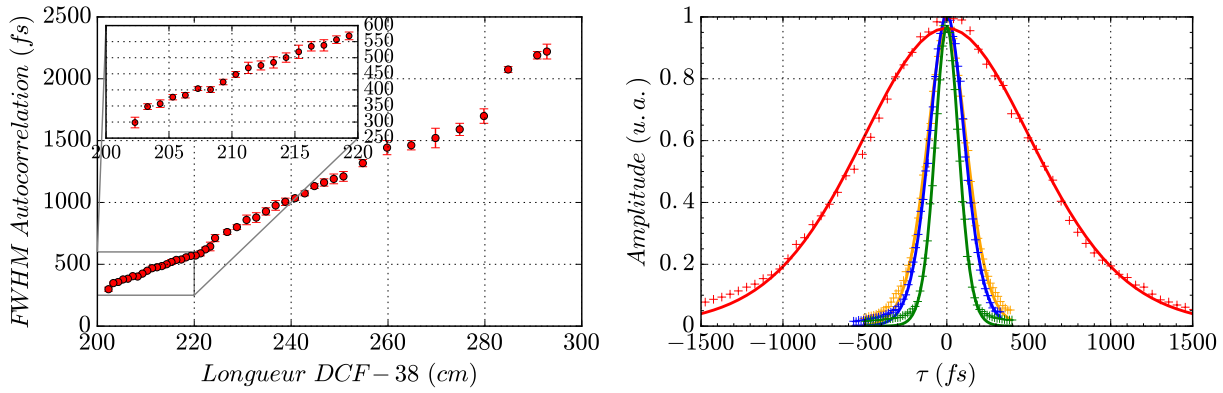


Figure 4.2 Compensation de la dispersion pour l'ensemble Ti :S+OPO - figure de gauche : variation de la largeur de l'autocorrélation en sortie de système en fonction de la longueur de fibre à compensation de dispersion - figure de droite : trace d'autocorrélation et régression gaussienne pour différentes configurations : impulsion en sortie d'OPO (bleu), en sortie de système sans fibre à compensation de dispersion (rouge), avec fibre à compensation de dispersion ($L^{exp}_{DCF-38} = 203\ cm$, orange) et compression d'impulsion ($L^{exp}_{DCF-38} = 185\ cm$, vert) - Puissance moyenne en sortie de coupleur $P_{moy} \sim 20\ mW$. Les courbes ont été moyennées sur vingt acquisitions de traces d'autocorrélation - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017)

Mesure des spectres

Les spectres ont été relevés pour les différentes configurations de circuit de fibres optiques à l'aide d'un analyseur de spectre. La figure 4.3 présente ces relevés. On remarque que pour le cas où la fibre à compensation de dispersion est implémentée (orange), le spectre retrouve quasiment sa forme originale (bleu). Lorsque de la compression d'impulsion est réalisée, le spectre s'élargit (vert) comme cela est attendu. Les largeurs spectrales sont fournies dans

le tableau 4.1. Le spectre initial en sortie de l'OPO (bleu) a été mesuré après 1 m de fibre SMF-28, ce qui impact le spectre mesuré, et explique l'écart entre les spectres mesurés avant (bleu) et après propagation dans le circuit de fibre compensé (orange).

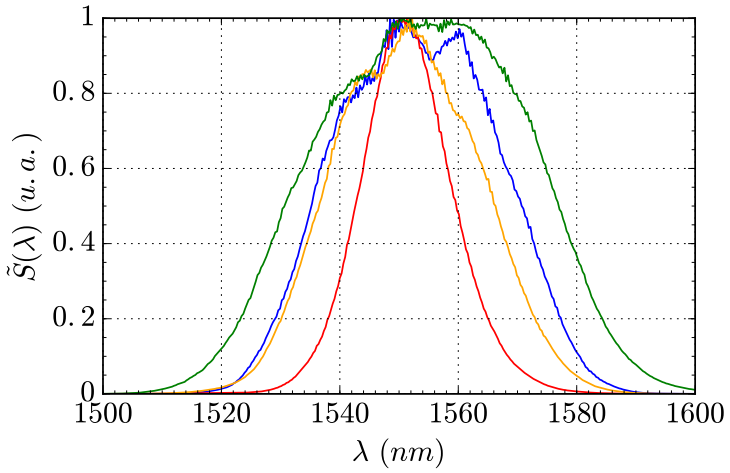


Figure 4.3 Spectres mesurés pour différentes configurations de fibres optiques pour l'ensemble Ti :S + OPO - Spectre en sortie d'OPO (bleu, mesuré après 1 m de fibre SMF-28), en sortie de système sans compensation de dispersion (rouge), avec compensation de dispersion (orange) et compression d'impulsion (vert).

Discussion

Les résultats de compensation de dispersion, dans le cas où l'ensemble Ti :S + OPO est utilisé comme source, corroborent les résultats de simulations du chapitre précédent (figure 3.9 gauche). En effet, dans le régime de puissance dans lequel nous travaillons ici ($P_{moy} \sim 30$ mW), la compensation de dispersion est pertinente afin de conserver une impulsion suffisamment courte comme cela était prédit par les simulations. Dans le cas où la compensation de dispersion n'est pas réalisée, l'impulsion est élargit d'un facteur cinq, dégradant l'efficacité de génération des signaux multiphotons du même facteur. De plus, on notera que l'impulsion originale en sortie d'OPO n'est pas trasnformée limitée (tableau 4.1, $\Delta t \Delta\omega > 4\ln(2)$) mais que la compensation de dispersion ne dégrade pas ce facteur : il n'y a pas d'ajout de *chirp* dans ce cas. Nous remarquons également que la fibre à compensation de dispersion nous permet de réaliser une compression d'impulsion, conduisant à un élargissement du spectre et à l'ajout d'un *chirp* : le produit $\Delta t \Delta\omega$ est plus que doublé par rapport à sa valeur initiale. Afin de maximiser la génération des effets non linéaires, nous utilisons cette dernière configuration ($L^{exp}_{DCF-38} = 185$ cm) lorsque le système TiS + OPO est utilisé comme source d'excitation

pour l'imagerie multiphotonique.

4.1.2 Laser fibré femtoseconde

Nous avons utilisé dans un deuxième temps un laser fibré femtoseconde (ELMO, MenloSystems) afin d'enlever le système d'injection.

Montage expérimental

Le circuit de fibres est présenté à la figure 4.4. Un oscillateur (ELMO, MenloSystems) suivi d'un amplificateur (ELMA, MenloSystems) fournissent des impulsions femtosecondes ($\Delta t \sim 90\ fs$) générées directement dans une fibre optique avec une puissance moyenne en sortie de PMF de $P_{moy} \sim 115\ mW$. La longueur de la fibre à compensation de dispersion est ajustée à la valeur expérimentale obtenue précédemment afin de compenser la dispersion du système ($L^{exp}_{DCF-38} = 203\ cm$). Il n'y a pas de système permettant d'ajuster la puissance dans ce montage.

Mesure des pertes du circuit de fibre

Il existe des pertes importantes au niveau du couplage entre la fibre à maintien de polarisation (PMF, $D_{coeur} = 13.5\ \mu m$) et la fibre à compensation de dispersion (DCF-38, $D_{coeur} = 6.3\ \mu m$) du fait de la différence importante entre les diamètres de coeur de ces deux fibres et de leurs ouvertures numériques respectives. Afin de minimiser ces pertes, nous avons réalisé une épissure entre ces deux fibres. Elle induit des pertes en puissance (uniquement pour l'épissure PMF/DCF-38) évaluées à 70% soit une atténuation de 5.1 dB. Les pertes du reste du système sont identiques à celles présentées dans la partie précédente. Dans cette

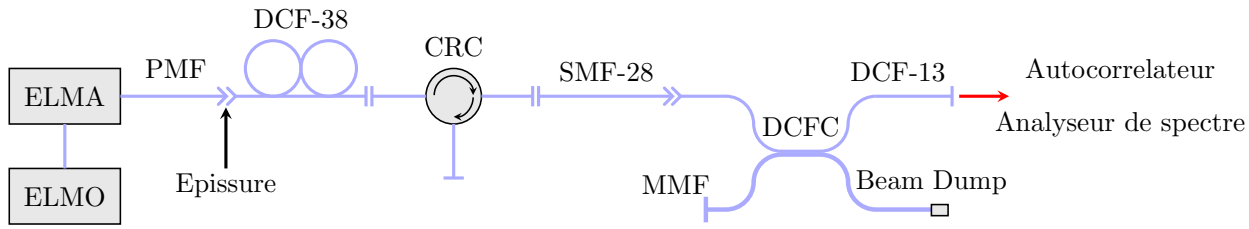


Figure 4.4 Compensation de la dispersion : schéma du montage expérimental avec source ELMO - Cette source fibrée utilise comme sortie une fibre à maintien de polarisation (PMF) à large coeur (FUD 3564, Nufern).

Tableau 4.1 Caractéristiques des impulsions pour l'ensemble Ti :S + OPO - Les largeurs sont toutes exprimées en pleine largeur à mi-hauteur (FWHM) - On suppose une impulsion de forme gaussienne pour retrouver la largeur d'impulsion à partir de l'autocorrélation.

Configuration	Largeur autocorrélation $\Delta\tau$ (fs)	Largeur impulsion Δt (fs)	Largeur spectrale $\Delta\lambda$ (nm)	Largeur spectrale $\Delta\omega$ (rad/s)	Produit $\Delta t \Delta\omega$
Sortie OPO (après 1 m de SMF-28)	254	180	35	2.74×10^{13}	4.93
Sans compensation de dispersion	1259	890	17	1.33×10^{13}	11.84
Avec compensation de dispersion	265	187	30	2.35×10^{13}	4.40
Avec compression d'impulsion	172	122	47	3.69×10^{13}	6.35

configuration, la puissance moyenne en sortie de DCF-13 est alors voisine de $P_{moy} = 22\ mW$. Nous avons également regardé ce qui se passait lorsque la fibre à compensation de dispersion était absente : le port 1 du circulateur étant alors directement connecté à la fibre PMF. Dans ce dernier cas, la puissance moyenne en sortie de système augmente alors drastiquement à une valeur de $P_{moy} = 77\ mW$.

Mesures des traces d'autocorrélations

La figure 4.5 (gauche) montre les traces d'autocorrélation relevées pour différentes configurations de fibre optique. Dans le cas où la fibre à compensation de dispersion ($L^{exp}_{DCF-38} = 203$ cm) est implantée dans le système (en orange), l'autocorrélation originale en sortie de laser (après la PMF, en bleu) n'est pas exactement retrouvée. En effet, la puissance se propageant dans la fibre à compensation de dispersion ($P_{moy} \sim 30\ mW$) est suffisamment élevée pour générer un effet d'automodulation de phase venant dégrader la compensation de dispersion. Dans le cas où la fibre à compensation de dispersion est enlevée du circuit (en rouge), la puissance se propageant dans les fibres est suffisante ($P_{moy} \sim 90\ mW$) pour générer un effet d'automodulation de phase dans la fibre SMF compensant en partie la dispersion. On conserve alors une autocorrélation très proche de celle en sortie de laser. Cet effet est rendu possible par le fait que les fibres SMF-28 et DCF-13 sont dans un régime de dispersion anomale à cette longueur d'onde. Les largeurs des traces d'autocorrélation et d'impulsion sont synthétisées dans le tableau 4.2.

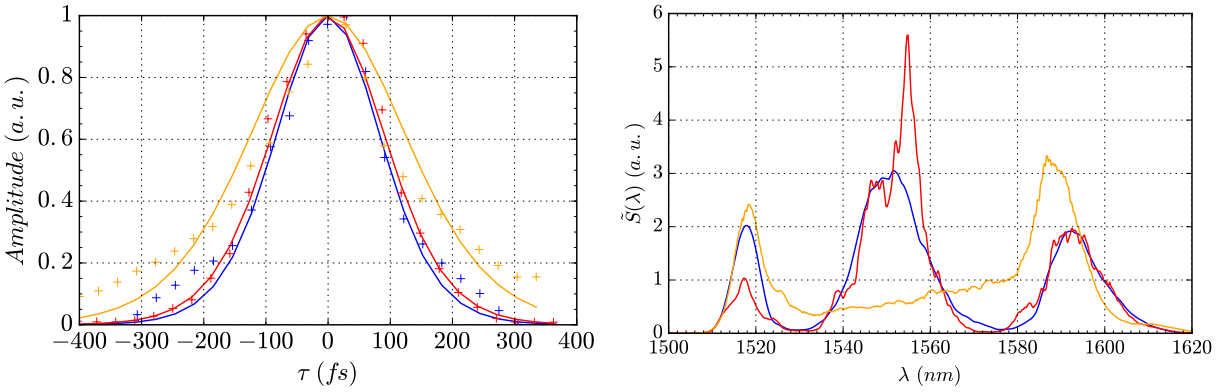


Figure 4.5 Compensation de la dispersion pour le laser fibré (ELMO) - figure de gauche : mesures d'autocorrélation et régression gaussienne pour différentes configurations : impulsion en sortie de la PMF de l'ELMO (bleu), en sortie de système sans fibre à compensation de dispersion (rouge) et avec fibre à compensation de dispersion ($L^{exp}_{DCF-38} = 203\ cm$, orange). Puissance moyenne en sortie de coupleur variable suivant les configurations (voir paragraphe sur la mesure des pertes du circuit de fibre). Les courbes ont été moyennées sur vingt acquisitions de traces d'autocorrélation - figure de droite : Spectres mesurés pour différentes configurations de fibres optiques pour le laser fibré (ELMO) : en sortie de PMF (bleu), en sortie de système sans compensation de dispersion (rouge) et avec compensation de dispersion (orange).

Mesure des spectres

Les spectres associés aux différentes configurations de fibres, dans le cas où le laser fibré est utilisé, sont présentés sur la figure 4.5. On notera que les spectres en sortie de laser (en bleu) et en sortie de système dans le cas où la compensation n'est pas implémentée (en rouge) ont le même profil. En revanche, la compensation de dispersion (en orange) induit une modification du spectre non négligeable due à l'automodulation de phase dans la fibre à compensation de dispersion. Les largeurs spectrales sont fournies dans le tableau 4.2. Elles sont mesurées aux extrémités des pics latéraux compte tenu des formes spectrales.

Discussion

Dans le cas où le laser fibre femtoseconde est utilisé, les résultats de la compensation de dispersion suggèrent une utilisation du système sans fibre à compensation de dispersion, permettant de profiter d'une propagation où la largeur d'impulsion est conservée. Ces résultats semblent en accord avec les prédictions des simulations (figure 3.9 droite). En effet, ces simulations prédisent que dans un régime à puissance modéré ($P_{moy} \sim 30\ mW$), la compensation de dispersion est dégradée par rapport à son optimum. De plus, à plus haute puissance

($P_{moy} \sim 90\ mW$), il est prédit que de ne pas compenser la dispersion est avantageux afin de profiter d'une propagation solitonique. Au vu des spectres à trois lobes, ce régime de propagation n'est pas purement solitonique en pratique mais préserve quand même la largeur d'impulsion et le profil spectral. Par la suite, lorsque le laser femtoseconde est utilisé comme source d'excitation, le circuit de fibre est branché en régime de propagation sans fibre à compensation de dispersion afin de conserver des impulsions courtes et avec une puissance disponible en sortie de coupleur plus importante.

4.2 Design et réalisation du microscope

Cette section présente les différents éléments constitutifs du microscope et leurs développements : le DCFC, la tête optique du microscope et le programme d'acquisition. La dernière partie détaille les deux montages expérimentaux réalisés au cours de ce projet : le premier incluant la source laser Ti :S + OPO et le second incluant le laser fibré femtoseconde (ELMO+ELMA) prêté par la compagnie MenloSystems.

4.2.1 Coupleur à fibre à double gaine (DCFC)

Comme cela est expliqué dans le Chapitre 2, l'utilisation d'un coupleur à fibre optique à double gaine (DCFC) dans le système permet de remplacer un miroir dichroïque (hors fibre) pour démultiplexer les signaux confocaux et multiphotons. La collection des signaux non linéaires via la gaine interne permet d'augmenter l'efficacité de collection tout en préservant la résolution axiale intrinsèque aux effets non linéaires.

Caractéristiques

Le DCFC développé dans le cadre de ce projet et réalisé par la compagnie Castor Optics possède les caractéristiques présentées dans le tableau 4.3. Ce coupleur fait sur mesure, avec une fibre multimodale de diamètre important (Ø400 μm), par rapport aux coupleurs commerciaux (Ø200 μm), permet d'atteindre une efficacité de transfert de la gaine interne vers le port multimodal de 89% dans le cas du composant utilisé ici. En effet, comme cela est présenté dans Madore et al. (2013), l'efficacité de transfert multimodal est lié au rapport des étendues optiques, G, des fibres utilisées pour fabriquer le coupleur. L'étendue optique peut se calculer comme :

$$G = \pi A_{eff} O N^2, \tag{4.1}$$

Tableau 4.2 Caractéristiques des impulsions pour le laser fibré ELMO+ELMA - Les largeurs sont toutes exprimées en pleine largeur à mi-hauteur (FWHM) - On suppose une impulsion de forme gaussienne pour retrouver la largeur d'impulsion à partir de l'autocorrélation.

Configuration	Largeur autocorrélation $\Delta\tau$ (fs)	Largeur impulsion Δt (fs)	Largeur spectrale $\Delta\lambda$ (nm)	Largeur spectrale $\Delta\omega$ (rad/s)	Produit $\Delta t \Delta\omega$
Sortie PMF	198	140	80	6.28×10^{13}	8.8
Sans compensation de dispersion	220	156	80	6.28×10^{13}	9.8
Avec compensation de dispersion	315	223	80	6.28×10^{13}	14.0

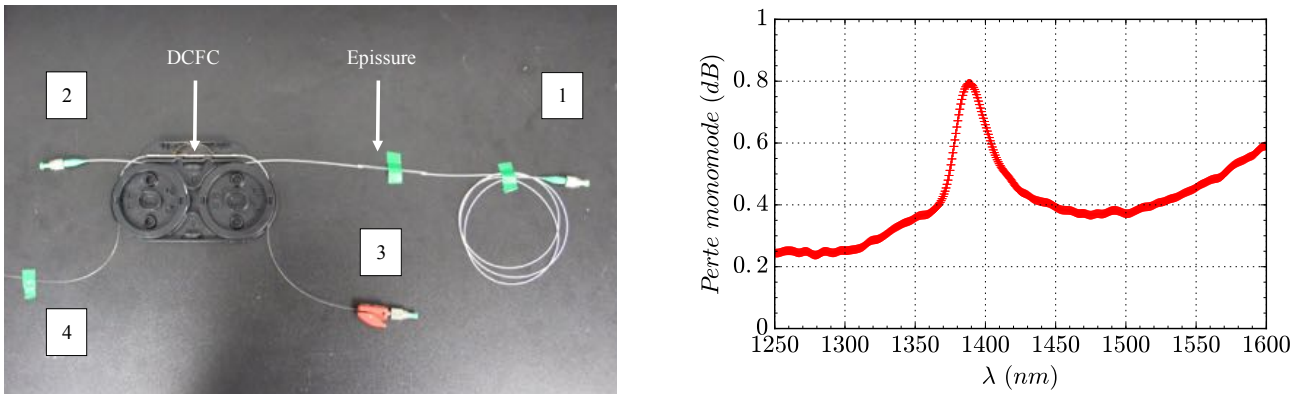


Figure 4.6 Coupleur à fibre à double gaine (DCFC) utilisé - figure de gauche : Photographie du DCFC utilisé ; Port 1 : injection SMF ; Port 2 : Sortie DCF ; Port 3 : Sortie multimodale ; Port 4 : Sortie multimodale inutilisée. - figure de droite : pertes d'injection unimodale (Port 1 à Port 2) du coupleur en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

où A_{eff} est la surface effective totale de mode et ON l'ouverture numérique des fibres utilisées. L'efficacité de transfert théorique se calcule alors comme (Madore et al., 2013) :

$$T = \frac{1}{1 + \frac{G_{DCF}}{G_{MMF}}}, \tag{4.2}$$

où G_{DCF} est l'étendue de la fibre DCF et G_{MMF} est l'étendue de la fibre multimodale utilisée. Le ratio d'étendu atteint ici en utilisant une fibre multimodale de diamètre double par rapport au précédent coupleur rapporté (Madore et al., 2013) est multiplié par quatre : $\frac{G_{MMF}}{G_{DCF}} \approx 14.4$. La figure 4.7 (gauche) montre une représentation en section des fibres utilisé dans le cas de coupleur symétrique ($\frac{G_{MMF}}{G_{DCF}} = 1$), du coupleur asymétrique rapporté par Madore et al. (2013) ($\frac{G_{MMF}}{G_{DCF}} = 3.6$) et du nouveau coupleur DCFC développé dans le cadre de ce projet ($\frac{G_{MMF}}{G_{DCF}} = 14.4$). La figure 4.7 (droite) montre quant à elle la courbe théorique de transmission (ligne rouge) en fonction du ratio d'étendu et les points expérimentaux correspondant aux DCFC rapportés dans Madore et al. (2013) (cercle bleu) et celui développé dans le cadre de ce projet de maitrise (carré vert). Un excellent accord est obtenu entre les point expérimentaux et la limite théorique de transmission. Le test de mesure du taux de transfert, bien que réalisé à une seule longueur d'onde (635 nm), est également valable au voisinage de 800 nm. En effet, la réponse spectrale du coupleur est relativement plate en longueur d'onde (Madore et al., 2013). Les pertes de transfert unimodal sont données sur la figure 4.6 (droite). Ce coupleur a été choisi pour son efficacité de transfert importante et pour ses faibles pertes unimodales à notre longueur d'excitation (1550 nm).

Effets sur des impulsions femtosecondes

Afin d'étudier le comportement du DCFC lorsque des impulsions femtosecondes se propagent à travers sa partie unimodale, des mesures de traces d'autocorrélation et de spectres ont été faites en sortie de circulateur et en sortie de DCFC pour les deux circuits de fibres détaillés précédemment. Dans le cas où l'ensemble Ti :S + OPO est utilisé et la compensation de dispersion implémentée (figure 4.8 gauche), on observe que le coupleur DCFC se comporte comme une fibre unimodale SMF-28 en recomprimant l'impulsion initialement précompensée. Le spectre est conservé et ne traduit aucun effet d'automodulation de phase apparaissant dans le DCFC aux puissances moyennes en jeu ici ($P_{moy} \sim 10\ mW$). Dans le cas où le laser fibré est utilisé et la compensation de dispersion non implémentée, l'impulsion entrante dans le DCFC et celle sortante possèdent des traces d'autocorrélation très proches (figure 4.8 droite). En revanche, les spectres traduisent la présence d'automodulation de phase due aux puissances plus importantes se propageant dans les fibres ($P_{moy} \sim 90\ mW$). En conclusion,

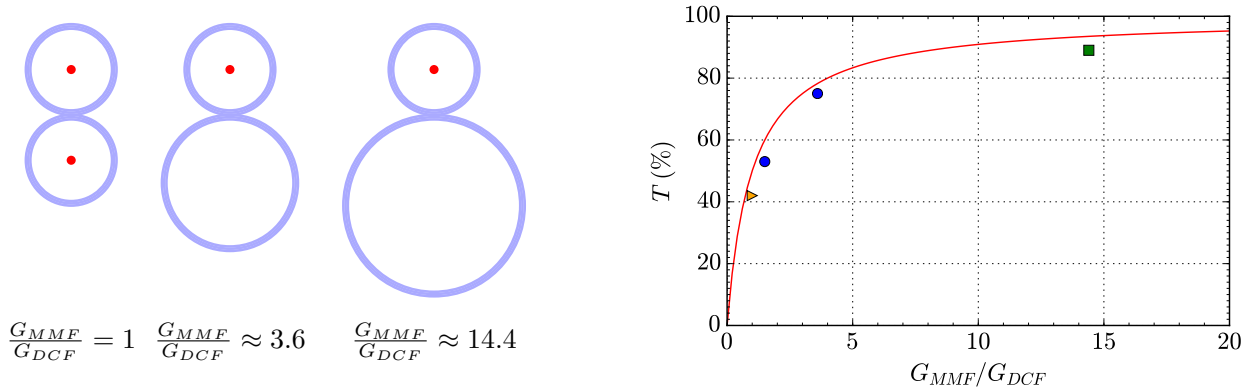


Figure 4.7 Étendue optique et transmission multimodale du DCFC - figure de gauche : schéma en section de différentes fibres avec des rapports d'étendu différents - figure de droite : transmission multimodale théorique en fonction du rapport d'étendue (courbe rouge) et points expérimentaux des DCFC asymétrique réalisés par Madore et al. (2013)(cercles bleus) et celui développé dans le cadre de ce projet (carré vert). Un DCFC symétrique (triangle orange) réalisé par Lemire-Renaud et al. (2010) est également montré et proche de la limite théorique de 50% de trasnmission. Adapté de (Madore et al., 2013).

Tableau 4.3 Caractéristiques du coupleur DCFC utilisé. Source : Castor Optics

Caractéristiques	Valeur
Plage de longueur d'onde	[1250 nm ; 1600 nm]
Diamètres fibre DCF (coeur/gaine interne/gaine externe)	Ø9/105/125 μm
Ouverture numérique fibre DCF (coeur/gaine interne)	0.12/0.2
Diamètres fibre multimodale (coeur/gaine externe)	Ø400/440 μm
Ouverture numérique fibre mutimodale (coeur)	0.22
Pertes d'insertion unimodal (à 1550 nm)	0.45 dB
Transfert gaine interne/multimodale (à 635 nm)	89 %

la transmission unimodale du DCFC ne semble a priori ne pas se comporter différemment d'une simple fibre optique unimodale. Une étude plus approfondie avec une caractérisation plus fine des impulsions (autocorrélation interférométrique) pourrait permettre de confirmer ces observations et de regarder en détail ce qui se produit au niveau de la partie étirée et fusionnée.

4.2.2 Tête optique du microscope

Le design et la réalisation de la tête optique du microscope sont un point essentiel. En effet, elle doit assurer les fonctions suivantes :

- relayer le faisceau d'excitation de la sortie du DCFC jusqu'à l'échantillon ;
- balayer le faisceau d'excitation afin de construire une image point par point ;
- collecter les signaux confocaux et non linéaires efficacement et les coupler dans la fibre DCF.

Cette section présente les choix réalisés dans l'élaboration de cette tête optique permettant de remplir les fonctions énumérées ci-dessus.

Relais et focalisation du faisceau d'excitation

Le faisceau en sortie de DCF doit dans un premier temps être collimé avant d'être focalisé. Notre choix s'est porté sur un couple de lentilles asphériques qui permettent de conserver une petite taille, de minimiser les aberrations sphériques et qui ont un faible coût. Cinq couples de lentilles asphériques ont été testés à l'aide de simulations Zemax (OpticStudio). La figure 4.9 montre le système optique simulé. Un point source d'ouverture numérique correspondant à celle du coeur de la fibre DCF est utilisé afin de simuler l'illumination par la fibre optique. Le couple retenu est l'ensemble de lentilles asphériques C-220 ($f = 11.00$ mm, $ON = 0.25$, Thorlabs) et C-660 ($f = 2.97$ mm, $ON = 0.60$, Thorlabs). Idéalement, la lentille de focalisation doit avoir l'ouverture numérique la plus grande possible comme cela a été discuté dans le Chapitre 2. Leurs revêtements antireflet ont été choisis pour être efficient dans la région [650 nm; 1050 nm] (B) afin de maximiser l'efficacité de transmission des effets non-linéaires collectés. De par la largeur spectrale des impulsions, nous avons vérifié que ce couple de lentilles permettait bien d'avoir un point de focalisation limité par la diffraction sur la plage de longueur d'onde [1500 nm; 1600 nm]. La limite de diffraction est bien atteinte et est donnée par le rayon du disque d'Airy qui est évalué à 1.5 μm pour cet ensemble de lentilles. Il existe cependant un déplacement du point focal avec la longueur d'onde évaluée à 5.6 μm entre 1500 nm et 1600 nm (figure 4.9 droite). Il apparaît également un déplacement du point focal d'environs 60 μm entre les longueurs d'onde d'excitation (au voisinage de 1550

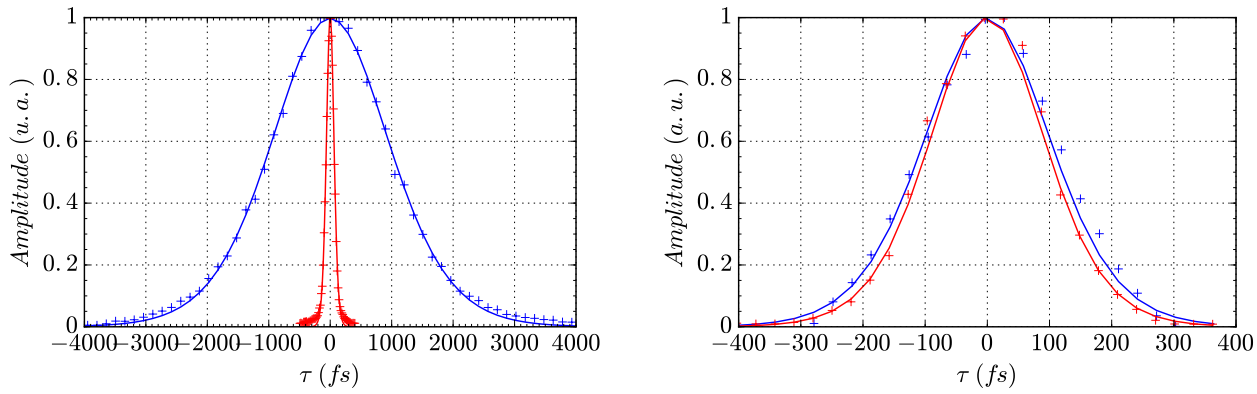


Figure 4.8 DCFC et propagation d'impulsion femtoseconde - Impulsion en entrée de DCFC (Port 1, en bleu) et en sortie de DCF (Port 2, en rouge) - figure de gauche : traces d'autocorrélation d'impulsion provenant de l'ensemble Ti :S + OPO avec compensation de dispersion (DCF-38) et circulateur en amont (figure 4.1) - figure de droite : traces d'autocorrélation d'impulsion provenant du laser fibré (ELMO) sans fibre à compensation de dispersion en amont (DCF-38) - Les courbes ont été moyennées sur vingt acquisitions de traces d'autocorrélation.

nm) et celles correspondant aux signaux non linéaires (au voisinage de 775 nm).

Système de balayage du faisceau

Pour remplir la fonction de balayage du faisceau, deux miroirs galvanométriques (G) ont été utilisés à la suite de la lentille asphérique de collimation (AL1). Couplée à deux doublets achromatiques (AcL) (AC-254-035-B, Thorlabs) assurant un balayage télécentrique avec la lentille objectif (AL2), la rotation des miroirs entraîne un balayage latéral dans les deux directions du faisceau sur l'échantillon. Ce choix est motivé par leur précision en position angulaire, leur vitesse de balayage et leur facilité d'utilisation. En effet, ils sont simplement contrôlés par deux rampes de tensions sortant d'une carte d'acquisition. L'acquisition des signaux peut ainsi être aisément synchronisée sur leur position afin de reconstruire une image point par point. En contrepartie, ils ne peuvent être miniaturisés à l'extrême pour être utilisés simplement dans le cadre d'une sonde. La figure 4.11 montre le schéma de principe de la tête optique ainsi qu'une photographie du montage réalisé. Le système de balayage couplé au système télécentrique permet d'obtenir un champ de vue de $350\mu m \times 350\mu m$.

Collection des signaux confocaux et non linéaires

La simulation de l'efficacité de collection des signaux non linéaires a été faite en utilisant ZEMAX en mode non séquentiel. Afin d'estimer théoriquement l'efficacité de collection, un

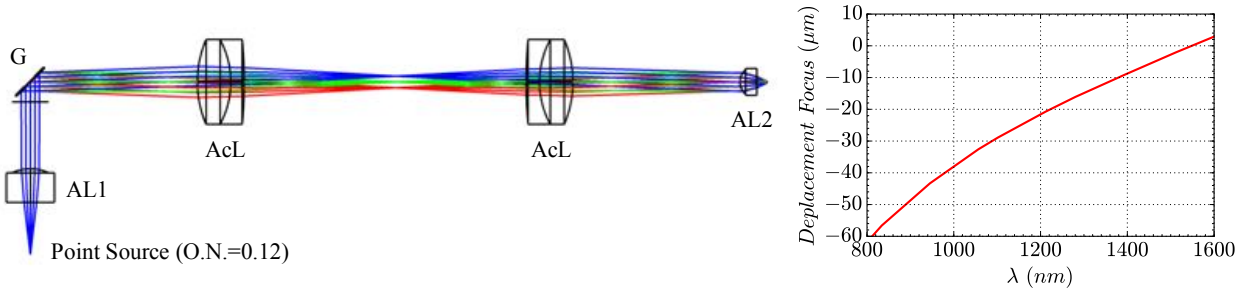


Figure 4.9 Design Zemax (OpticStudio) de la tête optique - figure de gauche : tracé Zemax du montage pour différents angles de balayage des galvanomètres ($-1\,^{\circ}$ en rouge, $0\,^{\circ}$ en vert et $1\,^{\circ}$ en bleu) - figure de droite : déplacement du point focal avec la longueur d'onde - Légende : miroirs galvanométriques (G), lentille asphérique (AL), doublet achromatique (AcL), fibre à double gaine (DCF).

point source émettant à 775 nm dans toutes les directions est placé au point focal de la lentille objectif. Seuls les rayons se propageant à travers le système et entrant dans un disque de la taille de la gaine interne de la DCF avec un angle inférieur à son angle d'acceptance sont conservés. Le rapport de la puissance collecté sur la puissance émise fournit une estimation de l'efficacité de collection. Cette méthode montre que l'efficacité de collection est fonction à la fois de la position du point source par rapport à l'objectif du fait du déplacement du point focal avec la longueur d'onde mais également de la position de la DCF par rapport à la lentille de collimation. En faisant varier ces distances, il est possible d'optimiser l'efficacité de collection du signal mais cela conduit également à dégrader la résolution du système. Un arbitrage est trouvé entre ces deux points et permet d'avoir une taille de tache focale à 1550 nm de 1.8 μm et une efficacité de collection avoisinant les 5 %. Cette efficacité de collection est faible, mais l'ouverture numérique de la lentille objectif utilisée ne permet de collecter que 10% de la lumière émise par le point source. L'utilisation de la gaine interne comme moyen de collection permet ainsi de coupler jusqu'à 50 % des signaux non linéaires entrant dans le système. Cette efficacité est purement théorique et ne tient pas compte des effets de diffusion dans les tissus susceptibles de renvoyer les photons dans le cône d'acceptance de la lentille objectif, effet jouant un rôle primordial dans le cas de l'observation de GSH.

4.2.3 Acquisition et contrôle

Afin d'obtenir une image point par point, le balayage et l'acquisition des signaux en provenance des détecteurs doivent être synchronisés. Un code Labview (National Instrument) a été adapté afin de réaliser cette synchronisation, d'afficher les images et pour extraire les données. Nous utilisons une carte d'acquisition (PCI-6115,National Instrument) avec deux sorties

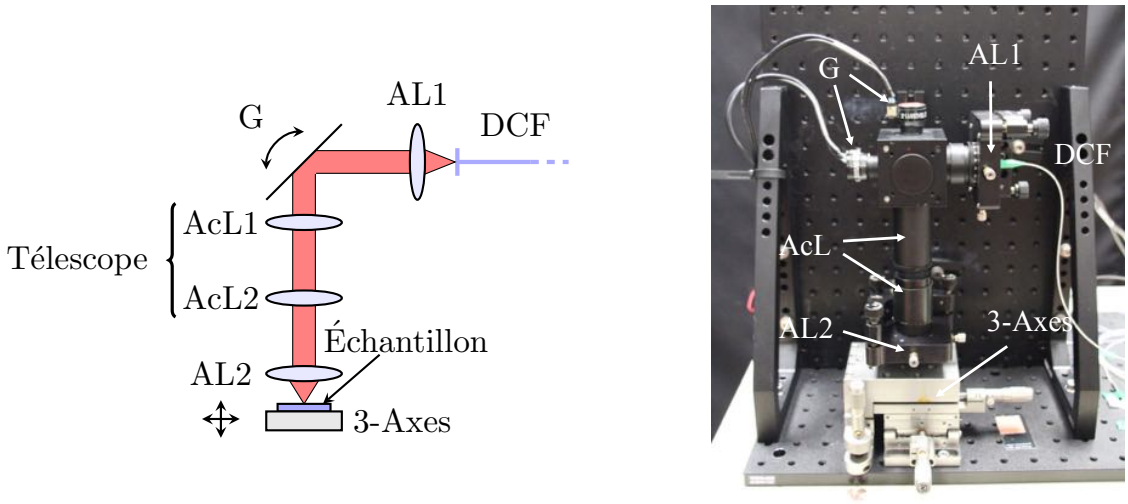


Figure 4.10 Tête optique du microscope - figure de gauche : schéma de principe de la tête optique - figure de droite : photographie de la tête optique réalisée - Légende : miroirs galvanométriques (G), lentille asphérique (AL), doublet achromatique (AcL), fibre à double gaine (DCF).

analogiques, contrôlant les deux miroirs galvanométriques, et deux entrées analogiques afin d'acquérir les signaux en provenance des deux détecteurs (photodiode et PMT). Le signal en provenance de la photodiode est directement une tension et peut être branchée directement sur la carte d'acquisition. De plus, le circuit de gain intégré à la photodiode permet d'ajuster la gamme dynamique afin qu'elle corresponde à celle de la carte d'acquisition. Le signal en sortie de PMT correspond lui à un courant, et doit donc être converti en tension à l'aide d'un circuit transimpédance. La faiblesse du signal non linéaire collecté nous oblige également à rajouter un circuit électronique gain/intégrateur en amont de la carte d'acquisition. La vitesse d'imagerie est limitée par ce temps d'intégration par pixel afin d'obtenir une image où le ratio signal sur bruit (RSB est suffisant pour observer des structures.

4.2.4 Montages expérimentaux

Afin d'acquérir des images d'échantillons, la tête optique a été intégrée à la suite des montages fibrés développés dans la première partie de ce chapitre. Le système d'acquisition permet l'obtention des images ainsi que le contrôle des miroirs galvanométriques. Nous avons dans un premier temps utilisé l'ensemble Ti :S + OPO pour sa disponibilité. La figure 4.12 montre le schéma et une photographie du premier montage expérimental réalisé. Comme cela a été discuté dans la première partie de chapitre, une fibre à compensation de dispersion (DCF-38, Thorlabs) est implémentée dans le système. L'excitation est relayée jusqu'à la lentille objective (AL3) via le circuit de fibre et la tête optique détaillés précédemment. Une plate-

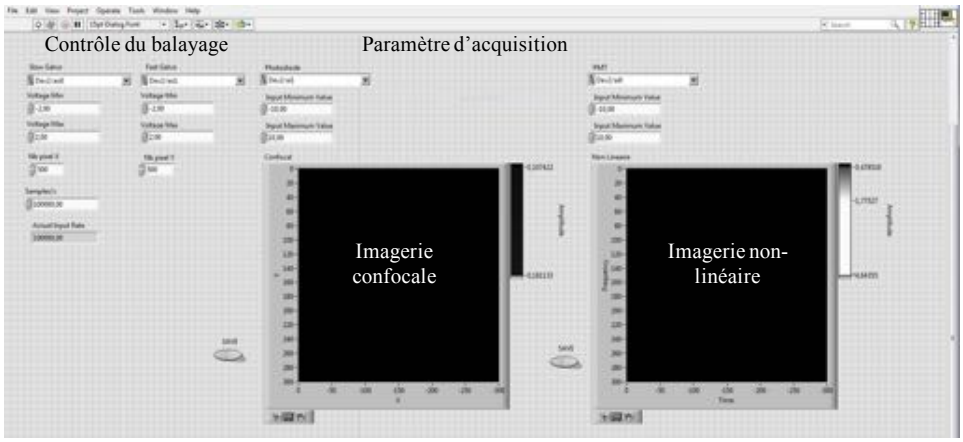


Figure 4.11 Interface Labview (National Instrument) pour l'acquisition - Capture d'écran de l'interface Labview développée. Cette interface permet de contrôler la vitesse de balayage des galvanomètres, l'amplitude du mouvement des galvanomètres (champs de vue), le nombre de pixels acquis et la gamme dynamique de l'acquisition.

forme 3-axes est utilisé afin d'ajuster la position de l'échantillon. Les signaux non linéaires (GSH et 2PEF) sont alors collectés dans la gaine interne de la DCF et couplés dans la partie multimodale (MMF) du coupleur. Ils sont ensuite collimés à l'aide d'une lentille asphérique (AL4, C100TMD, Thorlabs), filtrés afin de rejeter les réflexions du laser (F_L, correspondant à deux filtres Precision Shortpass 1150 nm $OD > 4$, Edmund Optics) et conserver uniquement le signal d'intérêt (F_S, 2PEF : Precision Longpass 800nm, GSH : Bandpass Filter 775 $nm \times 25$ nm ; Edmund Optics). Nous ne possédons qu'un seul PMT sensible à 800 nm (H10721-01, Hamamatsu) conduisant à une acquisition séquentielle des signaux 2-PEF et de GSH en changeant les filtres. Un signal confocal se propageant dans la partie unimodale de la DCF est extrait en amont à l'aide du circulateur (CRC, 6015-3-APC, Thorlabs) combiné à une photodiode à gain variable (PD, PDA10CS, Thorlabs). L'ensemble des connecteurs à fibre utilisés sont à angle (FC/APC) afin de minimiser les réflexions du laser susceptible de polluer le signal confocal. Un couple lame demi-onde ($\lambda/2$) et un cube séparateur de polarisation (PBS) permet de contrôler la puissance du laser en amont de l'injection. Ce montage permet d'avoir une puissance moyenne disponible à l'échantillon de $P_{moy} \sim 10$ mW. Ce montage a été utilisé dans un premier temps afin de réaliser une preuve de principe et valider notre approche. Ainsi la GSH a été démontrée en utilisant un cristal (figure 3.11) et la 2PEF en utilisant des billes fluorescentes (Ø500 nm, Fluoresbrite Carboxy 763 EX, PolyScience, figure 4.15 gauche). De plus, ce montage a permis d'obtenir les premières images permettant de caractériser expérimentalement la résolution du système. En revanche, le niveau de signal non linéaire est rapidement limitant sur la vitesse d'imagerie (750 pixels/seconde) : le signal

doit être intégré suffisamment longtemps pour obtenir un SBR convenable. Le caractère hors fibre du faisceau entrant, la taille du laser occupant la moitié de la table optique et le faible niveau de puissance en sortie conduisant à peu d'effets non linéaires observables sur les tissus nous ont conduit à un deuxième système utilisant un laser fibré prêté par la compagnie MenloSystems (ELMO) (figure 4.13 bas). Comme cela a été vu dans le début de ce chapitre, nous n'utilisons plus de fibre à compensation de dispersion dans ce cas-ci. La sortie fibrée du laser (PMF) est directement connectée sur le Port 1 du circulateur. Le reste du système est équivalent au premier montage. La figure 4.13 (haut) montre une photographie du système sur chariot. Le système est nettement plus que compact que le premier système et aucun faisceau n'est hors fibre, hormis dans la tête optique qui est isolée. Ce système permet de disposer de davantage de puissance au niveau de l'échantillon ($P_{moy} \sim 40\ mW$) avec des impulsions plus courtes, augmentant le niveau de signal non linéaire et ainsi la vitesse d'acquisition à 13000 pixels/seconde. La caractérisation de ce système final ainsi que les images obtenues sont présentées dans la section suivante.

4.3 Imagerie confocale et multiphotonique

Cette section présente dans un premier temps les résultats de caractérisations en résolution du système développé. Dans un second temps, les images des échantillons observés, biologiques ou non, à travers les modalités confocale, GSH et 2PEF sont montrées et discutées. Enfin, une discussion est faite sur les résultats présentés dans cette partie et sur les limitations du système actuel.

4.3.1 Caractérisation

Le système a été caractérisé en résolutions latérales et axiales pour les deux modalités : imagerie confocale et fluorescence par absorption à deux photons (2PEF). Cette section présente les mesures expérimentales permettant cette caractérisation. L'imagerie de seconde harmonique (GSH) n'a pas pu être caractérisée mais ses résolutions sont attendues pour être proches de celle de l'imagerie 2PEF (Rivard, 2016).L'ensemble des résultats sont présentés au tableau 4.4

Imagerie confocale

L'imagerie confocale a été caractérisée en résolution à l'aide d'une cible de résolution (USAF 1951). Une image confocale des groupes 6 et 7 d'une telle cible est montrée sur la figure 4.14 (gauche). La mesure de la résolution latérale est faite en utilisant le critère 90%-10% sur la

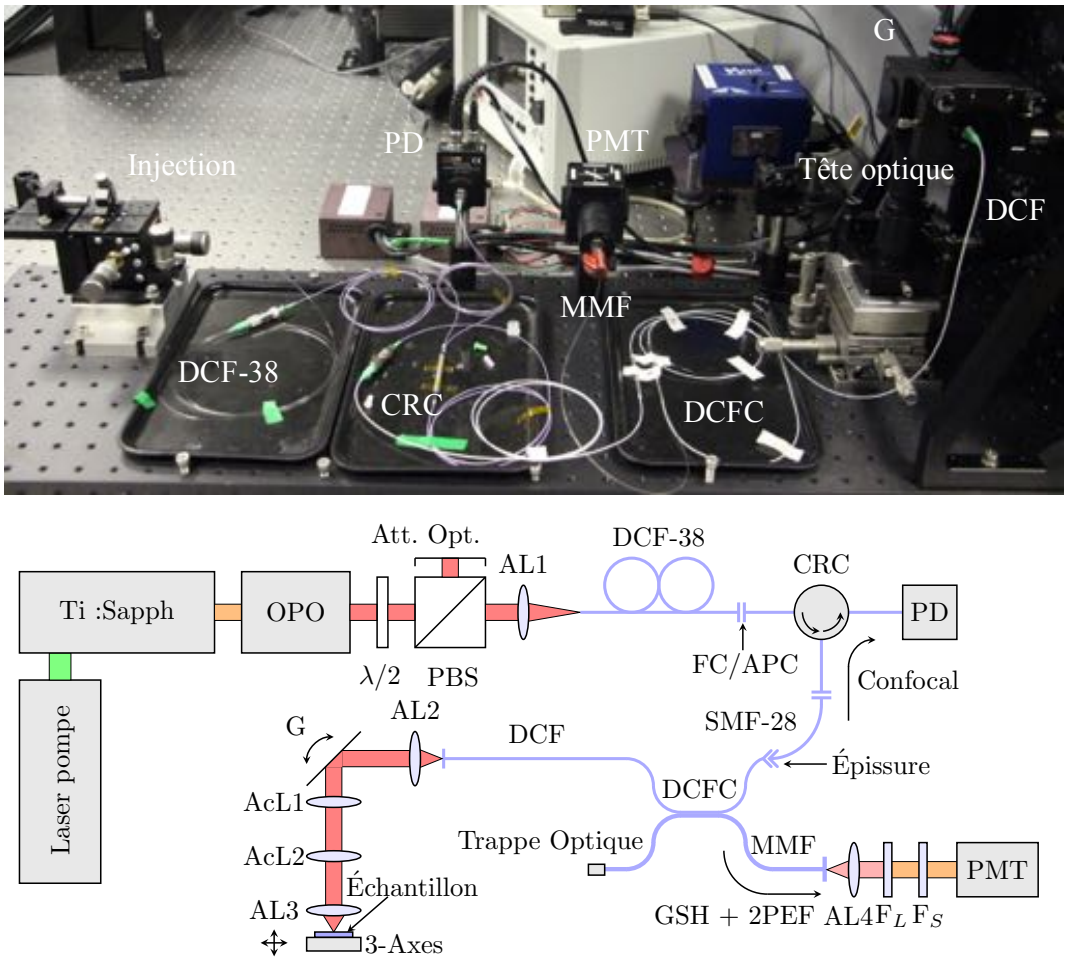


Figure 4.12 Montage d'imagerie avec source Ti :S et OPO - figure du haut : photographie du système d'imagerie ; le faisceau laser d'excitation arrive à gauche du module d'injection et se propage dans la fibre jusqu'à la tête optique du microscope - figure du bas : schéma détaillé du montage - Légende : atténuateur optique (Att. Opt.), cube séparateur de polarisation (PBS), lentille asphérique (AL), circulateur (CRC), miroirs galvanométriques (G), lentille achromatique (AcL), filtre (F), photodiode (PD) et tube photomultiplicateur (PMT) - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017).

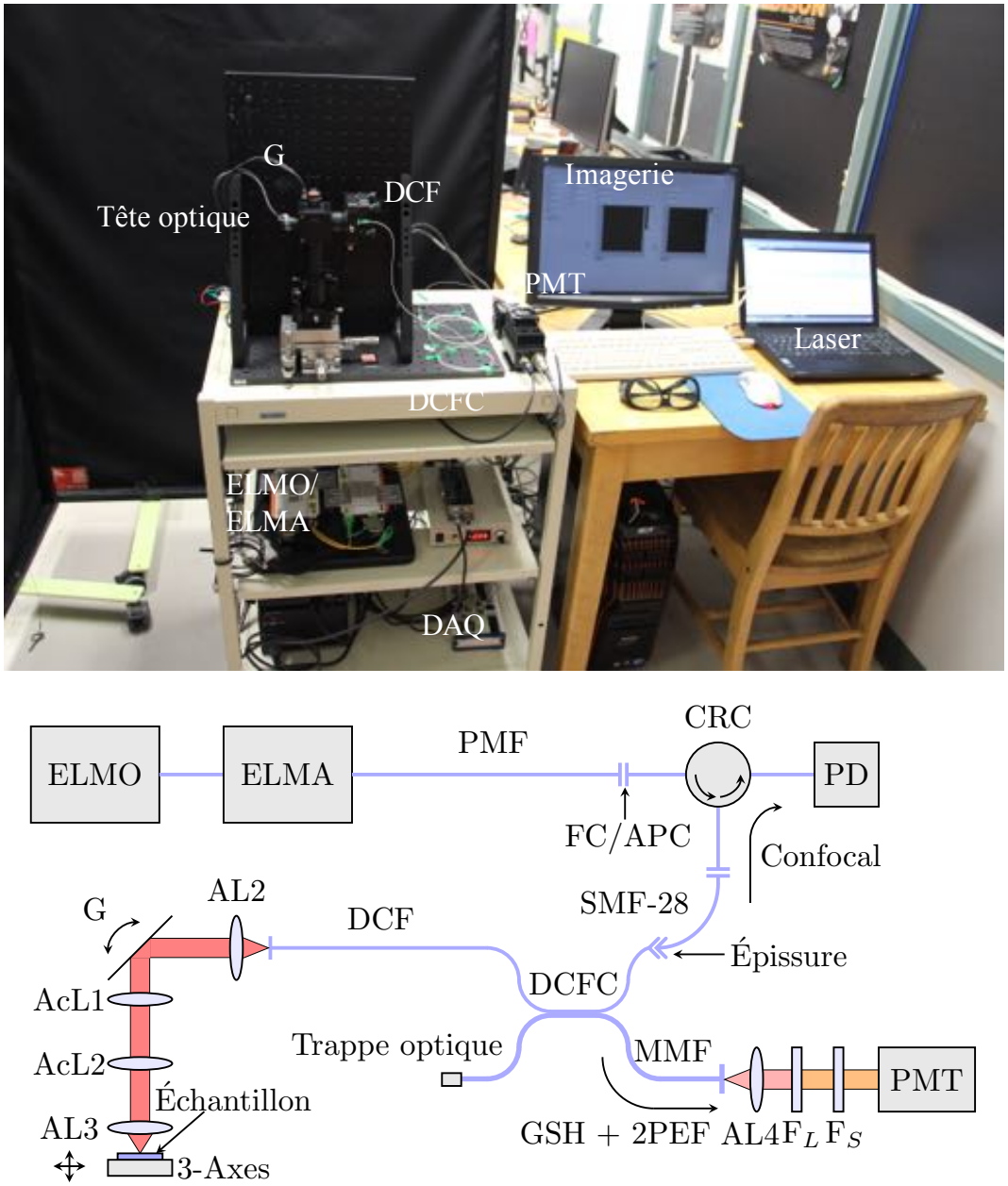


Figure 4.13 Montage d'imagerie avec source fibrée - figure du haut : photographie du système d'imagerie sur chariot avec deux ordinateurs contrôlant respectivement l'imagerie et le laser - figure du bas : schéma détaillé du montage - Légende : fibre à maintien de polarisation (PMF), lentille asphérique (AL), circulateur (CRC), miroirs galvanométriques (G), lentille achromatique (AcL), filtre (F), photodiode (PD) et tube photomultiplicateur (PMT).

fonction d'étalement d'un bord pour l'élément carré du groupe 6 (figure 4.14 centre). Pour les deux axes, cette résolution est voisine de 2 μm. La résolution axiale est obtenue en prenant la pleine largeur à mi-hauteur de la fonction de réponse d'un plan en fonction de la position longitudinal (figure 4.14 droite). La valeur expérimentale obtenue est de 11.3 μm pour une valeur théorique de 5.0 μm. Cet écart provient du fait que la lentille objective n'opère pas à ouverture numérique maximale.

Imagerie multiphotonique

La modalité d'imagerie 2PEF a été caractérisée en résolution en utilisant des microbilles fluorescentes (Ø500 nm, Fluoresbrite Carboxy 763 EX, PolyScience) fixées dans une solution de gélatine. L'image de ces microbilles (figure 4.15 gauche), du fait de leur faible dimension au vu de la résolution théorique prévue, nous donne accès à la fonction d'étalement du point en intensité (PSF). La résolution latérale est alors donnée par la pleine largeur à mi-hauteur de cette fonction (figure 4.15 centre) et est mesurée à 2.3 μm dans les deux directions. Du fait du photoblanchiment rapide des billes (quelques secondes), comparativement à la vitesse d'acquisition des images (50 $\mu s/pixel$), il est compliqué de mesurer une résolution axiale sur une seule bille. Nous avons alors mesuré la variation d'intensité avec la profondeur sur un agrégat de billes (figure 4.15 droite). Une borne supérieure sur la résolution axiale est obtenue en prenant la FWHM de cette fonction. On obtient ainsi une limite de 14.2 μm.

4.3.2 Imagerie d'échantillons

Cette section détaille en trois volets les images obtenues pour chacune des modalités d'imagerie que permet le système : confocale, GSH et 2PEF.

Imagerie confocale

Des exemples d'images confocales d'échantillons biologiques, acquises avec le système fibré décrit précédemment, sont montrés sur la figure 4.16. Celle de gauche montre la partie musculaire d'une corde vocale de porc ; celle du centre est l'image d'un échantillon d'aorte de souris et celle de droite montre des fibroblastes et leurs noyaux. L'ensemble des échantillons montrés sont des échantillons fins : ils ont été préalablement tranchés finement au microtome ($\sim$ 20 μm d'épaisseur). Pour des échantillons plus épais (tendon de poulet), un signal confocal est détectable jusqu'à 100 μm de profondeur, mais l'image est grandement dégradée à cause d'une réduction du SBR et de la résolution axiale relativement importante, conduisant à superposer différentes structures sur l'image acquise. La réduction du SBR provient de la di-

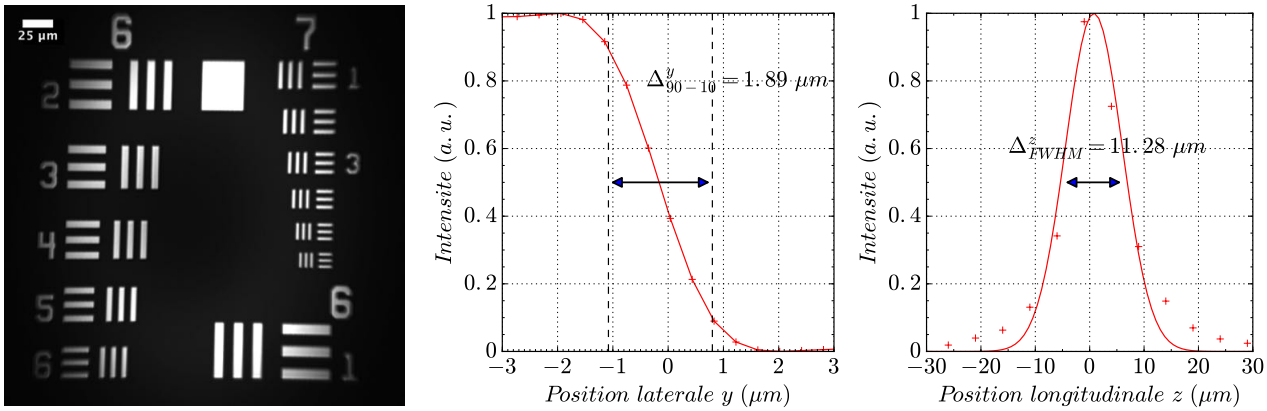


Figure 4.14 Caractérisation en résolution de l'imagerie confocale - figure de gauche : Groupe 6 et 7 d'une cible de résolution USAF 1951. Champs de vue de 325 × 325 μm - figure du centre : fonction d'étalement d'un bord permettant de caractériser la résolution latérale en utilisant un critère 90%-10% - figure de droite : fonction de réponse d'un plan en fonction de la profondeur permettant de caractériser la résolution axiale (sectionnement optique) - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017).

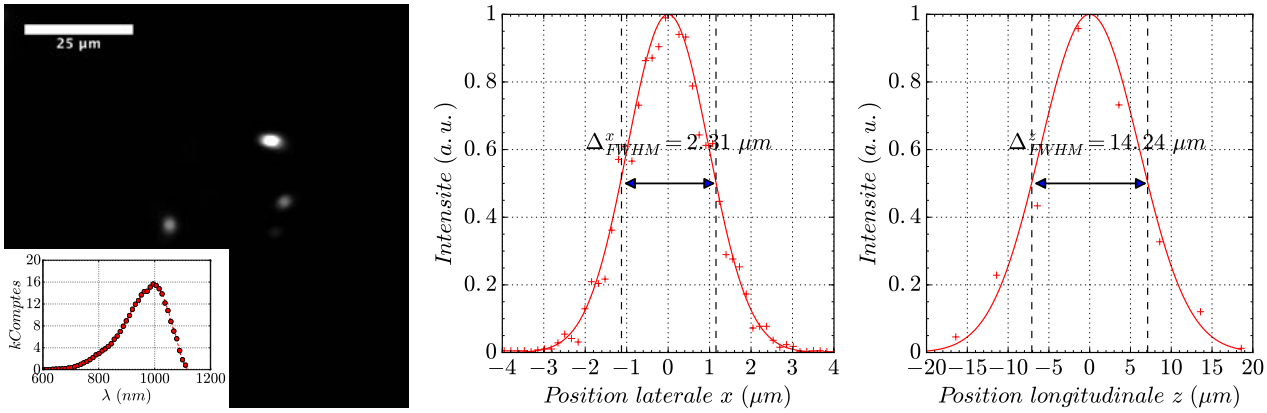


Figure 4.15 Caractérisation en résolution de l'imagerie 2PEF - figure de gauche : imagerie 2PEF de trois microbilles fluorescentes (Ø500 nm Fluoresbrite Carboxy 763 EX, Poly-Science). En insert, le spectre d'émission d'une bille relevé à travers la branche multimodale du DCFC - figure du centre : fonction d'étalement du point suivant l'axe x d'une bille et permettant de caractériser la résolution latérale - figure de droite : variation de l'intensité du signal en fonction de la profondeur sur un agrégat de billes permettant de caractériser la résolution axiale - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017).

minution du signal en profondeur qui est davantage sujet à la diffusion. De plus les réflexions de l'excitation aux différentes interfaces (connecteurs, port du DCFC non utilisé, lentille de la tête optique) entraînent un bruit de fond. Le signal confocal est nettement plus important que les signaux nonlinéaires observés et n'est pas limitant sur la vitesse d'acquisition (images acquise à 125000 pixels/seconde). L'imagerie confocale permet ainsi de positionner rapidement l'échantillon avant d'observer des signaux non-linéaires dans les échantillons.

Imagerie GSH

Les images GSH de quelques échantillons sont montrées sur la figure 4.17. Le premier échantillon non cristallin imagé a été de l'amidon distribué en poudre sur une lame de microscope (figure 4.17 gauche). Nous observons bien une réponse des GSH des grains placés dans le plan focal de la lentille objectif. Nous avons pu imager ces grains sur une épaisseur de 100 μm. La seconde image (figure 4.17 centre) est un échantillon d'aorte de souris préalablement tranché à 20 μm et fixé su une lame de microscope. L'origine du signal de GSH provient de la présence de collagène dans les vaisseaux sanguins. Le signal est en revanche extrêmement faible dans le cas de cet échantillon fin : il n'y a que peu de diffusion permettant une rétrodiffusion des signaux de GSH émis préférentiellement vers l'avant. Le dernier échantillon (figure 4.17 droite) est un échantillon de tendon de poulet (échantillon épais) où l'imagerie GSH révèle une structure fibrillaire de l'échantillon observé. Nous avons également tenté d'observer le collagène présent dans la lamina propria des cordes vocales à l'aide de l'imagerie GSH mais sans succès. Les échantillons fins disponibles de cordes vocales ($\sim$ 20 μm) ne permettent pas au signal GSH d'être suffisamment rétrodiffusé vers l'objectif. Comme mentionné dans la section d'acquisition, ces signaux doivent être amplifiés et intégrés longuement afin d'obtenir des images avec un SBR suffisant : la vitesse d'imagerie est ici limitée à 13000 pixels/seconde.

Imagerie 2PEF

Les images 2PEF ont été réalisées en utilisant des marqueurs externes (fluorescence exogène). Les fluorophores utilisés sont le Cardiogreen (SigmaAldrich), un dérivé de l'ICG, et le 3,3'-diethylthiatricarbocyanine (DTTCI, SigmaAldrich). Leurs spectres d'émission sont montrés sur la figure 3.10. Aucune fluorescence endogène n'a pus être observée sur les échantillons imagés. Le premier échantillon observé a été un canal micro fluidique (figure 4.18 gauche) d'épaisseur 50 μm remplie de Cardiogreen (figure 4.18 centre). On observe ainsi le fluorophore à l'intérieur du canal dont les bords sont obtenus à l'imagerie confocale. Cette approche nous a permis de valider la pertinence de ce fluorophore. La même manipulation a été faite pour le DTTCI. Nous avons ensuite immergé un échantillon de céleri pendant une heure dans du

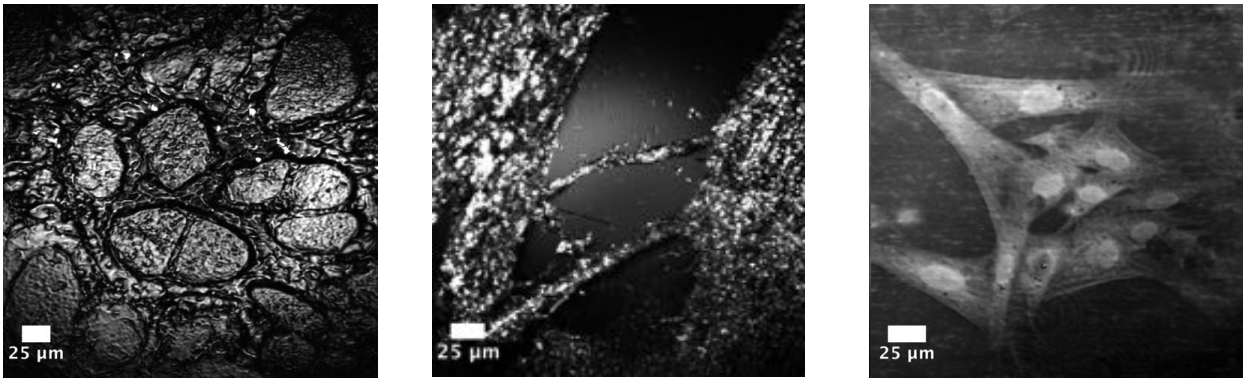


Figure 4.16 Imagerie confocale d'échantillons - figure de gauche : échantillon musculaire d'une corde vocale de porc tranché à 20 μm d'épaisseur et fixé sur une lame de microscope (1000×1000 pixels), reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017) - figure du centre : échantillon d'aorte de souris tranchée à 20 μm d'épaisseur et fixé sur une lame de microscope (500×500 pixels) - figure de droite : fibroblastes fixés sur une lame de microscope commerciale (FluoCells #6, ThermoFisher), les noyaux cellulaires apparaissent en blanc car ils sont plus denses que le reste de la structure cellulaire (1000×1000 pixels).

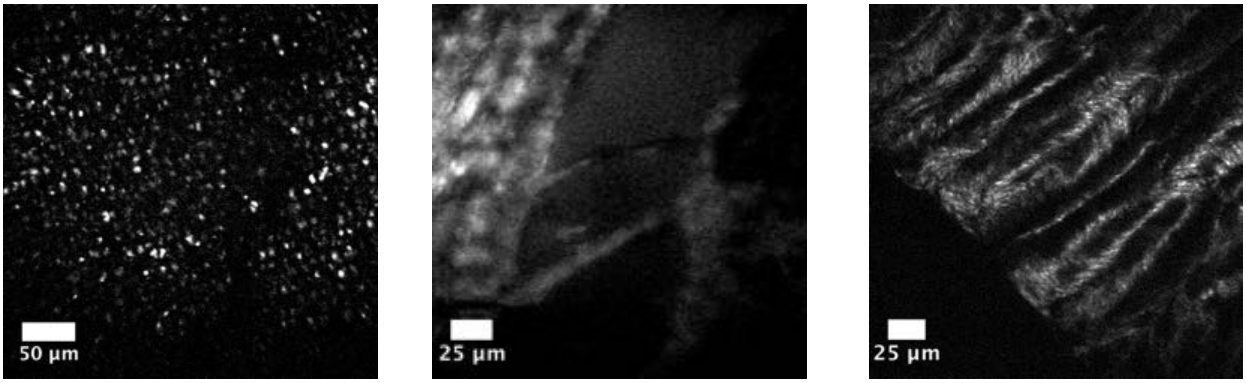


Figure 4.17 Imagerie GSH d'échantillons - figure de gauche : poudre d'amidon placé sur une lame de microscope (500×500 pixels) - figure du centre : échantillon d'aorte de souris tranché à 20 μm d'épaisseur et fixé sur une lame de microscope (500×500 pixels) - figure de droite : échantillon de tendon de poulet (500×500 pixels) - Reproduit de Perrillat-Bottonet et al. (2017).

Cardiogreen ($C \sim 10\ \mu M$)et imagé ensuite l'échantillon dans une coupe transverse. L'ICG en remontant par capillarité à travers l'échantillon est venu marquer la matrice extracellulaire des cellules de céleri (figure 4.18 droite). Dans ce dernier cas, le niveau de signal permet d'imager à une vitesse de 30000 pixels/seconde.

4.3.3 Discussion et limitations actuelles

Le système développé dans le cadre de cette maîtrise permet bien l'imagerie bimodale, confocale et multiphotonique, d'échantillons biologiques comme le montre les images précédentes. L'utilisation du coupleur DCFC a permis de s'affranchir de l'utilisation d'un miroir dichroïque et d'un système d'injection dans une fibre DCF. L'utilisation d'un laser fibré femtoseconde permet de réaliser un système complètement fibre, sans contrainte d'alignement. Le tableau 4.4 fournit les caractéristiques du système final. Il existe une déviation entre les résolutions théoriques calculées (équations 1.12 à 1.15) données entre parenthèses et celles effectivement mesurées sur le système. Cette déviation peut s'expliquer par le fait que la lentille objectif n'est pas utilisé à son ouverture numérique maximale. En effet, le faisceau incident est légèrement plus petit que l'ouverture permise par la lentille. De plus, dans le cas de la résolution axiale mesuré pour la 2PEF, la valeur obtenue est prise sur un agrégat de billes pour contourner le problème de photoblanchiment. La résolution axiale réelle pour la 2PEF est donc meilleure que celle obtenue par cette mesure, qui pose simplement une limite haute.

La tête optique du microscope est le dernier composant hors fibre du système et pourrait dans le futur être remplacée par une sonde spécialement développée pour l'endoscopie multiphotonique. Dans le cadre d'une utilisation en microscopie, cette tête optique doit être amélioré afin d'augmenter la résolution latérale du système qui reste limité au voisinage de 2 μm pour les trois modalités étudiées ici. De plus, la lentille objective possède une ouverture numérique relativement faible ($ON \sim 0.6$) comparativement aux objectifs (conçus pour le visible et le proche infrarouge) utilisés en microscopie multiphotonique standard ($ON \sim 1$). Notre choix de design actuel était de profiter de composant disponible commercialement afin de réaliser une preuve de principe. En augmentant le pouvoir de focalisation de la lentille objectif, les effets non linéaires seront plus aisément collecté ce qui pourrait abaisser la limite de sensibilité du système et augmenter la vitesse d'imagerie. En effet, actuellement aucun signal de fluorescence endogène n'a pu être observé sur les échantillons imagés. Il existe peu de fluorophores endogènes efficaces à cette longueur d'onde d'excitation (Yazdanfar et al., 2010). Un point à améliorer est le déplacement du point focal entre la longueur d'onde d'excitation et celles des signaux non linéaires de deuxième ordre qui limite en partie l'efficacité de

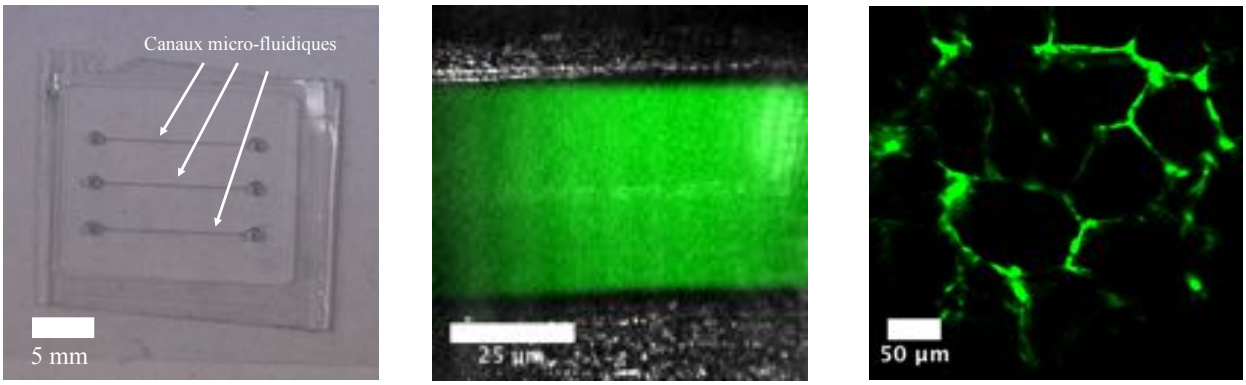


Figure 4.18 Imagerie 2PEF d'échantillons - figure de gauche : photographie des canaux micro fluidiques utilisés (largeurs respectives : 50 μm, 100 μm, 200 μm) pour imager l'ICG (Cardiogreen, SigmaAldrich) - figure du centre : imagerie 2PEF (en vert) et confocal (en gris) d'un canal micro fluidique (50 μm) rempli de Cardiogreen (500×500 pixels)- figure de droite : imagerie de cellules de céleri préalablement immergées dans du Cardiogreen pendant une heure et rincées à l'aide d'une solution saline (500×500 pixels).

collection même avec un diamètre de gaine interne de 105 μm. Cela pourrait être corrigé en concevant une tête optique entièrement achromatique. Ainsi le niveau très faible des signaux non linéaires collectés peut être amélioré en retravaillant la tête optique du microscope. Une autre approche possible serait de rendre la détection plus sensible en incorporant un système de comptage de photon en aval du PMT. Une des sources de bruit important dans le circuit de détection est le bruit électronique du système transimpédance et intégrateur utilisé.

Les échantillons imagés en GSH sont pour la plupart des échantillons épais. L'absence de signal de GSH dans la lamina proria des cordes vocales imagées peut s'expliquer par le fait que les échantillons imagés sont fins comparativement à la résolution axiale. L'imagerie d'échantillons plus épais devrait permettre d'augmenter la diffusion du signal de GSH et permettre sa collection en rétro diffusion. Les signaux de 2PEF endogène n'ont actuellement pas été observés au sein des tissus et reste un point à explorer une fois les améliorations précédentes apportées.

4.4 Conclusion

L'ensemble du microscope fibré développé a été détaillé dans de ce chapitre : allant de la compensation de la dispersion du système de fibre jusqu'à l'obtention des images d'échantillons biologiques. Nous avons vu qu'il est possible d'utiliser un coupleur DCFC afin de réaliser un microscope multimodal (confocal, 2PEF et GSH) complètement fibré. Les caractéristiques du système développé ont été présentées et des pistes d'améliorations ont été proposées. Le

Tableau 4.4 Caractéristiques du système final - Les résolutions théoriques sont données entre parenthèses -La profondeur de pénétration dépend fortement de l'échantillon et correspond à celles maximum observée.

Caractéristiques	Confocal	GSH	2PEF (exogène)
Longueur d'onde excitation/collection (en nm)	1550/1550	1550/775	1550/> 800
Résolution latérale (en μm)	2.0 (1.0)	~ 2.3	2.3 (0.98)
Résolution axiale (en μm)	11.3 (5.0)	< 14.2	< 14.2 (4.9)
Champ de vue maximal (en μm)	350×350	350×350	350×350
Profondeur de pénétration (en μm)	~ 100	~ 100	~ 100
Vitesse d'imagerie (en μs/pixel)	8	76	33

système final est compact (comparativement aux systèmes commerciaux) et très peu sensible aux contraintes d'alignement. Il est de plus montable et démontable rapidement. Le faible niveau de signal non linéaire collecté reste le point limitant sur la vitesse d'imagerie.

CHAPITRE 5 CONCLUSION

En combinant les résultats théoriques et expérimentaux des chapitres précédents, ce chapitre propose une discussion générale sur la solution fibrée proposée pour la microscopie multiphotonique. Dans un premier temps, une synthèse des travaux est faite et la réponse aux objectifs spécifiques validée. Ensuite, les limitations de la solution actuelle sont abordées en détail et enfin des pistes d'améliorations futures sont données.

5.1 Synthèse des travaux

L'objectif général de ce projet était de concevoir un microscope combinant imagerie confocale et multiphotonique entièrement fibré et incorporant un coupleur à fibre à double gaine (DCFC) à 1550 nm. Ce système devait répondre à l'une des problématiques d'un transfert clinique de la microscopie multiphotonique : transformer un microscope habituellement hors fibre en un système fibré, robuste et compact. Les travaux s'inscrivant dans l'atteinte des objectifs spécifiques sont résumés dans les sections correspondantes.

5.1.1 Propagation fibrée d'impulsion et compensation de la dispersion

Le premier travail réalisé a été d'étudier à l'aide de simulations la propagation d'impulsion femtosecondes dans un milieu fibré. Les simulations se concentrent sur des impulsions dont les caractéristiques correspondent à celles des deux lasers d'excitation utilisés par la suite dans ce projet : un ensemble Ti :S + OPO et un laser fibré femtoseconde (ELMO+ELMA). Ces simulations ont permis de mettre en avant les deux phénomènes prépondérants dans la propagation d'impulsion fibré dans notre cas : le dispersion chromatique d'ordre deux et l'automodulation de phase. En se basant sur un modèle simplifié du circuit de fibres et en couplant ces simulations à la théorie de la fluorescence multiphotonique, il a été montré que fonction de la puissance moyenne de l'excitation, il peut être avantageux (ou non) de compenser la dispersion. En pratique, afin de conserver l'ensemble du système fibré, la dispersion de compensation est réalisée dans une fibre à dispersion normale. Cette solution est rendue possible du fait de la longueur d'onde d'excitation choisie (1550 nm). Les manipulations permettant de calibrer la longueur de cette fibre à compensation de dispersion ont montré qu'il était possible de retrouver l'impulsion originelle en sortie de système, voire de la compresser pour des impulsions provenant de l'ensemble Ti :S+ OPO. Dans le cas où le laser fibré femtoseconde est utilisé, la fibre à compensation de dispersion peut être enlevée sans

provoquer un élargissement temporel de l'impulsion, à cause d'effets d'automodulation de phase et de dispersion anormale se compensant lors de la propagation dans le système. Ainsi, la propagation fibrée d'impulsions sans élargissement temporel significatif peut être réalisée à travers le circuit de fibre proposé pour le microscope, validant cet objectif spécifique.

5.1.2 DCFC et collection de signaux non-linéaires

Un DCFC atteignant un taux de transfert multimodal de 89 % a été conçu et réalisé dans le cadre de ce projet. En utilisant une fibre multimodal de diamètre double par rapport aux coupleurs précédemment développés, il a été possible d'augmenter le rapport d'étendu afin d'atteindre un tel taux de transfert. Une fois le circuit de fibre dans son ensemble réalisé, une tête optique constituée de deux lentilles asphériques (une pour la collimation et une pour la focalisation), a été montée en sortie de DCFC. Deux échantillons, un cristal de BBO et un fluorophore (Cardiogreen, Sigma Aldrich), ont été successivement placés au point focal de la lentille objectif et illuminé. Un spectromètre branché au port multimodal du DCFC a permis de mesurer les spectres d'émission de GSH et de 2PEF de ces trois échantillons, démontrant qu'un coupleur DCFC permet bien à la fois de transmettre l'excitation dans sa partie unimodale, de collecter des signaux non linéaires dans sa gaine interne et de permettre leurs extractions dans son port multimodal. L'utilisation d'une fibre DCF permet une collection plus importante des signaux non linéaire via sa gaine interne. En effet, une mesure du signal non linéaire se trouvant dans la partie unimodale (au niveau du circulateur) a été faite mais aucun signal n'a pu être observé, y compris sur le cristal.

5.1.3 Réalisation du système d'imagerie

Les résultats précédents nous ont confortés dans l'idée que le DCFC pouvait être intégré dans un système d'imagerie. Dans un premier temps, un système de balayage télécentrique, basé sur deux miroirs galvanométriques et deux lentilles achromatiques, a été implémenté dans la tête optique du microscope. Ce système complet a été simulé sous le logiciel Zemax (OpticStudio) afin de déterminer l'efficacité de collection théorique du système. Le déplacement focal en fonction de la longueur d'onde est un des éléments limitant la collection : un arbitrage a été trouvé entre une résolution optimale à 1550 nm (signal confocal) et une collection efficace des signaux non linéaires au voisinage de 800 nm. Ce type d'imagerie étant une imagerie point par point, l'acquisition doit être asservie sur la position du balayage. Pour cela un code Labview (National Instrument) a été adapté pour permettre l'acquisition simultanée des signaux confocaux et non linéaires. Le spectromètre a été remplacé par un PMT optimisé pour la détection autour de 800 nm suivi d'un circuit transimpédance et de montages

amplificateurs et intégrateurs. Le signal confocal est quand à lui détecté à l'aide d'une simple photodiode à gain ajustable. Deux montages expérimentaux ont ainsi été conçus tour à tour, en utilisant le laser TiS + OPO pour débuter avant de changer pour un laser femtoseconde. Ce changement nous a permis d'obtenir un système entièrement fibré et compact en plus de profiter de davantage de puissance disponible en sortie du microscope.

5.1.4 Caractérisation du microscope et imagerie d'échantillons biologiques

Les premières images obtenues ont permis une caractérisation du système. Une cible de résolution (USAF 1951) a permis de caractériser les résolutions latérales et axiales de la modalité confocale (2.0 μm et 11.3 μm respectivement). L'imagerie de microbilles fluorescentes a permis de caractériser les résolutions de la 2PEF (2.3 μm en latérale et inférieur à 14.2 μm en axiale). La GSH n'a pas été caractérisée en résolution mais les valeurs attendues sont censées être proches de celles obtenues pour la 2PEF. Des échantillons biologiques ont ensuite été imagés : cordes vocales de porc, aorte de souris, amidon, céleri... Ces images démontrent qu'il est effectivement possible de faire de l'imagerie multiphotonique en utilisant un tel coupleur à une longueur d'onde de 1550 nm. Ainsi le microscope réalisé répond bien à la problématique de concevoir un système mulitphoton entièrement fibré et compact pour la microscopie multiphotonique. Il présente en revanches des limitations à dépasser avant de s'intéresser à des problématiques cliniques. Ces limitations sont présentées dans la section suivante.

5.2 Limitations de la solution proposée

La limitation principale du système actuel est sa vitesse d'acquisition qui est limitée par le niveau de signal non linéaire collecté. En effet, les signaux non linéaire nécessitent d'être intégrés suffisamment longtemps pour conserver un rapport signal sur bruit satisfaisant sur l'image. Ce changement du temps d'intégration se fait manuellement en modifiant le circuit intégrateur et en ajustant la vitesse de balayage des galvanomètres. Ainsi avec une intégration de 100μs/pixel, le système met 25 s pour obtenir une image de 500×500 pixels. Ce temps est bien trop long pour envisager une utilisation clinique telle qu'elle. De plus, l'imagerie 2PEF n'a seulement été possible pour des échantillons injectés d'un fluorophore de type indocyanine green (ICG). Aucune fluorescence par absorption à deux photons endogène n'a été observée sur les échantillons imagés, même pour de longs temps d'intégration. Le microscope actuel ne permet pas l'imagerie simultanée des modalités GSH et 2PEF simultanément. Les filtres respectifs à la 2PEF ou à la GSH doivent être changés manuellement devant le PMT suivant la modalité désirée. Les sessions d'imagerie doivent également être faites dans le noir afin d'éviter une pollution lumineuse sur le détecteur qui conduit sensiblement à augmenter le

bruit sur l'image, voir à masquer le signal. Les profondeurs de pénétration maximales dans des échantillons biologiques sont voisines de la centaine de microns. L'absorption de l'eau pour une excitation à 1550 nm est importante (comparativement à 800 nm) atténuant fortement le faisceau d'excitation lorsqu'il est focalisé en profondeur dans le tissu. Enfin, un phénomène non attendu a été l'observation de génération de troisième harmonique dans le coeur de la fibre à compensation de dispersion et se propageant jusqu'en sortie de système. Cet effet peut être embarrassant pour l'observation éventuelle de signaux du troisième ordre dans les tissus biologiques. En effet, une partie de ce signal de GTH est rétro réfléchi dans la gaine interne en sortie de DCF et est détectable au niveau du port multimodal.

5.3 Améliorations futures

Afin d'améliorer la vitesse d'acquisition, il est nécessaire d'accroitre l'efficacité de collection du signal. Pour cela, le design de la tête optique du système doit être améliorée. Le déplacement du point focal avec la longueur d'onde est l'un des facteurs limitant l'efficacité de collection. Il pourrait être compensé en concevant des doublets de lentilles asphériques et achromatiques. Cela pourrait être réalisé en utilisant la fraise contrôler numériquement par ordinateur (CNC) du laboratoire qui permet l'usinage de pièce optique. Augmenter l'ouverture numérique de la lentille objectif permettra également d'accroitre l'efficacité de collection des signaux non linéaires et l'obtention de meilleures résolutions. Dans la continuité du développement des optiques, le développement d'une sonde pour l'imagerie à 1550 nm, associée à une problématique spécifique, pourrait être réalisée. Il pourrait être également intéressant d'abaisser la sensibilité de l'acquisition en utilisant un système de comptage de photons en arrière du PMT afin d'essayer de détecter des signaux de fluorescence endogène. L'utilisation d'un second PMT couplé à un miroir dichroïque devrait permettre d'imager simultanément les deux canaux non linéaires (2PEF et GSH) et obtenir ainsi un système tri modal. Il pourrait également être intéressant de faire une étude comparative avec une excitation à 800 nm. En effet, l'arrivée sur le marché de laser fibré femtoseconde au voisinage de 800 nm et de la disponibilité de DCFC dans ce régime de longueur d'onde pourrait permettre de réaliser un système entièrement fibré au voisinage de 800 nm. La compensation de dispersion devra quant à elle être repensée : il n'existe actuellement pas de fibre à compensation de dispersion dans cette plage de longueur d'onde. En effet, les fibres à dispersion anormales sont situées dans des plages de longueurs d'onde au delà 1300 nm, longueur d'onde où la dispersion s'annule et change de signe. L'utilisation de réseaux de Bragg fibré pourrait être une solution intéressante à étudier. Une autre avenue serait de migrer vers des longueurs d'onde plus élevée au voisinage de 1700 nm. Cette longueur d'onde propose un arbitrage

optimal entre absorption et diffusion, permettant d'accroitre la profondeur de pénétration de l'imagerie (Horton et al., 2013). Elle devrait permettre également l'observation d'effets du troisième ordre, conditionnellement aux effets de GTH pouvant se produire dans les fibres. Ainsi en utilisant un coupleur à fibre à double gaine (DCFC), ce projet démontre qu'il est possible de réaliser un microscope multiphotonique entièrement fibré, compact et robuste. En travaillant sur les points d'améliorations énoncés ci-dessus, ce système pourrait devenir très prometteur pour l'imagerie multiphotonique dans un contexte clinique.

RÉFÉRENCES

G. P. Agrawal, *Nonlinear fiber optics*. Academic press, 2007.

F. J. Ávila, O. del Barco, et J. M. Bueno, "Polarization dependence of aligned collagen tissues imaged with second harmonic generation microscopy", *Journal of biomedical optics*, vol. 20, no. 8, pp. 086 001–086 001, 2015.

H. Bao, S. Y. Ryu, B. H. Lee, W. Tao, et M. Gu, "Nonlinear endomicroscopy using a double-clad fiber coupler", *Optics letters*, vol. 35, no. 7, pp. 995–997, 2010.

W. Becker, A. Bergmann, M. Hink, K. König, K. Benndorf, et C. Biskup, "Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting", *Microscopy research and technique*, vol. 63, no. 1, pp. 58–66, 2004.

N. Bloembergen, *Nonlinear optics*. W. A. Benjamin, Inc., 1965.

C. Boudoux, "Fundamentals of biomedical optics", 2016.

R. W. Boyd, *Nonlinear optics*. Academic press, 2003.

R. W. Boyd, Z. Shi, et I. De Leon, "The third-order nonlinear optical susceptibility of gold", *Optics Communications*, vol. 326, pp. 74–79, 2014.

E. B. Brown, R. B. Campbell, Y. Tsuzuki, L. Xu, P. Carmeliet, D. Fukumura, et R. K. Jain, "In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy", *Nature medicine*, vol. 7, no. 7, pp. 864–868, 2001.

J. Bures, *Optique guidée : fibres optiques et composants passifs tout-fibre*. Presses inter Polytechnique, 2009.

M. D. Cahalan, I. Parker, S. H. Wei, et M. J. Miller, "Two-photon tissue imaging : seeing the immune system in a fresh light", *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 11, pp. 872–880, 2002.

I.-H. Chen, S.-W. Chu, C.-K. Sun, P.-C. Cheng, et B.-L. Lin, "Wavelength dependent damage in biological multi-photon confocal microscopy : a micro-spectroscopic comparison between femtosecond ti : sapphire and cr : forsterite laser sources", *Optical and Quantum electronics*, vol. 34, no. 12, pp. 1251–1266, 2002.

L.-C. Cheng, N. G. Horton, K. Wang, S.-J. Chen, et C. Xu, “Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy”, *Biomedical optics express*, vol. 5, no. 10, pp. 3427–3433, 2014.

S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, H.-J. Tsai, et C.-K. Sun, “In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy”, *Optics Express*, vol. 11, no. 23, pp. 3093–3099, 2003.

P. Curley, A. Ferguson, J. White, et W. Amos, “Application of a femtosecond self-sustaining mode-locked ti : sapphire laser to the field of laser scanning confocal microscopy”, *Optical and quantum electronics*, vol. 24, no. 8, pp. 851–859, 1992.

W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb *et al.*, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy”, *Science*, vol. 248, no. 4951, pp. 73–76, 1990.

R. Deterre, “Microscopie non-linéaire pour l’imagerie des cordes vocales”, Mémoire de maîtrise, Ecole polytechnique de Montréal, 2012.

T. A. Driscoll, P. E. Perkins, H. J. Hoffman, et R. E. Stone, “Efficient second-harmonic generation in ktp crystals”, *JOSA B*, vol. 3, no. 5, pp. 683–686, 1986.

M. E. Durst, D. Kobat, et C. Xu, “Tunable dispersion compensation by a rotating cylindrical lens”, *Optics letters*, vol. 34, no. 8, pp. 1195–1197, 2009.

A. Egner, S. Jakobs, et S. W. Hell, “Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 6, pp. 3370–3375, 2002.

P. Franken, A. E. Hill, C. Peters, et G. Weinreich, “Generation of optical harmonics”, *Physical Review Letters*, vol. 7, no. 4, p. 118, 1961.

FraunhoferIPMS. (2016, Août). En ligne : `http://www.ipms.fraunhofer.de`

I. Freund et M. Deutsch, “Second-harmonic microscopy of biological tissue”, *Optics letters*, vol. 11, no. 2, pp. 94–96, 1986.

L. Fu et M. Gu, “Double-clad photonic crystal fiber coupler for compact nonlinear optical microscopy imaging”, *Optics letters*, vol. 31, no. 10, pp. 1471–1473, 2006.

L. Fu, A. Jain, H. Xie, C. Cranfield, et M. Gu, “Nonlinear optical endoscopy based on a double-clad photonic crystal fiber and a mems mirror”, *Optics Express*, vol. 14, no. 3, pp.

1027–1032, 2006.

M. Göppert-Mayer, “Über elementarakte mit zwei quantensprüngen”, *Annalen der Physik*, vol. 401, no. 3, pp. 273–294, 1931.

G. Grynkiewicz, M. Poenie, et R. Y. Tsien, “A new generation of ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties.” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, no. 6, pp. 3440–3450, 1985.

M. Gu, D. Bird, D. Day, L. Fu, et D. Morrish, *Femtosecond Biophotonics : Core Technology and Applications*. Cambridge University Press, 2010.

R. Guay-Lord, X. Attendu, K. L. Lurie, L. Majeau, N. Godbout, A. K. E. Bowden, M. Strupler, et C. Boudoux, “Combined optical coherence tomography and hyperspectral imaging using a double-clad fiber coupler”, *Journal of biomedical optics*, vol. 21, no. 11, pp. 116 008–116 008, 2016.

Hamamatsu. (2016, Août). En ligne : `http://www.hamamatsu.com`

S. W. Hell, K. Bahlmann, M. Schrader, A. Soini, H. M. Malak, I. Gryczynski, et J. R. Lakowicz, “Three-photon excitation in fluorescence microscopy”, *Journal of Biomedical Optics*, vol. 1, no. 1, pp. 71–74, 1996.

N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer, et C. Xu, “In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain”, *Nature photonics*, vol. 7, no. 3, pp. 205–209, 2013.

IDQuantique. (2016, Juillet). En ligne : `http://www.idquantique.com/photon-counting/`

R. K. Jain, “Determinants of tumor blood flow : a review”, *Cancer research*, vol. 48, no. 10, pp. 2641–2658, 1988.

W. Kaiser et C. Garrett, “Two-photon excitation in ca f 2 : Eu 2+”, *Physical review letters*, vol. 7, no. 6, p. 229, 1961.

G. S. Kino et T. R. Corle, *Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems*. Academic Press, 1996.

D. Kobat, M. E. Durst, N. Nishimura, A. W. Wong, C. B. Schaffer, et C. Xu, “Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation”, *Optics express*, vol. 17, no. 16, pp. 13 354–13 364, 2009.

K. König, “Multiphoton microscopy in life sciences”, *Journal of microscopy*, vol. 200, no. 2, pp. 83–104, 2000.

K. König, B. Wang, I. Riemann, et J. Kobow, “Cornea surgery with nanojoule femtosecond laser pulses”, dans *Biomedical Optics 2005*. International Society for Optics and Photonics, 2005, pp. 288–293.

Leica. (2016, Août). En ligne : `http://www.leica-microsystems.com`

S. Lemire-Renaud, M. Rivard, M. Strupler, D. Morneau, F. Verpillat, X. Daxhelet, N. Godbout, et C. Boudoux, “Double-clad fiber coupler for endoscopy”, *Optics express*, vol. 18, no. 10, pp. 9755–9764, 2010.

W.-J. Madore, E. De Montigny, O. Ouellette, S. Lemire-Renaud, M. Leduc, X. Daxhelet, N. Godbout, et C. Boudoux, “Asymmetric double-clad fiber couplers for endoscopy”, *Optics letters*, vol. 38, no. 21, pp. 4514–4517, 2013.

P. Mahou, M. Zimmerley, K. Loulier, K. S. Matho, G. Labroille, X. Morin, W. Supatto, J. Livet, D. Débarre, et E. Beaurepaire, “Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing”, *Nature methods*, vol. 9, no. 8, pp. 815–818, 2012.

B. R. Masters et P. So, *Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy*. Oxford University Press on Demand, 2008.

B. R. Masters, P. So, et E. Gratton, “Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin.” *Biophysical journal*, vol. 72, no. 6, p. 2405, 1997.

M. Muller, J. Squier, R. Wolleschensky, U. Simon, et G. Brakenhoff, “Dispersion precompensation of 15 femtosecond optical pulses for high-numerical-aperture objectives”, *Journal of microscopy*, vol. 191, no. 2, pp. 141–150, 1998.

K. Murari, Y. Zhang, S. Li, Y. Chen, M.-J. Li, et X. Li, “Compensation-free, all-fiber-optic, two-photon endomicroscopy at 1.55 μm”, *Optics letters*, vol. 36, no. 7, pp. 1299–1301, 2011.

J. B. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, 3e éd. Springer, 2006.

T. Perrillat-Bottonet, M. Strupler, M. Leduc, L. Majeau, N. Godbout, et C. Boudoux, “All fiber nonlinear microscopy at 1550 nm using a double-clad fiber coupler”, dans *Proc. of SPIE Vol*, vol. 10069, 2017, pp. 1 006 927–1.

E. O. Potma, D. J. Jones, J.-X. Cheng, X. S. Xie, et J. Ye, “High-sensitivity coherent anti-stokes raman scattering microscopy with two tightly synchronized picosecond lasers”, *Optics letters*, vol. 27, no. 13, pp. 1168–1170, 2002.

M. Rivard, “Imagerie tissulaire par microscopie de seconde harmonique interférométrique.” Thèse de doctorat, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, 2016.

D. R. Rivera, C. M. Brown, D. G. Ouzounov, I. Pavlova, D. Kobat, W. W. Webb, et C. Xu, “Compact and flexible raster scanning multiphoton endoscope capable of imaging unstained tissue”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 43, pp. 17 598–17 603, 2011.

L. Sacconi, R. P. O’Connor, A. Jasaitis, A. Masi, M. Buffelli, et F. S. Pavone, “In vivo multiphoton nanosurgery on cortical neurons”, *Journal of biomedical optics*, vol. 12, no. 5, pp. 050 502–050 502, 2007.

B. E. Saleh, M. C. Teich, et B. E. Saleh, *Fundamentals of photonics*. Wiley New York, 1991, vol. 22.

Y. Tan, I. Llano, A. Hopt, F. Würriehausen, et E. Neher, “Fast scanning and efficient photodetection in a simple two-photon microscope”, *Journal of neuroscience methods*, vol. 92, no. 1, pp. 123–135, 1999.

Thorlabs. (2016, Août). En ligne : `https://www.thorlabs.com`

R. T. Tong, Y. Boucher, S. V. Kozin, F. Winkler, D. J. Hicklin, et R. K. Jain, “Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors”, *Cancer research*, vol. 64, no. 11, pp. 3731–3736, 2004.

J. T. Trachtenberg, B. E. Chen, G. W. Knott, G. Feng, J. R. Sanes, E. Welker, et K. Svoboda, “Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex”, *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 788–794, 2002.

R. Trebino, *Frequency-resolved optical gating : the measurement of ultrashort laser pulses*. Springer Science & Business Media, 2012.

A. Volkmer, “Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-stokes raman scattering microscopy”, *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 38, no. 5, p. R59, 2005.

Y. Wu, J. Xi, M. J. Cobb, et X. Li, “Scanning fiber-optic nonlinear endomicroscopy with miniature aspherical compound lens and multimode fiber collector”, *Optics letters*, vol. 34, no. 7, pp. 953–955, 2009.

C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, et W. W. Webb, “Multiphoton fluorescence excitation : new spectral windows for biological nonlinear microscopy”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, no. 20, pp. 10 763–10 768, 1996.

S. Yazdanfar, C. Joo, C. Zhan, M. Y. Berezin, W. J. Akers, et S. Achilefu, “Multiphoton microscopy with near infrared contrast agents”, *Journal of biomedical optics*, vol. 15, no. 3, pp. 030 505–030 505, 2010.

W. R. Zipfel, R. M. Williams, et W. W. Webb, “Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences”, *Nature biotechnology*, vol. 21, no. 11, pp. 1369–1377, 2003.