Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie.

Delphine Débarre

▶ **To cite this version:**

Delphine Débarre. Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie.. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole Polytechnique X, 2006. Français. NNT : . pastel-00001978

HAL Id: pastel-00001978
https://pastel.hal.science/pastel-00001978

Submitted on 28 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

ÉCOLE POLYTECHNIQUE

Thèse de doctorat de l'École Polytechnique

Spécialité : BIOPHYSIQUE

Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie

présentée par

Delphine DÉBARRE

pour obtenir le titre de **Docteur de l'École Polytechnique**

soutenue le 15 septembre 2006 devant la Commission d'Examen composée de

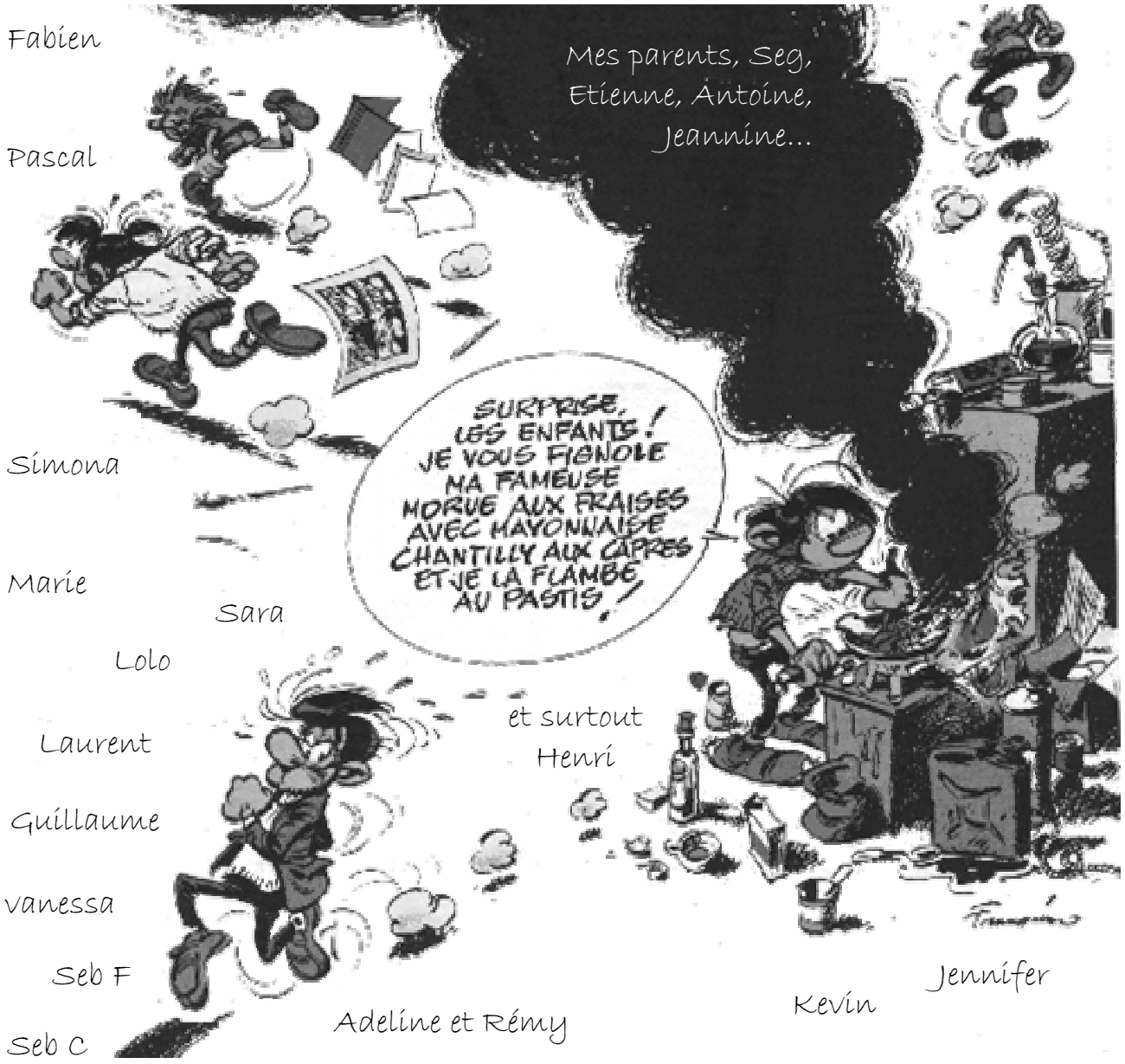
Pr. Yaron SILBERBERG	Président
Pr. Claude BOCCARA	Rapporteur
Pr. Jérôme MERTZ	Rapporteur
Dr. Emmanuel BEAUREPAIRE	Directeur de thèse
Pr. Jean-Louis MARTIN	
Pr. Jean-Paul THIERY	

Thèse effectuée au
Laboratoire d'Optique et Biosciences
CNRS UMR 7645 - INSERM U696 -École Polytechnique - ENSTA

Merci !

A tous ceux qui m'ont aidée dans mon travail...

...ou qui m'ont supportée en dehors (et vice versa)...



...et pour finir à tous ceux que je n'ai pas cités et qui ne m'en voudront pas (n'est-ce pas ?)

Table des matières

Préambule **1**

1 Introduction **5**
1.1 Principe de la génération de troisième harmonique 5
1.2 La microscopie optique non linéaire 8
1.2.1 Principe 8
1.2.2 Avantages et inconvénients 10
1.2.3 Comparaison avec d'autres techniques d'imagerie 14
1.2.4 Quelques exemples d'utilisation en biologie 14
1.3 Caractéristiques de la microscopie THG 19
1.3.1 Sectionnement optique intrinsèque 19
1.3.2 Modes de contraste 20
1.3.3 Invasivité 20
1.3.4 Pénétration dans les tissus 21
1.3.5 Combinaison avec d'autres techniques de microscopie 24
1.4 Etat de l'art de la microscopie THG 25
1.4.1 Démonstrations de principe 25
1.4.2 Applications en imagerie structurale 26
1.4.3 Etudes des sources de signal endogènes 27
1.4.4 Développements techniques 27
1.5 Dispositif expérimental pour l'imagerie THG 28
1.5.1 Les sources utilisées 28
1.5.2 Mise en forme du faisceau 29
1.5.3 Description du microscope 33

2 Facteurs géométriques en imagerie THG **35**
2.1 Influence de la géométrie de l'échantillon sur le niveau de signal 35
2.1.1 Une ou plusieurs interfaces planes perpendiculaires à la propagation 36
2.1.2 Une ou plusieurs interfaces planes parallèles à la propagation 49
2.1.3 Sphère uniforme centrée sur le faisceau 56
2.1.4 Récapitulatif 60
2.2 Focalisation et sélection des structures visibles 60
2.2.1 Sélection en taille de certaines structures 62
2.2.2 Comparaison de géométries différentes 65

2.2.3 Applications . . . 69
2.3 Caractère directionnel de l'émission et efficacité de détection . . . 72
2.3.1 Analyse théorique dans le cas d'un objet isolé . . . 72
2.3.2 Effet de la diffusion et de l'absorption du milieu . . . 79
2.3.3 Récapitulatif . . . 84
2.4 Conclusion . . . 86

3 Sources de signal en microscopie THG 87
3.1 Mesure de la susceptibilité non linéaire d'une solution . . . 87
3.1.1 Principe de la mesure . . . 88
3.1.2 Mesure de la susceptibilité d'ions en solution . . . 103
3.1.3 Transposition en microscopie . . . 108
3.2 Identification des structures biologiques donnant un fort signal THG . . . 113
3.2.1 Les corps lipidiques . . . 113
3.2.2 Autres structures visibles en microscopie THG . . . 121
3.2.3 Conclusion . . . 126
3.3 Applications en biologie . . . 126
3.3.1 Contexte . . . 126
3.3.2 Quantification des corps lipidiques . . . 127
3.3.3 Étude de la dynamique des corps lipidiques *in vivo* . . . 130
3.3.4 Imagerie multimodale . . . 131
3.4 Conclusion . . . 136

4 Imagerie THG de l'embryon de drosophile 137
4.1 Contexte . . . 137
4.1.1 La drosophile : un organisme modèle . . . 138
4.1.2 Visualiser et quantifier les mouvements morphogénétiques : enjeu . . . 144
4.1.3 Les méthodes d'imagerie du développement de la drosophile . . . 146
4.2 Imagerie THG du développement des embryons de Drosophile . . . 150
4.2.1 L'embryon de drosophile en microscopie THG . . . 150
4.2.2 Quantification des mouvements morphogénétiques : la PIV . . . 151
4.2.3 Comparaison avec les autres techniques d'imagerie . . . 155
4.3 Imagerie et perturbation du développement . . . 157
4.3.1 Interactions laser-tissus et perturbations biologiques . . . 158
4.3.2 Évaluation de la toxicité de l'imagerie THG . . . 162
4.3.3 Discussion . . . 169
4.3.4 Conclusion . . . 173
4.4 Applications à l'étude de la perturbation des mouvements . . . 174
4.4.1 Etude de mouvements morphogénétiques après photoablation . . . 174
4.4.2 Démonstration dans des organismes mutants . . . 176
4.5 Perspectives . . . 179

Conclusion 180

A Définition des susceptibilités non linéaires **185**

B Formulation générale du champ THG diffusé **187**
B.1 Expression exacte 187
B.2 Approximations 189
B.2.1 Direction de la polarisation induite 189
B.2.2 Forme du faisceau excitateur 190
B.2.3 Approximation paraxiale pour l'onde diffusée 190

C Calcul de l'intensité THG créée par une interface **193**
C.1 Propagation de l'onde excitatrice dans l'échantillon 194
C.2 Génération de troisième harmonique par un milieu semi-infini 195
C.3 Signal total de troisième harmonique 201
C.4 Cas d'une impulsion courte polychromatique 205
C.5 Exploitation des expériences de mesure de la susceptibilité 206

D Indices linéaires des différents verres et liquides **209**

E Compléments de matériels et méthodes **211**

Préambule

La visualisation de processus biologiques est souvent une étape essentielle à la compréhension des mécanismes sous-jacents. Dans cette situation, la mise au point d'une technique d'imagerie adaptée peut entraîner une avancée rapide des connaissances. Depuis une quinzaine d'années, la microscopie non linéaire a ainsi révolutionné des domaines aussi divers que les neurosciences ou la biologie du développement.

Ce constat justifie l'intérêt de développer de nouvelles techniques d'imagerie complémentaires, qui viendront enrichir le champ des possibilités offertes pour l'étude de cellules ou de tissus, voire d'organismes entiers. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au développement de la microscopie par génération de troisième harmonique (THG), technique récente de microscopie non linéaire, pour son utilisation en biologie. Cette technique possède l'avantage de produire un contraste endogène, permettant une imagerie sans marquage, et facilement combinable avec d'autres techniques non linéaires (chapitre 1). Cependant, son utilisation en biologie exige une caractérisation préalable permettant de déterminer les domaines d'application pertinents.

Cette caractérisation concerne essentiellement trois points : le mode de création du signal dans l'échantillon, les sources de contraste endogènes dans différents échantillons biologiques, et enfin l'étude de la phototoxicité induite par l'imagerie.

La THG étant un processus cohérent, les conditions d'accord de phase dans l'échantillon vont déterminer de façon cruciale l'amplitude du signal diffusé et rendre cette technique sensible à la géométrie de l'échantillon. Ceci peut conduire à une exaltation du signal pour certaines structures, ou au contraire à leur faible visibilité dans l'image obtenue. Nous avons donc étudié l'impact sur le signal obtenu des **caractéristiques géométriques** de l'échantillon étudié ainsi que de celles du faisceau excitateur (chapitre 2). Cette étude nous permis de déterminer et d'optimiser les paramètres pertinents pour la création du signal et pour sa détection, tels que l'ouverture numérique d'excitation.

D'autre part, l'identification des structures de l'échantillon fournissant un fort signal est un passage obligé avant l'application à une problématique précise, permettant d'interpréter les images obtenues puis d'en tirer des informations pertinentes. Toute inhomogénéité optique fournissant a priori un signal THG, l'étude des **sources de contraste** principales dans les tissus passe par une caractérisation *in vitro* des propriétés optiques de nombreuses molécules biologiques. Ensuite, l'étude *in vivo* de la spécificité de la microscopie THG permet de cerner les principales structures visibles dans des tissus aussi divers que le foie, les graines de plantes ou les embryons de drosophile (chapitre 3).

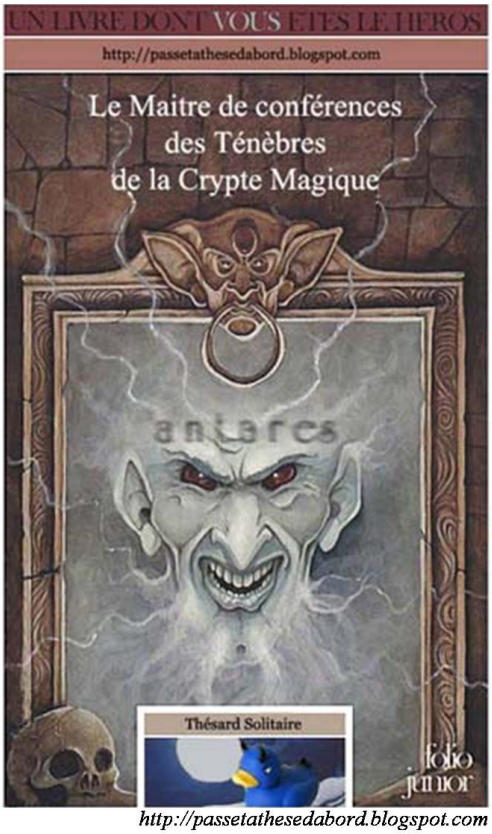
Parallèlement, le développement d'une première application de la microscopie THG a permis de démontrer son intérêt en biologie du développement. Couplée à une méthode d'ana-

lyse vélocimétrique des mouvements des tissus, cette nouvelle microscopie s'est révélée un outil précieux pour l'analyse des mouvements morphogénétiques chez l'embryon de drosophile sauvage ou pour différents mutants pour des gènes du développement (chapitre 4). Cette application a permis d'étudier la **phototoxicité** de la microscopie THG, à la fois pour déterminer les conditions d'imagerie ne perturbant pas l'échantillon et pour améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la création des dégâts photoinduits.

Ce travail n'a pu être réalisé que grâce à l'aide de nombreux collaborateurs dans le domaine biologique, et plus particulièrement :

- **Emmanuel Farge** et **Willy Supatto** (Groupe « mécanique et génétique du développement embryonnaire », Institut Curie, Paris) pour les différentes lignées de drosophile.
- **Laurent Combettes**, **Thierry Tordjmann** et **Sylvie Prigent** (Groupe « signalisation cellulaire et calcium », Inserm U757, IBAIC, Orsay) pour les hépatocytes de rat, le foie et le poumon de rat et les différentes lignées cellulaires hépatiques.
- **Renaud Legouis** (Centre de génétique moléculaire, CNRS UPR2167, Gif-sur-Yvette) pour les échantillons de *C.elegans*.
- **Geneviève Ephritikhine** (Groupe « transporteurs membranaires », Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette) pour les plants d'*Arabidopsis* ainsi que les différentes graines de plantes.
- **Aurélie Fabre** (Service de pneumologie, hôpital Bichat, Inserm U700, Paris) pour les échantillons de poumon de souris.
- **Nadine Peyriéras** (Groupe « réseaux génétiques et morphodynamiques cellulaires », CNRS UPR2197, Institut de neurobiologie Alfred Fessard, Gif-sur-Yvette) pour les larves de poisson-zèbre.

Toutes ces personnes, et plus particulièrement W.Supatto, L.Combettes et T.Tordjmann, ont beaucoup contribué à l'interprétation des images obtenues et ainsi fait progresser notre compréhension des sources de signal dans les tissus.



http://passetathesedabord.blogspot.com

Vous connaissez sûrement les « livres dont vous êtes le héros », qui vous envoient au numéro 153 si vous décidez d'ouvrir la porte derrière laquelle se cache un horrible troll, et au numéro 47 si vous préférez continuer à avancer dans le couloir où résonnent des bruits angoissants (un exemple ci-contre).

Cette thèse fonctionne sur le même principe : si vous êtes physicien(ne) et que vous voulez affronter directement les terrifiantes équations tapies dans les sombres recoins de ce manuscrit, n'hésitez pas à pousser la porte des chapitres 2 et 3.

Si vous êtes biologiste, après le chapitre 1, une force implacable vous attire vers le couloir des applications mystérieuses où résonne pour l'éternité le cri des embryons de drosophile maudits. Au péril de votre vie, vous emprunterez ses méandres à travers la section 3.2 et le chapitre 4.

Après ces conseils avisés, « vous seul(e) prendrez maintenant les décisions utiles au succès de votre lecture... »

Chapitre 1

Introduction

De nombreuses techniques d'imagerie ont été récemment développées dans l'optique d'une application à la biologie. Afin de définir les atouts et les limites spécifiques de la microscopie par génération de troisième harmonique (THG), ce chapitre présente son principe et la situe par rapport à d'autres techniques existantes, notamment en microscopie optique non linéaire.

Après avoir très brièvement décrit le principe de la génération de troisième harmonique (section 1.1), nous résumons donc les principales caractéristiques des techniques de microscopie non linéaire (section 1.2), telles que la microscopie de fluorescence excitée à deux photons (2PEF). Ceci permet dans un troisième temps (section 1.3) de mieux cerner par comparaison les caractéristiques de la microscopie par génération de troisième harmonique, dont l'état de l'art est présenté dans la partie 1.4. Enfin, le dispositif expérimental que nous avons utilisé pour les expériences de microscopie THG est décrit dans la dernière partie (section 1.5).

1.1 Principe de la génération de troisième harmonique

Considérons une molécule soumise à un champ électrique extérieur, supposé lentement variable (c'est-à-dire dont les variations spatiales sont très lentes à l'échelle de la taille de la molécule). Dans ce cas, on peut décrire la molécule comme un simple dipôle électrique $\boldsymbol{\mu}$[1], composé du moment dipolaire permanent éventuel de la molécule $\boldsymbol{\mu_0}$, ainsi que du moment dipolaire induit par le champ :

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu_0} + \boldsymbol{\mu}(\boldsymbol{E}) \tag{1.1}$$

On peut alors effectuer un développement en série de la partie variable de $\boldsymbol{\mu}$ pour obtenir [1] :

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu_0} + \boldsymbol{\alpha}.\boldsymbol{E} + \frac{1}{2}\boldsymbol{\beta}.\boldsymbol{E}.\boldsymbol{E} + \frac{1}{6}\boldsymbol{\gamma}.\boldsymbol{E}.\boldsymbol{E}.\boldsymbol{E} + ... \tag{1.2}$$

où $\boldsymbol{E}$ est le champ électrique appliqué à la molécule. Cette équation décrit la déformation du nuage électronique de la molécule sous l'action du champ électrique appliqué : le terme $\boldsymbol{\alpha}.\boldsymbol{E}$ décrit la réponse linéaire de la molécule, qui correspond à un déplacement des électrons proportionnel à la force électrique appliquée. $\boldsymbol{\alpha}$ est appelée polarisabilité linéaire de la molécule.

[1]Dans l'ensemble de ce manuscrit, les vecteurs et les tenseurs sont notés en caractères gras et $\mathbf{1}$ désigne le tenseur unité.

Dans le cas de molécules réelles, le potentiel vu par les électrons, notamment lorsqu'ils s'éloignent fortement de leur position d'équilibre, ne peut être considéré comme parfaitement harmonique[2]. Ainsi, lorsque le champ appliqué est fort, des termes d'ordre supérieur apparaissent ($\frac{1}{2}\boldsymbol{\beta}.\boldsymbol{E}.\boldsymbol{E}$, $\frac{1}{6}\boldsymbol{\gamma}.\boldsymbol{E}.\boldsymbol{E}.\boldsymbol{E}$, etc...) qui traduisent l'existence d'effets supplémentaires. Ces termes sont quantifiés par les hyperpolarisabilités du second ordre ($\boldsymbol{\beta}$), troisième ordre ($\boldsymbol{\gamma}$), etc...

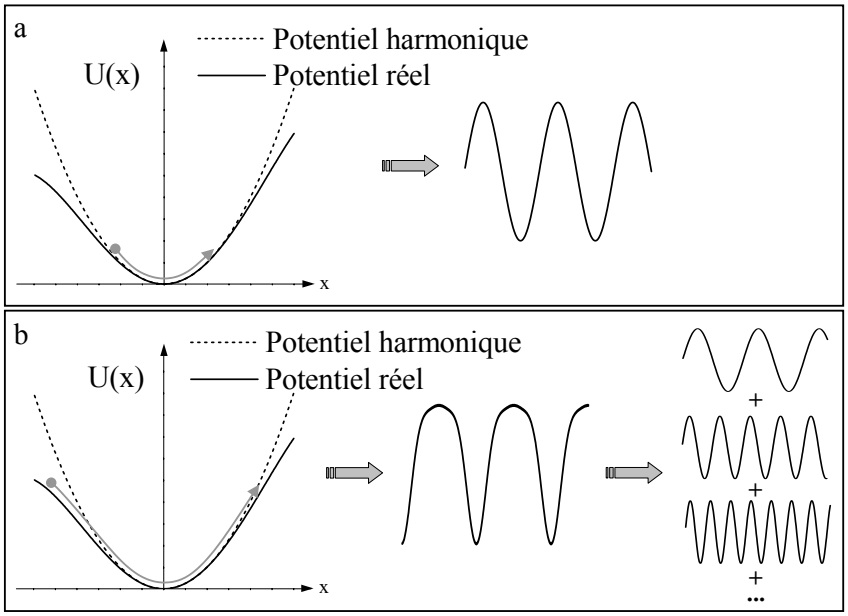


FIG. 1.1 – RÉPONSES HARMONIQUES ET ANHARMONIQUES DE LA MOLÉCULE. Dans le cas d'une excitation de faible amplitude (a), le potentiel vu par le nuage électronique au voisinage de sa position d'équilibre est proche d'un potentiel harmonique. La polarisation induite est sinusoïdale, de même fréquence ω que le champ excitateur. Quand l'excitation est plus forte (b), le potentiel réel s'écarte du potentiel harmonique et des composantes supplémentaires à 2ω, 3ω, etc... apparaissent dans la polarisation induite.

Si l'on considère maintenant la polarisation induite dans un élément de volume mésoscopique par un ensemble de molécules, on peut de même écrire[3] [1] :

$$\boldsymbol{P}(t) \;=\; \boldsymbol{P_0} + \epsilon_0 \boldsymbol{\chi}^{(1)}.\boldsymbol{E}(t) + \epsilon_0 \boldsymbol{\chi}^{(2)}.\boldsymbol{E}(t).\boldsymbol{E}(t) + \epsilon_0 \boldsymbol{\chi}^{(3)}.\boldsymbol{E}(t).\boldsymbol{E}(t).\boldsymbol{E}(t) + ... \qquad (1.3)$$

où $\boldsymbol{P_0}$ est la polarisation du milieu en l'absence de champ, $\boldsymbol{\chi}^{(1)}$ est la susceptibilité linéaire du milieu et $\boldsymbol{\chi}^{(n)}$ est sa susceptibilité non linéaire d'ordre n. Dans le cas général, les susceptibilités $\boldsymbol{\chi}^{(n)}$ (de même que les polarisabilités) sont des tenseurs d'ordre $n+1$. Cependant dans le cas d'un milieu isotrope[4], ces tenseurs se réduisent à un scalaire ($\times \mathbf{1}^{n+1}$). Les effets non linéaires mis en jeu sont nombreux (redressement optique, génération de somme de fréquences, effet Pockels, effet

[2]Dans la limite d'un champ appliqué comparable au champ électrique interne à la molécule, on pourra par exemple aller jusqu'à l'ionisation de la molécule, phénomène fondamentalement non linéaire.

[3]dans l'hypothèse d'une réponse instantanée du milieu.

[4]et en considérant une polarisation linéaire, ce qui sera toujours le cas dans ce travail.

Kerr...), surtout dans le cas où plusieurs faisceaux excitateurs à des fréquences différentes interagissent dans le milieu. Ici, nous allons nous restreindre au cas de la génération d'harmoniques par un unique faisceau de pulsation ω.

Dans le cas où la molécule peut être assimilée à un oscillateur harmonique, c'est-à-dire dans le cas d'un champ excitateur faible qui modifie peu la position du nuage électronique par rapport à sa position d'équilibre, la réponse du milieu à une excitation à la pulsation ω se fait à la même pulsation ω. Au contraire, si l'excitation est forte (figure 1.1), l'oscillateur devient anharmonique et la réponse à une excitation monochromatique fait intervenir les harmoniques de la pulsation d'excitation ω : 2ω (seconde harmonique), 3ω (troisième harmonique). Ces termes apparaissent dans la polarisation induite sous la forme[5] :

$$\begin{aligned} \boldsymbol{P}^{(2)}(2\omega) &= \frac{1}{2}\epsilon_0 \boldsymbol{\chi}^{(2)}(-2\omega;\omega,\omega).\boldsymbol{E}(\omega).\boldsymbol{E}(\omega) \\ \boldsymbol{P}^{(3)}(3\omega) &= \frac{1}{4}\epsilon_0 \boldsymbol{\chi}^{(3)}(-3\omega;\omega,\omega,\omega).\boldsymbol{E}(\omega).\boldsymbol{E}(\omega).\boldsymbol{E}(\omega) \end{aligned} \tag{1.4}$$

Le premier terme, comme tous les termes pairs suivants, n'est présent que si le milieu possède une brisure de symétrie. En effet, dans le cas contraire, le tenseur de susceptibilité d'ordre deux $\chi^{(2)}(-2\omega;\omega,\omega)$ est identiquement nul car si l'on inverse le sens du champ électrique, la polarisation induite est elle aussi inversée ce qui conduit à $\boldsymbol{\chi}^{(2)}(-2\omega;\omega,\omega) = -\boldsymbol{\chi}^{(2)}(-2\omega;\omega,\omega) = \mathbf{0}^{n+1}$. Au contraire, aucune condition de symétrie n'est requise pour les termes d'ordre impair comme la THG.

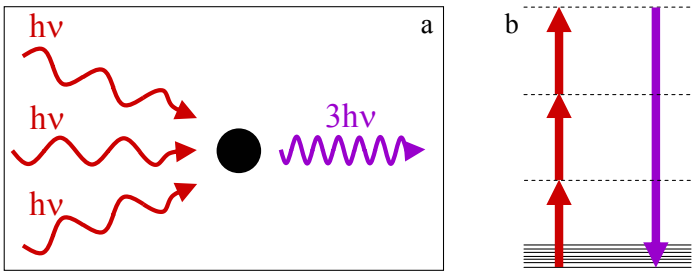


Fig. 1.2 – Représentations de la génération de troisième harmonique. La THG est un processus de diffusion élastique (a) durant lequel la molécule est portée à partir de son état fondamental (trait plein) vers des niveaux d'énergie "virtuels" (traits pointillés, b) de durées de vie extrêmement courtes ($\approx 10^{-15}$s). Le retour à l'état fondamental se fait par diffusion d'un photon d'énergie exactement égale à la somme de celles des photons incidents.

On peut décrire la THG comme un évènement de diffusion non linéaire combinant trois photons d'énergie $\hbar\omega$ pour donner un photon d'énergie $3\hbar\omega$. L'efficacité caractéristique du milieu dans lequel se produit cette diffusion est quantifiée par le paramètre $\boldsymbol{\chi}^{(3)}(-3\omega;\omega,\omega,\omega)$ (figure 1.2). Le processus peut également être représenté en termes d'excitation des molécules du milieu : une molécule donnée est excitée jusqu'à un niveau « virtuel » qui ne correspond pas à l'un de ses états

[5]Voir Appendice A pour les conventions utilisées pour la définition des susceptibilités.

propres. Cet état est donc instable et la molécule diffuse instantanément un photon d'énergie triple sans absorber d'énergie. Ainsi, le phénomène n'a lieu que lorsque les trois photons arrivent sur la molécule dans un intervalle de temps très court, c'est-à-dire si l'intensité instantanée du faisceau excitateur est très importante.

Pour obtenir un fort signal THG, il est donc nécessaire d'utiliser une source délivrant des impulsions courtes de puissance crête très supérieure à la puissance moyenne : en concentrant temporellement les photons, on augmente la probabilité que plusieurs photons arrivent simultanément sur une molécule et on exalte les effets non linéaires par rapport aux effets linéaires. La THG étant un effet du troisième ordre, l'intensité du signal produit sera proportionnelle à $\langle I_\omega^3 \rangle$, où I_ω est l'intensité incidente et $\langle\rangle$ dénote la moyenne temporelle (figure 1.3).

Dans le cas d'un laser continu, l'intensité est constante au cours du temps et $\langle I_\omega^3 \rangle = \langle I_\omega \rangle^3$. Au contraire, si le laser fonctionne en mode impulsionnel avec des impulsions de durée τ, et un taux de répétition T^{-1}, on obtient :

$$\langle I_\omega^3 \rangle = \left(\frac{T}{\tau}\right)^2 \times \langle I_\omega \rangle^3 \tag{1.5}$$

soit par exemple pour un laser titane-saphir émettant des impulsions de 100 fs à un taux de répétition de 80 MHz une exaltation d'un facteur $\approx 10^{10}$ par rapport à une source continue.

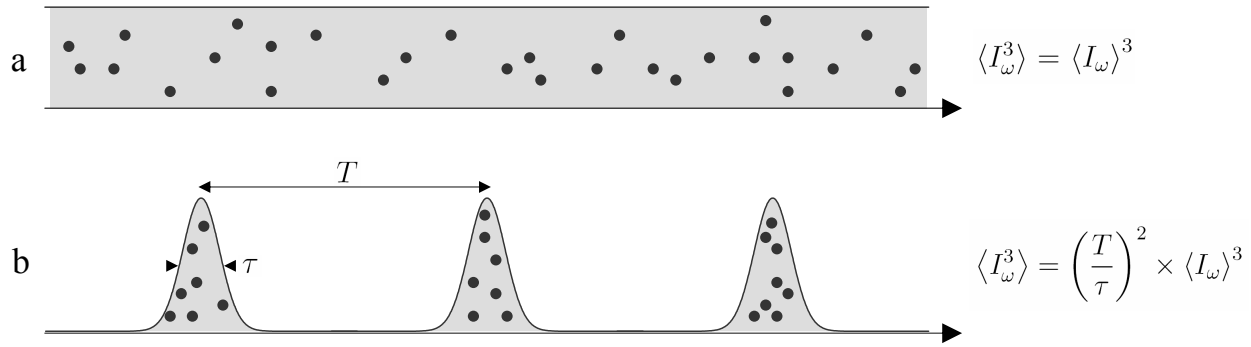


Fig. 1.3 – Comparaison d'un laser continu et d'un laser en impulsion pour l'efficacité de la génération de troisième harmonique.

Ce point sera détaillé dans la suite de ce chapitre (section 1.5) et certaines conséquences pratiques seront présentées dans le chapitre 4.

Avant de décrire plus en détail la microscopie THG, nous allons rappeler dans la section suivante le principe et les atouts de la microscopie non linéaire, et passer en revue quelques applications de cette approche en biologie.

1.2 La microscopie optique non linéaire

1.2.1 Principe

De façon générale, une technique de microscopie multiphotonique repose sur l'exploitation comme mode de contraste d'un ou plusieurs effets non linéaires se produisant dans l'échantillon

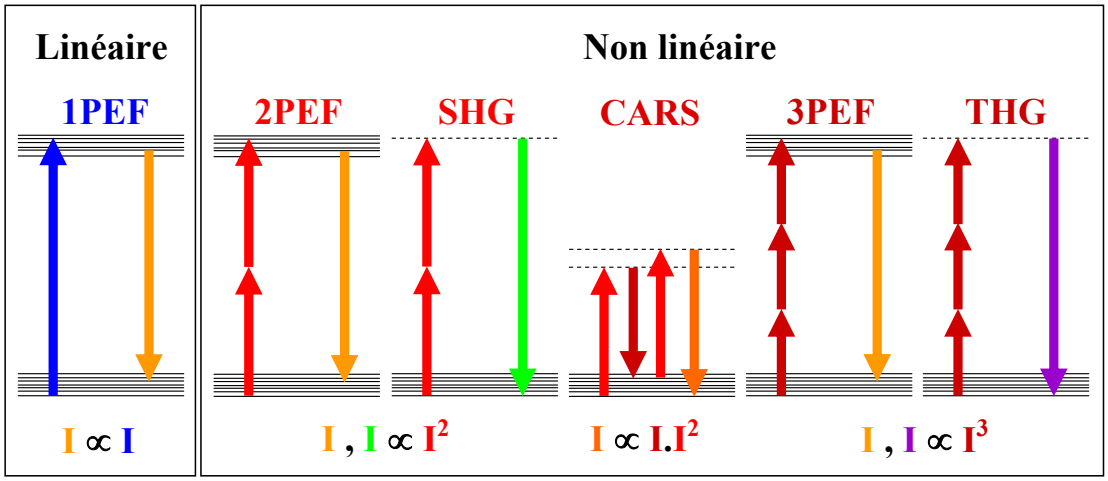


FIG. 1.4 – EFFETS NON LINÉAIRES LES PLUS EMPLOYÉS EN MICROSCOPIE. 1PEF, fluorescence excitée à un photon (linéaire) ; 2PEF, fluorescence excitée à deux photons ; 3PEF, fluorescence excitée à trois photons ; SHG, génération de seconde harmonique ; THG, génération de troisième harmonique ; CARS, diffusion Raman anti-Stokes cohérente.

observé. Les effets les plus couramment utilisés sont décrits sur la figure 1.4. Généralement, le faisceau excitateur est focalisé et balayé dans l'échantillon, et le signal non linéaire est détecté point par point afin d'obtenir une image.

La particularité de ce type d'imagerie repose sur la capacité de sectionnement optique qu'elle procure du fait de la dépendance non linéaire du signal avec la puissance d'excitation. La densité de puissance excitatrice étant très élevée au niveau du point focal, c'est seulement dans un volume focal limité que l'effet non linéaire considéré aura lieu de façon efficace ; cette propriété essentielle assure un confinement du signal obtenu dans l'échantillon.

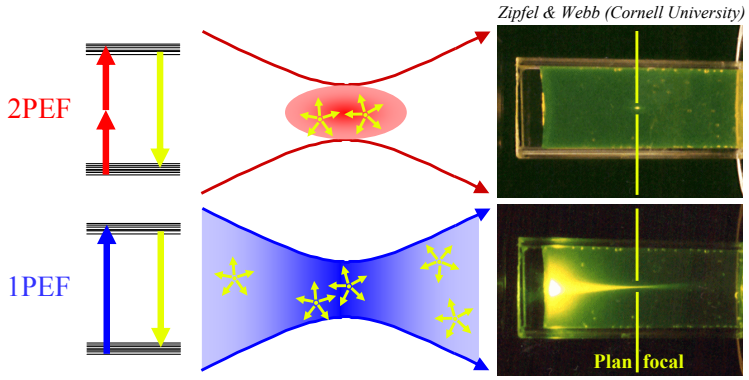


FIG. 1.5 – CONFINEMENT DE L'EXCITATION en microscopie non linéaire. Cas d'une solution de fluorescéine excitée à un photon (en bas) ou deux photons (en haut). Images extraites de la référence [2].

Une illustration de cet effet est présentée sur la figure 1.5 dans le cas de la fluorescence excitée

à deux photons (2PEF) : une solution de fluorescéine est excitée par deux faisceaux différents (488 nm, continu et 960 nm, en impulsion) afin de produire un signal de fluorescence excitée à un et deux photons [2, 3]. Dans le cas de la fluorescence excitée à un photon, le signal provient de tous les plans de section perpendiculaires à la direction de propagation du faisceau. En effet, la puissance lumineuse totale est la même dans tous ces plans. Au contraire, dans le cas de l'excitation à deux photons, le signal dépend du carré de la densité de puissance, qui n'est pas une fonction constante selon le plan considéré mais atteint un maximum au point de focalisation du faisceau, où la probabilité d'absorption à deux photons est donc maximale.

On obtient ainsi le signal provenant d'un point de l'échantillon. Afin de reconstruire l'image complète de celui-ci, le point de focalisation est ensuite balayé, afin d'obtenir une carte en deux ou trois dimensions du signal non linéaire.

1.2.2 Avantages et inconvénients

1.2.2.1 Sectionnement optique intrinsèque

Du fait du confinement des effets non linéaires au niveau du foyer de l'objectif de focalisation, la microscopie non linéaire permet d'obtenir intrinsèquement des images tridimensionnelles d'un échantillon épais. Contrairement au cas de la microscopie de fluorescence conventionnelle "plein champ", il n'y a pas de contribution provenant des plans distants du plan de focalisation de plus que la taille axiale du volume focal [3]. Il est ainsi possible de cartographier un échantillon épais à partir de coupes successives.

Plus quantitativement, on peut relier le volume d'excitation à la distribution d'intensité de l'onde excitatrice au voisinage du foyer de l'objectif. Différentes relations ont été proposées pour décrire la résolution obtenue. Nous avons choisi celle de la référence [4]. Pour un faisceau diaphragmé en entrée de l'objectif et une forte focalisation, on choisit en général pour le faisceau excitateur une forme gaussienne-gaussienne et on obtient pour un effet d'ordre N :

$$\begin{aligned} \delta_{N,xy} &= \frac{0.61\lambda}{\sqrt{N}\sin\theta} && \text{pour la résolution latérale} \\ \delta_{N,z} &= \frac{0.894\lambda}{\sqrt{N}(1-\cos\theta)} && \text{pour la résolution axiale} \end{aligned} \tag{1.6}$$

où δ_N est la largeur totale à mi-hauteur et θ le demi-angle d'ouverture du faisceau excitateur. Cette définition sous-estime légèrement la taille du volume d'excitation (voir par exemple [2]) et ne tient pas compte des effets de cohérence pour les processus comme la SHG, la THG ou le CARS, mais elle permet d'obtenir une estimation des capacités de sectionnement de ces techniques, dont la résolution axiale est typiquement de l'ordre de 1 à 8 µm pour des objectifs dont l'ouverture numérique varie entre 0.5 et 1.2.

La résolution obtenue est a priori moins bonne que dans le cas de la microscopie confocale car la longueur d'onde utilisée est 2 à 3 fois plus élevée, mais la comparaison de ces techniques en termes de résolution est en réalité complexe car elle dépend de plusieurs paramètres, dont

l'ouverture du diaphragme réel du microscope confocal, le niveau de signal dans l'échantillon ainsi que de sa diffusion, etc.[6] [2, 5, 6]

1.2.2.2 Pénétration dans les tissus

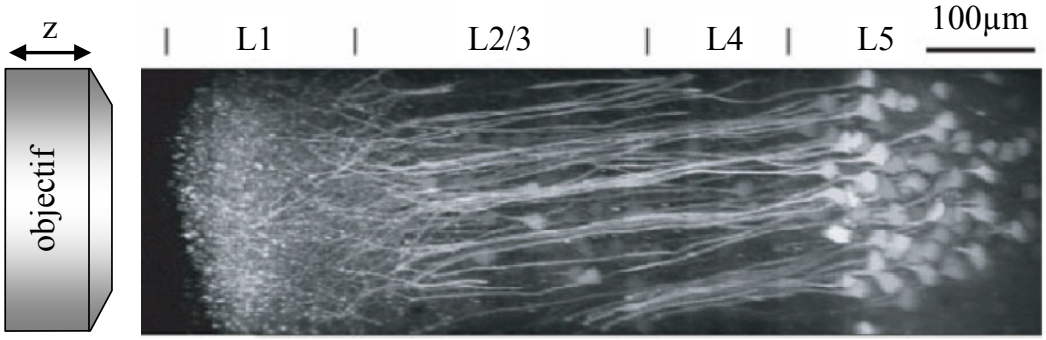


FIG. 1.6 – IMAGERIE EN PROFONDEUR À L'AIDE DE LA MICROSCOPIE 2PEF. Coupe optique du néocortex d'une souris exprimant une protéine fluorescente sensible aux ions chlorures (Clomeleon). Le contraste de l'image obtenue reste bon même à grande profondeur grâce à la conservation du sectionnement optique. L'image est extraite de la référence [7].

L'avantage majeur de la microscopie multiphotonique par rapport à la microscopie confocale est sa capacité de pénétration dans des tissus diffusants, où le libre parcours moyen de diffusion l_s (défini comme la distance moyenne entre deux évènements de diffusion) est de l'ordre de quelques dizaines de microns [8, 9, 10, 11]. Cette propriété peut être expliquée par différents effets :

- **Conservation du sectionnement optique** : dans le cas de la microscopie confocale, la sélection des photons provenant du point focal est réalisée par un diaphragme placé *à l'extérieur* de l'échantillon. Ce filtrage spatial n'est donc plus efficace quand les photons de fluorescence sont diffusés dans le tissu et perdent la mémoire de leur direction et position d'origine, ce qui conduit à un brouillage de l'image quand des photons émis en dehors du volume focal sont détectés. Au contraire, dans le cas de la microscopie multiphoton, au moins jusqu'à deux ou trois l_s de profondeur, on peut considérer que les photons d'excitation diffusés sont « perdus » et ne contribuent pas au signal non linéaire. Ainsi, la diffusion conduit à une atténuation du signal mais préserve mieux le contraste de l'image[7].

[6] On peut en outre rajouter un diaphragme confocal dans un microscope non linéaire afin d'augmenter ses capacités de sectionnement.

[7] En fait, au delà de 2 à $3\,l_s$, la diffusion conduit à une redistribution des photons dans le tissu et limite la qualité de l'image : d'une part, l'ouverture numérique effective est dégradée par la diffusion accrue des photons qui parcourent un trajet plus long dans le tissu du fait de leur grand angle d'incidence. D'autre part, les photons balistiques en surface de l'échantillon commencent à contribuer significativement au signal détecté puisque la puissance créée au niveau du point focal diminue. Enfin, les photons diffusés créent eux aussi un signal parasite au dessus du point focal qui détériore fortement la résolution axiale. Theer et al. ont par exemple montré sur des simulations que selon les conditions d'imagerie, la limite fondamentale à la profondeur d'imagerie en fluorescence à deux photons était de l'ordre de $5 - 8\,l_s$ [12].

- **Efficacité de détection du signal** : dans le cas de la microscopie multiphotonique, tout le signal créé dans le tissu est collecté pour former l'image : le signal détecté n'est donc (en première approximation) pas diminué par la diffusion des photons créés dans le tissu. Au contraire, pour des profondeurs d'imagerie faibles, le tissu joue le rôle d'un miroir diffusant et la fraction détectée est plus forte qu'en l'absence de diffusion [13] (voir section 2.3)[8]. La situation est très différente en microscopie confocale, où les photons diffusés ne contribuent plus à former l'image : ainsi la diffusion du signal de fluorescence conduit-elle à une perte de signal importante.

- **Influence de la longueur d'onde d'excitation** : enfin, les longueurs d'onde utilisées dans le cas de la microscopie non linéaire (700-1500 nm) sont sensiblement plus élevées que dans le cas de la microscopie de fluorescence classique (UV-visible), afin de détecter un signal dans le proche UV et le visible. Or, la longueur de diffusion des tissus croît généralement lorsque la longueur d'onde augmente (voir par exemple figure 1.11, page 23, où la longueur de diffusion croît en $\lambda^{2.4}$). Les effets de la diffusion se feront donc sentir plus en profondeur dans le cas d'une excitation multiphotonique.

La microscopie non linéaire est donc particulièrement adaptée à l'imagerie tissulaire, notamment lorsque l'on cherche, comme en neurophysiologie, à atteindre des profondeurs d'imagerie de plusieurs centaines de microns [10, 7, 14] (voir figure 1.6).

1.2.2.3 Imagerie point à point

En contrepartie, un inconvénient majeur de la microscopie non linéaire par rapport à une microscopie grand champ est la nécessité de balayer le point de focalisation du faisceau pour reconstruire une image. Outre les difficultés de mise en œuvre et le coût du dispositif, ce balayage limite fortement la dynamique temporelle accessible par ces techniques, pour lesquelles il reste très difficile d'obtenir une cadence d'acquisition vidéo des images. Ainsi, pour des objets (organelles, bactéries, protéines membranaires...) ayant un mouvement rapide, il peut se révéler impossible d'échantillonner convenablement la trajectoire.

Certains développements technologiques ont été mis au point pour pallier cet effet : la possibilité par exemple de balayer plusieurs faisceaux pour former un pavage de la zone visualisée a été étudiée [15, 16, 17]. Une alternative intéressante est l'utilisation d'une focalisation selon une ligne, qui réduit le balayage à une seule dimension [18, 19, 20, 21], au détriment toutefois de la résolution axiale de l'image qui se trouve dégradée. Dans les deux cas, le détecteur ponctuel (photomultiplicateur, photodiode) utilisé dans le cas d'un seul point de focalisation doit être remplacé par un détecteur multipoint afin d'acquérir en parallèle l'image des différents points illuminés simultanément dans l'échantillon.

Si ces techniques peuvent effectivement augmenter la cadence d'acquisition des images, elles sont d'une part limitées par la puissance excitatrice nécessaire (multipliée par le nombre de points utilisés par rapport à un balayage monofaisceau) et surtout par la diffusion dans l'échantillon dès que l'on s'enfonce en profondeur. En effet, celle-ci va brouiller les signaux obtenus simultanément (le long d'une ligne ou en plusieurs points), ce qui limite l'utilisation de ces techniques au cas

[8] Quand la profondeur augmente, la collecte devient par contre moins efficace car les photons très diffusés ressortent du tissu hors du champ de vue de l'objectif.

d'échantillons peu épais ou peu diffusants, pour lesquels la microscopie non linéaire n'est pas forcément avantageuse comparée par exemple à la microscopie confocale.

Une autre possibilité est de restreindre la zone imagée à une ligne ou à quelques points dans le tissu. Ceci peut être suffisant pour des applications précises comme l'étude de la vitesse des globules rouges dans un capillaire [14] et permet d'obtenir sur la zone choisie une meilleure résolution temporelle. Il est possible également d'utiliser pour cela des déflecteurs acousto-optiques, dont le temps de réponse est bien supérieur à celui des miroirs galvanométriques (de l'ordre de la microseconde) [22]. Cependant ces éléments présentent de nombreuses contraintes additionnelles : aberrations chromatiques, importante dispersion chromatique conduisant à l'étirement des impulsions, perte d'une grande partie de la puissance excitatrice disponible.

1.2.2.4 Réduction de la phototoxicité et du photoblanchiment

Un autre atout de la microscopie non linéaire par rapport à la microscopie de fluorescence conventionnelle est de diminuer la phototoxicité liée à l'imagerie. Cette réduction est principalement liée à l'utilisation de longueurs d'onde plus élevées dans le cas de la microscopie multiphotonique (700-1300 nm contre 350-600 nm dans le cas de la microscopie de fluorescence classique). En effet, dans le proche infrarouge, l'excitation se situe dans la fenêtre de transparence des tissus (figure 1.10, page 22) dans laquelle l'absorption linéaire des molécules biologiques est réduite. Ainsi, la quantité d'énergie absorbée en dehors du point focal par les tissus est très faible, ce qui limite les effets négatifs de l'illumination :

- d'une part, la phototoxicité induite hors du plan d'imagerie est notablement diminuée par rapport au cas, par exemple, de la microscopie confocale. Dans le domaine de l'embryologie, où l'éclairement peut empêcher le développement normal, la microscopie de fluorescence à deux photons [23] ou la THG [24, 25] permettent de suivre la dynamique du développement en trois dimensions. Des effets phototoxiques existent cependant, notamment du fait de l'importante intensité crête au niveau du point focal. Brièvement, trois types de processus peuvent intervenir : l'échauffement lié à l'absorption du faisceau excitateur par les molécules du milieu ; le claquage optique par création d'un plasma de basse densité conduisant à la formation d'une onde de choc mécanique ; la création d'espèces oxygénées réactives liées notamment à la perturbation de la chaîne respiratoire des cellules. Ces mécanismes de phototoxicité dans le cas de la microscopie THG seront abordés plus en détail dans le chapitre 4.

- d'autre part, dans le cas de la microscopie de fluorescence excitée à deux ou trois photons, on obtient pour la même raison (absorption limitée en dehors du point focal) une nette réduction du photoblanchiment par rapport à la microscopie confocale : en effet, puisque seules les molécules se trouvant dans le plan focal sont efficacement excitées, tout le signal créé participe à la construction de l'image (contrairement au cas de la microscopie confocale où une grande partie du signal est filtrée par le diaphragme).

La microscopie multiphotonique est donc une nouvelle fois particulièrement adaptée pour l'imagerie de tissus épais.

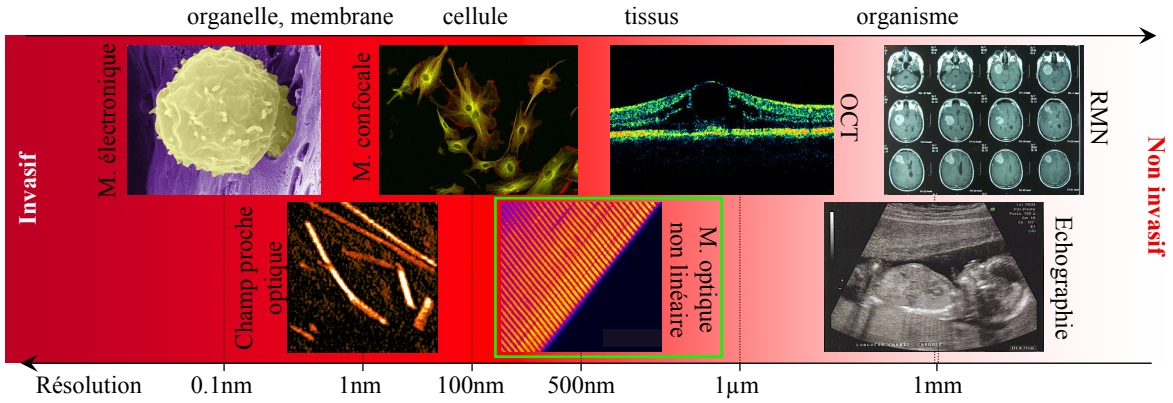


FIG. 1.7 – QUELQUES TECHNIQUES COURANTES D'IMAGERIE EN BIOLOGIE.
Selon le type d'application, on peut utiliser des techniques ayant une résolution "faible" mais peu invasives (résonance magnétique nucléaire (RMN), échographie...), ou bien des techniques permettant une visualisation très détaillée mais fonctionnant sur des échantillons très minces (surface de l'échantillon, coupe mince), souvent *ex vivo* (microscopie électronique...). La microscopie non linéaire se situe dans une gamme intermédiaire, permettant de visualiser des tissus vivants avec une résolution submicrométrique.

1.2.3 Comparaison avec d'autres techniques d'imagerie

La figure 1.7 situe la microscopie non linéaire par rapport à d'autres techniques d'imagerie couramment utilisées. Selon le problème étudié, la technique adaptée sera choisie en fonction d'un compromis entre son invasivité et la résolution nécessaire. Par exemple, la microscopie électronique permet d'observer des détails nanométriques dans les échantillons mais n'est pas adaptée pour travailler sur un tissu vivant.

Ceci nous permet donc de délimiter grossièrement les applications pour lesquelles la microscopie non linéaire sera pertinente : sa résolution étant légèrement inférieure à celle obtenue en microscopie confocale, et sa mise en oeuvre plus complexe, elle est souvent moins adaptée pour l'imagerie cellulaire. Par contre, du fait de sa faible invasivité (voir paragraphe précédent) et de sa bonne pénétration dans les tissus, elle permet d'observer des échantillons épais (organes entiers, petits organismes) avec une résolution meilleure que l'OCT (tomographie par cohérence optique ou *optical coherence tomography*) ou d'autres techniques non optiques (RMN, échographie), tout en conservant la possibilité de travailler sur le long terme.

Ainsi, dans cette thèse, nous concentrerons notre étude essentiellement sur l'imagerie des tissus intacts (chapitre 3) ou de petits organismes tels que des embryons (chapitre 4).

1.2.4 Quelques exemples d'utilisation de la microscopie non linéaire en biologie

Depuis son introduction en 1990 [3], la microscopie de fluorescence excitée à deux photons (2PEF) est progressivement devenue un outil indispensable en biologie. Les applications qui en

sont faites sont donc très nombreuses [2], dans des domaines aussi variés que les neurosciences [14, 26, 27, 28], l'étude de l'angiogénèse [29, 30] et des métastases [31, 32], l'embryologie [6, 23, 33, 25, 34, 35], l'immunologie [36, 37],... Dans cette section, nous rappelons simplement quelles sont les sources de contraste utilisées dans les tissus et quelles sont les applications qui en découlent.

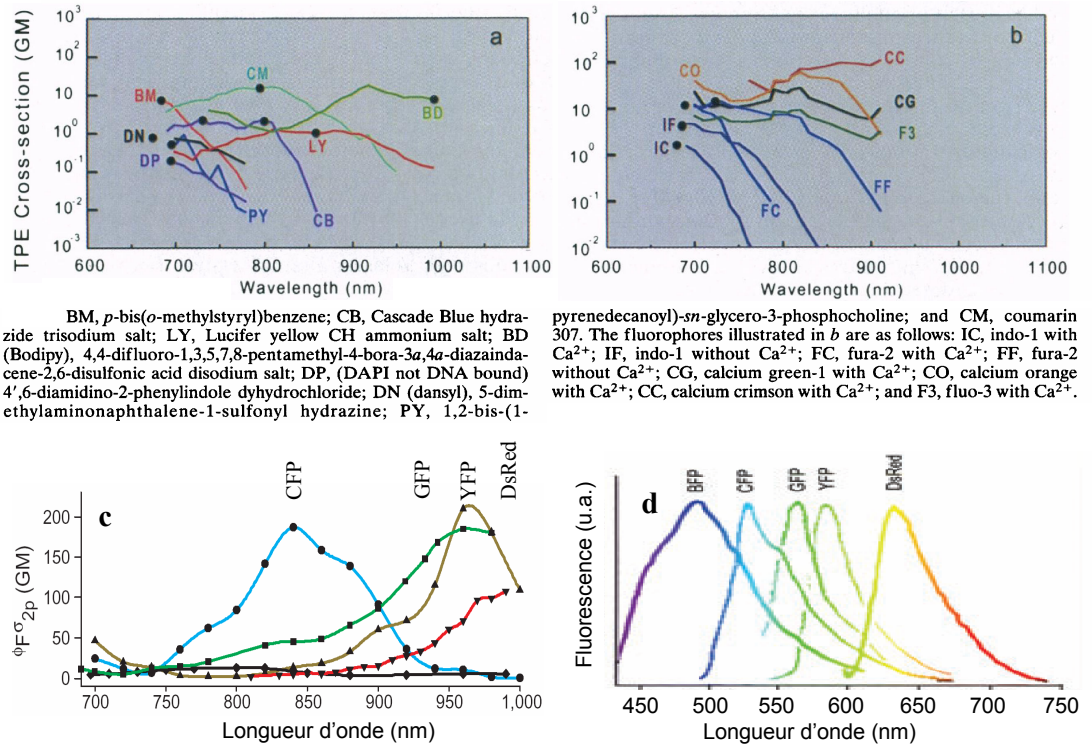
1.2.4.1 Signaux exogènes et signaux endogènes

De façon générale, pour faire l'image d'un tissu à l'aide de la microscopie non linéaire, il est nécessaire qu'il existe dans celui-ci une distribution de composant(s) donnant un signal détectable. Ces composants peuvent être ajoutés dans l'échantillon afin d'améliorer le contraste de l'image ou d'obtenir une cartographie sélective d'un élément du tissu : on parle dans ce cas de source(s) de contraste exogène(s). Mais les sources de contraste peuvent également être des molécules ou des structures du tissu lui-même : elles sont alors dites endogènes.

Ces deux types de contraste ont chacun leurs avantages respectifs. Un marquage exogène permet d'obtenir une très bonne spécificité pour presque n'importe quelle structure cellulaire, voire n'importe quelle molécule (voir par exemple http://probes.invitrogen.com/). On peut ainsi effectuer la cartographie, éventuellement résolue en temps, d'un élément bien précis dans l'échantillon étudié. D'autre part, il existe également de nombreuses sondes fonctionnelles sensibles par exemple aux variations ioniques, de pH... permettant de faire de l'imagerie fonctionnelle. Enfin, le signal obtenu est en général plus fort que pour les marqueurs endogènes, ce qui permet de réduire le niveau d'éclairement ou encore d'augmenter la vitesse d'acquisition des images. En contrepartie, l'utilisation de contrastes exogènes impose les contraintes liées au marquage de l'échantillon : difficulté et inhomogénéité du marquage, perte du contraste due à l'évacuation du marqueur par un tissu vivant, invasivité, toxicité accrue (de nombreuses sondes libérant des espèces radicalaires lors du photoblanchiment).

L'utilisation de contrastes endogènes, plus récente en microscopie non linéaire, permet donc d'apporter des informations complémentaires, voire de se substituer aux marqueurs exogènes. Les sources de contraste pour les différents effets non linéaires ont été depuis peu caractérisées dans les tissus biologiques [38, 39, 40], ce qui rend possible leur utilisation aussi bien pour l'imagerie structurale que pour l'imagerie fonctionnelle (état rédox des tissus par exemple). Les avantages majeurs de leur utilisation sont leur simplicité de mise en œuvre au niveau de la préparation de l'échantillon et leur invasivité réduite.

Finalement, il est possible de combiner la détection de signaux endogènes et exogènes afin d'obtenir des informations complémentaires. C'est l'approche que nous avons privilégiée dans ce travail : tout en cherchant à caractériser les sources de contraste endogènes en microscopie THG, nous avons utilisé des marqueurs fluorescents exogènes à la fois comme outil de caractérisation et pour obtenir des informations complémentaires sur d'autres structures (chapitre 3). Nous allons décrire brièvement les sources de contraste pour les effets non linéaires autres que la THG, dont certains seront utilisés dans les chapitres suivants.



BM, *p*-bis(*o*-methylstyryl)benzene; CB, Cascade Blue hydrazide trisodium salt; LY, Lucifer yellow CH ammonium salt; BD (Bodipy), 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3*a*,4*a*-diazaindacene-2,6-disulfonic acid disodium salt; DP, (DAPI not DNA bound) 4′,6-diamidino-2-phenylindole dyhydrochloride; DN (dansyl), 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl hydrazine; PY, 1,2-bis-(1-pyrenedecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine; and CM, coumarin 307. The fluorophores illustrated in *b* are as follows: IC, indo-1 with Ca^{2+}; IF, indo-1 without Ca^{2+}; FC, fura-2 with Ca^{2+}; FF, fura-2 without Ca^{2+}; CG, calcium green-1 with Ca^{2+}; CO, calcium orange with Ca^{2+}; CC, calcium crimson with Ca^{2+}; and F3, fluo-3 with Ca^{2+}.

FIG. 1.8 – QUELQUES SOURCES DE CONTRASTE EXOGÈNES EN MICROSCOPIE 2PEF.

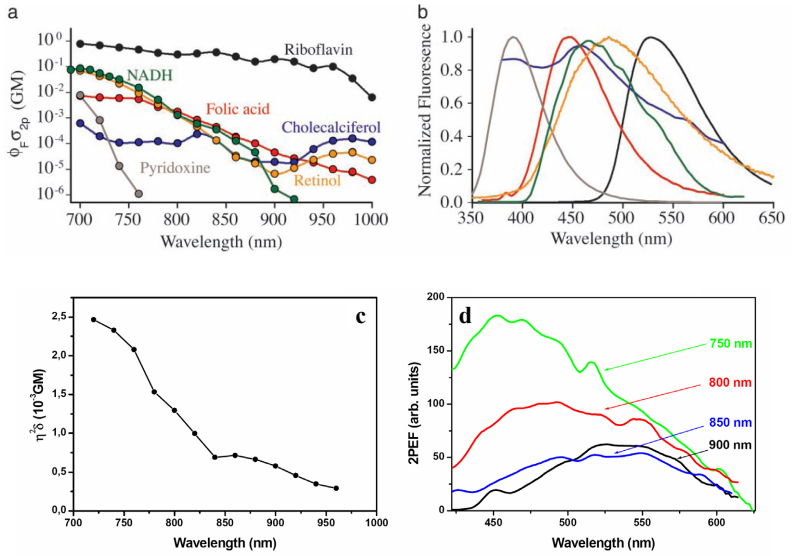
Sections efficaces de colorants traditionnels (a), sensibles au calcium (b) (figures tirées de [41]) et de protéines fluorescentes (c) (figure extraite de [2]). (d) spectres d'émission correspondant des protéines fluorescentes (figure extraite de [42]).

1.2.4.2 La microscopie de fluorescence excitée à deux photons (2PEF)

Le succès de la microscopie 2PEF pour la biologie repose pour beaucoup sur le très grand nombre de fluorophores qu'il est possible d'utiliser pour cibler une problématique précise. Ces marqueurs peuvent être des colorants classiques (figure 1.8,(a) et (b)) [41, 43], généralement développés initialement pour la microscopie 1PEF, mais également des boîtes quantiques (*quantum dots*) [44], ou encore des protéines fluorescentes exprimées directement par l'échantillon que l'on souhaite visualiser (figure 1.8,(c) et (d)) [45,46]. De plus, pour des marqueurs bien choisis, il est possible d'effectuer une détection résolue spectralement et donc de combiner les informations issues de différents marqueurs, en choisissant des fenêtres spectrales adaptées[9].

Le développement de souches transgéniques exprimant une protéine fluorescente greffée sur une protéine d'intérêt a beaucoup accéléré le développement de la microscopie 2PEF pour la biologie. On obtient par cette méthode un marquage dont la spécificité est souvent meilleure qu'avec des colorants classiques. Pour les organismes modèles couramment utilisés, il existe désormais des centaines de souches permettant d'utiliser ces techniques en routine dans les laboratoires de biologie (voir par exemple pour la drosophile : http://flybase.bio.indiana.edu).

[9]notons d'ailleurs que la sélection spectrale des signaux est facilitée par rapport au cas de la fluorescence à un photon, où les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont proches.



e

Molecule	Process	λ_{ex} 50% max, nm*	Cross section
Tyrosine	3PE	<700	1×10^{-84}
Tryptophan	3PE	700–740	1×10^{-84}
Serotonin	3PE	700–720	4×10^{-84}
Melatonin	3PE	700–720	7×10^{-84}
5-HIAA	3PE	700–720	2×10^{-84}
5-HTOL	3PE	700–720	5×10^{-84}
Retinol	2PE	700–830	7×10^{-52}
Flavins	2PE	700–730	$1–8 \times 10^{-51}$
NADH	2PE	690–730	9×10^{-52}
Pyridoxine	2PE	690–710	8×10^{-53}
Folic acid	2PE	700–770	7×10^{-53}
Cholecalciferol	2PE	<700	6×10^{-54}
Elastin	2PE	700–740	—
NFTs	2PE	700–780	—
Lipofuscin	2PE	700–850	High‡
Collagen	SHG	700–740	—
Microtubules	SHG	—	—
Skel. muscle	SHG	—	—

2PE-action cross sections given for 700-nm excitation, units are cm^4 s; 3PE cross sections measured at 720 nm, units are $cm^6 \cdot s^2$. (For comparison to Fig. 1: $10^{-50} \cdot cm^4$ s = 1 GM for 2PE cross sections. There is no unit equivalent to the GM for 3PE cross sections.)
*The Ti:S wavelength range where the cross section is >50% of the peak value.
‡Varies according to type.

FIG. 1.9 – SOURCES DE CONTRASTE ENDOGÈNES EN MICROSCOPIE 2PEF. Spectres d'excitation ((a) et (c)) et d'émission ((b) et (d)) de différentes molécules biologiques ((a) et (b)) et de la kératine ((c) et (d)). (e), sections efficaces et longueurs d'onde d'excitation pour quelques sources de signal en microscopie 2PEF, 3PEF et SHG. Les figures (a),(b) et (e) proviennent de la référence [38], les figures (c) et (d) de la référence [47].

Enfin, il est possible d'utiliser la fluorescence endogène des tissus pour obtenir des informations dans des organismes sauvages, non marqués. La fluorescence endogène est très dépendante à la fois du tissu étudié et de la longueur d'onde d'excitation utilisée. Quelques-uns de ces composés sont présentés sur la figure 1.9, extraite des références [38, 47]. Les sections efficaces correspondantes sont faibles comparées à celles de colorants classiques exogènes [41], mais les concentrations mises en jeu sont généralement beaucoup plus élevées (de l'ordre de la dizaine de mmol/L contre quelques µmol/L pour les colorants classiques) : le signal obtenu peut donc être d'intensité comparable [48].

L'utilisation de ces sources de contraste endogènes a trouvé des applications par exemple pour l'étude de la synthèse de la sérotonine [49,50], de l'organisation des fibres élastiques [51], du stress oxydatif dans l'échantillon [52,53] ou encore des photodommages induits par laser [35,54]. Il faut cependant noter que cette fluorescence repose sur l'absorption d'énergie par l'échantillon et peut donc poser des problèmes de phototoxicité, en particulier pour l'imagerie répétée sur le long terme.

1.2.4.3 La microscopie par génération de seconde harmonique (SHG)

La première démonstration de la microscopie SHG en biologie [55], présentant des images de SHG endogène dans du tendon de queue de rat, est antérieure à la microscopie 2PEF. Cependant, son utilisation ne s'est vraiment développée qu'une décennie plus tard, d'abord avec le développement de colorants efficaces pour la SHG et la fluorescence à deux photons [56,57], puis

grâce à la caractérisation des sources de contraste endogènes [39, 58, 59, 60, 61].

La génération de seconde harmonique n'étant possible que dans le cas d'un milieu non-centrosymétrique [62], les sources de contraste endogènes dans les échantillons biologiques sont constituées d'assemblages denses de molécules ayant une direction privilégiée : filaments de myosine dans les sarcomères musculaires, collagène fibrillaire, microtubules polarisés, granules d'amidon dans les plantes (figure 1.9). Comme la SHG est un phénomène cohérent dont l'intensité croît quadratiquement avec le nombre de molécules (dans le cas d'une distribution homogène), l'intensité du signal obtenu dépend très fortement de la densité et de la régularité avec lesquelles les molécules considérées sont arrangées, et c'est seulement pour les structures très denses et très bien orientées que la faiblesse de la section efficace de diffusion peut être compensée. Ainsi, bien que leurs propriétés intrinsèques soient comparables, le collagène de type I (fibrillaire) peut être détecté *in vivo* tandis que le collagène de type IV (formant des structures de type réseau avec des orientations très variées des molécules) ne donne aucun signal [59].

L'identification des sources et des modes de contraste étant encore récente, les applications de l'imagerie SHG endogène sont encore peu nombreuses : on peut mentionner la mesure de la contraction des sarcomères [63], l'étude de l'orientation des microtubules dans les neurones [64], l'étude de l'organisation des fibres de collagène dans la cornée [65] ou la peau [66] ou encore en cancérologie [29, 31].

1.2.4.4 La microscopie CARS

La microscopie par diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) [67] a pris récemment un essor important du fait de la démonstration de géométries efficaces (notamment avec une excitation colinéaire pour les faisceaux pompe et sonde [68, 69]). Différentes géométries et différentes sources laser ont été utilisées (voir par exemple [70] pour une revue), mais les dispositifs expérimentaux testés restent généralement complexes et peu compatibles avec les autres types de microscopie non linéaire, qui requièrent des impulsions femtosecondes[10].

La microscopie CARS possède cependant l'intérêt fondamental d'être une technique spectroscopique, permettant d'obtenir localement la signature vibrationnelle des molécules composant l'échantillon, sans marquage ni photoblanchiment, et en théorie d'analyser la composition chimique de n'importe quel point de l'échantillon. Bien qu'il soit en pratique difficile d'obtenir un spectre Raman entier sans induire de photodommages et avec un temps d'acquisition raisonnable, il est possible de sonder spécifiquement une ou deux vibrations caractéristiques d'une espèce moléculaire donnée (protéines, lipides, cholestérol...) avec une sensibilité limite d'environ 10^6 oscillateurs dans le volume focal.

En pratique, la mise en œuvre de la microscopie CARS étant généralement limitée par l'intensité réduite du signal pour les espèces présentes en faible concentration, les applications développées jusqu'à présent concernent essentiellement l'imagerie des lipides (corps lipidiques intracellulaires, membranes, gaine de myéline), pour lesquels il est facile d'obtenir un grand nombre d'oscillateurs, donc un signal important, en utilisant une vibration de la liaison carbone-hydrogène [71, 72, 73].

[10] On peut obtenir un signal CARS avec des impulsions femtosecondes, mais le spectre Raman de l'échantillon n'est alors pas résolu du fait de la largeur spectrale importante de la source.

1.3 Caractéristiques de la microscopie THG

1.3.1 Sectionnement optique intrinsèque

Comme nous l'avons précisé dans la section 1.1, la THG est un processus non linéaire : la microscopie THG possède donc toutes les propriétés détaillées dans la section 1.2.2 et notamment un sectionnement optique intrinsèque qu'elle conserve à l'intérieur d'un milieu diffusant.

Ce sectionnement est d'autant meilleur qu'il repose sur un effet d'ordre 3 : la taille de la région sur laquelle le signal est produit efficacement sera plus faible que pour un effet d'ordre 2. Typiquement, sans tenir compte des effets de cohérence (chapitre 2) et pour la même longueur d'onde d'excitation, la résolution sera améliorée d'environ 20% [4]. Si l'on effectue simultanément la détection d'un signal THG et 2PEF par exemple, ce dernier fournira une image moins résolue.

Cependant, les longueurs d'onde choisies pour l'imagerie THG sont en général plus élevées que celles classiquement utilisées en microscopie 2PEF ou SHG. Comme les dimensions du volume focal croissent linéairement avec la longueur d'onde d'excitation λ, son choix influence fortement la résolution obtenue. Par exemple, pour un objectif de même ouverture numérique, la résolution axiale en THG obtenue avec une excitation autour de 1.2 µm sera équivalente à la résolution en 2PEF autour de 950 nm (excitation optimale de la GFP), 20% moins bonne que celle d'une image 2PEF autour de 800 nm, et environ 1.7 fois moins bonne qu'une image de microscopie confocale avec une excitation autour de 400 nm.

	NA	d (mm)	w_{th} (µm)	w_{exp} (µm)	FOV (µm)
Olympus, 60x, eau	0.9	2	2.2	2.0	330
Olympus, 20x, eau	$0.55 - 0.85$ ♢	2.2	–	$2.5 - 6$	1000
Olympus, 60x, eau	1.2	0.3	1.1	–	330

Tab. 1.1 – Différents objectifs utilisés pour l'imagerie THG.
NA, ouverture numérique ; d, distance de travail ; w_{th}, résolution axiale théorique ; w_{exp}, résolution axiale mesurée ; FOV, champ de vue. ♢ : sous-illuminé, estimation à partir de la résolution mesurée. Les résolutions sont mesurées et calculées pour la THG et à une longueur d'onde d'excitation de 1180 nm.

En réalité, la THG est un processus cohérent, c'est-à-dire que les champs rayonnés par les différents diffuseurs présents simultanément dans le volume focal interfèrent pour créer un signal fortement dépendant de la géométrie de l'échantillon à l'échelle du volume focal. Ainsi, il est impossible de définir réellement la résolution d'une image THG car la largeur du profil axial ou latéral du signal THG, pour une même condition de focalisation, dépendra de l'objet considéré (petite sphère, interface plane...). D'autre part, les objectifs commerciaux que nous avons utilisés sont optimisés pour une utilisation sur la gamme de longueurs d'onde disponibles à partir d'un laser titane-saphir (soit environ 700-1000 nm), et non pas pour 1200 nm. Ainsi, les aberrations chromatiques et la différence d'indice entre l'objectif et le milieu d'immersion pourront dégrader

l'image THG par rapport aux images obtenues à des longueurs d'onde plus faibles.

Dans toute la suite, nous avons caractérisé la résolution des images THG par la largeur à mi-hauteur du profil axial obtenu pour une interface perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau séparant deux milieux homogènes, par exemple la surface d'une lamelle de microscope. Dans le cas d'une ouverture numérique de 0.9 et d'une excitation autour de 1.2 µm, on trouve une résolution axiale de 2.0 µm, proche de la valeur mesurée pour le même objectif en fluorescence excitée à deux photons vers 800 nm (1.9 µm). Ceci est à comparer avec les résolutions théoriques de 2.2 µm et 1.92 µm respectivement [4]. On constate que les résolutions des deux techniques sont expérimentalement assez comparables.

1.3.2 Modes de contraste

Jusqu'à récemment, les sources de contraste biologiques en microscopie THG avaient très peu été étudiées. Leur caractérisation représente une grande partie de ce travail (chapitres 2 et 3), et sera donc largement développée dans la suite du manuscrit. Dans ce chapitre d'introduction générale, nous allons nous contenter d'en donner les principales propriétés afin de mieux décrire les applications qui en découlent (section 1.4).

Une importante caractéristique de la microscopie THG est, contrairement au cas de la SHG, qu'il n'existe pas de règle de symétrie annulant la susceptibilité non linéaire $\boldsymbol{\chi}^{(3)}(-3\omega;\omega,\omega,\omega)$. Ainsi, n'importe quelle molécule de l'échantillon peut a priori fournir un signal THG. Il existe cependant des conditions d'accord de phase qui limitent la création du signal au niveau des interfaces et des inhomogénéités du milieu dont la taille est comparable à celle du volume focal, avec une efficacité proportionnelle au carré de la différence de susceptibilité de part et d'autre de l'interface. Ce point sera précisé dans le chapitre 2.

En conséquence, dès que l'échantillon étudié n'est pas parfaitement homogène, il est possible d'obtenir un contraste structural endogène, ce qui supprime la nécessité du marquage. Cette propriété est particulièrement intéressante si l'on cherche à faire de l'imagerie structurale (voir [34] et chapitre 4). En effet, l'image obtenue est à fond noir (puisqu'un milieu homogène ne donne aucun signal) et présente un bon contraste. Par contre, le signal obtenu est a priori peu spécifique, ce qui rend difficile son utilisation pour obtenir des informations fonctionnelles.

On peut cependant noter que les objets qui vont ressortir sur l'image sont très différents de leur environnement, ce qui peut induire une certaine spécificité selon le type d'échantillon observé. On verra ainsi que, dans de nombreux tissus, le signal provient spécifiquement de corps lipidiques micrométriques [40].

D'autre part, il est possible d'utiliser des nanoparticules métalliques comme source de contraste [74, 75]. Le contraste est dans ce cas exogène, mais si les particules sont fonctionnalisées, elles permettent de gagner en spécificité.

1.3.3 Invasivité

La microscopie THG est parfois décrite comme une "technique non invasive", c'est-à-dire ne perturbant pas l'échantillon observé. Cette affirmation repose sur plusieurs caractéristiques de la THG : tout d'abord, comme nous l'avons vu plus haut, il est possible d'obtenir un contraste

endogène dans n'importe quel tissu, donc de travailler sans marquage. Le tissu étudié n'est donc pas perturbé par la présence de molécules exogènes. D'autre part, comme nous l'avons vu dans la partie 1.1, le processus de génération de troisième harmonique en lui-même n'implique pas de déposition d'énergie dans l'échantillon : l'onde incidente est diffusée sans absorption, donc sans provoquer de photoblanchiment ni de phototoxicité. On peut en conséquence affirmer que le processus de génération de troisième harmonique dans un échantillon non marqué est en lui-même non invasif.

Cependant, lorsque des impulsions femtosecondes sont focalisées dans un échantillon, de nombreux processus ont lieu simultanément, avec une efficacité dépendant des caractéristiques du faisceau, sans qu'il soit forcément possible de les supprimer. Ainsi, parallèlement au rayonnement THG, le faisceau excitateur pourra-t-il être partiellement absorbé par certaines molécules du milieu, voire exciter la fluorescence à un ou plusieurs photons de certaines molécules. Dans ce cas, on retrouvera les phénomènes de phototoxicité précédemment décrits.

Il est important de souligner que puisque la THG est un phénomène du troisième ordre, non résonnant pour la plupart des molécules biologiques aux longueurs d'onde utilisées, son efficacité est très faible si on la compare par exemple à celle de la fluorescence excitée à deux photons ou même de la génération de seconde harmonique. Pour obtenir un signal suffisant pour reconstruire une image de l'échantillon, il faut utiliser non seulement des impulsions courtes, mais également une puissance moyenne d'excitation considérable comparée à celle employée en microscopie 2PEF (typiquement 100 mW contre environ 10-20 mW pour l'imagerie de la fluorescence endogène ou 1-5 mW pour l'imagerie de la fluorescence exogène). A titre de comparaison, si un faisceau excitateur comparable (même puissance moyenne, même taux de répétition (80 MHz) et même durée d'impulsion (150 fs)) à la longueur d'onde de 830 nm est focalisé sur l'échantillon, on peut induire localement des effets extrêmement destructeurs (ionisation, ablation) [35].

Ceci souligne l'intérêt de travailler autour de 1.2 µm : comme le montre la figure 1.10, on se situe alors dans la fenêtre de transparence des tissus biologiques, c'est-à-dire la région du proche infrarouge, d'environ 700 jusqu'à 1300 nm, où l'absorption linéaire des tissus est réduite. D'autre part, quand on décale la longueur d'onde d'excitation de 800 nm à 1200 nm, l'absorption à deux photons se trouve elle aussi réduite. En particulier, il devient presque impossible d'exciter des espèces fluorescentes endogènes (voir par exemple [38]). Ceci explique que l'utilisation de cette longueur d'onde permette de réduire de façon significative les effets phototoxiques.

Finalement, l'absence de phototoxicité de l'imagerie THG n'a rien d'évident a priori, et il importe de bien définir les conditions dans lesquelles on ne perturbe pas l'échantillon. Ces conditions, ainsi que les mécanismes sous-jacents, seront étudiés dans le chapitre 4.

1.3.4 Pénétration dans les tissus

De façon générale, plusieurs effets limitent la profondeur de pénétration dans un échantillon, notamment la diffusion de la lumière excitatrice et la déformation de son front d'onde par les aberrations du milieu.

La diffusion induite par un milieu homogène peut être caractérisée par deux paramètres : le libre parcours moyen de diffusion de la lumière, $l_s(\omega)$, qui quantifie la distance moyenne parcourue par un photon d'énergie $\hbar\omega$ entre deux évènements de diffusion, et le coefficient d'anisotropie

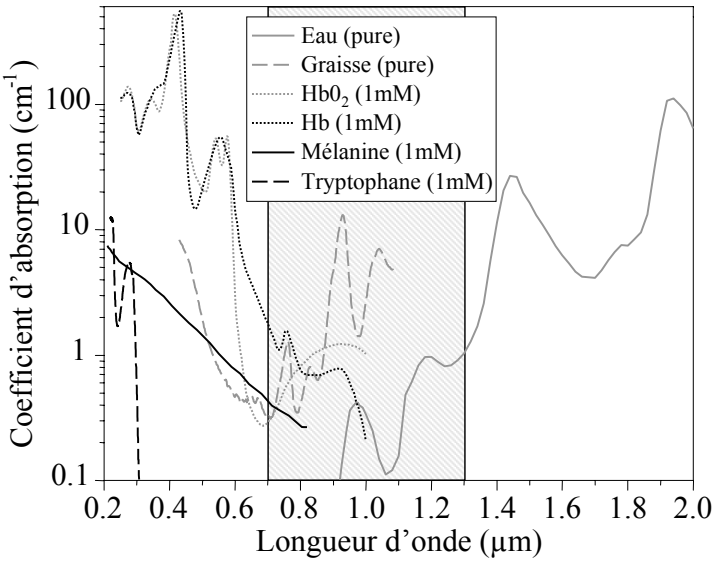


FIG. 1.10 – COEFFICIENT D'ABSORPTION LINÉAIRE DE DIFFÉRENTES MOLÉCULES BIOLOGIQUES.
La zone grisée correspond à la fenêtre de transparence des tissus biologiques. Les données présentées sont disponibles sur le site http://omlc.ogi.edu/.

$g = \langle \cos\theta \rangle$ où θ est l'angle de diffusion. Comme on l'a vu précédemment (paragraphe 1.2.2.2), au moins pour des profondeurs d'imagerie modérées, on peut considérer qu'un photon excitateur diffusé est « perdu », c'est-à-dire qu'il ne produit aucun signal. Ainsi, en première approximation, on considère que l'effet de la diffusion est d'atténuer l'intensité du faisceau excitateur avec la profondeur z selon la loi[11] :

$$I(\omega, z) = I_0 . \exp\left[-\frac{z}{l_s}\right] \tag{1.7}$$

Pour un effet d'ordre n, si l'on considère que l'efficacité de détection du signal avec la profondeur est constante, on obtient donc :

$$I^n(z) = I_0^n . \exp\left[-n\frac{z}{l_s}\right] \tag{1.8}$$

pour une même longueur d'onde d'excitation, le signal de THG décroît donc environ 1.5 fois plus vite que le signal 2PEF ou SHG. Par contre, en utilisant une longueur d'onde plus élevée, on réduit significativement l'atténuation en augmentant l_s : en effet, (bien qu'il existe de grandes disparités entre différents tissus biologiques) de façon générale, la diffusion diminue nettement lorsque la longueur d'onde excitation augmente. La figure 1.11 représente la variation du coefficient de diffusion de la lumière par une solution aqueuse de gouttelettes lipidiques de

[11] En réalité, l'atténuation du faisceau excitateur fait également intervenir son absorption par le tissu, décrite par le libre parcours moyen d'absorption l_{abs}, et on doit écrire : $I(\omega, z) = I_0 . \exp\left[-z(\frac{1}{l_s} + \frac{1}{l_{abs}})\right]$. Cependant dans la majorité des tissus et à la longueur d'onde utilisée, on a $l_{abs} >> l_s$, donc on peut négliger l'absorption dans l'atténuation du signal [9, 76]

taille micrométrique : cet exemple, ainsi que la table 1.2, illustrent l'augmentation de la longueur de diffusion du tissu qui peut compenser la diminution plus rapide du signal THG et même permettre d'obtenir une meilleure pénétration dans les tissus.

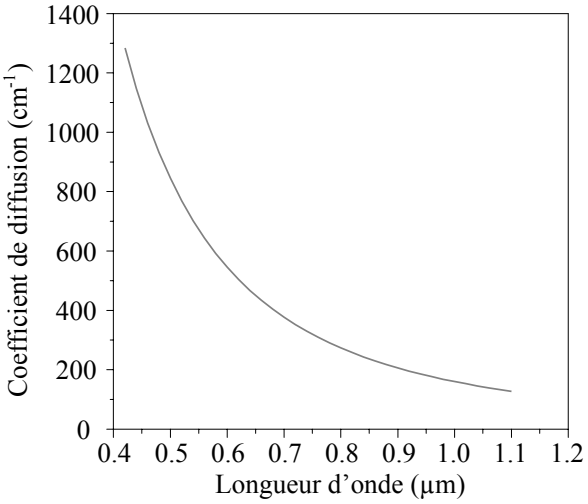


FIG. 1.11 – COEFFICIENT DE DIFFUSION DE GOUTTELETTES LIPIDIQUES.
Le coefficient de diffusion est l'inverse de l_s. Données provenant de la référence [77]. La solution étudiée contient des gouttelettes dont le diamètre varie entre 20 et 700 nm. Les auteurs trouvent une variation de la longueur de diffusion en $\lambda^{2.4}$.

	λ (nm)	l_s (μm)	g
cerveau (matière blanche)	480	42	0.91
	850	71	0.95
	1064	91	0.95
foie	515	35	–
	850	50	0.95
	1064	67	0.93

TAB. 1.2 – DIFFUSION DE DIFFÉRENTS TISSUS BIOLOGIQUES en fonction de la longueur d'onde. Les valeurs sont extraites des références [9] et [76]. Dans les deux cas présentés, la longueur de diffusion l_s croît lorsque la longueur d'onde augmente.

Un autre effet limitant la profondeur de pénétration est la déformation du front d'onde excitateur dans les tissus. Ceux-ci sont généralement optiquement inhomogènes et induisent donc des aberrations qui vont détériorer la focalisation du faisceau d'autant plus sévèrement que l'on s'enfonce dans l'échantillon [78], et ainsi diminuer l'efficacité de création du signal et la résolution de l'image obtenue [79]. Booth *et al.* ont effectivement montré que la correction des aberrations

permettait de restaurer le niveau de signal et la résolution d'une image en microscopie confocale, mais ce type de correction a pour l'instant à peine été exploré pour la microscopie non linéaire [80].

1.3.5 Combinaison avec d'autres techniques de microscopie

Finalement, la THG est facilement combinable avec d'autres techniques de microscopie non linéaire, telles que la microscopie 2PEF ou la microscopie SHG, ainsi qu'avec les techniques d'ablation induite par laser [35]. En effet, comme nous le verrons dans la section suivante, le dispositif expérimental utilisé pour ces différentes techniques est quasiment identique, à l'exception de la source lumineuse et des filtres pour la détection du signal. On pourra donc combiner des informations obtenues par différentes techniques et surtout implanter cette technique sur des dispositifs déjà existants.

La limitation essentielle concerne la longueur d'onde d'excitation utilisée : en effet, les sources émettant des impulsions autour de 1.2 µm (oscillateurs paramétriques optiques, lasers chrome-forsterite) sont encore peu répandues et limitées en puissance en comparaison des lasers titane-saphir. Ainsi, il sera difficile par exemple de disposer d'assez de puissance en sortie du laser pour pouvoir ajuster la puissance utilisée dans le microscope en fonction de la profondeur d'imagerie comme ceci est fait en microscopie à deux photons [8, 10].

D'autre part, ce changement de longueur d'onde implique que les espèces dont la fluorescence est excitée ne seront pas les mêmes : comme il a été mentionné dans le paragraphe 1.3.3, il est par exemple impossible d'exciter l'autofluorescence des tissus à de très rares exceptions près (notamment l'excitation du rétinal à trois photons, voir section 3.3.4, ou la fluorescence induite par des dommages au tissu). En effet, la fluorescence de ces composés provient en majorité de résidus aromatiques dont l'absorption à un photon se situe dans l'ultraviolet. Dans l'infrarouge leur section efficace d'excitation s'écroule donc pour les grandes longueurs d'onde (figure 1.9).

De plus, beaucoup de colorants développés jusqu'à très récemment pour la microscopie 2PEF sont plutôt excitables dans la gamme 700-1000 nm, correspondant à celle des lasers titane-saphir. En particulier, il est impossible d'exciter une protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*, ou GFP) avec le faisceau utilisé pour faire une image THG. Dans le cas de ce type de marquage, on devra travailler séquentiellement avec deux faisceaux différents [46].

Ce sera également le cas pour la combinaison THG/photodissection, cette dernière étant beaucoup plus efficace pour des longueurs d'onde comprises dans la gamme 700-1000 nm, probablement parce que l'absorption à deux et trois photons y est plus importante [35, 81, 82]

Il existe cependant de nombreux colorants classiques dont la fluorescence se situe dans le rouge et qui peuvent donc être excités à deux photons avec un laser compatible avec la THG. Depuis quelques années, de nouvelles protéines ont également été développées dont l'excitation est décalée vers l'infrarouge plus lointain (figure 1.8), permettant une excitation autour de 1100-1200 nm [40,83,79]. Ainsi, en choisissant correctement le marquage utilisé, on pourra combiner microscopie 2PEF et microscopie THG et discriminer les signaux en effectuant une simple détection spectrale (figure 1.12).

Cette simplicité de mise en œuvre sur des microscopes conçus pour la microscopie 2PEF constitue l'un des atouts majeurs de la microscopie THG : en effet, comme dans le cas de

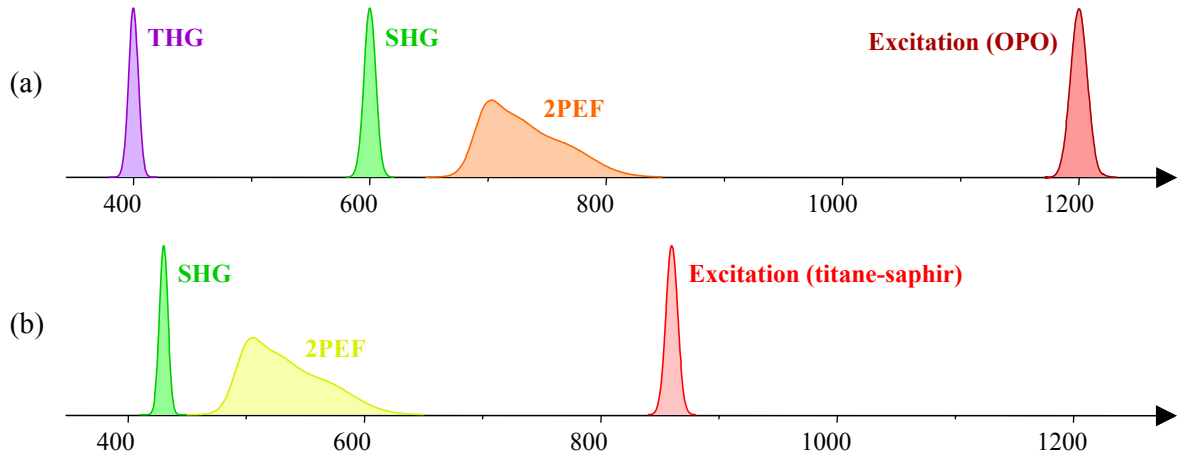


FIG. 1.12 – COMBINAISON DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES D'IMAGERIE.
(a), cas d'une excitation autour de 1.2 µm : les signaux THG et SHG sont détectés aux longueurs d'onde tiers et moitié, tandis que la fluorescence se situe au delà de la longueur d'onde moitié. Dans le cas où le marqueur fluorescent n'est pas excitable à 1.2 µm, on peut réaliser une deuxième image (b) à l'aide d'un laser titane-saphir et recaler les deux images à l'aide du signal SHG dont la spécificité est la même pour toutes les longueurs d'onde.

la SHG endogène, la THG fournit des informations supplémentaires sur l'échantillon avec une modification minimale du dispositif expérimental. C'est un avantage par rapport à la microscopie CARS, qui impose l'utilisation d'une combinaison complexe d'impulsions qui ne sont pas adaptées pour la SHG ou la fluorescence à deux photons.

1.4 Etat de l'art de la microscopie THG

Afin de resituer le travail présenté ici dans son contexte, nous allons présenter brièvement l'état de l'art de la microscopie THG en biologie. Cette technique étant récente, les applications qui en ont été faites sont peu nombreuses et peu avancées au niveau biologique : bien que différentes voies aient déjà été explorées (ou l'aient été depuis), une grande partie de la caractérisation des sources et des modes de contraste restait à faire au début de ce travail.

1.4.1 Démonstrations de principe

Les premiers articles sur la microscopie THG appliquée à la biologie datent de la fin des années 90, et représentent essentiellement des démonstrations de principe sans réelle application en biologie. Deux groupes ont publié quasi-simultanément des images de microscopie THG : celui de Y. Silberberg [84,85] et celui de J. Squier [86,87]. Les auteurs montrent que des images structurales avec une résolution micrométrique peuvent être obtenues à partir de différents échantillons (algue verte, neurones en culture, levures) sans que les sources de contraste soient clairement identifiées. Les longueurs d'onde d'excitation utilisées sont 1.5 µm [84,85] ou 1.2 µm [86,87], permettant une

détection dans le visible. Dans ces articles, les auteurs utilisent des puissances d'excitation relativement modérées (15-50 mW), ce qui conduit à des temps d'acquisition de plusieurs dizaines de seconde pour des images de taille moyenne (300×300 pixels par exemple, soit environ 10^5 pixels).

Les auteurs discutent également des caractéristiques des images THG, où ressortent principalement des structures de taille micrométrique (organelles) et des interfaces telles que les parois cellulaires. Ceci est confirmé par l'analyse théorique de Cheng *et al.* [88], qui montrent par des simulations que les conditions d'accord de phase conduisent à une annulation du signal pour un milieu homogène et isotrope et à l'exaltation de structures de taille comparable à celle du volume focal.

Un peu plus tard, le groupe de C.K. Sun [79, 89] démontre la combinaison des microscopies THG, SHG et 2PEF au niveau de parois cellulaires dans des tiges de maïs, puis dans un embryon de poisson-zèbre.

1.4.2 Applications en imagerie structurale

Les premières études des applications potentielles de la microscopie THG en biologie concernent l'imagerie structurale, où le signal THG est utilisé pour obtenir une image résolue en trois dimensions des différentes structures dans l'échantillon, sans grande spécificité. Ceci permet entre autres de suivre des mouvements et peut être exploité en biologie du développement par exemple : Chu *et al.* [24,34] ont ainsi montré qu'il était possible de suivre sans marquage le développement d'un embryon de poisson-zèbre depuis les premiers stades (quelques cellules) jusqu'au stade de la larve, sans observer de dommages ni de retard au niveau du développement. Dans cette étude, la source utilisée est un laser chrome-forsterite centré autour de 1230 nm, émettant des impulsions de 100 fs avec une puissance sur l'échantillon de 100 mW. Les auteurs combinent le signal THG avec le signal SHG provenant des faisceaux de microtubules lors de la division cellulaire puis des muscles de la larve.

D'autres études ont également été menées sur des échantillons de peau [90] montrant que la microscopie THG peut être utilisée, éventuellement en combinaison avec d'autres techniques, pour décrire la morphologie d'un tissu.

Enfin des études en polarisation ont été réalisées pour extraire des informations sur l'orientation des structures donnant le signal THG : dans les articles de Oron *et al.* [91, 92], les auteurs utilisent les propriétés de polarisation de la lumière diffusée non linéairement pour caractériser des cristaux biologiques, tels que des spicules d'oursins ou des cystolithes, assemblages partiellement cristallisés de carbonate de calcium contenus dans les feuilles de certains arbres. Il est possible de cette manière d'obtenir des informations sur le degré de cristallisation des objets étudiés et sur la direction de ces cristaux. D'autres études ont porté sur le signal obtenu dans le muscle de souris [93], mais aucune information sur la source du signal THG n'est donnée : les auteurs ne tirent donc pas d'information de la dépendance en polarisation observée.

De façon générale, ces études démontrent les possibilités de l'imagerie THG en biologie ainsi que ses limites (notamment sa faible spécificité dans beaucoup de tissus). Cependant, à ce stade, les images ne sont pas utilisées pour extraire ou quantifier un paramètre biologique.

1.4.3 Etudes des sources de signal endogènes

D'autre part, des études ont visé à caractériser plus précisément les sources de contraste dans les échantillons biologiques. C'est notamment le cas des articles de Canioni *et al.* [94, 95, 96], qui s'intéressent à l'imagerie sans marquage des flux calciques par microscopie THG. Les auteurs mesurent les variations de signal THG au niveau de la membrane plasmique de cellules en culture lors de l'ajout de drogues modifiant la concentration cytoplasmique en calcium, et attribuent les variations du signal THG aux changements de concentration calcique de part et d'autre de la membrane. Cependant, aucune évaluation quantitative des variations de concentration n'est présentée, et ces expériences ne sont confirmées par aucune expérience *in vitro*. Nous verrons dans le chapitre 3 que ces variations de signal ne semblent pas être directement liées aux flux calciques, ce qui met en évidence la difficulté de l'interprétation de ces signaux.

D'autres auteurs [97, 98] ont tout de même montré que la susceptibilité non linéaire d'une solution de chlorure de calcium dépendait de la concentration de cette espèce, mais les gammes de concentration mises en jeu dans ces articles sont supérieures de plusieurs ordres de grandeur à celles citées précédemment (quelques mol/L contre au plus quelques centaines de µmol/L en milieu cellulaire).

De leur côté, Clay *et al.* [99] ont cherché à caractériser les propriétés de nombreux composés en solution, et notamment l'hémoglobine selon son degré d'oxydation. Les auteurs proposent une étude spectroscopique en fonction de la longueur d'onde d'excitation, démontrant l'influence sur l'amplitude du signal THG de résonances à un, deux ou trois photons. A partir de ces données, les états d'oxydation de l'hémoglobine peuvent, en théorie, être différentiés par leur signal THG, d'où la possibilité de sonder avec cette technique l'oxygénation des tissus. Cette étude corrobore les travaux de Barzda *et al.* [100] montrant qu'il est possible, dans des cardiomyocytes, de mesurer un signal corrélé à la distribution des mitochondries (riches en hémoprotéines), sans marquage.

Bien que l'application biologique de ces résultats soulève de nombreuses difficultés (notamment en termes de variation relative de signal et de phototoxicité, voir chapitre 4), la quantification des propriétés de solutions biologiques pour la THG est une étape essentielle pour la compréhension des sources de contraste dans les tissus. Ces deux derniers articles apportent donc beaucoup pour la caractérisation des signaux cellulaires.

1.4.4 Développements techniques

Enfin, quelques articles ont proposé des améliorations techniques de la microscopie THG :

a Utilisation de nano-objets métalliques Afin d'améliorer le signal THG et sa spécificité, Yelin *et al.* [74] proposent l'utilisation de nanoparticules métalliques pour marquer les échantillons étudiés. Les auteurs montrent que ces particules, en exaltant localement le champ électrique, peuvent être détectées sélectivement dans des cellules vivantes ou fixées et localisées en trois dimensions. Cette démonstration a été complétée par des études plus exhaustives notamment de la dépendance du signal THG avec la taille des particules et avec la longueur d'onde d'excitation [75, 101]. Ces études sont à rapprocher de l'utilisation de la THG en microscopie de champ proche [102] pour l'imagerie de cristaux biologiques.

Bien qu'elle limite l'intérêt de la microscopie THG, notamment en termes de simplicité de préparation des échantillons et de non-invasivité, l'utilisation d'un marquage exogène peut s'avérer utile pour obtenir des informations complémentaires à celles obtenues avec les signaux endogènes. Ces signaux ont par exemple l'avantage par rapport à la fluorescence des quantum dots de ne pas clignoter, ce qui permet de suivre les particules continûment. Cependant, il faut noter qu'aucune étude de phototoxicité de ce type d'imagerie THG n'a été publiée, de même qu'aucune application en biologie.

b Imagerie THG sans balayage En conclusion, le groupe de Y. Silberberg s'est intéressé à la possibilité d'effectuer des images THG plein champ tout en conservant une bonne résolution axiale. Pour ce faire, les auteurs ont développé une méthode de focalisation temporelle de l'impulsion (*temporal focusing*) [20] permettant d'obtenir un sectionnement optique par la focalisation temporelle de l'impulsion dans l'échantillon au niveau du plan focal. Les auteurs illustrent cette technique dans le cas de la microscopie 2PEF et non THG, où ils sont limités par la puissance d'excitation nécessaire (il faut en effet illuminer l'ensemble du champ de vue simultanément, contre un point dans le cas de la microscopie à balayage).

Cependant, cette technique de *temporal focusing* peut être combinée avec la focalisation du faisceau selon une ligne (ce qui réduit le balayage à une dimension) afin d'obtenir un sectionnement équivalent à celui obtenu pour une focalisation à deux dimensions spatiales du faisceau [21, 103] et (si la puissance d'excitation suffisante est disponible) une nette diminution de la durée d'acquisition des images. Dans le cas de la microscopie 2PEF, les auteurs démontrent ainsi une acquisition des images à la cadence vidéo, avec un sectionnement confocal.

1.5 Dispositif expérimental pour l'imagerie THG

Le principe du dispositif expérimental utilisé pour les expériences de microscopie est schématisé sur la figure 1.13 : une ou plusieurs sources laser sont mises en forme temporellement et spatialement, puis envoyées vers le microscope.

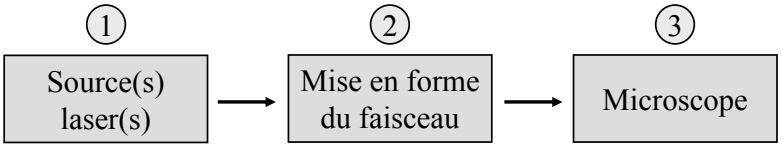


Fig. 1.13 – Principe du dispositif expérimental.

1.5.1 Les sources utilisées

Deux sources impulsionnelles différentes sont utilisées dans nos expériences : un laser titane-saphir (Mira, Coherent) et un oscillateur paramétrique optique (APE, Berlin).

a Oscillateur titane-saphir Le laser titane-saphir est accordable de 700 à 950 nm et délivre des impulsions de l'ordre de 150 fs à un taux de répétition de 76 MHz. Avec une puissance de pompe de 10 W (laser Verdi V10, pompé par diode et émettant à 532 nm, Coherent), il délivre jusqu'à 1.8 W en fonctionnement en modes bloqués au centre de la gamme d'accordabilité. Comme illustré sur la figure 1.14, une fraction du faisceau obtenu peut être envoyée vers le microscope directement avec une puissance modulée par un ensemble lame demi-onde + polariseur ; la puissance au foyer de l'objectif peut donc être ajustée en fonction du type d'application : faible pour l'imagerie de signaux exogènes (5-10 mW au foyer de l'objectif), intermédiaire pour l'imagerie de signaux endogènes (15-30 mW au foyer de l'objectif), forte pour la photoablation des tissus (100-300 mW au foyer de l'objectif). La fraction restante du faisceau est envoyée vers un oscillateur paramétrique optique qui constitue la deuxième source utilisée pour ces expériences de microscopie.

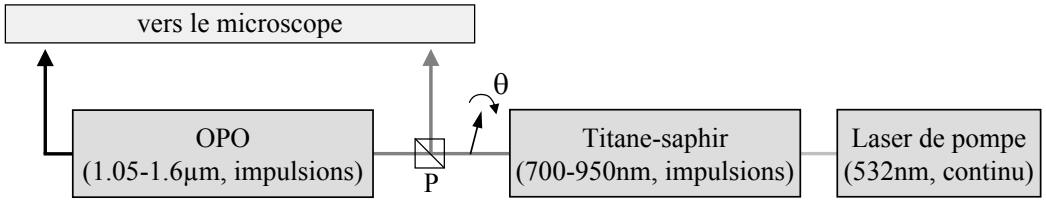


FIG. 1.14 – ENSEMBLE DES SOURCES UTILISÉES.
La polarisation du laser titane-saphir est contrôlée par une lame demi-onde qui tournée d'un angle θ fait tourner cette polarisation d'un angle 2θ. La puissance envoyée vers le microscope varie donc continûment selon $\cos^2(2\theta)$, et celle utilisée pour le pompage de l'OPO varie selon $\sin^2(2\theta)$.

b Oscillateur paramétrique optique La seconde source utilisée est un oscillateur paramétrique optique (OPO) pompé de manière synchrone par le laser titane-saphir. Deux cristaux non linéaires différents peuvent être utilisés dans l'OPO, CTA (gamme 1300-1600 nm) ou KTP (gamme 1050-1300 nm). C'est ce deuxième cristal qui a été utilisé pour les expériences présentées.

Les caractéristiques des impulsions en sortie de l'OPO (pour le cristal de KTP) sont présentées sur la figure 1.15.

1.5.2 Mise en forme du faisceau

Le dispositif expérimental de mise en forme du faisceau est présenté sur la figure 1.16. Il se compose de quatre parties différentes :

a Contrôle de la puissance et de la polarisation Le faisceau est polarisé linéairement en sortie de l'OPO et on utilise tout d'abord une lame demi-onde pour contrôler sa direction de polarisation (partie (1)). Si l'on souhaite également réguler la puissance envoyée vers le microscope, on rajoute un polariseur (partie (2)), qui permet de moduler la transmission de l'ensemble. La fraction du faisceau restante est envoyée sur un échantillon de référence dont le signal est destiné

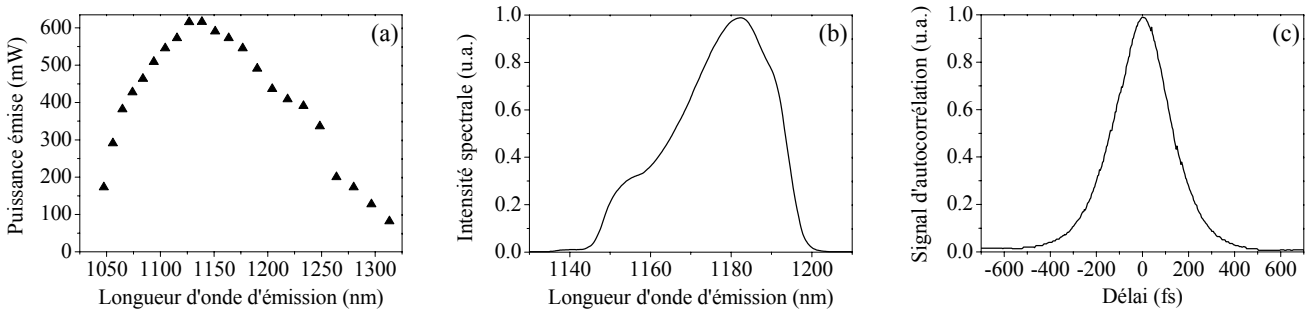


FIG. 1.15 – CARACTÉRISTIQUES DE L'OPO.
(a), puissance moyenne en sortie de l'OPO en fonction de la longueur d'onde centrale. (b), spectre et (c), autocorrélation d'intensité des impulsions pour une longueur d'onde centrale de sortie de 1180 nm, la plus utilisée dans la suite de ce travail. La largeur spectrale à mi-hauteur est de 28 nm, et la durée des impulsions à mi-hauteur 200 fs.

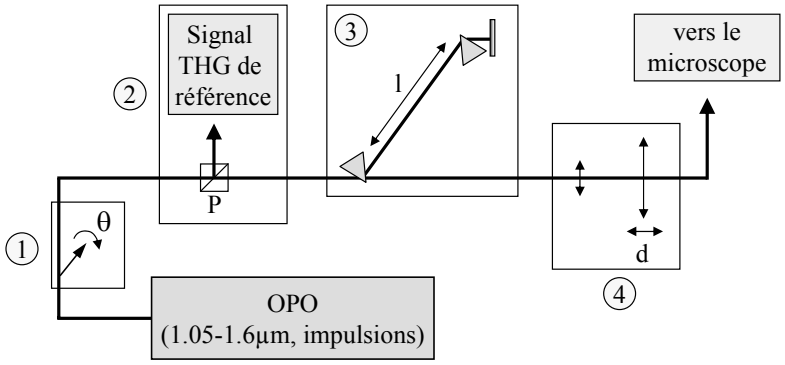


FIG. 1.16 – MISE EN FORME DU FAISCEAU DE L'OPO.
(1), contrôle de la polarisation (si (2) est absent) ; (1)+(2), contrôle de la puissance envoyée vers le microscope et voie de référence ; (3), précompensation de la dispersion de l'impulsion ; (4), contrôle du diamètre du faisceau au niveau de la pupille arrière de l'objectif de focalisation. Tous les dispositifs de mise en forme peuvent éventuellement être retirés du trajet du faisceau.

à normaliser celui obtenu dans le microscope. L'échantillon est une lame de silice sur laquelle le faisceau est focalisé à l'aide d'une lentille de focale f = 50 mm. Dans le cas où l'on cherche à contrôler la polarisation, on remplace le polariseur par une lamelle de verre qui va réfléchir une fraction du faisceau vers l'échantillon de référence[12].

b Contrôle de la dispersion de l'impulsion L'impulsion en sortie de l'OPO présente une dispersion positive (dispersion normale) qui élargit l'impulsion : en effet, si l'on compare la durée calculée de l'impulsion limitée par transformée de Fourier (figure 1.17,(c)) et celle mesurée (figure 1.17,(d), courbe en pointillés fins), on trouve un élargissement d'un facteur 2.6. De plus,

[12]On pourrait également garder le polariseur et rajouter derrière une seconde lame demi-onde. Cependant dans nos expériences, nous étions généralement limités par la puissance excitatrice disponible sous l'objectif donc nous avons cherché à limiter le nombre d'éléments insérés sur le trajet du faisceau.

la traversée des optiques avant et dans le microscope induit de la dispersion supplémentaire pour aboutir sous l'objectif à des impulsions de 250 fs (figure 1.17,(d), courbe en pointillés larges).

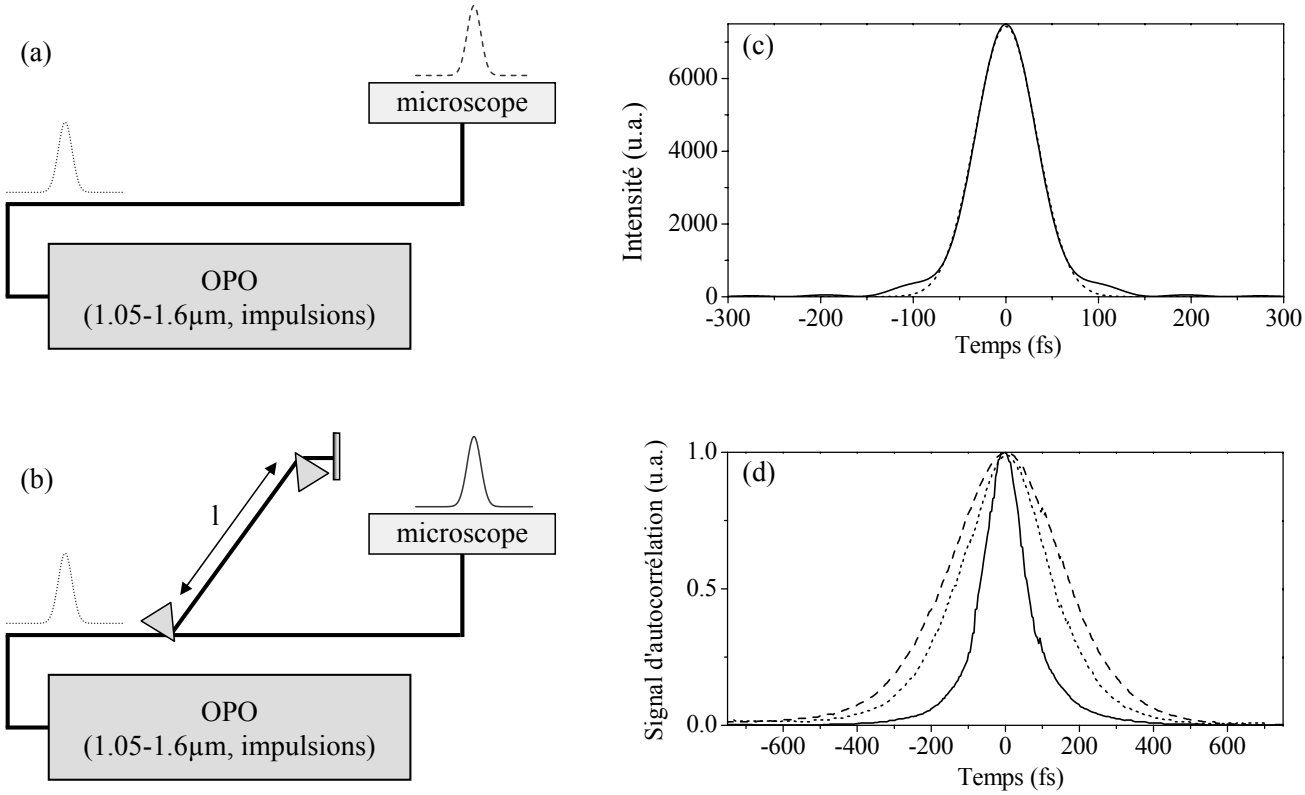


FIG. 1.17 – MISE EN FORME TEMPORELLE DU FAISCEAU DE L'OPO.
Schéma du dispositif expérimental avec (b) et sans (a) précompensation de la dispersion, avec les points de mesure de la durée des impulsions. (c), Impulsion limitée par transformée de Fourier calculée à partir du spectre de la figure 1.15 (traits pleins) et ajustement gaussien (traits pointillés) donnant une largeur à mi-hauteur de 77 fs. (d), signal d'autocorrélation obtenu en sortie de l'OPO (pointillés courts), sous l'objectif sans précompensation de la dispersion (pointillés longs) et avec précompensation de la dispersion (traits pleins). Les courbes correspondent à des durées d'impulsion de 200, 250 et 95 fs respectivement (en supposant une forme d'impulsion gaussienne, c'est-à-dire en divisant la largeur à mi-hauteur du signal d'autocorrélation par $\sqrt{2}$).

Comme on l'a vu à la section 1.1, le signal THG dépend fortement, pour une même puissance moyenne, de la durée des impulsions : il est donc important de chercher à obtenir sous l'objectif les impulsions les plus courtes possibles. Pour cela, on insère dans le trajet du faisceau une ligne à dispersion négative constituée de deux prismes de silice fondue que le faisceau traverse deux fois (partie (3)). On peut montrer [104, 105] que ce dispositif permet d'introduire une dispersion du second ordre (group velocity dispersion, ou GVD) dans le faisceau dont la quantité est directement liée à la distance l entre les prismes (figure 1.16)[13]. En choisissant convenablement cette distance, on peut annuler la GVD des impulsions, donc les raccourcir.

[13]Dans le cas général, la GVD négative induite dans l'impulsion dépend également de la longueur du trajet optique de l'impulsion dans les prismes, donc de l'insertion des prismes dans le faisceau. Cependant autour de 1.2 µm,

A partir des mesures de la figure 1.15, on calcule une GVD dans l'impulsion d'environ $6000\,\mathrm{fs}^2$ [106], compensable par une distance inter-prismes $l \approx 3\,\mathrm{m}$ [105]. Expérimentalement, il s'agit effectivement de la distance pour laquelle les impulsions mesurées au foyer de l'objectif Olympus 20x (voir table 1.1) sont les plus courtes. Cependant, on mesure alors une durée de 95 fs (figure 1.17,(d), courbe en traits pleins), soit toujours $20-25\%$ supérieure à celle des impulsions limitées par transformée de Fourier. Nous avons attribué cet élargissement résiduel à la dispersion du troisième ordre (*third-order dispersion*, ou TOD) qui n'est pas compensable avec un tel système.

Du fait de cette dispersion résiduelle, la durée n'est pas très sensible à la quantité de GVD dans l'impulsion tant que cette quantité est faible (c'est-à-dire quand la TOD domine l'élargissement de l'impulsion). Ainsi, nous avons pu vérifier que la même distance l était optimale pour les différents objectifs de focalisation utilisés dans cette étude et dont l'épaisseur optique est pourtant différente : il est donc inutile d'ajuster l entre les différentes expériences.

L'ajout de cette ligne de prismes induit des pertes importantes en puissance, notamment par réflexion : la puissance moyenne au foyer de l'objectif se trouve réduite de 40%. Si l'on tient compte de cette variation de puissance ainsi que du changement de la durée des impulsions, on trouve un signal THG de même amplitude que sans la ligne de compensation, ce que nous avons vérifié expérimentalement (voir chapitre 4). Ainsi, on peut obtenir le même signal avec une puissance moyenne réduite sur l'échantillon. Nous verrons dans ce même chapitre 4 les conséquences de cette amélioration sur l'invasivité de l'imagerie THG.

Cette compression des impulsions ayant été réalisée à la fin de ce travail, tous les résultats (jusqu'au chapitre 4, quand il en est fait mention) présentés ici sont obtenus pour des impulsions de 250 fs au niveau de l'échantillon.

c Contrôle du diamètre du faisceau excitateur Enfin, pour certaines expériences, on cherche à faire varier la taille du volume focal d'excitation au niveau de l'échantillon. Pour cela, nous avons choisi de faire varier le diamètre du faisceau excitateur au niveau de la pupille arrière de l'objectif de focalisation en changeant, avant le microscope, la divergence du faisceau. A cette fin, on rajoute sur le trajet du faisceau un télescope constitué de deux lentilles quasi-confocales de focales respectives 50 et 100 mm. Si les lentilles sont parfaitement confocales, elles introduisent un grandissement de 2. Si on change maintenant légèrement la position de la deuxième lentille autour de la position confocale (paramètre d, partie (4) dans la figure 1.16), on fait varier la divergence du faisceau ; comme le trajet optique entre ce télescope et la pupille arrière est d'environ 2 m, on peut ainsi changer fortement mais continûment l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.

Nous avons caractérisé cette ouverture numérique effective, pour différentes positions respectives des lentilles, en mesurant la résolution axiale obtenue sur une lamelle de microscope (voir chapitre 2 et section 2.2, figure 2.28) : celle-ci varie, pour l'objectif Olympus 20x, de 2 µm à 6 µm, soit une ouverture numérique effective comprise environ entre 0.5 et 0.9.

D'autre part, pour des expériences sur tissu ne nécessitant pas une résolution sub-micrométrique des images mais pour lesquelles une puissance d'excitation importante est requise,

on se situe quasiment au minimum de dispersion de la silice, ce qui rend cet effet très faible. Expérimentalement, nous n'avons effectivement vu aucune variation de la durée des impulsions avec l'insertion des prismes.

sous-illuminer l'objectif de cette façon permet d'augmenter sa transmission et donc l'intensité au point focal.

1.5.3 Microscope

Il s'agit d'un microscope droit, entièrement construit au laboratoire, représenté sur la figure 1.18. Le faisceau excitateur est focalisé sur l'échantillon à l'aide d'un objectif (Olympus, voir table 1.1) et le point de focalisation est balayé dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau par des miroirs galvanométriques (GSI Lumonics). Le plan de focalisation selon la direction du faisceau est, quant à lui, déterminé par la position de l'objectif, commandée par un moteur pas à pas.

Le signal obtenu peut alors être détecté soit en épicollection à travers l'objectif focalisant le faisceau excitateur, soit en transmission à travers un condenseur. Des photomultiplicateurs (PMT) en régime de comptage de photons associés à une électronique de comptage fonctionnant à 100 MHz, permettent, à l'aide de filtres appropriés[14], de détecter le(s) signal(aux) produit(s) par chaque impulsion[15]. Enfin, une source de lumière blanche située derrière le condenseur permet de visualiser les échantillons en lumière transmise et l'image plein champ peut alors être directement enregistrée en niveaux de gris à l'aide d'une caméra.

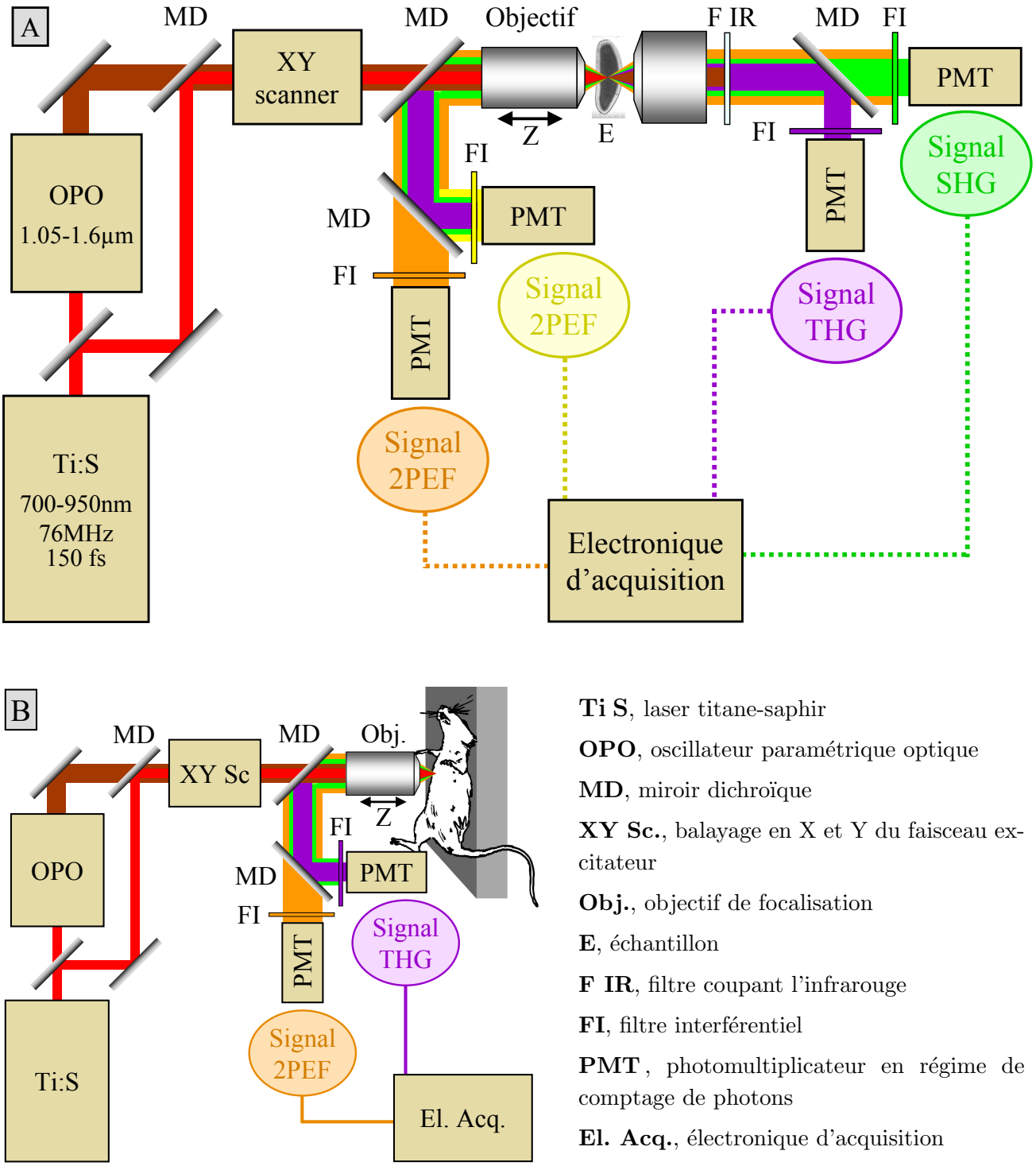
L'éclairement de l'échantillon par le faisceau excitateur et l'acquisition des images sont synchronisés à l'aide d'une électronique d'acquisition commandant simultanément l'ouverture et la fermeture d'un obturateur de faisceau avant le microscope, le balayage du champ par les miroirs galvanométriques et le comptage des photons pour chaque pixel. L'ensemble permet l'acquisition d'images à une cadence maximale d'environ 0.3 pixel/µs.

Les objectifs utilisés sont des objectifs à eau ayant une distance de travail d'environ 2 mm, ce qui permet de réduire l'encombrement et l'hypoxie au niveau de l'échantillon. L'espace restant permet alors d'installer des micromanipulateurs ou un système de perfusion si l'on travaille sur un organe entier.

Enfin, dans le cas d'un échantillon avec un encombrement très important (animal entier...), il est possible d'enlever la partie inférieure du microscope (condenseur et détecteurs, voir figure 1.18) afin de disposer de plus d'espace.

[14] Les filtres coupant l'infrarouge, systématiquement utilisés dans ces expériences, sont : 2 E700SP (Chroma) devant chaque PMT dans le cas du titane-saphir ; un KG3 (Chroma) d'épaisseur 1 mm dans le cas de l'OPO.

[15] En théorie, il est possible d'acquérir simultanément tous les signaux désirés sous réserve qu'ils soient séparables spectralement. Cependant dans notre cas, l'électronique de comptage permet l'acquisition simultanée de seulement deux canaux.



Ti S, laser titane-saphir

OPO, oscillateur paramétrique optique

MD, miroir dichroïque

XY Sc., balayage en X et Y du faisceau excitateur

Obj., objectif de focalisation

E, échantillon

F IR, filtre coupant l'infrarouge

FI, filtre interférentiel

PMT, photomultiplicateur en régime de comptage de photons

El. Acq., électronique d'acquisition

FIG. 1.18 – SCHÉMA DE PRINCIPE DU MICROSCOPE.
Dans le cas d'un échantillon mince, le signal peut être détecté en transmission à travers un condenseur (A). Pour un échantillon épais, les signaux sont collectés en épidétection (B). On verra au chapitre 2 dans quelles conditions on peut enregistrer le signal THG vers l'arrière.

Chapitre 2

Facteurs géométriques en imagerie THG

Comme il a été souligné dans la section 1.3, le caractère cohérent de la génération de troisième harmonique par une particule a des conséquences importantes sur la structure du signal créé par un ensemble de diffuseurs. En effet pour obtenir l'expression de l'intensité diffusée, il faut effectuer une sommation cohérente des ondes créées en différents points, en tenant compte de la phase locale du champ excitateur. Ainsi on verra apparaître des phénomènes d'interférence qui vont déterminer la puissance totale diffusée ainsi que le diagramme de rayonnement. Ces phénomènes sont déterminants pour la compréhension de la structure des images obtenues en microscopie de troisième harmonique, images dans lesquelles certaines structures seront exaltées et d'autres atténuées. De plus, l'analyse de ces effets va permettre de choisir un dispositif pour la mesure de l'indice non linéaire de certaines molécules.

La variation du signal THG avec la géométrie de l'échantillon sera étudiée dans la première partie de ce chapitre. Ensuite, dans les deux parties suivantes, l'étude de l'influence de la focalisation du faisceau excitateur va permettre de définir des paramètres optimaux pour l'acquisition des images selon le type d'échantillon étudié. On illustrera les implications de cette étude sur des cas concrets d'imagerie de cellules ou de tissus. Enfin, la dernière partie de ce chapitre s'intéressera au caractère directionnel de l'émission THG et à ses conséquences sur la détection du signal.

2.1 Influence de la géométrie de l'échantillon sur le niveau de signal

On s'intéresse dans ce paragraphe à quelques géométries particulières pour mettre en évidence les principales propriétés de l'imagerie de troisième harmonique. Ainsi, le premier paragraphe s'intéresse au cas de deux milieux semi-infinis, homogènes et séparés par une interface plane perpendiculaire au faisceau. Le deuxième paragraphe traite du cas d'une ou plusieurs interfaces parallèles au faisceau. Enfin, on analysera le cas d'une sphère homogène entourée d'un milieu infini uniforme.

Dans toute la suite de cette partie, on considère la géométrie d'excitation présentée sur la figure 2.1 : le faisceau excitateur se propage selon l'axe z, son point de focalisation se trouvant

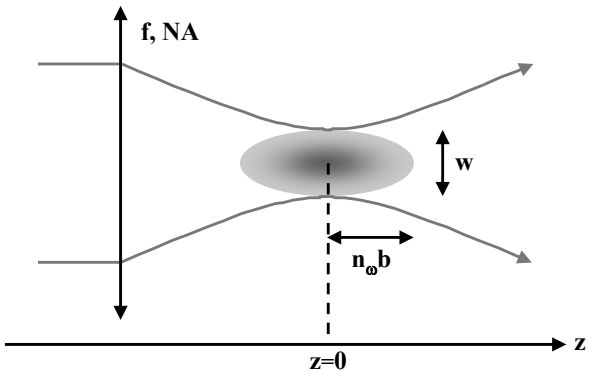


FIG. 2.1 – GÉOMÉTRIE D'EXCITATION UTILISÉE DANS LA SUITE DE CETTE PARTIE.
f, distance focale ; NA, ouverture numérique ; w, waist du faisceau excitateur ; $n_\omega b$, longueur de Rayleigh du faisceau dans un milieu d'indice n_ω.

en $z = 0$. Il est caractérisé par sa longueur d'onde λ, son waist w et sa longueur de Rayleigh b, et la focalisation est assurée par une lentille ou un objectif de microscope caractérisés par leur ouverture numérique $NA = n_\omega \sin\alpha$, où α est le demi-angle sous lequel est focalisé le faisceau (voir figure 2.1). Cette focalisation peut être faible dans le cas où une lentille est utilisée (typiquement $NA \approx 0.1$), ou forte dans le cas d'un objectif de microscope ($NA \approx 0.9$).

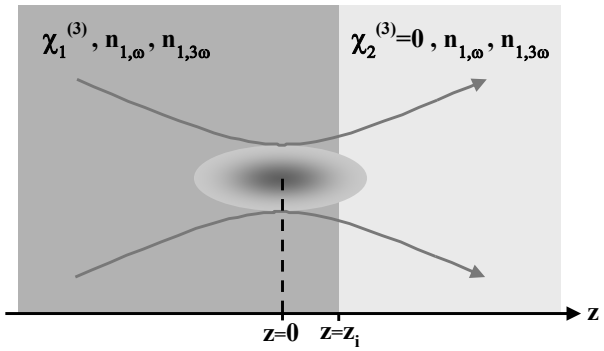


FIG. 2.2 – GÉOMÉTRIE CONSIDÉRÉE DANS LE PARAGRAPHE 2.1.1.1.
Un milieu semi-infini est limité par une interface plane, perpendiculaire à la direction de propagation z de l'onde excitatrice et située en $z = z_i$. Le reste de l'espace est constitué d'un autre milieu semi-infini de mêmes susceptibilités linéaires mais pour lequel $\chi^{(3)} = 0$.

2.1.1 Une ou plusieurs interfaces planes perpendiculaires à la propagation

2.1.1.1 Cas d'une seule interface perpendiculaire au faisceau

On considère dans un premier temps un milieu semi-infini, homogène et isotrope, de susceptibilité non linéaire $\chi_1^{(3)}$, d'indice $n_{1,\omega}$ à la longueur d'onde excitatrice et $n_{1,3\omega}$ à la longueur d'onde diffusée. Il est limité par une interface plane perpendiculaire à la direction de propagation z de

l'onde excitatrice et située en $z = z_i$. De l'autre côté de cette interface se trouve un autre milieu semi-infini, homogène et isotrope, de susceptibilité non linéaire nulle, d'indice $n_{1,\omega}$ à la longueur d'onde excitatrice et $n_{1,3\omega}$ à la longueur d'onde diffusée. Ainsi l'onde diffusée ne subit-elle pas de réfraction au passage de l'interface (figure 2.2).

Le calcul analytique de l'intensité diffusée dans le cas d'un faisceau gaussien est présenté en annexe C, section C.2 (équation C.14), et on trouve pour le champ diffusé (moyennant les approximations précisées dans l'appendice B) :

$$\begin{aligned} E_{1,3\omega}(x,y,z \geq z_i) \;=& \frac{-3i\pi^2\epsilon_0\chi_1^{(3)}E_0^3}{n_{1,3\omega}b\lambda}\exp\left[\frac{6i\pi n_{1,3\omega}}{\lambda}z\right]\frac{\exp\left[-\dfrac{3\pi}{\lambda b}\dfrac{x^2+y^2}{(1+i\frac{z}{n_{1,3\omega}b})}\right]}{\sqrt{b}\left(1+i\frac{z}{n_{1,3\omega}b}\right)} \\ &\times\int_{-\infty}^{z_i}\frac{dz_1}{\left(1+i\frac{z_1}{n_{1,\omega}b}\right)^2}\exp\left[\frac{6i\pi(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})z_1}{\lambda}\right] \end{aligned} \tag{2.1}$$

L'intégrale obtenue n'ayant pas de solution analytique, on considère deux cas permettant certaines approximations précisées dans l'annexe C. On peut en effet décomposer la fonction à intégrer en deux termes : d'une part, la fonction $f(z_1)$ définie par :

$$f(z_1) \;=\; \frac{1}{\left(1+i\frac{z_1}{n_{1,\omega}b}\right)^2} \tag{2.2}$$

qui a pour échelle de variation $n_{1,3\omega}b$; d'autre part, le terme $\exp\left[\dfrac{6i\pi(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})z_1}{\lambda}\right]$ qui varie sur une taille typique :

$$l_c \;=\; \frac{\lambda}{3\,|n_{1,\omega}-n_{1,3\omega}|} \tag{2.3}$$

l_c est appelée longueur de cohérence du milieu et correspond à la distance au bout de laquelle l'onde fondamentale et l'onde harmonique sont déphasées de 2π sous l'effet de la dispersion du milieu. On peut donc s'intéresser aux cas où ces deux échelles de variation sont suffisamment différentes l'une de l'autre pour pouvoir considérer que l'un des termes varie lentement par rapport à l'autre et simplifier ainsi l'expression du champ diffusé.

a Cas d'une onde faiblement focalisée. On se place tout d'abord dans le cas d'une onde faiblement focalisée, pour laquelle le terme oscillant dû à la dispersion a une variation bien plus rapide que la fonction f. C'est le cas, par exemple, pour un faisceau faiblement focalisé ($NA \approx 0.1$), pour lequel $n_{1,3\omega}b \approx 500\,\mu$m, traversant un milieu dispersif, comme par exemple l'eau, où $l_c \approx 20\,\mu$m. Dans ce cas on peut considérer les variations de f au premier ordre pour

obtenir l'expression du champ diffusé :

$$E_{1,3\omega}(x,y,z \geq z_i) = \frac{\pi\epsilon_0\chi_1^{(3)}E_0^3}{2n_{1,3\omega}(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})b} \frac{\exp\left[\frac{6i\pi(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})z_i}{\lambda}\right]}{\left(1+i\frac{z_i}{n_{1,\omega}b}\right)^2} \times \frac{1}{\sqrt{b}(1+i\frac{z}{n_{1,3\omega}b})} \exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1+i\frac{z}{n_{1,3\omega}b})} + \frac{6i\pi n_{1,3\omega}z}{\lambda}\right] \tag{2.4}$$

Soit une puissance totale diffusée :

$$\mathcal{P}_{3\omega} = \frac{\pi^2\,\epsilon_0^3\,c\,\lambda\,\chi_1^{(3)2}E_0^6}{48b^2n_{1,3\omega}(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})^2} \times \frac{1}{\left(1+\left(\frac{z_i}{n_{1,\omega}b}\right)^2\right)^2} \tag{2.5}$$

Pour analyser le résultat obtenu, notons d'abord que le signal créé dépend non pas de la susceptibilité non linéaire $\chi_1^{(3)}$, mais du rapport $\frac{\chi_1^{(3)}}{(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})}$. Ceci s'explique simplement en considérant que le champ diffusé est d'autant plus intense que l'interaction entre l'onde excitatrice et l'onde diffusée est efficace. Or, cette efficacité est limitée dans le cas présent par la dispersion du milieu qui déphase de π les deux ondes au bout d'une longueur de propagation $l_c/2$ (équation 2.3). Cette distance étant très inférieure à la taille du volume focal, le champ excitateur garde à cette échelle une valeur approximativement constante, mais les deux ondes interagissent ensuite destructivement. Ainsi, pour l_c petite, on a un champ diffusé proportionnel à l_c, donc inversement proportionnel à $|n_{1,\omega}-n_{1,3\omega}|$.

Ensuite, on note que l'expression 2.5 fait intervenir la position de l'interface par rapport au point de focalisation du faisceau. En particulier, pour une interface située en $z_i = +\infty$, la puissance créée est nulle bien que l'on focalise le faisceau dans un milieu possédant une susceptibilité non linéaire non nulle. Pour comprendre ce phénomène, rappelons que la condition assurant la diffusion efficace d'un signal par le milieu est l'accord de phase entre l'onde incidente et l'onde diffusée.

Si $\vec{k}_\omega$ est le vecteur d'onde de l'onde incidente et $\vec{k}_{3\omega}$ celui de l'onde de fréquence triple (voir figure 2.3), alors cette condition s'écrit :

$$\left|3(\vec{k}_\omega + \vec{k}_g) - \vec{k}_{3\omega}\right| = 0 \tag{2.6}$$

où $\vec{k}_g$ est le désaccord de phase introduit par la phase de Gouy lors du passage de l'onde excitatrice par son foyer [88]. Ce vecteur $\vec{k}_g$ est donc colinéaire à z et sa projection selon z est représentée sur la figure 2.4.

Dans le volume focal, on peut considérer $||\vec{k}_g||$ comme constant et égal à $\frac{-1}{n_{1,\omega}b}$. Du fait de la symétrie du milieu autour de l'axe z, la direction moyenne de $\vec{k}_{3\omega}$ doit être également colinéaire

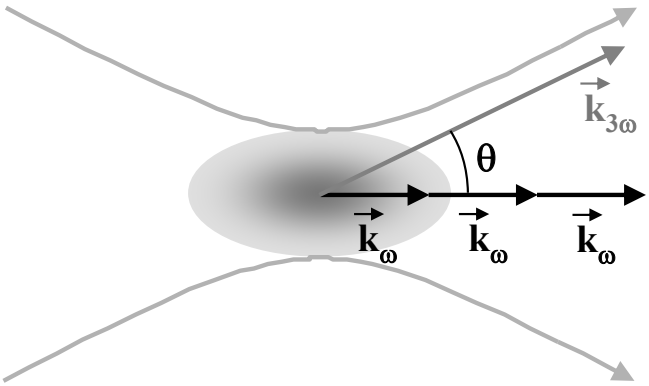


FIG. 2.3 – DIRECTION ET DÉFINITION DES VECTEURS D'ONDE.
$\vec{k}_{\omega}$ et le vecteur d'onde excitateur et $\vec{k}_{3\omega}$ celui de l'onde harmonique. Le déphasage entre les deux ondes dépend de l'angle θ entre ces vecteurs.

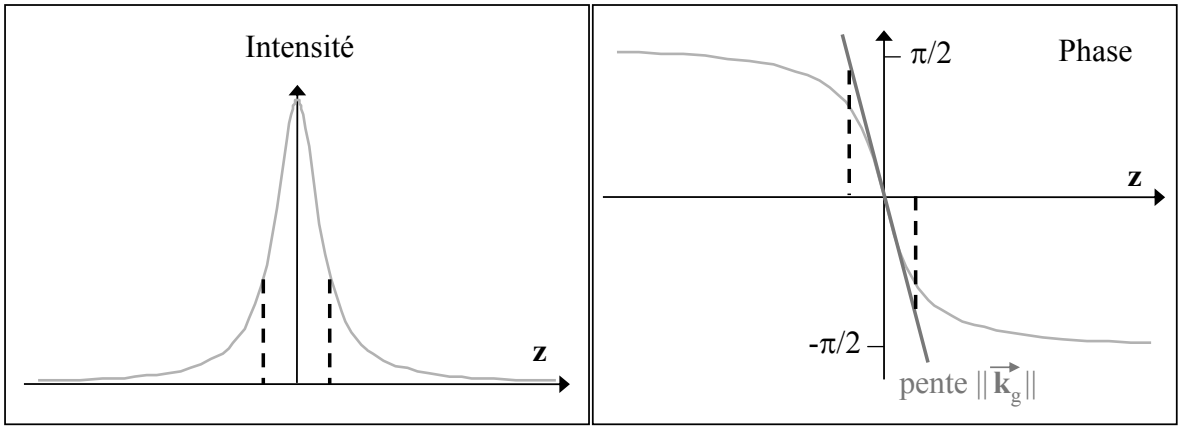


FIG. 2.4 – INTENSITÉ ET PHASE DU FAISCEAU EXCITATEUR SELON L'AXE DE PROPAGATION (SIMULATION).
Si l'on considère la zone sur laquelle l'intensité d'excitation est importante, la phase du faisceau excitateur peut être considérée comme variant linéairement avec z. Le vecteur $\vec{k}_g^{(1)}$ est donc défini comme le gradient de la phase dans cette région.

à z et l'équation 2.6 se réécrit :

$$\frac{6\pi n_{1,\omega}}{\lambda} - \frac{6\pi n_{1,3\omega}}{\lambda} - \frac{3}{n_{1,\omega} b} = 0 \tag{2.7}$$

soit :

$$n_{1,3\omega} - n_{1,\omega} = -\frac{\lambda}{2\pi n_{1,\omega} b} \leq 0 \tag{2.8}$$

Or dans le visible et le proche infrarouge, en dehors des bandes d'absorption, l'indice d'un milieu matériel décroît généralement avec la longueur d'onde. Il est donc impossible de satisfaire

à la condition d'accord de phase dans un milieu homogène et non biréfringent, ce qui conduit à une puissance diffusée nulle.

De façon générale, dans le cas où la dispersion du milieu limite la création du signal de troisième harmonique, le signal est créé sur une épaisseur de l'ordre de la longueur de cohérence autour d'une inhomogénéité du milieu. Ceci explique la décroissance rapide de la puissance obtenue avec l'éloignement de l'interface, avec un profil bien décrit par une lorentzienne au carré de largeur à mi-hauteur $1.28 \times \lambda$ (figure 2.5, à droite). Enfin notons que cette inhomogénéité peut concerner aussi bien la susceptibilité non linéaire que linéaire du milieu, le paramètre déterminant l'efficacité de diffusion étant fonction de ces deux grandeurs.

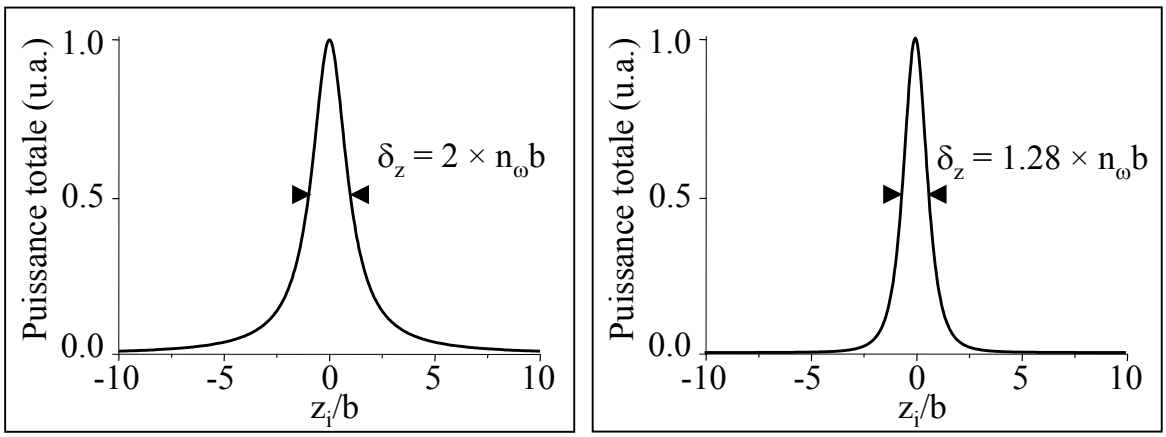


FIG. 2.5 – SIMULATION DU PROFIL THG CRÉÉ À L'INTERFACE ENTRE DEUX MILIEUX NON DISPERSIFS (GAUCHE) ET DEUX MILIEUX DISPERSIFS (DROITE). Dans le premier cas (forte focalisation), la création du signal est limitée par la décroissance de l'intensité de l'onde excitatrice. Au contraire, dans le cas d'un milieu très dispersif (faible focalisation), la création est limitée par le déphasage entre les ondes excitatrice et harmonique, donc la largeur à mi-hauteur de la courbe est plus faible.

b Cas d'une onde fortement focalisée. On considère maintenant le cas d'un faisceau fortement focalisé ($NA \approx 0.9$), pour lequel la longueur confocale est de l'ordre du micron, soit nettement inférieure à la longueur de cohérence du milieu étudié. Dans ce cas, on peut négliger la dispersion du milieu pour obtenir la puissance totale diffusée (annexe C) :

$$\mathcal{P}_{3\omega} = \frac{3\pi^4 \epsilon_0^3 c\, n_1 \chi_1^{(3)2} E_0^6}{4\lambda\left(1 + \left(\frac{z_i}{n_1 b}\right)^2\right)} \tag{2.9}$$

On obtient cette fois une décroissance lorentzienne plus lente en fonction de la distance du point de focalisation à l'interface. En effet, c'est la décroissance de l'intensité loin du volume focal qui va alors limiter la création du signal. On peut noter que, dans ce cas aussi, le niveau de signal est nul lorsque l'interface s'éloigne à l'infini du point de focalisation.

Cependant comme l'illustre la figure 2.6, dès que la longueur de cohérence du milieu n'est plus infinie, on s'éloigne très rapidement de ce résultat. Même dans le cas d'une forte focalisation

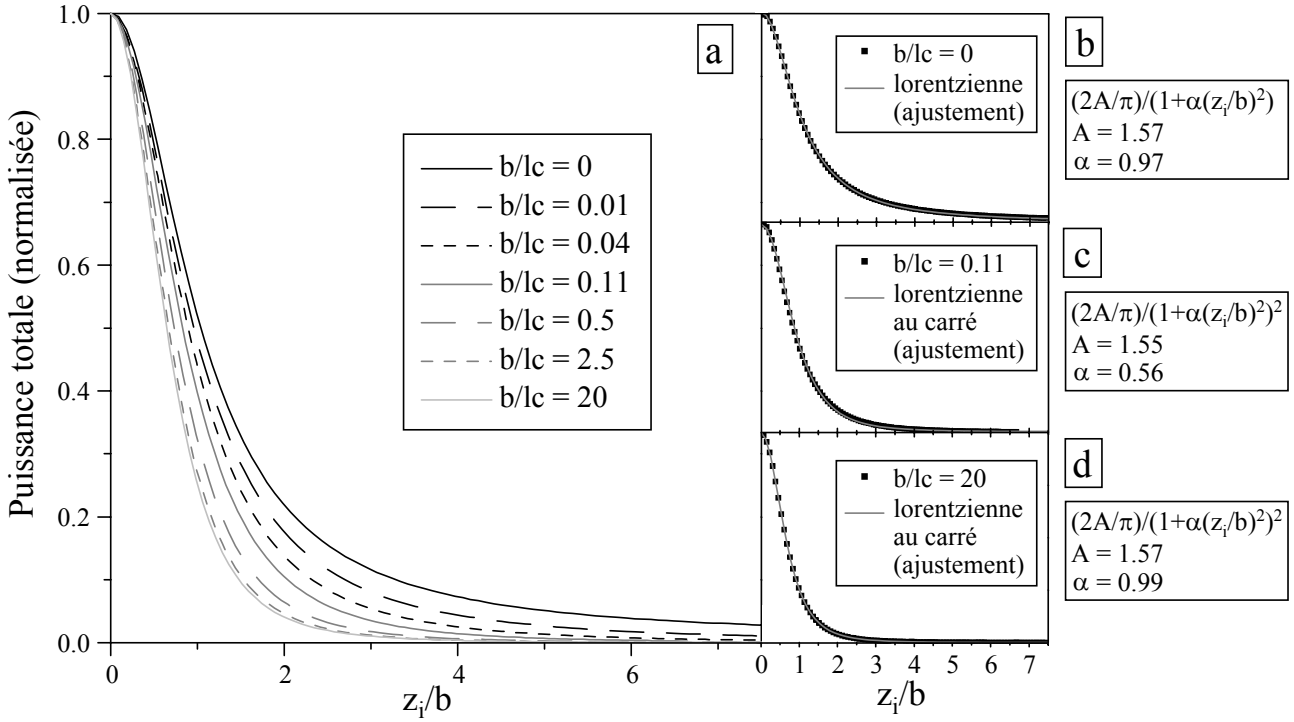


FIG. 2.6 – INFLUENCE DE LA DISPERSION SUR LA LARGEUR DU PROFIL AXIAL THG AUTOUR D'UNE INTERFACE.
(a), simulation du profil axial pour différentes valeurs du rapport b/l_c. La résolution axiale est meilleure dans le cas d'un milieu dispersif. A droite, les courbes simulées (carrés pleins) ont été ajustées par des fonctions lorentzienne (courbe b, dispersion nulle) ou lorentzienne au carré (courbe c, dispersion modérée ; courbe d, dispersion forte). La théorie développée dans le texte décrit correctement les résultats obtenus dans le cas de la dispersion nulle ou forte. Dans le cas d'une dispersion modérée ($b/l_c \approx 0.1$), on trouve également une dépendance en lorentzienne au carré mais avec une largeur intermédiaire entre les cas (b) et (d). On note qu'il faut que la dispersion soit très faible ($b/l_c << 0.01$) pour pouvoir négliger la dispersion du milieu. Les simulations ultérieures prendront donc en compte cette dispersion pour calculer le signal THG induit par un milieu, contrairement à ce qui a été fait dans la référence [88].

($NA = 0.9$), dans le cas de l'eau et autour de $\lambda = 1.2\,\mu$m, on a $b/lc = 0.05$ et la courbe obtenue est intermédiaire entre les deux formules analytiques. On peut ajuster correctement la courbe en utilisant le carré d'une lorentzienne mais dans ce cas la largeur obtenue est supérieure à $1,28 \times \lambda$. Ainsi, en pratique, on devra utiliser ces simulations pour établir la longueur confocale du faisceau en fonction du profil axial mesuré sur une interface perpendiculaire au faisceau.

Il faut enfin souligner que ce calcul suppose une forme gaussienne-lorentzienne pour le faisceau, ce qui n'est pas justifié pour des faisceaux diaphragmés au niveau de la pupille arrière de l'objectif de focalisation. Comme ce cas se présentera fréquemment dans les expériences présentées, un traitement approché en est proposé ci-dessous.

c Cas d'un faisceau diaphragmé en entrée de l'objectif. Dans le cas où l'on utilise un objectif de forte ouverture numérique, si l'on veut obtenir effectivement le point de focalisation le plus petit possible, il est nécessaire d'illuminer entièrement la pupille arrière de l'objectif. En pratique, l'objectif est surilluminé et la pupille d'entrée diaphragme le faisceau. Considérons l'objectif comme une simple lentille convergente de focale f et de diamètre d (voir figure 2.7). Son ouverture numérique est alors donnée par :

$$NA = n_{1,\omega}\sqrt{\frac{d^2}{d^2+4f^2}} \tag{2.10}$$

On suppose qu'il est éclairé par un faisceau parfaitement collimaté de diamètre w, pour lequel le champ s'écrit :

$$E_i(r,z) = E_0 \exp\left[-\frac{r^2}{w^2} + \frac{2i\pi n_{1,\omega} z}{\lambda}\right] \tag{2.11}$$

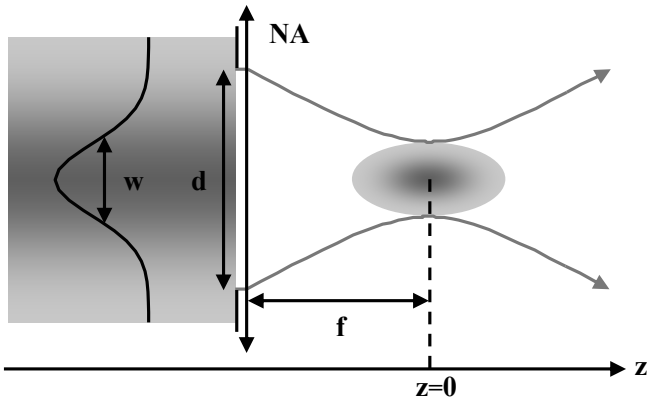


FIG. 2.7 – GÉOMÉTRIE ADOPTÉE DANS LE CAS D'UNE FORTE FOCALISATION. Dans le cas d'un objectif de forte ouverture numérique, le faisceau excitateur surillumine la pupille arrière de l'objectif. Le profil du faisceau n'est donc pas gaussien.

On considérera que la pupille arrière sera entièrement couverte dès que :

$$w = \frac{d}{2} \tag{2.12}$$

Ainsi l'expression du champ diffracté au foyer de la lentille peut s'écrire en utilisant la représentation spectrale angulaire [88] :

$$\begin{aligned} E_f(r,z) =& E_0 \frac{\pi n_{1,\omega} f}{\lambda} \exp\left[\frac{2i\pi n_{1,\omega} f}{\lambda}\right] \int_0^{\alpha_{max}} \sin\alpha\sqrt{\cos\alpha}(1+\cos\alpha) J_0\left(\frac{2i\pi n_{1,\omega} r}{\lambda}\sin\alpha\right) \\ &\times \exp\left[-\left(\frac{\sin\alpha}{\sin\alpha_{max}}\right)^2\right] \exp\left[\frac{2i\pi n_{1,\omega}}{\lambda}(z-f)\cos\alpha\right] d\alpha \end{aligned} \tag{2.13}$$

où J_0 est la fonction de Bessel d'ordre zéro et $\sin\alpha_{max} = \dfrac{NA}{n_{1,\omega}}$. Cette intégrale n'a pas de solution analytique mais on peut calculer numériquement le profil du faisceau ainsi que le cube de celui-ci. Les résultats obtenus sur présentés sur la figure 2.8.

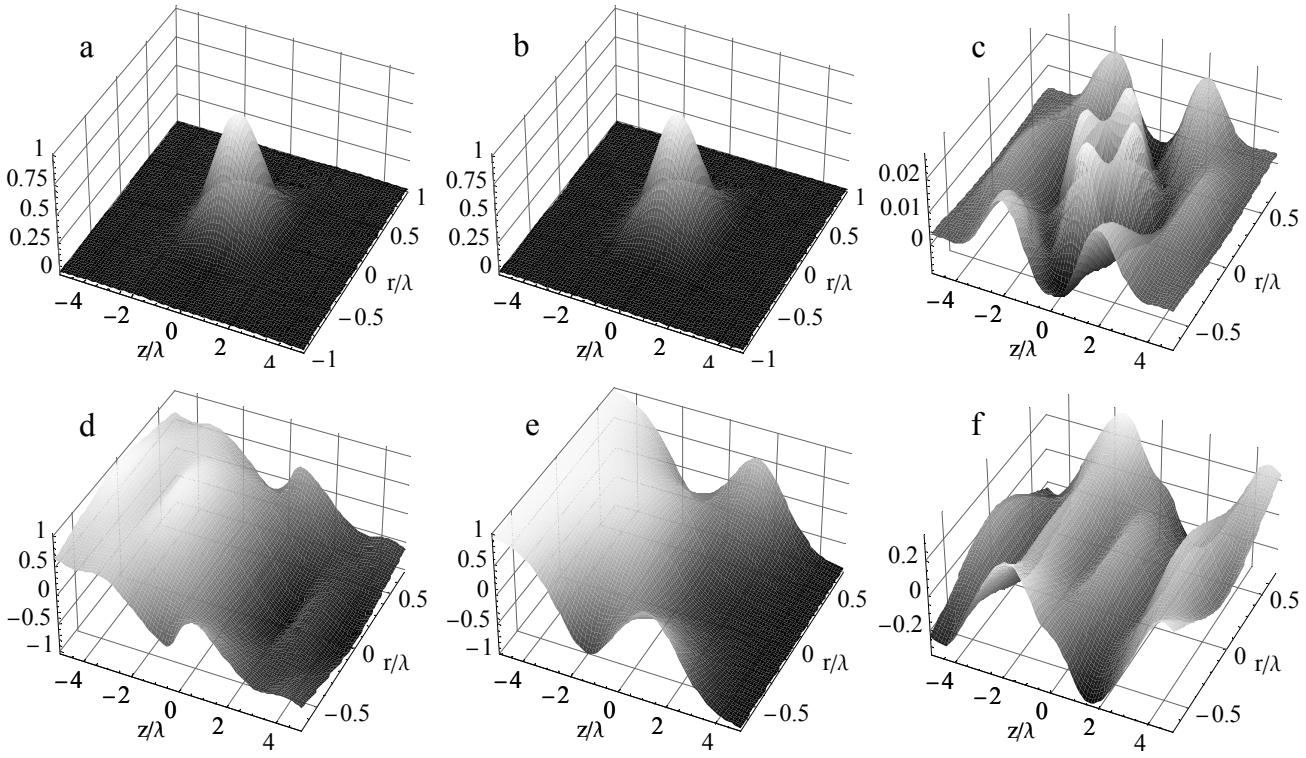


FIG. 2.8 – PROFIL D'EXCITATION POUR UN FAISCEAU DIAPHRAGMÉ.
Profils d'excitation en intensité (a) et en phase (d) calculés à partir de l'équation 2.13 et élevés au cube. En choisissant des paramètres appropriés, on peut raisonnablement utiliser l'approximation d'un faisceau gaussien-gaussien ((b), intensité au cube ; (e), phase triplée). Les figures (c) (intensité) et (f) (phase) représentent la différence normalisée entre la simulation et l'approximation gaussienne-gaussienne. On constate que l'approximation est meilleure pour l'intensité que pour la phase. Sur les figures (d) et (e), on a supprimé la partie propagative de la phase.

Dans le cas de la génération de troisième harmonique, c'est le cube du champ excitateur qui intervient dans le calcul de l'intensité diffusée. Or, l'amplitude de celui-ci peut être raisonnablement considéré comme gaussienne-gaussienne (figure 2.8).[1] Pour simplifier l'analyse du cas d'un faisceau diaphragmé, on peut donc remplacer la forme axiale lorentzienne du champ excitateur par un profil gaussien[2]. Il apparaît donc clairement dans ce cas que quelle que soit la dispersion du milieu, le profil obtenu lorsque l'on déplace une interface perpendiculaire au faisceau est

[1] Il faut noter ici que c'est moins l'ouverture numérique de focalisation que le fait de diaphragmer le faisceau qui détermine la forme du volume d'excitation.

[2] Utiliser ici la forme exacte du champ excitateur entraîne des calculs beaucoup plus lourds puisque ceci impose un calcul entièrement numérique. Au contraire, si l'on dispose d'une forme analytique pour le champ, seules les intégrales sur z et l'angle solide d'émission sont calculées numériquement.

gaussien. Ce résultat est confirmé par les simulations présentées sur la figure 2.9.

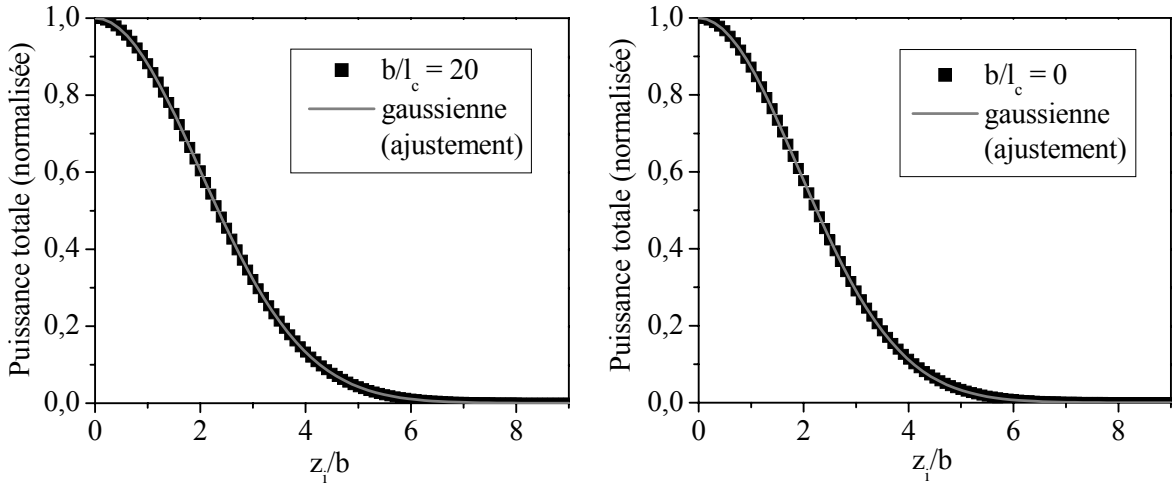


FIG. 2.9 – PROFIL AXIAL THG DANS LE CAS D'UN FAISCEAU DIAPHRAGMÉ.
Dans l'approximation d'un faisceau gaussien-gaussien, la simulation du profil THG axial (carré pleins) peut être ajustée par une gaussienne (traits pleins) tant pour un milieu très dispersif ($b/l_c = 20$) que pour un milieu non dispersif ($b/l_c = 0$).

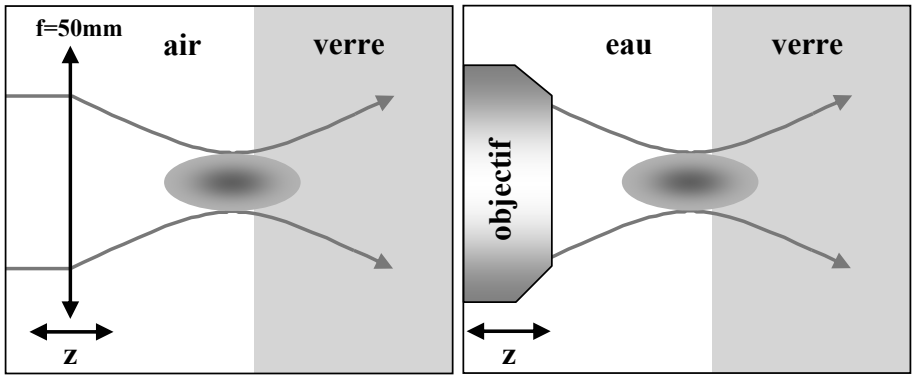


FIG. 2.10 – GÉOMÉTRIE EXPÉRIMENTALE
Le faisceau excitateur est focalisé sur une lame de verre par une lentille (gauche) ou par un objectif à immersion à eau (droite), déplacés perpendiculairement à l'interface pour obtenir le profil axial de THG.

d Confirmation expérimentale. Pour confirmer l'analyse théorique précédente, nous avons mesuré le profil du signal THG créé par une interface entre deux milieux homogènes dans le cas d'une onde faiblement ou fortement focalisée. Pour cela, on utilise d'une part une lentille de focale f = 5 cm correspondant (vu le diamètre du faisceau) à une ouverture numérique d'environ 0.03, et d'autre part différents objectifs de microscope (objectifs à immersion à eau, d'ouverture numérique 0.43 (10x), 0.9 (60x) et 0.75 (20x, sous-illuminé), Olympus).

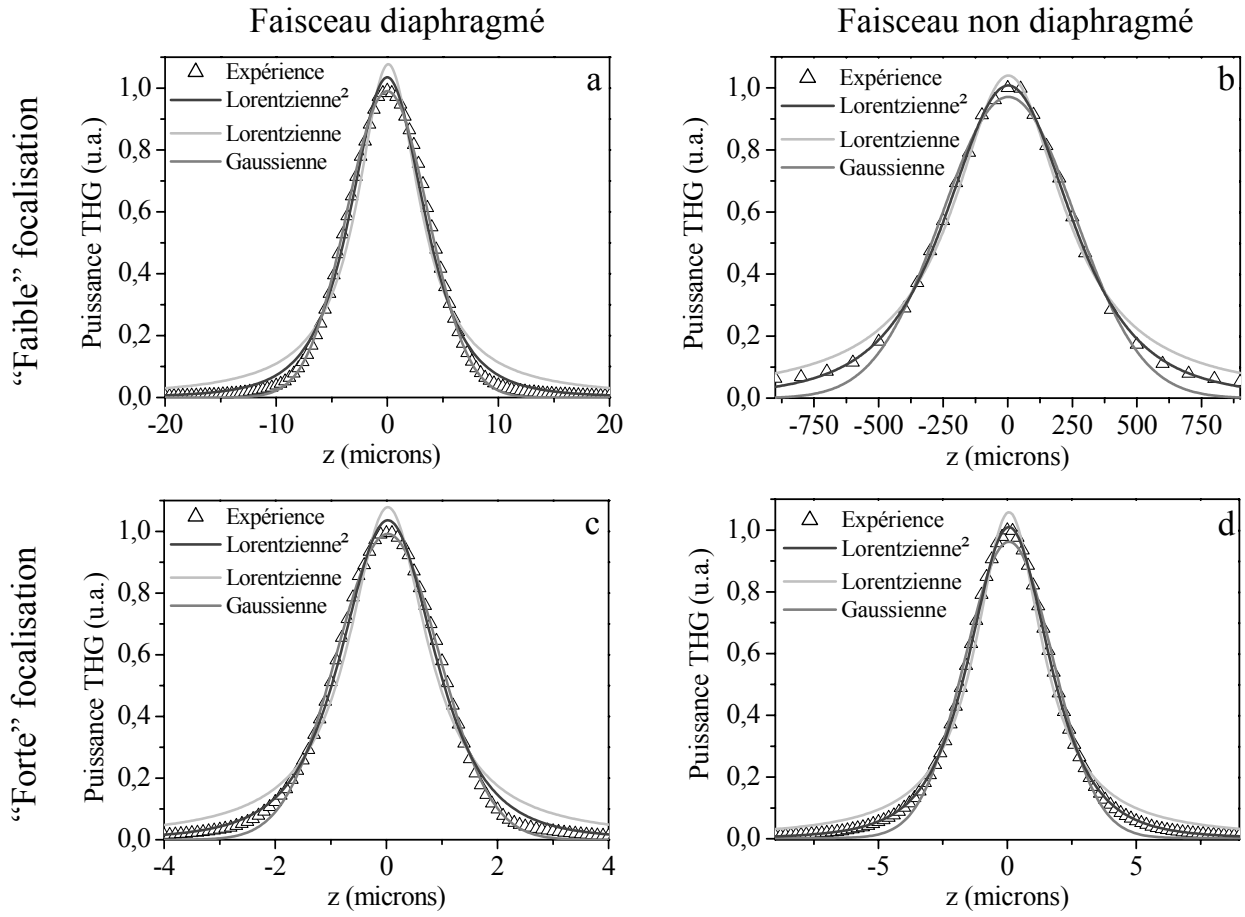


FIG. 2.11 – RÉSULTATS OBTENUS POUR DIFFÉRENTES FOCALISATIONS.
Triangles : points expérimentaux ; traits pleins : ajustements. Dans le cas d'un faisceau diaphragmé (à gauche), le profil est approximativement gaussien pour une ouverture numérique faible (objectif 20x, NA=0.4, $b/l_c \approx 0.25$, en haut) comme pour une ouverture forte (objectif 60x, NA=0.9, $b/l_c \approx 0.05$, en bas). Au contraire, dans le cas d'un faisceau gaussien non diaphragmé, le profil obtenu est bien décrit par une lorentzienne au carré pour une ouverture numérique faible (lentille, NA$\approx$ 0.03, $b/l_c \approx 15$, en haut) ou forte (objectif 20x, NA$\approx$ 0.75, $b/l_c \approx 0.075$, en bas)

Dans tous les cas l'interface est la surface d'une lame de verre, et il s'agit donc d'une interface verre/air ou d'une interface verre/eau. De plus, la lame de verre est choisie suffisamment épaisse pour être considérée comme semi-infinie à l'échelle de la longueur de Rayleigh du faisceau (figure 2.10). Le dispositif de focalisation est déplacé perpendiculairement au faisceau et le signal est détecté sur un photomultiplicateur en régime de comptage de photons.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 2.11. On observe deux types de profils différents selon que le faisceau est ou non diaphragmé. Que la focalisation soit forte (NA=0.7) ou faible (NA=0.03), le profil est lorentzien au carré dans le cas d'un faisceau non diaphragmé. On retrouve bien les résultats de la simulation effectuée (voir figure 2.6) dès que la longueur de cohérence du milieu n'est pas au moins 20 fois plus faible que la longueur de Rayleigh du

faisceau. Dans le cas d'un faisceau diaphragmé, on trouve un profil gaussien qui avait également été obtenu par simulation (figure 2.9). Cependant, dans les deux cas les ajustements ne sont pas parfaits ce qui s'explique entre autres par les approximations effectuées dans la forme du faisceau (figure 2.8).

2.1.1.2 Cas de deux interfaces parallèles

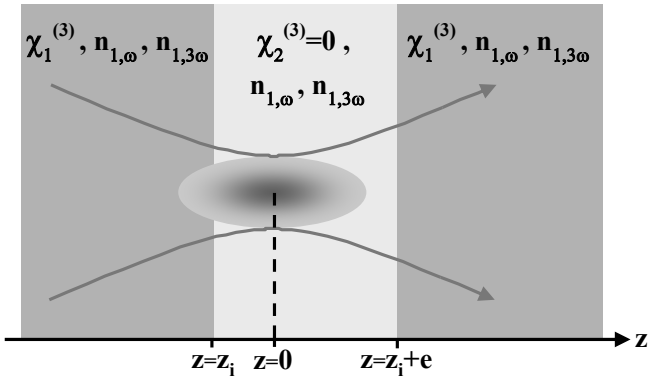


FIG. 2.12 – GÉOMÉTRIE CONSIDÉRÉE dans ce paragraphe.

a Analyse théorique Considérons maintenant la géométrie présentée sur la figure 2.12, où deux interfaces parallèles séparent un milieu 1 de susceptibilité non linéaire $\chi_1^{(3)}$ d'un milieu 2 dont la susceptibilité non linéaire est nulle. Le calcul de la puissance diffusée est présenté dans l'annexe C dans le cas d'un faisceau faiblement focalisé :

$$\mathcal{P}_{tot} = \frac{\pi^2\epsilon_0^3\,\Delta\omega^2 n_{1,3\omega}\,c\,\lambda E_0^6\,|\alpha|^2}{144\sqrt{6}b^2}\left[\frac{1}{\left(1+(\frac{z_i+e}{n_{1,\omega}b})^2\right)^2}+\frac{1}{\left(1+(\frac{z_i}{n_{1,\omega}b})^2\right)^2}\right.$$
$$\left.+\frac{\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\exp\left[\frac{3i\omega_0(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})e}{c}\right]}{(1+i\frac{z_i+e}{n_{1,\omega}b})^2(1-i\frac{z_i}{n_{1,\omega}b})^2}+\frac{\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\exp\left[-\frac{3i\omega_0(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})e}{c}\right]}{(1-i\frac{z_i+e}{n_{1,\omega}b})^2(1+i\frac{z_i}{n_{1,\omega}b})^2}\right] \tag{2.14}$$

où

$$l_a = \frac{\sqrt{\frac{8\pi}{3}}c}{(n_{1,3\omega}-n_{1,\omega})\Delta\omega} \tag{2.15}$$

Cherchons tout d'abord à interpréter ce résultat. On identifie facilement les deux premiers termes de la parenthèse dans lesquels on retrouve la puissance diffusée au niveau d'une interface (voir équation 2.5), l'une centrée autour de $z_i + e$ et l'autre autour de z_i. Les deux autres termes oscillent en fonction de l'épaisseur e du milieu intermédiaire et représentent donc des termes d'interférence entre les deux interfaces [107].

En effet, la diffusion s'effectue de façon cohérente dans l'ensemble du volume focal, et il faut donc sommer les champs émis en différents points, qui sont proportionnels à la susceptibilité non linéaire du milieu en ce point. Par linéarité, on peut décomposer le milieu traversé par l'onde en la somme d'une première interface entre un milieu de susceptibilité $\chi_2^{(3)} - \chi_1^{(3)}$ et un milieu de susceptibilité nulle, d'une deuxième interface entre un milieu de susceptibilité nulle et un milieu de susceptibilité $\chi_2^{(3)} - \chi_1^{(3)}$ et enfin d'un milieu uniforme de susceptibilité $\chi_1^{(3)}$, chacun de ces milieux créant une onde qui interfère avec celles créées par les deux autres (figure 2.13).

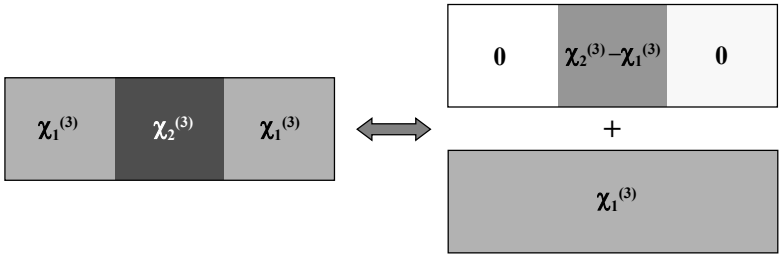


FIG. 2.13 – DÉCOMPOSITION DE L'ÉCHANTILLON POUR L'ÉMISSION THG.
Le champ diffusé étant linéaire en $\chi^{(3)}$, on peut appliquer le principe de superposition et décomposer la géométrie étudiée en un premier échantillon uniforme de susceptibilité $\chi_1^{(3)}$ et un deuxième échantillon de susceptibilité $\chi_2^{(3)} - \chi_1^{(3)}$ entouré d'un milieu de susceptibilité nulle. Le premier étant uniforme, le signal engendré est nul.

Ainsi on obtient en intensité :
- un terme provenant de la première interface (proportionnel à $\frac{1}{\left(1+(\frac{z_i}{n_{1,\omega}b})^2\right)^2}$)
- un terme provenant de la deuxième interface (proportionnel à $\frac{1}{\left(1+(\frac{z_i+e}{n_{1,\omega}b})^2\right)^2}$)
- un terme croisé d'interférence entre les champs provenant de chacune des interfaces (proportionnel à $\frac{\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\exp\left[\frac{3i\omega_0(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})e}{c}\right]}{\left(1+i\frac{z_i+e}{n_{1,\omega}b}\right)^2\left(1-i\frac{z_i}{n_{1,\omega}b}\right)^2} + \frac{\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\exp\left[-\frac{3i\omega_0(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})e}{c}\right]}{\left(1-i\frac{z_i+e}{n_{1,\omega}b}\right)^2\left(1+i\frac{z_i}{n_{1,\omega}b}\right)^2}$)
- une intensité diffusée nulle pour le milieu infini de susceptibilité $\chi_2^{(3)}$

Le terme d'interférence oscille en outre en fonction du déphasage entre les deux interfaces, que l'on peut retrouver facilement : l'équation 2.4 indique que l'émission de l'onde harmonique dans le cas d'une interface perpendiculaire au faisceau se fait perpendiculairement à cette interface. Le déphasage entre les deux ondes issues des deux interfaces vaut donc $\frac{3\omega_0(n_{1,\omega}-n_{1,3\omega})e}{c}$, à quoi il faut rajouter le déphasage de Gouy pour l'onde excitatrice entre les deux interfaces. De plus ce terme de phase dépend de la fréquence incidente, et on aura un amortissement des franges si l'on utilise une impulsion polychromatique, ce qui est reflété par le facteur exponentiel décroissant $\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]$.

Enfin, il faut noter que l'amplitude de ces interférences décroît avec la distance entre les deux interfaces et devient négligeable au delà d'une distance caractéristique de l'ordre de b, c'est-à-

dire lorsque l'une des deux interfaces au moins sort du volume focal d'excitation. Ainsi, on ne peut observer en pratique des interférences entre les deux interfaces que dans le cas où cette distance d'atténuation est inférieure à la distance caractéristique d'oscillation de la phase du terme d'interférence, c'est-à-dire l_c. Or ceci correspond précisément à l'hypothèse d'un faisceau faiblement focalisé que nous avons faite dans ce paragraphe. Par contre, dans le cas d'un faisceau fortement focalisé (typiquement dans le cas de la THG appliquée à la microscopie), on n'observe pas d'interférences entre les signaux issus des deux interfaces car la longueur de cohérence du milieu est très grande devant la taille du volume focal (voir figure 2.14).

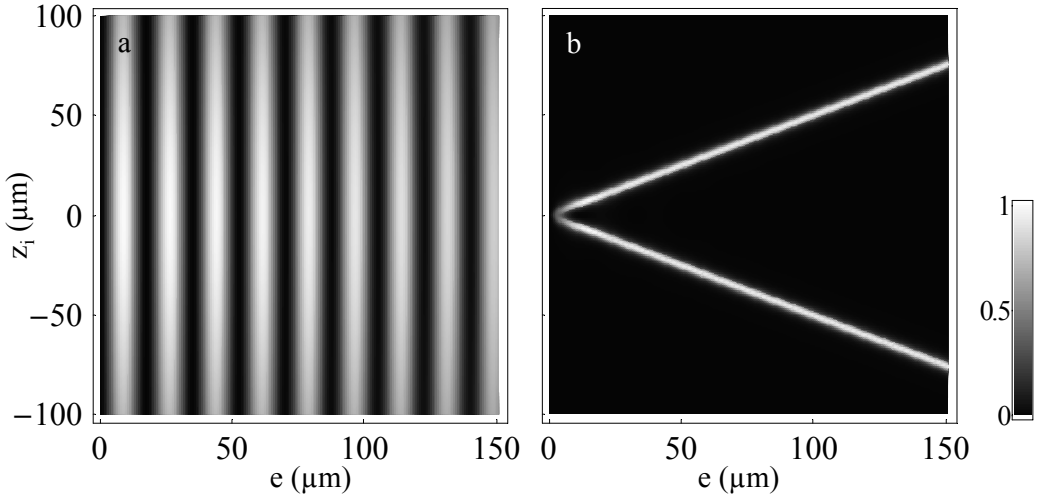


FIG. 2.14 – SIMULATION DU SIGNAL THG OBTENU POUR LA GÉOMÉTRIE DE LA FIGURE 2.12.
Le signal THG obtenu en fonction de l'épaisseur e du milieu intermédiaire et de la position z_i du point de focalisation présente des franges d'interférence (à gauche) dans le cas d'une focalisation faible devant la longueur de cohérence, mais pas dans le cas d'une forte focalisation (à droite) où l'on distingue les deux interfaces.

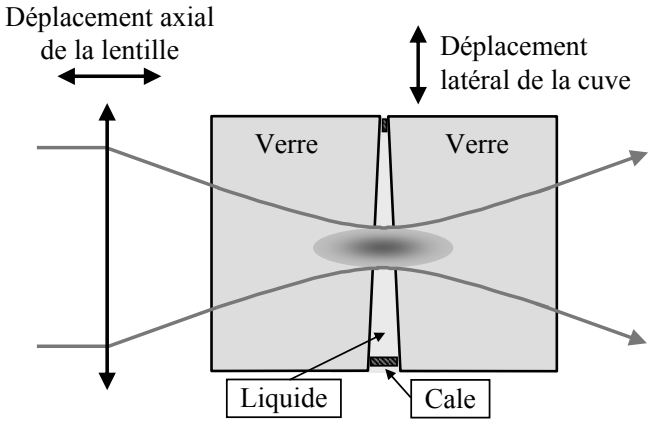


FIG. 2.15 – DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL utilisé pour étudier le profil d'intensité créé par deux interfaces parallèles.

b Confirmation expérimentale Pour étudier le profil du signal THG créé dans le cas d'une faible focalisation par deux interfaces parallèles en fonction de leur écartement, on utilise le dispositif présenté schématiquement sur la figure 2.15 : deux fenêtres prismatiques de silice fondue sont appuyées sur deux fines cales permettant de contrôler leur écartement et l'angle entre les deux parois. Cet angle est choisi suffisamment petit (typiquement 5 milliradients) pour que les interfaces puissent être considérées comme parallèles. Cependant, il permet si l'on déplace la cuve parallèlement à ses faces de faire varier l'épaisseur de liquide traversée par le faisceau[3] [107]. Ainsi on peut observer l'influence de l'écartement des deux interfaces sur le signal THG diffusé. Les résultats obtenus ainsi que la simulation correspondante sont présentés sur la figure 2.16, et montrent un bon accord entre la théorie et les résultats expérimentaux.

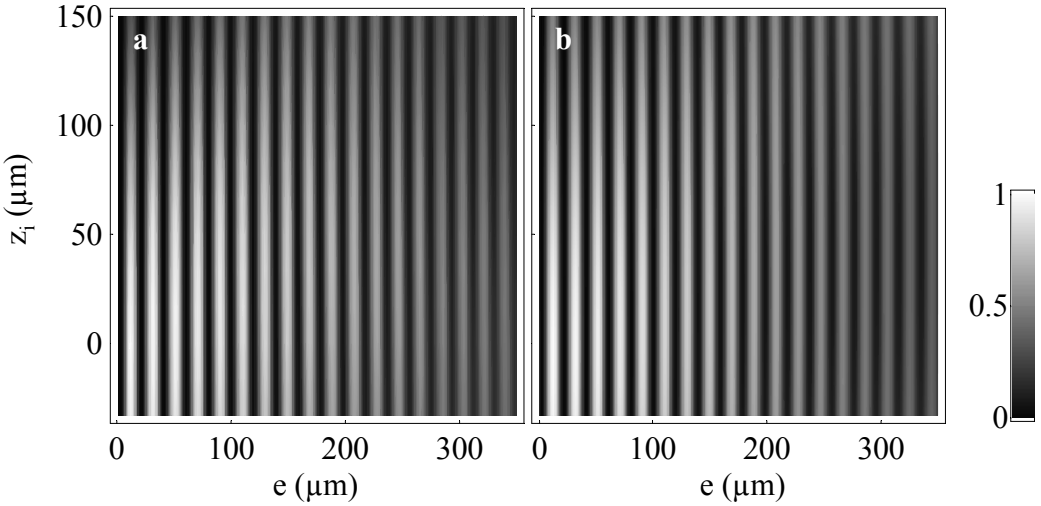


FIG. 2.16 – COURBE OBTENUE À L'AIDE DU DISPOSITIF PRÉCÉDENT (à gauche) et simulation numérique correspondante (à droite). Les courbes obtenues sont détaillées dans le chapitre 3.

Dans le cas d'un faisceau fortement focalisé, on fait l'image de deux lamelles de verre faisant un angle l'une avec l'autre, induisant ainsi un écartement variable des deux interfaces verre/eau et eau/verre (figure 2.17-a). En faisant l'image de ce dispositif sur le dessus à l'aide d'un objectif 60x, 0.9NA pour différentes profondeurs, on obtient la coupe présentée sur la figure 2.17-b : comme il a été discuté plus haut, on n'observe pas d'interférences entre les deux interfaces verre/eau et eau/verre.

2.1.2 Une ou plusieurs interfaces planes parallèles à la propagation

2.1.2.1 Cas d'une seule interface

Considérons cette fois une interface plane, parallèle à la direction de propagation du faisceau excitateur et passant par le point focal, séparant deux milieux homogènes, isotropes et semi-infinis, de susceptibilités non linéaire $\chi_1^{(3)}$ (resp. $\chi_2^{(3)}$), d'indices $n_{1,\omega}$ (resp. $n_{2,\omega}$) à la longueur

[3]Cette géométrie simple sera reprise au chapitre 3 pour la mesure de la susceptibilité non-linéaire de différents milieux.

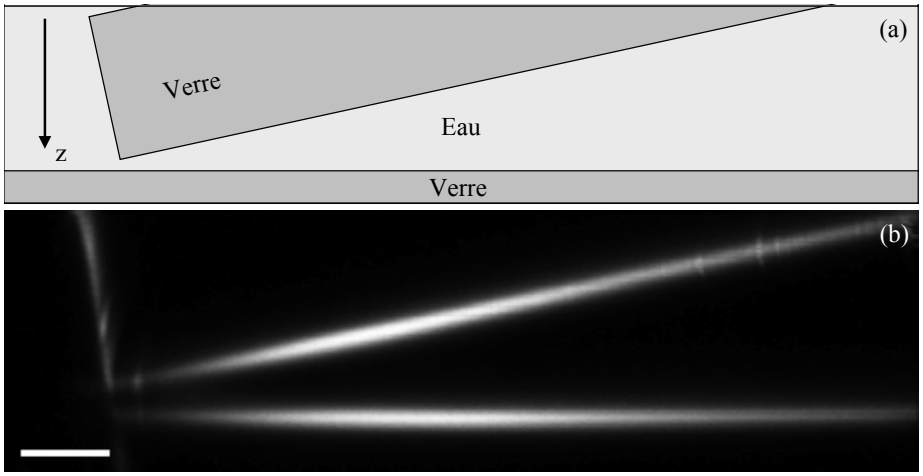


FIG. 2.17 – COURBE OBTENUE pour deux interfaces d'écartement variable perpendiculaires à l'axe optique. (a), schéma de l'échantillon étudié, constitué de deux lamelles de verre faisant un angle d'environ 12° entre elles. (b), signal THG correspondant obtenu : on n'observe pas d'interférences entre les deux interfaces. Les variations de puissance le long d'une interface sont dues à l'inhomogénéité de l'intensité d'excitation sur l'ensemble du champ de vue de l'objectif ainsi qu'à la déformation du faisceau excitateur à proximité du bord de la lamelle supérieure. Barre d'échelle, 20 µm (soit environ l_c à la longueur d'onde utilisée (1180 nm)).

d'onde excitatrice et $n_{1,3\omega}$ (resp. $n_{2,3\omega}$) à la longueur d'onde diffusée (voir figure 2.18). De plus par souci de simplicité on prendra ici : $n_{1,\omega} = n_{2,\omega}$ et $n_{1,3\omega} = n_{2,3\omega}$.

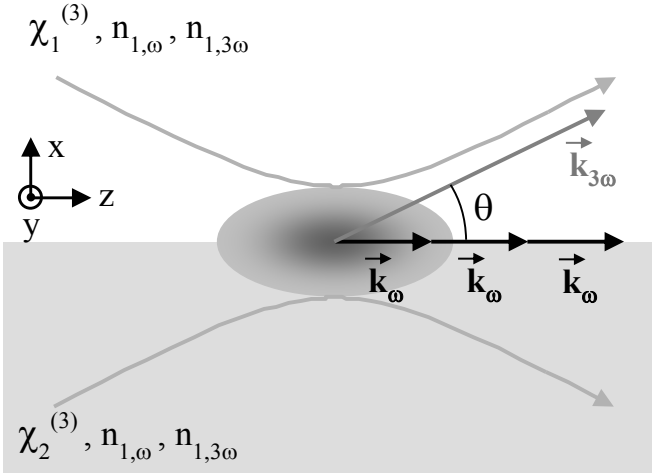


FIG. 2.18 – GÉOMÉTRIE CONSIDÉRÉE dans le paragraphe 2.1.2.1.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent qu'un milieu homogène ne diffuse pas de signal THG. Ainsi, le signal semble provenir de l'interface entre les deux milieux, avec une puissance proportionnelle à $\left|\chi_1^{(3)} - \chi_2^{(3)}\right|^2$. Comment s'écrit dans ce cas la condition d'accord de phase ? Comme dans le paragraphe précédent, celle-ci ne peut être satisfaite sur l'axe de propagation.

De plus pour des raisons de symétrie, l'émission se fera dans le plan xz (figure 2.18). Ainsi, on peut définir l'angle θ de diffusion par rapport à l'axe z dans le plan xz, et l'accord de phase s'écrit (voir equation 2.6) :

$$\left|3(\vec{k}_\omega + \vec{k}_g) - \vec{k}_{3\omega}\right| = 0 \tag{2.16}$$

soit en projection sur l'axe z :

$$\left|\frac{6\pi n_{1,\omega}}{\lambda} - \frac{6\pi n_{1,3\omega}\cos\theta}{\lambda} - \frac{3}{n_{1,\omega}b}\right| = 0 \tag{2.17}$$

d'où l'on déduit :

$$\cos\theta = \frac{n_{1,\omega}}{n_{1,3\omega}} - \frac{\lambda}{2\pi n_{1,\omega}n_{1,3\omega}b} \tag{2.18}$$

Dans le cas d'un faisceau gaussien[4], on obtient finalement :

$$\cos\theta = \frac{n_{1,\omega}}{n_{1,3\omega}} - \frac{0.189\,(NA)^2}{n_{1,\omega}n_{1,3\omega}} \tag{2.19}$$

La référence [88] présente un calcul plus complet dans le cas d'un faisceau fortement focalisé (NA=1.4) en dehors de l'approximation gaussienne, qui donne pour valeur numérique de l'angle de diffusion 28°, et 34° avec un calcul gaussien approché. Les auteurs ont choisi de négliger la dispersion d'indice et de poser $n_{1,3\omega} = n_{1,\omega} = 1.5$. Avec ces valeurs, l'équation 2.19 donne une valeur de 33°. Pour un faisceau focalisé par un objectif de microscope d'ouverture numérique 0.9 sur un échantillon aqueux pour lequel $n_{1,\omega} \approx 1.325$ et $n_{1,3\omega} \approx 1.345$, on obtient un angle de 26°.

En effectuant une simulation numérique dans l'hypothèse d'un faisceau gaussien, on obtient un résultat plus précis. En particulier, le pic de diffusion obtenu est sensiblement plus près de l'axe (26.5° et 28.0° au lieu de 33°, toujours pour $NA = 1.4$ et $n_{1,\omega} = n_{1,3\omega} = 1.5$, voir figure 2.19-b) et en bon accord avec les résultats de Cheng *et al.* [88] (26° et 28° respectivement, voir figure 2.19-a). La différence entre la valeur calculée avec la condition d'accord de phase et celle obtenue par simulation peut être attribuée à la mauvaise description de la phase du faisceau dans le premier cas. En effet, si l'on effectue la même simulation avec une phase linéaire, on retrouve une valeur très proche de 33°[5].

[4]Dans le cas d'un faisceau gaussien, $b = \frac{\pi w^2}{\lambda}$ (où w est le waist du faisceau) et $w = \frac{0.61\lambda}{NA\sqrt{2\ln 2}}$

[5]Les auteurs obtiennent des résultats sensiblement différents avec une simulation gaussienne et attribuent ce résultat à la mauvaise description faite du champ. En fait, leur résultat s'explique au moins en partie par la différence de taille des volumes focaux considérés dans chacun des cas (largeur à mi-hauteur axiale en intensité passant de 1.03 µm dans le cas d'un faisceau diaphragmé à 1.52 µm pour le calcul gaussien). Si l'on prend au contraire la même largeur axiale à mi-hauteur, on obtient un résultat proche du calcul exact.

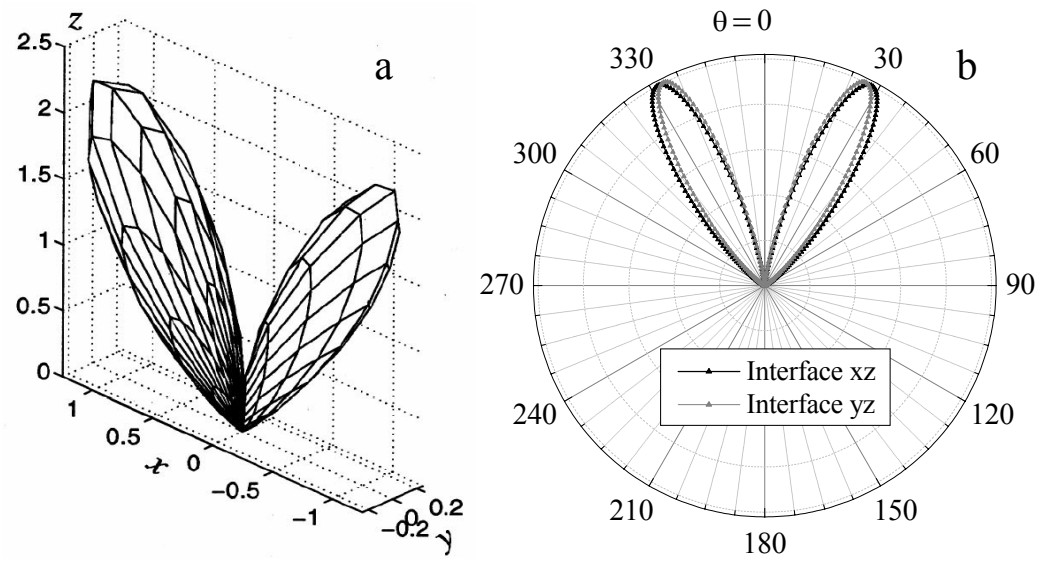


FIG. 2.19 – DIAGRAMME DE RAYONNEMENT obtenu pour une interface parallèle au faisceau et centrée sur celui-ci. (a), simulation de Cheng *et al.* extraite de la référence [88] pour une interface yz ; (b), résultat de notre simulation obtenue dans l'approximation paraxiale avec les mêmes paramètres.

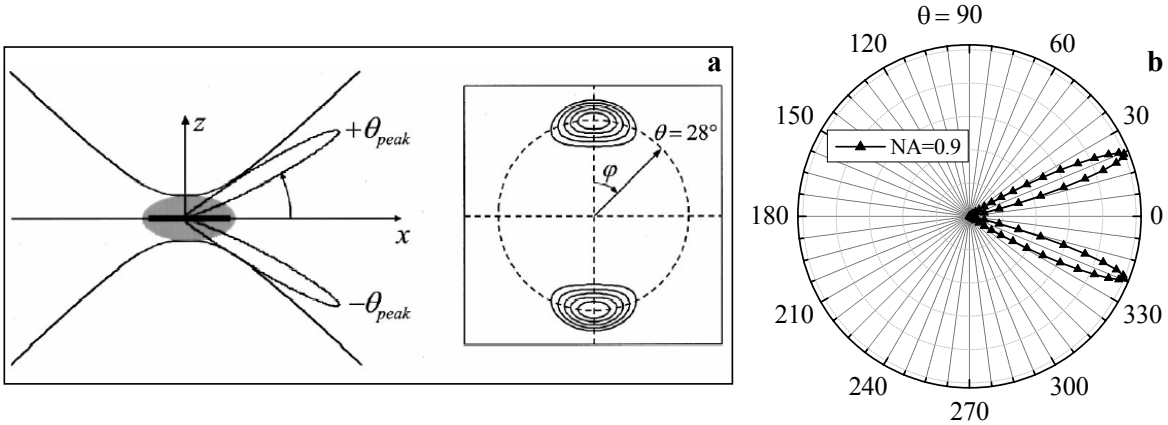


FIG. 2.20 – COMPARAISON DU DIAGRAMME DE RAYONNEMENT OBTENU EN THG ET EN SHG.
(a), diagramme obtenu en SHG pour une membrane orientée, parallèle à la direction de propagation du faisceau excitateur. La figure est extraite de la référence [56]. *Sur cette figure, les axes x et z sont inversés par rapport aux conventions du texte.* (b), résultat de notre simulation pour l'émission THG, obtenu dans l'approximation d'un faisceau gaussien avec les mêmes paramètres.

Ce résultat est à rapprocher de ce que l'on observe dans le cas de la génération de seconde harmonique. Dans ce cas, il s'agit d'un signal surfacique et l'échantillon équivalent à une interface parallèle à la direction de propagation du faisceau (en THG) est une membrane composée de dipôles parallèles, elle-même parallèle au faisceau (figure 2.20). La figure 2.20-a extraite de [56]

montre que dans ces conditions, on a également un diagramme de rayonnement composé de deux lobes symétriques dont la direction est définie par les conditions d'accord de phase.

On peut également s'intéresser au profil obtenu lorsque l'on décale l'interface selon x (figure 2.21) : dans ce cas on obtient avec le modèle précédent un profil gaussien dont la largeur est reliée à celle du faisceau incident et qui peut avec une bonne approximation être écrit comme :

$$I(x_i) = I_0 \exp[-\alpha x_i^2] \tag{2.20}$$

où α dépend de b et de la dispersion du milieu et est de l'ordre de $\frac{3}{w^2}$.

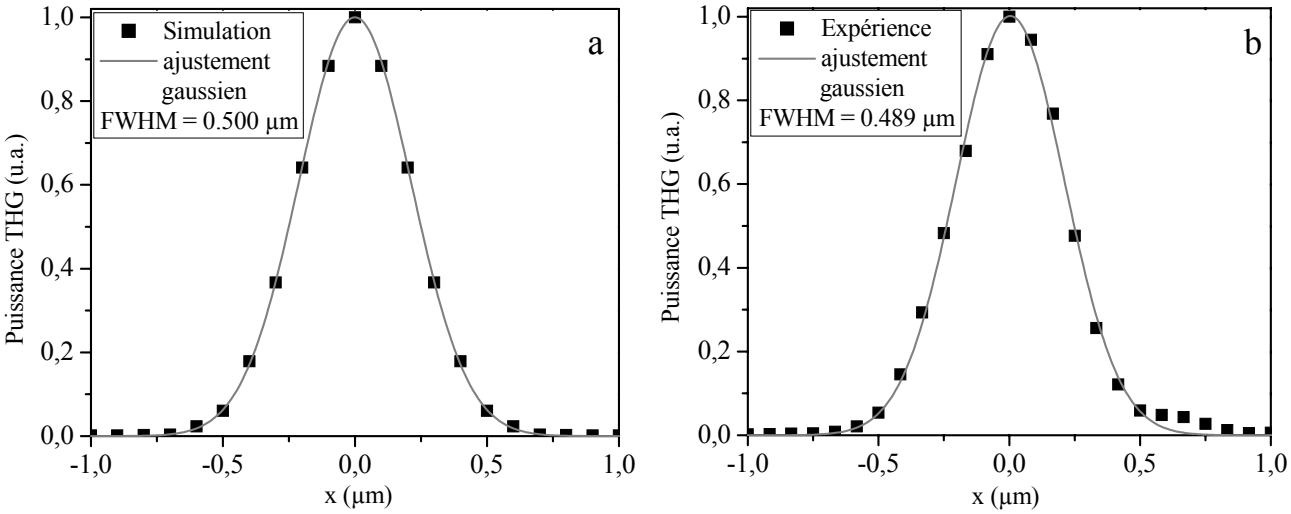


FIG. 2.21 – PROFIL LATÉRAL EN THG.
(a), profil pour une ouverture numérique de 0.9 (carré pleins) obtenu avec notre modèle et ajustement gaussien (traits pleins). (b), profil obtenu expérimentalement sur une interface eau/verre pour la même ouverture numérique (carré pleins) et ajustement gaussien. On observe une bonne concordance entre la simulation et l'expérience.

2.1.2.2 Cas de deux interfaces parallèles

Considérons maintenant le cas de deux interfaces parallèles distantes de e. Pour obtenir le champ total diffusé, il suffit alors de sommer les champs créés par les deux interfaces et donnés par l'équation 2.20 : nous avons vu que l'émission s'effectuait principalement selon un angle θ par rapport à l'axe z, angle assurant l'accord de phase entre l'onde incidente et l'onde harmonique. Si l'on raisonne comme si l'onde était créée au niveau de chaque interface, on peut exprimer le déphasage entre les deux signaux dû à la propagation dans la direction θ (figure 2.22) :

$$\Delta\phi = \frac{6\pi}{\lambda} \times \left(n_{1,3\omega} e \sin\theta + (n_{1,3\omega} - n_{2,3\omega}) e \frac{\cos^2\theta}{\sin\theta} \right) \tag{2.21}$$

De plus, le modèle précédent a montré que le champ émis dépendait de la position x_i de l'interface selon l'équation 2.20. Finalement, on obtient donc pour l'intensité totale diffusée :

$$I_{tot}(3\omega, x_i, e) = I_0(\exp[-2\alpha x_i^2]+\exp[-2\alpha(x_i+e)^2]-2\cos[\Delta\phi]\exp[-\alpha(x_i+e)^2]\exp[-\alpha x_i^2]) \quad (2.22)$$

On peut tout d'abord noter qu'en se plaçant dans le cas où $e = 0$, on obtient une intensité diffusée nulle : on retrouve le résultat obtenu précédemment pour un milieu infini homogène. De plus, si l'on se place entre les deux interfaces, c'est-à-dire pour $x_i = -\frac{e}{2}$, l'expression précédente devient :

$$I_{tot}(3\omega, x_i, e) = 2I_0 \exp[-\frac{1}{2}\alpha e](1 - \cos[\Delta\phi]) \quad (2.23)$$

On obtient donc des interférences constructives dans le cas où e est un multiple impair de $e_c = \dfrac{\lambda}{6(n_{1,3\omega}\sin\theta + (n_{1,3\omega} - n_{2,3\omega})\frac{\cos^2\theta}{\sin\theta})} \approx 0.240\,\mu\text{m}$ et destructives dans le cas où ce multiple est pair. De plus, ces interférences vont décroître en amplitude lorsque les deux interfaces s'éloignent du point de focalisation avec une distance caractéristique w.

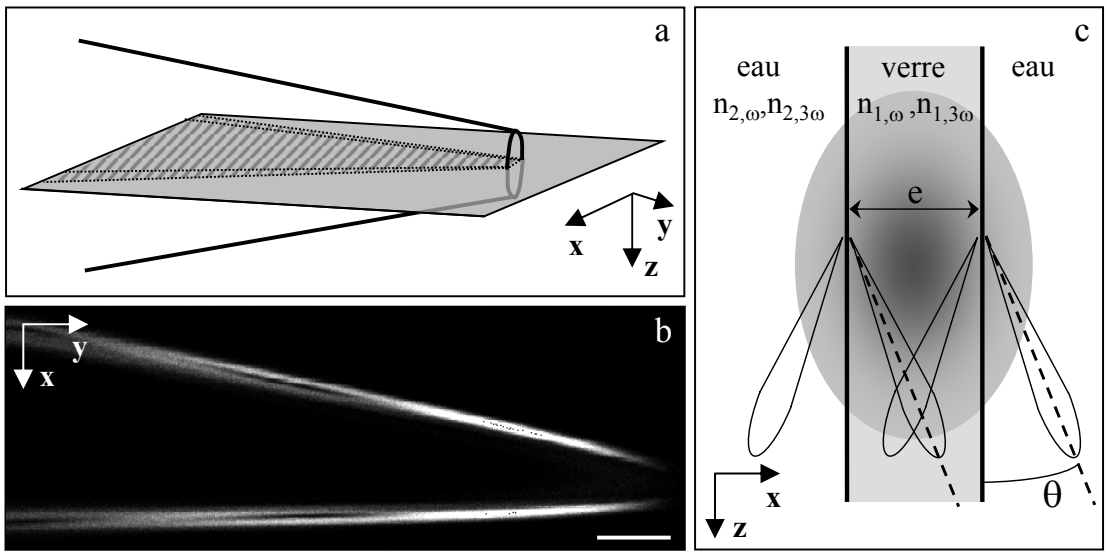


FIG. 2.22 – CONFIRMATION EXPÉRIMENTALE.
(a), schéma de l'échantillon étudié (pipette en verre étirée) et plan d'imagerie (en gris). (b), image obtenue à l'équateur de la pipette. On distingue les quatre interfaces (eau/verre et verre/eau) correspondant aux deux parois de verre de la pipette. Barre d'échelle, 5 µm. (c), diagramme d'émission schématique pour les deux interfaces eau/verre et verre/eau de l'une des parois de la pipette.

Si l'on compare ce résultat avec celui obtenu dans le cas de deux interfaces perpendiculaires à la direction de propagation du faisceau, on constate que les échelles caractéristiques mises en jeu sont différentes : en effet, la distance caractéristique d'atténuation des interférences est bien du même ordre de grandeur (environ b), mais dans le cas de deux interfaces perpendiculaires

à z, les interférences constructives étaient obtenues pour une distance caractéristique $l_c/2 = \frac{\lambda}{6(n_{1,3\omega} - n_{1,\omega})} \approx 10\,\mu\text{m}$. Ceci les rendaient inobservables dans le cas d'un faisceau fortement focalisé pour lequel $b < l_c/2$. Ici au contraire, même dans le cas d'un faisceau très focalisé, e_c reste comparable à w.

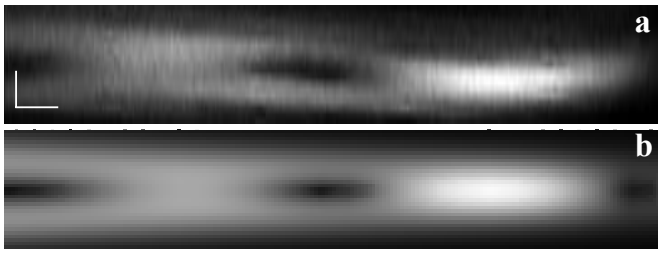


FIG. 2.23 – COMPARAISON ENTRE LA THÉORIE ET L'EXPÉRIENCE.
(a), image à l'équateur. Zoom sur l'une des parois de la pipette. Barre horizontale, 3 µm. Barre verticale, 500 nm. (b), simulation correspondante.

Les figures 2.22-b et 2.23-a (zoom) présentent l'image d'une pointe de pipette en verre étirée, analogue à celles utilisées en électrophysiologie. On distingue clairement ici la présence des deux interfaces eau/verre et verre/eau et la présence entre elles d'interférences constructives et destructives dont l'amplitude décroît avec l'écartement des interfaces. Sur la figure 2.23-b est représenté le graphe correspondant à l'equation 2.23 pour des paramètres analogues à ceux de l'expérience : $\alpha = 11\mu\text{m}^{-2}$, $e_c = 240\,\mu\text{m}$. On constate un bon accord entre la théorie et l'expérience.

2.1.2.3 Conséquences

La constatation précédente a des implications importantes pour les images obtenues en microscopie THG. En effet, sur l'image précédente, les deux interfaces sont très bien résolues lorsqu'elles sont distantes de 500 nm, mais non résolues pour une distance de 750 nm. Il apparaît donc difficile de définir la résolution du microscope pour la THG, celle-ci dépendant fortement de la géométrie considérée à cause des effets de cohérence dans la construction du signal.

On peut rapprocher ces résultats des observations qui ont été rapportées dans le cas de la microscopie SHG [62, 108]. De la même manière les effets de cohérence impliquent des variations fortes du niveau de signal quand on rapproche deux interfaces présentant chacune une rupture de symétrie mais qui superposées donnent un milieu isotrope. Dans ces articles, les auteurs illustrent cet effet sur l'exemple d'une vésicule unilamellaire géante dont les membranes sont marquées à l'aide d'un colorant efficace en SHG et inséré spécifiquement dans la partie externe de la bicouche lipidique (figure 2.24). Ainsi, la membrane d'une vésicule isolée fournit un signal SHG tandis que deux vésicules collées ne fournissent pas de signal SHG. Entre ces deux cas extrêmes, il existe une distance critique pour laquelle le signal SHG est exalté. On observe un effet similaire lorsque l'on fait l'image de deux corps lipidiques séparés par une distance de l'ordre de la centaine de nm : on observe une exaltation du signal au niveau où les deux sphères sont les plus proches. On peut cependant noter que l'analogie entre THG et SHG n'est pas parfaite car le signal SHG

provient dans ce cas d'une surface (membrane lipidique) tandis que le signal THG provient d'un volume (goutte de lipides).

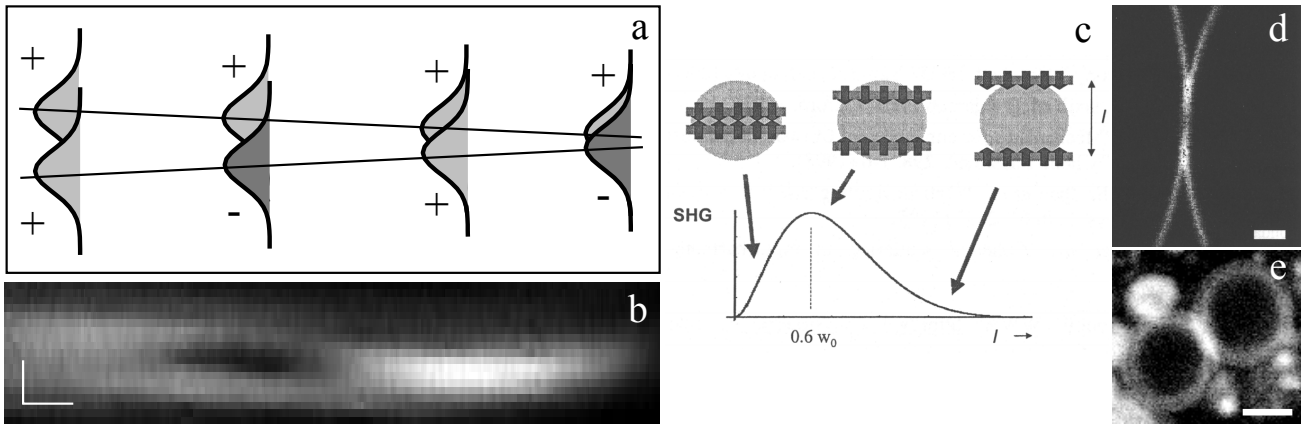


FIG. 2.24 – COMPARAISON AVEC LE CAS DE LA SHG
(a),(b), image de la pipette en THG et interférences des ondes des deux interfaces correspondantes. (c), (d) mise en évidence des interférences en SHG. Deux membranes proches dans le volume focal produisent des signaux interférant constructivement ou destructivement selon leur écartement. Expérimentalement (d), deux vésicules unilamellaires marquées dont les membranes sont orientées ne produisent pas de signal si elles sont collées. Au contraire, le signal SHG est exalté lorsque la distance entre les deux vésicules est une fraction du waist du faisceau excitateur. Figure extraite de la référence [62]. Barre d'échelle, 2 µm. (e), expérience correspondante en THG sur des gouttelettes lipidiques adjacentes dans un hépatocyte. Barre d'échelle, 5 µm.

2.1.3 Sphère uniforme centrée sur le faisceau

On s'intéresse finalement au cas d'une sphère homogène de susceptibilité non linéaire $\chi^{(3)}$ non nulle plongée dans un milieu de même indice linéaire mais pour lequel $\chi^{(3)} = 0$. Dans un premier temps, on considère le cas d'une sphère de taille croissante centrée sur le point de focalisation du faisceau. Qualitativement, on peut décrire la dépendance attendue du signal avec le diamètre d de la bille : pour $d << b$, on peut considérer que l'accord de phase est réalisé dans toute la bille et le signal doit alors croître approximativement avec le carré du nombre de diffuseurs, soit avec la puissance sixième du diamètre. Par contre quand le déphasage entre les ondes émises en différents points de la bille n'est plus négligeable, le signal va croître moins rapidement avec d, puis décroître. Enfin, dans la limite où $d >> b$, les bords de la bille sont très loin du point de focalisation : le milieu apparaît comme localement homogène et le signal diffusé doit tendre vers 0.

Ce problème a été étudié dans la référence [88] dans le cas d'un faisceau très fortement focalisé (NA=1.4) et en négligeant la dispersion d'indice dans le milieu. Pour valider notre modélisation (et notamment les approximations utilisées pour la forme du faisceau), nous allons donc tout d'abord comparer nos résultats à ceux de cette référence en utilisant les mêmes paramètres (fo-

calisation, indice). Afin de limiter le temps de calcul, nous avons utilisé l'approximation paraxiale pour décrire la forme du faisceau excitateur. L'allure du faisceau excitateur obtenu ne décrit pas parfaitement la forme réelle du faisceau (figure 2.25-a) mais permet d'obtenir des résultats comparables à ceux de Cheng *et al.* (2.25-b).

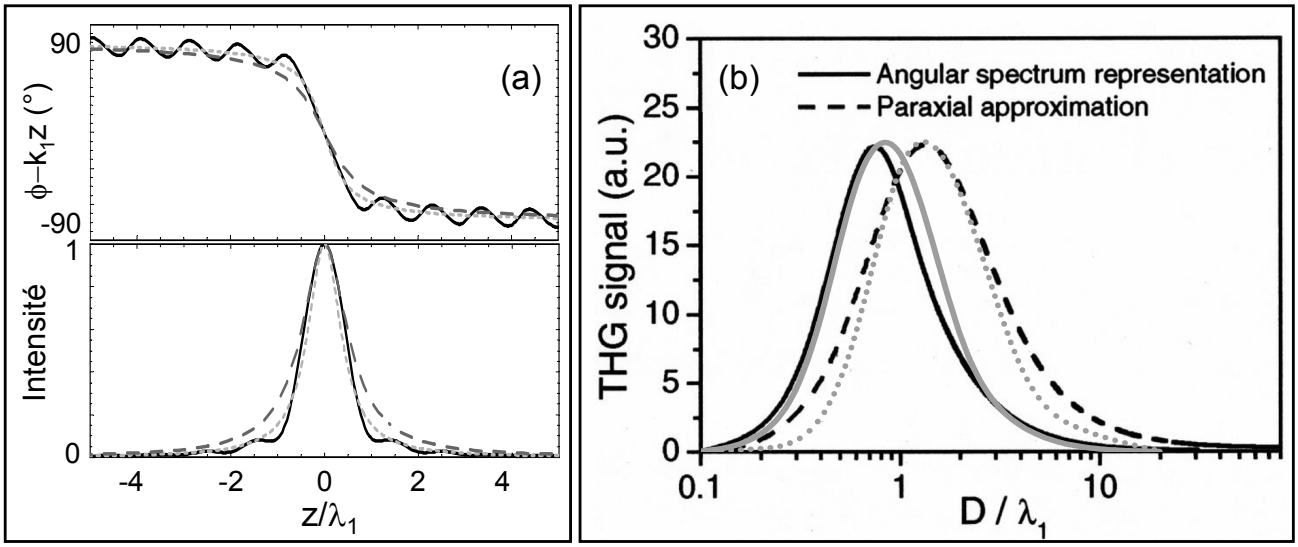


FIG. 2.25 – COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS avec le cas d'un calcul exact. (a), intensité et phase du faisceau excitateur dans le cas d'un calcul exact (traits pleins noirs), d'un faisceau gaussien ($b = 0.28\,\mu$m) de même largeur à mi-hauteur (traits en pointillés fins, gris clairs) et du faisceau gaussien ($b = 0.52\,\mu$m) considéré dans la référence [88] dans l'approximation paraxiale (pointillés épais, gris foncés). Les courbes en traits pleins noirs sont identiques à celles de la référence [88]. (b), résultats de notre modélisation pour les deux faisceaux gaussiens, $b = 0.28\,\mu$m (trait plein gris) et $b = 0.52\,\mu$m (trait pointillé gris), comparés aux résultats de Cheng *et al.* pour un calcul exact (trait plein noir) et l'approximation paraxiale avec $b = 0.52\,\mu$m (trait pointillé noir).

Dans notre modélisation comme dans la référence [88], on retrouve l'allure prédite qualitativement : les petites billes apparaissent pleines tandis que les billes plus grosses vont apparaître creuses sur une image THG, dès que les bords sont suffisamment éloignés pour être dissociés.

On note cependant clairement que la courbe que nous avons obtenue présente des variations par rapport à celle issue d'un calcul exact, notamment en termes de position du maximum (lequel se situe autour de 0.8λ au lieu de 0.7λ) ; cependant, ces écarts restent faibles si l'on considère que la comparaison a été menée dans le cas le plus défavorable (très forte focalisation avec un faisceau diaphragmé en entrée de l'objectif). Le désaccord est notablement inférieur à celui annoncé par Cheng *et al.* mais il faut noter que dans le cas d'un faisceau gaussien, les auteurs tirent cette conclusion d'un calcul avec un faisceau beaucoup moins focalisé ($b \approx 0.52\,\mu$m contre $b \approx 0.28\,\mu$m pour décrire la forme exacte du faisceau, voir figure 2.25-a).

Dans les expériences présentées par la suite, l'ouverture numérique utilisée est toujours inférieure ou égale à 0.9. On peut donc raisonnablement admettre que les erreurs systématiques

du calcul avec l'approximation paraxiale sont négligeables et nous avons en conséquence conservé cette approximation dans toutes les simulations ultérieures.

Pour vérifier expérimentalement ces résultats théoriques, on a utilisé des billes de polystyrène de tailles différentes dispersées dans un gel d'agarose. Comme on cherche à comparer le niveau de signal obtenu pour différents objets, la mesure est très sensible aux fluctuations du laser, à la position de l'objectif de collection, aux propriétés de diffusion de l'échantillon dont on fait l'image, etc... Si l'on utilise des échantillons différents pour chaque taille de bille étudiée, on risque donc de cumuler ces différentes sources d'erreur et d'aboutir à une très grande incertitude sur les rapports des signaux.

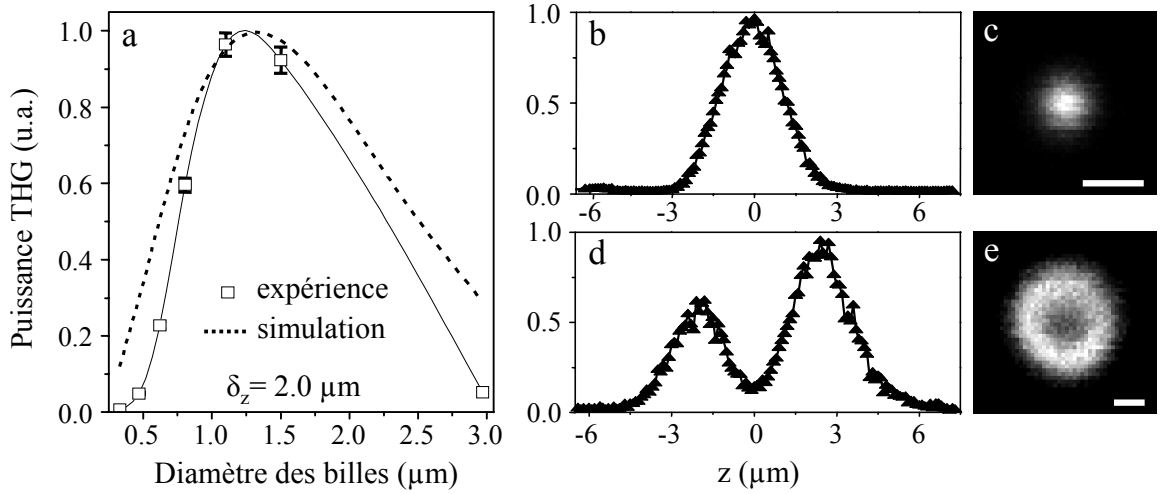


FIG. 2.26 – SIGNAL THG OBTENU AU CENTRE DE BILLES DE DIFFÉRENTES TAILLES.
(a), signal au centre de billes de polystyrène de différentes tailles. Les carrés sont les points expérimentaux obtenus à partir d'une trentaine de billes de chaque taille. Les barres d'erreur ont été estimées à partir de l'erreur standard sur les rapports de puissance mesurés. La ligne pleine est un guide visuel. La ligne en pointillé est la simulation numérique correspondante. (b), profil THG axial et (c) latéral d'une bille de 0.6 µm. la bille apparaît pleine. (d), profil axial et (e) latéral d'une bille de 3.0 µm. La bille apparaît creuse. Barres d'échelle, 2 µm.

Pour limiter ces erreurs, on a choisi d'utiliser des échantillons contenant chacun deux types de billes de tailles différentes. Ainsi, en faisant le rapport de la puissance THG obtenue pour chacun des deux types, on s'affranchit de ces erreurs et l'incertitude sur le rapport est nettement diminuée. Pour obtenir la courbe de dépendance en taille, on a combiné chaque type de billes avec les deux tailles précédentes et les deux suivantes. En réunissant les différents rapports de puissance THG pour chaque combinaison, on obtient le graphe présenté sur la figure 2.26 : la courbe est effectivement similaire à celle décrite théoriquement. Les barres d'erreur données sur la figure sont calculées à partir de la largeur à mi-hauteur de la distribution de rapports divisée par la racine carrée du nombre de billes prises en compte.

A cause de la grande différence de signal selon la taille de la bille, il est difficile d'observer des billes de tailles très différentes. Avec les paramètres de la figure 2.27 (objectif 60x d'ouverture

numérique 0.9, résolution axiale $\delta_z = 2\,\mu\text{m}$), on a par exemple un facteur 20 entre la puissance rayonnée par une bille de $1\,\mu\text{m}$ et par une bille de 300 nm. Il sera donc très difficile d'observer cette dernière sans atteindre la saturation au niveau des objets plus gros.

Tout se passe comme si faire l'image d'un objet en THG revenait à appliquer un filtre passe-bande en fréquences spatiales sur l'image pour en supprimer les détails[6] : pour des billes nettement plus petites que le volume focal, le champ croît avec le nombre de molécules dans le volume focal, donc le cube du diamètre. La puissance varie donc avec la puissance sixième du diamètre (voir figure 2.27) : la cohérence réduit la sensibilité aux petits objets comparativement au cas d'un processus incohérent comme l'émission de fluorescence. En effet pour un processus incohérent, le signal émis varie dans ce cas proportionnellement au nombre de molécules fluorescentes dans le volume focal, donc comme le cube du diamètre de la sphère (pour une bille plus petite que le volume focal).

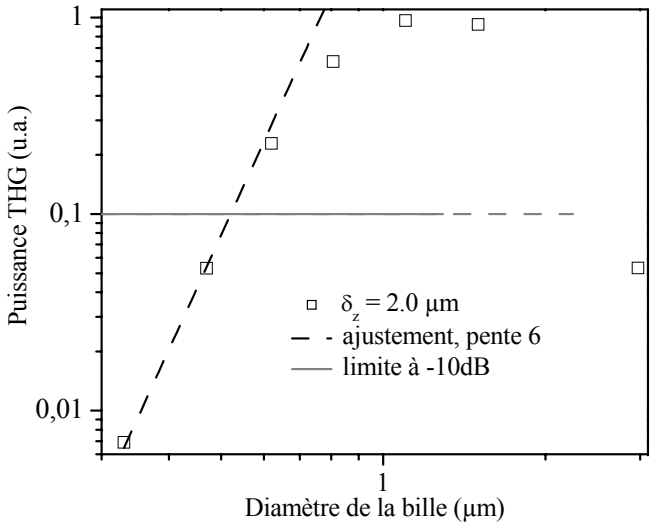


FIG. 2.27 – SIGNAL THG OBTENU AU CENTRE DE BILLES DE DIFFÉRENTES TAILLES.
En échelle logarithmique, on retrouve la dépendance du signal en puissance sixième du rayon. Pour les billes se rapprochant de la taille du volume focal, le déphasage du champ provenant des différents points de la bille intervient et le signal croît plus lentement, puis décroît.

Il faut noter cependant que ce résultat a été obtenu dans le cas d'une bille diélectrique (polystyrène) et que la dépendance obtenue est différente dans le cas d'une bille métallique : Lippitz *et al.* [75] ont ainsi montré expérimentalement que dans le cas de nanoparticules individuelles d'or de taille très inférieure à celle du volume focal, le signal maximum, obtenu au centre de la particule, variait approximativement avec le carré de la surface de la nanoparticule, soit avec la puissance quatrième de son diamètre dans le cas d'une particule sphérique. En effet, les auteurs attribuent majoritairement l'intensité de l'émission THG à l'exaltation créée par l'excitation

[6]Les objets de grande taille apparaissent donc comme creux (puisque les très basses fréquences spatiales sont supprimées) mais leurs contours sont parfaitement visibles.

résonante de plasmons de surface de la particule (voir aussi [109], [110]).

Enfin, récemment, Shcheslavskiy *et al.* [111] ont cherché à détecter des objets de petites tailles grâce à l'émission THG et ont proposé une variation du signal avec la puissance quatrième du rayon. Ils comparent leur résultat, obtenu pour des billes diélectriques (verre ou polystyrène), à celui de Lippitz *et al.*, qui concerne des billes métalliques. Dans leur expérience, les billes diffusent librement en solution et le faisceau excitateur est fixe : le signal THG est obtenu en faisant la moyenne temporelle du signal détecté, pour différentes concentrations, afin d'obtenir le signal d'une bille individuelle. Or, par cette méthode, les auteurs mesurent en fait le signal total émis par une bille traversant le volume focal, ce qui est équivalent à mesurer le signal total émis par une bille fixe lorsque le faisceau excitateur est balayé dans l'échantillon. Ainsi, les expériences qu'ils présentent ne sont pas comparables à celle de la figure 2.27 et de la référence [75]. De plus, la théorie développée dans cet article et qui confirme cet exposant 4 est incorrecte puisque les auteurs somment les intensités produites en différents points de la bille et non pas les champs. Enfin, les courbes présentées dans l'article correspondent non pas à une puissance 4 mais à une puissance 4.25-4.5.

On peut par contre comparer leur résultat à celui présenté dans le paragraphe 2.2.1.2 sur la figure 2.33 qui présente le signal total créé par une bille fixée dans un gel d'agarose lorsque le faisceau excitateur est balayé dans l'échantillon. Dans ce cas, nous trouvons également une variation du signal avec la puissance 4.5 du diamètre environ.

2.1.4 Récapitulatif

On peut pour finir résumer les propriétés de l'image THG liées à la géométrie de l'échantillon étudié :

-L'image obtenue est une image à fond noir. En dehors de l'échantillon à étudier, le milieu est homogène et ne donne donc pas de signal ; de plus, si un échantillon est homogène, le signal proviendra seulement de ses contours.

-La sensibilité aux petits objets est limitée par le filtrage spatial dû à la construction cohérente du signal.

-Des effets d'interférence peuvent créer des artéfacts dans les images (voir chapitre 3).

2.2 Focalisation et sélection des structures visibles

Dans la section précédente, on comparait pour une condition de focalisation donnée le signal provenant de différentes géométries. Nous allons étudier maintenant l'influence des conditions de focalisation du faisceau sur les résultats précédents. Dans un premier temps, on considérera le cas de billes centrées sur le point de focalisation du faisceau, puis le cas du signal total créé par ces mêmes billes. Dans toute la suite, on caractérise les conditions de focalisation par la résolution axiale δ_z obtenue sur une interface perpendiculaire au faisceau. On a considéré deux dispositifs de focalisation différents : le premier est un objectif 60x, 0.9 NA correspondant à une résolution axiale $\delta_z = 2\,\mu\mathrm{m}$; l'autre, un objectif 20x, 0.95 NA sous-illuminé (voir fig 2.28), correspond selon la taille du faisceau au niveau de la pupille arrière de l'objectif à une résolution

axiale à mi-hauteur pour le signal THG s'étendant de $\delta_z = 2.5\,\mu m$ à $\delta_z = 6\,\mu m$ (soit une ouverture numérique effective variant environ entre 0.8 et 0.5).

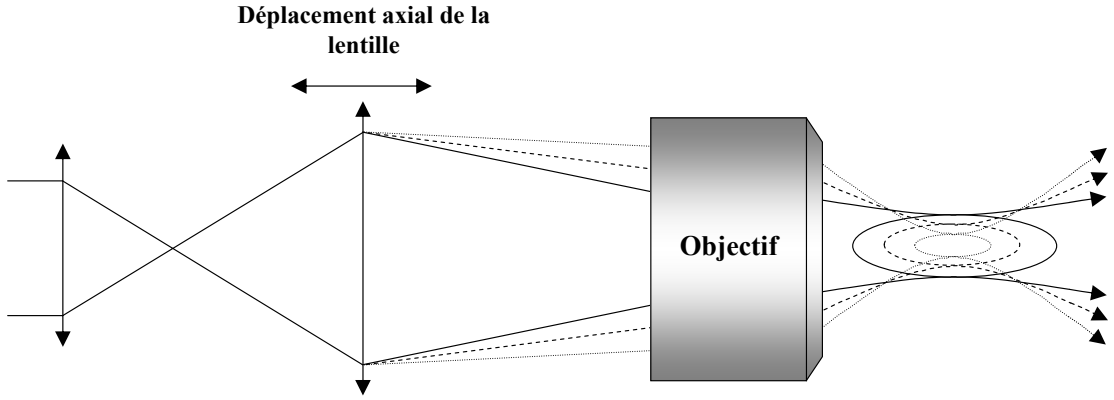


FIG. 2.28 – DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL DE CHANGEMENT DE LA FOCALISATION.
La focalisation du faisceau excitateur est ajustée en changeant la taille du faisceau au niveau de la pupille arrière de l'objectif. Le changement de position axiale du point de focalisation dû au changement de divergence est compensé par une translation de l'objectif. L'ouverture numérique effective est quantifiée expérimentalement par la mesure de la résolution axiale sur une lamelle de microscope.

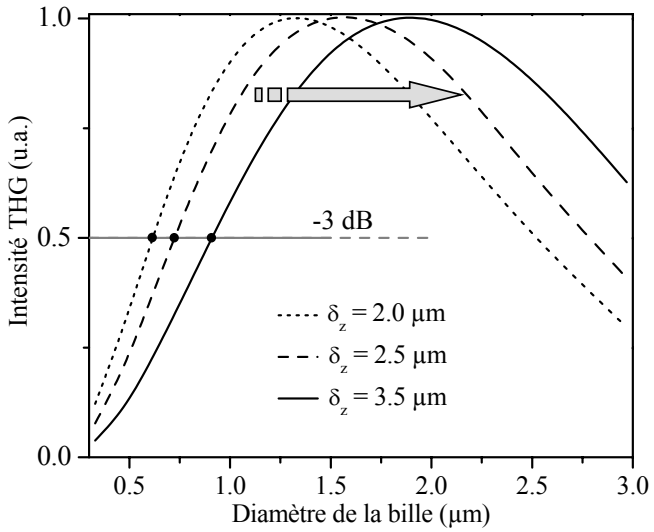


FIG. 2.29 – MODÉLISATION DE L'INFLUENCE DE LA FOCALISATION SUR LA VISIBILITÉ DES STRUCTURES DE DIFFÉRENTES TAILLES.
Lorsque la taille du volume focal augmente, le maximum de la courbe se décale vers les billes de plus grande taille. Celles-ci deviennent donc plus lumineuses que les autres. Corrélativement, la visibilité des structures de petite taille diminue : la taille minimale des objets bien visibles dans l'image (au dessus de la courbe représentant une atténuation de 3dB, par exemple) augmente.

2.2.1 Sélection en taille de certaines structures

2.2.1.1 Sphère centrée sur le point de focalisation

a Analyse théorique Dans les simulations effectuées dans ce travail, pour tenir compte de différentes conditions de focalisation, on a considéré une ouverture numérique variant de 0.5 à 0.9 (soit une résolution axiale allant de 2 à 6 microns). Les résultats obtenus pour trois conditions de focalisation différentes (résolution axiale de 2, 2.5 et 3.5 µm) sont représentées sur la figure 2.29. Ces courbes ont été obtenues en considérant un indice égal à celui du polystyrène à la fréquence fondamentale comme à la fréquence harmonique, et en négligeant la différence d'indice entre les billes et le milieu environnant. Ici apparaît clairement l'influence de la focalisation sur le filtrage spatial de l'image THG : les structures les plus visibles ont une taille dépendant de la taille du volume focal d'excitation, et la visibilité des petits objets est également affectée. En ajustant l'ouverture numérique du faisceau, on peut mettre en avant certaines structures par rapport à d'autres. Tout se passe comme si la fréquence centrale du filtre spatial obtenu pouvait être décalée en fonction des caractéristiques de l'excitation. On retrouve un résultat intuitif : pour observer des objets petits, il faudra focaliser plus (indépendamment de la résolution recherchée) le faisceau excitateur ; au contraire, si l'on cherche à observer des objets de plus grande taille, il peut être intéressant de défocaliser le faisceau excitateur afin de faire ressortir les structures d'intérêt.

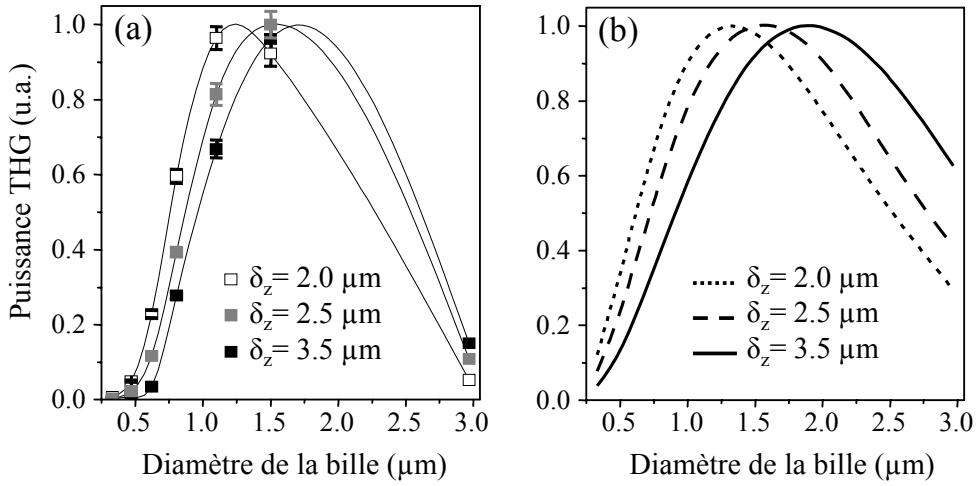


FIG. 2.30 – SIGNAL THG OBTENU AU CENTRE DE BILLES DE DIFFÉRENTES TAILLES ET POUR DIFFÉRENTES FOCALISATIONS.
(a), signal relatif au centre de billes de polystyrène de différentes tailles. Les carrés sont les points expérimentaux obtenus à partir d'une trentaine de billes de chaque taille. Les barres d'erreur ont été estimées à partir de l'erreur standard sur les rapports de puissance mesurés. La ligne est un guide visuel. (b), simulation correspondante (voir figure 2.29). Par souci de clarté, les résultats expérimentaux et théoriques sont séparés. Voir la figure 2.26 pour une superposition.

b Confirmation expérimentale Comme dans le paragraphe 2.1.3, on fait l'image de billes de polystyrène dispersées dans un gel d'agarose (voir annexe E pour la préparation des échantillons). Le résultat pour trois focalisations différentes (résolution axiale de 2, 2.5 et 3.5 µm) est présenté sur les figures 2.30 et 2.31.

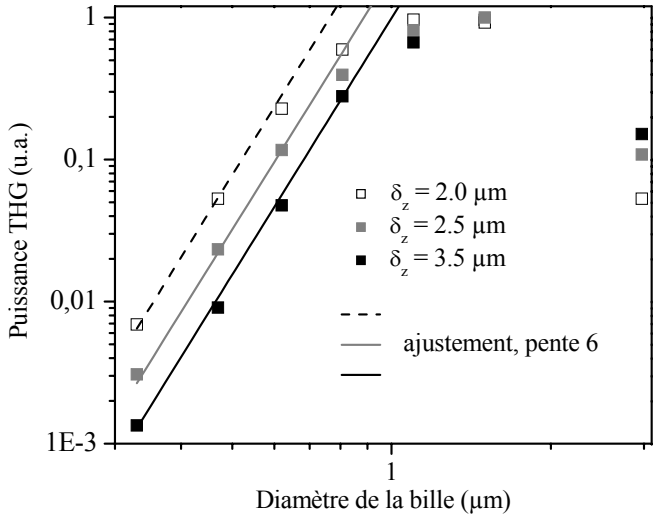


FIG. 2.31 – SIGNAL THG OBTENU AU CENTRE DE BILLES DE DIFFÉRENTES TAILLES ET POUR DIFFÉRENTES FOCALISATIONS.
Courbes de la figure 2.30-a présentées en échelle log-log. Pour les billes de petites tailles, la dépendance en taille suit la puissance sixième du diamètre pour les différentes focalisations.

Les courbes théoriques et expérimentales sont en accord qualitatif et le décalage des courbes avec la focalisation est bien décrit par notre modèle. Par contre, il apparaît clairement que les courbes théoriques ont une largeur trop importante pour bien décrire les résultats expérimentaux. Cet écart peut s'expliquer par les approximations importantes effectuées lors du calcul théorique : par exemple, on a utilisé une forme approchée pour le profil du faisceau excitateur (voir section 2.1.3). Cependant nous avons vu que cette approximation ne peut expliquer un désaccord aussi important. Par contre, de façon plus cruciale, on a négligé les différences d'indice entre les milieux composant l'échantillon : dans la pratique, les indices de l'agarose (approximativement égaux à ceux de l'eau, soit 1.325 et 1.345, [112]) et du polystyrène (1.57 et 1.61, [113]) sont suffisamment différents pour induire d'importantes modifications de la forme du faisceau lorsque celui-ci est focalisé sur une bille de taille comparable à celle du volume focal. Par exemple, l'indice du polystyrène à la fréquence excitatrice étant plus élevé que celui de l'eau, le faisceau converge plus fortement quand il pénètre dans la bille [114] : expérimentalement, on constate que le signal THG est plus important lorsque le faisceau a traversé la bille (voir figure 2.32). Très qualitativement, cet effet va tendre à diminuer la taille du volume focal dans les billes de grande taille. Au centre de la bille, ceci signifie que les bords de la bille seront « plus loin » du volume focal, donc le signal THG créé sera plus faible. La courbe expérimentale décroît donc plus vite pour les grandes billes qu'en l'absence de déformation du faisceau.

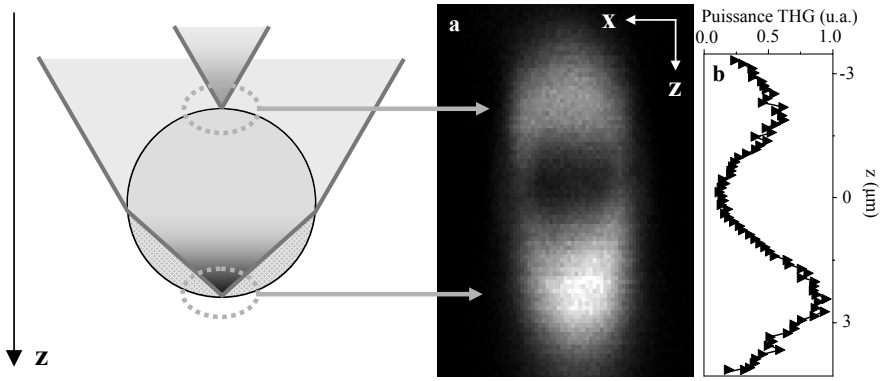


FIG. 2.32 – DÉFORMATION DU FAISCEAU EXCITATEUR LORS DE LA FOCALISATION DANS UNE BILLE.
(a), schéma de la déformation du faisceau excitateur par une bille de taille importante par rapport au volume focal. L'indice du polystyrène étant plus élevé que celui de l'eau environnante, la réfraction à l'entrée dans la bille induit une convergence plus forte du faisceau qui augmente localement la densité de puissance. Le signal THG obtenu ((b), coupe xz d'une bille de 3 µm) est donc plus important au voisinage de la surface inférieure de la bille. Le profil du signal THG au centre de la bille (c) est asymétrique, ce qui induit une déformation de la courbe de dépendance en taille.

2.2.1.2 Puissance totale créée par une sphère

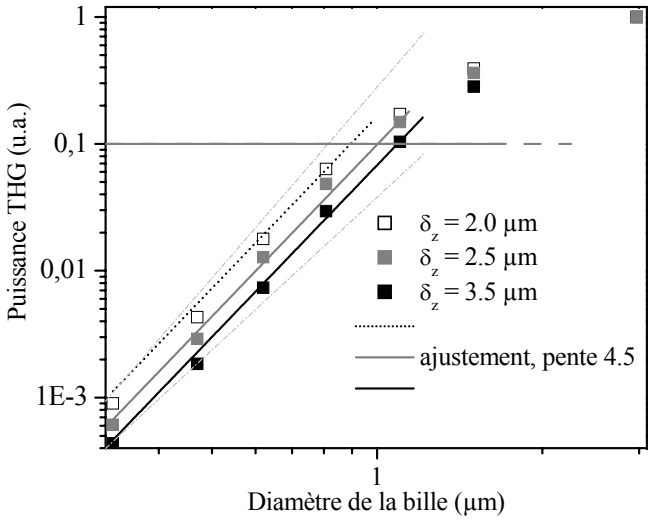


FIG. 2.33 – PUISSANCE TOTALE CRÉÉE PAR UNE BILLE dans une image tridimensionnelle. Les différentes courbes en échelle log-log présentent pour les petites billes une variation avec la puissance ≈ 4.5 du diamètre. A titre de comparaison, les deux courbes en gris clair illustrent des pentes 4 et 5. La visibilité relative des structures de différentes tailles dépend de la focalisation. Si l'on considère notamment un seuil de visibilité pour une puissance relative de 0.1, la taille minimale des billes visibles augmente avec la taille du volume focal.

Les courbes précédentes ne sont pas réellement adaptées à une application en imagerie car le paramètre important pour déterminer la visibilité d'une structure dans ce cas est le signal total créé par la structure en question lorsque le faisceau effectue un balayage en trois dimensions de l'échantillon. Il paraît donc plus adapté de décrire la variation du signal *total* créé par une sphère en fonction de son diamètre et pour différentes focalisations. Les courbes correspondantes sont représentées sur la figure 2.33. Ici, le fait que les billes de grande taille restent bien visibles même si leur centre apparaît sombre est mis en évidence, de même que l'effet de filtre passe-bas lié à l'imagerie cohérente.

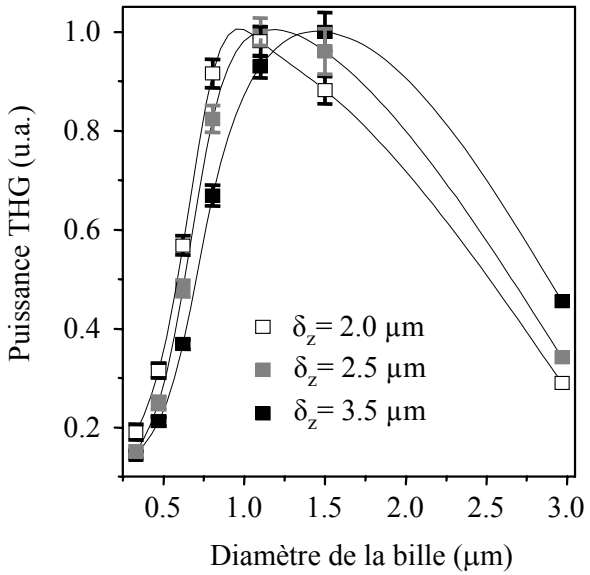


FIG. 2.34 – PUISSANCE TOTALE CRÉÉE PAR UNE BILLE dans une image tridimensionnelle, rapportée au volume de la bille. Cette grandeur décrit la « luminosité moyenne » des structures. Comme précédemment pour le signal au centre des billes, on retrouve des courbes passant par un maximum pour un diamètre dépendant de la focalisation du faisceau excitateur, ce qui traduit l'exaltation de structures d'une taille donnée et l'hétérogénéité des réponses d'un échantillon composé de structures de différentes tailles.

Enfin, on peut relier ces courbes à la luminosité moyenne des structures en normalisant le signal obtenu par le volume de la bille : on obtient alors le signal moyen par pixel, et on retrouve dans ce cas un maximum sur la courbe correspondant aux structures pour lesquelles le signal est exalté (voir figure 2.34). Comme précédemment, on peut noter le décalage de ce maximum lors du changement des conditions de focalisation du faisceau excitateur.

2.2.2 Comparaison de géométries différentes

Jusqu'ici, on a comparé le signal relatif provenant de structures de taille variable dans différentes conditions de focalisation de l'excitation. Il est également intéressant d'étudier, pour un type donné de structure, l'influence de ces changements de focalisation sur le niveau absolu de signal mesuré. Expérimentalement, ceci est plus difficile à réaliser car il n'est plus possible

de s'affranchir simplement des fluctuations du faisceau excitateur (lesquelles sont notablement amplifiées lorsqu'on s'intéresse à un processus d'ordre trois), ni du changement de puissance sous l'objectif de focalisation lorsque le diamètre du faisceau (et donc la fraction de puissance transmise) varie au niveau de la pupille arrière (figure 2.28). Ceci explique donc que les courbes obtenues dans ces conditions soient plus bruitées que les courbes précédentes.

Dans la suite, on normalise simplement le signal obtenu par le cube de la puissance de l'onde excitatrice au foyer de l'objectif, cette puissance ayant été préalablement étalonnée à l'aide d'un mesureur de puissance pour différentes positions des lentilles composant le télescope d'élargissement du faisceau. Dans ce paragraphe, on s'intéresse plus particulièrement à deux types de géométries : un ensemble de billes dispersées dans un gel d'agarose (qui simulent des organelles micrométriques) et une lamelle de verre perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau (qui simule par exemple une membrane biologique).

2.2.2.1 Cas d'une simple interface perpendiculaire au faisceau

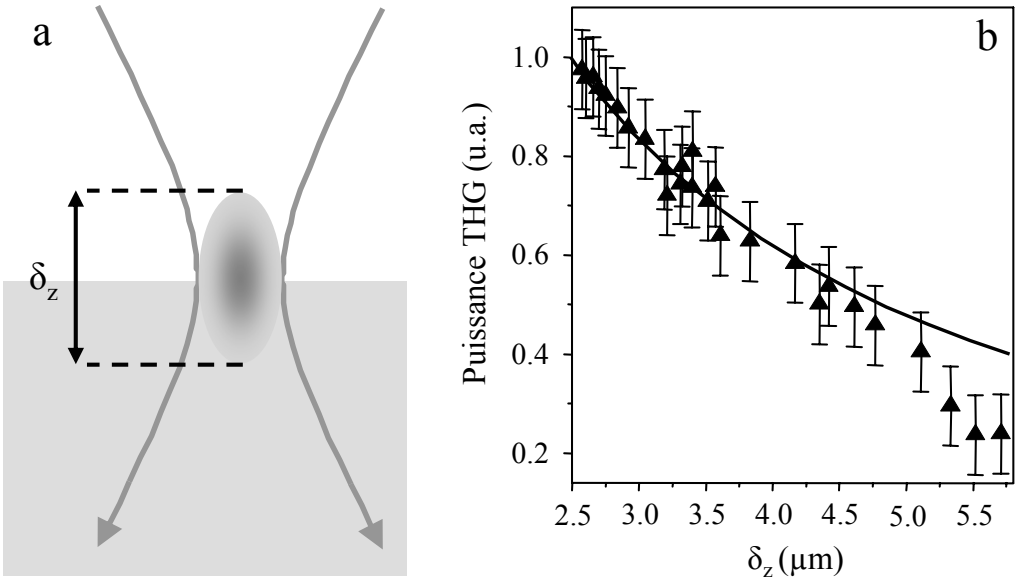


FIG. 2.35 – VARIATION DU SIGNAL THG AVEC LA FOCALISATION.
Cas d'une interface perpendiculaire au faisceau (a). (b), courbe expérimentale (triangles) et simulation correspondante (trait plein). Le bruit sur la mesure est dû à l'absence de normalisation, qui ne permet pas de s'affranchir des fluctuations de la source.

La courbe obtenue pour un faisceau dont le point de focalisation se situe sur l'interface est présentée sur la figure 2.35. On observe un net déclin du signal de troisième harmonique lorsque le faisceau excitateur est défocalisé, ce qui signifie que le processus est moins efficace. Ce résultat peut s'expliquer qualitativement : pour un milieu non dispersif, lorsque le faisceau est défocalisé, l'intensité excitatrice diminue mais le nombre de diffuseurs excités rayonnant en phase augmente dans le même temps avec la taille du volume focal. Nous avons vu (équation 2.9) que dans ce cas la puissance diffusée ne dépendait pas de la focalisation du faisceau. Par contre, dans le cas d'un milieu fortement dispersif (c'est-à-dire pour lequel $l_c << n_\omega b$), les diffuseurs rayonnant en

phase restent confinés dans une tranche de milieu d'épaisseur l_c, et leur nombre augmente donc moins vite avec b : comme le montre l'équation 2.5, on trouve alors une décroissance en b^{-2} du signal THG.

Dans l'exemple de la figure 2.35, nous sommes dans un cas intermédiaire où b et l_c sont du même ordre de grandeur ($n_\omega b \approx 2-4\,\mu\text{m}$, $l_c \approx 18\,\mu\text{m}$) : logiquement, on obtient une décroissance du signal en b^{-n} avec $0 \leq n \leq 2$. La simulation numérique effectuée avec les paramètres correspondant à l'expérience ($\lambda_1 = 1.18\,\mu\text{m}$, $n_\omega = 1.323$, $n_{3\omega} = 1.344$ (indices de l'eau, voir annexe D))[7] donne en effet une décroissance avec $n \approx 1$. La courbe expérimentalement obtenue présente elle une décroissance légèrement plus importante.

2.2.2.2 Cas d'une population de billes

On fait ici l'image d'une population de billes de polystyrène de 600 nm et 3.0 µm de diamètre dispersées dans l'agarose et on obtient les courbes de la figure 2.36. Les variations de signal mesurées sont complètement différentes de celles obtenues dans le cas d'une lamelle perpendiculaire au faisceau : la puissance totale sur l'image augmente nettement lorsque l'on défocalise le faisceau, résultat a priori contre-intuitif et plus difficile à expliquer. Deux phénomènes se conjuguent en effet dans cette configuration :

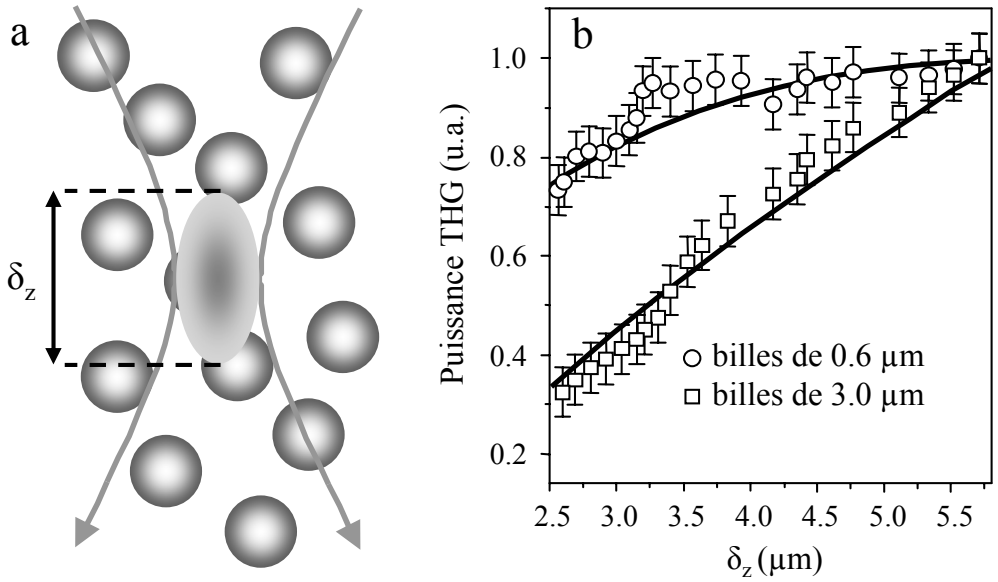


FIG. 2.36 – VARIATION DU SIGNAL THG AVEC LA FOCALISATION.
Cas d'une population de bille monodisperse (a). (b), courbe expérimentale obtenue (ronds et carrés) et simulations correspondantes (traits pleins). Le bruit sur la mesure est dû à l'absence de normalisation, qui ne permet pas de s'affranchir des fluctuations de la source.

[7] On a choisi arbitrairement ici de considérer les indices de l'eau et non ceux du verre : ce choix ne devrait pas être critique pour l'allure de la courbe obtenue car si l'indice du verre est plus élevé, la longueur de cohérence des deux matériaux est à peu près équivalente pour les longueurs d'onde considérées.

– D'une part, lorsque le volume focal s'agrandit, les différences de phase entre les différents points de la bille sont moins importantes car la variation de la phase du faisceau excitateur à l'échelle de la bille est plus faible. Ici, la différence fondamentale par rapport au cas de la lamelle est que l'objet considéré est de taille finie et que l'on peut donc comparer cette taille à δ_z[8], tandis que la lamelle constitue un milieu semi-infini à l'échelle considérée, pour lequel la variation de phase du faisceau excitateur ne peut jamais être négligée. L'effet dépend donc de la taille de la bille, ce qui est manifeste sur la figure 2.37 où le signal au centre de la bille est représenté en fonction de δ_z pour des billes de 0.6 et 3.0 µm : dans le premier cas, la bille est rapidement plus petite que le volume focal, donc la défocalisation induit une diminution du signal après un passage par un maximum. Dans le deuxième cas, on se rapproche de l'accord de phase et le signal augmente.
– D'autre part, comme le diamètre de la bille est comparable à la largeur du volume focal, sa taille apparente sur l'image dépend de la résolution du microscope. Si le volume focal est plus grand, la taille apparente de la bille augmente et le signal de la bille est sur-échantillonné (ce qui explique la croissance ininterrompue de la courbe correspondant aux billes de 0.6 µm sur la figure 2.36). Comme l'effet précédent, celui-ci n'existe pas dans le cas d'une interface perpendiculaire au faisceau, dont la taille transverse est infinie. Enfin, de la même façon, la taille axiale apparente de la bille augmente ce qui revient à dire que le nombre de billes visualisées sur l'image est plus important.

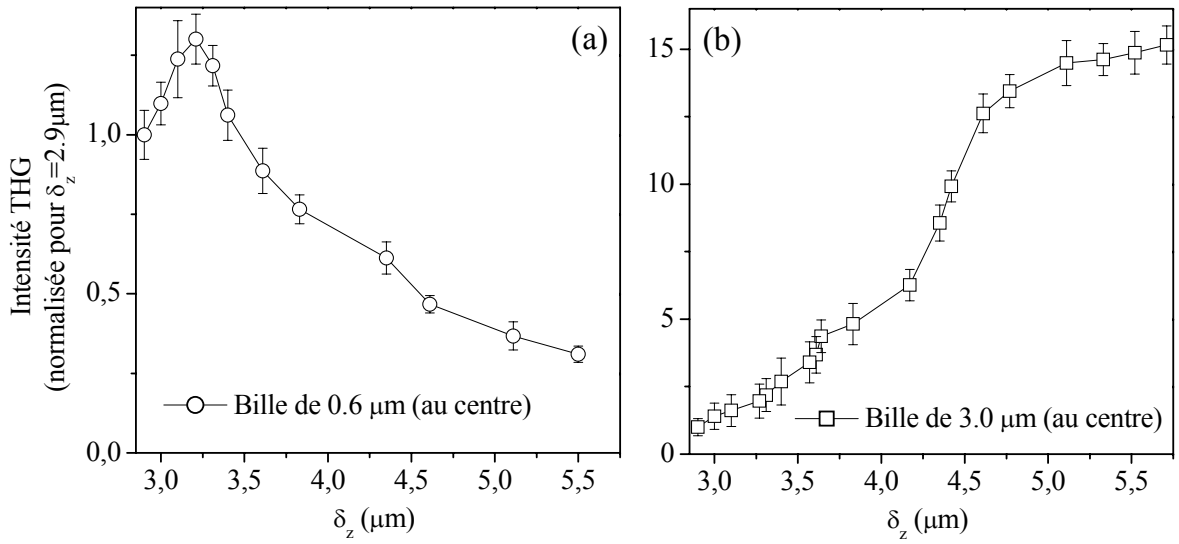


FIG. 2.37 – VARIATION DU SIGNAL THG AVEC LA FOCALISATION.
Cas d'une bille centrée sur le point de focalisation du faisceau. Le bruit sur la mesure est dû à l'absence de normalisation, qui ne permet pas de s'affranchir des fluctuations de la source. Les barres d'erreur ont été déterminées à partir de l'écart quadratique sur une dizaine de billes imagées pour chaque point.

La combinaison de ces effets permet de compenser la diminution du signal due à la décroissance de l'intensité en chaque point. Il faut noter de plus que cette augmentation de signal est d'am-

[8]Rappelons que δ_z est la résolution axiale à mi-hauteur du signal THG.

plitude importante puisqu'il est possible, en passant de $\delta_z = 2.5\,\mu$m à $\delta_z = 6\,\mu$m de gagner un facteur 3 sur le signal mesuré. Cependant, on s'attend à obtenir ensuite une décroissance de la courbe si l'on continue à défocaliser le faisceau, quand l'effet d'interférence dans la bille ne pourra plus compenser la diminution de la densité d'énergie excitatrice.

2.2.3 Applications

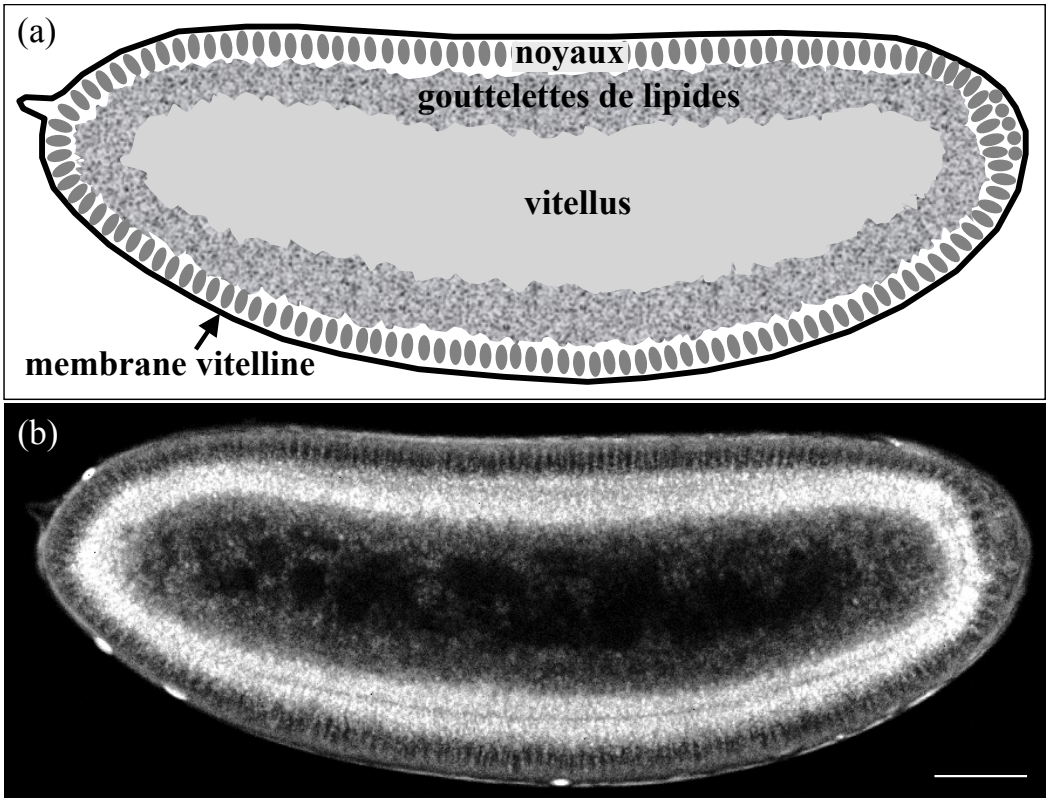


FIG. 2.38 – STRUCTURE DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE PRÉCOCE.
L'embryon au stade 5 (3 h après la fécondation) présente une succession de couches à partir de la membrane externe (a). La zone constituée majoritairement de corps lipidiques est celle qui donne le plus fort signal en microscopie THG (b). Barre d'échelle, 50 µm.

Les résultats obtenus peuvent permettre d'adapter les conditions d'imagerie en fonction de l'échantillon étudié pour optimiser la qualité de l'image. En effet, on aura tendance intuitivement à utiliser une ouverture numérique la plus grande possible afin d'améliorer la résolution de l'image. Cette approche se justifie si l'on cherche à observer des échantillons de taille réduite comme par exemple des cellules isolées (taille typique de l'ordre de quelques dizaines de microns, avec des organelles de quelques centaines de nanomètres), ou des détails dans des échantillons de taille plus importante. Cependant, d'autres paramètres doivent être pris en compte pour déterminer la qualité de l'image obtenue. Par exemple, le contraste des structures d'intérêt ou la vitesse d'acquisition des images peuvent aussi être des paramètres déterminants pour utiliser la

microscopie THG de façon optimale dans certaines études.

On s'intéresse au cas, développé en détail dans le chapitre 4, de l'imagerie structurale du développement de l'embryon de drosophile. Une image en microscopie THG de l'embryon environ 3 h après la fécondation est présentée sur la figure 2.38. Sur cette image apparaissent les différentes structures composant l'embryon à ce stade de développement : autour de l'embryon, la membrane vitelline est l'enveloppe externe dans laquelle il se développe ; les membranes cellulaires ne sont pas encore formées et les noyaux sont alignés le long de la membrane vitelline ; autour d'eux et plus en profondeur, de nombreux corps lipidiques sont activement transportés et de façon régulée selon le stade de développement ; enfin, au centre de l'embryon, le vitellus (ou espace vitellin, équivalent du jaune d'oeuf) fournit les éléments nécessaires (protéines, glycogène...) à la croissance de l'embryon (pour plus de détails sur la description de l'embryon de drosophile aux stades précoces, voir chapitre 4).

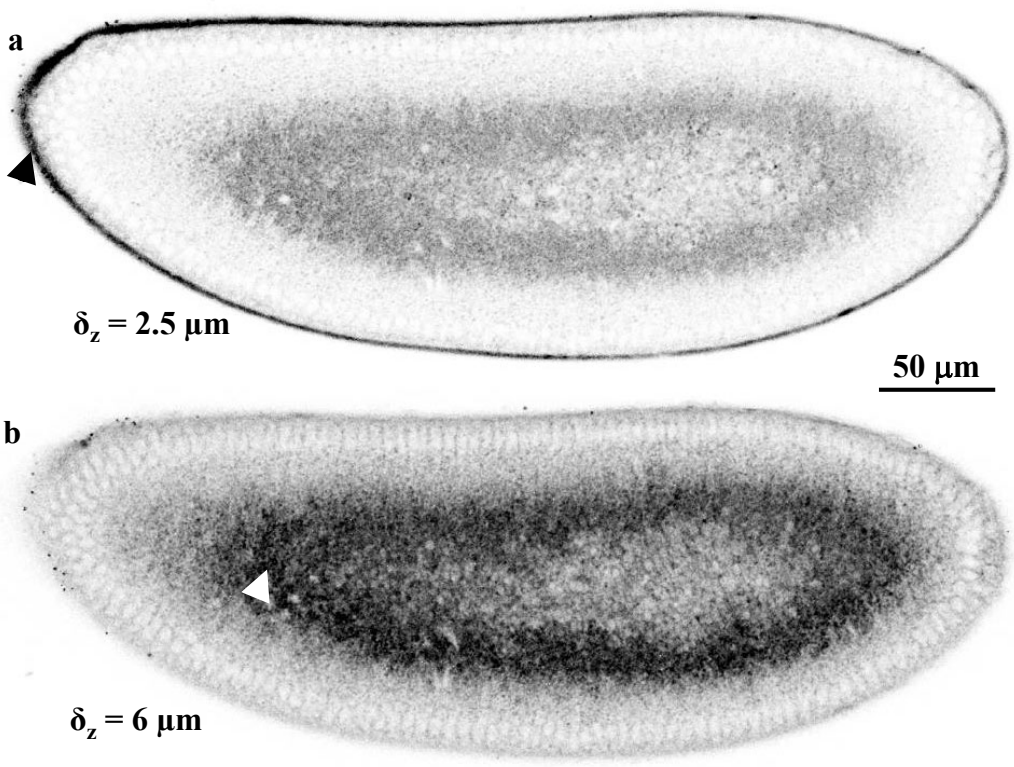


FIG. 2.39 – IMAGERIE THG DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE selon la focalisation du faisceau excitateur. En haut, pour une forte focalisation, le signal provient surtout de la membrane vitelline. En bas, pour un faisceau défocalisé, le signal provient principalement du centre de l'embryon. Les deux images sont présentées avec la même échelle de niveaux de gris et en contraste inversé (blanc = pas de signal, noir = signal maximal).

Les structures qui nous intéressent dans cet exemple sont celles animées de mouvements lors du développement, c'est-à-dire toutes celles situées à l'intérieur de la membrane vitelline à l'exclusion de celle-ci. Ces structures sont essentiellement des vésicules de taille variant entre 500 nm pour les gouttelettes lipidiques et quelques microns pour les structures présentes dans le vitellus. Comme on le verra par la suite, pour obtenir des informations sur les mouvements

dans l'embryon au cours du développement, il est nécessaire d'avoir une résolution temporelle minimale de l'ordre de 10-30 s (pour une image d'environ 5×10^5 pixels), ce qui implique un niveau de signal assez important pour limiter le temps d'acquisition par pixel à quelques microsecondes. Par contre, les mouvements étudiés sont des mouvements de tissus s'effectuant sur une échelle de plusieurs microns, et la technique d'analyse des séquences d'images utilisée est particulièrement sensible aux structures de l'image de dimensions micrométriques (voir chapitre 4). Une résolution spatiale de quelques microns est donc suffisante.

On peut donc utiliser les résultats obtenus dans les paragraphes précédents pour améliorer le contraste des structures d'intérêt dans l'image de l'embryon en optimisant la focalisation du faisceau excitateur. Le résultat est présenté sur la figure 2.39 : il apparaît très clairement, pour une plus faible focalisation, que non seulement le contraste entre l'intérieur de l'embryon et la membrane externe est amélioré, mais également que le niveau de signal obtenu dans l'embryon est plus important [115].

Quantitativement, on a représenté sur la figure 2.40 le signal au niveau de la membrane vitelline et au centre de l'embryon, normalisé par le cube de la puissance incidente, en fonction de la résolution axiale δ_z. Le facteur gagné sur le signal au centre de l'embryon est de l'ordre de 5, ce qui permet de diviser par cette même valeur le temps d'acquisition des images ou d'améliorer notablement le rapport signal sur bruit dans les images.

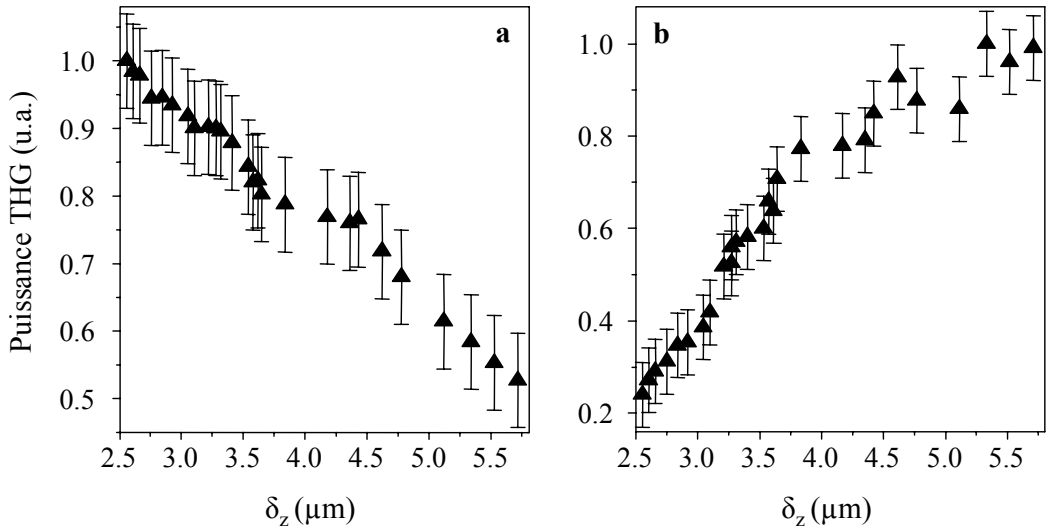


FIG. 2.40 – SIGNAL THG PROVENANT DE DIFFÉRENTES RÉGIONS DE L'EMBRYON en fonction de la focalisation du faisceau excitateur. (a), membrane vitelline ; (b), centre de l'embryon (zone dense en gouttelettes lipidiques et yolk).

Finalement, cette amélioration du contraste de l'image permet d'agir significativement sur la phototoxicité de l'imagerie THG : comme on le verra dans la section 4.3, celle-ci augmente en effet à la fois avec la puissance du faisceau excitateur et avec la dose d'éclairement de l'embryon par unité de temps. En augmentant la vitesse de balayage ou en diminuant la puissance de la source, on peut donc diminuer les effets phototoxiques de l'imagerie et préserver la viabilité des embryons, y compris sur le long terme.

2.3 Caractère directionnel de l'émission et efficacité de détection

Dans les exemples présentés dans cette partie, on a considéré des échantillons minces (embryon de drosophile, environ 150 à 200 µm d'épaisseur) ou assez peu diffusants (gel d'agarose contenant une densité faible de billes de polystyrène, cuve de verre contenant un liquide homogène). On s'est donc limité à détecter le signal obtenu en transmission. Cependant dans beaucoup d'échantillons biologiques (organes entiers, organismes plus gros), cette configuration sera difficile à mettre en œuvre. Si l'on cherche par exemple à faire l'image du cerveau d'un animal *in vivo*, il sera nécessaire d'utiliser une géométrie d'épicollection, comme c'est généralement le cas en microscopie 2PEF. Il est donc important d'étudier la faisabilité d'une détection à travers l'objectif de focalisation du faisceau excitateur en fonction des propriétés optiques de l'échantillon étudié.

Dans cette partie on s'intéressera tout d'abord aux diagrammes de rayonnement THG d'objets isolés, afin d'étudier notamment la fraction de signal se propageant vers l'arrière. On considérera ensuite l'influence de la diffusion linéaire et de l'absorption du milieu environnant sur la fraction de signal épidétectée pour conclure finalement sur la possibilité de détecter le signal THG dans une géométrie d'épicollection.

2.3.1 Analyse théorique dans le cas d'un objet isolé

Jusqu'à présent, on a considéré que l'émission THG s'effectuait principalement vers l'avant, avec un cône d'émission plus ou moins grand selon la géométrie de l'échantillon et celle du faisceau excitateur. En effet, on a considéré que l'émission se faisait principalement selon les directions pour lesquelles le désaccord de phase entre l'onde excitatrice et l'onde diffusée était le plus faible : dans ces directions, la distance d_c sur laquelle le signal se construit est maximale, ce qui correspond aussi au plus grand nombre de dipôles rayonnant en phase et donc à un signal maximal.

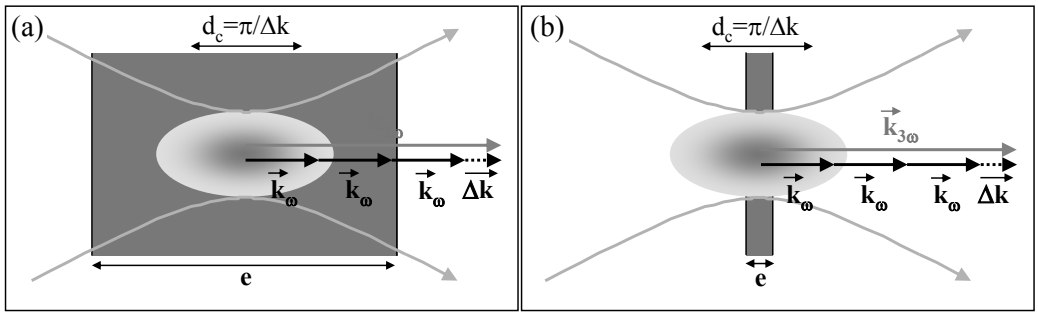


FIG. 2.41 – DÉSACCORD DE PHASE ET CONSTRUCTION DU SIGNAL.
Pour un milieu d'épaisseur e grande devant l'inverse du désaccord de phase $\boldsymbol{\Delta k}$ (a), la construction du signal se fait sur l'épaisseur d_c qui gouverne la direction d'émission (plus d_c est grande, plus l'émission est forte). Par contre, si pour toutes les directions, l'épaisseur du milieu est plus petite que d_c (b), c'est cette épaisseur e qui va déterminer le diagramme de rayonnement.

Cependant, cette analyse laisse de côté plusieurs éléments : d'une part, elle suppose que l'extension spatiale de l'objet est « suffisamment grande » pour que, hors d'un cône étroit autour de la direction d'accord de phase (ou de moindre désaccord de phase), la distance d'interaction soit limitée par d_c et non par la taille de l'objet (figure 2.41). D'autre part, elle néglige l'impact des fréquences spatiales de l'échantillon qui peuvent en partie compenser le désaccord de phase entre les deux ondes [108].

Nous allons donc étudier, pour différentes géométries, les diagrammes de rayonnement THG, et en déduire la fraction de signal créée vers l'arrière.

2.3.1.1 Cas d'une interface entre deux milieux homogènes semi-infinis

Une interface entre deux milieux homogènes peut être décrite comme une fonction de Heavyside à une dimension : elle contient donc toutes les fréquences spatiales dans la direction perpendiculaire à l'interface, avec une amplitude proportionnelle à l'inverse de la fréquence. Ainsi, dans la direction perpendiculaire à l'interface, toutes les valeurs du désaccord de phase peuvent en théorie être compensées, avec une efficacité variant avec l'inverse de ce désaccord. Par contre, dans la direction parallèle à l'interface, seule la fréquence nulle est présente et aucun désaccord de phase ne peut être compensé sur l'axe de propagation du faisceau (figure 2.42).

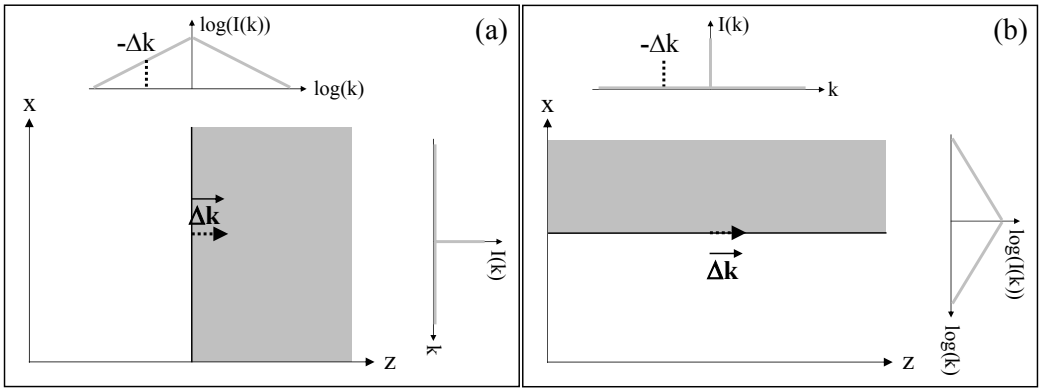


FIG. 2.42 – FRÉQUENCES SPATIALES DE L'ÉCHANTILLON.
(a), pour une interface perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau, les vecteurs d'onde présents dans l'échantillon peuvent compenser le désaccord de phase et induire un signal détectable vers l'avant comme vers l'arrière. (b), dans le cas d'une interface parallèle au faisceau, la seule fréquence spatiale présente selon l'axe z est la fréquence nulle, donc l'interface ne peut compenser aucun désaccord de phase et l'émission, pour $\boldsymbol{\Delta k} \neq 0$, doit se faire hors de l'axe z.

Ainsi, on s'attend à ce que pour une interface perpendiculaire au faisceau, l'émission se fasse vers l'avant ($\theta = 0°$) et vers l'arrière ($\theta = 180°$), tandis que pour une interface parallèle au faisceau, l'émission se fasse vers l'avant, mais hors de l'axe($0° \leq |\theta| \leq 90°$).

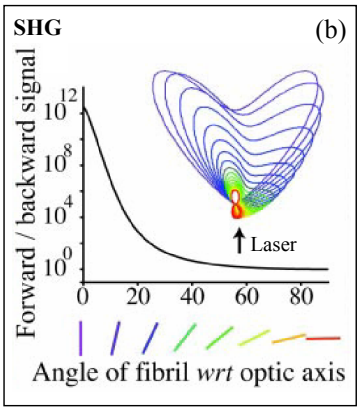
Ceci est confirmé par la simulation de l'émission THG dans l'approximation paraxiale pour ces deux géométries. Les rapports signal THG vers l'avant/signal THG vers l'arrière sont présentés pour trois focalisations différentes sur la figure 2.43-a : dans le cas d'une interface parallèle à la

direction de propagation du faisceau, on trouve effectivement un rapport avant/arrière tendant vers l'infini, comme il apparaissait sur les diagrammes de rayonnement des figures 2.19 et 2.20, page 52.

Dans le cas d'une interface perpendiculaire au faisceau, il existe un signal émis vers l'arrière, bien que moins efficacement que vers l'avant puisque le désaccord de phase à compenser est plus grand (figure 2.45). On note d'ailleurs que le rapport avant/arrière est d'autant plus faible que l'ouverture numérique est forte ; en effet pour une forte focalisation, l'inclinaison des rayons par rapport à l'axe est en moyenne plus forte donc la résultante moyenne des vecteurs d'onde d'excitation selon l'axe est plus faible. Ainsi, le désaccord de phase est réduit vers l'arrière et augmenté vers l'avant, ce qui rééquilibre les deux signaux.

(a)

	Rapport THG avant/arrière	
	Interface xy entre deux milieux semi-infinis	Interface yz entre deux milieux semi-infinis
NA=0.5	3350	$> 10^{11}$
NA=0.9	749	
NA=1.4	134	



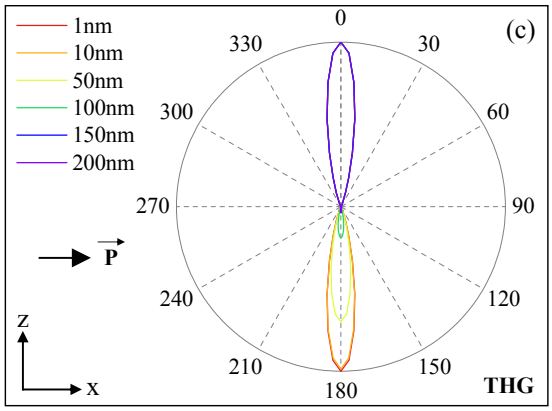


FIG. 2.43 – COMPARAISON DE L'ÉMISSION THG AVANT/ARRIÈRE.
(a), rapport du signal THG émis avec un angle $|\theta| \leq 90°$ (vers l'avant) sur le signal THG émis avec un angle $90° \leq |\theta| \leq 180°$ (vers l'arrière) pour une interface perpendiculaire (plan xy) ou parallèle (plan yz) à la direction (z) de propagation du faisceau excitateur (figure 2.43). Ces rapports ont été obtenus avec notre modélisation pour des indices linéaires de 1.325 et 1.345 pour les fréquences fondamentales et harmoniques respectivement, et une longueur d'onde fondamentale de 1.18 µm. (b), signal SHG obtenu pour une fibrille de collagène présentant différentes orientations par rapport à l'axe optique. La figure est extraite de la référence [38]. (c), diagrammes de rayonnement THG par notre modélisation pour des tranches de milieu homogène de différentes épaisseurs, perpendiculaires à l'axe optique z. Les paramètres de la simulation sont les mêmes qu'en (a). Les différents diagrammes ont été normalisés.

Comparaison avec la microscopie SHG. On peut comparer le résultat obtenu à celui trouvé en microscopie SHG dans le cas par exemple d'une fibre de collagène : pour une fibrille dont le diamètre est très petit devant la longueur d'onde, la figure 2.43-b présente le rapport avant/arrière et le diagramme de rayonnement pour différentes orientations de la fibrille. On retrouve une émission quasiment exclusivement vers l'avant dans le cas d'une fibrille orientée parallèlement à l'axe optique, mais dans le cas d'une orientation perpendiculairement à l'axe optique, le rapport avant/arrière tend vers 1 : on peut alors efficacement détecter un signal en épicollection.

Ceci diffère du résultat obtenu en THG et peut s'expliquer par la différence entre les deux géométries étudiées : en effet dans le cas de la fibrille de collagène, l'échantillon a une taille finie et très faible devant la longueur d'onde dans sa direction transverse. Au contraire dans le cas de la THG, on a considéré un milieu semi-infini dans la direction de l'axe optique[9]. Si l'on considère au contraire une tranche de milieu très fine d'épaisseur e, perpendiculaire à l'axe optique, on obtient cette fois un diagramme de rayonnement beaucoup plus proche de celui calculé en SHG (voir figure 2.43-c) : pour une épaisseur e de 1 à 10 nm, le diagramme obtenu est effectivement symétrique entre l'avant et l'arrière, comme dans le cas de la fibrille en SHG. A l'inverse, quand la tranche devient plus épaisse, l'émission se fait principalement vers l'avant (on retrouve un milieu semi-infini).

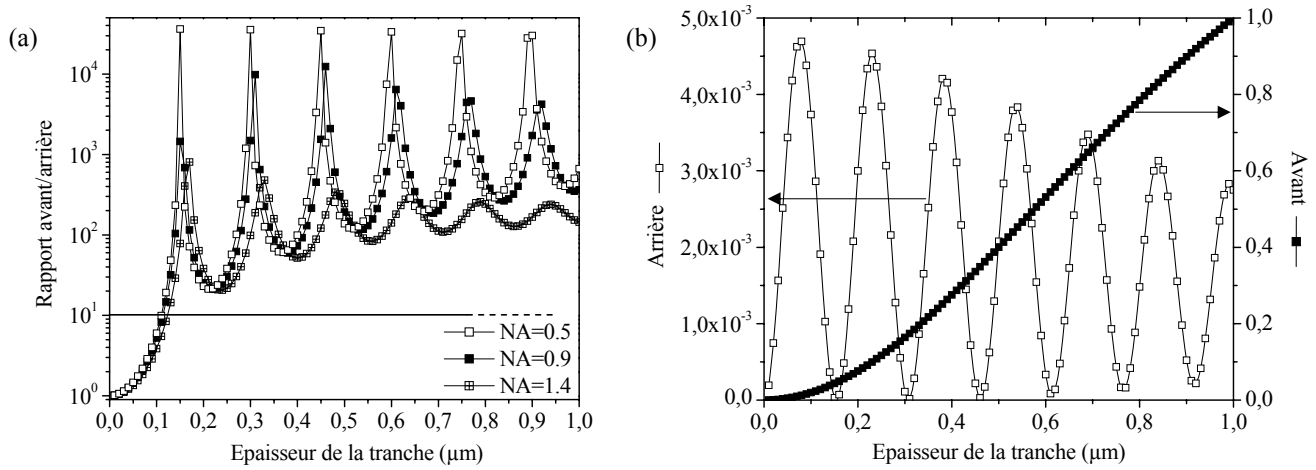


FIG. 2.44 – COMPARAISON DE L'ÉMISSION THG AVANT/ARRIÈRE POUR UNE TRANCHE DE MILIEU D'ÉPAISSEUR VARIABLE.
(a), rapport du signal THG émis vers l'avant sur le signal THG émis vers l'arrière pour une tranche de milieu d'épaisseur variable. Ces rapports ont été obtenus pour des indices linéaires de 1.325 et 1.345 pour les fréquences fondamentales et harmoniques respectivement, et une longueur d'onde fondamentale de 1.18 µm. On peut comparer ce résultat à celui obtenu en SHG pour une fibrille dont la taille augmente (voir [116]).(b), signaux THG obtenus vers l'arrière et vers l'avant dans le cas d'une ouverture numérique de 0.9. On trouve vers l'arrière une périodicité de 155 nm pour les franges, proche de la valeur calculée avec l'équation 2.24 (158 nm). La diminution de l'amplitude des oscillations avec l'épaisseur e est due au décalage de la deuxième interface hors du volume focal lorsque l'épaisseur de la tranche augmente.

On peut expliquer cette différence en considérant les fréquences spatiales mises en jeu d'une part pour une interface entre deux milieux semi-infinis et d'autre part pour une tranche de milieu infiniment fine : dans le premier cas, on a selon la direction z un spectre en fréquences spatiales $\boldsymbol{k}$ dont l'amplitude varie comme $1/k$ (figure 2.42). Par contre, dans le deuxième cas, le profil spatial selon z de l'échantillon est une fonction delta, donc le spectre en fréquence est uniforme. Ainsi,

[9]La fibrille a également une taille finie dans une des dimensions transverses, mais ceci influe essentiellement sur la largeur des lobes du diagramme de rayonnement, qui sont alors plus larges (voir aussi figure 2.46)

l'efficacité de compensation du désaccord de phase ne varie pas avec l'amplitude de ce désaccord et l'efficacité de diffusion est la même vers l'arrière et vers l'avant.

En conséquence, s'il est difficile, voire impossible de détecter un signal vers l'arrière pour une interface entre deux milieux semi-infinis, cela paraît possible pour de fines tranches de milieux. Cependant, les diagrammes présentés sur la figure 2.43-c ont été normalisés et le signal provenant de tranches fines est en fait très faible, tant vers l'avant que vers l'arrière, comme l'illustre la figure 2.44 : les épaisseurs pour lesquelles une fraction significative du signal (au moins 10%) est dirigée vers l'arrière correspondent à une situation pour laquelle les signaux sont très faibles par rapport à une tranche épaisse : typiquement 0.5% du signal obtenu pour une tranche d'un micron d'épaisseur.

Ceci se comprend facilement si l'on considère la distance sur laquelle le signal se construit effectivement : vers l'avant, comme nous l'avons vu dans la section 2.1 le signal s'additionne de façon constructive sur une longueur $d_c(\theta = 0) = \pi/\Delta k = \lambda/6(n_\omega - n_{3\omega}) = l_c/2$ de l'ordre de 10 µm (voir figure 2.45). Dans ce cas, pour un milieu d'épaisseur e inférieur à l_c, le signal s'additionne constructivement sur toute l'épaisseur de la tranche et croît continûment avec e[10].

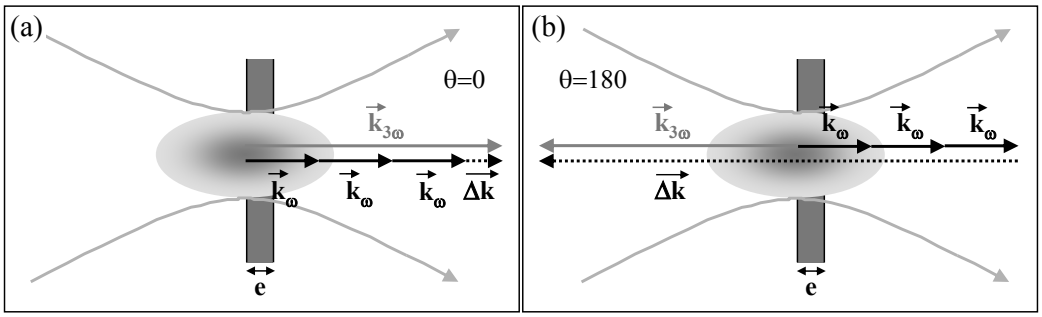


FIG. 2.45 – DÉSACCORD DE PHASE vers l'avant (a) et vers l'arrière (b). On a négligé dans ce schéma la phase de Gouy qui revient à diminuer le module des vecteurs $\boldsymbol{k}_\omega$.

Vers l'arrière au contraire, le désaccord de phase est très important et la longueur sur laquelle se construit le signal est $d_c(\theta = 180) = \pi/\Delta k = \lambda/6(n_\omega + n_{3\omega})$. Plus précisément, on peut écrire en tenant compte de la phase de Gouy :

$$d_c(\theta = 180) \times (3k_\omega + k_{3\omega} - 3/(n_\omega b)) = \pi \tag{2.24}$$

et on calcule une distance $d_c(\theta = 180)$ de l'ordre de 80 nm dans notre cas. L'épaisseur e est de l'ordre de quelques $d_c(\theta = 180)$, et on obtient des oscillations de période $2d_c(\theta = 180)$. Ainsi, le signal ne se construit que sur une épaisseur de quelques dizaines de nanomètres, ce qui explique qu'il reste toujours très faible quand l'épaisseur de la tranche augmente[11].

En conclusion, la différence essentielle dans ce problème entre la SHG et la THG est que la SHG est souvent un phénomène de surface tandis que, dans les cas considérés ici, la THG se

[10] En fait si $l_c \geq b$, c'est la longueur de Rayleigh qui limitera l'épaisseur de création du signal. Cependant cette distance est toujours au moins de l'ordre du micron.

[11] On retrouve en fait les résultats obtenus pour $b >> l_c$ présentés dans la partie 2.1.1.2, page 46, mais cette fois pour des conditions de focalisation compatibles avec la microscopie...

construit en volume : ainsi, en SHG, il est possible de faire l'image d'échantillons très minces dans une (membrane lipidique) ou deux (fibrille de diamètre très petit devant la longueur d'onde) direction(s) de l'espace, qui vont donc pouvoir rayonner vers l'arrière de façon significative tout en produisant un signal détectable. Au contraire, en THG, seuls les échantillons ayant une extension comparable ou grande devant la longueur d'onde dans les trois directions de l'espace (qui donc ne rayonnent pas de façon conséquente vers l'arrière) donnent un signal important.

2.3.1.2 Cas d'une bille centrée sur le point de focalisation

De la même façon, on peut considérer les diagrammes d'émission de sphères de différentes tailles. Ce cas présente plus d'intérêt pratique que le cas d'une tranche de milieu homogène car il est fréquemment rencontré en biologie (vésicules de stockage ou d'exocytose par exemple). Par souci de simplicité, nous nous sommes limités ici au cas de sphères centrées sur le point de focalisation du faisceau.

Les diagrammes de rayonnement dans les plans parallèles et perpendiculaires à la direction de polarisation du faisceau excitateur sont présentés sur la figure 2.46. Comme précédemment, on constate que seules les billes dont la taille est petite devant $d_c(\theta = 180)$ produisent efficacement un signal THG vers l'arrière. Ce résultat peut être comparé à ce qui est obtenu en CARS, où le diagramme d'émission est d'autant plus directionnel que la sphère considérée est grande. Cependant, dans le cas de la microscopie CARS, il existe un signal pour un milieu homogène ce qui limite la pertinence de la comparaison dans le cas de billes de grande taille.

De nouveau, on peut calculer le signal avant et arrière créé par ces billes en fonction de leur taille : les courbes correspondantes sont présentées sur la figure 2.47. Comme précédemment, on constate que seules les billes de très petites tailles (inférieures à 150 nm pour une focalisation avec une ouverture numérique de 0.9) diffusent une fraction significative de signal vers l'arrière, alors que l'amplitude totale de ce signal est très faible (de l'ordre de 10^5 fois plus faible que le signal vers l'avant d'une bille de taille micrométrique). On retrouve de même les oscillations du signal THG créé vers l'arrière, liées au très grand désaccord de phase[12]

Ainsi, dans ce cas également, il est impossible de détecter efficacement un signal vers l'arrière.

Ce résultat est toutefois à nuancer : on a en effet considéré dans cette section des billes diélectriques, pour lesquelles l'efficacité de diffusion est assez faible, ce qui explique qu'on ne puisse expérimentalement détecter leur signal pour des tailles inférieures à 200-300 nm. C'est également le cas de la plupart des structures en biologie, dont la susceptibilité non linéaire est du même ordre de grandeur que celle du milieu environnant. Cependant, des susceptibilités non linéaires bien supérieures, exaltées notamment par des plasmons de surface, ont été décrites pour des nanosphères métalliques : or [75], argent [74]. Dans ce cas, il est possible d'imager des particules de tailles bien inférieures au micron : Lippitz *et al.* ont ainsi détecté en transmission des particules de 40 nm de diamètre. Dans cette situation, on peut raisonnablement penser qu'une partie significative du signal peut être créée vers l'arrière, mais les simulations présentées dans cette section ne peuvent permettre de le vérifier car elles ne sont valables que pour une bille

[12] On remarque que cette fois l'amplitude des franges est croissante avec la taille de la bille : en effet, lorsque son diamètre augmente, l'extension latérale de la tranche d'épaisseur d_c dans laquelle le signal est créé efficacement augmente également.

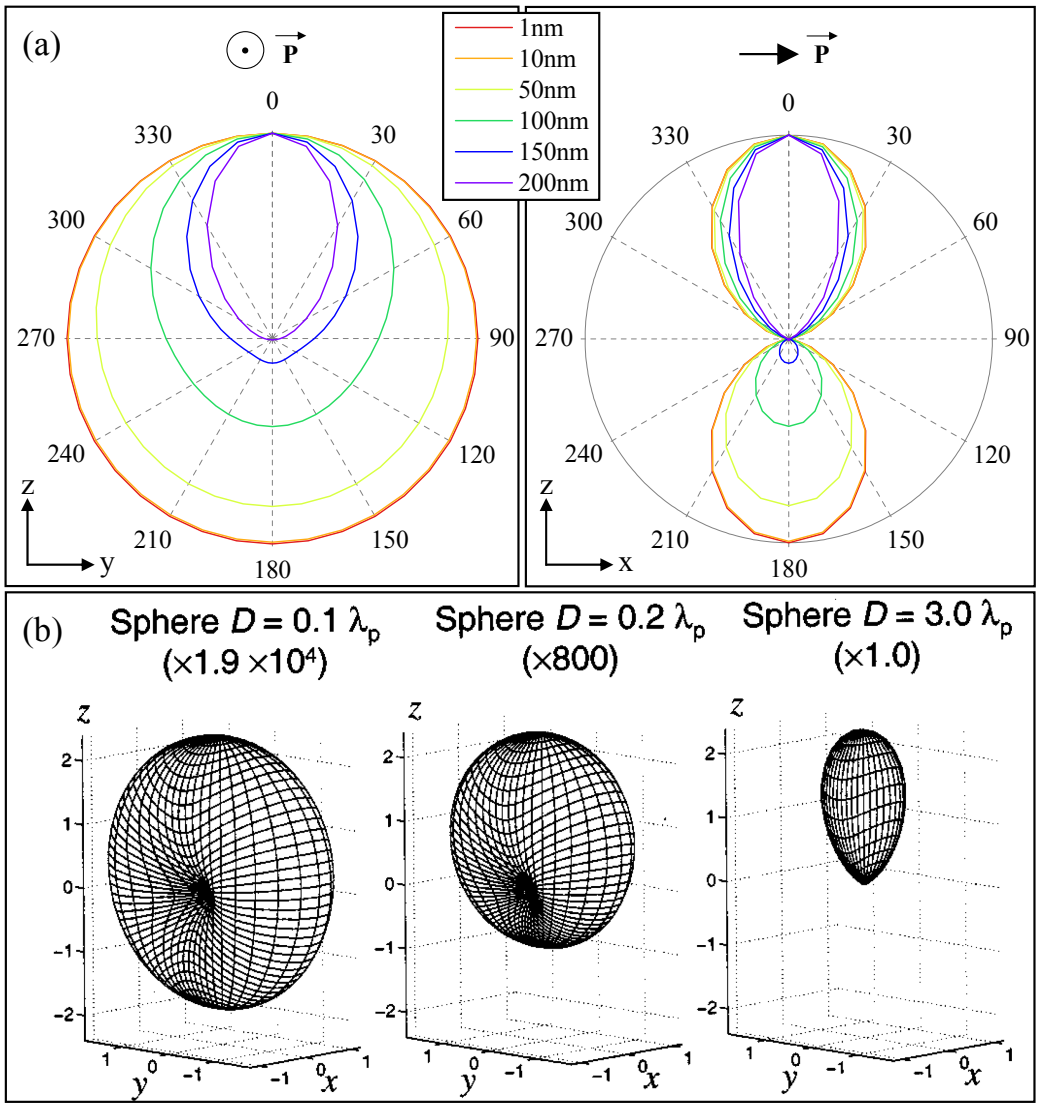


FIG. 2.46 – DIAGRAMMES DE RAYONNEMENT POUR UNE SPHÈRE CENTRÉE SUR LE FAISCEAU. (a), diagrammes de rayonnement THG obtenus par notre modélisation au centre de sphères homogènes et isotropes. Les diagrammes ont été obtenus pour une ouverture numérique de 0.9, des indices linéaires de 1.325 et 1.345 pour les fréquences fondamentales et harmoniques respectivement, et une longueur d'onde fondamentale de 1.18 µm. Les différents diagrammes ont été normalisés. (b), simulation équivalente en CARS pour deux faisceaux excitateurs se propageant dans la même direction. L'ouverture numérique de focalisation est 1.4, l'indice linéaire est 1.5 et la dispersion d'indice est négligée. Les diagrammes ont été normalisés et le facteur de normalisation est indiqué au dessus de chaque diagramme. Figure (b) extraite de la référence [117].

diélectrique dans laquelle le signal est créé localement et en volume (par exemple, le signal d'une sphère métallique centrée sur le faisceau varie avec la puissance quatrième du diamètre, contre sixième dans le cas d'une sphère diélectrique [118]).

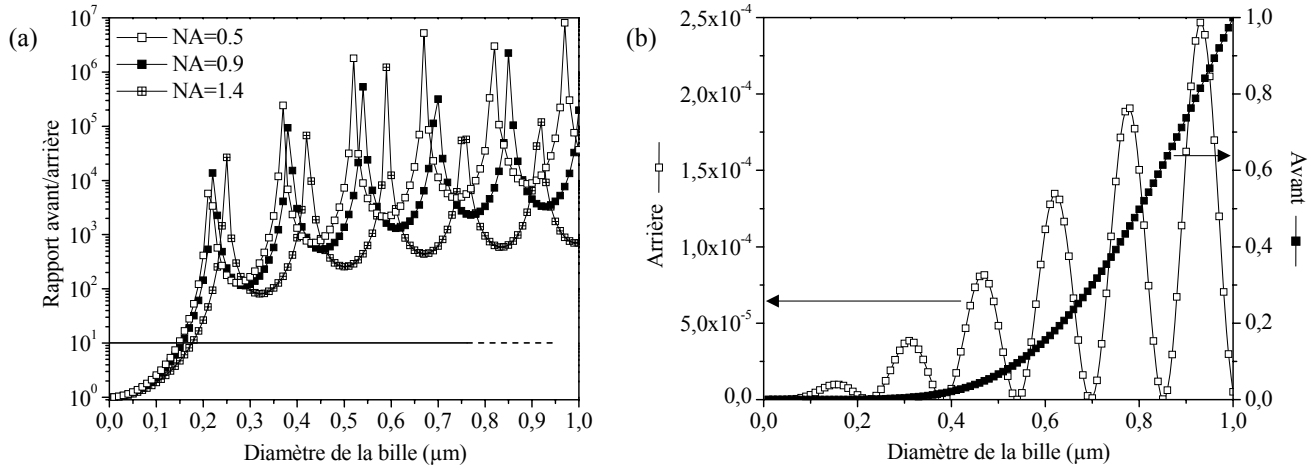


FIG. 2.47 – COMPARAISON DE L'ÉMISSION THG AVANT/ARRIÈRE POUR UNE BILLE HOMOGÈNE centrée sur le point de focalisation. (a), rapport du signal THG émis vers l'avant sur le signal THG émis vers l'arrière pour une bille de diamètre variable. Ces rapports ont été obtenus pour des indices linéaires de 1.325 et 1.345 pour les fréquences fondamentales et harmoniques respectivement, et une longueur d'onde fondamentale de 1.18 µm. Le rapport avant/arrière est encore plus défavorable pour l'épidétection que dans le cas d'une tranche de milieu (comparer avec la figure 2.44. (b), signaux THG obtenus vers l'arrière et vers l'avant dans le cas d'une ouverture numérique de 0.9. On trouve de nouveau vers l'arrière une périodicité d'environ 160 nm pour les franges, proche de la valeur calculée avec l'équation 2.24 (158 nm). Le signal THG vers l'arrière augmente avec le carré du nombre d'émetteurs dans une tranche d'épaisseur 80 nm, donc avec le diamètre de la bille pour des petits diamètres (contrairement au cas d'une tranche de milieu infinie dans les directions x et y).

2.3.2 Effet de la diffusion et de l'absorption du milieu

2.3.2.1 Étude théorique

Nous avons vu dans la section précédente qu'il était en général impossible de détecter un signal THG intrinsèquement rayonné vers l'arrière. Dans une géométrie d'épicollection, le signal détecté sera donc constitué par les photons harmoniques qui ont été diffusés au sein du tissu et redirigés vers la surface. Afin d'estimer l'efficacité de ce phénomène de rétrodiffusion, il faut considérer les propriétés optiques des tissus biologiques : la table 1.2 (page 23) donne une estimation du libre parcours de diffusion et du coefficient d'anisotropie de diffusion dans différents tissus. Elle montre notamment que dans la plupart des cas, la diffusion au sein des tissus est fortement anisotrope et dirigée vers l'avant. Ainsi, après un évènement de diffusion, la direction de propagation du photon n'est pas aléatoire mais fortement corrélée avec sa précédente direction.

Pour que les photons harmoniques soient redirigés à l'opposé de leur direction d'origine, il faut donc que plusieurs évènements de diffusion se produisent. Pour estimer le nombre N de diffusions nécessaires, estimons d'abord le nombre d'évènements au bout duquel les photons ont perdu la mémoire de leur direction initiale : si $\theta_0 = 0$ est l'angle initial de propagation du photon

et θ_n celui après n évènements de diffusion, on a :

$$\langle \cos\theta_n \rangle \approx g^n \cos\theta_0 \approx (1 - n(1-g)) \tag{2.25}$$

si l'on suppose que $g \approx 1$.

Lorsque les photons ont complètement perdu la mémoire de leur direction initiale, on a statistiquement : $\langle \cos\theta_n \rangle = 0$, ce qui se produit donc pour un nombre de diffusions $N \approx 1/(1-g)$. Le photon a alors parcouru en moyenne dans la direction initiale une distance :

$$l_t = \frac{l_s}{1-g} \tag{2.26}$$

l_t est appelée longueur de transport et pour $g \approx 0.9$ (voir 1.2), elle est de l'ordre de $10 \times l_s$.

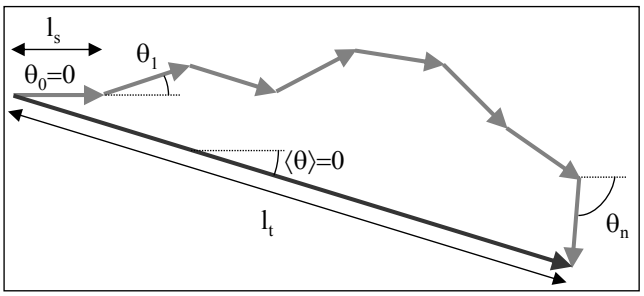


FIG. 2.48 – DIFFUSIONS MULTIPLES AU SEIN D'UN TISSU.

On peut donc se ramener au cas d'une diffusion isotrope en considérant que le photon change aléatoirement de direction tous les l_t (figure 2.48) [119] : comme les photons THG sont initialement créés en $z = z_0$ vers l'avant, ils parcourent tout d'abord une distance moyenne l_t dans la direction de propagation du faisceau excitateur. Ensuite, leurs directions deviennent aléatoires et ils sont diffusés de façon isotrope par le tissu avec un libre parcours de diffusion l_t. Tout se passe donc comme si les photons rayonnaient de façon isotrope à partir d'une source située à la profondeur $z_0 + l_t$ (figure 2.49). La diffusion peut donc rediriger une partie significative du signal THG vers l'objectif de focalisation. Dans le cas analogue de la microscopie CARS, Evans *et al.* montrent par exemple une efficacité de collecte d'environ 40% pour une émulsion de lipides non absorbants à la fréquence du signal CARS, et de 15% dans la peau de souris d'après des simulations Monte-Carlo de la propagation dans le tissu [120].

On peut estimer que la distance moyenne parcourue avant que les photons ne sortent du tissu est de l'ordre de quelques l_t, et au minimum de $2z_0 + 2l_t$. La première conséquence de ce résultat est que le signal THG détecté en épicollection est entièrement constitué de photons en régime diffusif, dont la position et l'orientation à la sortie du tissu sont aléatoires. Ainsi, et contrairement au cas de la fluorescence, même dans le cas où l'on fait l'image d'un plan juste en dessous de la surface du tissu, le champ de vue de l'objectif déterminera de façon critique l'efficacité de détection du signal [13] (figure 2.49).

D'autre part, même pour de faibles profondeurs d'imagerie, le trajet parcouru par les photons harmoniques dans le tissu est grand (au moins 1000-1500 µm pour des valeurs typiques de $l_s =$

50 µm et $g = 0.9$ et une faible profondeur d'imagerie). L'absorption du tissu à la fréquence harmonique devient donc un paramètre crucial pour l'efficacité de détection du signal THG.

Dans le cas d'une émission isotrope, au moins jusqu'à des profondeurs intermédiaires, le rayonnement initialement émis vers l'arrière, et qui traverse donc une faible épaisseur de tissu (typiquement 0-100 µm soit 0-2l_s), va constituer une part importante du signal détecté. Pour ce rayonnement, si l'on considère un libre parcours d'absorption l_{abs} de l'ordre du millimètre (matière blanche du cerveau par exemple), l'absorption est négligeable : la perte de signal qui lui est due est de l'ordre de 10 à 15% (50% pour $l_{abs} = 200$ µm). Par contre, elle produit des effets très importants, même pour des coefficients d'absorption relativement faibles, dans le cas du signal rétrodiffusé qui parcourt une vingtaine de longueurs de diffusion dans le tissu : en effet avec les mêmes paramètres que précédemment, on trouve une atténuation de 70% de la lumière collectée pour $l_{abs} = 1000$ µm, et de 99.8% pour $l_{abs} = 200$ µm.

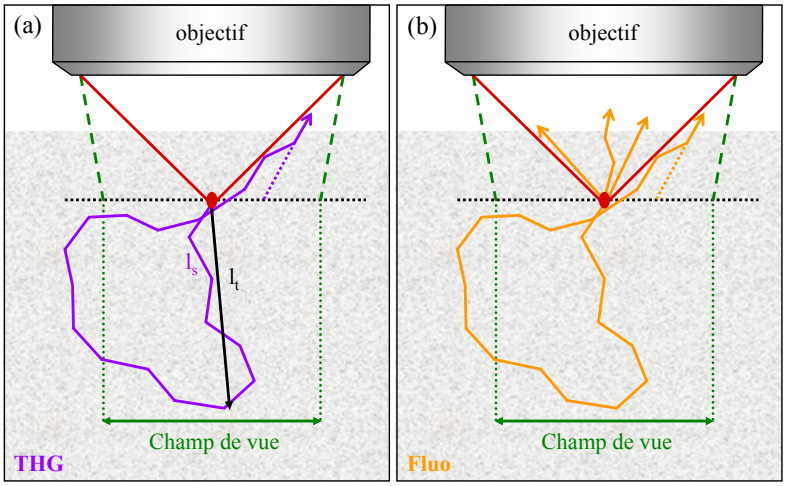


FIG. 2.49 – IMPORTANCE DU CHAMP DE VUE POUR COLLECTER LA LUMIÈRE MULTIDIFFUSÉE.
(a), dans le cas de la THG, à cause des diffusions multiples, le signal semble provenir d'une source étendue donc l'efficacité de détection dépend fortement de la taille du champ de vue (cône vert, traits pointillés). (b), dans le cas de la fluorescence, ceci reste vrai pour les photons initialement émis vers l'avant. Par contre, à faible profondeur, les photons émis vers l'arrière sont le plus souvent balistiques ou serpentiles, et leur efficacité de détection dépend presque uniquement de l'ouverture numérique de l'objectif (cône rouge, traits pleins).

En microscopie de fluorescence à deux photons, intrinsèquement isotrope, il est donc possible de collecter un signal balistique, au moins à faible profondeur, même pour un tissu fortement absorbant à la longueur d'onde du signal. Au contraire, en microscopie THG, il sera impossible de détecter un signal rétrodiffusé dès que le libre parcours d'absorption est inférieur à une dizaine de libres parcours de diffusion (figure 2.50).

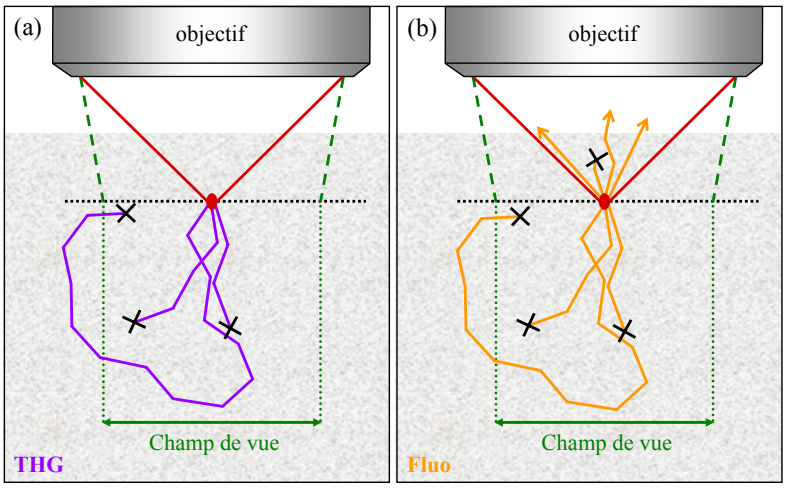


FIG. 2.50 – INFLUENCE DE L'ABSORPTION DU SIGNAL SUR L'EFFICACITÉ DE DÉTECTION.
(a), dans le cas de la THG, très peu de photons ressortent du tissu après un long trajet de rétrodiffusion dès que l'absorption devient modérée. (b), dans le cas de la fluorescence, à faible profondeur, le tissu perd sont rôle de miroir diffusant, d'où une chute du signal total. Par contre, les photons balistiques ou serpentiles émis vers l'arrière restent détectables pour une absorption et une profondeur d'imagerie modérées.

2.3.2.2 Confirmation expérimentale

Nous avons tout d'abord quantifié l'influence de la diffusion du signal THG sur l'efficacité de détection en utilisant un échantillon constitué de billes micrométriques de polystyrène immobilisées dans un gel d'agarose à 3% en masse, d'une épaisseur z de 3-4 mm : ces billes servent à la fois à induire la diffusion du milieu, qui peut être ajustée en fonction de leur concentration, et à produire une source de signal THG répartie dans l'ensemble de l'échantillon. Les gels utilisés sont suffisament minces pour qu'il soit possible de détecter un signal en transmission. Nous avons donc d'abord mesuré le signal THG collecté en transmission et en épidétection pour différentes valeurs du rapport z/l_s.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2.51 : pour de faibles valeurs de z/l_s, le signal détecté en épicollection est négligeable par rapport à celui collecté en transmission. Ceci confirme pour cet échantillon que le signal détecté est bien un signal rétrodiffusé, qui doit être faible pour $z/l_s \approx 1-2$. En effet, le gel n'est pas assez épais pour que le signal puisse être redirigé vers la surface avant de le traverser (soit $l_t > z$). De plus, comme l_s est grand, si certains photons sont rétrodiffusés, leur point de sortie du tissu sera éloigné de l'axe optique de l'objectif, donc leur probabilité de détection sera faible. Enfin, comme le signal THG est peu diffusé, il est efficacement détecté en transmission. Quand z/l_s augmente, l'ensemble de ces facteurs tend à faire augmenter le rapport des puissances détectées en épi et en transmission, qui atteint dans cette expérience 30-35% pour $z/l_s \approx 100$ (objectif de focalisation 60x, 0.8NA).

D'autre part, nous avons cherché à déterminer l'influence du champ de vue de l'objectif de focalisation utilisé : si l'on compare sur la figure 2.51 le signal obtenu pour deux objectifs de

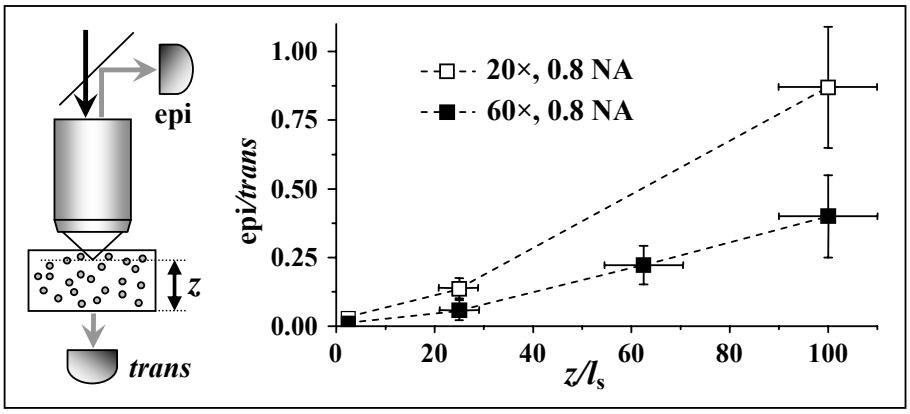


FIG. 2.51 – EPIDÉTECTION DU SIGNAL RÉTRODIFFUSÉ DANS UN ÉCHANTILLON MODÈLE.
L'échantillon étudié est un gel d'agarose d'épaisseur e contenant des billes de polystyrène à différentes concentrations. Le signal THG est créé à une profondeur $e - z << z$ dans le gel et collecté à travers l'objectif de focalisation (epi) ou en transmission (*trans*). Le rapport epi/*trans* est quantifié pour deux objectifs (60x, champ de vue de 300 µm et 20x, champ de vue de 1000 µm) en fonction de z/l_s. L'épidétection est plus efficace pour un milieu épais et diffusant et un objectif de grand champ de vue.

même ouverture numérique (0.8) mais dont l'un possède un champ de vue de 330 µm (objectif 60x) de diamètre contre 1000 µm (objectif 20x) pour l'autre, on constate effectivement une nette différence d'efficacité de détection du signal rétrodiffusé : le gain sur l'efficacité de détection, entre les deux objectifs, est typiquement d'un facteur 2-3[13].

Finalement, nous avons vérifié sur un tissu biologique la possibilité de détecter un signal THG rétrodiffusé : pour cela, nous avons fait l'image du bord d'un poumon de souris fraîchement excisé et lavé. A la surface du poumon, le signal THG provient principalement de structures de taille micrométrique (chapitre 3). Nous avons mesuré les signaux THG en transmission et en épidétection, en utilisant l'objectif 20x à grand champ de vue pour la focalisation du faisceau.

La figure 2.52 présente les résultats obtenus pour une excitation à une longueur d'onde de 1.18 µm. En transmission, le signal est surtout important sur le bord du tissu : d'une part, comme le montre la figure 2.51(a), la profondeur de tissu traversée par le faisceau excitateur au centre du tissu est plus importante, donc le signal est moins efficacement créé que sur le bord, où le faisceau est focalisé en surface. D'autre part, comme le bord du tissu est très raide, une partie du signal THG, dirigée vers l'avant, peut sortir du tissu et se propager sans diffusion jusqu'au condenseur, où elle est détectée avec une meilleure efficacité qu'au centre où l'ensemble du signal subit des diffusions multiples avant d'être détecté[14].

Au contraire, en épidétection, le centre du tissu fournit plus de signal que le bord. Ceci est

[13]Pour des photons entièrement en régime diffusif, l'efficacité de collecte est proportionnelle au carré du champ de vue. Ceci correspondrait dans notre cas à un gain d'un facteur 9 entre les deux objectifs. Une partie du champ de vue est donc certainement diaphragmée au niveau du chemin d'épidétection.

[14]Le tissu a en effet une épaisseur totale d'environ 800 µm, soit nettement supérieure à la longueur de diffusion moyenne des tissus, voir table 1.2, page 23

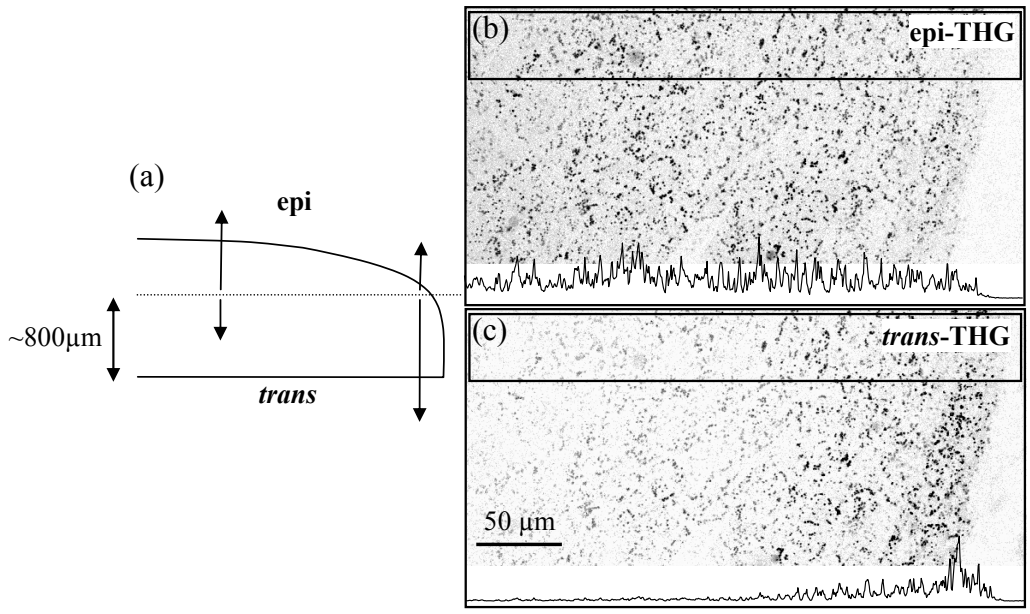


FIG. 2.52 – EPIDÉTECTION DU SIGNAL RÉTRODIFFUSÉ DANS UN ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE.
(a), géométrie du poumon de souris visualisé dans cette expérience. Le plan imagé se situe une dizaine de microns en dessous de la surface de l'échantillon, dont l'épaisseur est d'environ 800 µm. (b), image THG obtenue en épidétection et (c), en transmission, acquises simultanément. Les profils en dessous des images sont les profils de signal THG selon la direction horizontale dans les deux cadres noirs.

cohérent avec l'hypothèse d'un signal rétrodiffusé : la rétrodiffusion sera plus efficace au centre du tissu, où le milieu peut être considéré comme semi-infini, que sur le bord où une partie des photons va s'échapper avant d'être redirigée vers l'arrière. Cet effet est d'autant plus remarquable que la diffusion plus importante du faisceau excitateur au centre aurait dû produire une variation opposée. Cette répartition du signal THG confirme donc l'hypothèse d'un signal rétrodiffusé.

Cette rétrodiffusion est possible car le poumon est un tissu clair, peu vascularisé, et dont l'absorption est donc réduite autour de 400 nm. Au contraire, dans le foie qui est lui très vascularisé, nous n'avons pas pu détecter de signal en épicollection, même en surface du tissu : cette observation confirme également l'absence de signal THG intrinsèquement rayonné vers l'arrière.

2.3.3 Récapitulatif

On peut finalement résumer les propriétés directionnelles du rayonnement THG et leurs conséquences sur la détection du signal :

- Pour des objets de taille supérieure à une centaine de nanomètres, la création du signal se fait très majoritairement vers l'avant. Comme les objets diélectriques de quelques dizaines de nanomètres donnent un signal très faible, il n'y a pas de signal THG intrinsèquement dirigé vers l'arrière dans les tissus biologiques.

- Dans des tissus épais et diffusants, une fraction significative du signal peut être rétrodiffusée

et détectée dans une géométrie d'épicollection. La détection sera d'autant plus efficace que le champ de vue de l'objectif utilisé est important.

- Cette rétrodiffusion n'est possible que si le tissu n'est pas ou très faiblement absorbant à la fréquence harmonique. Pour une excitation autour de 1.2 µm, la fréquence THG correspond aux bandes d'absorption des hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine, cytochromes...) donc il sera nécessaire entre autres de travailler sur des tissus peu vascularisés ou exsanguinés.

2.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré théoriquement et expérimentalement plusieurs effets liés à la construction cohérente du signal en microscopie de troisième harmonique.

Tout d'abord, le signal diffusé n'est pas simplement proportionnel au nombre ou au carré du nombre de diffuseurs mais dépend de façon cruciale de la géométrie de l'échantillon. En conséquence, certaines structures sont exaltées au détriment d'autres, ce qui influe fortement sur l'image obtenue qui peut différer de la structure réelle de l'échantillon observé. En particulier, nous avons vu que l'image obtenue en THG était filtrée pour les hautes fréquences spatiales (comme pour d'autres techniques d'imagerie cohérente : SHG, CARS), ce qui contribue à limiter la visibilité des structures de petite taille.

D'autre part, les expériences décrites dans la troisième partie ont souligné l'influence des conditions de focalisation du faisceau excitateur sur la structure de l'image. Le choix de l'ouverture numérique de l'objectif de focalisation apparaît ainsi comme déterminant notamment dans le cas où l'application choisie ne nécessite pas une résolution sub-micrométrique. Ceci a été illustré sur l'exemple, développé dans le chapitre 4, de l'imagerie d'embryons de drosophile où l'on démontre un gain d'un facteur 5 sur le signal obtenu au niveau des structures d'intérêt avec une ouverture numérique appropriée.

Enfin, l'étude du caractère directionnel de l'émission a montré que le champ de vue de l'objectif était également un facteur prépondérant pour l'efficacité de la détection du signal THG rétrodiffusé pour des géométries d'épicollection dans des tissus non absorbants.

Pour conclure, on s'est intéressé dans ce chapitre à des effets purement géométriques et donc indépendants des propriétés non linéaires des échantillons étudiés qui ont été caractérisés simplement par leur homogénéité. Dans le chapitre suivant, on va tenter de déterminer plus précisément quelles sont les sources de signal en microscopie THG dans différents échantillons biologiques.

Chapitre 3

Sources de signal en microscopie THG

Le faible nombre d'applications de la microscopie THG en biologie jusqu'à présent s'explique en grande partie par la méconnaissance des structures visibles dans les images. Comme auparavant dans le cas des microscopies 2PEF ou SHG [38,58], la caractérisation des sources de contraste est une étape essentielle au choix de problématiques spécifiques pour lesquelles l'imagerie THG peut constituer un apport significatif.

Dans ce chapitre, nous décrivons les principales sources de signal identifiées dans les échantillons biologiques que nous avons étudiés. Ce travail de caractérisation s'est appuyé d'une part sur des mesures *in vitro*, permettant de déterminer les susceptibilités non linéaires du troisième ordre de différentes molécules ; d'autre part, l'imagerie multimodale *in vivo* ou *ex vivo* de cellules ou tissus entiers a permis, notamment grâce à l'utilisation de marquages fluorescents, d'identifier les structures donnant un fort signal THG. La première partie est donc consacrée à la mesure des propriétés optiques de différents liquides biologiques, tandis que la deuxième partie explore les sources de contraste dans différents tissus. Enfin, la troisième partie présente les premières applications développées à partir des résultats précédents.

3.1 Mesure de la susceptibilité non linéaire d'une solution

L'identification *ab initio* de sources de signal dans des échantillons complexes comme des cellules ou des tissus peut se révéler difficile, notamment dans le cas de la THG où le signal provient de nombreuses structures, dont la plupart présentent une géométrie sphérique commune à beaucoup d'organelles. La caractérisation optique *in vitro* de différentes molécules biologiques nous a permis de mieux cerner les propriétés des structures recherchées et a facilité leur identification *in vivo*.

Cette section présente tout d'abord le principe de la mesure de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre, notée $\chi^{(3)}$ dans la suite, notamment les difficultés liées à la construction cohérente du signal, ainsi que les différents dispositifs expérimentaux décrits dans la littérature (paragraphe 3.1.1). Les résultats obtenus pour différentes solutions aqueuses (paragraphe 3.1.2) sont ensuite transposés dans un contexte d'imagerie (paragraphe 3.1.3).

3.1.1 Principe de la mesure

3.1.1.1 Diffusion cohérente et construction du signal : conséquences sur la mesure de la susceptibilité

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les effets de cohérence jouent en THG un rôle prépondérant dans la construction du signal. En particulier, dans le cas d'un milieu homogène et non biréfringent, aucun signal n'est créé en champ lointain : il est donc nécessaire que l'échantillon à étudier présente des inhomogénéités, c'est-à-dire qu'il soit composé d'au moins deux milieux différents (1 et 2), dont on mesurera la différence de susceptibilité. La puissance du signal de troisième harmonique s'écrit de façon générale sous la forme :

$$\mathcal{P}_{3\omega} \propto \kappa \left|\alpha_1 - \alpha_2\right|^2 \left\langle I_\omega^3 \right\rangle \tag{3.1}$$

où κ dépend de la géométrie de l'échantillon et peut être calculé, $\langle I_\omega^3 \rangle$ dépend des propriétés de la source excitatrice et est généralement inconnu, et $|\alpha_1 - \alpha_2|^2$ dépend des propriétés linéaires et non linéaires des milieux 1 et 2[1]. Deux problèmes se posent donc pour déterminer une valeur absolue de susceptibilité :

- d'une part il faut disposer d'un matériau pour lequel α est déjà connu et sert de référence pour déterminer de proche en proche celui des autres matériaux,

- d'autre part il faut simultanément acquérir une mesure de référence permettant de s'affranchir du terme $\langle I_\omega \rangle^3$ inconnu.

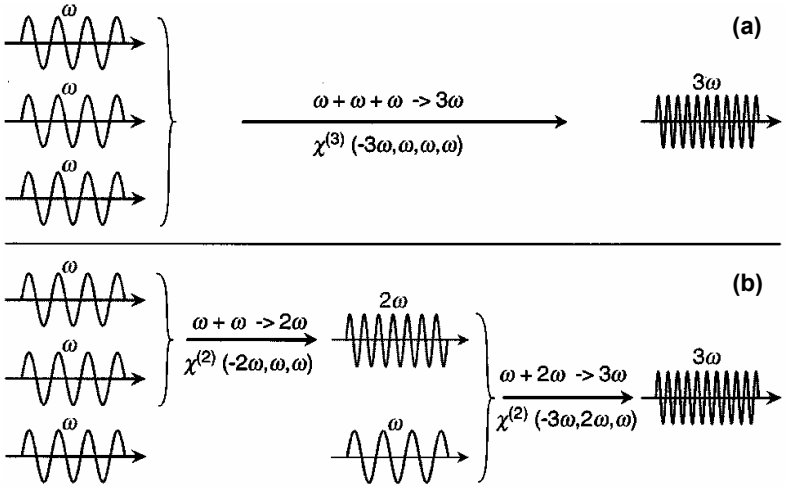


FIG. 3.1 – CRÉATION EN CASCADE D'UNE ONDE À LA FRÉQUENCE 3ω.
(a), création de l'onde directement par génération de troisième harmonique ; (b), création de l'onde par génération de seconde harmonique et somme de fréquences en cascade. La figure est extraite de la référence [121].

Dans les années 1980, un important travail de caractérisation a été effectué pour déterminer $\chi^{(3)}$ pour des matériaux de référence [122, 123]. Ces travaux ont été repris et complétés plus

[1]Voir appendice C : si par exemple la dispersion peut être négligée dans le milieu, $\alpha \to \chi^{(3)}$. Si au contraire elle est forte par rapport à la focalisation du faisceau, $\alpha \to \dfrac{\chi^{(3)}}{n_{3\omega}(n_{3\omega} - n_\omega)}$

récemment par Bosshard *et al.*. [121, 124]. Les deux groupes adoptent des solutions similaires pour s'affranchir des facteurs inconnus dans l'équation 3.1 :

- d'une part, le matériau de référence utilisé est le vide - pour lequel $\chi^{(3)}$ est connu et nul,

- d'autre part, afin de s'affranchir des paramètres mal connus du faisceau excitateur $\langle I_\omega^3 \rangle$, les deux groupes ont utilisé des phénomènes de cascade dans un matériau, le quartz, présentant une susceptibilité non linéaire du second ordre non nulle. Dans ce cas, comme le montre la figure 3.1, deux phénomènes contribuent à la création d'une onde à la pulsation 3ω : la génération de troisième harmonique, et la cascade génération de seconde harmonique + somme de fréquences. Comme ces deux termes peuvent être séparés par des considérations géométriques et qu'ils sont tous deux fonction de $\langle I_\omega^3 \rangle$, on peut comparer leur intensité respective et remonter au paramètre :

$$\frac{\chi^{(3)}(-3\omega;\omega,\omega,\omega)}{\chi^{(2)}(-3\omega;2\omega,\omega) \times \chi^{(2)}(-2\omega;\omega,\omega)} \tag{3.2}$$

Les susceptibilités du second ordre étant bien connues [125,126,127], on peut ensuite remonter à la valeur de $\chi^{(3)}$ pour le quartz.

A partir de cette valeur, on peut étalonner celle de différents verres [123] puis, en utilisant une cuve constituée d'un verre de susceptibilité connue, de différents liquides [128, 129, 130, 107]. Peu de mesures ont cependant été réalisées jusqu'à présent sur des molécules d'intérêt biologique.

3.1.1.2 Différents dispositifs expérimentaux décrits dans la littérature

Les expériences de mesure de $\chi^{(3)}$ diffèrent essentiellement par la géométrie de l'échantillon choisi, adaptée au type de milieu dont on cherche à déterminer les propriétés. Ici on va se restreindre à décrire des échantillons en phase condensée en laissant de côté les gaz.

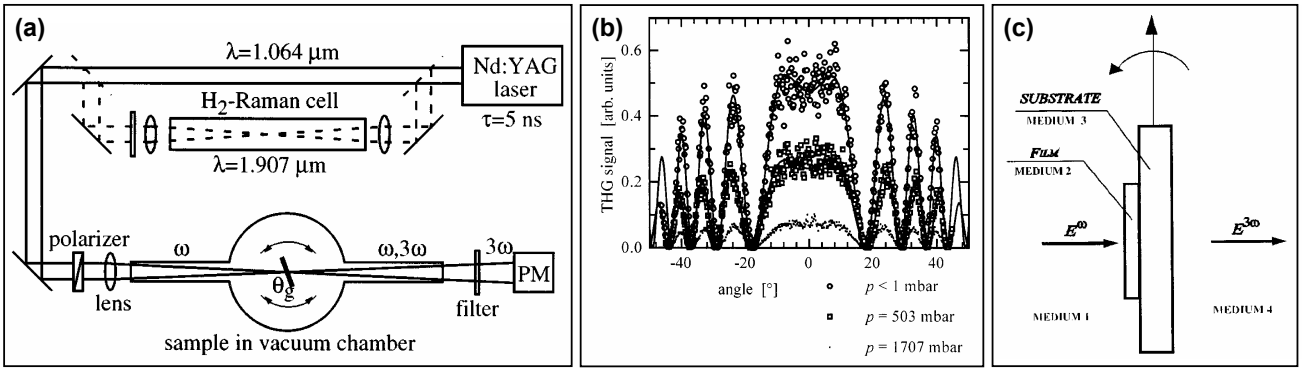


FIG. 3.2 – DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX TYPIQUES POUR L'ÉTUDE D'ÉCHANTILLONS SOLIDES.
(a), dispositif expérimental et (b), courbes obtenues dans le cas d'un échantillon solide. Figures extraites de la référence [124] (c), dispositif équivalent pour l'étude de films minces. Figure extraite de la référence [131]

Dans le cas d'échantillons solides tout d'abord, la géométrie utilisée est généralement constituée d'une tranche mince du matériau à étudier, entourée d'un milieu dont les propriétés sont connues. Dans le cas d'un verre ou d'un cristal, une tranche d'épaisseur faible devant la taille du

volume focal (typiquement 100 µm-1 mm pour une longueur de Rayleigh du faisceau excitateur de l'ordre de 100 mm [124]) constituée du matériau étudié est plongée dans une atmosphère de composition et pression contrôlées (voir figure 3.2-a). Dans le cas ou l'on étudie un film mince [131, 132], celui-ci est déposé sur un verre de susceptibilité connue, et l'ensemble est de nouveau placé dans une atmosphère contrôlée (voir figure 3.2-c). Le signal à la fréquence 3ω est ensuite détecté en fonction de la rotation de l'échantillon selon un axe perpendiculaire à l'axe optique et l'amplitude des **franges de Maker** obtenues permet de remonter aux propriétés optiques de l'échantillon (figure 3.2-b). Une autre possibilité, adoptée par Meredith *et al.* [128] consiste à utiliser un échantillon prismatique translaté perpendiculairement au faisceau afin de faire varier l'épaisseur de milieu traversée. Comme dans le cas précédent, la courbe du signal THG est enregistrée en fonction de l'épaisseur traversée.

L'importance de contrôler l'atmosphère entourant l'échantillon a été soulignée dès les premières expériences de génération de troisième harmonique dans les gaz [133]. On pourrait en effet penser que du fait de sa faible densité, on peut négliger la susceptibilité d'un milieu gazeux et l'assimiler au vide. Cependant, comme le montrent par exemple les références [130] ou encore [124], dans le cas d'un faisceau faiblement focalisé, la grandeur à considérer est $\chi^{(3)} \times l_c$; or la longueur de cohérence de l'air pour une fréquence fondamentale dans le proche infrarouge est de l'ordre de 2 mm, contre 20 µm pour la silice : la contribution totale de l'atmosphère entourant l'échantillon n'est pas négligeable et peut conduire à des erreurs de l'ordre de 30% sur la susceptibilité calculée [124].

Dans tous les cas, il est nécessaire de disposer d'un matériau de référence pour normaliser l'amplitude des franges obtenues pour l'échantillon étudié. Dans le cas de verres ou de cristaux, la référence utilisée est le quartz, dont la susceptibilité est connue (voir section précédente). Dans le cas de films minces, ceux-ci sont déposés sur un verre de propriétés connues et la mesure est alors effectuée avant et après dépôt du film.

Pour des échantillons liquides (solvants), les premières expériences ont été réalisées sur des cuves d'épaisseur inférieure à la longueur de Rayleigh du faisceau excitateur, conduisant à des géométries complexes du type air/verre/liquide/verre/air [128, 129, 130]. Comme précédemment, la cuve est en rotation selon un axe perpendiculaire à l'axe optique ou en translation perpendiculairement à l'axe optique, et on mesure le profil d'intensité THG obtenu pour différentes positions de la cuve (voir figure 3.3-a et b).

Cette technique permet des mesures précises des susceptibilités mais repose sur un dispositif expérimental lourd qui requiert l'utilisation d'une enceinte à vide. De plus, la puissance mesurée résulte d'interférences entre les ondes provenant de cinq milieux différents et présente un profil complexe dépendant de nombreux paramètres.

Plus récemment, Kajzar *et al.* [107] ont proposé une géométrie différente reposant sur l'utilisation d'une **cuve prismatique épaisse**, permettant de focaliser l'ensemble du faisceau dans la cuve. Le nombre d'interfaces est alors réduit à trois (verre/liquide/verre). La complexité du dispositif est réduite puisqu'il n'est plus nécessaire de contrôler l'atmosphère entourant l'échantillon. De plus, ceci a pour avantage de simplifier l'analyse des courbes obtenues - qui sont simplement sinusoïdales dans les conditions expérimentales choisies (voir figure 3.3-c).

Ce dispositif nécessite cependant de disposer d'au moins deux valeurs de référence pour

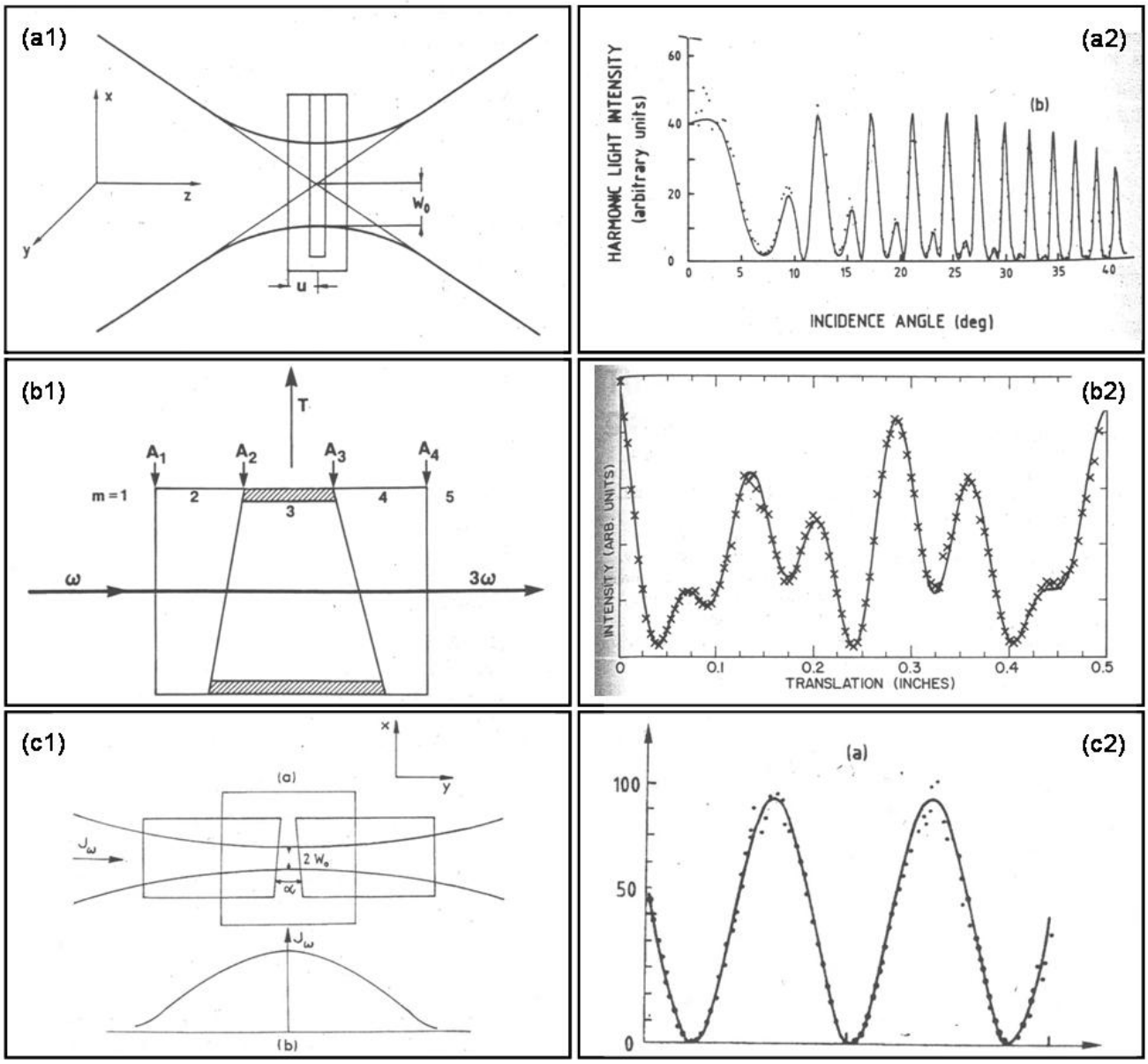


FIG. 3.3 – DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX POUR L'ÉTUDE D'ÉCHANTILLONS LIQUIDES (I).
(1), dispositif expérimental et (2), courbe typique obtenue dans le cas (a), d'une cuve standard en rotation selon un axe perpendiculaire à l'axe optique (figure extraite de la référence [130]) ; (b), d'une cuve prismatique mince translatée perpendiculairement à l'axe optique (figure extraite de la référence [128]) ; (c), d'une cuve prismatique épaisse par rapport à la longueur de Rayleigh du faisceau excitateur (figure extraite de la référence [107]).

extraire la susceptibilité du milieu à partir des courbes mesurées : celle du verre constituant la cuve, et celle d'un liquide de référence. Nous montrons au paragraphe 3.1.1.5 qu'il est également possible de prendre comme références deux types de verres de propriétés connues en utilisant deux cuves différentes.

L'inconvénient majeur de cette technique est l'utilisation d'une cuve spécialement conçue pour ces expériences, du fait de l'épaisseur requise pour les fenêtres de verre. Cette cuve est généralement non étanche car les fenêtres reposent sur des cales contrôlant leur écartement. Le défaut d'étanchéité qui en découle rend impossible le contrôle précis de l'état d'oxydation des molécules étudiées.

Finalement, Barille *et al.* [134] ont récemment proposé un dispositif beaucoup plus simple, reposant sur l'utilisation d'une cuve standard mais dans une géométrie de forte focalisation : les auteurs montrent qu'en utilisant une ouverture numérique de 0.65, la contribution de l'air au signal obtenu peut être négligée. En focalisant le faisceau successivement sur les interfaces air/verre à la surface de la cuve et verre/échantillon liquide, le rapport des amplitudes obtenues permet, moyennant un étalonnage préalable, de déterminer les propriétés du liquide étudié (figure 3.4).

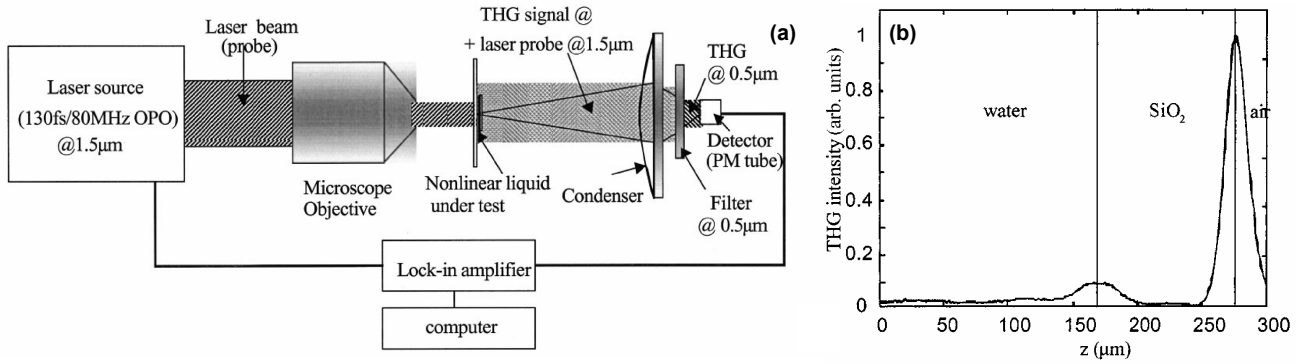


FIG. 3.4 – DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX POUR L'ÉTUDE D'ÉCHANTILLONS LIQUIDES (II).
(1), dispositif expérimental et (2), courbe typique obtenue avec le dispositif expérimental de Barille *et al.* [134]. L'asymétrie du pic au niveau de l'interface verre/air montre la présence d'aberrations dues à la focalisation à travers une lame de verre.

L'avantage de ce dispositif est d'abord sa grande simplicité : le faisceau est simplement focalisé par un objectif de microscope sur une cuve standard, avec un déplacement contrôlé du point de focalisation. Il peut donc être simplement implanté sur tout type de microscope. De plus, l'absence de contraintes géométriques sur la cuve permet de travailler avec une cuve commerciale étanche et donc éventuellement d'étudier l'influence de l'état d'oxydation de l'échantillon sur le signal obtenu [99].

Cependant, ce dispositif présente l'inconvénient d'utiliser des objectifs d'ouverture numérique assez importante (typiquement 0.65), ce qui accentue les aberrations du faisceau excitateur liées à la focalisation à travers une interface plane, et notamment l'aberration sphérique. Pillai *et al.* [135] montrent ainsi que les auteurs, en négligeant ces aberrations, surestiment d'environ 40% la valeur de la susceptibilité obtenue à partir de leurs mesures. Ce point sera repris au paragraphe 3.1.2.3. D'autre part, contrairement aux dispositifs précédents, qui ont en commun de mesurer l'amplitude de franges d'interférence (dites de Maker) entre plusieurs interfaces, les auteurs ne mesurent ici que l'amplitude d'un seul maximum du signal, ce qui ne leur permet pas

de s'affranchir d'éventuelles irrégularités de la cuve.

En conclusion, les différents dispositifs expérimentaux présentés dans cette section sont chacun adaptés pour des applications différentes. Si le dispositif de Barille *et al.* est adapté pour des mesures rapides et nécessitant une bonne étanchéité de la cuve de mesure, il fournit des valeurs moins précises que celui de Kajzar *et al.*

3.1.1.3 Dispositif expérimental choisi

Nous avons choisi d'adopter ici la géométrie développée par Kajzar et Messier [107], qui a été décrite dans le paragraphe 2.1.1.2 ainsi que dans le paragraphe précédent.

Comme nous l'avons vu précédemment, elle consiste en une succession de deux interfaces planes, localement parallèles[2] et d'écartement variable, du type verre-échantillon liquide-verre (figure 2.12). Expérimentalement, le faisceau est focalisé dans une cuve constituée de deux fenêtres de verre épaisses de 2.5 mm et reposant sur deux fines cales dont la taille permet de contrôler l'épaisseur du compartiment contenant le liquide et sa variation sur la largeur de la cuve (figure 3.5). On peut ainsi modifier l'épaisseur de liquide traversée par le faisceau et la position du point de focalisation par rapport aux interfaces.

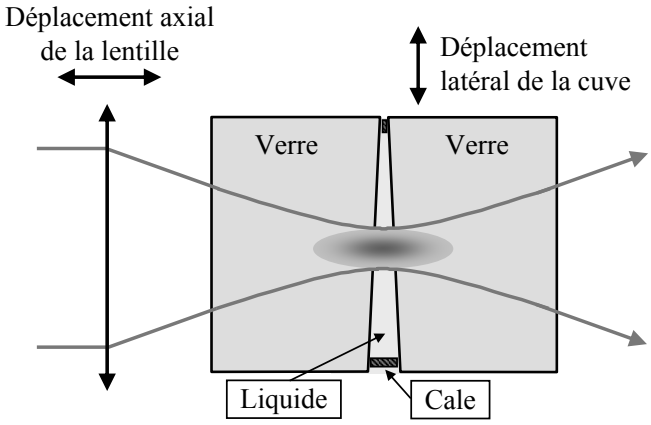


FIG. 3.5 – DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL CHOISI pour la mesure de susceptibilités non linéaires de liquides.

Le faisceau excitateur provient de l'oscillateur paramétrique optique (OPO) dont les caractéristiques sont données dans le paragraphe 1.5.1, page 28. Il est élargi à l'aide d'un télescope constitué de deux lentilles L1 et L2 (cf. figure 3.6) de focales respectives 50 et 150 mm, positionnées de manière confocale de façon à obtenir en sortie un faisceau collimaté de diamètre à $1/e \approx 5$ mm. Un polariseur de Glan (G) sépare le faisceau en deux parties, l'intensité respective de ces deux parties étant modulée par une lame demi-onde située en avant. L'une de ces parties est focalisée par la lentille L3=50 mm sur une lame de verre LV pour obtenir un signal THG de

[2]Expérimentalement, l'angle entre les deux interfaces est inférieur à 10^{-2} rad, tandis que le waist du faisceau excitateur est d'approximativement 10 µm, soit une variation de moins de 100 nm du chemin optique à travers la cuve d'un bout à l'autre du faisceau.

référence, refocalisé par la lentille L4=50 mm[3] sur un photomultiplicateur en régime de comptage de photons PMT1. Les filtres F1 (RG1000, 2 mm) et F2 (KG3, 10 mm) coupent respectivement le visible et l'infrarouge. De même, l'autre partie du faisceau est focalisée par la lentille L5=50 mm sur la cuve prismatique CP, et le signal THG créé est refocalisé sur le photomultiplicateur PMT2 à l'aide de la lentille L6=50 mm. Les filtres F3 (respectivement F4) sont identiques aux filtres F1 (resp. F2).

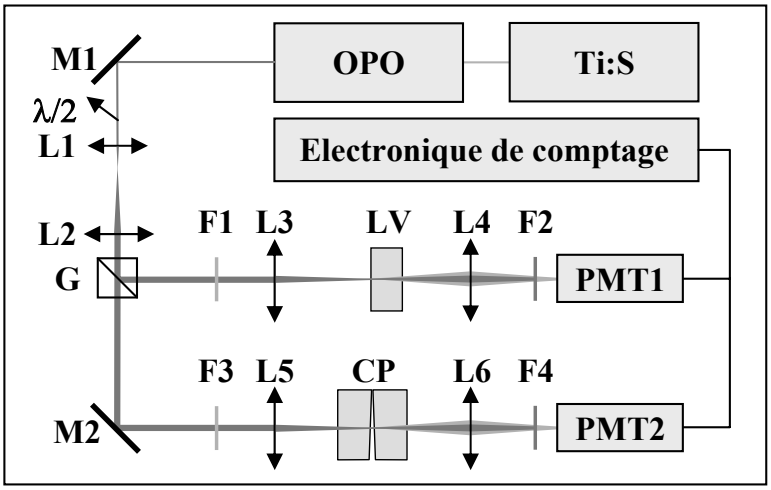


Fig. 3.6 – Schéma complet du dispositif de mesure.
$\lambda/2$, lame demi-onde ; L1 à L6, lentilles convergentes ; G, polariseur de Glan ; F1, F3, filtres coupant le visible ; F2, F4, filtres coupant l'infrarouge ; LV, lame de verre ; CP, cuve prismatique ; PMT1 et 2, photomultiplicateurs en régime de comptage de photons.

Afin de s'affranchir autant que possible des signaux parasites provenant du bruit et d'éventuels défauts de surface des fenêtres de la cuve, il est nécessaire d'effectuer un échantillonnage précis de la courbe pour écarter d'éventuels points aberrants. Le déplacement de la cuve a donc été automatisé à l'aide de moteurs pas à pas et synchronisé avec l'acquisition du signal provenant des photomultiplicateurs. Des courbes contenant 4000 à 5000 points de mesure peuvent ainsi être obtenues en une heure environ[4].

L'analyse théorique de l'intensité diffusée lorsque le faisceau est focalisé à proximité de la double interface verre/liquide/verre est présentée en annexe C à la page 193. On obtient la

[3]Comme la divergence du faisceau harmonique est inférieure à celle du faisceau incident, une lentille de diamètre équivalent suffit à assurer une bonne collecte du signal obtenu.

[4]Ce temps varie notablement selon l'échantillon étudié en fonction du niveau de signal obtenu : en effet, le temps d'intégration nécessaire pour chaque mesure pour obtenir un bon rapport signal-sur-bruit peut varier de 100 ms pour les signaux les plus forts à 1-2 s pour les signaux les plus faibles.

puissance totale diffusée :

$$\mathcal{P}_{tot} = \frac{\pi^2\epsilon_0^3\Delta\omega^2\, n_{v,3\omega}\, c\, \lambda I_0^3\, |\alpha|^2}{144\sqrt{6}b^2}\left[\frac{1}{\left(1+(\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2\right)^2}+\frac{1}{\left(1+(\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2\right)^2}\right.$$
$$\left.+\frac{\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\exp\left[\frac{3i\omega_0(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{c}\right]}{(1+i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2(1-i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2}+\frac{\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\exp\left[-\frac{3i\omega_0(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{c}\right]}{(1-i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2}\right] \tag{3.3}$$

où $\Delta\omega$ est la largeur spectrale de l'impulsion incidente, λ est la longueur d'onde centrale d'excitation dans le vide, I_0 est l'intensité de l'onde excitatrice, $l_a = \frac{\sqrt{8\pi/3}\,c}{(n_{l,3\omega}-n_{l,\omega})\Delta\omega}$ est la longueur caractéristique d'atténuation des franges, $n_{l,\omega}$, $n_{l,3\omega}$ sont les indices linéaires réels du liquide respectivement à la fréquence fondamentale et harmonique et :

$$\alpha = \frac{\chi_l^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{l,3\omega}(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})} - \frac{\chi_v^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(\omega)3}}{n_{v,3\omega}(n_{v,3\omega}-n_{v,3\omega})} \tag{3.4}$$

Lorsqu'on déplace la cuve parallèlement à l'axe optique, on obtient pour chaque interface un profil en lorentzienne au carré (voir aussi chapitre 2, section 2.1.1.2, page 46). Pour une translation de la cuve perpendiculairement à l'axe optique, on considère le maximum d'intensité obtenu pour chaque épaisseur e en fonction de la position du point de focalisation, ce qui donne l'équation de la courbe $\mathcal{P}_{max} = f(e)$:

$$\mathcal{P}_{max} = \frac{\pi^2\epsilon_0^3\Delta\omega^2\, n_{v,3\omega}\, c\, \lambda I_0^3\, |\alpha|^2}{72\sqrt{6}b^2} \times \frac{1+\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\cos\left[\frac{3\omega_0(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{c}-4\arctan(\frac{e}{2n_{l,\omega}b})\right]}{\left(1+(\frac{e}{2n_{l,\omega}b})^2\right)^2} \tag{3.5}$$

Ainsi, on obtient avec une bonne approximation (annexe C) une relation analytique décrivant les courbes mesurées. Nous allons tout d'abord vérifier la concordance entre théorie et courbes expérimentales.

3.1.1.4 Analyse des courbes obtenues

La figure 3.7 présente l'évolution du signal lorsque le point de focalisation est balayé autour de la double interface verre/liquide/verre. Dans la direction axiale, le signal atteint un maximum lorsque le point de focalisation est situé au milieu de la cuve. En effet, c'est là que l'intensité d'excitation au niveau des interfaces (d'où le signal semble provenir, voir paragraphe 2.1.1.1, page 36) est la plus grande. Dans la direction perpendiculaire, le signal décrit des franges de Maker, provenant des interférences entre les signaux des deux interfaces (paragraphe 2.1.1.2, page 46). La période spatiale de ces oscillations est donnée par la longueur de cohérence du milieu,

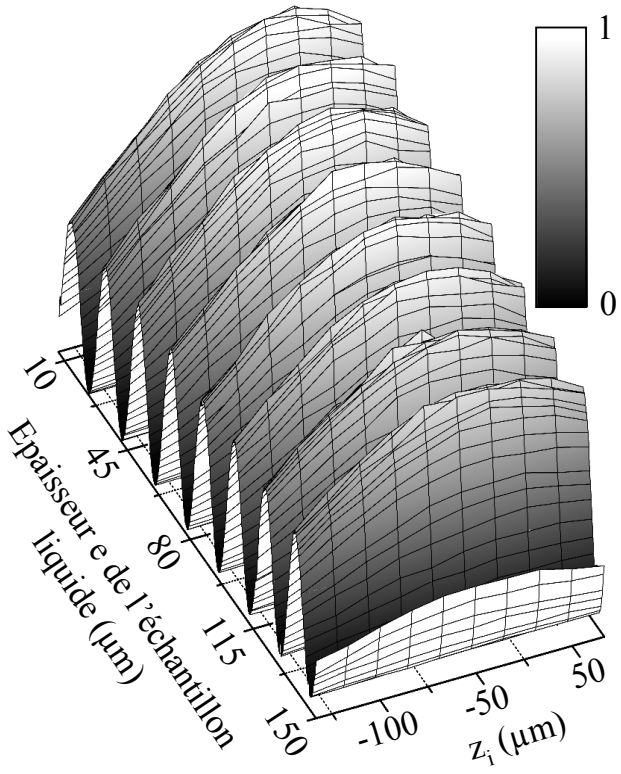


FIG. 3.7 – BALAYAGE AXIAL ET LATÉRAL DU POINT DE FOCALISATION.
La position axiale est repérée par l'abscisse z_i, tandis que le mouvement latéral de la cuve induit un changement de l'épaisseur e de liquide traversé. La courbe présentée est reconstruite à partir d'environ 3000 points de mesure à la longueur d'onde de 1160 nm.

c'est-à-dire la distance sur laquelle l'onde fondamentale et l'onde harmonique se déphasent dans un milieu dispersif et dont on rappelle l'expression (voir équation 2.3, page 37) :

$$l_c = \frac{\lambda}{3\,|n_{1,\omega} - n_{1,3\omega}|} \tag{3.6}$$

En premier lieu, nous avons vérifié l'origine du signal en mesurant sa dépendance avec la puissance du faisceau excitateur. La dépendance obtenue (figure 3.8) est bien d'ordre 3, confirmant qu'il s'agit d'un signal de troisième harmonique.

Si l'on s'intéresse plus précisément au profil créé lors d'un balayage axial de l'ensemble de la cuve, le faisceau est alors successivement focalisé sur les quatre interfaces air/verre, verre/liquide, liquide/verre et enfin verre/air. La courbe obtenue dans le cas de l'eau est présentée sur la figure 3.9 : chaque interface est visualisée par un pic du signal THG, les deux interfaces verre/liquide apparaissant confondues car très rapprochées à l'échelle du volume focal excitateur.

Le signal THG provenant des interfaces entre air et verre est d'amplitude plus importante car la différence de propriétés optiques entre le verre et l'air est plus importante que celle entre le verre et le liquide.

L'équation 3.3 prédit un profil bien décrit par une forme lorentzienne au carré pour les différents pics. L'ajustement correspondant des données expérimentales (traits gris sur la fi-

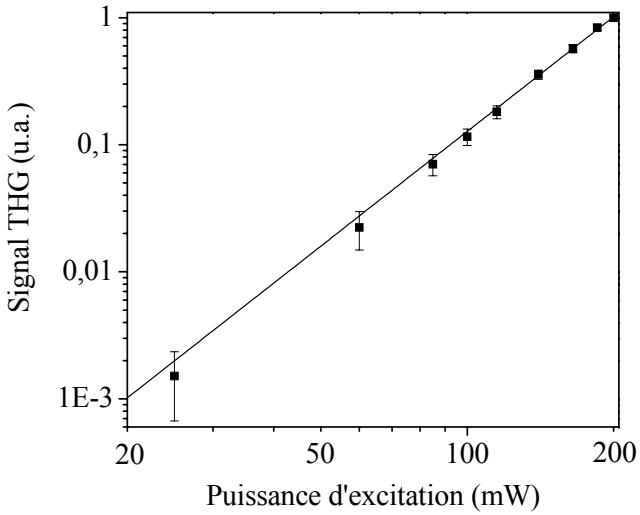


FIG. 3.8 – DÉPENDANCE DU SIGNAL AVEC LA PUISSANCE D'EXCITATION.
Les points expérimentaux (carrés) sont correctement ajustés par une droite de pente 3 (ligne noire). L'incertitude sur les points de mesure provient principalement des fluctuations de puissance de l'OPO.

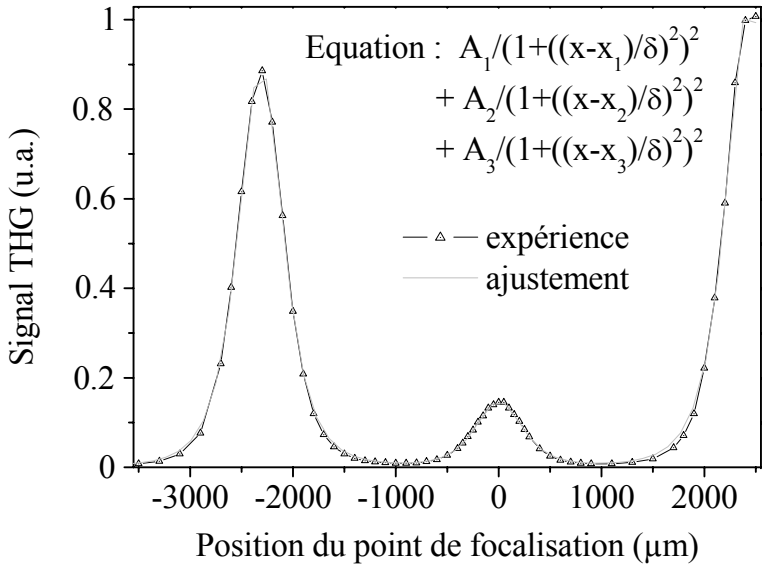


FIG. 3.9 – BALAYAGE AXIAL DU POINT DE FOCALISATION.
Les trois pics de gauche à droite correspondent aux interfaces air/verre, verre/liquide/verre (confondues), verre/air. Longueur d'onde d'excitation : 1160 nm.

gure 3.9) décrit correctement l'allure de la courbe obtenue. De plus, la longueur de Rayleigh utilisée pour l'ajustement ($b = 280\,\mu\text{m} \pm 15\,\mu\text{m}$) correspond à la valeur calculée à partir de l'ouverture numérique du faisceau ($b = 290\,\mu\text{m} \pm 10\,\mu\text{m}$).

De même, on peut considérer le profil obtenu lors d'un déplacement latéral centré au milieu de la cuve (soit pour le maximum d'amplitude des franges, équation 3.5). La courbe correspondante

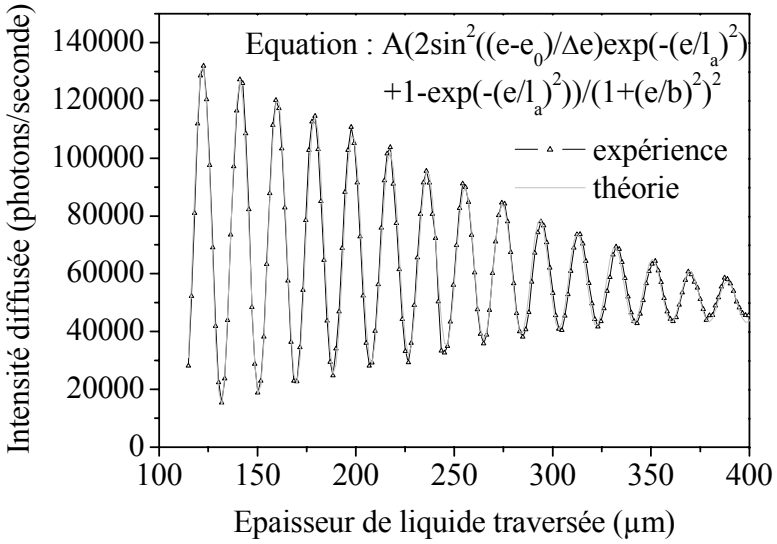


FIG. 3.10 – BALAYAGE LATÉRAL DU POINT DE FOCALISATION.
Le signal THG décrit des franges de Maker dont l'amortissement est lié à la largeur spectrale du faisceau excitateur. Longueur d'onde d'excitation : 1160 nm

est présentée sur la figure 3.10.

Les franges de Maker observées sont elles aussi bien décrites par la théorie. Leur période est de $l_c = 19\,\mu\text{m} \pm 0.1\ \mu\text{m}$, ce qui est compatible avec la valeur attendue de $18.8\,\mu\text{m} \pm 0.1\ \mu\text{m}$ [5], et leur amplitude et leur contraste décroissent avec l'épaisseur de liquide traversée. La diminution du signal moyen provient de l'éloignement des interfaces par rapport au point focal. Dans la limite où la tranche de liquide devient plus épaisse que le volume focal, le milieu redevient localement homogène et le signal tend vers 0. La distance caractéristique d'atténuation est donc $2n_{l,\omega}b$ (équation 3.5). L'ajustement de la figure 3.10 fournit une valeur de $b = 281\,\mu\text{m} \pm 10\ \mu\text{m}$, en très bon accord avec la valeur théorique et celle trouvée précédemment pour le profil axial de la courbe.

La diminution du contraste des franges avec l'épaisseur de liquide traversée s'explique quant à elle par la largeur spectrale importante de la source, pouvant atteindre 45 nm pour certaines longueurs d'onde. Ainsi, la longueur de cohérence, proportionnelle à λ, varie significativement d'un bout à l'autre du spectre et conduit pour des épaisseurs de liquide supérieures à quelques l_c à un brouillage dû au déphasage des différentes composantes spectrales. La baisse de contraste intervient sur une distance caractéristique l_a, inversement proportionnelle à la largeur spectrale de la source (équation 3.5 et section C.4, page 205).

L'ajustement de la figure 3.10 fournit une valeur de $l_a = 315\,\mu\text{m} \pm 15\,\mu\text{m}$, correspondant à $\Delta\omega = 1.56 \pm 0.05 \times 10^{14}$ Hz, soit une largeur spectrale en intensité à mi-hauteur d'environ 50 nm. Or, la valeur mesurée est d'environ 30 nm, incompatible avec un amortissement aussi rapide des franges de Maker. Pour vérifier que l'atténuation est malgré tout liée à la largeur spectrale de la source, nous avons fait varier celle-ci en changeant les paramètres d'asservissement de la cavité

[5] La précision de cette valeur théorique est limitée par le faible nombre de mesures tabulées autour de 1.2 µm. Voir annexe D pour les valeurs des indices utilisées dans cette étude et les références correspondantes.

de l'OPO. On trouve effectivement une nette décroissance de l_a lorsque la largeur spectrale augmente (figure 3.11) bien que la dépendance ne soit pas quantitativement celle attendue. La rapidité de l'amortissement est peut-être liée au fait que le spectre est très éloigné d'une gaussienne (figure 1.15 à la page 30).

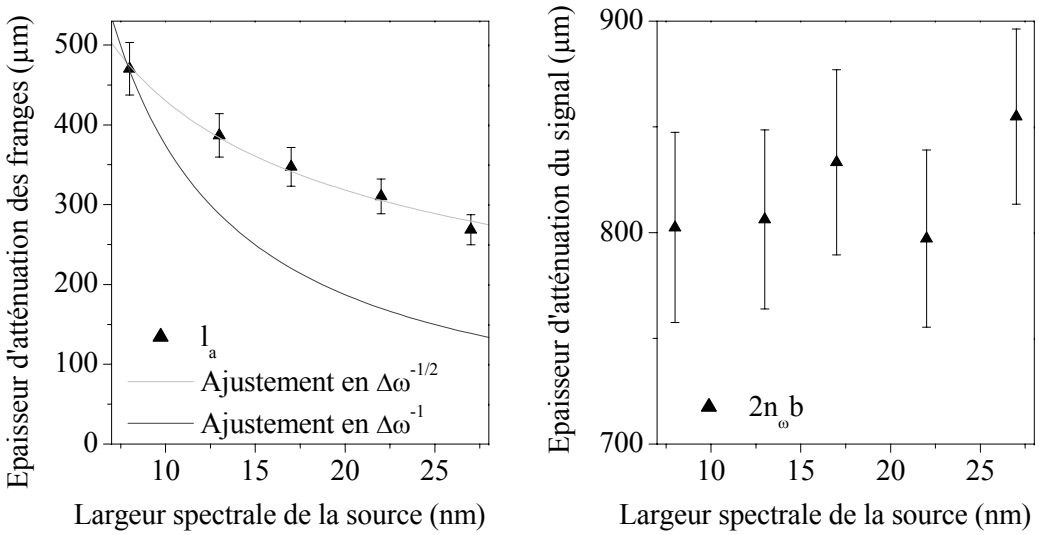


FIG. 3.11 – INFLUENCE DE LA LARGEUR SPECTRALE SUR LA DÉCROISSANCE DES FRANGES.
La longueur caractéristique d'atténuation des franges l_a décroît lorsque la largeur spectrale de la source augmente (à gauche), mais cette décroissance (en gris clair) est plus lente que celle prévue par la théorie (en gris foncé). Par contre, la distance caractéristique d'atténuation du signal moyen $2n_\omega b$ reste comme prévu inchangée (à droite).

En conclusion, à l'exception de l'amortissement des franges pour lequel les ordres de grandeur ne sont pas les bons, on peut considérer que les courbes obtenues sont correctement décrites par la théorie développée dans l'annexe C. Dans la suite et pour faciliter le traitement des données, on se placera dans des conditions où l'amplitude des franges est à peu près constante et où les courbes peuvent être considérées comme simplement sinusoïdales dans la direction latérale (ceci correspond à une épaisseur de cuve e variant entre 0 et 100 µm, figure 3.14).

3.1.1.5 Choix des valeurs de susceptibilité de référence

Dans l'équation 3.3, la susceptibilité non linéaire du troisième ordre intervient à travers le facteur α, qui apparaît dans l'amplitude du signal diffusé :

$$\alpha = \frac{\chi_l^{(3)} t_{vl}^{(\omega)3} t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{l,3\omega}(n_{l,3\omega} - n_{l,\omega})} - \frac{\chi_v^{(3)} t_{vl}^{(\omega)3} t_{lv}^{(\omega)3}}{n_{v,3\omega}(n_{v,3\omega} - n_{v,\omega})} = t_{vl}^{(\omega)3} t_{lv}^{(3\omega)} \alpha_l - t_{vl}^{(\omega)3} t_{lv}^{(\omega)3} \alpha_v \qquad (3.7)$$

Or, l'amplitude dépend également fortement des conditions de focalisation du faisceau et de son profil temporel, qui sont mal connus. Il est donc nécessaire de s'affranchir de ces paramètres en rapportant l'amplitude du signal à celle mesurée dans des conditions identiques pour une

solution de référence. Ainsi, en mesurant successivement le signal obtenu pour deux solutions, on obtient le rapport des amplitudes :

$$r(l_1, l_2, v) = \left| \frac{t_{vl_1}^{(\omega)3} t_{l_1 v}^{(3\omega)} \alpha_{l_1} - t_{vl_1}^{(\omega)3} t_{l_1 v}^{(\omega)3} \alpha_v}{t_{vl_2}^{(\omega)3} t_{l_2 v}^{(3\omega)} \alpha_{l_2} - t_{vl_2}^{(\omega)3} t_{l_2 v}^{(\omega)3} \alpha_v} \right|^2 \tag{3.8}$$

Dans cette équation, les paramètres du faisceau excitateur sont complètement éliminés, permettant une détermination du paramètre inconnu α_{l_1}. Cependant, à cause de la valeur absolue présente dans la définition de $r(l_1, l_2, v)$, une ambiguïté de signe subsiste, obligeant à faire une hypothèse sur les valeurs relatives de α_{l_1} et α_v[6]. Dans le cas où les deux liquides sont très voisins, on peut logiquement supposer que $\alpha_{l_1} \approx \alpha_{l_2}$, ce qui lève l'ambiguïté. C'est la solution que nous avons adoptée dans le cas des solutions aqueuses étudiées dans la section 3.1.2 : leurs propriétés optiques restent en effet proches de celles de l'eau[7].

Dans le cas où aucune hypothèse ne peut être émise a priori sur le signe de $\alpha_{l_1} - \alpha_v$, il est nécessaire de disposer d'une équation supplémentaire pour déterminer α_{l_1}. Dans ce cas, les mesures précédentes sont répétées dans une cuve composée d'un verre différent, dont les propriétés optiques sont également connues. En combinant les deux équations, l'ambiguïté de signe peut être résolue. C'est l'approche que nous avons utilisée pour la mesure des propriétés optiques de lipides.

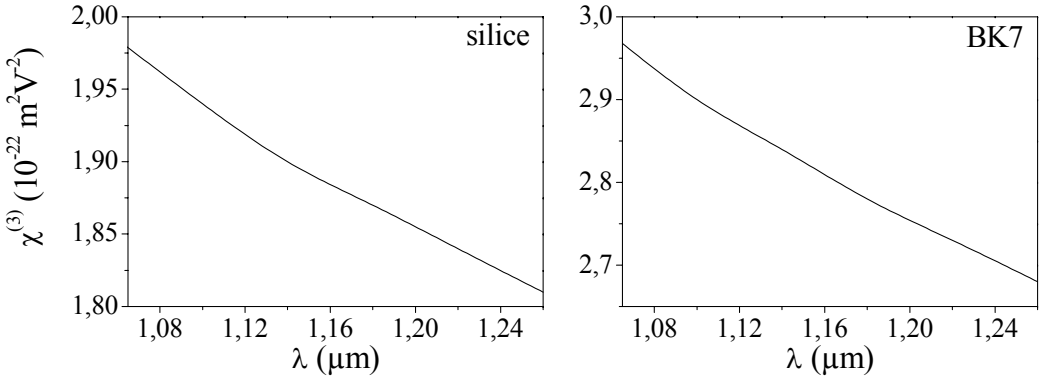


FIG. 3.12 – SUSCEPTIBILITÉS DU TROISIÈME ORDRE DES VERRES UTILISÉS.
Les valeurs de la susceptibilité $\chi_v^{(3)}$ de la silice (à gauche) et du BK7 (à droite) ont été obtenues à partir des données de la référence [121].

Un problème subsiste si aucune valeur de référence pour un milieu liquide n'est disponible dans la littérature : c'est le cas autour de 1.2 µm. Cependant, des valeurs sont disponibles pour une longueur d'onde proche, celle des lasers Nd-YAG ($\lambda = 1.064\,\mu$m). Dans ce cas, nous avons utilisé deux types de verre connus pour déterminer simultanément les valeurs de deux liquides (eau et

[6]Dans toute la suite, nous avons travaillé loin des bandes d'absorption des milieux étudiés. Nous supposons donc ici que la susceptibilité non linéaire de ces milieux est toujours réelle, ce qui réduit l'ambiguïté à celle du signe. La mesure de la partie imaginaire de la susceptibilité nécessite une mesure avec une référence différente afin de disposer d'une équation supplémentaire.

[7]On peut vérifier cette hypothèse facilement puisque nous avons travaillé avec des concentrations graduelles d'ions : le changement de signe est alors précédé d'un passage par 0.

éthanol) qui sont tabulées à 1.064 µm, en faisant l'hypothèse que leur position par rapport aux valeurs des verres restaient les mêmes dans la gamme explorée, soit : $\alpha_{v_1} \leq \alpha_{v_2} \leq \alpha_{eau} \leq \alpha_{ethanol}$. Une fois mesurée la susceptibilité de l'eau autour de 1.2 µm, celle-ci sert de référence pour les autres mesures.

Les verres utilisés comme références ont été choisis parmi ceux étudiés par Bosshard *et al.* [121,124], qui à partir de mesures à différentes longueurs d'onde dans l'infrarouge obtiennent des équations décrivant la dépendance en longueur d'onde de la susceptibilité (figure 3.12). Ceci nous a permis de les utiliser comme référence sur toute la gamme spectrale [1.06 µm, 1.26 µm]. Nous avons choisi de prendre comme références la silice et le BK7, en écartant le quartz pour lequel la contribution en cascade de la seconde harmonique dans le signal de troisième harmonique impose de contrôler précisément l'orientation des lames constituant les fenêtres de la cuve [121]. La silice et le BK7 sont de plus des matériaux bien adaptés pour ce type de mesure puisqu'ils sont très courants (leurs indices linéaires, en particulier, sont bien connus), peu chers et inertes chimiquement vis-à-vis des liquides étudiés dans ce travail.

Enfin la figure 3.12 illustre, comme évoqué plus haut, que les variations de $\chi^{(3)}$ loin des bandes d'absorption des matériaux sont faibles, ce qui justifie l'hypothèse $\alpha_{v_1} \leq \alpha_{v_2} \leq \alpha_{eau} \leq \alpha_{ethanol}$.

3.1.1.6 Vérification de la validité des mesures : comparaison avec des données de référence

Afin d'estimer la précision de nos mesures, nous avons commencé par les comparer à des valeurs tabulées en travaillant à une longueur d'onde d'excitation de 1.064 µm. A cette longueur d'onde, les valeurs de plusieurs solvants ont été mesurées par Kajzar *et al.* [130], avec une précision de l'ordre de 1%. Pour vérifier la concordance de nos mesures avec ces résultats, nous nous sommes concentrés sur l'eau et l'éthanol. Pour chaque cuve (silice et BK7), nous avons mesuré l'amplitude des franges de Maker pour différentes proportions du mélange eau/éthanol. Les courbes obtenues (figure 3.13) permettent d'estimer avec précision les valeurs de α_{eau} et $\alpha_{ethanol}$ en fonction de α_{silice} et α_{BK7} ; puis, à partir des indices linéaires de ces liquides, de déterminer les valeurs de $\chi^{(3)}_{eau}$ et $\chi^{(3)}_{ethanol}$.

La table 3.1 présente les résultats obtenus en utilisant les mêmes valeurs de référence ($\chi^{(3)}_{silice}$, $\chi^{(3)}_{BK7}$) ainsi que des indices linéaires identiques à ceux de la référence [130]. Nos valeurs sont en très bon accord avec les données tabulées, ce qui confirme la validité des mesures effectuées avec notre dispositif. Cependant, les auteurs utilisent des valeurs d'indice linéaire pour l'eau et l'éthanol qui diffèrent de celles que nous avons rassemblées à partir de différentes références et qui sont présentées dans l'appendice D, page 209. Ils utilisent également une valeur peu précise et surévaluée de la susceptibilité non linéaire de la silice (appendice D). Nous proposons donc dans la table 3.2 de nouvelles valeurs de $\chi^{(3)}_{eau}$ et $\chi^{(3)}_{ethanol}$ qui prennent en compte ces modifications.

Nous avons également vérifié la reproductibilité des données obtenues, et notamment la stabilité vis-à-vis des fluctuations de la source. Pour cela, nous avons effectué des acquisitions successives sur le même échantillon pendant le temps de stabilisation de l'asservissement de l'OPO, où les paramètres du faisceau (spectre, puissance) varient significativement. La figure 3.16 montre le signal THG de référence, présentant des variations de l'ordre de 40%, ainsi que les franges de Maker acquises pendant la même période et normalisées par le signal de référence. Cet exemple

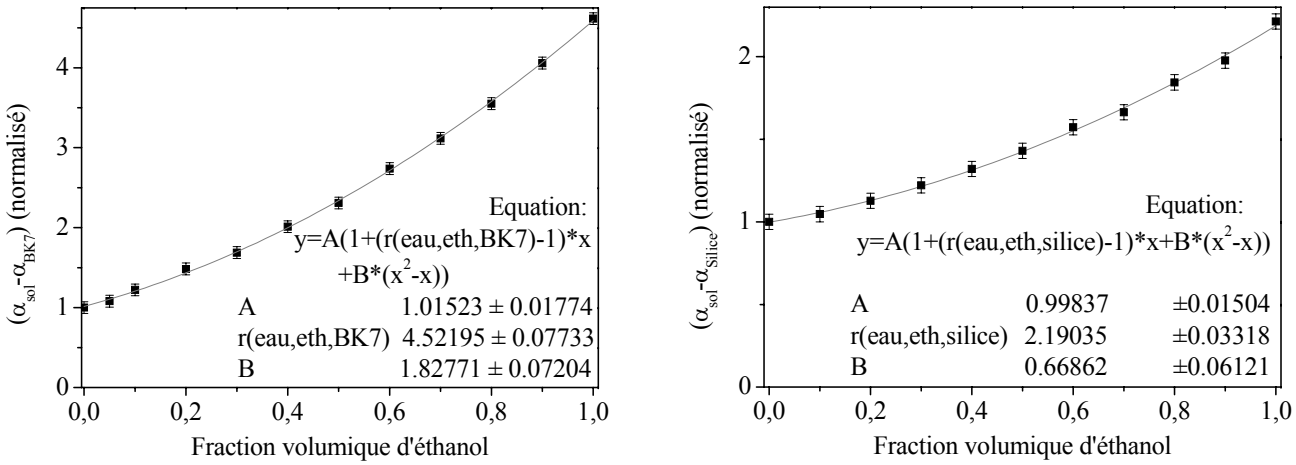


FIG. 3.13 – MESURE DES SUSCEPTIBILITÉS $\chi^{(3)}$ DE L'EAU ET DE L'ÉTHANOL À 1064 NM.
La racine carrée de l'amplitude des franges, qui est proportionnelle à $|t^{(\omega)3}_{v,sol}t^{(3\omega)}_{sol,v}\alpha_{sol} - t^{(\omega)3}_{v,sol}t^{(\omega)3}_{sol,v}\alpha_v|$ (où *sol* est le mélange eau/éthanol et v le verre de la cuve utilisée), est tracée en fonction de la concentration volumique en éthanol. En combinant la courbe obtenue avec la silice (à gauche), donnant $\sqrt{r(eau, ethanol, silice)}$ et celle obtenue avec le BK7 (à droite), donnant $\sqrt{r(eau, ethanol, BK7)}$, on peut déduire les valeurs de α_{eau} et $\alpha_{ethanol}$.

	α	n_ω	$n_{3\omega} - n_\omega$	$\chi^{(3)}_{mil}/\chi^{(3)}_{sil}$	$\chi^{(3)}_{mil}/\chi^{(3)}_{sil}$ (ref)
Silice	50.58	1.476	0.0265	1	1
Eau	57.8 ± 3.9	1.348	0.0240	0.92 ± 0.05	0.90
Ethanol	72.6 ± 5.1	1.378	0.0229	1.12 ± 0.06	1.11

TAB. 3.1 – COMPARAISON AVEC LES VALEURS TABULÉES.
Valeurs de $\chi^{(3)}_{mil}/\chi^{(3)}_{sil}$ déterminées dans notre expérience, comparées avec celles de la référence [130]. Les valeurs des indices utilisées pour calculer $\chi^{(3)}$, données dans les colonnes 2 et 3, sont celles de la référence citée précédemment. Une bonne concordance est obtenue entre nos données, mesurées avec des impulsions de 200 fs, et celles de [130], mesurées avec des impulsions de 13 ns.

illustre la bonne reproductibilité des données, avec une variation sur l'amplitude des franges de l'ordre de 2 à 3%, ce qui correspond à la précision de la mesure de α[8]. Ceci souligne l'importance cruciale d'une voie de référence pour effectuer des mesures précises : un effet du troisième ordre est très sensible tant aux variations de puissance que de phase des impulsions excitatrices.

[8]La précision de la valeur de $\chi^{(3)}$ obtenue dépend ensuite fortement de la précision avec laquelle les indices linéaires de la solution aux fréquences fondamentales et harmoniques sont connus. Dans la majorité des mesures décrites ici, c'est cette source d'incertitude qui est prépondérante.

	α	$n_{3\omega}$	$n_{3\omega} - n_{\omega}$	$\chi^{(3)}_{mil}$
Eau	57.8 ± 3.9	1.348	0.0235	1.83 ± 0.10
Ethanol	72.6 ± 5.1	1.378	0.0242	2.42 ± 0.13

TAB. 3.2 – VALEURS DE $\chi^{(3)}$ POUR L'EAU ET L'ÉTHANOL POUR λ =1064 NM.
Ces valeurs sont obtenues en utilisant comme références les valeurs de $\chi^{(3)}$ de la référence [121]. Les valeurs des indices proviennent de la compilation des références données dans l'annexe D. $\chi^{(3)}$ est exprimée en $10^{-22}\mathrm{m}^2\mathrm{V}^{-2}$.

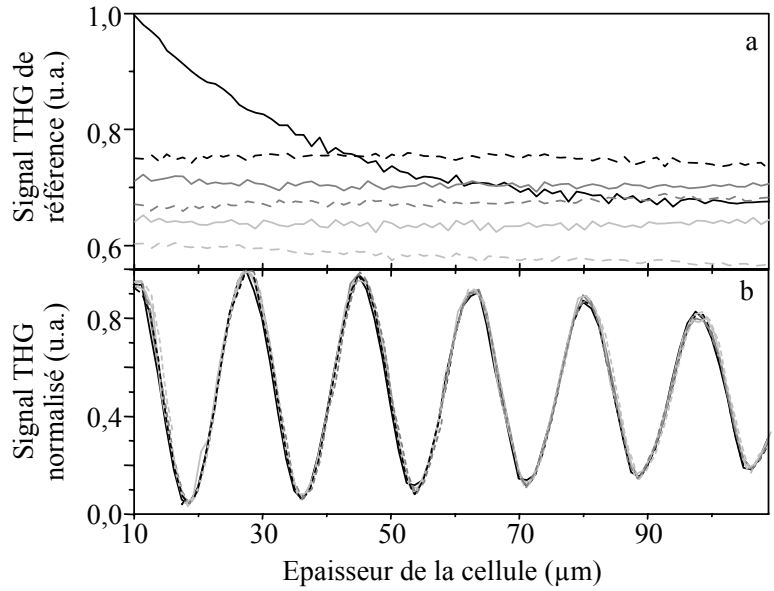


FIG. 3.14 – STABILITÉ DES MESURES DE SUSCEPTIBILITÉ.
Les fluctuations de l'asservissement de l'OPO induisent d'importantes variations du signal THG mesuré (a, signal de référence), mais l'utilisation d'une voie de référence permet d'obtenir un signal normalisé stable (b, franges de Maker normalisées).

Après avoir vérifié la fiabilité des données obtenues, nous allons maintenant chercher à mesurer les propriétés de solutions d'intérêt biologique.

3.1.2 Mesure de la susceptibilité d'ions en solution

Les premiers travaux s'intéressant à la microscopie THG comme méthode d'imagerie fonctionnelle en biologie [94, 95, 96] se sont concentrés sur l'influence des variations intracellulaires de calcium sur le signal THG. Les auteurs, utilisant une longueur d'onde d'excitation de $\lambda = 1.5\,\mu$m, montrent des variations de signal THG qu'ils corrèlent avec des fluctuations physiologiques de calcium, dont l'amplitude est au plus de l'ordre de 1 à 2 mmol/L. Cependant, aucune piste n'est proposée pour expliquer l'origine et la sélectivité de ce contraste, et sa sensibilité n'est pas étudiée. Dans un premier temps, nous avons donc cherché pour expliquer ces résultats à mesurer les pro-

priétés optiques de différentes solutions ioniques d'intérêt biologique. Les autres applications en microscopie seront discutées dans la section 3.1.3.

3.1.2.1 Susceptibilité non linéaire de différentes solutions ioniques

Nous avons mesuré la susceptibilité non linéaire $\chi^{(3)}$ de différentes espèces cationiques (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+, K^+) ainsi que de différents contre-ions (Cl^-, $H_2PO_4^-$), en fonction de la concentration des espèces et toujours à la longueur d'onde de 1064 nm. Les variations de $\chi^{(3)}$ correspondantes sont présentées sur la figure 3.15. Les variations de signal liées aux différents ions sont d'amplitudes comparables, ce qui signifie que la sélectivité du signal THG vis-à-vis des variations de concentration de l'un d'entre eux sera faible, voire inexistante.

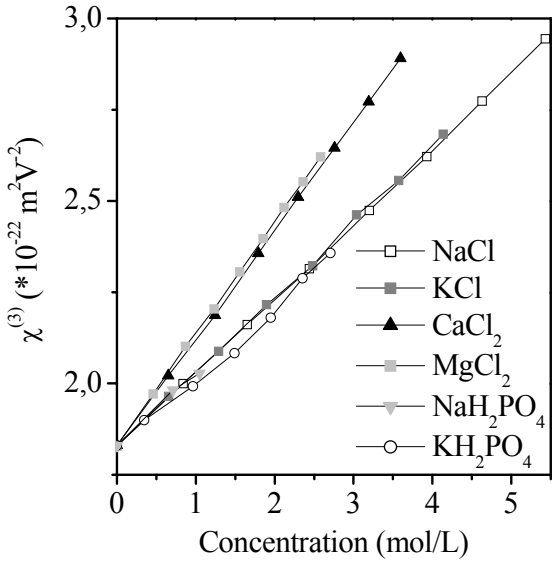


FIG. 3.15 – VARIATION DE $\chi^{(3)}$ AVEC LA CONCENTRATION IONIQUE.
Les variations de la susceptibilité non linéaire avec la concentration en espèce ionique ont des amplitudes comparables pour les différents composés étudiés. La concentration maximale mesurée pour chacune des espèces correspond à sa limite de solubilité à 20°C. Longueur d'onde d'excitation : 1064 nm.

Comme dans la gamme de concentration étudiée les variations de $\chi^{(3)}$ avec la concentration ionique sont linéaires, on peut définir une variation de susceptibilité par unité de concentration $\frac{\partial\chi^{(3)}}{\partial C}$ afin de quantifier ces variations. Les résultats sont présentés dans la table 3.3. Quatre des six valeurs présentent entre elles des écarts inférieurs à l'incertitude sur les valeurs mesurées[9]. Il semble très difficile de séparer *in vivo* les contributions de différentes espèces ioniques à la variation du signal THG lors d'un processus physiologique.

Enfin, à partir des valeurs mesurées de $\frac{\partial\chi^{(3)}}{\partial C}$, on peut estimer la variation de signal THG induite par une variation physiologique de calcium de part et d'autre d'une membrane cellu-

[9]essentiellement liée à l'incertitude sur les variations de $n_{3\omega} - n_\omega$ avec la concentration, mesurées à partir des variations de la période des franges.

	$\frac{\partial\chi^{(3)}}{\partial C}$ $(\times 10^{-22} m^2 V^{-2} mol^{-1} L)$
NaCl	0.203 ± 0.011
KCl	0.204 ± 0.011
$CaCl_2$	0.295 ± 0.015
$MgCl_2$	0.306 ± 0.017
NaH_2PO_4	0.188 ± 0.021
KH_2PO_4	0.196 ± 0.032

TAB. 3.3 – VARIABILITÉ DE $\chi^{(3)}$ AVEC LA CONCENTRATION POUR DIFFÉRENTS IONS.
Variation de la susceptibilité non linéaire par unité de concentration. Longueur d'onde d'excitation : 1064 nm

laire. Pour une différence de concentration intérieur/extérieur de 1 mmol/L (déjà conséquente au regard des concentrations mises en jeu dans les processus cellulaires), la variation relative de susceptibilité non linéaire est de l'ordre de 0.2%. A titre de comparaison, la variation relative de $\chi^{(3)}$ au niveau d'une interface verre/eau (lamelle de microscope par exemple) est de l'ordre de 40%. Comme le signal THG varie en outre comme le carré de la différence des $\chi^{(3)}$ de part et d'autre de l'interface, le signal obtenu au niveau de la membrane sera typiquement cinq ordres de grandeur plus faible que le signal de la lamelle. La sensibilité de la THG comme méthode de visualisation des variations de concentration calcique est donc très nettement inférieure à celle de marqueurs fluorescents spécifiques tels que le Fura 2, qui peuvent détecter des variations de l'ordre de 150 nmol/L, et cette sensibilité est manifestement insuffisante pour la plupart des applications biologiques.

3.1.2.2 Comparaison avec d'autres solutions aqueuses

De façon plus générale, nous avons mesuré les variations de $\chi^{(3)}$ dues à d'autres espèces en solution aqueuse telles qu'acides aminés, polypeptides, protéines ou sucres. Les résultats pour des molécules appartenant à chacune de ces catégories sont présentés dans la table 3.4. **Il ressort de ces mesures que les signaux de troisième harmonique créés par des molécules en solution aqueuse à des concentrations physiologiques sont généralement peu différents de ceux créés par une solution d'eau pure**. Ceci s'explique simplement par le fait que la densité de molécules d'eau est plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle du soluté. A moins que celui-ci ne possède une hyperpolarisibilité du troisième ordre particulièrement importante, son influence sur le $\chi^{(3)}$ de la solution est donc négligeable. On s'attend ainsi à ce que les discontinuités importantes de $\chi^{(3)}$ se situent plutôt au niveau de structures très denses,

contenant majoritairement d'autres types de molécules que des molécules d'eau, par exemple des empilements structurés de protéines (voir paragraphe 3.2.2.1) ou des structures lipidiques.

	Type de molécule	$\frac{\partial\chi^{(3)}}{\partial C}$ $(\times 10^{-22}\mathrm{m^2V^{-2}mol^{-1}L})$
NaCl	ions	0.203 ± 0.011
ac. glutamique	acide aminé	0.041 ± 0.015
GlyGlyGly	polypeptide	-0.064 ± 0.02
cytochrome c	protéine	pas de variation mesurable
glucose	sucre	0.197 ± 0.012

Tab. 3.4 – Variabilité de $\chi^{(3)}$ avec la concentration pour différents types de molécules.
Variation de la susceptibilité non linéaire par unité de concentration. Longueur d'onde d'excitation : 1064 nm

3.1.2.3 Influence de la longueur d'onde d'excitation

Finalement, pour nous assurer que les résultats obtenus restent valables pour différentes longueur d'onde d'excitation, nous avons exploré la variation des signaux mesurés avec la longueur d'onde dans la gamme [1.06 µm,1.26 µm]. La figure 3.16 présente les variations obtenues pour l'eau et l'éthanol, ainsi que pour la contribution à la susceptibilité non linéaire du $CaCl_2$. Les variations de $\chi^{(3)}$ pour l'eau sont de l'ordre de 15%, tandis que les variations mesurées pour le chlorure de calcium sont inférieures à l'incertitude sur les valeurs mesurées.

Clay *et al.* [99] ont réalisé des spectres d'excitation THG de plusieurs molécules et solvants dans la région [0.7 µm,1.0 µm]. Cette spectroscopie d'excitation met en évidence l'importance des résonances à un ou plusieurs photons dans les variations de $\chi^{(3)}$. Pour les espèces considérées ici, transparentes dans le visible[10], les variations de $\chi^{(3)}$ devraient essentiellement être dominées dans la gamme [1.06 µm,1.26 µm] par les variations du spectre d'absorption à un photon. La figure 3.17 compare la dépendance en longueur d'onde de $\chi^{(3)}$ et le spectre d'absorption à un photon. Dans aucun des deux cas (eau et éthanol), il n'y a de corrélation franche entre la tendance mesurée dans la région [1.06 µm,1.26 µm] et le spectre d'absorption, mais comme on se situe au voisinage d'une inflexion de la courbe d'absorption, il paraît raisonnable que la dépendance en longueur d'onde soit relativement faible.

[10] à l'exception du cytochrome c, qui présente notamment une bande d'absorption autour de 410 nm (bande de Soret). Cependant pour cette protéine, pour les concentrations millimolaires que nous avons étudiées, nous n'avons pas détecté de signal THG spécifique supérieur au bruit sur la mesure, quelle que soit la longueur d'onde considérée dans la gamme [1.06 µm,1.26 µm].

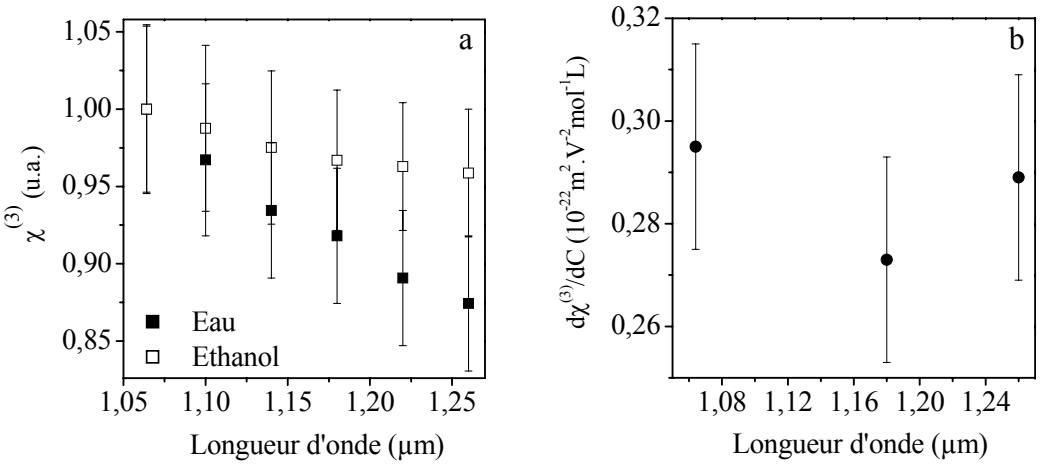


FIG. 3.16 – VARIATION DE $\chi^{(3)}$ AVEC LA LONGUEUR D'ONDE.
(a), variations de $\chi^{(3)}$ de l'eau (carrés blancs) et de l'éthanol (carrés noirs) en fonction de la longueur d'onde d'excitation ; (b), variations de $\dfrac{\partial\chi^{(3)}}{\partial C}$ pour le chlorure de calcium.

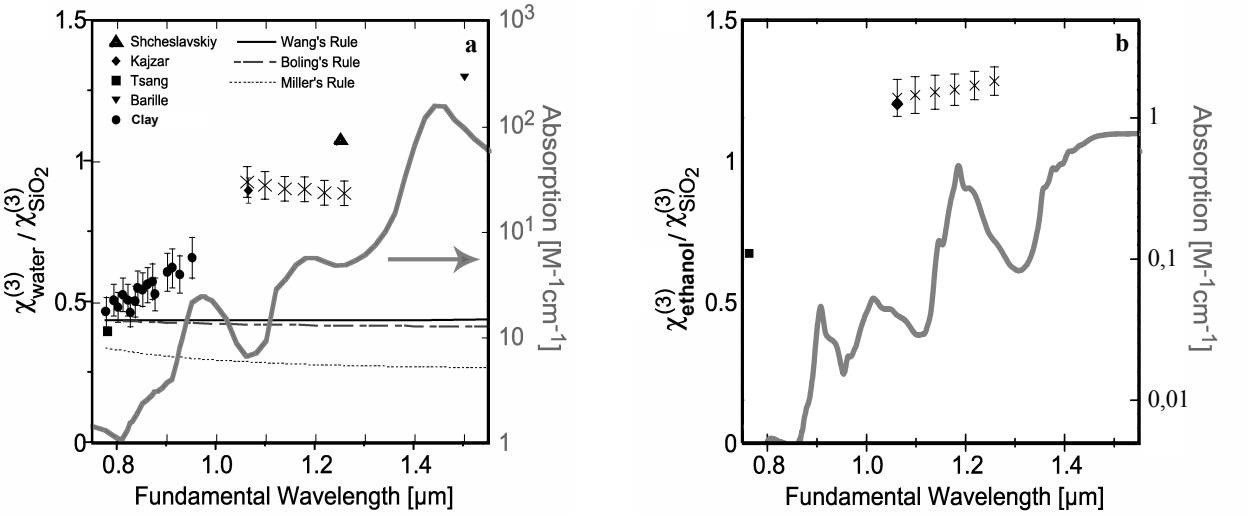


FIG. 3.17 – COMPARAISON AVEC D'AUTRES ÉTUDES.
(a), variations de $\chi^{(3)}$ de l'eau mesurées dans cette étude (croix) comparées avec les résultats trouvés dans la littérature. (b), variations de $\chi^{(3)}$ de l'éthanol (croix). Les deux résultats trouvés dans la littératures sont représentés par le même symbole qu'en (a). Les références pour ces valeurs sont : [97, 99, 130, 134, 136].

La faible dépendance de la susceptibilité du chlorure de calcium avec la longueur d'onde d'excitation s'explique elle aussi par l'absence d'absorption à un, deux ou trois photons de ce composé autour des fréquences étudiées. Ainsi, on s'attend à ce que la sensibilité du signal THG aux variations de concentration calcique ne soit pas spécialement exaltée pour d'autres longueurs d'onde proches de celles utilisées dans cette étude. Finalement, nos mesures contredisent l'interprétation donnée dans la référence [94] pour expliquer les variations de signal observées

dans les expériences. Comme on le verra à la section 3.1.3.2, ces variations sont essentiellement imputables à des changements de géométrie de l'échantillon, géométrie qui joue par contre un rôle considérable dans l'intensité THG détectée (chapitre 2).

Notons que nos données concernant l'eau sont par ailleurs en contradiction avec la valeur mesurée par Shcheslavskiy *et al.* [97,98] à 1250 nm (figure 3.17-a, triangle pointant vers le haut), mais celle-ci a été obtenue moyennant certaines approximations qui remettent en cause sa validité : tout d'abord, l'absence de normalisation des signaux mesurés rend l'expérience très sensible aux fluctuations de puissance du laser. En outre, les auteurs ont utilisé le dispositif, décrit au paragraphe 3.1.1.2, proposé par Barille *et al.* [134]. Or Pillai *et al.* [135] ont montré que pour ce dispositif, l'utilisation d'un objectif d'ouverture numérique supérieure à 0.35 conduit à une surestimation de la valeur de $\chi^{(3)}$. Ils démontrent une surestimation de 50% de la valeur de l'éthanol avec un objectif d'ouverture numérique 0.65 à la longueur d'onde de 1062 nm. Si l'on néglige la variation des aberrations induites entre cette longueur d'onde et 1250 nm, on obtient pour les conditions expérimentales de Shcheslavskiy *et al.* (ouverture numérique 0.55, lamelle de 170 µm d'épaisseur) une surestimation de l'ordre de 25%, ce qui ramènerait leur valeur (normalisée par celle de la silice) autour de 0.86, soit beaucoup plus proche de la valeur que nous avons mesurée (0.87).

3.1.3 Transposition en microscopie

Afin d'évaluer les fluctuations de signal effectivement observées lors de changements de concentration calcique dans un contexte d'imagerie, nous avons tout d'abord ajouté du calcium dans une solution contenant des vésicules unilamellaires géantes (GUV) afin d'éviter des variations induites d'autres espèces comme cela pourrait se produire dans un contexte cellulaire (paragraphe 3.1.3.1). Nous avons ensuite expérimenté l'apport d'une détection de type homodyne en utilisant le signal provenant de la lamelle sur laquelle étaient collées des cellules (paragraphe 3.1.3.2).

3.1.3.1 Démonstration sur des vésicules unilamellaires géantes

Les vésicules unilamellaires géantes (Giant Unilamellar Vesicles, ou GUVs) sont des bicouches lipidiques sphériques, de diamètre variant de 10 à 50 µm et entourant une solution interne de même pression osmotique que la solution dans laquelle elles baignent. Elles sont synthétisées par électroformation à partir de lipides tels que le DOPC et constituent des milieux modèles pour l'étude des membranes cellulaires[11].

Dans notre cas les GUVs ont été synthétisées dans une solution de sucrose de concentration 300 mmol/L puis resuspendues dans une solution de glucose équimolaire. Ainsi, l'équilibre des pressions osmotiques externes et internes est respecté tandis que, le sucrose étant plus dense que le glucose, la densité du milieu interne est plus importante que celle de la solution extérieure. Les GUVs vont donc sédimenter en quelques minutes sous le microscope puis rester immobiles sur la lamelle, ce qui permet de les visualiser de façon prolongée (Appendice E).

[11] Pour une description complète de différents protocoles de synthèse de GUVs, voir référence [137].

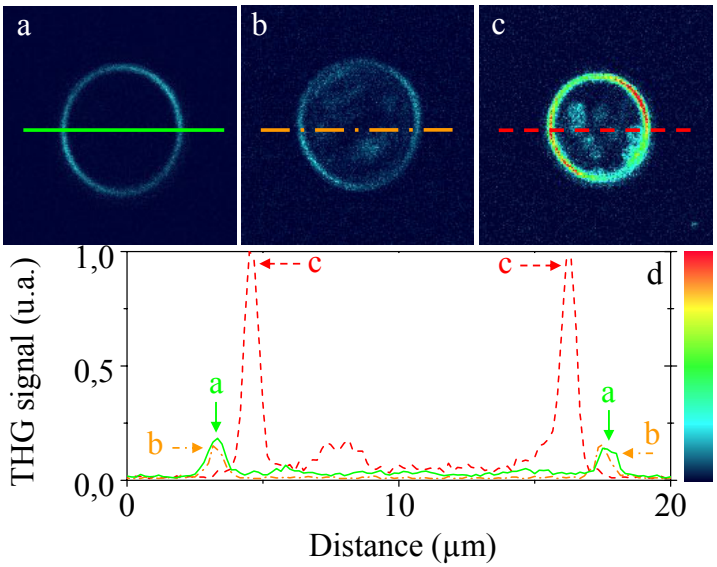


FIG. 3.18 – INFLUENCE DE LA CONCENTRATION CALCIQUE SUR LE SIGNAL THG AU NIVEAU DE LA MEMBRANE D'UNE GUV.
Image d'une GUV remplie d'une solution de sucrose à une concentration de 300 mmol/L et immergée dans une solution de glucose à une concentration de 300 mmol/L, additionnée de : (a), 0 mmol/L de chlorure de calcium ; (b), quelques 10 mmol/L de chlorure de calcium ; (c), quelques 100 mmol/L de chlorure de calcium. L'ajout de chlorure de calcium modifie l'osmolarité des solutions externes et déforme les vésicules. L'échelle de couleur représentée en dessous est la même pour les trois images. (d), profils obtenus selon les traits représentés sur les images. On mesure une nette augmentation du signal pour une addition forte de chlorure de calcium, mais pas d'augmentation mesurable pour une addition modérée.

Dans ces conditions, le signal THG obtenu au niveau de la bicouche est très faible car les propriétés des solutions internes et externes sont très proches. Typiquement, le signal obtenu est plus d'un ordre de grandeur plus faible que celui provenant de l'interface solution de glucose/verre. En ajoutant une goutte d'une solution molaire de chlorure de calcium dans le milieu extérieur, on observe une hausse très importante (d'un facteur 5 environ) du signal détecté au niveau de la membrane (figures 3.18 - a et c). Cependant, comme l'équilibre des pressions osmotiques est rompu, la vésicule implose très rapidement après l'ajout de calcium. La goutte n'ayant pas le temps de diffuser dans la solution, il est impossible de connaître précisément la concentration de calcium locale, mais nous l'avons estimée à quelque centaines de mmol/L. Par comparaison, si l'on ajoute une goutte d'une solution de chlorure de calcium à une concentration 10 fois plus faible, le changement de signal obtenu est indétectable (figures 3.18 - a et b) : en effet, la variation de signal attendue sera alors 100 fois plus faible soit environ 5% du signal en l'absence de calcium. Or cette variation est du même ordre de grandeur que les fluctuations de signal liées à celles de la source ou à la géométrie de la GUV.

Nous confirmons ainsi en microscopie ce qui avait été prédit quantitativement dans la section précédente : les variations de concentration ioniques (et notamment calciques) peuvent certes

être détectées avec la microscopie THG, mais avec une sensibilité trop faible pour trouver des applications en biologie.

3.1.3.2 Détection homodyne

Finalement, nous avons cherché à augmenter la sensibilité de la THG vis-à-vis des variations de concentration ionique en utilisant le signal de la lamelle sur laquelle repose l'échantillon pour effectuer une détection de type homodyne. En effet, le signal provenant de la lamelle est généralement beaucoup plus important que celui provenant de la membrane cytoplasmique des cellules. Ainsi, le signal provenant de la paroi cellulaire collée sur la lamelle peut s'écrire approximativement :

$$\begin{aligned} I_{3\omega} &= I_0 \left|\alpha_{verre} - \alpha_{cellule}\right|^2 \\ &\approx I_0 \left|\alpha_{verre} - \alpha_{eau}\right|^2 - 2I_0 \left(\alpha_{verre} - \alpha_{eau}\right)\left(\alpha_{cellule} - \alpha_{eau}\right) \end{aligned} \tag{3.9}$$

où I_0 est un facteur multiplicatif tenant compte des paramètres du faisceau ainsi que de la géométrie de l'échantillon. On voit que dans ce cas, la dépendance du signal avec la concentration en calcium est linéaire et non plus quadratique. Il doit donc être possible d'obtenir une meilleure sensibilité aux variations de concentration. Quand le corps cellulaire s'éloigne de la lamelle, la phase relative des deux termes $\alpha_{verre} - \alpha_{eau}$ et $\alpha_{cellule} - \alpha_{eau}$ change et on obtient une exaltation du signal pour une distance qui résulte d'un compromis entre l'atténuation du signal de la cellule qui sort du volume focal et la diminution du déphasage entre les deux ondes (figure 3.19). De plus la dépendance du signal pour une distance donnée avec la concentration en calcium reste linéaire.

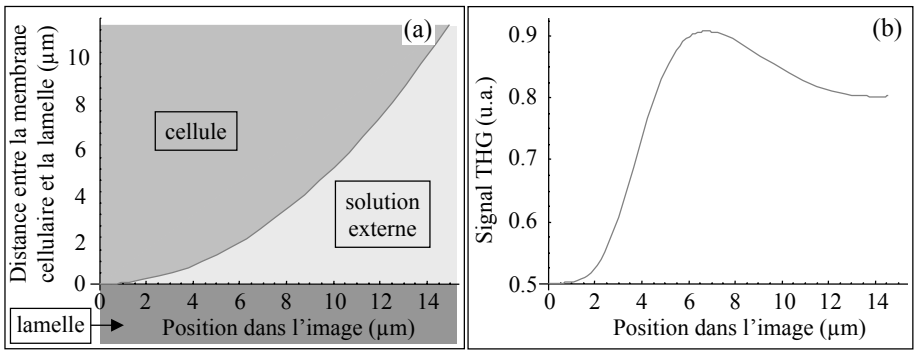


Fig. 3.19 – Détection homodyne du signal cellulaire en fonction de la distance à la lamelle.
(a), géométrie considérée, correspondant à une cellule sphérique de 20 µm de diamètre. (b), signal THG calculé, pour des valeurs arbitraires des différents $\chi^{(3)}$. Le signal THG est très sensible à la distance entre le corps cellulaire et la lamelle et mime bien le profil obtenu pour des cellules réelles (figure 3.21).

Nous avons tout d'abord testé cette hypothèse en mesurant le signal obtenu au niveau d'une lamelle de microscope recouverte d'une solution de concentration calcique variable (figure 3.20).

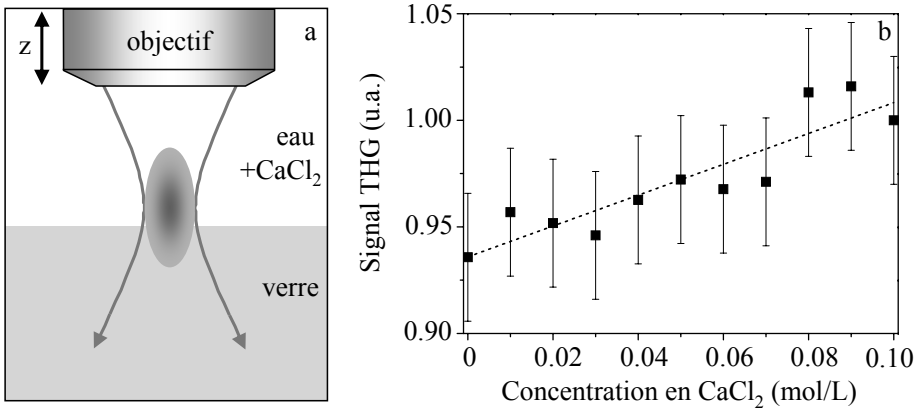


FIG. 3.20 – ÉTALONNAGE DE LA DÉTECTION HOMODYNE SUR UNE LAMELLE DE MICROSCOPE EN VERRE.
(a), dispositif expérimental : le point de focalisation du faisceau est balayé selon la direction z et le maximum de la courbe obtenue, quand le point focal est centré sur l'interface, est reporté sur la courbe b. (b), Variation du signal maximum obtenu à l'interface solution/verre en fonction de la concentration en chlorure de calcium. Les barres d'erreurs ont été estimées à partir des fluctuations moyennes entre deux mesures différentes pour chaque point. Courbe en traits pointillés : ajustement linéaire.

La modification du signal au niveau de la lamelle est de faible amplitude (de l'ordre de 5%). Ceci justifie l'hypothèse de l'équation 3.9, confirmée par le comportement approximativement linéaire du signal THG avec la concentration calcique. Ainsi, par rapport à l'expérience précédente, on peut observer une variation du signal pour une concentration de l'ordre de 20 à 50 mmol/L. Cependant, la variation de signal correspondante (de l'ordre de 1-3% du signal) est de l'ordre de l'incertitude sur les valeurs mesurées (due entre autres aux fluctuations du faisceau excitateur), ce qui la rend très difficile à séparer du bruit.

Nous avons ensuite cherché à détecter ces variations au niveau de la membrane plasmique d'hépatocytes de rat cultivés pendant quelques heures sur une lamelle recouverte de collagène, ceci afin d'améliorer l'adhésion des cellules sur la lamelle. Les hépatocytes sont obtenus par digestion partielle par une collagénase d'un foie de rat adulte fraîchement sacrifié [138]. Une image typique de l'échantillon est présentée sur la figure 3.21 - a. Comme le plan imagé se situe au niveau de la lamelle, les corps cellulaires des hépatocytes sont au dessus de l'image. Du fait de l'homodynage avec le signal de la lamelle, le bord des cellules apparaît très intensément tandis que l'intérieur apparaît sombre (figure 3.19).

Les hépatocytes ont été montés successivement dans des milieux contenant 0.1, 20 puis 50 mmol/L de chlorure de calcium[12]. Aucune variation significative de signal n'a été détectée entre les images acquises pour les deux premières concentrations. Lors du passage de 20 à 50 mmol/L, le signal global obtenu sur l'image augmente, notamment à l'interface verre/solution et dans la

[12]afin de limiter les processus induits dans les cellules au moment de l'ajout de calcium, nous avons choisi de modifier la concentration de calcium *à l'extérieur* de l'échantillon. Ainsi, nous pouvons maîtriser la concentration précise en calcium et avoir accès à une gamme de variation beaucoup plus large.

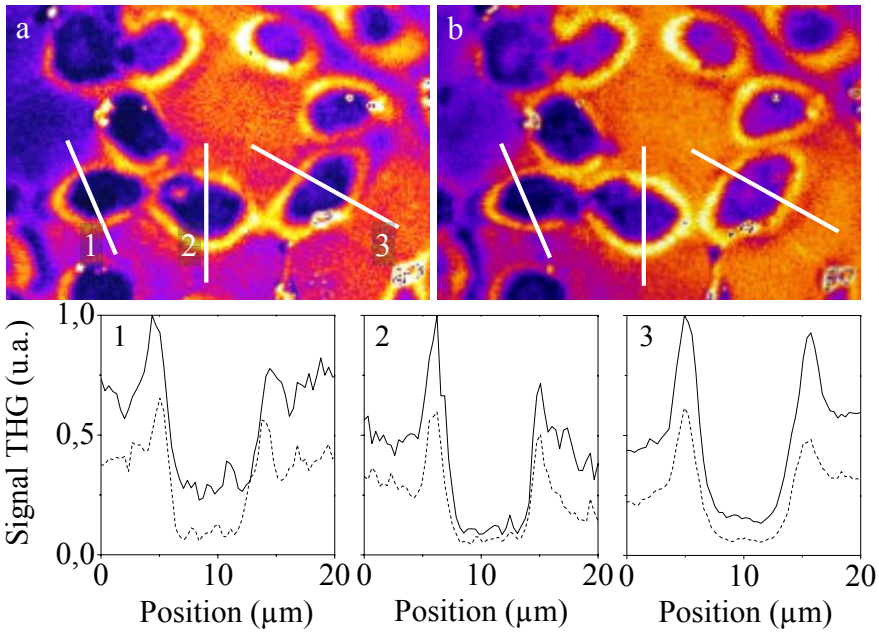


FIG. 3.21 – DÉTECTION HOMODYNE DU CALCIUM SUR DES HÉPATOCYTES EN CULTURE.
Images d'hépatocytes collés sur une lamelle de verre dans une solution physiologique contenant 20 mmol/L de calcium (a), puis 50 mmol/L de calcium (b). Les profils d'intensité pour les trois traits dessinés sur les images sont représentés en pointillés pour l'image a et en traits pleins pour l'image b.

zone d'homodynage. L'augmentation au niveau de l'interface verre/solution, déjà observée sur la figure 3.20, est la même sur les trois courbes (on trouve un facteur 1.8 environ). Comme elle est d'amplitude comparable au signal de la lamelle, on sort de la zone de validité de l'équation 3.9 et la variation d'amplitude est plus importante que ne le prévoit la régression linéaire de la figure 3.20[13]. Par contre, les changements de signal dans la zone d'homodynage sont très irréguliers, variant d'un facteur 1.4 à un facteur 2.1 selon les zones observées. Il est donc impossible de relier ce changement de façon quantitative aux variations de calcium en solution.

En fait sur les deux images présentées, on voit que la forme des cellules change lors de l'ajout de calcium : la distance entre les deux pics d'homodynage présents sur les courbes de la figure 3.21 (1 et 2 notamment) varie significativement. Les conditions d'interférence entre le signal cellulaire et celui de la lamelle changent donc fortement. Ceci est confirmé par les changements d'intensité très hétérogènes observés dans la zone des corps cellulaires. Cette observation n'est pas surprenante du point de vue biologique car la signalisation calcique joue un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette cellulaire, par exemple dans le cas de la plasticité neuronale. De plus les doses de calcium que nous avons utilisé dans ces expériences sont énormes par rapport aux variations physiologiques intracellulaires (de l'ordre de la centaine de µM).

[13]Il est possible qu'une partie de cette variation soit liée à un léger changement du plan de focalisation au moment de l'ajout de calcium. Ce facteur devrait cependant être faible car on avait pris soin de se placer au départ à la position axiale où le signal était le plus important.

En conclusion, nous nous sommes placés dans une géométrie similaire à celle présentée dans les références [94,95,96], et nous montrons que les variations de signal observées sont essentiellement attribuables à un changement de géométrie des cellules, auquel la THG, comme nous l'avons étudié dans le chapitre précédent, se révèle très sensible. Dans ce contexte, il est nécessaire de rester très prudent quand à la possible utilisation de la THG comme sonde de la concentration de calcium, à la fois à cause de son manque de sensibilité et de son manque de sélectivité, et à cause de la présence d'artéfacts dûs à des modifications de la géométrie de l'échantillon. Comme nous le verrons dans la section 3.2.2.2, la situation peut être tout à fait différente si la longueur d'onde d'excitation utilisée est proche d'une résonance de la molécule utilisée, mais dans le cas du calcium, ceci ne se produit pas pour une excitation dans la fenêtre de transparence des tissus (définie à la section 1.3.3, page 20).

Les mesures de susceptibilités du troisième ordre présentées dans cette partie nous ont permis d'écarter certaines hypothèses quand à l'origine du signal THG dans des échantillons biologiques. Nous allons maintenant tirer parti de ces résultats pour identifier des structures donnant effectivement un fort signal en microscopie THG dans la région [1.06 µm,1.26 µm].

3.2 Identification des structures biologiques donnant un fort signal THG

La partie précédente a permis d'établir que les structures donnant un fort signal THG ont probablement une composition très différente du milieu aqueux environnant, et notamment ne contiennent pas (ou peu) d'eau. Ceci élimine d'emblée de nombreuses organelles telles que des endosomes, et restreint notre champ d'investigation. A partir de ces constatations, nous avons identifié différentes structures visibles (selon les échantillons) sur des critères morphologiques par exemple. Dans cette section, nous présentons ces différentes structures qui fournissent la majeure partie du signal THG.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés dans la première partie de cette section aux corps lipidiques, présents dans de nombreux tissus, et qui présentent des propriétés optiques très différentes de celles des milieux aqueux, comme le montre le paragraphe 3.2.1. La deuxième sous-section (3.2.2) est quant à elle consacrée à d'autres types de structures, plus spécifiques de tissus particuliers, qui peuvent également fournir un signal important.

3.2.1 Les corps lipidiques

La visualisation des corps lipidiques en microscopie est délicate car ces organelles, qui ne présentent généralement pas d'autofluorescence[14], sont des objets dont la structure est assez fragile et résiste mal à la fixation (les lipides sont solubles dans l'alcool) et au marquage (les marqueurs fluorescents couramment utilisés ont tendance à favoriser l'agrégation des corps lipidiques [139]). Or, jusqu'à récemment, il n'existait pas de technique permettant de visualiser sans marquage les corps lipidiques.

[14] A quelques exceptions près comme on le verra dans la section 3.2.1.3 dans le cas des gouttelettes de surfactant pulmonaire.

Récemment, le groupe de S. Xie a montré [140] qu'il était possible grâce à la microscopie CARS de visualiser sélectivement les corps lipidiques *in vivo* et sans marquage, en excitant spécifiquement la vibration symétrique du groupement $-CH_2$ autour de $2850\,cm^{-1}$ ou celle du groupement C-H aliphatique. Cette visualisation reposant sur un contraste chimique, elle est très spécifique et permet également d'analyser la composition des objets visualisés [72]. Cependant, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.2.4.4 (page 18) du chapitre 1, la microscopie CARS présente l'inconvénient d'être difficilement compatible avec d'autres techniques de microscopie non linéaire telles que la microscopie 2PEF.

Nous montrons dans cette section que la microscopie THG permet, dans de nombreux tissus et organismes, de visualiser sélectivement les corps lipidiques en combinaison avec d'autres techniques telles que les microscopies SHG et 2PEF, ce qui permet d'obtenir simultanément des informations complémentaires.

Nous allons tout d'abord étudier les propriétés optiques de lipides autour de $1.18\,\mu m$, qui permettent d'expliquer cette spécificité que nous démontrerons dans un deuxième temps *in vivo* dans différents tissus.

3.2.1.1 Propriétés optiques des lipides

A l'aide du dispositif présenté dans la section 3.1.1.3, nous avons mesuré la susceptibilité non linéaire de plusieurs types de lipides (table 3.5)[15].

	α	$\chi^{(3)}_{mil}$	$\lvert\alpha_{mil}-\alpha_{eau}\rvert^2$	$\left\lvert\chi^{(3)}_{mil}-\chi^{(3)}_{eau}\right\rvert^2$
Eau	61.8 ± 3.6	1.68 ± 0.08	0	0
Eau + NaCl, 1mol/L	63.9 ± 4.2	1.79 ± 0.09	0.012	4.4
Triglycérides	83.7 ± 5.0	2.58 ± 0.5	0.8	480
Triglycérides + cholestérol, 1%	83.7 ± 5.0	2.58 ± 0.5	0.8	480
Huile végétale	90.0 ± 5.0	2.71 ± 0.5	1.1	795
Glycérol	85.2 ± 5.0	2.63 ± 0.5	0.9	550

TAB. 3.5 – SUSCEPTIBILITÉS NON LINÉAIRES DE DIFFÉRENTS LIPIDES comparées à celle de l'eau et d'une solution saline. Longueur d'onde d'excitation : 1180 nm. Les valeurs obtenues pour des triglycérides purs et pour un mélange triglycérides/cholestérol sont identiques compte tenu de la précision de l'expérience. α et $\chi^{(3)}$ sont exprimées en $10^{-22}m^2V^{-2}$.

Ceux-ci permettent d'expliquer la spécificité de la visualisation des corps lipidiques en imagerie THG : en effet, contrairement aux différentes solutions aqueuses qui ont été étudiées dans la section précédente, les solutions lipidiques ont des propriétés non linéaires très différentes de

[15]Les valeurs des indices linéaires, mesurées ou tabulées, sont présentées en annexe D.

celles de l'eau. On s'attend ainsi (table 3.5) à ce que le contraste obtenu au niveau d'un corps lipidique dans un environnement aqueux soit environ deux ordres de grandeur supérieur à celui obtenu à une interface entre de l'eau pure et une solution saline molaire.

Par contre, il apparaît également que les différences obtenues entre des types variés de lipides (triglycérides (Sigma), huile végétale, triglycérides mélangés à du cholestérol) sont faibles, voire indétectables : contrairement au cas de la microscopie CARS, il est donc impossible d'exploiter le signal THG pour remonter à la composition chimique des corps lipidiques. La microscopie THG sera donc plus adaptée pour visualiser les propriétés géométriques (taille, répartition dans l'organe ou la cellule) ou dynamiques de ces objets.

3.2.1.2 Visualisation et marquage dans des hépatocytes

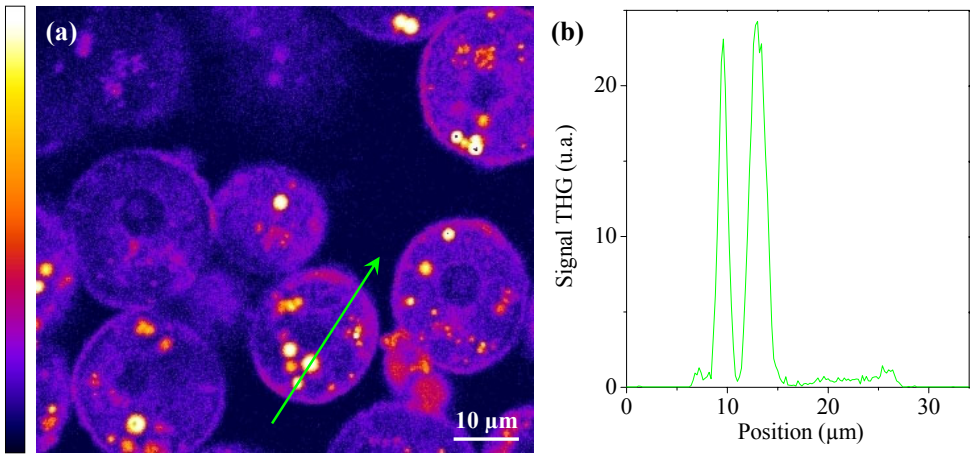


FIG. 3.22 – HÉPATOCYTES FRAÎCHEMENT ISOLÉS EN MICROSCOPIE THG.
(a), les cellules en suspension dans du liquide physiologique présente des structures très brillantes correspondant aux corps lipidiques du cytoplasme. L'échelle de couleur est présentée à gauche de l'image. Le contraste de l'image a été modifié afin de faire ressortir les structures donnant un faible signal (cytoplasme, membrane plasmique). (b), profil le long de la ligne dessinée sur l'image (a), à partir des données brutes. Paramètres pour l'acquisition de l'image : longueur d'onde d'excitation, 1180 nm, puissance moyenne sous l'objectif, 90 mW, ouverture numérique d'excitation 0.9, durée des impulsions, 250 fs, temps d'acquisition, 1.2 s. Signal détecté en transmission.

Le foie, organe de stockage et de régulation de la glycémie dans l'organisme, est un tissu riche en lipides. Les cellules hépatiques (ou hépatocytes) comportent des corps lipidiques répartis dans le cytoplasme et dont la taille peut atteindre plusieurs microns [141]. Il s'agit donc d'un bon modèle pour démontrer la visibilité des corps lipidiques *in vivo*.

Visualisés en microscope THG, des hépatocytes fraîchement isolés (figure 3.22-a) présentent effectivement des structures donnant un signal très intense[16], typiquement 20 à 100 fois plus

[16]Dans les conditions d'imagerie précisées sur la figure 3.22, le signal provenant des corps lipidiques est de l'ordre de 20-30 photons par µs, soit à peu près un photon toutes les 2-3 impulsions : on est proche de la saturation du photomultiplicateur.

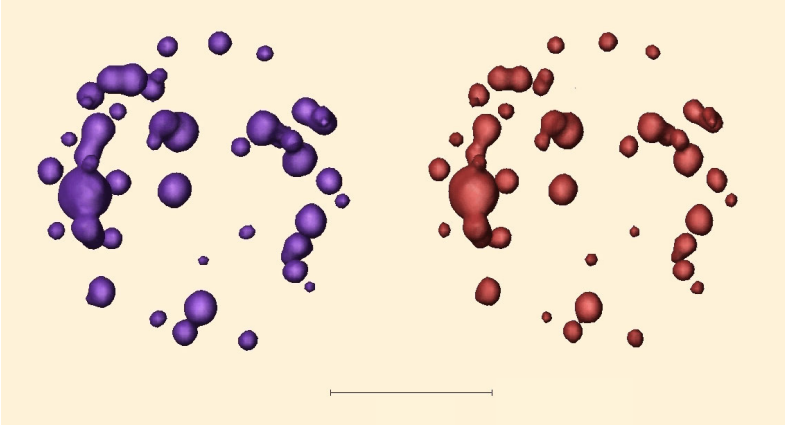


FIG. 3.23 – CONFIRMATION DE LA SOURCE DU SIGNAL THG.
Reconstruction tridimensionnelle d'un hépatocyte visualisé en THG (à gauche) et en 2PEF après marquage par du Nile Red (à droite). La reconstitution a été obtenue à partir d'un seuillage de l'image, ce qui explique les différences de taille de certaines structures entre les deux images. Barre d'échelle, 10 µm. Paramètres pour l'acquisition des images : longueur d'onde d'excitation, 1180 nm, puissance moyenne sous l'objectif, 90 mW, ouverture numérique d'excitation 0.9, durée des impulsions, 250 fs, durée d'acquisition, 0.6 s par plan et 25 s pour l'image totale.

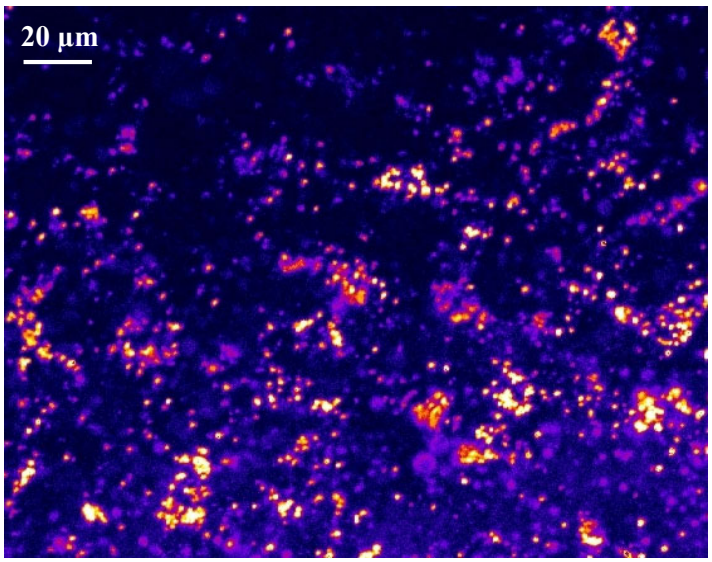


FIG. 3.24 – VISUALISATION DES CORPS LIPIDIQUES DANS UN LOBE ENTIER PERFUSÉ.
Foie de rat fraîchement excisé visualisé en microscopie THG autour de 1180 nm. Les corps lipidiques sont visibles dans l'ensemble du tissu. Projection de 30 images séparées de 2 µm. Temps d'acquisition : 4 s par plan, 2 min pour l'image complète.

élevé que les autres structures dans la cellule (figure 3.22-b).

Afin de vérifier l'origine des signaux obtenus, nous avons effectué un marquage des corps

lipidiques avec un colorant, Nile Red, spécifique de ces structures et efficacement excité à deux photons autour de 1.18 µm [142]. Le spectre de fluorescence s'étendant autour de 600-650 nm, il est facile de séparer spectralement ce signal de celui de troisième harmonique. Nous avons donc effectué simultanément, sur des hépatocytes fixés et marqués (voir appendice E), une détection en transmission du signal THG et en épidétection du signal de fluorescence à deux photons (figure 3.23). La très bonne corrélation entre les deux images confirme l'hypothèse selon laquelle les corps lipidiques sont bien la source principale du signal obtenu dans le tissu hépatique.

Le signal obtenu étant très intense, il est également possible de détecter le signal des corps lipidiques dans un lobe hépatique intact (figure 3.24) ; comme nous l'avons vu à la fin du chapitre 2 (page 84), il est cependant nécessaire de travailler sur tissu perfusé afin que le rayonnement harmonique ne soit pas réabsorbé par le sang, très absorbant autour de 400 nm.

3.2.1.3 Autres exemples

Les corps lipidiques sont également détectables dans de nombreux autres tissus, dont nous allons présenter ici quelques exemples.

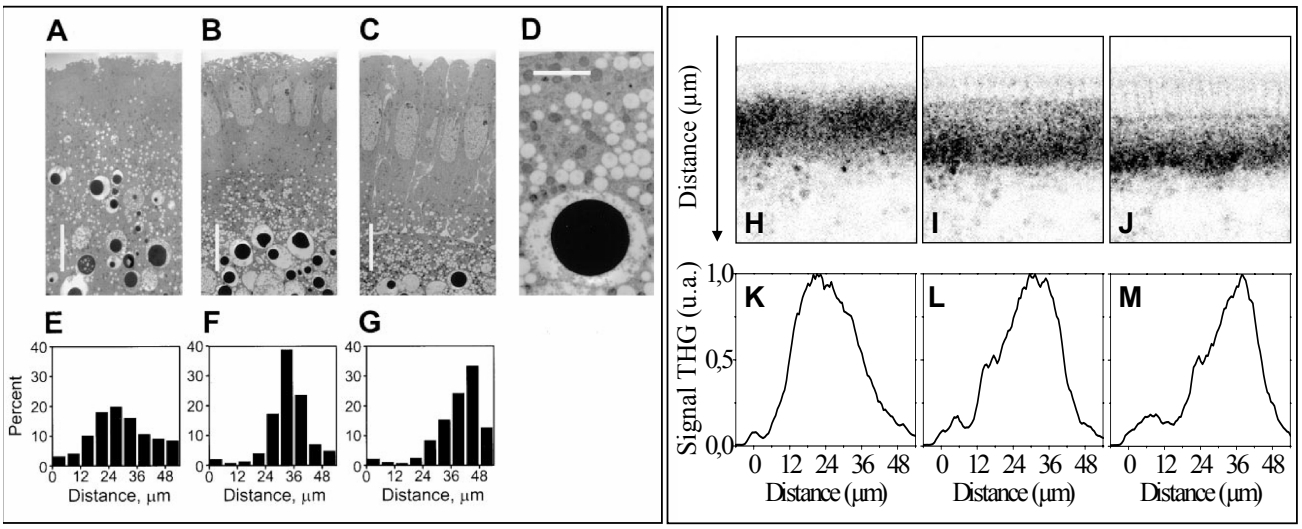


Fig. 3.25 – Répartition du signal THG selon les stades de développement d'un embryon de drosophile. Images de microscopie électronique du bord d'un embryon aux stades 4 (A) et 5 ((B), début de cellularisation, (C), fin de cellularisation). Barre d'échelle, 10 µm. Pour la description des stades du développement, voir chapitre 4 et référence [143]. Sur l'image (D) (zoom), on distingue les gouttelettes lipidiques en blanc, une vésicule du vitellus (grosse, centre noir) et des mitochondries (en noir). Barre d'échelle, 2.5 µm. Sur ces quatre images, la membrane vitelline (apical) est en haut et le yolk (basal) en bas. (E-G), histogramme de la position des gouttelettes aux différents stades selon l'axe apico-basal. (H-J), images équivalentes aux images (A-C) en microscopie THG sur embryon vivant. Longueur d'onde d'excitation : 1180 nm ; ouverture numérique : 0.9. (K-M), profil du signal selon l'axe apico-basal. On distingue, en plus du signal des gouttelettes, celui de la membrane vitelline et la position du front de cellularisation (section 4.3, page 157).

a Dans les embryons de drosophile Dans les embryons de drosophile aux premiers stades de développement, les corps lipidiques sont présents sous la forme de gouttelettes dont le diamètre est de l'ordre de 500 nm. Ces gouttelettes sont ségrégées dans une région comprise entre les noyaux des cellules en formation et le vitellus (figure 2.38, page 69 et chapitre 4). Cette ségrégation est maintenue par un trafic actif des vésicules, liées à un moteur moléculaire, la dynéine [144].

Les images de microscopie THG des embryons de drosophile à ce stade présentent une zone de fort signal au niveau de la région où les gouttelettes lipidiques sont localisées. Afin de confirmer que le signal THG provient bien de ces structures lipidiques, nous avons tout d'abord vérifié que la répartition du signal THG dans l'embryon était analogue à celle des corps lipidiques aux différents stades de développement. Celle-ci a été quantifiée par microscopie électronique [144]. La figure 3.25 compare les résultats obtenus à ceux de la référence précédente : on constate que la répartition du signal THG selon l'axe apico-basal suit effectivement celle des gouttelettes.

Cependant la figure 3.25-D montre que d'autres structures pouvant a priori donner un signal, comme des mitochondries, sont également présentes dans cette région de l'embryon. Afin d'attribuer plus précisément le signal THG aux corps lipidiques, nous avons réalisé un marquage Nile Red, visualisé comme précédemment par microscopie 2PEF. La colocalisation obtenue confirme l'origine présumée du signal (figure 3.26-b).

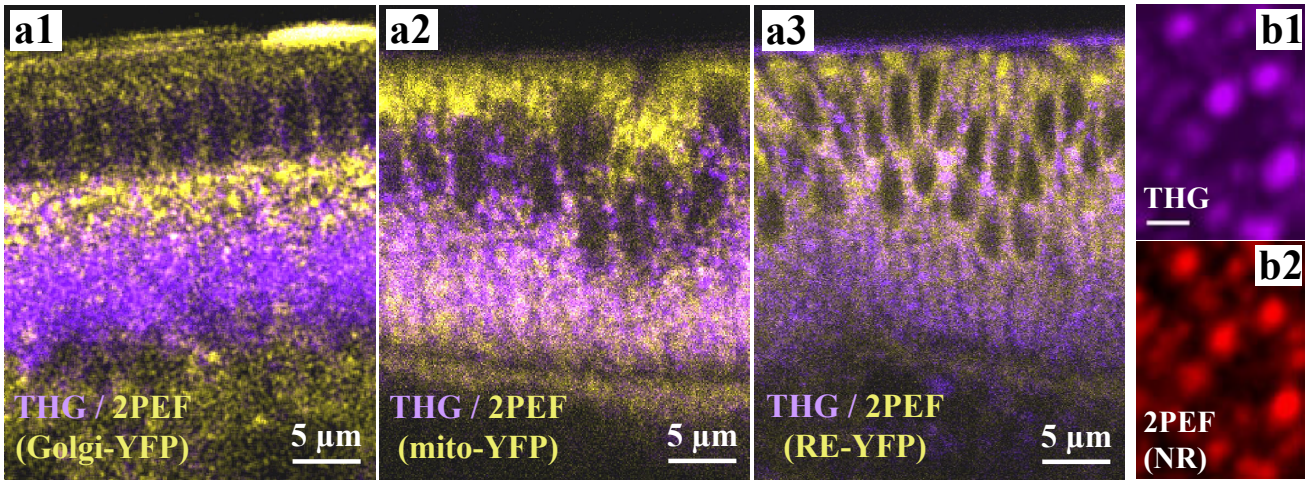


Fig. 3.26 – Caractérisation du signal obtenu en microscopie THG. (a), images combinées THG (violet) et fluorescence à deux photons de la protéine YFP (jaune). La protéine est localisée dans l'appareil de Golgi (a1), les mitochondries (a2) et le réticulum endoplasmique (a3). Temps d'acquisition : 1 s par image. (b), images THG (b1) et fluorescence à deux photons (b2) du Nile Red dans des embryons fixés et marqués (voir appendice E), démontrant la colocalisation des deux signaux. Barre d'échelle, 2 µm. Temps d'acquisition, 5 s. Toutes les images ont été obtenues pour une longueur d'onde d'excitation de 1.18 µm.

La membrane vitelline étant imperméable à la coloration, il est délicat de fixer et marquer les embryons sans perte des corps lipidiques (appendice E) ; le marquage obtenu est donc de moins bonne qualité que dans les autres tissus. Nous avons choisi de compléter cette caractérisation en visualisant en microscopie THG et 2PEF des embryons transgéniques exprimant une protéine

fluorescente jaune (YFP) excitable autour de 1.18 µm. Nous avons fait l'image de trois souches différentes, pour lesquelles la protéine est localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Bloomington, 7193), des mitochondries (Bloomington, 7194) et du réticulum endoplasmique (Bloomington, 7195). Les images combinées présentées sur la figure 3.26-a confirment que le signal ne provient pas de ces différentes organelles.

b Dans le poumon Dans le poumon, l'imagerie THG révèle des structures micrométriques localisées dans la région de la plèvre, au niveau de la surface du poumon. Deux types de structures lipidiques peuvent être à l'origine de ce signal : des corps lamellaires, impliqués dans les processus de sécrétion du surfactant tapissant les alvéoles pulmonaires [145], et des corps lipidiques stockant la vitamine A, qui sont notamment impliqués dans la formation des alvéoles pulmonaires [146]. La forte fluorescence à trois photons observée dans les vésicules présente un photoblanchiment rapide caractéristique du rétinol (vitamine A) [147, 148], ce qui suggère que le signal THG, peut-être exalté par résonance (voir section 3.2.2.2), provient plutôt du deuxième type de vésicules.

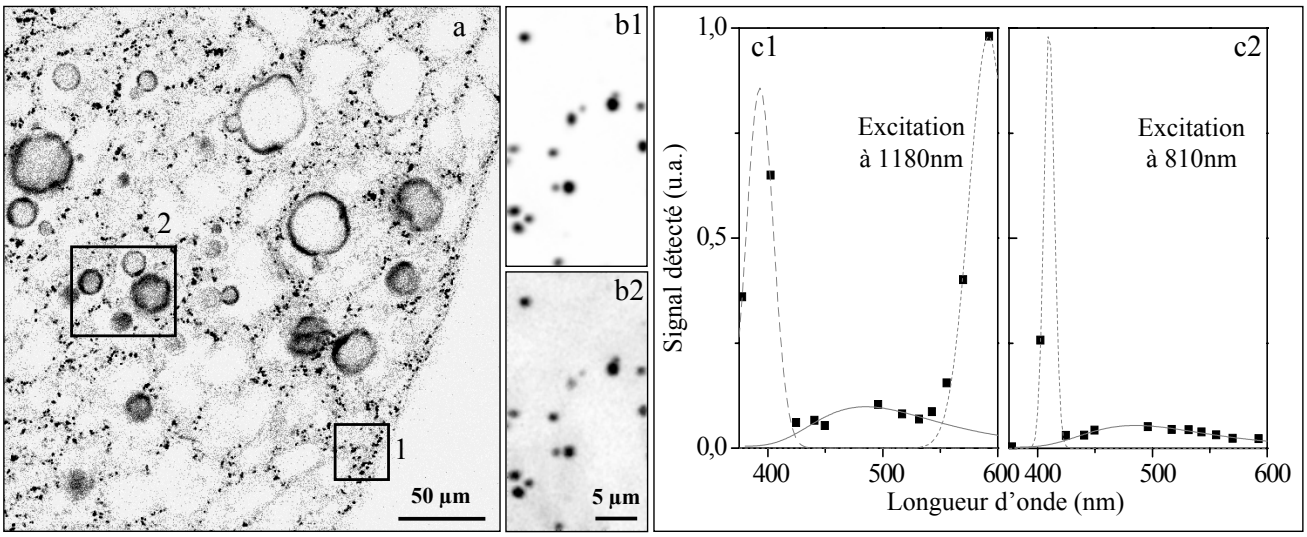


FIG. 3.27 – IMAGERIE DU POUMON EN MICROSCOPIE THG.
(a), image THG d'un poumon de souris entier, fraîchement excisé et lavé, environ 40 µm sous la surface de l'organe. Le signal provient principalement des corps lipidiques (carré 1) ainsi que des bulles d'air (carré 2), prisonnières des alvéoles, qui donnent un signal à peu près trois fois plus faible. Contraste inversé. (b), images de tissu frais, marqué au Nile Red, acquises simultanément en transmission (b1, THG, filtre interférentiel centré à 389 nm) et en épidétection (b2, 2PEF, filtre interférentiel 500-600 nm). Contraste inversé. Toutes les images ont été obtenues pour une longueur d'onde d'excitation de 1.18 µm. (c), spectre d'émission des corps lipidiques non marqués (carrés pleins) et spectres théoriques d'émission du rétinol (traits pleins), de la SHG (pointillés fins) et de la THG (tirets) pour une excitation à 1.18 µm (c1) et à 810 nm (c2).

Afin de confirmer la nature de ces structures, nous avons mesuré leur spectre d'émission à deux photons (excitation autour de 810 nm, figure 3.27-c1) et à trois photons (excitation autour

de 1180 nm, figure 3.27-c2). Le blanchiment du chromophore étant très rapide, nous avons mesuré le spectre sur un petit nombre de points en épicollection, tout en enregistrant la totalité de la fluorescence émise en transmission pour normaliser la valeur obtenue. Le spectre mesuré est proche de celui du rétinol, bien qu'il ne soit pas assez précis pour identifier avec certitude le chromophore mis en jeu. Le signal SHG présent sur les spectres provient du collagène fibrillaire de la plèvre, et produit un pic à la longueur d'onde moitié de la longueur d'onde d'excitation (paragraphe 3.3.4-b).

Finalement, nous avons confirmé la nature lipidique des structures visualisées en microscopie THG par un marquage Nile Red dont la fluorescence est bien colocalisée avec le signal de troisième harmonique (figure 3.27-b).

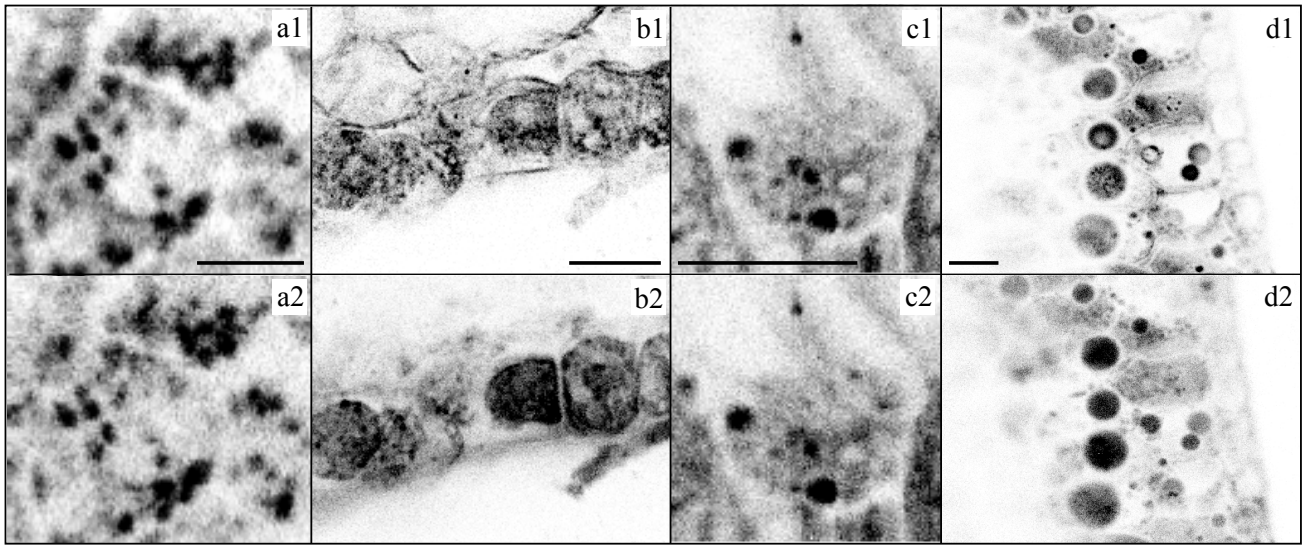


FIG. 3.28 – IMAGERIE DE DIFFÉRENTES GRAINES EN MICROSCOPIE THG.
Images simultanées en microscopie THG (1) et 2PEF du Nile Red (2) de graines d'*Arabidopsis* (a), soja (b), luzerne (c) et colza (d). Barres d'échelle, 5 µm (a) et 20 µm (b,c et d). Longueur d'onde d'excitation, 1180 nm. Pour les protocoles de marquage, voir appendice E.

c Dans les plantes Nous avons également cherché à observer les corps lipidiques dans les graines de différentes plantes, où ces structures ont un rôle central dans le développement. La figure 3.28 présente les images obtenues en microscopie THG et 2PEF (marquage Nile Red) dans différentes graines : *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* (luzerne), *Brassica napus* (colza) ou encore *Glycine max* (soja). La quantité et la taille des corps lipidiques varient en fonction du type de graine : le colza, par exemple, est particulièrement riche en lipides, tandis que le soja en contient très peu. On retrouve ces caractéristiques sur les images de microscopie THG : elles montrent des structures nombreuses et de taille importante (2-15 µm de diamètre) dans le colza, beaucoup plus petites (en dessous de la limite de résolution) et moins nombreuses pour le soja. De plus, les structures donnant un signal THG sont marquées par Nile Red, ce qui confirme leur nature lipidique.

Note : afin d'éviter leur dessèchement, il est courant de monter ce type d'échantillon dans un mélange eau/glycérol. Dans ce cas, il y a une adaptation d'indice entre le milieu extérieur et les corps lipidiques et en conséquence, le signal de troisième harmonique qui en provient disparaît (voir table 3.5). Ceci est à rapprocher de l'utilisation du glycérol comme agent de transparence (optical clearing) dans les tissus. Il est donc important pour l'imagerie THG des corps lipidiques de se placer en milieu aqueux.

3.2.1.4 Conclusion

Nous avons montré que la microscopie THG détecte sélectivement les corps lipidiques micrométriques dans une grande variété de tissus et d'organismes. Cette bonne sélectivité permet, comme nous le discuterons dans la section 3.3, d'envisager de nombreuses applications de cette technique en biologie.

Cependant, cette sélectivité repose essentiellement sur un contraste structural plus que chimique : il existe donc des cas où d'autres structures peuvent également donner un fort signal THG. Afin de mieux définir les domaines d'application de la microscopie THG comme technique d'imagerie des corps lipidiques, nous avons recherché les autres types de structures donnant un fort signal de troisième harmonique.

3.2.2 Autres structures visibles en microscopie THG

Jusqu'ici nous avons montré que deux conditions distinctes étaient nécessaires pour obtenir un signal important en microscopie par génération de troisième harmonique :

- d'une part, il faut que les structures observées aient une taille comparable à celle du volume focal. Si l'on cherche à visualiser des corps lipidiques de petite taille (100-300 nm), leur signal sera plus faible et donc plus proche de celui d'autres structures.
- d'autre part, il faut que les propriétés optiques des structures observées soient très différentes de celles du milieu environnant.

Ceci peut se produire par exemple dans le cas de structures très denses (paragraphe 3.2.2.1) ou dans le cas de molécules dont la polarisabilité non linéaire est exaltée par la proximité de résonances à un, deux ou trois photons (paragraphe 3.2.2.2).

3.2.2.1 Structures solides amorphes ou cristallines

La génération de troisième harmonique par des structures denses a initialement été décrite par Oron *et al.* [91, 92], dans le cas de spicules d'oursin (structures cristallines composées de calcite) ou de cystolithes (agrégats calcaires, amorphes, que l'on peut trouver dans les feuilles de certains arbres). Ces structures à base de carbonate de calcium produisent un contraste important du fait de leur densité et éventuellement, dans le cas des structures cristallines, du fait de leur biréfringence qui peut permettre d'obtenir l'accord de phase dans l'échantillon (figure 3.29-a).

On peut étudier la structure de ces objets en s'intéressant à la polarisation de l'onde harmonique obtenue en différents points : les auteurs montrent qu'ils peuvent par cette méthode cartographier les directions privilégiées de différents biocristaux.

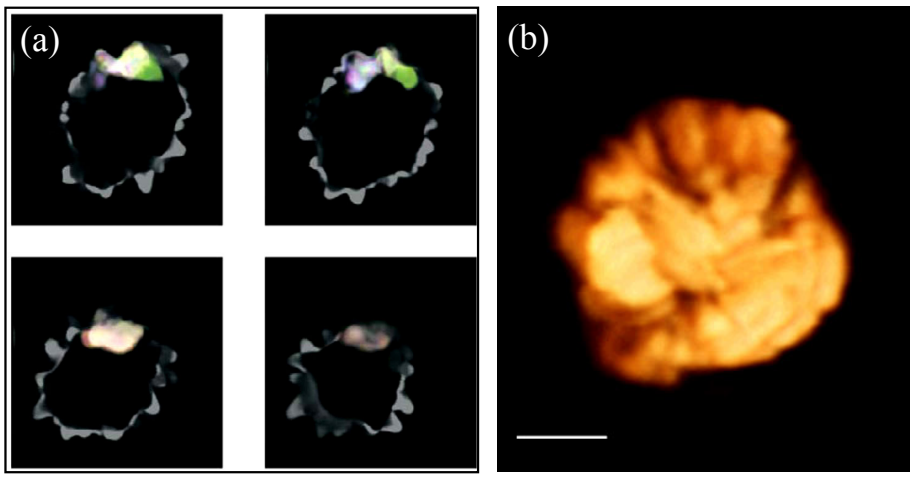


FIG. 3.29 – IMAGERIE DE CONCRÉTIONS CALCIQUES EN MICROSCOPIE THG.
(a), images d'un cystolithe extraites de la référence [92]. Chaque image a une taille de 70 µm × 70 µm. L'image en noir et blanc du signal THG a été superposée à une image en couleur résolue en polarisation. (b), reconstitution tridimensionnelle d'un otolithe de poisson-zèbre âgé de 48h. Barre d'échelle, 10 µm. Longueur d'onde d'excitation, 1180 nm. Temps d'acquisition, 350 ms par plan et 18 s pour l'image 3D.

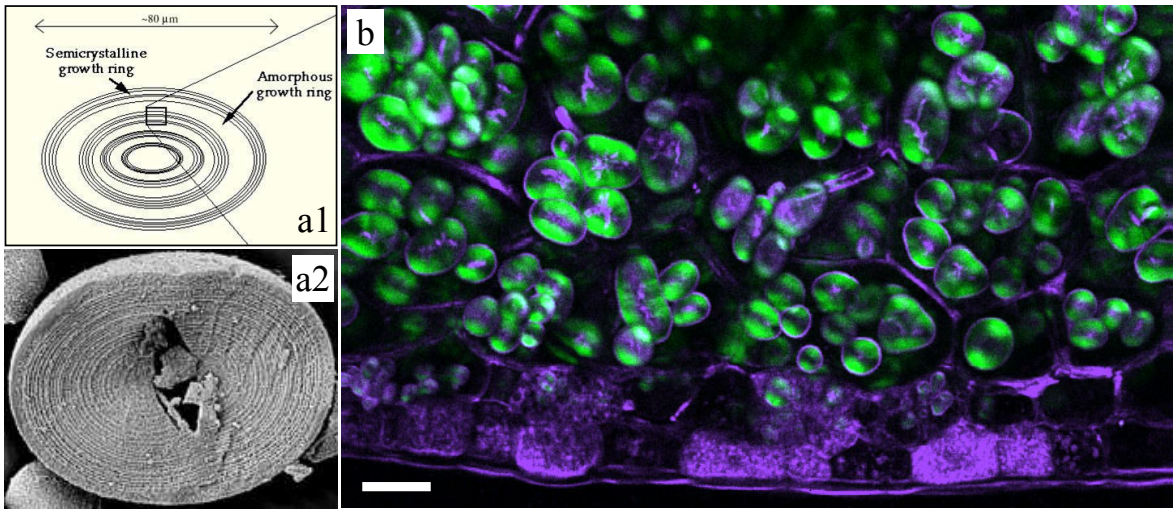


FIG. 3.30 – GRANULES D'AMIDON EN MICROSCOPIE MULTIPHOTONIQUE.
Structure (a1) et image de microscopie électronique (a2) d'un granule d'amidon en coupe. Images adaptées du site : www.cheng.cam.ac.uk/research/groups/polymer/RMP/nitin/Starchstructure.html. (b), image combinée SHG (vert) et THG (violet) du bord d'une graine de soja [40]. Au bord, la THG révèle la présence de corps lipidiques tandis que vers le centre, le signal provient principalement de granules d'amidon dont la structure semi-cristalline permet la création d'un important signal de seconde harmonique [60]. Nous avons également observé un fort signal de troisième harmonique au bord des granules et au niveau de leur craquelure centrale. Barre d'échelle, 25 µm. Longueur d'onde d'excitation, 1180 nm. Temps d'acquisition, 3.7 s.

De même, nous avons observé l'émission de troisième harmonique par un otolithe présent dans l'oreille interne de la larve de poisson-zèbre (figure 3.29-b). L'otolithe est une concrétion calcique semi-cristalline, servant à l'équilibration du poisson[17].

Finalement dans les plantes, on détecte dans les tissus qui en contiennent (graines, germes) les contours des granules d'amidon qui forment des structures semi-cristallines concentriques avec une craquelure centrale. Encore une fois, nous avons expliqué ce contraste par la forte densité de ces structures.

3.2.2.2 Structures exaltées par résonance

Dès 2002, Yelin *et al.* [149] montrent que les structures visibles dans les images obtenues par microscopie de troisième harmonique dépendent de la longueur d'onde d'excitation : en comparant l'image d'une cellule pour des longueurs d'onde excitatrices de 1500, 1230 et 810 nm, les auteurs soulignent que certaines organelles ne sont visibles que pour la troisième longueur d'onde[18]. Plus récemment, Clay *et al.* [99] ont montré sur la gamme de longueur d'onde du laser titane-saphir que les variations des susceptibilités $\chi^{(3)}$ de nombreuses molécules étaient corrélées à leurs spectres d'absorption à un, deux ou trois photons, ce qui suggère une forte influence des résonances sur l'efficacité de création du signal THG.

Dans de nombreux tissus, on peut détecter un signal important de structures qui présentent une absorption à deux ou trois photons dans la gamme de longueur d'onde considérée. Barzda *et al.* [100] étudient dans des cardiomyocytes le signal THG provenant des mitochondries pour une excitation à 810 ou 1064 nm. Les auteurs attribuent la présence de ce signal à la structure quasi-cristalline des protéines dans la membrane des mitochondries, mais les bandes d'absorption autour de 400 nm des hémoprotéines qu'elles contiennent peuvent également être un facteur d'exaltation, comme le montrent les mesures réalisées par Clay *et al.* sur l'hémoglobine [99].

Pour notre part, nous avons détecté un fort signal THG dans des structures analogues, les plastes, présents notamment dans les tissus verts des plantes. Ces structures sont elles aussi très organisées et contiennent des pigments tels que la chlorophylle (pour les chloroplastes)[19], très absorbante autour de 400 nm et émettant une fluorescence intense autour de 650-700 nm (voir figure 3.31). L'absorption vers 400 nm (résonance à trois photons) et l'organisation cristalline de la chlorophylle expliquent l'existence d'un fort signal THG, que l'on peut détecter en même temps que la fluorescence des chloroplastes qui est facilement excitable à 1.18 µm.

En illuminant un ensemble de plastes de façon répétitive, on s'aperçoit que le signal THG s'atténue très rapidement alors que le signal de fluorescence décroît peu : il est probable que, via une absorption multiphoton de la chlorophylle, l'énergie déposée dans les plastes lors de l'imagerie induise une désorganisation de leur structure. Ceci implique qu'une partie du signal

[17] Pour la petite histoire, l'otolithe permet par ailleurs de déterminer l'age des poissons. En effet les concrétions calciques successives, déposées selon un rythme circadien, forment des cercles alternativement clairs et sombres : comme un tronc d'arbre, l'otolithe constitue donc une véritable archive biologique utilisée pour appréhender l'écologie des poissons...

[18] Notons qu'entre ces longueurs d'onde, la résolution de l'image change, ce qui peut aussi faire varier le signal relatif de différentes structures par des effets purement géométriques (chapitre 2).

[19] La situation est analogue pour les chromoplastes, qui ont une structure du même type et accumulent eux des pigments liposolubles de la famille des caroténoïdes.

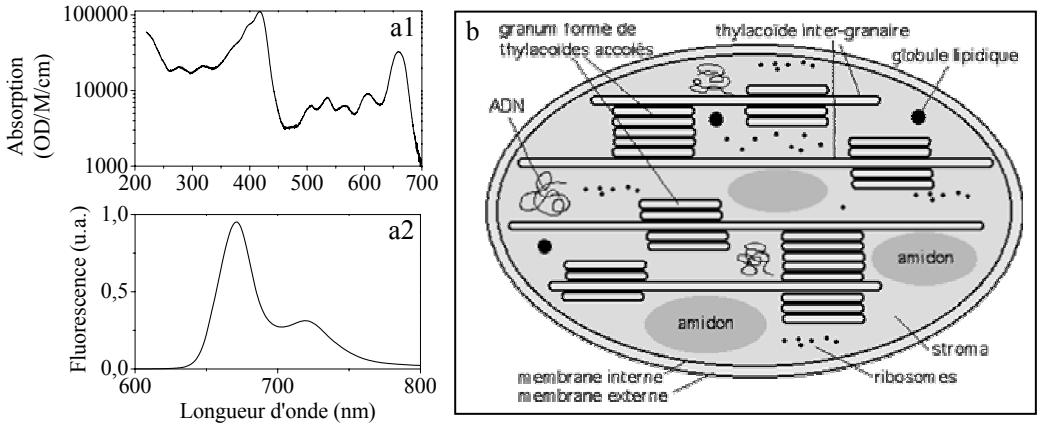


FIG. 3.31 – STRUCTURE DES CHLOROPLASTES ET PROPRIÉTÉS DE LA CHLOROPHYLLE.
(a1), spectre d'absorption et (a2), spectre d'émission de la chlorophylle. Source : http ://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD. (b), structure d'un chloroplaste. La chlorophylle est localisée dans les membranes des thylacoïdes. Figure adaptée de http ://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/index.html.

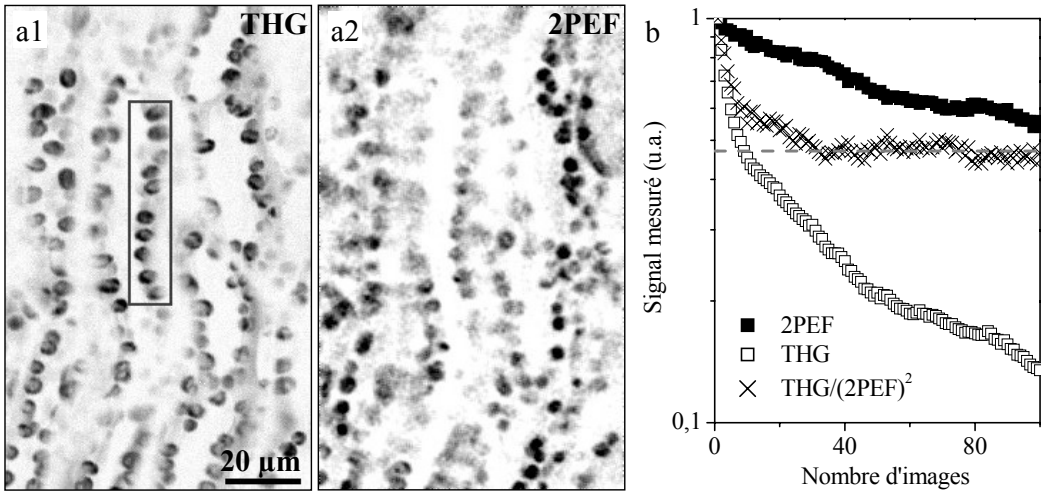


FIG. 3.32 – IMAGES DE CHLOROPLASTES EN MICROSCOPIE THG.
(a1), image THG et (a2), image de fluorescence de chloroplastes près de la nervure centrale d'une feuille d'*Arabidopsis*. Barre d'échelle, 20 µm. Temps d'acquisition, 1.6 s. Longueur d'onde : 1180 nm, ouverture numérique 0.6. (b), variation du signal total dans la zone encadrée sur la figure (a1) en fonction du nombre d'images effectuées : la courbe représentant le signal THG normalisé par le carré du signal de fluorescence décroît d'abord brusquement, indiquant que le signal THG chute plus vite que ne l'explique le blanchiment des molécules, probablement à cause de la désorganisation des structures du plaste. La courbe atteint ensuite un palier, qui indique que la chute du signal est alors corrélée au blanchiment.

THG est attribuable à l'organisation géométrique des pigments dans les plastes. Cependant après que le signal a chuté de moitié, sa diminution devient plus lente. Si l'on suppose que le signal de fluorescence varie avec le nombre de molécules non blanchies, le signal THG (cohérent) doit décroître comme le carré du signal de fluorescence, ce que l'on confirme expérimentalement (figure 3.32-b, croix).

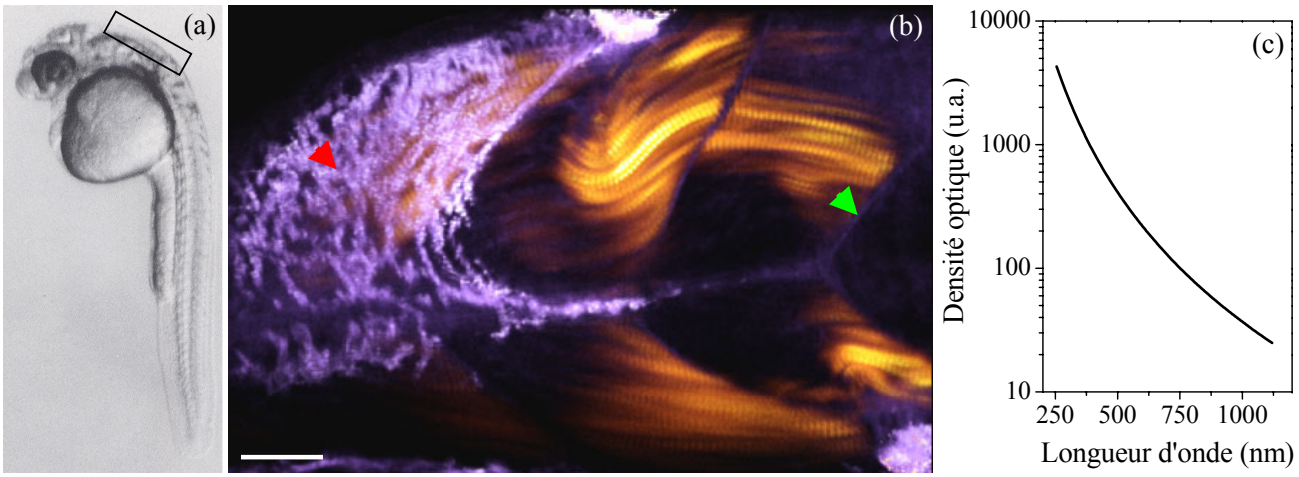


FIG. 3.33 – IMAGES DE MÉLANOSOMES EN MICROSCOPIE THG.
Image de microscopie THG (violet) et SHG (jaune) d'une larve de poisson-zèbre âgée de 48 h (b). Barre d'échelle, 20 µm, longueur d'onde d'excitation, 1180 nm, durée d'acquisition, 14 s par image et 2 min pour l'image complète (10 plans séparés de 2 µm). La zone imagée est représentée sur la figure (a) (image adaptée de [150]). Nous avons attribué le fort signal THG au niveau de l'épiderme aux mélanosomes (flèche rouge) du fait de la forte absorption de la mélanine à deux et trois photons. On détecte également un petit signal (environ un ordre de grandeur plus faible, flèche verte) au niveau de la bordure des muscles. L'absorption de la mélanine est illustrée sur la courbe (c) décrivant son spectre d'absorption à un photon dans la peau (source :http://www.omlc.ogi.edu/spectra/). La courbe est en unités arbitraires car la densité optique dépend beaucoup du type de tissu considéré.

Enfin, nous avons observé également un signal THG que nous avons attribué aux mélanosomes de la larve de poisson-zèbre. Les mélanosomes, vésicules lipidiques contenant la mélanine [151], sont responsables de la pigmentation de la peau chez les animaux. Chez le poisson-zèbre, cette pigmentation apparaît très tôt (figure 3.33-b, embryon âgé de 48 h). La forte absorption dans l'UV et le visible de la mélanine (figure 3.33-c) peut expliquer l'exaltation du signal THG détecté au niveau de l'épiderme.

Cette exaltation du signal THG a pour contrepartie des effets phototoxiques très importants : comme on l'a vu dans le cas des plastes, une importante absorption multiphotonique peut induire une désorganisation des structures, voire des effets photodestructifs plus importants dans les tissus [35, 82, 152, 153, 154]. Une des difficultés de la microscopie THG est qu'elle nécessite une forte intensité excitatrice (voir chapitre 1), ce qui fait qu'une absorption même modérée peut conduire à un important dépôt d'énergie dans l'échantillon. On verra au chapitre 4, section 4.3,

l'influence de l'absorption multiphotonique sur les dommages induits dans le cas de l'embryon de drosophile.

Ainsi, il est difficile en pratique d'exploiter ces exaltations, en particulier pour l'imagerie prolongée, sans induire de photodommages et il convient d'être très prudent sur les doses d'exposition des tissus.

3.2.3 Conclusion

En conclusion, nous avons vu dans cette section que les sources de contraste dépendent beaucoup des tissus étudiés et de la longueur d'onde d'excitation utilisée. On peut cependant résumer les propriétés des structures donnant un fort signal :

- elles ont une composition très différente du milieu environnant.

- elles sont généralement denses, voire semi-cristallines[20].

- leur susceptibilité non linéaire peut éventuellement être exaltée par la présence de résonances à un, deux ou trois photons.

Il faut enfin noter que la taille des structures mises en jeu influe également beaucoup sur leur visibilité : ainsi si l'on cherche à observer des structures de très petite taille (200nm ou moins) dans un environnement en contenant d'autres, plus grandes, on risque de perdre en sélectivité.

3.3 Applications en biologie

Nous allons finalement décrire les premières applications que nous avons démontrées en biologie, qui permettent d'envisager des applications ultérieures plus poussées. Nous nous attacherons tout d'abord à décrire les difficultés rencontrées pour visualiser les corps lipidiques dans les tissus, puis à montrer que la THG peut permettre la quantification (section 3.3.2) et l'étude de la dynamique (section 3.3.3) des corps lipidiques, ainsi que leur colocalisation avec d'autres structures dans l'échantillon par imagerie multimodale (section 3.3.4).

3.3.1 Contexte

L'une des difficultés majeures pour observer les corps lipidiques en microscopie est leur absence de fluorescence intrinsèque : ainsi, sans marquage, il est impossible de les détecter en microscopie de fluorescence linéaire ou non linéaire. Bien qu'il existe des marqueurs fluorescents spécifiques des corps lipidiques, tels que Nile Red [142] ou encore Oil Red O [139], le marquage exogène entraîne des inconvénients tels que la coalescence des petites structures. D'autre part, il peut être difficile de marquer des structures dans un organisme entier, voire vivant. Par exemple, la membrane vitelline de l'embryon de drosophile empêche la pénétration du colorant et ne peut être supprimée tout en préservant l'intégrité de l'embryon. De même, les colorants sont arrêtés par les membranes cellulosiques épaisses des cellules de plante et finalement, l'injection du colorant peut poser des difficultés en termes d'invasivité (embryon de drosophile par exemple).

[20]Bien que ce point n'ait pas été discuté, il existe également des structures lipidiques ayant une structure très organisée comme par exemple les corps lamellaires qui ont une structure en oignon.

Enfin, il existe des inconvénients inhérents à toutes les colorations : marquage non spécifique (par exemple des membranes cellulosiques), inhomogénéités de marquage, blanchiment du colorant lors d'une observation prolongée...

Or, les corps lipidiques sont des structures ubiquitaires complexes, associées à de nombreuses protéines, et interagissant avec de nombreux composants cellulaires [141, 155]. Ils jouent un rôle prépondérant dans le tube digestif [156], la peau [151], la glande mammaire [157] ou encore les plantes [141]. Les dysfonctionnements affectant leur régulation sont impliqués dans des maladies répandues telles que l'athérosclérose, le diabète ou la stéatose [158].

Du fait de leur difficulté d'observation, de nombreuses zones d'ombre persistent concernant leur formation, leur régulation et leur interaction avec le reste de la cellule. Dans ce contexte, la microscopie THG en tant que sonde des lipides fondée sur un contraste endogène peut devenir un outil important pour mieux caractériser la distribution en taille, la répartition dans le tissu ou encore la dynamique des corps lipidiques.

3.3.2 Quantification des corps lipidiques dans différentes conditions physiologiques

La THG peut tout d'abord permettre une analyse quantitative sans marquage des corps lipidiques dans différentes situations physiologiques. Pour le démontrer, nous avons fait l'image d'hépatocytes issus d'une part d'un foie de rat fraîchement isolé et d'autre part d'un foie de rat ayant subi 24 h auparavant une hépatectomie partielle. L'augmentation transitoire de la quantité de lipides dans le foie en régénération est connue [159] et participe au processus de régénération hépatique [160].

La figure 3.34 présente les résultats obtenus pour n=10 hépatocytes en régénération et n=17 hépatocytes témoins. Pour des gouttelettes dont la taille est supérieure à 500 nm (résolution latérale pour l'objectif 60x, 0.9NA utilisé), les images obtenues en microscopie THG permettent effectivement de quantifier non seulement le volume moyen occupé par le corps lipidiques dans la cellule, mais également leur répartition en taille qui influe sur la biodisponibilité des réserves lipidiques [141] : comme les interactions avec les protéines associées et le reste de la cellule se font au niveau de la surface de la goutte, la disponibilité dépend du rapport surface/volume et décroît lorsque le diamètre des corps lipidiques augmente.

Les résultats présentés ont été obtenus sur des cellules fixées (appendice E) mais la même analyse peut être effectuée sur des cellules vivantes en culture sans compromettre leur viabilité. Nous avons vérifié cette affirmation à partir de plusieurs tests :

- **Exclusion du bleu Trypan.** Le bleu Trypan est un colorant marquant spécifiquement les cellules dont l'intégrité des parois est altérée. L'exclusion du colorant est donc un test de la vitalité des cellules [161]. Des hépatocytes en cultures (Wif-B, lignée hybride présentant les caractéristiques structurales et fonctionnelles des hépatocytes [162]) ont été éclairées dans les mêmes conditions que celles des images de la figure 3.34. L'exclusion du Trypan 24 h plus tard dans des cellules illuminées et non illuminées est comparable et la division cellulaire est préservée (figure 3.35 - a et b).

- **Hydrolyse de la calcéine-AM.** La calcéine est une sonde de l'activité enzymatique de

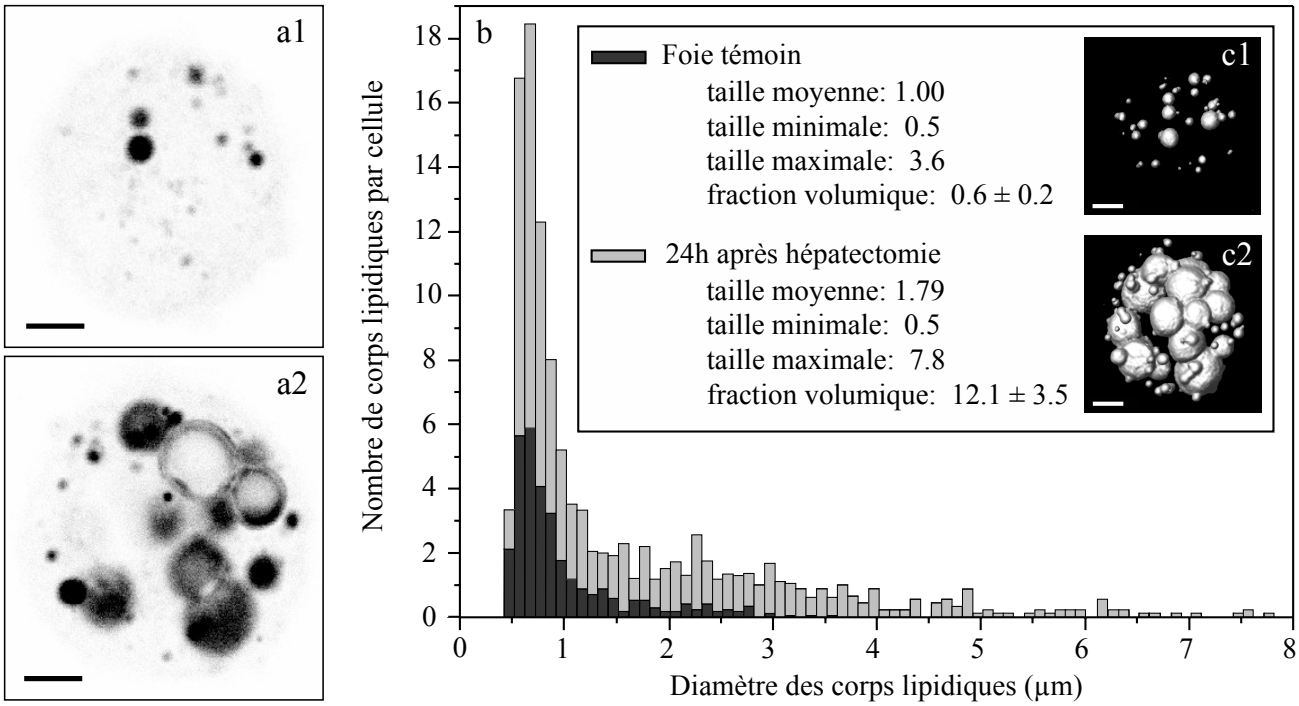


FIG. 3.34 – QUANTIFICATION DES CORPS LIPIDIQUES DANS DES HÉPATOCYTES. Coupes tridimensionnelles d'hépatocytes normaux (a1) et en régénération (a2). Projection axiale de trois plans successifs. Contraste inversé. Barre d'échelle, 5 µm. Longueur d'onde d'excitation, 1180 nm, ouverture numérique d'excitation, 0.9, puissance sous l'objectif, 90 mW. Échantillonnage latéral : 0.1 µm par pixel. Échantillonnage axial : un plan tous les µm. (b), quantification et répartition en taille des corps lipidiques dans des hépatocytes normaux (gris foncé) et en régénération (gris clair). La quantification a été réalisée en mesurant le diamètre des corps lipidiques dans le plan équatorial. (c), reconstruction tridimensionnelle des hépatocytes de la figure (a). Barre d'échelle, 5 µm.

la cellule. Elle rentre dans la cellule sous forme d'ester (calcéine-AM) non fluorescent et devient fluorescente lorsqu'elle est hydrolysée par des estérases intracellulaires non spécifiques [163]. Des hépatocytes de rat cultivés pendant quelques heures sur une lamelle de microscope recouverte de collagène ont été visualisés en trois dimensions dans les conditions de la figure 3.34, puis la calcéine-AM a été introduite dans le milieu baignant les cellules. Après 30 min, la fluorescence de la calcéine hydrolysée a été visualisée par microscopie 2PEF : comme le montre la figure 3.35-d, les cellules visualisées en THG présentent une fluorescence comparable à celle des cellules témoins non éclairées, démontrant une activité normale des estérases dans la cellule.

-**Rétention de la calcéine hydrolysée** La calcéine hydrolysée, fluorescente, est incapable de retraverser la membrane plasmique des cellules et sa rétention dans les hépatocytes est donc une sonde de l'intégrité des membranes plasmiques. Pour vérifier cette intégrité, des hépatocytes de rat en culture ont donc été incubés pendant 30 min avec de la calcéine-AM et leur fluorescence mesurée par microscopie 2PEF. Une partie de ces cellules (n=5) a ensuite été visualisée en microscopie THG dans les conditions de la figure 3.34. Après 30 min, la fluorescence de la calcéine

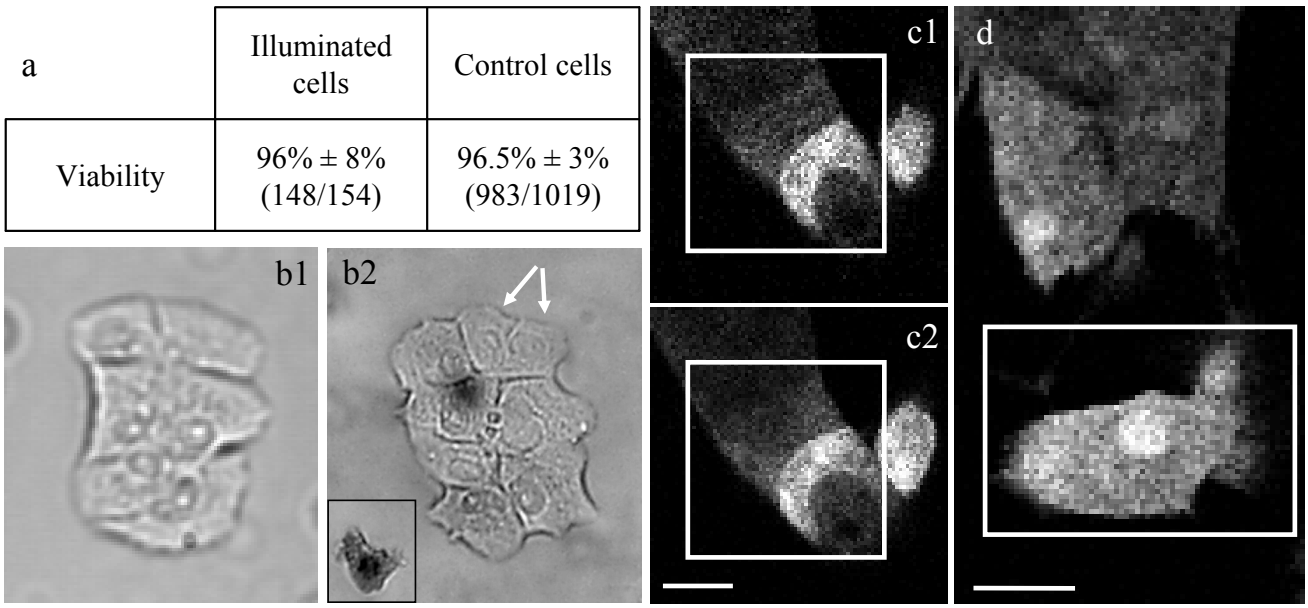


FIG. 3.35 – VÉRIFICATION DE LA VIABILITÉ DES HÉPATOCYTES APRÈS IMAGERIE.
(a), taux d'exclusion au bout de 24 h du bleu Trypan par les cellules imagées et non imagées. (b), images en lumière transmise d'un îlot de cellules avant imagerie (b1) et 24 h après avec un marquage au Trypan (b2). Les cellules, vivantes, excluent le colorant (comparer avec la cellule morte en insert qui est colorée) et une division cellulaire a eu lieu (flèches blanches). La tache noire sur l'image b2 provient d'une impureté au dessus du plan d'imagerie. (c), rétention de la calcéine hydrolysée dans des hépatocytes de rat cultivés avant (c1) et après (c2) imagerie. Les deux images sont présentées avec la même échelle de couleur. (d), hydrolyse de la calcéine dans un hépatocyte préalablement visualisé en microscopie THG. Barres d'échelle, 20 µm. Les images (c) et (d) ont été obtenues par microscopie 2PEF. Les carrés blancs sur ces figures correspondent à la zone visualisée par microscopie THG.

en microscopie 2PEF a été comparée à celle mesurée avant imagerie THG. Comme le montre la figure 3.35-c, le niveau de fluorescence est inchangé avant et après imagerie THG.

Dans leur ensemble, ces différents tests confirment la viabilité des cellules après la quantification des corps lipidiques par imagerie THG. Notons que ce résultat ne vaut que pour les conditions d'illumination décrites ici (figure 3.34) et qu'un éclairement plus prolongé par exemple pourrait conduire à des résultats différents. Cependant le niveau de signal et la résolution que nous avons obtenus dans ces conditions s'avèrent suffisants pour quantifier les corps lipidiques.

Cette technique de quantification peut donc être utilisée sans compromettre la viabilité des cellules imagées ce qui permet d'envisager un suivi sur le long terme des variations du contenu en lipides des cellules.

3.3.3 Étude de la dynamique des corps lipidiques *in vivo*

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la microscopie THG des corps lipidiques permet également l'étude de leur dynamique *in vivo*. Nous avons démontré la possibilité de suivre le mouvement d'une gouttelette lipidique dans un embryon de drosophile au stade 5 de développement (figure 3.25 et [143]), stade où les gouttelettes sont activement ségrégées dans la zone située entre les noyaux et le vitellus.

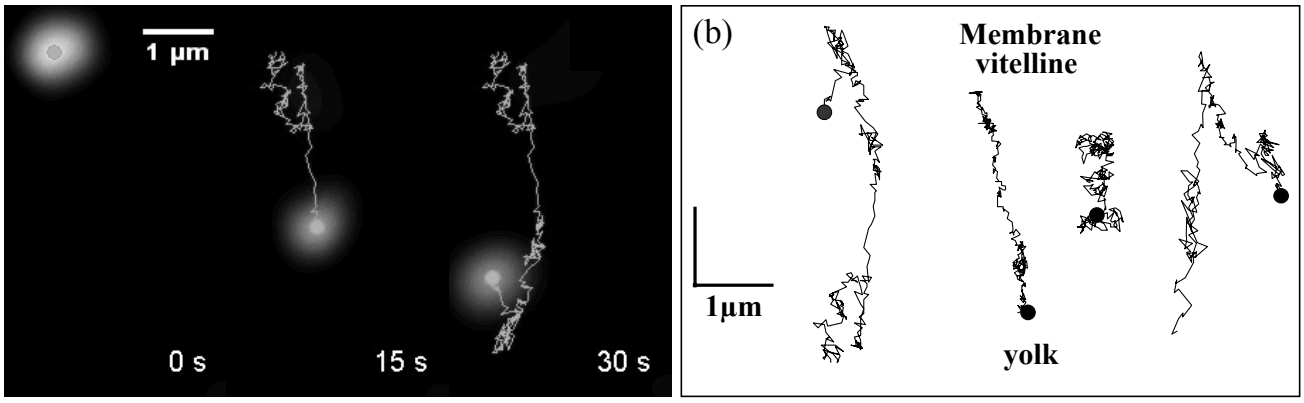


FIG. 3.36 – SUIVI D'UNE GOUTTELETTE LIPIDIQUE DANS UN EMBRYON VIVANT. (a), trois images successives d'une gouttelette lipidique dans un embryon de drosophile au stade 5 de développement dans la partie dorsale de l'embryon. La trajectoire de la gouttelette a été reconstruite par repérage de sa position dans les enregistrements successifs. Temps d'acquisition, 120 ms par image. Ouverture numérique 0.9, échantillonnage latéral de l'image, 0.1 µm/pixel. Le suréchantillonnage et le bon rapport signal sur bruit permettent une localisation avec une précision meilleure que la résolution de l'image. Sur les images, la région apicale est en bas et la région basale en haut. (b), exemples de trajectoires obtenues pour différents corps lipidiques. La résolution temporelle est de 120 ms.

Welte *et al.* [144] ont étudié le mouvement de ces gouttelettes, dont le transport est assuré par un moteur moléculaire, la dynéine, liée aux microtubules [164,165]. L'analyse des caractéristiques de ce mouvement (temps de persistance, distance moyenne parcourue, vitesse parcourue, selon les stades de développement et le sens du mouvement dans la direction apico-basale) leur a permis d'étudier dans des embryons entiers la coordination de moteurs moléculaires permettant un transport dirigé et un contrôle précis de la distribution totale des corps lipidiques. La caractérisation de la dynamique de ces objets peut ainsi s'avérer précieuse pour étudier indirectement les problématiques de transport à l'intérieur d'organismes vivants [166, 167].

Une des limites du dispositif expérimental utilisé dans les études précédemment citées est la préparation des embryons nécessaire à l'observation des gouttelettes de lipides : à cause de l'opacité des embryons à la lumière (voir section 4.2 page 150), les auteurs sont contraints d'écraser l'embryon entre deux lamelles jusqu'à réduire son épaisseur de moitié environ, ce qui conduit à un éclatement partiel de l'embryon. D'après les auteurs, ce traitement semble préserver pendant quelques minutes le trafic normal des corps lipidiques. Il reste cependant très invasif, et serait

avantageusement suppléé par une technique permettant la visualisation des mêmes structures tout en préservant la viabilité de l'embryon.

Comme le signal de troisième harmonique provenant des gouttelettes lipidiques est très fort dans les conditions d'imagerie typiques que nous avons utilisées (90-100 mW autour de 1.18 µm, impulsions de 250 fs, ouverture numérique 0.9), il est possible d'effectuer une imagerie rapide d'une gouttelette au sein d'un embryon. La figure 3.36 montre un exemple du suivi d'une gouttelette individuelle pendant 30 s, avec une résolution temporelle d'environ 120 ms et une résolution spatiale de 100 nm. En enregistrant ainsi les trajectoires individuelles de plusieurs objets, on peut remonter aux propriétés statistiques de leur mouvement.

Plusieurs limites existent cependant à l'utilisation de la microscopie THG pour sonder le mouvement des corps lipidiques : la première est la résolution temporelle accessible à cette technique dans le cas de mouvements rapides comme c'est le cas dans l'exemple présenté. Dans la référence [144], les auteurs, en utilisant une imagerie plein champ, ont une résolution de 33 ms avec une précision sur le positionnement des objets d'environ 5 nm. La précision spatiale dans notre cas est de l'ordre de 100 nm[21] pour une résolution temporelle de 120 ms et l'amélioration de l'une de ces deux résolutions, à cause de la nécessité de balayer le faisceau, implique une dégradation de l'autre.

D'autre part, Barzda *et al.* [100] ont évoqué la possibilité de piéger des objets observés par un faisceau aussi intense que celui utilisé pour créer un signal THG. Dans notre expérience, l'ouverture numérique reste modérée (0.9) et le faisceau est balayé rapidement (25 µs/µm) ce qui limite le risque d'entraînement de l'objet. Cependant, cette limitation est à considérer si l'on cherche à augmenter la résolution spatiale de la technique en utilisant un objectif de plus forte ouverture numérique ou une puissance plus importante pour augmenter le rapport signal-sur-bruit de l'image.

Finalement, il est difficile de vérifier si dans les conditions d'imagerie utilisées (éclairement continu et très localisé pendant plusieurs dizaines de secondes) la dynamique des objets étudiés n'est pas perturbée[22].

Ces limitations orientent pour le moment la THG plutôt vers des problématiques où le mouvement se fait légèrement plus lentement et/ou à plus grande échelle, comme c'est le cas pour les mouvements de tissus impliqués dans le développement d'un organisme. Nous en verrons un exemple dans le chapitre suivant.

3.3.4 Imagerie multimodale

Finalement, un des atouts de la microscopie THG est la facilité avec laquelle cette technique se combine avec d'autres types d'imagerie non linéaire. Nous présentons dans ce paragraphe quelques exemples illustrant les possibilités de combinaison de la microscopie THG avec des

[21] Compte tenu du bon rapport signal-sur-bruit des images, une meilleure précision sur la localisation de la gouttelette pourrait être obtenue en utilisant un algorithme de localisation du barycentre de l'objet ainsi qu'en disposant d'une référence fixe dans l'image (bord d'un noyau par exemple).

[22] A plus grande échelle, nous avons cependant vérifié qu'après les séries d'images effectuées, la position du front de cellularisation (voir chapitre suivant) n'était pas modifiée localement par rapport au reste de l'embryon et que l'embryon se développait normalement jusqu'au stade larvaire.

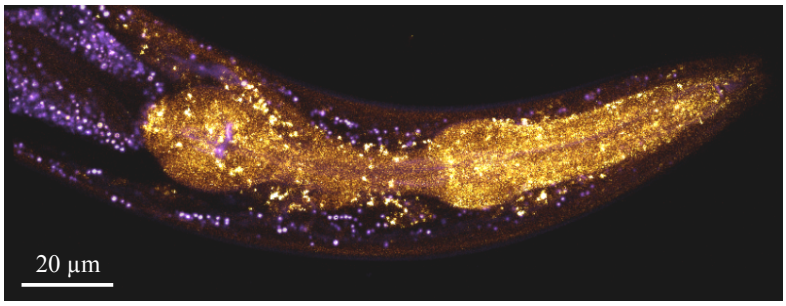


FIG. 3.37 – IMAGE 3D MULTIMODALE DE LA TÊTE D'UN NÉMATODE *C.elegans*. Signal THG (violet) et 2PEF (jaune) provenant d'une protéine mono-red localisée au niveau des endosomes (construction vps-23 : : mRED). Les deux signaux ont été acquis simultanément, en transmission avec un filtre interférentiel à 390 nm pour la THG et en épidétection avec un filtre coupant les longueurs d'onde inférieures à 590 nm pour la fluorescence. Temps d'acquisition, 16 s par plan, 1 min pour l'image 3D. Les autres paramètres sont donnés dans le texte.

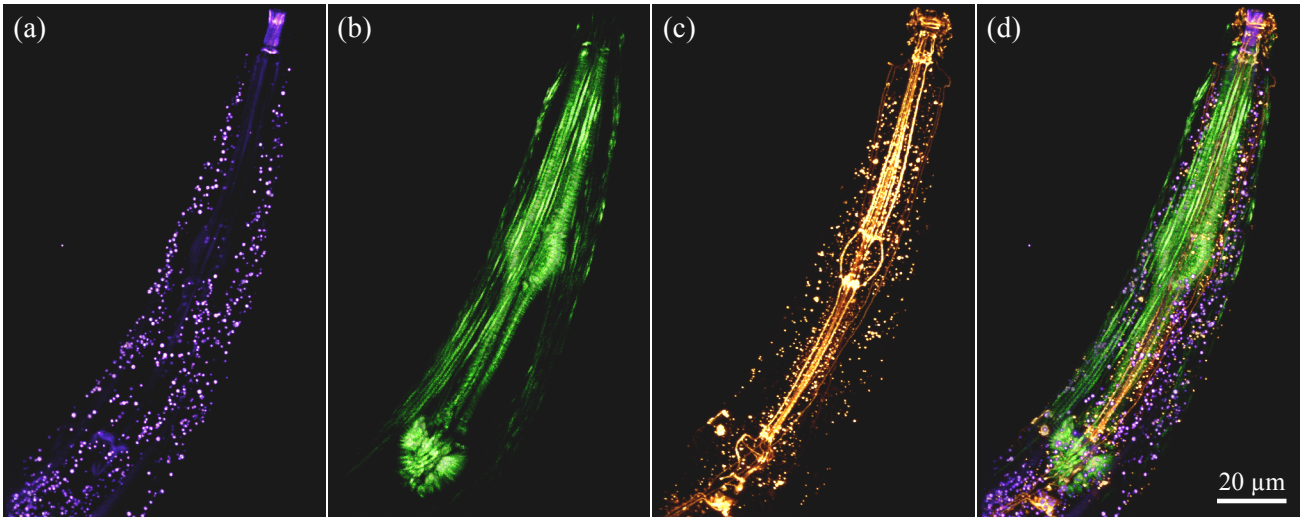


FIG. 3.38 – IMAGE 3D MULTIMODALE DE LA TÊTE D'UN NÉMATODE *C.elegans*. (a), signal THG provenant des corps lipidiques situés dans l'épiderme. (b), signal SHG provenant des structures musculaires du pharynx et de la surface du ver. Les deux signaux ont été acquis simultanément en transmission, séparés par un miroir dichroïque réfléchissant les longueurs d'onde supérieures à 495 nm et sélectionnés à l'aide de filtres interférentiels centrés respectivement autour de 390 et 592 nm. Durée d'acquisition, 9 s par plan et 6 min pour l'image 3D. Les autres paramètres d'acquisition sont donnés dans le texte. (c), signal 2PEF d'une GFP marquant les jonctions cellulaires. Le signal a été acquis indépendamment des deux signaux précédents avec une excitation à 900 nm et une puissance moyenne de l'ordre de 7 mW. Durée d'acquisition, 5.6 s par plan et 3.7 min pour l'image 3D. (d), superposition des trois signaux obtenus.

signaux de seconde harmonique ou de fluorescence à deux photons.

a Visualisation simultanée de différents signaux Deux exemples d'images obtenues en combinant la microscopie THG avec d'autres signaux non linéaires sont présentés sur les figures 3.37 et 3.38 : dans la tête du nématode *C.elegans*, on peut visualiser simultanément le signal THG provenant de structures micrométriques (probablement des corps lipidiques, voir figure 3.38-a) et de la lumière du pharynx (mode de contraste à comparer à la surface des granules d'amidon, voir section 3.2.2.1) et un signal SHG provenant des muscles du pharynx et des muscles entourant le ver (figure 3.38-b). D'autre part on peut également visualiser simultanément le signal THG et un signal 2PEF provenant d'un marquage des tissus (figure 3.37 : ici il s'agit de la protéine fluorescente mono-Red, excitable autour de 1.2 µm).

La difficulté essentielle pour obtenir ce type d'image réside dans la nécessité de disposer, avec le même faisceau, de signaux d'intensité comparable. Pour les paramètres utilisés ici (longueur d'onde d'excitation 1.18 µm, impulsions de 250 fs, ouverture numérique de 1.2 et puissance moyenne de l'ordre de 35mW), les signaux THG et SHG sont effectivement du même ordre de grandeur. En effet, l'efficacité de création du signal SHG décroît significativement avec la longueur d'onde d'excitation [38] et est donc à 1.18 µm comparable à celle de la THG (pour la plupart des sources de signal : muscles, collagène fibrillaire, etc.). Le signal 2PEF dépend quant à lui fortement de la densité du marquage et du spectre d'excitation de la protéine.

b Cas d'une excitation séquentielle Il peut également être intéressant dans certains cas de détecter séquentiellement des signaux obtenus avec des longueurs d'onde d'excitation différentes. C'est le cas par exemple si l'on cherche à combiner l'imagerie THG avec le signal de fluorescence d'une GFP, protéine fluorescente majoritairement utilisée à l'heure actuelle dans les constructions transgéniques et excitable autour de 900-950 nm (figures 3.38 et 3.39). C'est également le cas si l'on cherche à détecter un signal de fluorescence endogène (figures 3.39), principalement excité à deux photons en dessous de 800-900 nm selon les molécules mises en jeu (figure 1.9, page 17).

Sur l'exemple de la figure 3.39, la combinaison du signal 2PEF de la GFP localisée dans les noyaux, de l'autofluorescence du vitellus et de la membrane vitelline et enfin du signal THG provenant des gouttelettes de lipides illustre la ségrégation de ces dernières entre les cellules en formation et le vitellus pendant la cellularisation de l'embryon (voir chapitre 4 pour la description du développement embryonnaire chez la drosophile).

Un autre exemple est présenté sur la figure 3.40, où le signal THG des corps lipidiques dans le poumon est combiné au signal SHG des fibres de collagène de la plèvre, ainsi qu'au signal endogène de fluorescence de l'élastine et des macrophages.

Dans cette situation, la limitation essentielle est d'acquérir les différentes images sans que l'échantillon ne bouge. Cette contrainte est limitante notamment pour des échantillons vivants (tels que les embryons de drosophile, visualisés à un stade où les mouvements morphogénétiques n'ont pas encore commencé). Une solution peut être d'exciter simultanément le tissu avec plusieurs faisceaux dont il faut alors soigneusement superposer les points de focalisation. Ceci doit prendre en compte les aberrations chromatiques de l'objectif de focalisation, qui font varier la position axiale du point de focalisation avec la longueur d'onde (typiquement de 3 µm pour les

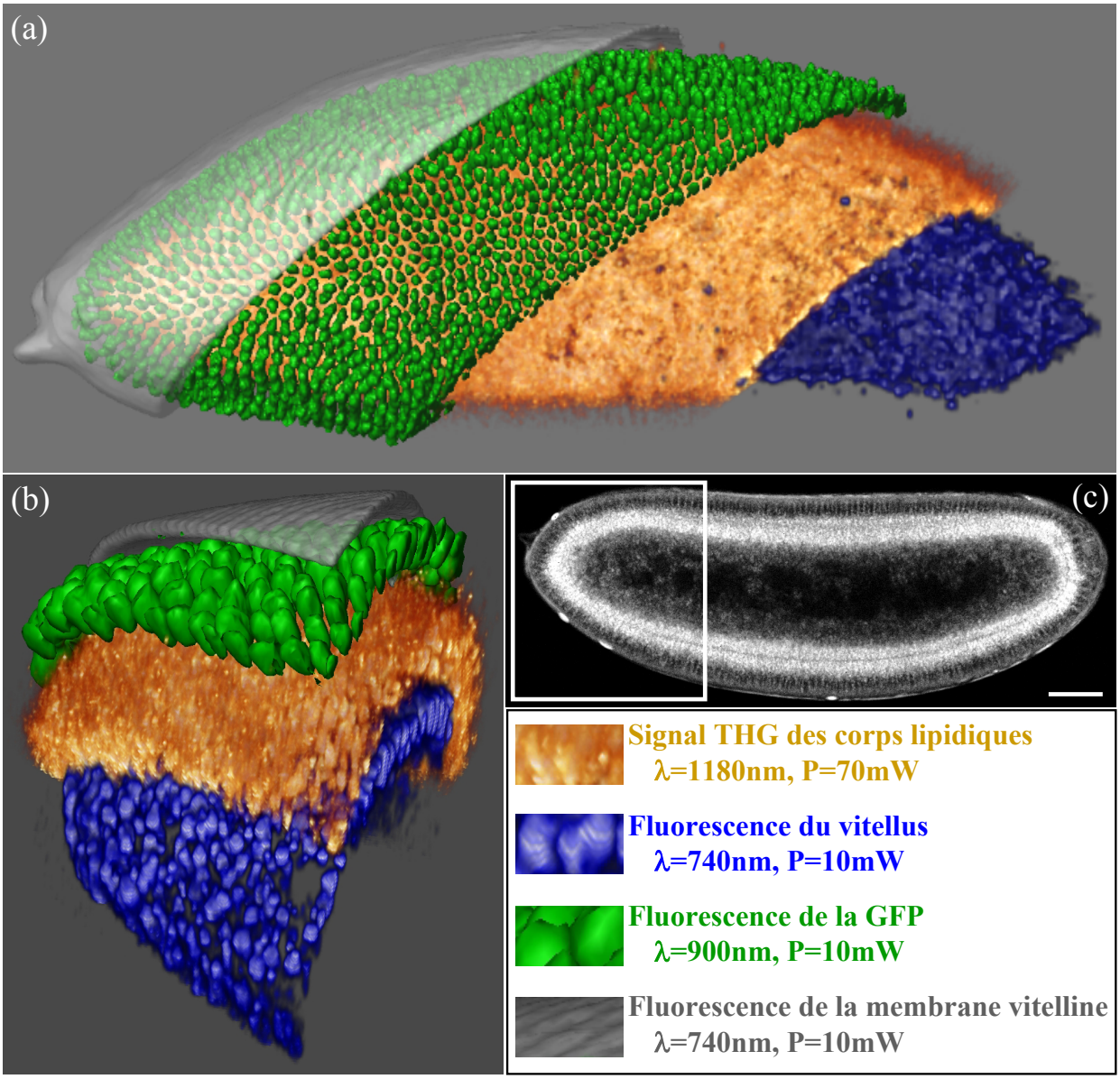


FIG. 3.39 – IMAGERIE 3D MULTIMODALE D'UN EMBRYON DE DROSOPHILE.
(a), embryon de drosophile entier. (b), zoom sur le pôle antérieur, encadré sur la coupe sagittale (c). Les différentes longueurs d'onde utilisées sont précisées sur la figure. Barre d'échelle, 50 µm. Temps total d'exposition de l'échantillon pour obtenir l'image multimodale 3D : 8 min pour (a) (56 images 2D) et 7 min pour (b) (51 images 2D). Il faut rajouter à ce temps 5 à 10 min nécessaires pour changer de longueur d'onde d'excitation. Ce temps peut être réduit par l'utilisation d'une source accordable automatisée.

objectifs utilisés entre 800 nm et 1.18 µm). Une autre possibilité, pour des tissus dont le mouvement est suffisamment lent pour disposer de plusieurs secondes pour acquérir une image, est d'utiliser une source accordable automatisée qui permet de changer la longueur d'onde de la source utilisée beaucoup plus rapidement que dans notre cas. Ceci permettrait par exemple de réduire le temps d'acquisition d'une image comme celle présentée à la figure 3.40 à 10-30 s.

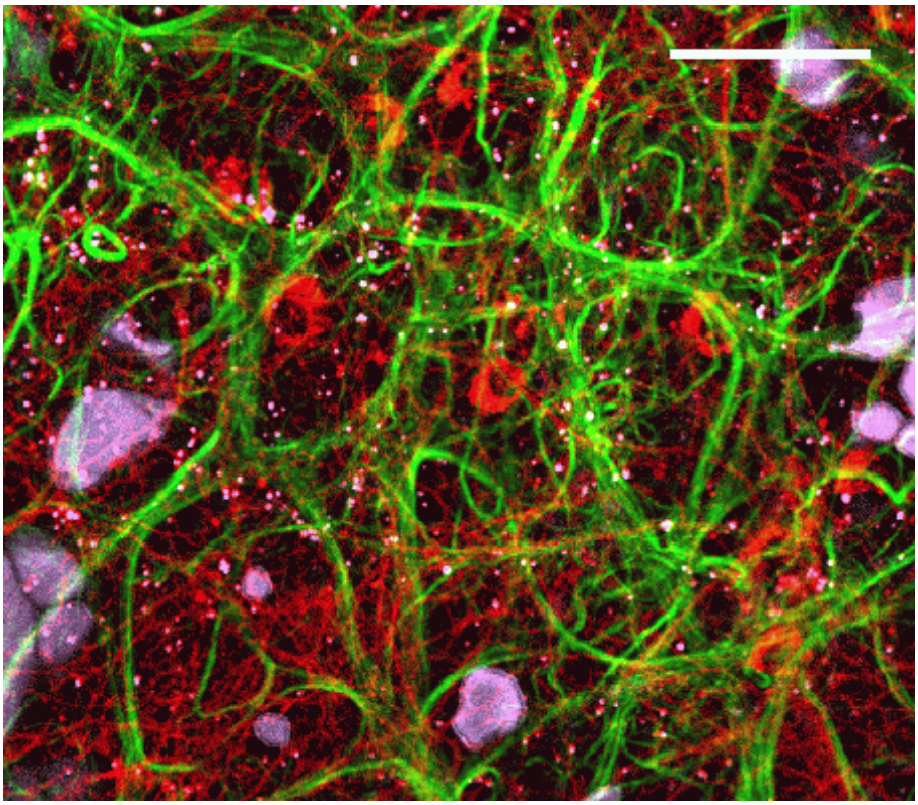


FIG. 3.40 – IMAGERIE MULTIMODALE DE POUMON FRAIS.
Poumon de rat non marqué visualisé en microscopie THG (corps lipidiques et bulles d'air, en violet), SHG (fibres de collagène de la plèvre, en vert) et de fluorescence à deux photons (élastine des alvéoles pulmonaires, macrophages, vitamine A des corps lipidiques... en rouge). Barre d'échelle, 50 µm. Temps d'acquisition total, 3 min.

c Perspectives Au delà d'une démonstration de principe, la combinaison de différents signaux non linéaires permet d'obtenir des informations complémentaires autour d'une problématique donnée comme par exemple dans le cas du poumon (figure 3.40), où les corps lipidiques, visualisés en THG, semblent jouer un rôle dans le développement des alvéoles pulmonaires, visualisées grâce à la fluorescence endogène de l'élastine [146]. Dans le foie, la THG devrait permettre d'étudier la stéatose hépatique, caractérisée par une accumulation excessive de triglycérides dans les hépatocytes. Le pronostic de cette maladie est essentiellement lié à la présence d'une stéatose pure ou d'une stéatose associée à une inflammation, une nécrose et/ou une fibrose. Or, le rôle de la stéatose dans le développement de ces symptômes est encore mal connu [158]. La combinaison de l'imagerie de troisième harmonique des corps lipidiques, de seconde harmonique du collagène fibrillaire (permettant de visualiser la fibrose) et de la fluorescence à deux photons du NADH (permettant de visualiser le stress oxidatif dans le tissu [53]) devrait donc constituer un outil de choix pour l'étude d'un tel processus.

La THG enrichit donc le champ des possibilités offertes par la microscopie non linéaire pour l'étude de processus impliquant les corps lipidiques.

3.4 Conclusion

Nous avons décrit dans ce chapitre les principales sources de contraste que nous avons identifiées dans les tissus. Comme dans le cas de la SHG et contrairement au cas de la fluorescence ou du CARS, le contraste obtenu est de nature structurale et non chimique, ce qui conduit à une moins bonne spécificité du signal.

Nous avons cependant montré que dans de nombreux tissus, aussi divers que les embryons de drosophile, le foie, le poumon ou les graines de plantes, le signal THG est spécifique des corps lipidiques de taille micrométrique. Cette spécificité est d'autant plus intéressante qu'il n'existe pas de technique bien établie pour l'étude de ces structures, dont la physiologie est en conséquence mal connue et dont l'étude a pris ces dernières années un essor important [141, 155].

Certaines précautions s'imposent toutefois pour l'utilisation de ce mode de contraste : nous avons vu que selon les tissus, d'autres structures (très denses ou dont la susceptibilité est exaltée par résonance) peuvent elles aussi donner un signal significatif. Il est donc nécessaire de bien caractériser les structures visualisées dans un type de tissu particulier avant d'envisager des applications biologiques plus poussées. D'autre part, la sensibilité de la THG aux petits corps lipidiques n'a pas été étudiée *in vivo* : elle dépendra notamment de la focalisation du faisceau et va limiter les applications à des tissus dans lesquels les corps lipidiques sont de taille « suffisante » (au moins quelques centaines de nanomètres).

Pour conclure, cette application de la THG, bien que sa caractérisation biologique soit pour l'instant partielle, ouvre un grand champ d'applications à une technique qui était pour l'instant limitée à l'imagerie structurale (dont nous allons voir un exemple dans le chapitre suivant). Ceci permet d'envisager à moyen terme son utilisation en routine en biologie en combinaison avec la microscopie 2PEF.

Chapitre 4

Microscopie THG pour l'analyse des mouvements morphogénétiques chez la drosophile

L'embryon de drosophile est un modèle très utilisé en biologie du développement, notamment du fait de la bonne connaissance de sa génétique. Cependant, son étude est limitée par la difficulté liée à l'observation de son développement par des techniques d'optique traditionnelles. La mise au point de méthodes alternatives efficaces pour la visualisation *in vivo* des mouvements morphogénétiques dans ce modèle est donc un enjeu pour mieux comprendre la dynamique de ces mouvements. Dans ce contexte, l'utilisation de la microscopie THG permet d'envisager une visualisation du développement sans marquage, avec une résolution tridimensionnelle micrométrique et sur le long terme.

Dans la première partie de ce chapitre, nous introduisons le modèle *Drosophila melanogaster* (section 4.1.1) et l'étude de ses mouvements morphogénétiques (section 4.1.2). Elle comprend également un bref descriptif des techniques généralement utilisées pour la visualisation de ces mouvements (section 4.1.3). Ces techniques de visualisation présentent de sérieuses limitations qui nous ont amenés à utiliser la microscopie THG pour visualiser l'ensemble de l'embryon de drosophile et quantifier les mouvements morphogénétiques (section 4.2). La validation de cette nouvelle méthode de visualisation requiert également l'étude des perturbations du développement induites par l'éclairement (section 4.3). Les résultats obtenus nous ont finalement permis d'effectuer des démonstrations de principe dans différents contextes (génétiques et mécaniques) de perturbation des mouvements (section 4.4).

Les expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées en collaboration avec Willy Supatto. Le lecteur peut se référer à ses travaux de thèse pour une présentation plus détaillée du modèle *Drosophila melanogaster* ainsi que du contexte biologique qui sous-tend ce travail [168].

4.1 Contexte

L'essentiel des connaissances en biologie a été acquis à partir de l'étude d'un nombre relativement restreint d'organismes que l'on peut considérer comme des systèmes modèles. D'un point

de vue historique, la mouche *Drosophila melanogaster* s'est imposée comme organisme modèle en génétique au cours des années 1910-1930. Les travaux de Thomas Morgan pour établir formellement la théorie chromosomique de l'hérédité à l'aide de la drosophile ont été récompensés par un prix Nobel en 1933. Pourtant, de nombreux généticiens délaisseront ce système au milieu du XXème siècle pour lui préférer des micro-organismes plus simples comme les virus, les champignons ou les bactéries. La drosophile reviendra cependant sur le devant de la scène à partir des années 1970 grâce à l'étude de son développement. Ainsi, les travaux d'Edward Lewis, de Christiane Nüsslein-Volhard et d'Eric Wieschaus (prix Nobel 1995) sur le développement précoce de l'embryon de drosophile ont jeté les bases d'un nouveau domaine d'étude : la génétique du développement. La connaissance spectaculaire de sa génétique fait de la drosophile un modèle de choix en biologie du développement parmi les autres organismes classiquement étudiés (invertébrés comme le nématode *Caenorhabditis elegans* ou vertébrés comme le xénope, le poulet, la souris ou le poisson zèbre). La drosophile est aujourd'hui le système dont le contrôle génétique du développement précoce est de loin le mieux compris.

4.1.1 La drosophile : un organisme modèle

Cette section est une introduction au modèle *Drosophila melanogaster*. En particulier, nous présentons les principaux événements ayant lieu pendant les stades précoces du développement de la drosophile, tels que la cellularisation et les mouvements morphogénétiques (« générateurs de formes ») de la gastrulation.

4.1.1.1 Le cycle de vie de la drosophile

Le cycle de vie de la drosophile, de l'embryon à l'insecte adulte, est illustré par le schéma 4.1. Après la fécondation, l'embryon subit une série de divisions nucléaires aboutissant à la formation d'un blastoderme syncitial. Après la cellularisation et la formation du blastoderme cellulaire, les mouvements morphogénétiques de la gastrulation commencent et mettent en place les trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). Au bout d'environ 24 heures à 25°C, le développement de l'embryon se termine par l'éclosion d'une larve.

Dans ce travail, les expériences ont été réalisées pour une température d'environ 19°C. Les vitesses de développement sont notablement plus lentes à cette température (voir par exemple la section 4.3 pour la cellularisation). Schématiquement, on peut considérer que la vitesse de développement est deux fois plus lente à 18°C qu'à 25°C [170].

4.1.1.2 L'embryon de drosophile précoce

L'embryon de drosophile a globalement une forme d'ellipsoïde de révolution d'une longueur de 450-500 µm pour un diamètre de 150-200 µm (figure 4.2). Avant la cellularisation (voir paragraphe 4.1.1.3), la membrane plasmique contenant le volume cytoplasmique (les noyaux et les réserves vitellines) est entourée de la membrane vitelline constituée de protéines réticulées. Cette membrane est recouverte d'une couche de cire qui l'imperméabilise et d'une couche protectrice plus épaisse, le chorion, qui régule les échanges gazeux. Le volume cytoplasmique est aussi appelé vitellus (ou espace vitellin, ou yolk) et correspond au jaune de l'œuf. Il fournit les nutriments

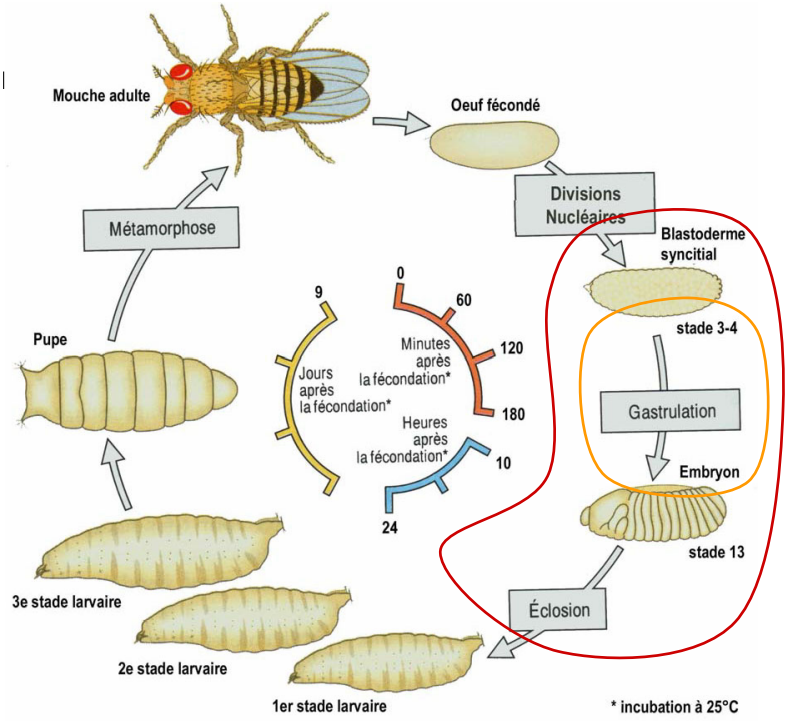


FIG. 4.1 – LE CYCLE DE VIE DE LA DROSOPHILE.
D'après [169]. Dans les expériences présentées, on s'intéresse au développement de l'embryon du blastoderme syncitial jusqu'au premier stade larvaire (courbe rouge). Plus précisément, la plupart des expériences visualisent la cellularisation et la gastrulation (stades 5 à 8, courbe orange).

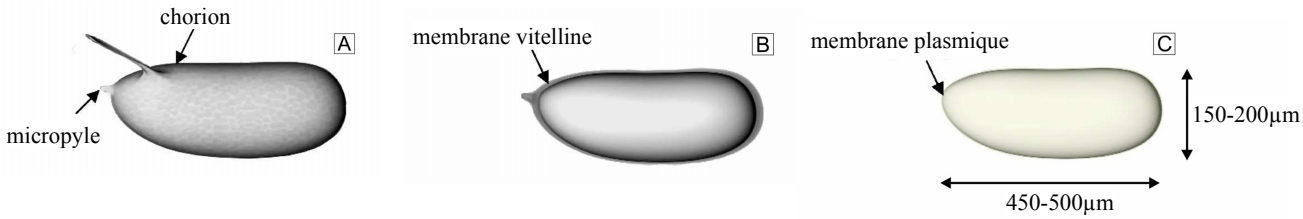


FIG. 4.2 – STRUCTURE DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE.
D'après flymove (http ://flymove.uni-muenster.de/). Le chorion (A) est la membrane la plus externe de l'embryon. En dessous se trouve la membrane vitelline (B) puis la membrane plasmique qui entoure le volume cytoplasmique avant la cellularisation.

pendant le développement de l'embryon et est composé principalement de trois constituants : des vésicules riches en protéines, des vésicules riches en glycogène et des gouttelettes de lipides [171]. Le micropyle est une petite ouverture dans le chorion par lequel le spermatozoïde pénètre pour fertiliser l'ovocyte. Il détermine la position du pôle antérieur de l'embryon.

Par convention, lorsque l'embryon est représenté en coupe sagittale (voir la définition des coupes dans la figure 4.3), il est toujours orienté avec le pôle antérieur à gauche et le côté dorsal vers le haut. La morphologie caractéristique de l'embryon permet de reconnaître facilement ses

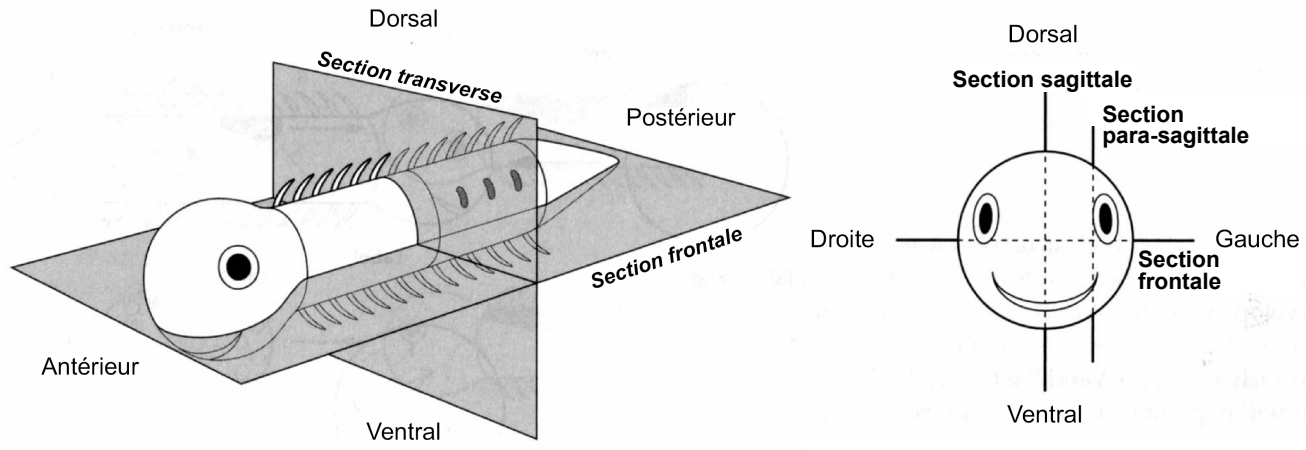


FIG. 4.3 – DÉFINITION DES SECTIONS UTILISÉES DANS LA SUITE DE CE CHAPITRE. D'après [172]. Dans nos expériences, l'embryon étant collé sur une face latérale (appendice E), une coupe sagittale ou parasagittale correspond à un plan d'imagerie (perpendiculaire à l'axe optique).

Stade	Evénements	Délai après la ponte (à 22°C)	Cycle de division mitotique
4	Blastoderme syncytial	1 h 30 min – 2 h 30 min	10-13
5	Cellularisation Blastoderme cellulaire	2 h 30 min – 3 h 15 min	14
6	Invagination du sillon ventral Invagination du sillon céphalique	3 h 15 min – 3 h 35 min	14
7	Invagination des endodermes anterieurs et postérieurs	3 h 35 min – 3 h 45 min	14
8	Extension de la bande germinale	3 h 45 min – 4 h 30 min	14

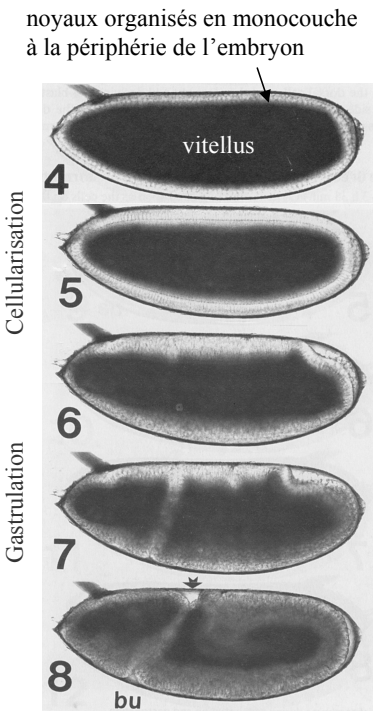


FIG. 4.4 – STADES DE DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE.
Adapté de [143]. Les images présentées sont obtenues en lumière transmise (voir section 4.1.3).

polarités (dorso-ventrale et antéro-postérieure). Par la suite, la plupart des coupes optiques de l'embryon correspondront à des coupes sagittales ou à des coupes para-sagittales.

Dans l'ensemble de ce travail, les stades utilisés pour décrire les phases du développement sont

ceux définis dans la référence [143]. La figure 4.4 présente les stades 4 à 8, allant du blastoderme syncitial à la fin de la gastrulation. Nous allons maintenant décrire plus précisément les deux phénomènes principaux se produisant pendant ces stades : la cellularisation et la gastrulation.

4.1.1.3 La cellularisation

Le développement de l'embryon jusqu'au stade 4 aboutit à la formation d'un blastoderme syncitial, c'est-à-dire d'un ensemble de noyaux (6000 pour la lignée somatique) organisés en une monocouche à la périphérie de l'embryon et constituant avec le vitellus une unique cellule. L'embryon ne devient véritablement multicellulaire qu'au cours du stade 5 du développement, où intervient la cellularisation.

La cellularisation est le processus dynamique d'invagination entre les noyaux de la membrane plasmique entourant l'embryon, qui aboutit à la formation simultanée d'environ 6000 cellules [173] organisées en monocouche le long de la membrane vitelline. L'embryon passe ainsi du stade de blastoderme syncitial à celui de blastoderme cellulaire.

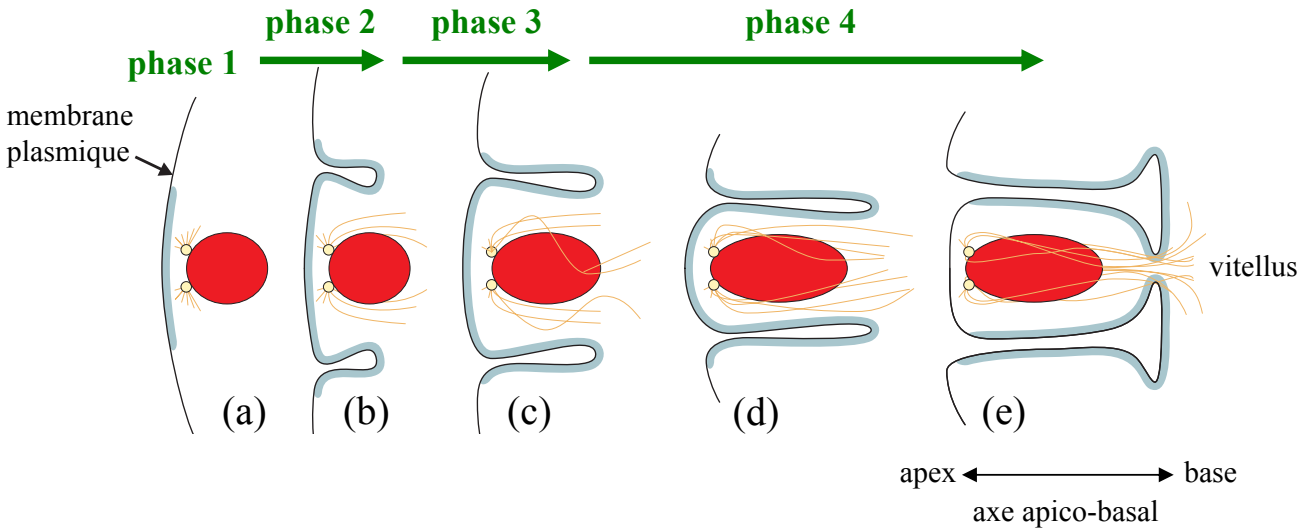


Fig. 4.5 – Les étapes de la cellularisation.
Adapté de [174]. La cellularisation est le processus d'invagination de la membrane plasmique entre les noyaux (en rouge) pour former des cellules individualisées. Les microtubules (en orange) polymérisent depuis le centrosome (en jaune) et semblent servir de guide à la croissance des membranes. Le réseau d'actine (en bleu-vert) forme au niveau du front d'invagination un réseau hexagonal parallèle à la surface de l'embryon. Ce réseau entoure chaque noyau d'un anneau d'actine supposé contractile.

L'invagination du front de cellularisation (noté IFC dans la suite) entre chaque noyau s'effectue en plusieurs phases de vitesses différentes. Nous suivrons dans la suite l'analyse de Lecuit & Wieschaus [175] qui distinguent quatre phases : elles sont décrites sur la figure 4.5. La phase 1 dure environ 10 minutes[1] et correspond à la mise en place du canal d'invagination (figure 4.5-a).

[1]Les durées indiquées dans ce paragraphe correspondent à une température d'environ 20°C, d'après [175].

Pendant les trois phases suivantes, durant chacune 20 minutes environ, les membranes invaginent entre les noyaux à vitesse croissante. Pendant la phase 2, le front d'invagination se déplace de quelques microns de façon très lente jusqu'à atteindre la partie apicale des noyaux (figure 4.5-b). La vitesse de l'IFC devient alors plus rapide (phase 3) tandis que les noyaux s'allongent. Lorsque le front dépasse la base des noyaux (figure 4.5-c et d), sa vitesse double (phase 4). Pendant cette dernière phase, les cellules doublent de longueur. A la fin de la cellularisation (figure 4.5-e), les cellules se referment mais il reste toujours un petit orifice qui laisse en contact le cytoplasme cellulaire et le vitellus. La vitesse du processus de cellularisation est très sensible à la température dans la gamme de température physiologique (18-30°C) et double par exemple entre 18 et 25°C (figure 4.22) [176].

Durant la cellularisation, les microtubules polymérisent depuis le centrosome et servent de guide et de support à la croissance des membranes. L'actine est présente au niveau de l'IFC et forme un réseau hexagonal parallèle à la surface embryonnaire, entourant d'un anneau supposé contractile chaque noyau [173, 176]. Il existe différentes hypothèses pour expliquer l'origine de la force qui engendre l'invagination des membranes [177, 178]. Dans tous les cas, le processus de cellularisation est très sensible à une perturbation du cytosquelette [173, 176, 178]. La perturbation par une drogue de la dynamique des filaments d'actine ou des microtubules entraîne un ralentissement voire même l'arrêt total du front d'invagination [178].

Cette double sensibilité à la température et à l'intégrité du cytosquelette font de la cellularisation une sonde idéale des perturbations instantanées de la dynamique du développement liées au processus d'imagerie. Elle sera donc utilisée dans cette optique à la section 4.3.

4.1.1.4 La gastrulation

La gastrulation est l'un des événements les plus précoces du développement d'un organisme multicellulaire. Pendant cette période, l'embryon subit les premiers mouvements morphogénétiques qui vont le transformer d'un amas ou d'une monocouche de cellules en une structure tridimensionnelle à plusieurs feuillets (ectoderme[2], mésoderme[3] et endoderme[4] pour les organismes triploblastiques comme la drosophile).

Chez l'embryon de drosophile, la gastrulation débute dès la fin de la cellularisation, après environ 3 heures de développement, et dure typiquement 45 minutes, du stade 6 au stade 8 de développement (figure 4.4). Les principaux mouvements morphogénétiques de la gastrulation sont l'invagination du sillon ventral, la formation du sillon céphalique, l'invagination des endodermes postérieur et antérieur et l'extension de la bande germinale. Ces mouvements sont schématisés dans la figure 4.6-b et illustrés par plusieurs images de microscopie électronique à balayage (figure 4.6-a). Notons que presque tous les mouvements morphogénétiques de la gastrulation s'effectuent sans division cellulaire. En effet, la division cellulaire ne reprend qu'en fin de gastrulation. Par conséquent, nous pouvons considérer que ces mouvements s'effectuent à nombre constant de cellules.

Nous allons brièvement décrire ces mouvements ainsi que leur enchaînement temporel. Une

[2]L'ectoderme est à l'origine principalement de l'épiderme et du système nerveux.
[3]Le mésoderme est à l'origine principalement des muscles, du cœur, des gonades et d'autres tissus conjonctifs.
[4]L'endoderme est à l'origine principalement du système digestif.

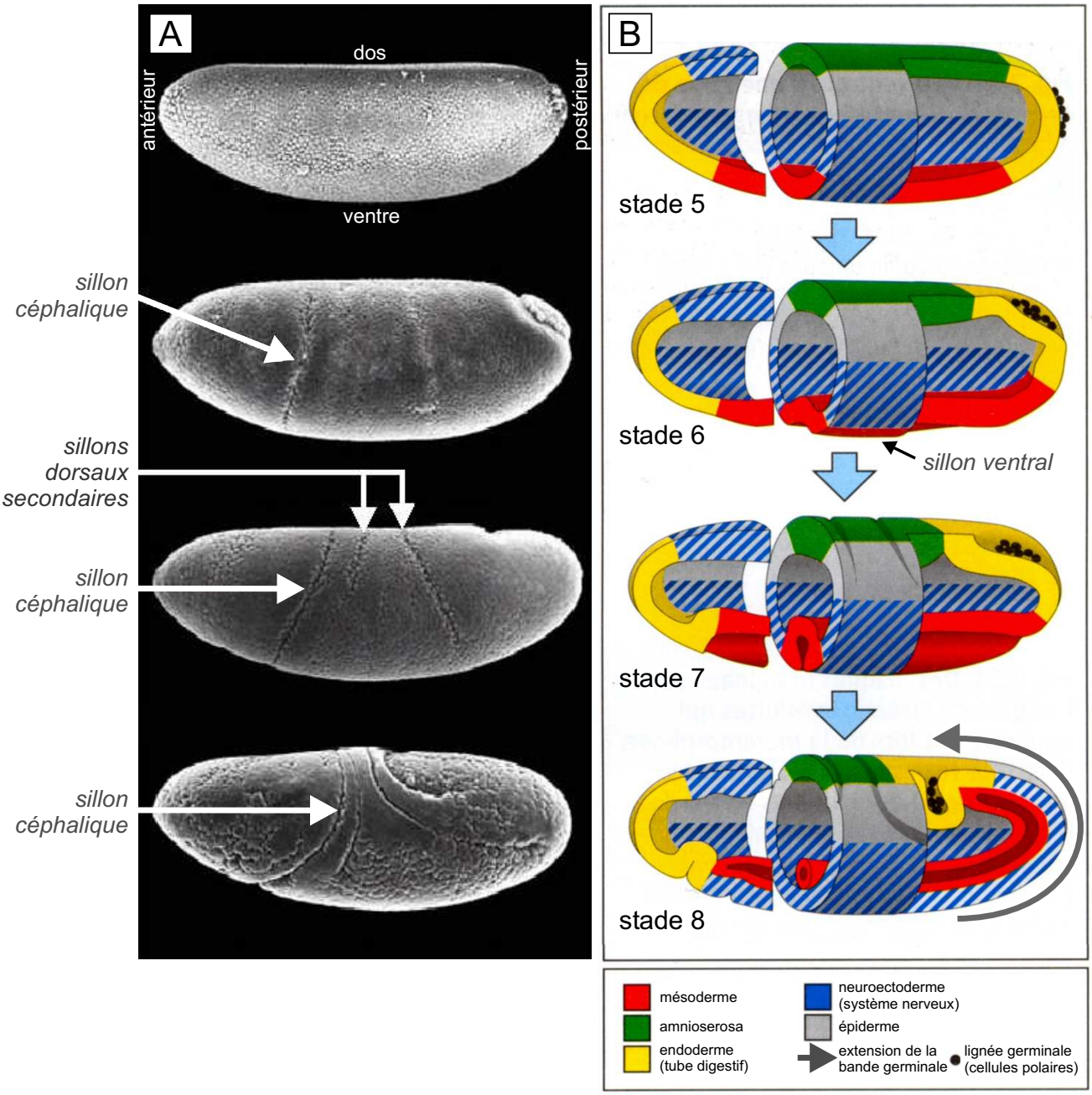


FIG. 4.6 – LES ÉTAPES DE LA GASTRULATION.
Adapté de [169] et Flybase (http ://flybase.bio.indiana.edu/). A, vues latérales en microscopie électronique à balayage. B, schéma des mouvements morphogénétiques aux stades correspondants. Les différents feuillets sont représentés par des couleurs distinctes.

description précise des mouvements morphogénétiques de la gastrulation chez l'embryon de drosophile est disponible dans la référence [179]. Tous les mouvements décrits et illustrés dans ce paragraphe apparaissent de manière parfaitement reproductible d'un embryon sur l'autre.

a L'invagination du sillon ventral Chez la drosophile, l'invagination du sillon ventral est le premier mouvement morphogénétique de la gastrulation. Elle est à l'origine de la formation du mésoderme[5]. Suivant directement la fin de la cellularisation des cellules ventrales, une bande d'environ 18 cellules de large et 60 cellules de long située dans la région ventrale de l'embryon subit une séquence de déformations cellulaires produisant une invagination (figure 4.6-stade 6). Les cellules invaginées forment alors un tube vers l'intérieur de l'embryon (figure 4.6-stade 7), puis se dispersent et forment une couche monocellulaire qui tapisse l'ectoderme (figure 4.6-stade 8).

b La formation du sillon céphalique Quasi-simultanément à l'invagination du sillon ventral (stade 6) se forme le sillon céphalique séparant une région antérieure (céphalique) et une région postérieure de l'embryon (figure 4.6 - stade 6). Il se situe à environ 2/3 de la longueur de l'embryon par rapport au pôle postérieur. Ce sillon prend naissance de chaque côté de l'embryon, au milieu des faces latérales, et s'étend ventralement et dorsalement pour former un sillon perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur.

c L'invagination de l'endoderme postérieur L'endoderme postérieur est internalisé avec les cellules polaires (lignée germinale) par une invagination ayant lieu au pôle postérieur de l'embryon à partir de la fin de l'invagination du sillon ventral et simultanément au début de l'extension de la bande germinale [179, 143]. Cette invagination concerne une bande centrée sur le pôle postérieur de vingt cellules le long de l'axe dorso-ventral et de dix cellules latérales.

d L'extension de la bande germinale L'extension de la bande germinale est le mouvement le plus spectaculaire de la gastrulation chez l'embryon de drosophile. Selon l'axe antéro-postérieur, la bande germinale correspond à la région qui s'étend du pôle postérieur au sillon céphalique. Selon l'axe dorso-ventral, toutes les cellules participent à la bande germinale à l'exception des plus dorsales. L'extension de la bande germinale commence lors de l'invagination de l'endoderme postérieur (stade 7). Pendant cette phase d'extension, cette bande s'étend de 2.5 fois sa longueur suivant l'axe antéro-postérieur [180] et sa largeur diminue de moitié. L'extension s'effectue principalement vers le pôle postérieur et remonte du côté dorsal pour se propager antérieurement (flèche grise de la figure 4.6-B au stade 8).

4.1.2 Visualiser et quantifier les mouvements morphogénétiques : enjeu

Les mouvements morphogénétiques que nous avons décrits dans le paragraphe précédent sont à la fois complexes et parfaitement reproductibles dans l'espace et le temps. Cette constance suggère l'existence de processus très fins de régulation, mais les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas entièrement élucidés. Cette question reste un enjeu en biologie du développement [181] et l'étude de la régulation de la morphogénèse embryonnaire amène à s'interroger sur les interactions entre les mécanismes *inductifs* qui contrôlent l'expression génétique et les mécanismes

[5]Ce mouvement est d'ailleurs aussi appelé « invagination du mésoderme ».

morphogénétiques qui engendrent les formes et les structures de l'embryon. On peut formuler cette question de la façon suivante :

> l'expression génétique, agissant sur les propriétés des cellules (adhésion, forme...) peut induire des mouvements de tissus dans l'organisme. S'il y a une régulation fine des mouvements, peut-on supposer qu'il existe une boucle de rétroaction permettant aux contraintes mécaniques de moduler l'expression génétique ?

Il existe aujourd'hui un certain nombre d'études qui appuient l'hypothèse d'une expression génétique mécano-sensible impliquée dans le contrôle du développement embryonnaire (voir [182] ou [183] pour une revue). Par exemple, le rôle mécanique inducteur du flux hémodynamique a été montré durant la formation du rein et du cœur chez le poisson zèbre [184, 185]. Il est intéressant de remarquer que le contrôle mécanique de la morphogénèse est une question émergente en biologie animale [186] alors que ce processus est déjà bien établi en biologie végétale. Ainsi, même si les mécanismes mis en jeu peuvent être très différents, la perception de la déformation et l'identification de gènes mécano-sensibles permettant un contrôle de la croissance et de la morphogénèse chez les plantes par des sollicitations mécaniques sont déjà admis [187, 188].

La question de l'induction mécanique des gènes durant la morphogénèse a été étudiée par Willy Supatto pendant sa thèse à l'Institut Curie sous la direction d'Emmanuel Farge, en collaboration avec le Laboratoire d'Optique et Biosciences. En particulier, W. Supatto s'est attaché à montrer l'expression mécano-sensible du gène *twist*[6] durant le développement de la drosophile, au niveau du pôle antérieur de l'embryon [35, 168].

Or, pour étudier la transduction d'un signal mécanique en un signal biochimique (induisant une expression génétique) et montrer l'expression génétique mécano-sensible d'un gène, il est nécessaire de disposer d'une description quantitative des mouvements morphogénétiques. En fournissant une description précise du comportement mécanique des cellules chez des embryons perturbés ou non, une telle approche quantitative permet de corréler zones de déformation et profils d'expression génétique et d'aborder la question de la spécificité mécanique de la réponse mécano-sensible. Pour cela, il est tout d'abord essentiel de pouvoir visualiser ces mouvements avec une bonne résolution spatiale et temporelle, sans les perturber.

> Cette étude centrée sur l'expression mécano-sensible de *twist* a motivé notre intérêt pour la visualisation du développement de l'embryon de drosophile, mais de façon plus générale, la **description du phénotype dynamique** des embryons sauvages ou mutants a été relativement peu développée jusqu'à présent, notamment à cause de l'absence de technique de visualisation adaptée. Or cette description est essentielle pour comprendre les aspects biomécaniques de l'embryogénèse, comme par exemple les relations entre déformations cellulaires et morphogénèse tissulaire, ou entre la distribution spatiale des contraintes et la déformation des tissus. La mise au point de nouvelles techniques d'imagerie *in vivo* adaptées est nécessaire pour appréhender expérimentalement ces problématiques nouvelles en biologie du développement et élaborer ensuite des modèles de morphogénèse dynamique.

[6] gène à l'origine des déformations cellulaires provoquant une invagination.

Malheureusement, si la drosophile est particulièrement adaptée à une étude génétique, elle présente l'inconvénient majeur d'avoir un développement très difficile à observer. Il est en effet particulièrement rapide alors que l'embryon est extrêmement opaque à la lumière visible. Nous allons donc passer en revue dans le paragraphe suivant les méthodes d'imagerie existantes et montrer l'intérêt de la microscopie THG dans ce contexte.

4.1.3 Les méthodes d'imagerie du développement de la drosophile

C'est en partie à cause de la rapidité de son développement ainsi que de son opacité que d'autres organismes, comme le poisson zèbre *Danio rerio*, sont actuellement préférés à la drosophile comme modèles pour l'étude dynamique des mouvements morphogénétiques. A titre d'exemple, l'embryon de poisson zèbre, qui est sensiblement plus transparent que celui de la drosophile, présente une gastrulation qui dure plus de 4 heures, comparé à seulement 45 minutes chez la drosophile. Par conséquent, l'étude dynamique de la gastrulation de la drosophile a d'abord nécessité des méthodes indirectes comme l'extrapolation du mouvement à partir d'images « statiques » obtenues en microscopie électronique à balayage [189] ou à l'aide de coupes sophistiquées d'embryons fixés [190]. Plus récemment, et malgré les limites des techniques d'imagerie conventionnelles, l'intérêt d'une approche dynamique *in vivo* a été démontré en utilisant la microscopie en lumière transmise [180] ou la microscopie de fluorescence conventionnelle ou confocale (voir par exemple [178, 191, 192]). Cette dernière approche a pris son essor à partir de 1995 avec l'introduction de souches transgéniques de drosophile exprimant la GFP [193].

Pour visualiser correctement les mouvements morphogénétiques dans l'embryon, il est nécessaire d'utiliser une technique satisfaisant principalement à trois critères : d'abord, elle doit fournir une description des mouvements résolue en trois dimensions. Ensuite, l'embryon étant très diffusant, elle doit permettre d'obtenir des images en profondeur dans ce type de milieu. Enfin, elle doit être suffisamment peu invasive pour permettre de visualiser l'embryon sur le long terme sans perturber son développement. Nous allons donc dans ce paragraphe évaluer les performances des différentes techniques d'imagerie de l'embryon de drosophile selon ces trois critères.

a La microscopie en lumière transmise La microscopie en lumière transmise a l'avantage d'être très simple et peu onéreuse à mettre en œuvre. Elle est cependant difficile à utiliser pour l'étude de la gastrulation chez la drosophile du fait de l'opacité de l'embryon. Comme l'illustre la figure 4.7, avant la gastrulation, l'embryon apparaît presque noir en lumière transmise, à l'exception d'une bande occupée par les noyaux à la périphérie. On peut relier cette opacité centrale à la présence d'une forte densité de corps lipidiques micrométriques en bordure du vitellus. En effet, comme on l'a vu dans la section 3.2.1.3, page 117, ces structures, qui induisent une forte diffusion de la lumière visible (voir figure 4.11 et figure 1.11, page 23), sont ségrégées à la base de la région des noyaux pendant la cellularisation, expliquant la transparence de la zone périphérique de l'embryon. Au début de la gastrulation, les corps lipidiques vont recoloniser les cellules [144] et on observe une opacification de la région périphérique (figure 4.7-b).

D'autre part, cette technique ne permet pas d'obtenir une résolution tridimensionnelle sur un échantillon aussi épais ($\approx$ 150-200 µm), ce qui limite son utilisation pour l'analyse quantitative

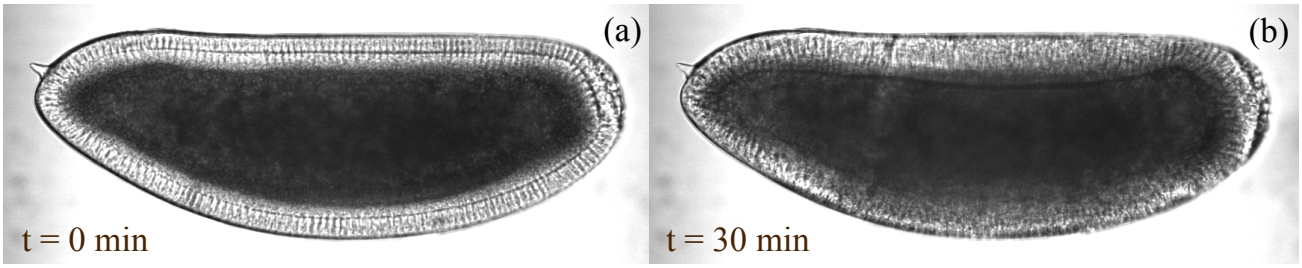


FIG. 4.7 – L'EMBRYON DE DROSOPHILE EN LUMIÈRE TRANSMISE.
(a), pendant la cellularisation, le vitellus est très opaque mais la région des noyaux est transparente. (b), au début de la gastrulation, les cellules s'opacifient à cause de la recolonisation des corps lipidiques.

des mouvements : on verra un exemple des problèmes rencontrés pour la quantification dans la section 4.2.2. Ainsi, l'imagerie en lumière transmise sera insuffisante pour obtenir les données nécessaires à l'analyse du mouvement des tissus, notamment à l'intérieur de l'embryon.

b La microscopie de fluorescence à un photon De la même façon, l'imagerie conventionnelle de fluorescence est inadaptée pour obtenir des images résolues en trois dimensions dans les embryons (figure 4.9). La microscopie confocale permet d'obtenir ce sectionnement optique mais elle est limitée par la diffusion très forte au centre de l'embryon (section 4.2.1). Elle est donc plus adaptée pour visualiser la surface de l'embryon [194, 195] qu'une coupe sagittale, pour laquelle la forte autofluorescence du vitellus et le caractère diffusant de l'embryon induisent un bruit de fond important. En outre, l'utilisation de la microscopie confocale à un photon pose d'importants problèmes de phototoxicité, surtout si l'on cherche à suivre le développement de l'embryon en 3 dimensions [23].

c La microscopie de fluorescence à deux photons Ces arguments incitent à utiliser préférentiellement la microscopie 2PEF pour faire l'image des embryons de drosophile : en effet, Squirrell *et al.* [23] ont montré une très nette réduction de la phototoxicité chez les embryons de hamster entre la microscopie 1PEF et 2PEF, notamment du fait de l'absorption réduite des espèces endogènes.

La fluorescence endogène du vitellus (et, en dessous de 750 nm, des mitochondries entourant les noyaux) permet d'envisager une imagerie sans marquage de l'embryon. Cependant, comme elle n'est significative que pour des courtes longueurs d'onde d'excitation (figure 4.8)[7], elle s'accompagne d'une phototoxicité importante empêchant le développement de l'embryon. Ceci concorde avec de nombreuses études attestant de la toxicité de l'imagerie 2PEF prolongée dans la gamme 750-850 nm [196, 197, 198].

Ainsi, il est nécessaire pour visualiser l'embryon en microscopie 2PEF d'utiliser un marquage

[7]L'origine de cette fluorescence n'est pas documentée dans la littérature. D'après les spectres d'excitation et de fluorescence que nous avons obtenus (figures 4.8 et 4.9, et référence [48]), nous l'avons attribuée majoritairement au NADH, qui n'est pas excité significativement au dessus de 800-850 nm.

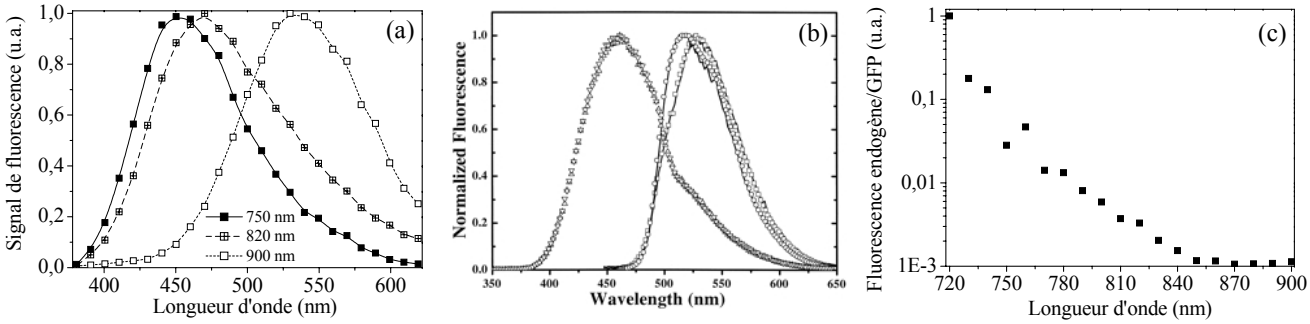


FIG. 4.8 – FLUORESCENCE ENDOGÈNE DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE.
(a), le spectre d'émission de la fluorescence endogène du vitellus que nous avons mesuré pour différentes longueurs d'onde d'excitation, très proche des spectres du NADH publiés par Huang *et al.* [53] (spectre du NAD(P)H excité à 750 nm, rond et triangles, et de différentes flavines, traits+points, courbe b), incite à attribuer la majeure partie de la fluorescence détectée à cette molécule. Corroborant cette analyse, l'efficacité d'excitation (ici comparée à celle de la e-GFP dans un embryon transgénique dont les noyaux sont marqués avec cette protéine) chute nettement lorsque la longueur d'onde d'excitation augmente (courbe c). Une fraction très faible de fluorescence subsiste cependant au delà de 850nm, attribuable partiellement à un marquage GFP non spécifique ainsi peut-être qu'à d'autres composants non identifiés.

qui est le plus souvent une protéine fluorescente comme la e-GFP[8] (figure 4.9).

Cette méthode de visualisation est très bien adaptée pour visualiser le développement de l'embryon, et permet d'obtenir des résultats spectaculaires sur l'ensemble de l'embryon dans un contexte transgénique [35]. Cependant, elle est essentiellement limitée par la nécessité de marquer l'embryon pour disposer d'une source de contraste utilisable. Ce marquage introduit deux difficultés : d'une part, il restreint ce type d'imagerie à des lignées transgéniques, ce qui pose problème dans un contexte où l'on cherche entre autres à faire l'image de mutants parfois complexes pour lesquels de telles lignées n'existent pas toujours[9]. D'autre part, ces marquages sont spécifiques d'un type de structure et ne sont généralement pas répartis dans l'ensemble de l'embryon : ainsi certaines régions ne seront-elle pas visibles.

Pour ces deux raisons, il est préférable de disposer d'une technique ne requérant aucun marquage. C'est dans ce contexte que nous avons développé l'imagerie de l'embryon par microscopie THG.

[8]enhanced GFP, protéine la plus utilisée dans les souches transgéniques de drosophile. Voir par exemple http://flybase.bio.indiana.edu/

[9]Notons d'autre part qu'un marquage par injection, bien que possible [191] est très délicat car la membrane vitelline entourant l'embryon forme une barrière impénétrable pour le colorant et son percement entraîne souvent la mort de l'embryon.

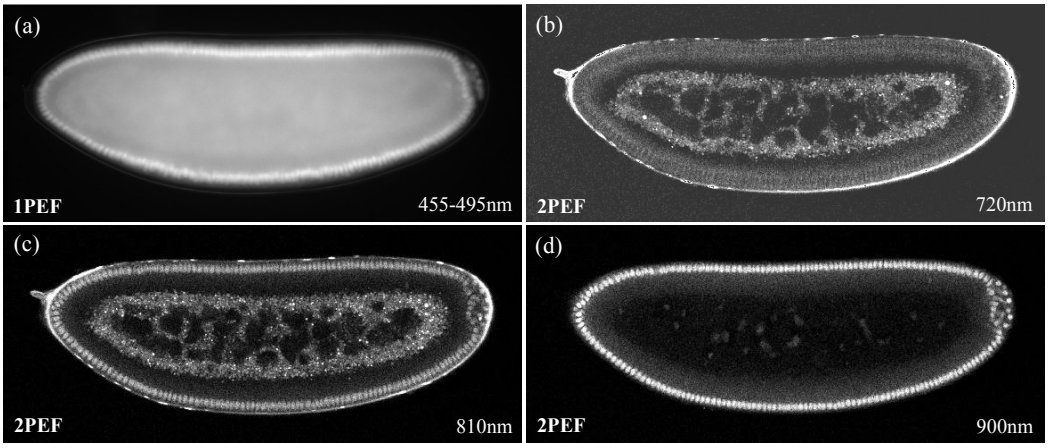


FIG. 4.9 – VISUALISATION D'UN EMBRYON DE DROSOPHILE EXPRIMANT UNE GFP LOCALISÉE DANS LES NOYAUX.
(a), visualisation en microscopie de fluorescence conventionnelle. La forte autofluorescence du vitellus est d'intensité comparable à la celle de la GFP. (b-d), microscopie 2PEF avec différentes longueurs d'onde d'excitation. Pour les courtes longueurs d'onde (720 nm), on détecte essentiellement le signal d'autofluorescence du vitellus, des mitochondries qui dessinent le contour des noyaux, ainsi que de la membrane vitelline. Pour les grandes longueurs d'onde au contraire, la fluorescence endogène est pratiquement inexistante et on visualise les noyaux marqués par la GFP.

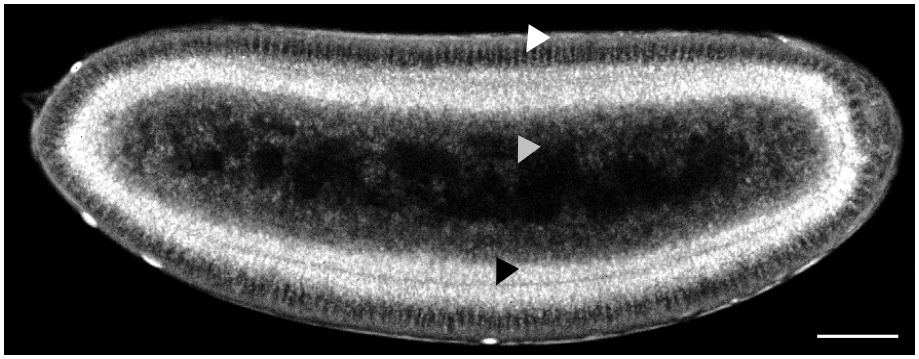


FIG. 4.10 – VISUALISATION D'UN EMBRYON DE DROSOPHILE SAUVAGE EN MICROSCOPIE THG.
Embryon déchorionné (voir appendice E), en cours de cellularisation. Le signal provenant des corps lipidiques permet de visualiser la position du front de cellularisation (flèche noire) et délimite le contour des noyaux (flèche blanche). Un signal provient également de structures de quelques microns présentes dans le vitellus (flèche grise). Barre d'échelle, 50 µm. Longueur d'onde d'excitation 1180 nm, puissance 100 mW, ouverture numérique 0.6, temps d'acquisition 3 s.

4.2 Imagerie THG du développement des embryons de Drosophile

4.2.1 L'embryon de drosophile en microscopie THG

L'utilisation de la microscopie THG pour visualiser le développement de la drosophile nécessite tout d'abord une caractérisation des propriétés optiques des embryons, en termes de sources de signal et d'atténuation du signal avec la profondeur (paragraphe 4.2.1). Nous avons ensuite confirmé la possibilité d'analyser quantitativement les images obtenues pour déterminer les champs de vitesse des tissus embryonnaires pendant la gastrulation (paragraphe 4.2.2).

La figure 4.10 présente une coupe sagittale d'un embryon en cours de cellularisation, visualisé en imagerie THG. Les corps lipidiques donnent un fort signal permettant de visualiser en contraste négatif les noyaux et le front de cellularisation. Un des avantages de la microscopie THG (pour une excitation à 1180 nm) par rapport à la microscopie 2PEF autour de 900 nm est la présence d'un signal au niveau du vitellus : ceci est lié à la différence des propriétés de diffusion de l'embryon entre ces deux longueurs d'onde. Celles-ci sont illustrées sur la figure 4.11.

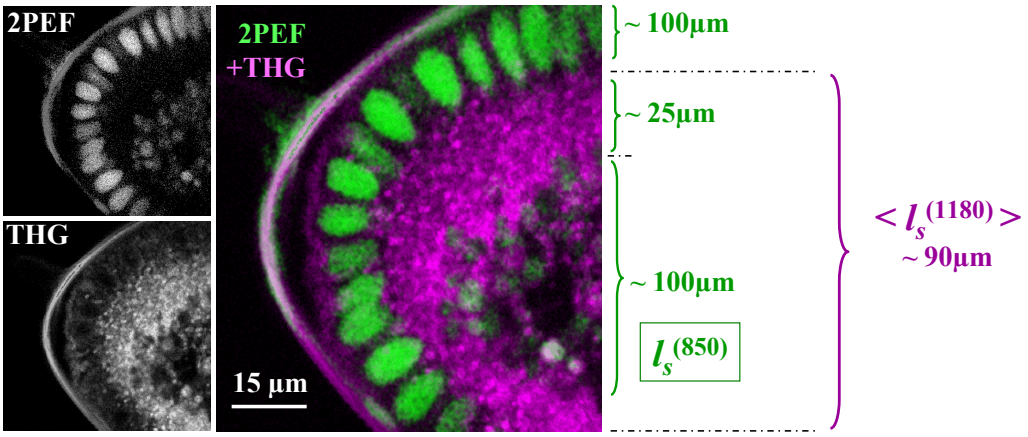


FIG. 4.11 – PROPRIÉTÉS DE DIFFUSION DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE.
Comparaison des propriétés de diffusion de l'embryon de drosophile à 850 nm (dans le cas de la microscopie 2PEF, en vert) et 1.18 µm (dans le cas de la microscopie THG, en violet).

Les valeurs des longueurs de diffusion présentées ont été déterminées en mesurant l'atténuation du signal en fonction de la profondeur. Il s'agit de valeurs approximatives : en toute rigueur, le libre parcours de diffusion dans le tissu est défini pour un milieu homogène et semi-infini, tandis que l'embryon est constitué de couches successives très hétérogènes. D'autre part, une fraction de l'atténuation du signal est probablement liée à la déformation du volume focal par les aberrations optiques induites par le tissu [78]. Ces valeurs expliquent toutefois la difficulté d'obtenir un signal 2PEF dans l'espace vitellin, liée à la forte diffusion mesurée dans la zone contenant les corps lipidiques (que l'on peut relier à l'opacité constatée en lumière transmise). Cette zone semble moins diffusante autour de 1.18 µm, comme le prévoit la figure 1.11 (page 23), ainsi que

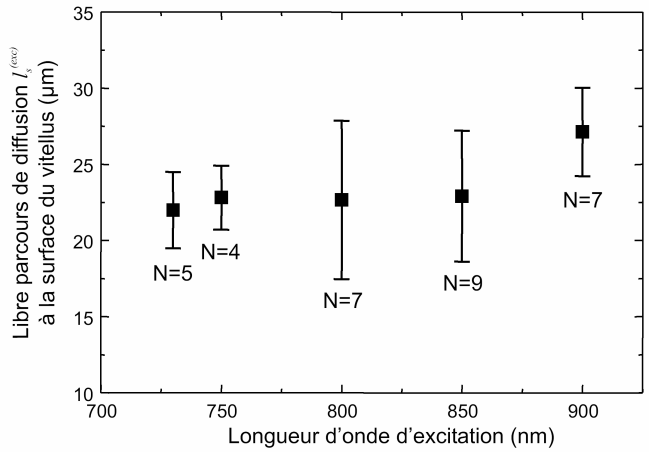


FIG. 4.12 – INFLUENCE DE LA LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION sur la longueur de diffusion, dans la gamme spectrale du titane-saphir et dans la région des corps lipidiques. Le nombre N indiqué sous chaque point correspond au nombre d'embryons pour lesquels la mesure a été effectuée [168].

l'évolution des valeurs de la longueur de diffusion avec la longueur d'onde dans la gamme du titane-saphire (figure 4.12).

Finalement, comme l'indique la figure 4.10, une coupe sagittale de l'embryon peut être obtenue en 2-3 s avec une résolution suffisante (typiquement 0.6 µm/pixel) pour visualiser correctement les différentes structures. En acquérant de telles images à des intervalles de temps successifs de quelques dizaines de secondes, on obtient une séquence de développement de l'embryon telle que celle présentée sur la figure 4.13.

A partir d'une telle séquence, on cherche à décrire quantitativement les mouvements des tissus en calculant le champ de vitesse dans l'embryon.

4.2.2 Quantification des mouvements morphogénétiques : la PIV

Il existe principalement deux façons de décrire les mouvements d'un ensemble de structures, d'un fluide ou d'un solide en déformation. La première est l'approche lagrangienne, dans laquelle chaque particule ou chaque point de l'échantillon est suivi au cours du temps. La seconde est l'approche eulérienne, dans laquelle la vitesse est mesurée ou calculée pour un élement de volume fixe[10].

L'approche lagrangienne est utilisée en biologie dans les méthodes dites de « tracking », où la vitesse de cellules individuelles, d'organelles ou de molécules uniques est quantifiée en repérant leur déplacement d'une image sur l'autre. En biologie du développement, cette technique a été utilisée en particulier pour suivre les mouvements morphogénétiques [199, 200, 201, 202].

[10]Un exemple classique de description lagrangienne ou eulérienne est le passage de voitures sous des ponts : dans une description lagrangienne, il y a un observateur dans chaque voiture, qui mesure sa propre vitesse à chaque instant. Dans la description eulérienne, il y a un observateur sur chaque pont, qui mesure à chaque instant la vitesse des voitures passant en dessous. Dans un soucis de réduction des émissions de gaz à effet de serre, les voitures peuvent aisément être remplacées par des cyclistes.

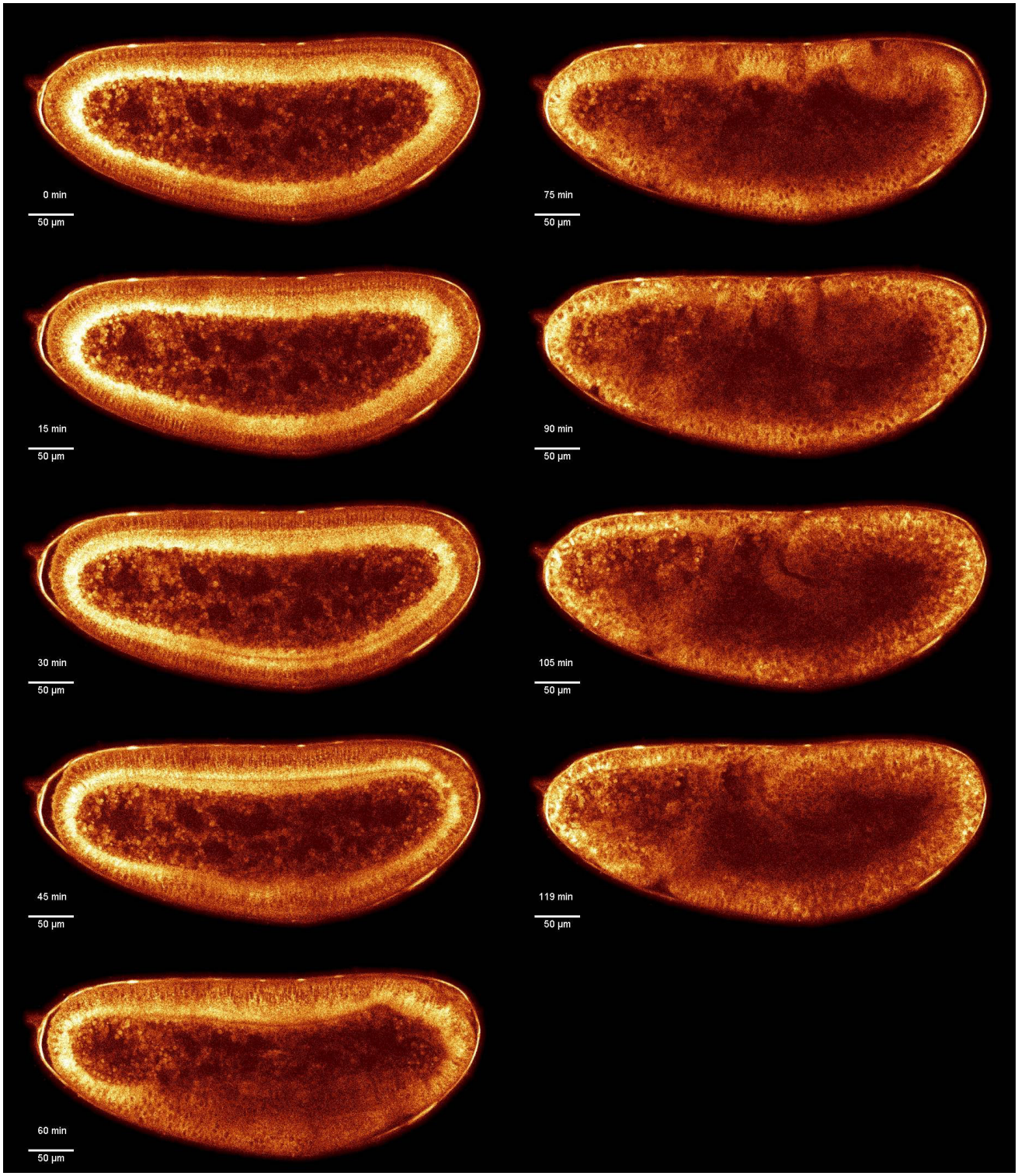


FIG. 4.13 – SÉQUENCE DE DÉVELOPPEMENT EN MICROSCOPIE THG.
0-45 min, cellularisation. 45-120 min, gastrulation. La séquence a été acquise dans les conditions décrites sur la figure 4.10, avec une résolution temporelle (définie comme l'intervalle entre deux images successives) de 30 s.

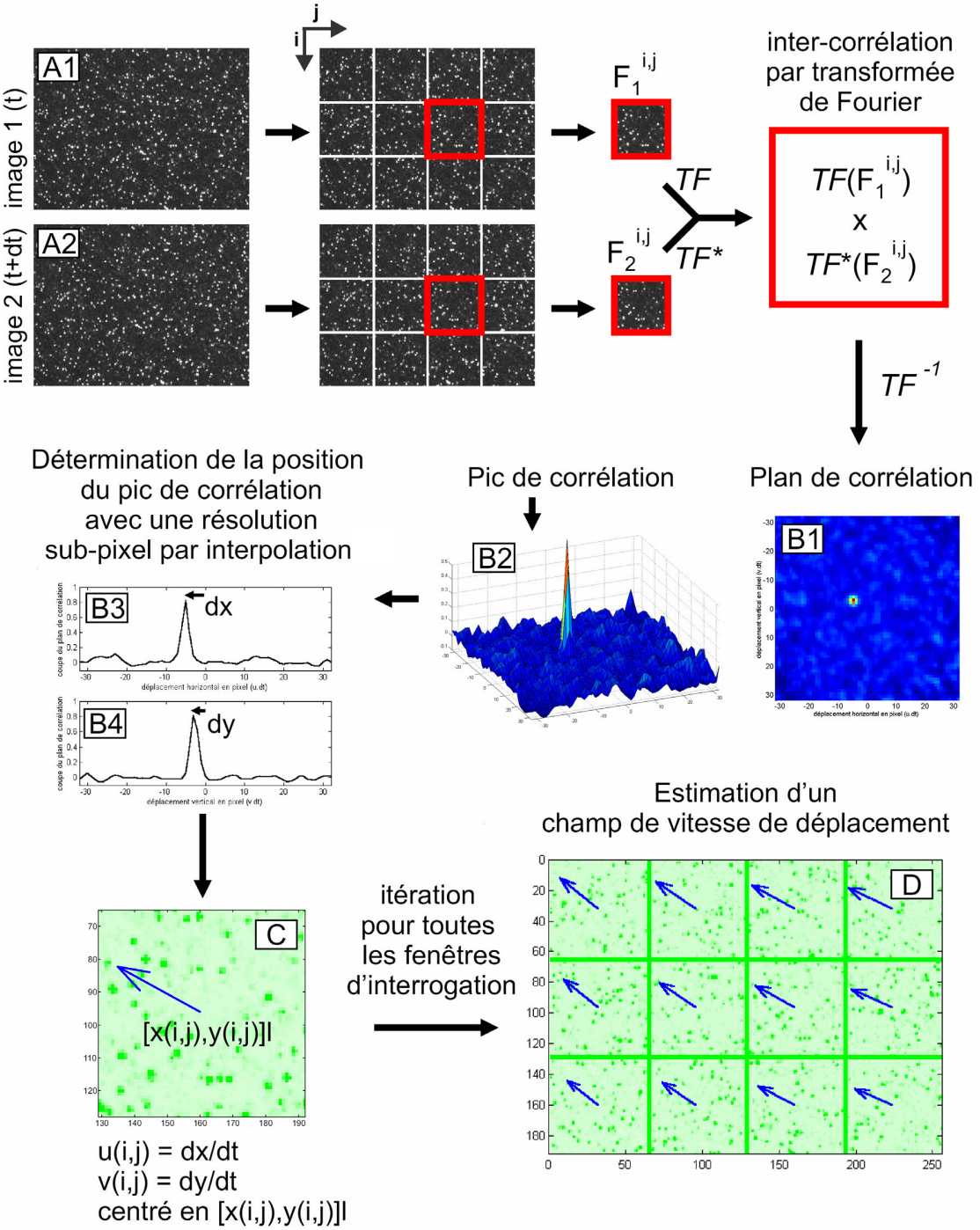


FIG. 4.14 – PRINCIPE DE L'ESTIMATION DU CHAMP DE VITESSE PAR PIV (voir texte). Figure extraite de la référence [168].

L'approche eulérienne est beaucoup moins familière aux biologistes. Seules quelques études utilisent cette approche, à l'échelle cellulaire, pour étudier par exemple le champ de déformation imposé à une cellule [203]. Cette approche est pourtant complémentaire du tracking, notamment lorsque l'on s'intéresse au mouvement global de tissus : en effet, elle permet d'obtenir directement le champ de vitesse dans l'échantillon, et donc par dérivation le champ de déformation

(compression, cisaillement...). Il est toujours possible de passer d'une description lagrangienne à une description eulérienne des mouvements, par exemple en effectuant une interpolation spatiale du champ discret lagrangien. Cependant ce passage se fait au prix d'une étape supplémentaire de calcul, source d'erreur supplémentaire sur le résultat obtenu[11].

La vélocimétrie par image de particules (*particle image velocimetry*, ou PIV) est une technique développée en mécanique des fluides pour obtenir une description eulérienne du champ de vitesse d'écoulement. Cette technique a connu un essor important depuis son apparition au début des années 1980 et est aujourd'hui une technique de routine en mécanique des fluides [204]. Depuis quelques années, elle trouve également des applications en biologie, telles que l'étude de la propulsion d'insectes dans les fluides [205, 206] , l'étude du flux sanguin sur le développement du cœur chez le poisson-zèbre [185] ou encore l'étude de la croissance des plantes [207].

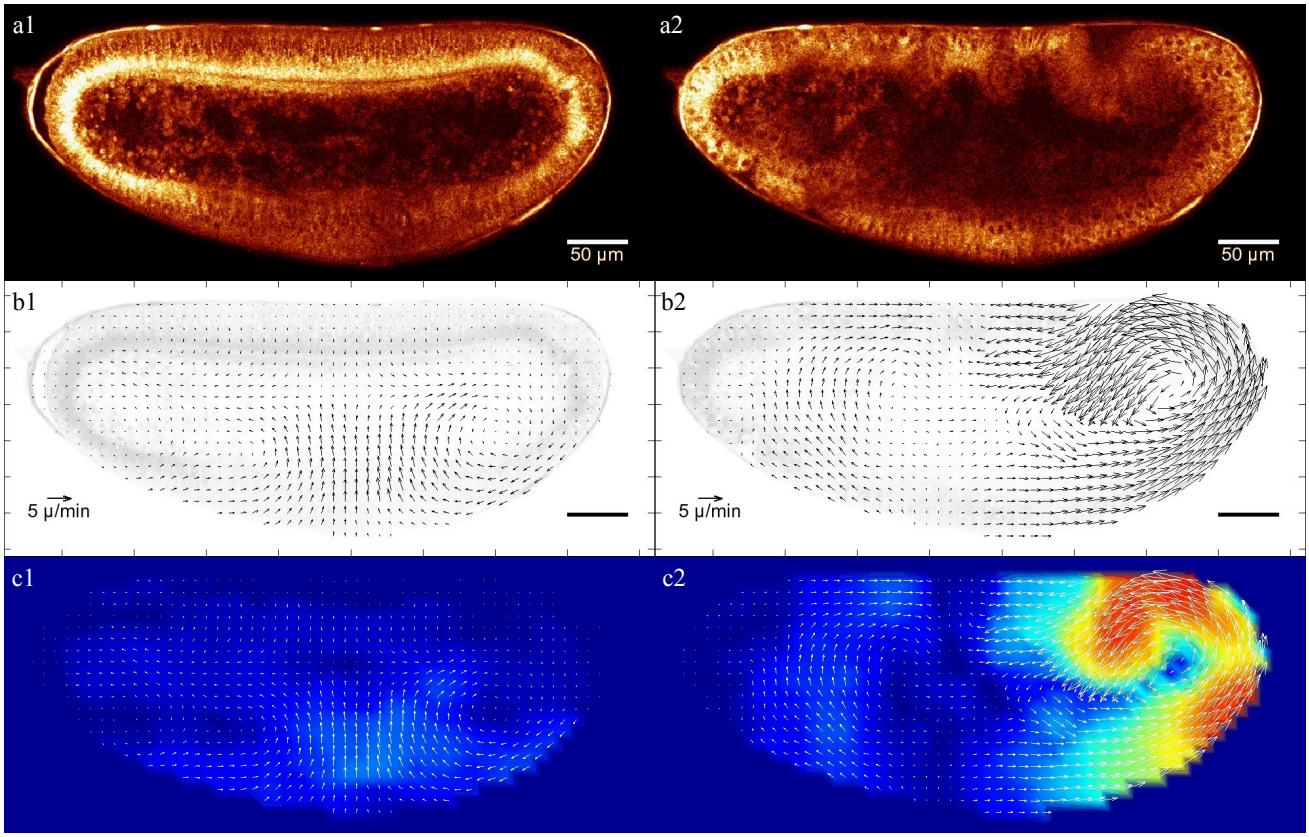


Fig. 4.15 – Estimation du champ de vitesse par PIV à partir d'une séquence de développement obtenue en microscopie THG.
(a), images THG utilisées pour l'estimation pendant l'invagination du mésoderme (1) puis l'extension de la bande germinale (2). (b), champ de vitesse calculé par PIV aux instants correspondants. (c), champ de vitesse représenté avec la norme de la vitesse, codée en couleur du bleu (0 µm/min) au rouge (environ 10 µm/min)

La PIV est une méthode de mesure de la vitesse instantanée et bidimensionnelle d'un écou-

[11] De même, bien que cette description ne soit pas adaptée pour ce type de problématique, on peut obtenir des trajectoires individuelles à partir d'une description eulérienne.

lement à partir de l'analyse d'une séquence d'images à deux dimensions. Elle repose sur le calcul du plan d'intercorrélation entre deux fenêtres d'interrogation découpées au même endroit dans deux images successives (figure 4.14). Le déplacement moyen du tissu entre ces deux images dans la fenêtre d'interrogation est alors estimé de manière statistique en déterminant la meilleure superposition entre les deux fenêtres, repérée par un pic dans le plan d'intercorrélation. En répétant le processus pour des fenêtres couvrant l'ensemble de l'image de départ, on obtient une estimation du champ de vitesse dans le tissu au cours du temps.

En pratique, l'utilisation de la PIV pour quantifier les mouvements des tissus demande certains ajustements, notamment en termes de filtrage des images. Les images utilisées sont en effet très différentes de celles classiquement utilisées en mécanique des fluides (figure 4.14-A1), où le fluide est ensemencé par de petites particules (traceurs). Cette adaptation à partir du package MatPIV (disponible gratuitement sur internet à l'adresse : http ://www.math.uio.no/ ∼jks/matpiv/ [208]) a été réalisée par W. Supatto et fait partie de ses travaux de thèse [168].

Un exemple de séquence obtenue pendant la gastrulation de l'embryon de drosophile est présenté sur la figure 4.15. La séquence utilisée est celle de la figure 4.13, et deux instants (t=15 et 45 min après le début de la gastrulation) ont été sélectionnés pour illustrer l'invagination du mésoderme et l'extension de la bande germinale.

La validité des champs de vitesse calculés à partir d'images 2PEF a été confirmée précédemment par W. Supatto [35, 168] en comparant les résultats obtenus par PIV avec ceux d'autres méthodes (tracking, kymographes). Cette étude nous fournit une référence pour vérifier la validité des champs obtenus à partir d'images THG.

4.2.3 Comparaison avec les autres techniques d'imagerie

La figure 4.16 présente les champs de vitesse que nous avons obtenus pendant l'invagination du mésoderme à partir de séquences de développement obtenues en microscopie en lumière transmise, 2PEF et THG.

Comparons tout d'abord le résultat obtenu en microscopie 2PEF et THG. La direction et la norme des champs obtenus dans différentes régions de l'organisme (invagination du mésoderme sur le ventre, extension de la bande germinale à l'arrière, formation du sillon céphalique à l'avant de l'embryon) sont comparables, ce qui valide les résultats obtenus avec des séquences de développement THG : l'embryon se développe normalement et il n'y a pas de biais significatif dans l'estimation des champs de vitesse liés par exemple à la nature cohérente du signal THG. En outre, par rapport à la microscopie 2PEF, la microscopie THG possède l'avantage de fournir un signal dans l'ensemble de l'embryon *à partir d'une souche sauvage* (figure 4.16 - (b2) et (c2)). Les informations sont ainsi obtenues dans un contexte non transgénique et sont plus complètes.

Si l'on compare maintenant les résultats obtenus avec la microscopie non linéaire à ceux obtenus en lumière transmise, les limites de cette dernière méthode apparaissent clairement sur cet exemple. En effet, à cause de *l'absence de sectionnement optique*, le champ de vitesse obtenu est erroné : le mouvement des cellules vers l'intérieur de l'embryon pendant l'invagination du mésoderme n'est pas visible (figure 4.17) car il est moyenné avec le mouvement en sens inverse des cellules sur les faces latérales de l'embryon (figure 4.5).

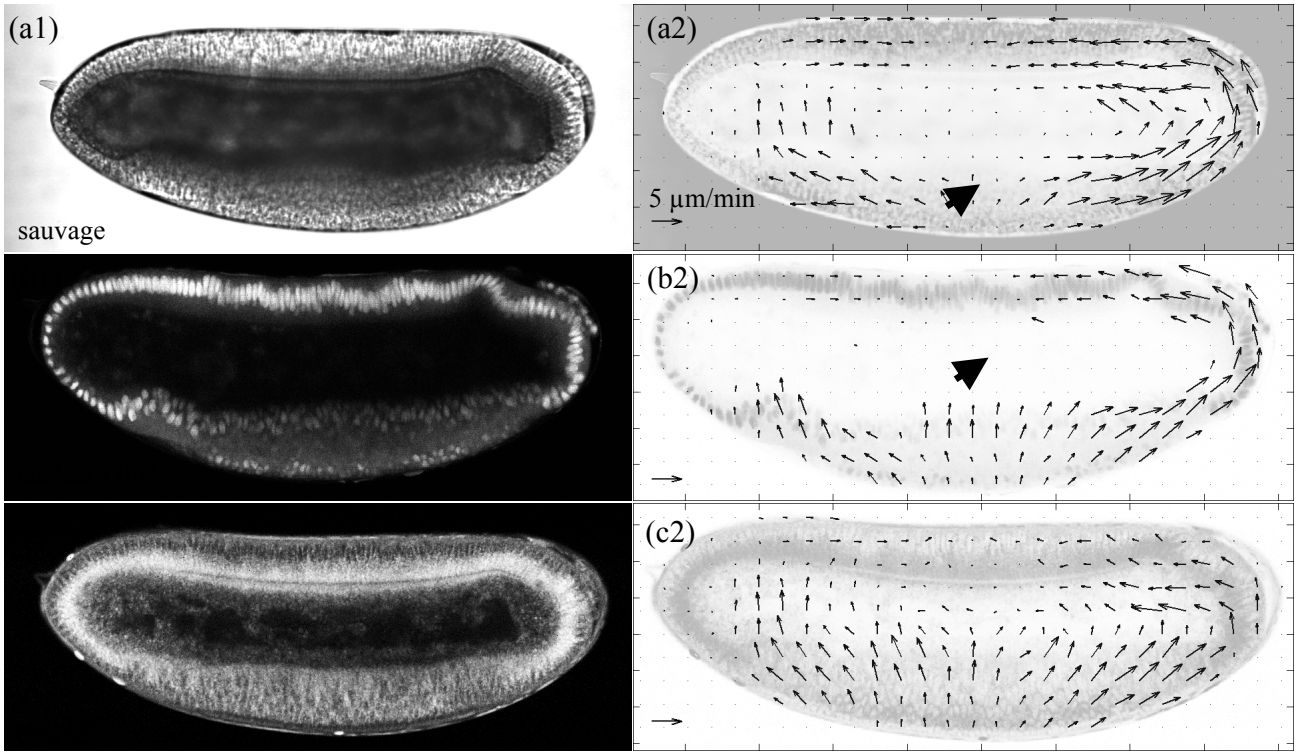


FIG. 4.16 – COMPARAISON DES CHAMPS DE VITESSE OBTENUS AVEC DIFFÉRENTES MÉTHODES D'IMAGERIE.
Image (1) et champ de vitesse calculé (2) dans le cas de la microscopie en lumière transmise (a), de la microscopie 2PEF (b) et de la microscopie THG (c), au moment de l'invagination du mésoderme. Les images (a1) et (c1) sont obtenues à partir d'embryons sauvages, l'image (b1) avec un embryon transgénique exprimant une GFP avec une séquence de localisation nucléaire.

La microscopie THG est donc un outil particulièrement adapté pour l'étude des mouvements morphogénétiques chez la drosophile dans un contexte non transgénique. Sa validation complète requiert cependant des études supplémentaires, et notamment l'évaluation de la phototoxicité liée à l'éclairement intense de l'échantillon.

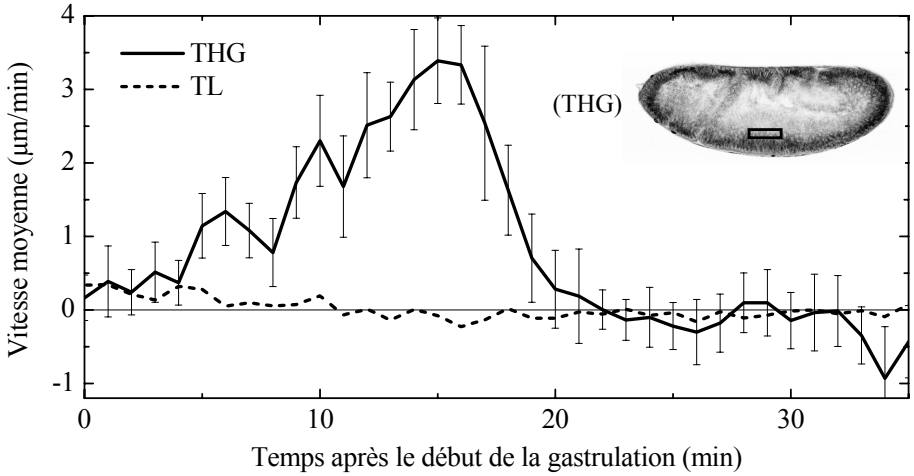


FIG. 4.17 – COMPARAISON DES CHAMPS DE VITESSE OBTENUS PAR IMAGERIE THG ET EN LUMIÈRE TRANSMISE.
Vitesse d'invagination dans la direction apico-basale mesurée au cours du temps pour une séquence acquise en microscopie THG (traits pleins) et en microscopie en lumière transmise (traits pointillés). La mesure a été effectuée dans la fenêtre indiquée sur l'image THG. Une vitesse positive correspond à un mouvement dans la direction basale (vers l'intérieur de l'embryon). Les barres d'erreur sont définies comme la variance des valeurs obtenues en différents points de la fenêtre.

4.3 Imagerie et perturbation du développement

Le succès de la microscopie multiphotonique en biologie repose en partie sur son caractère faiblement invasif comparé par exemple à la microscopie confocale (voir paragraphe 1.2.2.4). L'absorption linéaire du tissu est généralement grandement réduite par l'utilisation de sources infrarouges et les interactions lumière-tissu sont confinées au niveau du volume focal. Cependant, même si les puissances moyennes mises en jeu restent modestes (1-100 mW), les effets non linéaires tels que l'absorption multiphotonique ou la génération d'harmoniques requièrent des intensités crêtes de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de GW/cm^2. Des effets destructifs peuvent alors intervenir de façon localisée dans l'échantillon et conduire à la perturbation de ses fonctions biologiques, voire à sa destruction immédiate.

De même qu'il existe une « fenêtre de transparence » pour la longueur d'onde d'excitation minimisant les dommages induits, il existe également une « fenêtre de sécurité » déterminant les conditions d'imagerie (intensité et puissance crête, taux de répétition de la source, temps d'illumination, etc.) pour lesquelles la perturbation biologique reste minimale. En faisant varier ces paramètres, il est possible d'accéder à une large gamme d'effets allant d'une perturbation

indétectable jusqu'à l'ablation d'une partie de l'échantillon. Si les effets destructifs tels que la photoablation peuvent se révéler des outils précieux pour modifier l'intégrité mécanique d'un tissu [35], du cytosquelette d'une cellule [152] ou encore étudier la régénération neuronale [209], dans un contexte d'imagerie, il est nécessaire de les limiter autant que possible.

Dans cette section, nous allons d'abord décrire les mécanismes d'interaction laser-tissu et la chaîne d'évènements biologiques qu'ils induisent. A partir de ce contexte, nous avons cherché à déterminer quelles étaient les perturbations potentiellement mises en jeu dans nos expériences d'imagerie THG sur les embryons et quels paramètres d'imagerie étaient pertinents pour minimiser les photodommages.

4.3.1 Interactions laser-tissus et perturbations biologiques

Il existe un grand nombre d'études sur les effets de la lumière sur les tissus biologiques. Nous avons essayé dans ce paragraphe de résumer les différents effets décrits dans la littérature, à partir d'études réalisées pour des conditions d'illumination très diverses. En effet, malgré ces différences (longueur d'onde, temps d'illumination, durée des impulsions...), les effets mis en évidence sont très similaires et peuvent être englobés dans un schéma général traduisant les modes d'interaction de la lumière avec l'échantillon et les perturbations biologiques résultantes. Schématiquement, trois types de conditions expérimentales ont été étudiées :

- L'illumination par une lumière non focalisée, de puissance modérée, avec une source continue. Ce type d'illumination, pour des longueurs d'onde allant de l'ultraviolet à l'infrarouge, est utilisé en médecine pour induire des processus de prolifération cellulaire (thérapie par illumination d'intensité modérée ou *low level light therapy* (LLLT)) ou au contraire une destruction des cellules dans le cas où un photosensibilisateur (thérapie photodynamique ou PDT) ou un niveau d'éclairement plus fort sont utilisés [210, 211, 212].
- L'utilisation d'un faisceau très focalisé (NA=1-1.3), continu et de forte puissance moyenne (50-200 mW) pour le piégeage optique d'organelles, de cellules ou de particules exogènes. Dans ce cas, le faisceau est généralement fixe en un point de la cellule [196,213,214,215,216].
- La microscopie multiphotonique, qui requiert de fortes puissances crêtes (1-1000 GW/cm^2), des impulsions courtes (100-5000 fs) et des taux de répétition importants (80-120 MHz dans les études citées dans ce paragraphe), généralement dans l'infrarouge (700-1100 nm). Dans ce cas le faisceau est balayé à deux dimensions pour former une image de l'échantillon [23, 54, 81, 154, 197, 198, 217, 218, 219, 220].

Dans tous les cas, l'interaction de l'onde incidente avec le tissu requiert la présence d'un absorbeur. Celui-ci peut changer selon les longueurs d'onde et il peut s'agir aussi bien de l'eau que d'autres molécules biologiques. La première étape met donc en jeu une absorption à un ou plusieurs photons faisant passer la molécule dans un état excité (figure 4.18). Ensuite, plusieurs voies de désexcitation sont possibles [82]. La molécule peut tout d'abord céder son énergie sous forme de chaleur au tissu par désexcitation non radiative. Dans ce cas, on a échauffement du tissu et l'éclairement aboutit à des **dommages photothermiques**.

Elle peut également se dissocier ou changer d'état d'oxydo-réduction, ou encore transférer son énergie à l'oxygène pour aboutir à la formation d'espèces oxygénées réactives (*reactive oxygen species*, ou ROS). Dans tous ces cas, l'excitation résulte en une modification de la composition

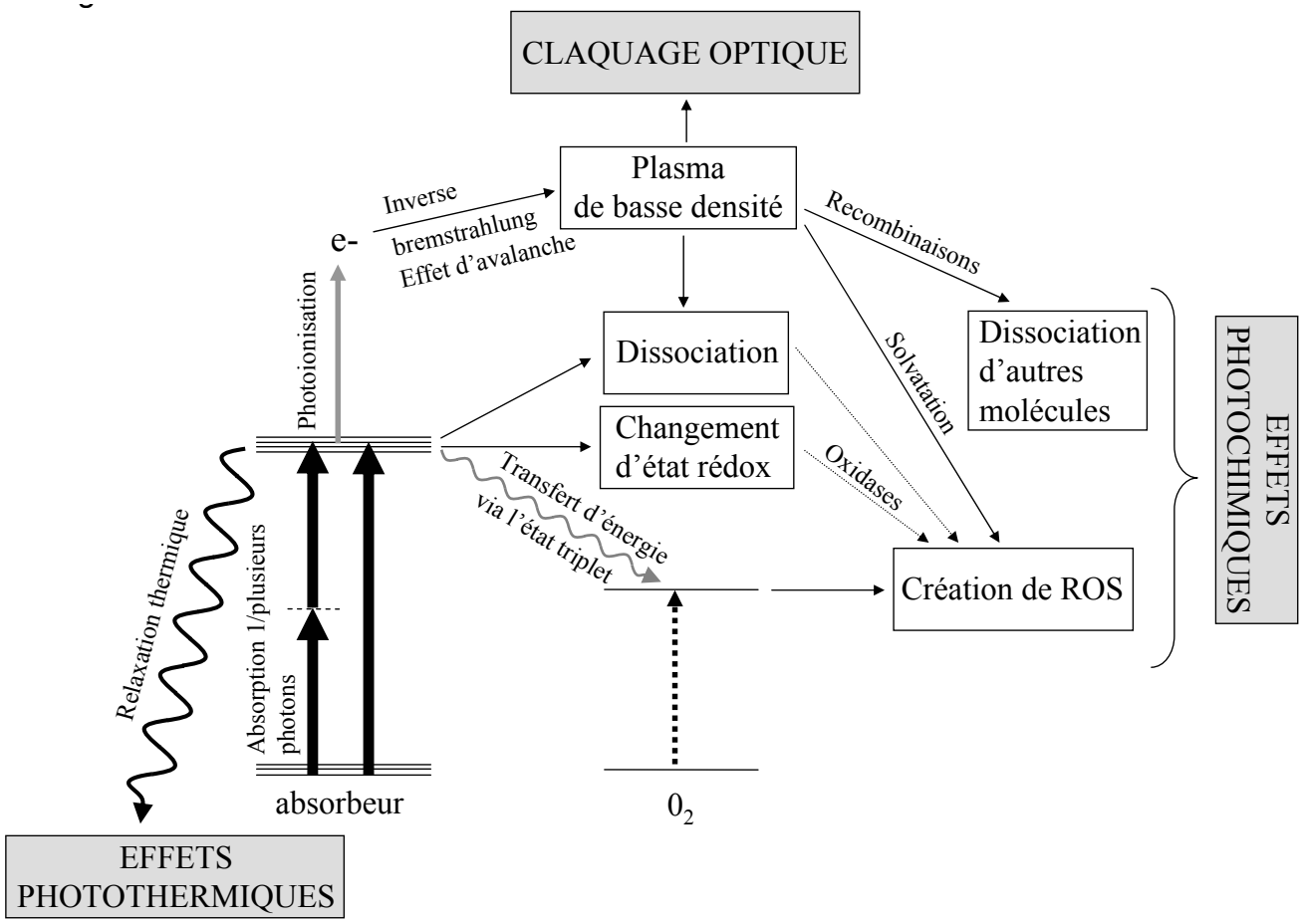


FIG. 4.18 – MÉCANISMES SCHÉMATIQUES D'INTERACTION LASER/TISSU.
Figure adaptée à partir de [82, 210, 211].

chimique du tissu et l'éclairement induit des **perturbations photochimiques**.

Enfin, si l'intensité lumineuse est suffisante, l'absorption ultérieure de plusieurs photons peut conduire à l'ionisation de la molécule. L'électron ainsi créé peut lui-même absorber des photons supplémentaires lors de collisions avec les molécules du milieu (*bremstrahlung* inverse) et ainsi gagner en énergie. Au delà d'une certaine énergie, il peut arracher un nouvel électron à une autre molécule, et la répétition de ce processus conduit par effet d'avalanche à la création d'un **plasma de basse densité**. Ce plasma peut ensuite interagir avec les molécules du milieu pour induire des effets photochimiques. Dans le cas où l'éclairement est fort, on peut aussi dépasser le seuil de **claquage optique**, de l'ordre de 10^{21} électrons/cm^3, au delà duquel le plasma formé n'est plus confiné : se produisent alors des effets mécaniques tels que la formation d'une onde de choc supersonique dans le tissu qui conduisent à la destruction immédiate des structures et la mort de la cellule ou du tissu [82, 221, 222].

Cet effet de claquage optique peut intervenir dans des conditions très proches de l'imagerie multiphotonique [35, 219], pour des puissances d'excitation plus fortes ou des vitesses de balayage plus lentes. Il s'accompagne d'une intense luminescence à large spectre, de durée de vie très courte [219]. Cependant, ce cas de figure n'est pas pertinent dans nos expériences, où la

densité d'électrons du plasma est inférieure de plusieurs ordres de grandeur au seuil de claquage (table 4.1, page 165 et référence [82], figure 5). De même, les effets photothermiques peuvent a priori être négligés dans la plupart des études, à l'exception des cas où il existe une très forte absorption linéaire dans le tissu, comme dans le cas de cellules pigmentées [154]. Nous confirmerons cette hypothèse dans le paragraphe 4.3.3.2. Nous allons donc nous concentrer sur les conséquences biologiques des effets photochimiques. Selon les études citées, ces effets proviennent de l'absorption à un, deux, voire trois photons, et sont assistés à des degrés variables par la présence d'un plasma de basse densité dans le tissu.

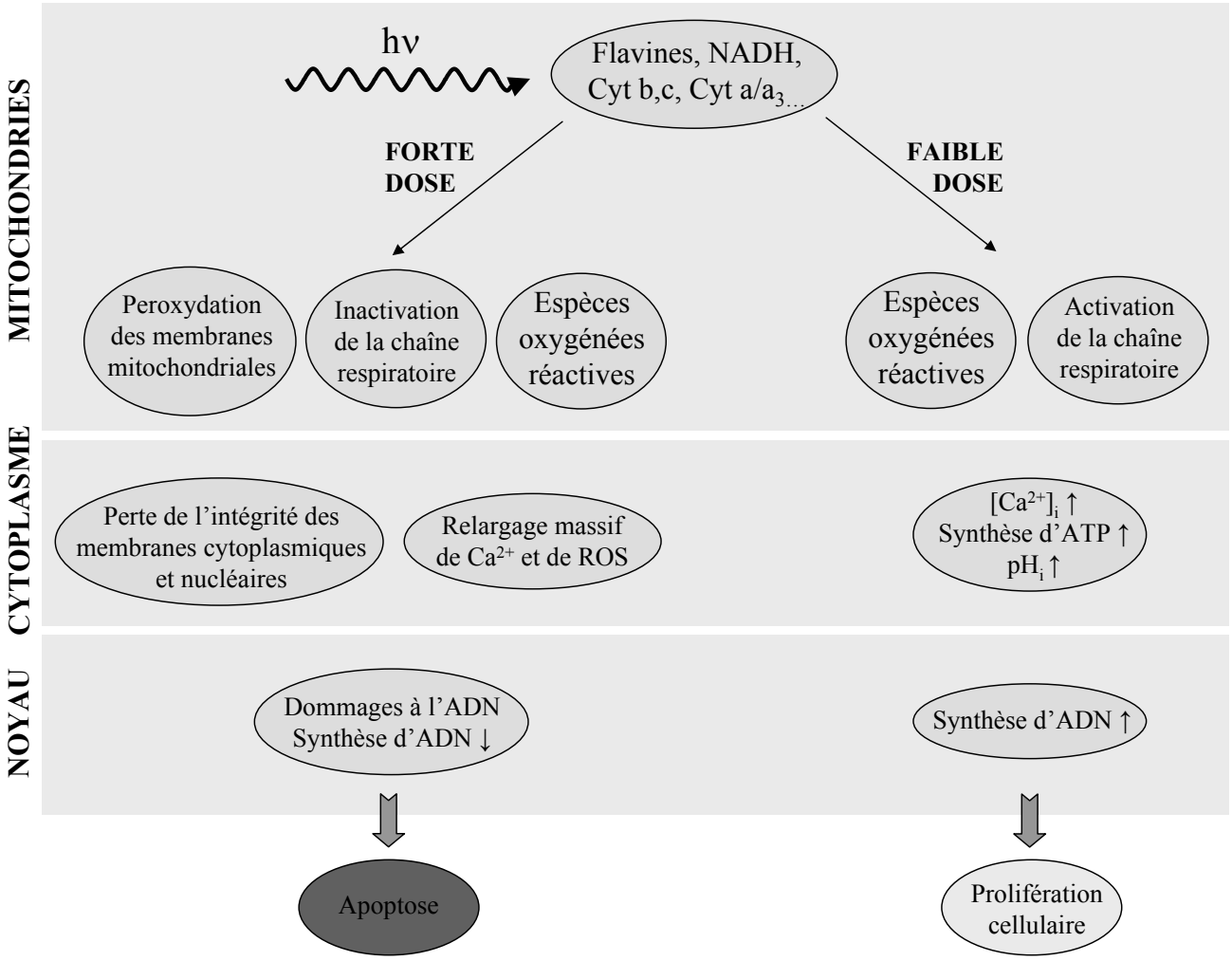


FIG. 4.19 – PERTURBATION BIOLOGIQUE - TRANSDUCTION DU SIGNAL.
Figure résumant les principaux effets décrits dans les articles cités dans cette partie, et notamment [210, 211, 212, 223, 224, 225]. Les effets biologiques dépendent de la dose lumineuse reçue, et peuvent conduire à une prolifération cellulaire ou à une mort par apoptose.

L'effet biologique de l'interaction avec le tissu dépend du ou des absorbeurs mis en jeu. Leur localisation dans le tissu va influer sur le type de perturbation biologique induite. A l'exception de l'illumination dans l'ultraviolet qui peut induire des dommages directs à l'ADN, toutes les études

relèvent une perturbation des mitochondries et de la chaîne respiratoire de la cellule, même pour des niveaux d'éclairement faibles. Les mitochondries contiennent en effet une forte concentration d'espèces (cytochromes, flavoprotéines, NADH, etc.) possédant des bandes d'absorption dans le visible et le proche ultraviolet.

Selon les longueurs d'onde, différentes molécules interviennent dans le processus d'absorption. Pour une illumination avec une lumière continue dans le bleu ou le violet, Hockberger *et al.* [211] proposent qu'une absorption par les flavines induise une activation des oxydases[12]. Plus loin dans le visible et dans le proche infrarouge, toujours pour des sources continues, la référence [210] propose un changement de l'état d'oxydation de la cytochrome c oxydase (ou cytochrome a/a_3) comme étape initiatrice de la perturbation. Le NADH peut également changer d'état d'oxydation sous l'effet d'une illumination à deux photons autour de 700-760 nm [225]. Ces molécules présentent toutes des absorptions maximales en dessous de 400-450 nm à un photon, et autour de 700-850 nm à deux photons, ce qui est cohérent avec la diminution de la toxicité observée lorsque la longueur d'onde d'excitation augmente [196, 197, 211, 213].

De nombreux mécanismes, éventuellement différents selon la molécule perturbée en premier lieu, sont ensuite mis en jeu. Tous impliquent une perturbation de la chaîne respiratoire de la cellule (toutes les espèces précédemment citées en faisant partie) et conduisent à la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS) (dont la formation semble requérir la présence d'oxygène [216, 211]) par exemple via la régénération d'un composant (NADH, flavine) par une oxydase [211, 225, 226]. Le terme ROS regroupe essentiellement l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, l'eau oxygénée H_2O_2 et son produit de dismutation $HO^{\cdot}$.

A partir de ces effets primaires, deux types de transduction du stress oxydatif créé sont possibles selon l'amplitude de ce signal [212, 225] : si la perturbation est faible, des mécanismes de **réparation** et de **protection**, éventuellement par l'intermédiaire de ces ROS [210] et de l'augmentation transitoire de calcium intracellulaire [212], interviennent et induisent une prolifération cellulaire [227]. Cet effet a été observé expérimentalement essentiellement dans le cadre de la LLLT, mais aussi pour de faibles puissances en microscopie 2PEF [54].

Quand la perturbation est plus forte, la capacité de réparation des cellules est dépassée et des effets toxiques graduels apparaissent : augmentation forte du calcium intracellulaire [212, 218], dépolarisation des membranes [228], désorganisation puis destruction des membranes mitochondriales [54], diffusion des ROS dans le cytoplasme [211], perte de l'intégrité de la membrane nucléaire [198], arrêt de la prolifération cellulaire [225], dommages à l'ADN [213, 229], et finalement mort par apoptose [198].

Selon les conditions expérimentales, les effets induits sont plus ou moins sévères. Les seuils au delà desquels les effets toxiques apparaissent peuvent être très différents d'une étude sur l'autre. En effet, les différents auteurs utilisent des critères d'évaluation différents (morphologiques, fonctionnels, capacité de division ultérieure, survie...) et des conditions d'illumination variées (source continue ou en impulsion, faisceau fixe ou balayant l'échantillon, focalisations différentes, nombre d'images acquises...). De plus, les paramètres nécessaires pour comparer les différentes études ne sont pas toujours spécifiés.

[12]Dans cette étude, les auteurs indiquent aussi une perturbation des peroxysomes, qui contiennent également une grande quantité de flavoprotéines

En conséquence, la comparaison directe de nos expériences avec celles de la littérature s'avère impossible. Nous allons cependant examiner nos résultats à la lumière des mécanismes que nous venons de décrire et qui apparaissent comme assez généraux.

4.3.2 Évaluation de la toxicité de l'imagerie THG

4.3.2.1 Critères d'évaluation de la phototoxicité

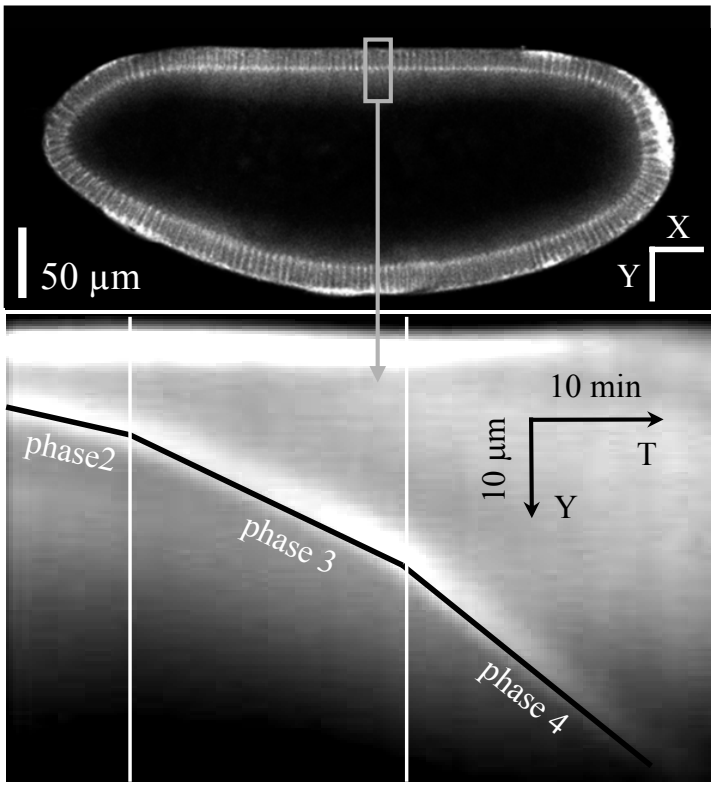


FIG. 4.20 – PRINCIPE DE MESURE DE LA VITESSE DE CELLULARISATION PAR KYMOGRAPHE.
On sélectionne une zone sur le côté dorsal de l'embryon, suffisamment petite pour que la vitesse du front de cellularisation puisse être considérée comme uniforme sur l'ensemble de la zone. En effectuant une projection selon l'axe apico-basal Y, en fonction du temps, on obtient le déplacement du front de cellularisation sous forme de droites, une pour chaque phase, dont la pente donne la vitesse de cellularisation. L'image présentée a été obtenue en microscopie 2PEF sur un embryon dont le contour cellulaire est marqué par une GFP (souche sGMCA [192]).

La phototoxicité de la microscopie THG pour l'imagerie de l'embryon de drosophile est a priori difficile à étudier par comparaison avec des cellules en culture, pour lesquelles on peut facilement ajouter une sonde telle qu'un marqueur de ROS. Dans le cas des embryons, il est très délicat d'injecter un composé à travers la membrane vitelline sans provoquer la mort de l'embryon. Nous avons donc choisi d'utiliser deux critères différents pour évaluer la phototoxicité :

– D'une part, la survie de l'embryon jusqu'au premier stade larvaire (environ 24 heures après la cellularisation) permet d'évaluer les effets à long terme sur le développement.
– D'autre part, nous avons utilisé la cellularisation comme sonde de l'intégrité du cytosquelette et de la température (paragraphe 4.1.1.3).

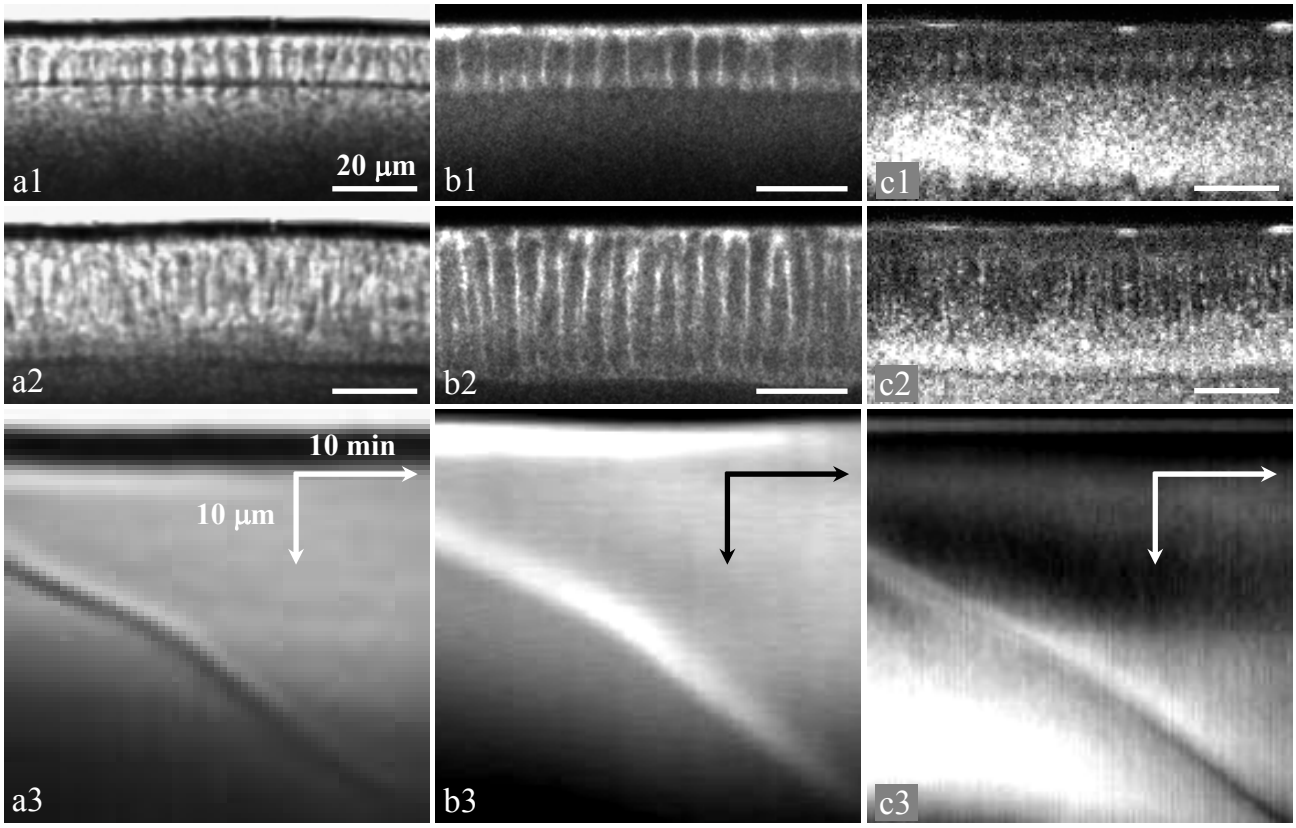


FIG. 4.21 – ALLURE DES KYMOGRAPHES OBTENUS pour les trois techniques de microscopie employées. (a), microscopie en lumière transmise. (b), microscopie 2PEF sur un embryon exprimant une GFP localisée au niveau des membranes cellulaires. (c), microscopie THG. Les images (1) et (2) se situent respectivement en début de phase 3 et fin de phase 4, les images (3) sont les kymographes obtenus pour chaque technique (figure 4.20).

Pour cela, nous avons mesuré, à partir des images de microscopie, la vitesse du front de cellularisation durant les phases 3 et 4 de la cellularisation. Cette vitesse est très régulée selon les différentes phases, durant lesquelles elle est constante. Lorsque le front de cellularisation est visible sur les images, la mesure peut s'effectuer en réalisant un kymographe sur une petite zone de l'image. Le principe de la mesure est illustré sur la figure 4.20 : sur une zone de l'embryon suffisamment réduite pour que le front de cellularisation y soit rectiligne, on effectue une projection du signal sur l'axe apico-basal, en fonction du temps. La position du front de cellularisation par rapport à la membrane vitelline est ainsi obtenue au cours du temps et on distingue les différentes phases de la cellularisation, caractérisées par des ruptures de pente, c'est-à-dire des vitesses d'invagination différentes (figure 4.21).

L'imagerie en lumière transmise, dont on sait qu'elle ne perturbe pas le développement, a servi de référence aux mesures effectuées en microscopie non linéaire. Les pentes que nous avons mesurées pour les phases 3 et 4, dans le cas de l'imagerie en lumière transmise, sont représentées sur la figure 4.22. La variation de vitesse avec la température dans une gamme correspondant à des conditions physiologiques (19 à 27°C) est suffisamment forte pour permettre de détecter des changements de température de l'ordre de 1°C ainsi qu'une perturbation minimale de la dynamique du cytosquelette. Notons que dans le cas de la microscopie 2PEF, la valeur que nous avons obtenue dans des conditions standard d'imagerie à 19°C est identique à la valeur de référence.

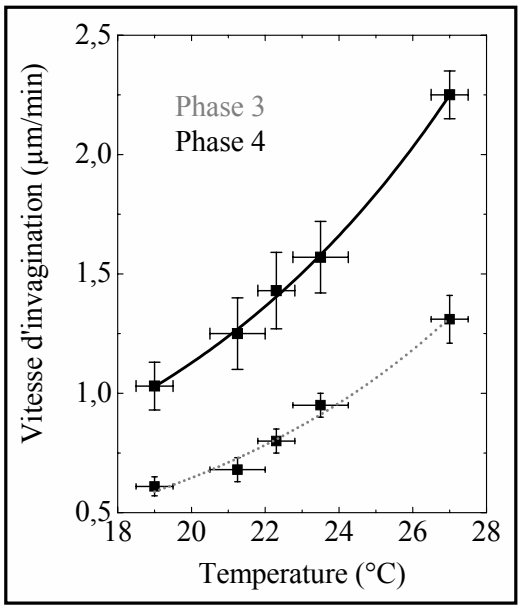


FIG. 4.22 – ÉTALONNAGE DE LA VITESSE DU FRONT DE CELLULARISATION en lumière transmise. Les expériences ont été réalisées à différentes températures et les vitesses ont été mesurées sur 3-4 embryons pour chaque point. Dans les expériences de THG la température est fixée à 19°C et les vitesses de référence sont donc 0.56 µm/min pour la phase 3 et 1.03 µm/min pour la phase 4.

4.3.2.2 Toxicité à 1180 nm

Afin de comparer les résultats de cette étude de toxicité avec les séquences que nous avons utilisées précédemment pour la quantification des mouvements, nous avons utilisé des paramètres d'imagerie similaires. Ces paramètres sont regroupés dans la table 4.1. Ils sont valables pour l'ensemble de la section 4.3.2, sauf quand il est explicitement mentionné que l'un d'eux a été modifié. De même, les images ont été acquises selon le même plan de coupe de l'embryon (sagittal), pour un embryon posé sur sa surface latérale. Enfin, les séquences ont été systématiquement acquises durant 90 min, depuis le milieu de la phase 2 de cellularisation jusqu'à la fin de la gastrulation.

La figure 4.23 présente les résultats obtenus lorsque la fréquence d'acquisition des images augmente. Au delà d'un certain seuil, le taux de survie des embryons décroît rapidement pour devenir

Longueur d'onde excitation	1.18 µm
Puissance moyenne au point focal	120 mW
Durée des impulsions	250 fs
Taux de répétition de l'OPO	76.40 MHz
Énergie par impulsion	1.57 nJ
Ouverture numérique de l'objectif de focalisation	0.6
Intensité moyenne au point focal	1.36×10^7 W/cm^2
Intensité crête au point focal	7.1×10^{11} W/cm^2
Vitesse de balayage de l'échantillon	150 µm/ms
Temps par pixel (*pixel dwell time*)	4 µs/pixel
Échantillonnage	0.6 µm/pixel
Temps entre deux lignes consécutives	7.5 ms
Distance entre deux lignes consécutives	0.6 µm
Taille totale de l'image	5×10^5 pixels
% surface de l'image occupée par l'embryon	40-50% (selon l'embryon)

Tab. 4.1 – Paramètres d'acquisition des séquences de développement en microscopie THG.

presque nul lorsque l'embryon est éclairé en continu. Corrélativement, la vitesse de cellularisation augmente jusqu'à doubler pour un éclairement continu[13]. Il est clair que dans ces conditions, l'acquisition des images entraîne une forte phototoxicité qui perturbe le développement. De façon intéressante, cette perturbation ne dépend pas de la dose lumineuse totale reçue, mais plutôt de la « dose par unité de temps », puisque la perturbation de la vitesse de cellularisation intervient dès le début des séquences (phase 3), alors que le nombre d'images acquises est encore nettement inférieur au nombre atteint à la fin d'une séquence avec une fréquence d'acquisition des images plus faibles, pour laquelle le développement n'est pas perturbé. Ceci suggère l'existence de mécanismes de relaxation (par exemple par diffusion des espèces toxiques créées ou de la chaleur hors du plan focal) ou de réparation des cellules, qui peuvent compenser les effets phototoxiques tant que ceux-ci ne sont pas engendrés avec un taux supérieur à la capacité de réparation de l'organisme.

[13]Par éclairement continu, il faut comprendre qu'il n'y a pas de pause entre deux images successives. Le faisceau ne repasse en fait sur le même point que toutes les 3.3 s, durée de l'image.

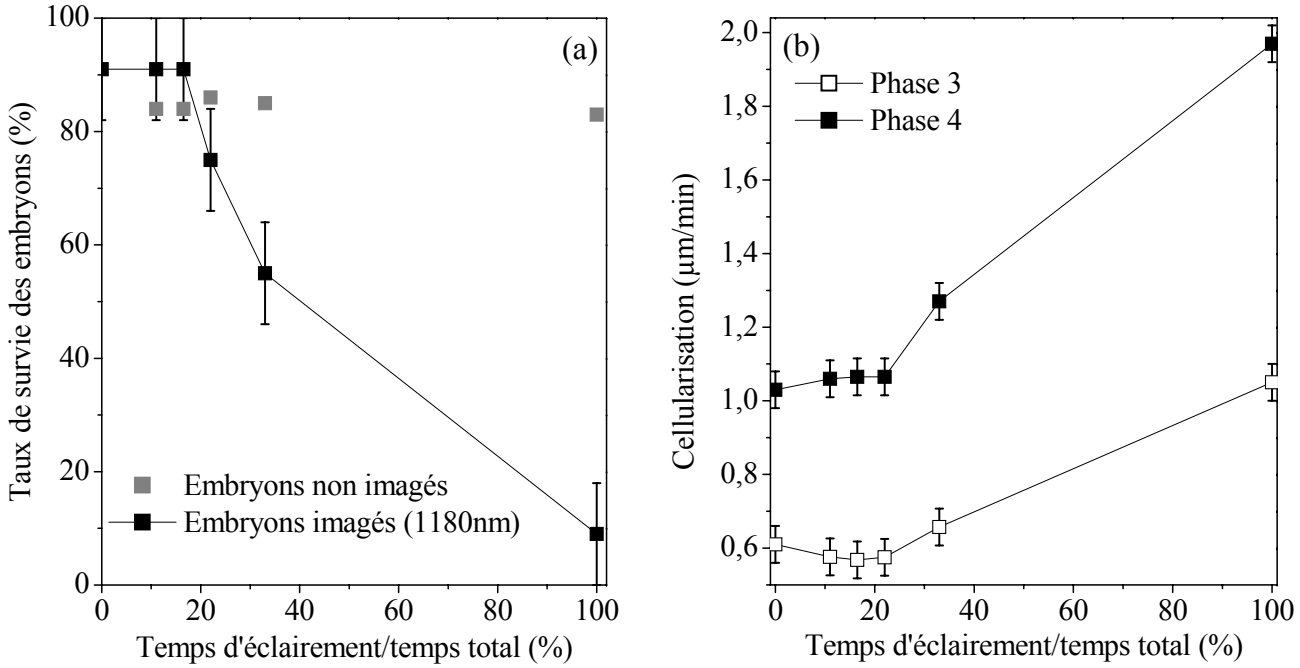


FIG. 4.23 – INFLUENCE DE LA FRÉQUENCE D'ÉCLAIREMENT sur les dommages constatés. (a), taux de survie des embryons illuminés comparé à celui des embryons témoins, ayant subi la même préparation (annexe E). Le taux de survie légèrement supérieur des embryons illuminés dans le cas d'une faible illumination est dû au fait qu'on choisit de faire l'image d'embryons n'ayant pas souffert durant l'étape de préparation. (b), vitesse de cellularisation durant les phases 3 et 4, dans les mêmes conditions. La vitesse de référence est indiquée pour une fréquence d'imagerie nulle. Chaque point sur les figures (a) et (b) est une moyenne sur N=11 embryons.

4.3.2.3 Influence de la longueur d'onde d'excitation

Afin d'éclaircir les mécanismes par lesquels sont induits ces effets, nous avons acquis des séquences dans les mêmes conditions mais en décalant la longueur d'onde d'excitation de 1.18 µm à 1.08 µm (tous les autres paramètres restant identiques). La courbe de survie obtenue est présentée sur la figure 4.24. Le seuil de dommage obtenu est deux à trois fois plus faible que celui obtenu à 1.18 µm, indiquant que les dommages induits sont beaucoup plus importants. Or, dans cette gamme de longueur d'onde, l'absorption des principales molécules biologiques est négligeable à l'exception de celle de l'eau, qui passe de $1.04\,\mathrm{cm}^{-1}$ pour λ =1.18 µm à $0.13\,\mathrm{cm}^{-1}$ pour λ =1.08 µm. L'absorption à un photon du tissu diminue donc fortement entre ces deux longueurs d'onde, alors que les dommages induits augmentent. Ces derniers ne peuvent donc être imputés à des effets d'absorption linéaires (échauffement notamment), mais plutôt à des effets d'absorption multiphotonique à deux ou trois photons.

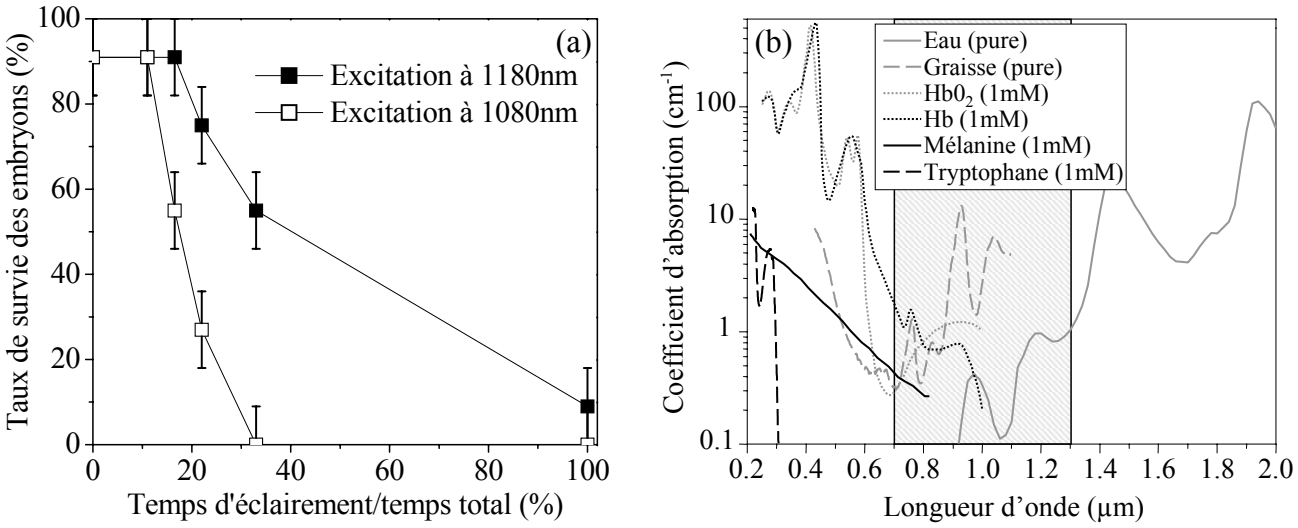


FIG. 4.24 – INFLUENCE DE LA LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION sur les dommages constatés. (a), taux de survie des embryons illuminés à 1.08 µm comparé à celui des embryons illuminés à 1.18 µm. Le seuil de dommage est nettement plus bas dans le cas d'une longueur d'onde d'excitation de 1.08 µm, indiquant des photodommages plus importants. (b), Coefficients d'absorption de différentes molécules biologiques. Entre 1.18 µm et 1.08 µm, l'absorption de l'eau décroît quasiment d'un ordre de grandeur, indiquant que l'absorption linéaire de l'eau (et donc l'échauffement) ne domine pas les mécanismes de phototoxicité. Chaque point sur la figure (a) est une moyenne sur N=11 embryons.

4.3.2.4 Imagerie dans plusieurs plans

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons quantifié la survie des embryons lorsque, pour une longueur d'onde d'excitation de 1.18 µm, le nombre d'images était augmenté, mais cette fois dans différents plans d'imagerie. Pour cela, nous avons tout d'abord considéré une fréquence d'acquisition d'une image par minute, puis 3, 10 et enfin 17 (éclairement en continu) images acquises toutes les minutes dans des plans d'imagerie écartés de 2 µm. Le dernier plan se situe toujours dans le plan sagittal de l'embryon, les autres plans étant au dessus[14]. Effectivement, comme l'illustre la figure 4.25, le développement dans ce cas se poursuit normalement : le taux de survie et les vitesses de cellularisation sont (compte tenu de l'incertitude sur la mesure) identiques à ceux des témoins, même lorsque l'embryon est éclairé en continu. Ces résultats confirment que les dommages semblent bien confinés au plan d'imagerie, comme il est attendu dans le cas où la toxicité provient d'une absorption multiphotonique de l'onde excitatrice, et que la répartition des effets phototoxiques sur un volume plus important diminue leur influence sur le développement embryonnaire.

[14]Par exemple, dans le cas où l'on a fait 17 images par minute, on obtient toutes les minutes une image tridimensionnelle de $2 \times (17 - 1) = 32$ µm d'épaisseur.

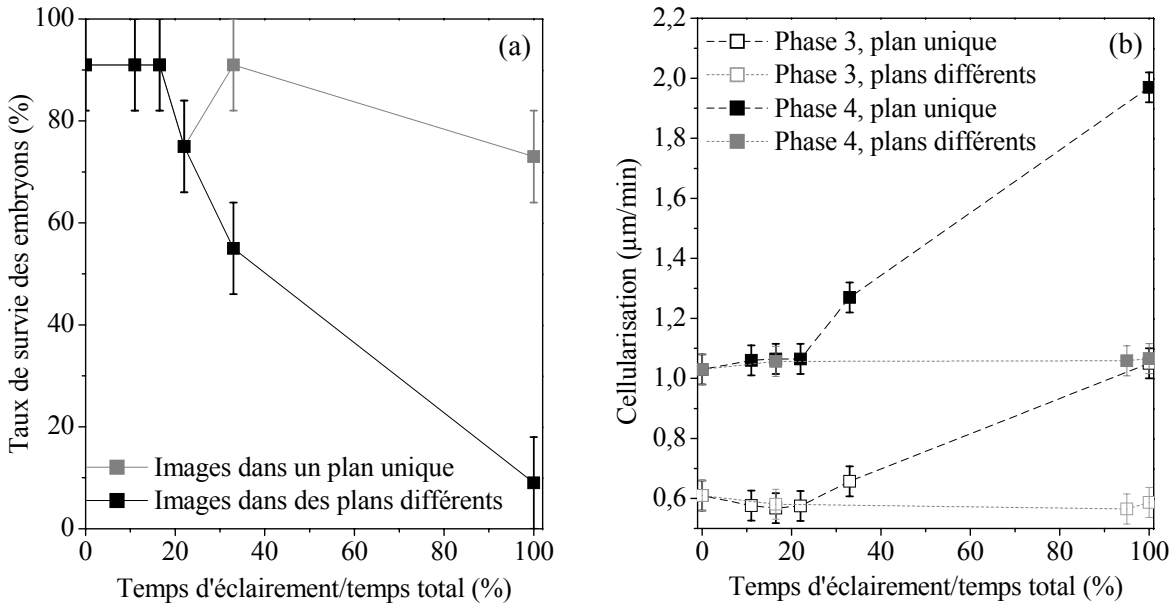


FIG. 4.25 – IMAGERIE DANS PLUSIEURS PLANS séparés entre eux de 2 µm. (a), taux de survie des embryons illuminés dans un plan unique comparé à celui des embryons visualisés avec le même nombre d'images mais réparties dans des plans d'imagerie différents. (b), vitesses de cellularisation correspondantes. Chaque point sur les figures (a) et (b) est une moyenne sur N=11 embryons.

4.3.2.5 Influence de la durée des impulsions

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le signal THG dépend fortement de la durée τ de l'impulsion (paragraphe 1.1). Nous avons donc compressé les impulsions sous l'objectif d'une durée de 250 fs à une durée de 100 fs. Dans le même temps, du fait des pertes supplémentaires induites avant le microscope, la puissance d'excitation passe de 120 mW à 70 mW. Globalement, le signal THG, qui varie comme $\langle I \rangle^3 \times \tau^{-2}$, est inchangé[15]. Dans ces nouvelles conditions d'imagerie (de nouveau dans un unique plan d'imagerie), la phototoxicité est nettement réduite (figure 4.26) par rapport au cas d'impulsions plus longues. On peut donc en déduire que les dommages sont liés à un phénomène d'ordre inférieur à celui de la THG, c'est à dire 3 : ainsi, la phototoxicité est principalement induite dans nos conditions d'imagerie par des effets d'ordre 2, comme l'absorption à deux photons de différentes molécules, ou éventuellement par un mélange d'effets d'ordre 2 et 3.

[15]Le calcul à partir des données du texte prévoit une augmentation du signal THG d'environ 25%, mais compte tenu des imprécisions sur la mesure de la puissance sous l'objectif (±5 mW) et de la durée des impusions (±5-10 fs), cette augmentation calculée n'est pas significative. Expérimentalement, nous avons mesuré un signal THG inchangé.

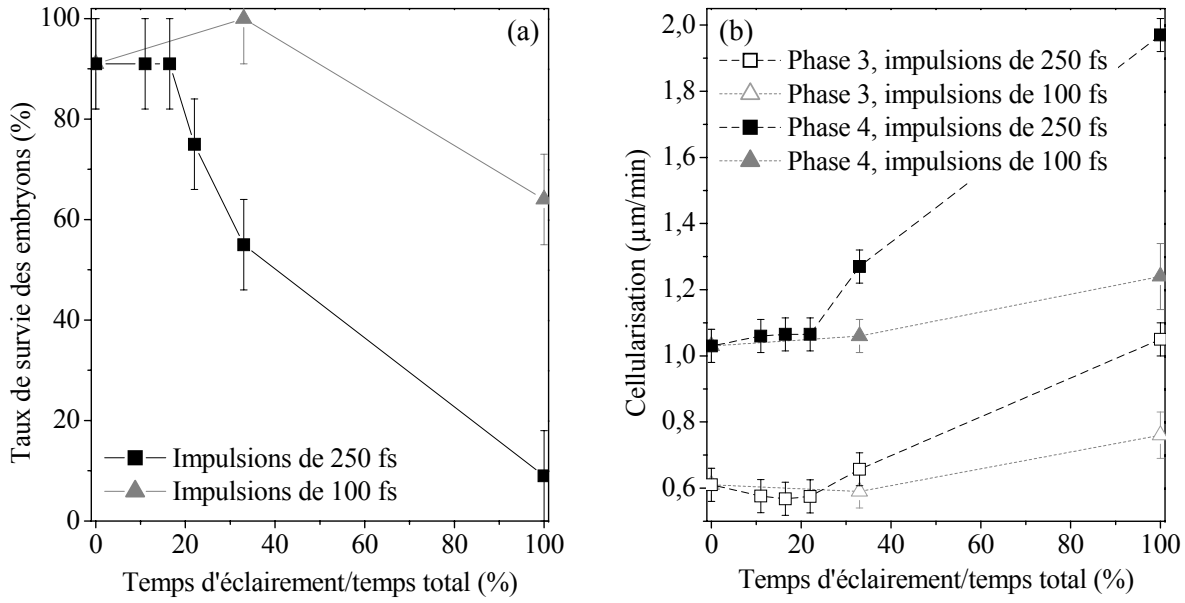


FIG. 4.26 – INFLUENCE DE LA DURÉE DES IMPULSIONS sur les photodommages. (a), taux de survie des embryons illuminés dans un plan unique (sagittal) avec des impulsions de 250 fs (carrés noirs) ou de 100 fs (triangles gris). (b), vitesses de cellularisation correspondantes. Pour un signal THG identique, les dommages sont plus limités lorsque les impulsions sont compressées. Chaque point sur les figures (a) et (b) est une moyenne sur N=11 embryons.

4.3.3 Discussion

4.3.3.1 Existence d'un seuil pour la perturbation du développement

A partir de ces différents résultats, nous pouvons formuler des hypothèses sur l'origine de la phototoxicité pouvant apparaître dans nos expériences. Tout d'abord, les effets phototoxiques semblent liés à la quantité de dommages induits par unité de temps : comme l'illustre la figure 4.23, il existe un seuil au delà duquel l'embryon est incapable de récupérer des dommages induits, indiquant que la capacité de réparation, soit par capture/destruction des espèces toxiques créées, soit par régénération des molécules et/ou des structures perturbées, est dépassée. Cette analyse est confirmée par l'imagerie sur le long terme de l'embryon (figure 4.27) : si l'on éclaire l'embryon en respectant un intervalle suffisant entre les images (150 s dans cet exemple), il est possible de le visualiser pendant plusieurs heures sans perturber le développement.

Ce résultat est à rapprocher de l'étude de Squirrell *et al.* [23], qui observent sur le long terme (24 h) des embryons de hamster à une longueur d'onde de 1047 nm. Tous les paramètres permettant la comparaison avec nos expériences ne sont pas donnés dans l'étude, mais on peut cependant noter que l'intensité crête utilisée est seulement 2.5 fois plus faible (2.8×10^{11} W/cm^2 contre 7.1×10^{11} W/cm^2 dans notre cas). De plus la vitesse de balayage de l'échantillon est environ 3 fois plus lente (50 µm/ms, estimée à partir des paramètres donnés dans l'article, contre 150 µm/ms dans notre cas), et ceci pour une longueur d'onde plus faible (1.047 µm) dont nous avons montré qu'elle induisait des dommages plus importants que celle que nous utilisons (1.18 µm).

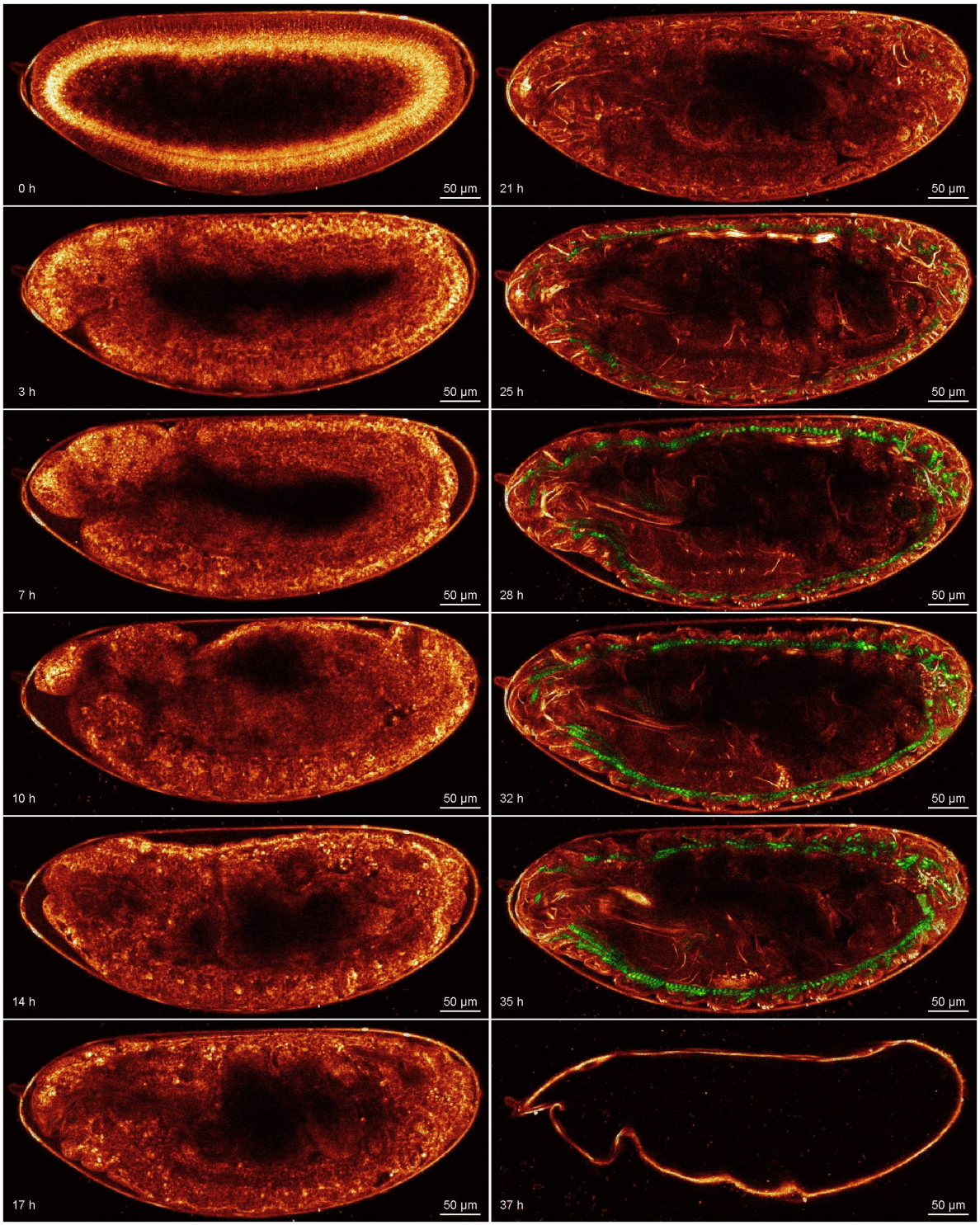


FIG. 4.27 – DÉVELOPPEMENT DE L'EMBRYON JUSQU'AU PREMIER STADE LARVAIRE. Séquence d'images (coupe sagittale) obtenue avec des impulsions compressées en imagerie THG (jaune-rouge) et SHG (vert). Intervalle entre les images de la séquence d'origine, 150 s. 0 h, stade 5 ; 3 h, stade 10 (fin) ; 7 h, stades 11/12 ; 10 h, stade 14 ; 14 h, stade 16 (fin) ; 17 à 35 h, stade 17. L'apparition d'un signal SHG permet de suivre le développement des muscles. Au bout de 37 h, la larve est sortie de la membrane vitelline.

Dans ces conditions, les auteurs n'observent aucun signe de photodommages dans les embryons, tant en termes de survie qu'en termes de création de ROS. Ceci confirme que dans les conditions d'imagerie que nous avons utilisées dans la section précédente pour la quantification des mouvements morphogénétiques, nous sommes dans une fenêtre d'imagerie qui ne perturbe pas le développement des embryons.

En dessous de ce seuil de dommages, les critères que nous avons utilisés pour quantifier les dommages ne montrent pas d'effets résiduels. Les champs de vitesse mesurés par PIV sont normaux (analyse effectuée au niveau de l'extension de la bande germinale) et nous n'avons pas observé de retard significatif au développement jusqu'au premier stade larvaire (en prenant comme critère le temps au bout duquel la larve sort de la membrane vitelline[16]). Ceci est à comparer à la référence [225], où les dommages sub-létaux induisent un retard dans la prolifération cellulaire.

La sensibilité limitée de nos critères, essentiellement morphologiques, peut expliquer cette absence d'effet pour des images espacées dans le temps. Pour effectuer une analyse plus approfondie, il serait nécessaire de disposer de sondes supplémentaires, par exemple pour les ROS [23,198,211]. Cependant, comme nous l'avons déjà précisé, l'utilisation d'une sonde dans l'embryon à un stade précoce est délicate car la membrane vitelline entourant l'embryon empêche la diffusion de marqueurs de la solution externe et l'injection de la sonde à travers la membrane diminue nettement le taux de survie des embryons. L'étude présentée dans cette section pourrait donc être complétée par exemple par une analyse approfondie de la phototoxicité dans des cellules isolées (voir par exemple l'étude du paragraphe 3.3.2, page 127).

4.3.3.2 Origine des photodommages

La variation de la longueur d'onde d'excitation a permis de montrer que l'absorption linéaire, en particulier par l'eau, n'était pas un facteur prépondérant de toxicité dans ces expériences. Ceci est cohérent avec les calculs menés par Schönle *et al.* [230] et Vogel *et al.* [82]. En utilisant les paramètres réunis dans la table 4.1, on trouve un échauffement transitoire (pendant les 6.7 µs pendant lesquelles le faisceau éclaire un élément de surface d'1 μm^2) compris entre 0.4°C [230] et 0.9°C [82].

Cet échauffement est très largement en dessous du seuil d'activation des protéines de choc thermique [215] par exemple, et il est suffisament faible pour se résorber presque complètement entre deux lignes successives (le temps caractéristique de relaxation dans l'eau pure étant de l'ordre de la centaine de µs [214]). D'autre part, on peut s'attendre à ce que l'embryon, qui se développe normalement pour des températures extérieures variant environ de 17 à 30°C, soit relativement peu sensible à un échauffement d'une fraction de degré. En fait, dans la littérature, les cas où les dommages sont causés par des effets photothermiques sont essentiellement limités à l'utilisation de lasers YAG en impulsion (pour lesquels l'échauffement peut atteindre 100°C [231]) ou continus dans le cas du piégeage optique [214,215], et au cas où une molécule absorbe fortement l'onde fondamentale, comme dans le cas des cellules pigmentées [154].

[16] Comme l'illustre la figure 4.27, ce temps est notablement plus long que celui de 24 h généralement annoncé, que l'embryon soit éclairé ou non durant son développement. Ceci est probablement dû à la préparation de l'embryon qui est collé sur la lamelle de microscope, rendant la sortie de la larve plus difficile.

De même les effets de claquage optique sont peu pertinents dans notre étude. En comparaison avec les effets induits dans la gamme 800-900 nm [35], nous n'avons jamais observé d'intense autofluorescence excitable à 1.18 µm ou 800 nm après imagerie à 1.18 µm, ni même en fixant le faisceau en un point de l'échantillon pendant plusieurs dizaines de secondes. Chen *et al.* [81] font une constatation similaire à 1.23 µm, sans toutefois pousser plus loin leurs investigations. On ne peut pourtant exclure qu'un plasma de faible densité soit malgré tout créé dans le tissu et contribue aux dommages photochimiques observés.

Nos résultats suggèrent que les effets dominants dans nos conditions d'imagerie sont de nature photochimique et dérivent d'une absorption à 2 photons d'une ou plusieurs molécules du milieu. L'absorption à 3 photons, bien que possible, est en effet un processus très peu efficace comparé à l'absorption à 2 photons. Par exemple, nous n'avons observé aucune autofluorescence du vitellus pour une excitation à 1180 nm, alors que cette fluorescence est forte autour de 790 nm, probablement à cause de la présence de NADH. On ne peut pas exclure formellement à partir de nos résultats la présence d'un (faible) effet à 3 photons[17], mais la réduction de la phototoxicité lors de la compression des impulsions incite à considérer plutôt des effets d'ordre 2.

A partir de ces constatations, on peut avancer des hypothèses sur le mode d'induction des photodommages. Dans la grande majorité des études citées, les dommages sont induits au niveau des mitochondries, et ceci aussi bien pour des sources continues qu'impulsionnelles, et pour des longueurs d'onde allant de 300 à 1060 nm. Il est donc raisonnable de penser que dans notre cas également, l'absorption se fera au niveau de molécule(s) située(s) dans les mitochondries ; Cependant, si l'on suppose que les spectres d'absorption à 2 photons des molécules considérées sont proches de ceux à 1 photon (ce qui est vrai au moins pour le NADH et les flavines [53]), les seules molécules efficacement excitables entre 1.1 et 1.2 µm sont les porphyrines telles que les cytochromes c, b ou encore la cytochrome c oxidase (figure 4.28). Cette dernière présente cependant une absorption comparable entre 540 et 590 nm, qui ne permet pas d'expliquer la variation du seuil de dommage entre une excitation à 1.08 µm et une excitation à 1.18 µm.

Une hypothèse plausible à partir des données présentées est donc que la phototoxicité observée dans notre cas provient de l'absorption à deux photons de l'onde excitatrice par des porphyrines telles que les cytochromes, qui conduirait à la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale et à la production de ROS.

> *Cette explication reste une hypothèse qui demanderait pour être validée (notamment en termes de production de ROS, influence de la présence d'oxygène, etc.) des expériences complémentaires, par exemple utilisant des marqueurs fonctionnels. Cette confirmation sort toutefois du cadre de cette étude où notre but était de définir la fenêtre d'utilisation de l'imagerie THG pour le développement de l'embryon de drosophile, notamment en termes de longueur d'onde, de fréquence d'exposition et de durée d'impulsion.*

[17] Hopt *et al.* montrent par exemple qu'autour de 800 nm et pour des puissance d'excitation importantes (20-50 mW sur l'échantillon), la dépendance en puissance des effets obtenus indique un mélange d'effets à 2 et 3 photons. Notons cependant que cette gamme de longueur d'onde correspond à une absorption à 3 photons vers 250-300 nm, région dans laquelle beaucoup de molécules très abondantes comme l'ADN ou les protéines, qui contiennent de nombreux résidus aromatiques, pourront être excitées. La faiblesse des effets à 3 photons peut dans ce cas être compensée par le nombre très important de noyaux aromatiques excitables. Voir aussi [35].

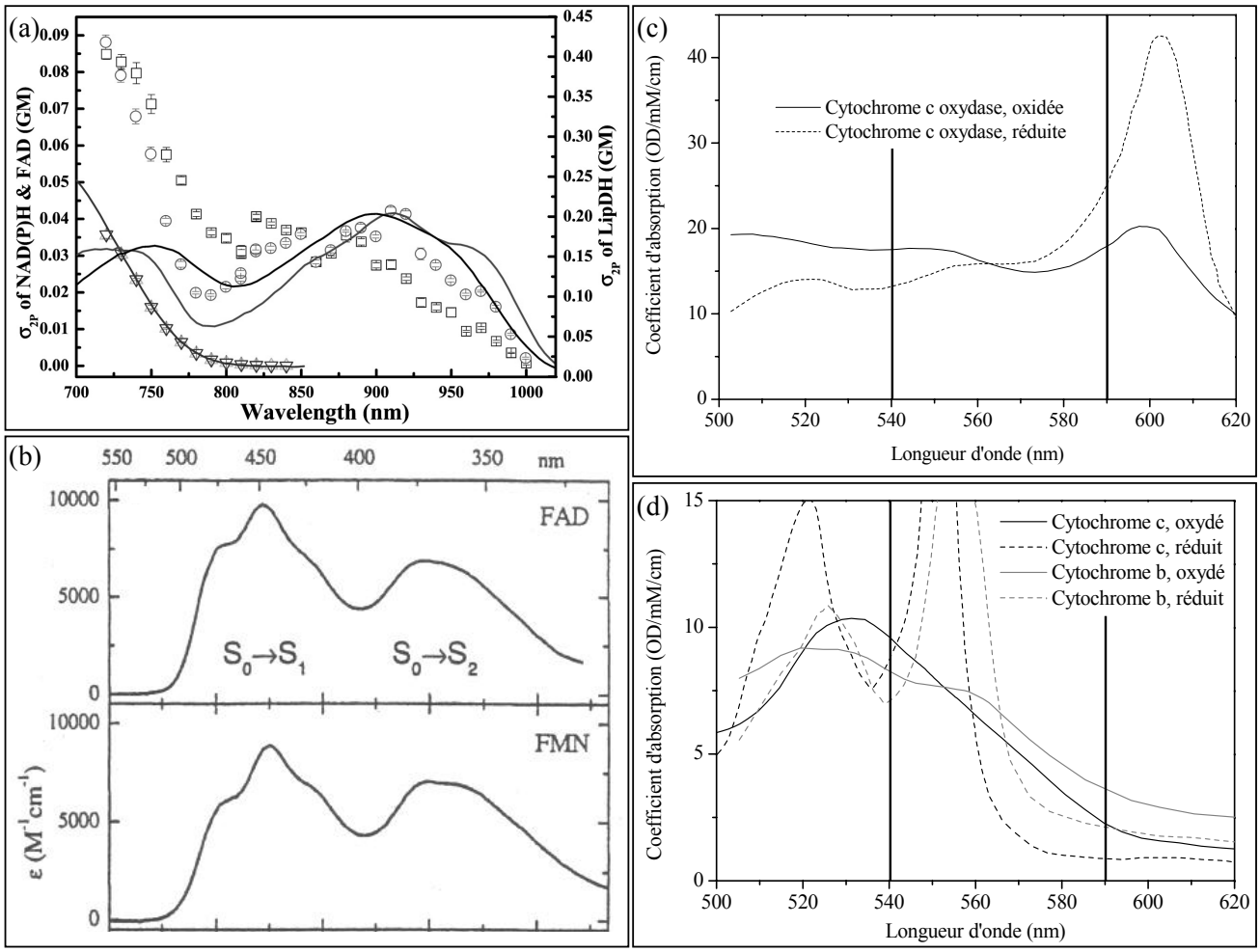


FIG. 4.28 – SPECTRES D'ABSORPTION LINÉAIRE DE DIFFÉRENTS ABSORBEURS POTENTIELS.
(a), spectres d'excitation à 1 (traits pleins) et 2 (points) photons du NAD(P)H (triangles), de la flavine adénine dinucléotide (carrés) et de la lipoamide déhydrogénase (LipDH, ronds). Figure extraite de la référence [53]. (b), spectres d'absorption de la FAD et de la flavine mononucléotide (FMN). Figure extraite de la référence [232]. (c), spectres d'absorption de la cytochrome c oxydase et (d), des cytochromes b et c, en fonction de leur état d'oxydation. Données (c et d) provenant du site : http ://www.medphys.ucl.ac.uk/research/bort/research/NIR_topics/spectra/spectra.html. Les traits verticaux sur les figures (c) et (d) représentent les longueurs d'onde moitié des longueurs d'onde d'excitation (1.18 µm et 1.08 µm).

4.3.4 Conclusion

En conclusion, nous avons montré que dans des conditions d'imagerie adaptées à l'analyse par PIV du développement, les mouvements morphogénétiques de l'embryon ne sont pas perturbés. Ceci valide l'utilisation de la microscopie THG comme technique d'imagerie pour la caractérisation des mouvements, par exemple dans des embryons mutants pour certains gènes

du développement dont le phénotype n'est actuellement pas caractérisé.

L'analyse de l'origine des photodommages a montré que ceux-ci étaient limités au plan focal, permettant d'envisager le développement de l'imagerie dynamique de l'embryon en trois dimensions, comme l'illustre la figure 4.29. Ainsi, on pourrait obtenir une description complète des mouvements dans des organismes mutants pour différents gènes du développement par exemple, sans marquage des échantillons.

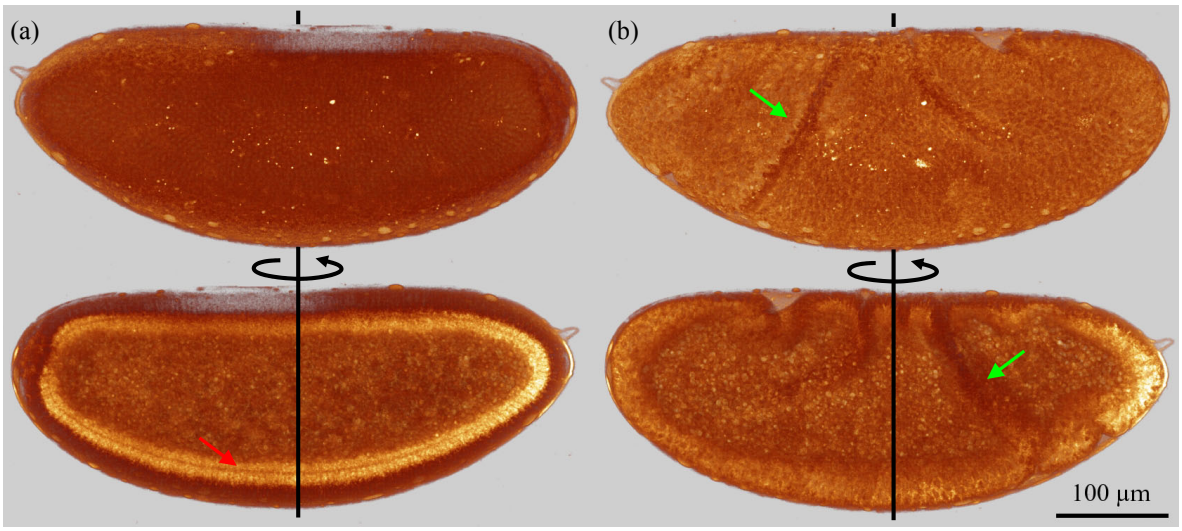


FIG. 4.29 – VISUALISATION 3D DYNAMIQUE DE LA MOITIÉ D'UN EMBRYON PENDANT LA GASTRULATION EN IMAGERIE THG.
Temps d'acquisition par image 3D, 57 s. Echantillonnage latéral, 0.75 µm/pixel et échantillonnage axial, 2 µm entre chaque plan. Echantillonnage temporel, 2 min. (a), cellularisation (flèche rouge, front de cellularisation). (b), gastrulation (30 min plus tard). Les images du haut (vue « de l'extérieur ») et du bas (vue « de l'intérieur ») permettent de bien voir par exemple la formation du sillon céphalique (flèche verte).

La microscopie THG est donc une technique de choix pour l'étude de la morphogénèse de l'embryon de drosophile, tant dans le cas de perturbations mécaniques que génétiques, comme nous allons l'illustrer dans la section suivante.

4.4 Applications à l'étude de la perturbation des mouvements

4.4.1 Etude de mouvements morphogénétiques après photoablation

Une manière non génétique de moduler à grande distance l'ensemble des mouvements tissulaires est de perturber l'intégrité mécanique de l'embryon afin de modifier le champ de contrainte s'appliquant sur les tissus. Ceci peut, par exemple, être effectué à l'aide de la photoablation par impulsions femtosecondes d'un ensemble de cellules bien localisées, dont la destruction permet

de bloquer certains mouvements morphogénétiques. Cette technique a été caractérisée pour la drosophile par W. Supatto *et al.* [35, 233] et permet par exemple, en détruisant un ensemble de cellules sur le côté dorsal de l'embryon, de moduler l'invagination du mésoderme et la formation du sillon céphalique (figure 4.30).

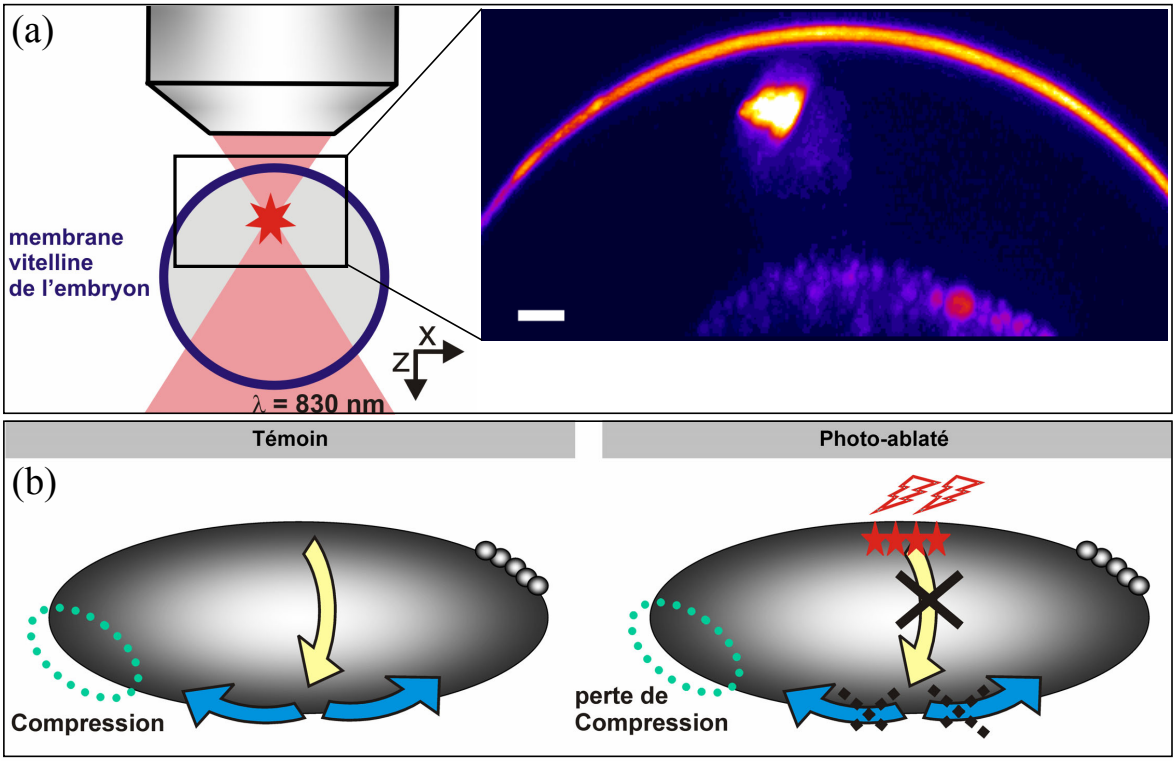


FIG. 4.30 – PERTURBATION DES MOUVEMENTS MORPHOGÉNÉTIQUES PAR PHOTOABLATION.
Figure adaptée de [168]. (a), principe de la photoablation sur un embryon vu en coupe transversale. Visualisée à l'aide de l'intense fluorescence créée par l'ablation, la zone détruite par le laser environ 20 µm sous la membrane vitelline est très bien localisée en 3 dimensions et la membrane elle-même (visualisée par autofluorescence) est intacte (longueur d'onde d'imagerie, 830 nm). (b), modèle d'interprétation de la perturbation des mouvements morphogénétiques induits par une ablation laser dans la région de l'amniosérosa (figure 4.6).

On peut ensuite caractériser la perturbation obtenue en termes de champ de vitesse par microscopie THG. La figure 4.31 donne une illustration du type de perturbation obtenue après photoablation sur le dos de l'embryon : la suppression de l'invagination du mésoderme et de la formation du sillon céphalique entraîne une modification complète du champ de vitesse au niveau du pôle antérieur de l'embryon. Au niveau des contraintes mécaniques, ceci se traduit par un passage d'un régime de compression à un régime de dilatation des cellules situées au pôle antérieur [35].

La combinaison « tout optique » de la photoablation et de la microscopie THG permet ainsi, à partir de la même chaîne laser, de moduler et de quantifier les mouvements morphogénétiques

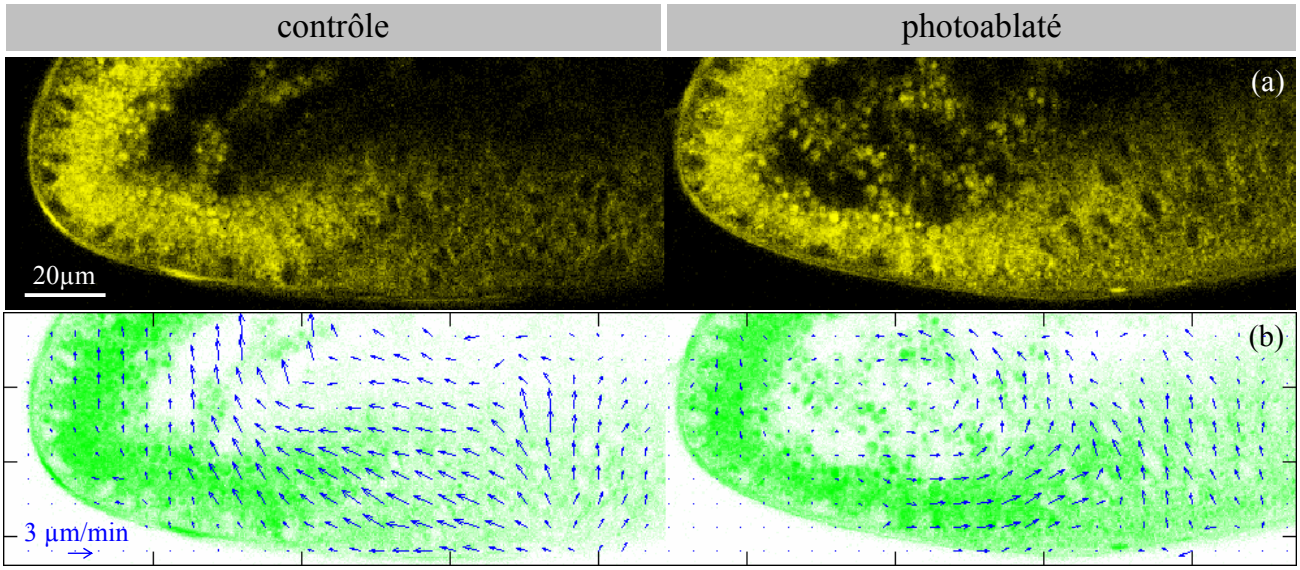


FIG. 4.31 – CARACTÉRISATION DES MOUVEMENTS PERTURBÉS PAR PHOTOABLATION EN MICROSCOPIE THG.
(a), image THG du pôle antérieur d'un embryon pendant la formation du sillon céphalique (stade 6). (b), champ de vitesse correspondant montrant un mouvement des tissus dirigé vers le pôle antérieur pour un embryon normal et vers le pôle postérieur pour un embryon ayant subi une photoablation. Temps d'acquisition, 3.1 s par image. Résolution temporelle, 30 s. Echantillonnage latéral, 0.4 µm/pixel.

dans un contexte entièrement sauvage, ce qui en fait un outil précieux pour étudier le rôle des contraintes mécaniques dans le développement embryonnaire et particulièrement la mécanosensibilité de certains gènes.

4.4.2 Démonstration dans des organismes mutants

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la THG est également un outil puissant pour la caractérisation des mouvements morphogénétiques pour des embryons mutants. De nombreux mutants complexes ne sont en effet pas caractérisés mécaniquement en l'absence de souche transgénique exprimant une protéine fluorescente. Comme l'illustre la figure 4.32 sur l'exemple des mutations *dorsal* et *concertina*, la microscopie THG permet d'obtenir avec une préparation minimale de l'embryon une description des mouvements dans un plan d'intérêt (sagittal ou parasagittal dans les exemples présentés sur la figure 4.32).

A titre de comparaison, la visualisation des mouvements à l'aide de la microscopie en lumière transmise ne permet pas une description rigoureuse des mouvements morphogénétiques. La figure 4.33 présente le résultat d'une analyse vélocimétrique de l'invagination du sillon ventral dans le cas d'un embryon sauvage et dans le cas d'un embryon *dorsal* (qui ne possède pas de polarité dorso-ventrale), dans lequel cette invagination est supprimée : si la microscopie THG distingue correctement les deux phénotypes, ce n'est pas le cas de la microscopie en lumière transmise. En effet, le manque de sectionnement optique ne permet pas de visualiser l'invagination du

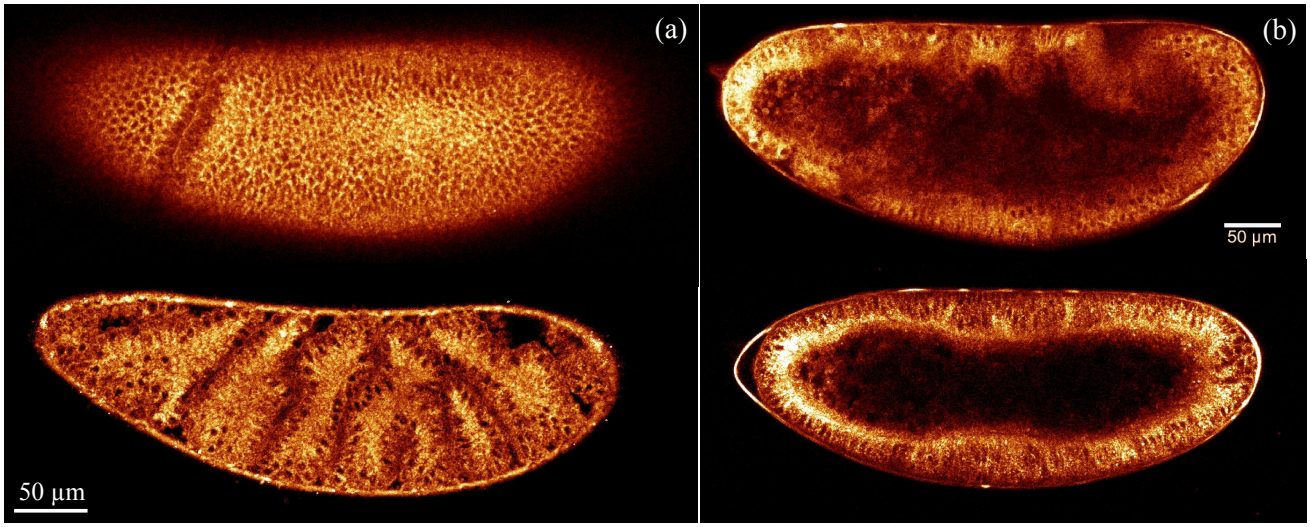


FIG. 4.32 – CARACTÉRISATION PAR IMAGERIE THG D'EMBRYONS MUTANTS.
(a), comparaison sur une coupe parasagittale d'un embryon normal (en haut) et d'un embryon mutant pour *concertina* (en bas), qui présente des sillons anormaux après la gastrulation. (b), comparaison sur une coupe sagittale d'un embryon normal (en haut) et d'un embryon présentant la mutation *dorsal* (en bas), qui ne possède pas de polarité dorso-ventrale.

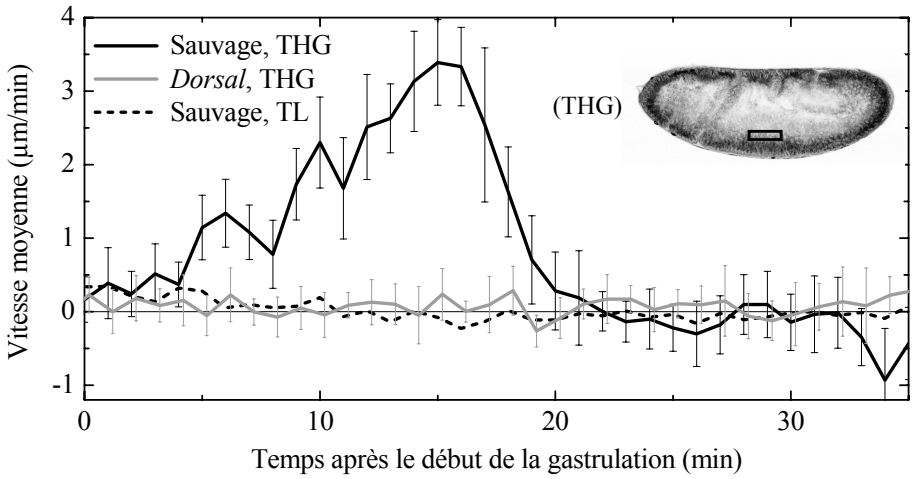


FIG. 4.33 – ANALYSE DU MOUVEMENT D'INVAGINATION DU SILLON VENTRAL DANS LE CAS D'UN EMBRYON *dorsal*.
Vitesse d'invagination dans la direction apico-basale mesurée au cours du temps pour une séquence acquise en microscopie THG (traits pleins) pour un embryon sauvage (en noir) et un embryon *dorsal* (en gris), et en microscopie en lumière transmise (traits pointillés). La mesure a été effectuée dans la fenêtre indiquée sur l'image THG. Une vitesse positive correspond à un mouvement dans la direction basale (vers l'intérieur de l'embryon). Les barres d'erreurs sont définies comme la variance des valeurs obtenues en différents points de la fenêtre.

mésoderme chez l'embryon sauvage donc sa perturbation chez le mutant *dorsal* n'apparaît pas.

Cette nouvelle approche de microscopie sans marquage pour la caractérisation de phénotypes mutants devrait trouver une large gamme d'applications en biologie du développement et particulièrement pour la drosophile, qui constitue un modèle majeur en génétique du développement.

4.5 Perspectives

Nous avons présenté dans ce chapitre l'utilisation de la microscopie THG pour la visualisation du développement précoce de l'embryon de drosophile. Cette technique, couplée à l'analyse des images par PIV, permet d'obtenir des données quantitatives sur les mouvements des tissus, sans marquage, dans un contexte sauvage ou mutant.

L'étude de la phototoxicité de ce mode d'imagerie, reposant à la fois sur des critères dynamiques et sur la survie de l'organisme à long terme, a permis de définir une « fenêtre de sécurité » pour laquelle le développement n'est pas perturbé, ainsi que d'avancer des hypothèses sur le type de mécanisme responsable de cette phototoxicité. Ceci nous a finalement permis de démontrer le suivi dynamique en trois dimensions d'un demi-embryon, permettant la visualisation de l'ensemble des mouvements morphogénétiques.

Ces résultats ouvrent un champ d'application important en biologie du développement, faisant de la microscopie THG un outil idéal pour l'étude de la morphogénèse dynamique en combinaison avec d'autres techniques de microscopie non linéaire comme la microscopie SHG ou 2PEF.

Bien que des améliorations techniques puissent être envisagées pour augmenter la rapidité d'acquisition des images notamment, les résultats de ce chapitre permettent dès à présent d'envisager l'utilisation de cette technique en routine pour la caractérisation du développement en trois dimensions de lignées embryonnaires mutantes, chez la drosophile ou d'autres organismes modèles.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons cherché à caractériser la microscopie THG dans le but de l'utiliser dans un contexte biologique. Cette caractérisation s'est effectuée autour de trois axes principaux : le mode de création du signal dans l'échantillon, les sources de contraste endogènes dans différents échantillons biologiques, et enfin l'étude de la phototoxicité induite par l'imagerie.

L'étude théorique et expérimentale de la création du signal dans l'échantillon a montré plusieurs effets liés à la construction cohérente du signal. Tout d'abord, le signal diffusé dépend de façon cruciale de la géométrie de l'échantillon et certaines structures sont en conséquence exaltées sur les images obtenues. En particulier, l'image obtenue en THG est filtrée pour les hautes fréquences spatiales, ce qui contribue à limiter la visibilité des structures de petite taille. D'autre part, nous avons mis en évidence l'influence des conditions de focalisation du faisceau excitateur sur la structure de l'image. Le choix de l'ouverture numérique de l'objectif de focalisation apparaît déterminant notamment dans le cas où l'application choisie ne nécessite pas une résolution sub-micrométrique. Enfin, l'étude du caractère directionnel de l'émission a montré que le champ de vue de l'objectif était également un facteur prépondérant pour l'efficacité de détection du signal THG rétrodiffusé pour des géométries d'épicollection dans des tissus non absorbants.

Nous avons ensuite décrit les principales sources de contraste que nous avons identifiées dans les tissus. Comme dans le cas de la SHG et contrairement au cas de la fluorescence ou du CARS, le contraste obtenu est de nature structurale et non chimique, ce qui conduit à une moins bonne spécificité du signal. Nous avons cependant montré que dans de nombreux tissus, le signal THG est spécifique des corps lipidiques de taille micrométrique, structures pour lesquelles il n'existe pas à l'heure actuelle de technique de visualisation bien établie. Certaines précautions s'imposent toutefois pour l'utilisation de ce mode de contraste : selon les tissus, d'autres structures (très denses ou dont la susceptibilité est exaltée par résonance) peuvent elles aussi donner un signal significatif. Il est donc nécessaire de bien caractériser les structures visualisées dans un type de tissu particulier avant d'envisager des applications biologiques plus poussées. D'autre part, la sensibilité de la THG aux petits corps lipidiques n'a pas été étudiée *in vivo* : elle dépendra notamment de la focalisation du faisceau et va limiter les applications à des tissus dans lesquels les corps lipidiques sont de taille « suffisante » (au moins quelques centaines de nanomètres).

Enfin, l'imagerie THG a été appliquée à la visualisation du développement de l'embryon de drosophile où elle permet, couplée à l'analyse des images par PIV, d'obtenir des données quantitatives sur les mouvements des tissus, sans marquage, dans un contexte non transgénique. Elle ouvre ainsi un champ d'application important en biologie du développement pour la ca-

ractérisation du phénotype dynamique de souches mutantes pour des gènes du développement. Cette étude nous a en outre fourni l'occasion d'étudier la phototoxicité de ce mode d'imagerie, en nous appuyant à la fois sur des critères dynamiques et sur la survie de l'organisme à long terme. Ceci nous a permis de définir une « fenêtre de sécurité » pour laquelle le développement n'est pas perturbé, ainsi que d'avancer des hypothèses sur le type de mécanisme responsable de cette phototoxicité. Enfin, l'optimisation des conditions d'imagerie, et notamment de la durée des impulsions et de l'ouverture numérique d'excitation, ont conduit à démontrer le suivi dynamique en trois dimensions d'un demi-embryon, permettant la visualisation de l'ensemble des mouvements morphogénétiques.

Afin d'augmenter encore la qualité des données obtenues, de nombreuses améliorations techniques peuvent être envisagées, telles que la mise en forme temporelle (*pulse shaping*) ou spatiale (*PSF engineering*) des impulsions, ou encore la correction des aberrations induites par les tissus. L'exploitation de la sélectivité en taille du signal THG est également une piste pour obtenir *in vivo* des informations supplémentaires sur les structures visualisées. Enfin, l'optimisation de la technique de balayage du faisceau ou encore la modulation de l'intensité d'excitation utilisée avec la position dans l'embryon pourraient améliorer la vitesse d'acquisition des images et diminuer la phototoxicité induite.

L'ensemble des résultats présentés fait cependant dès à présent de la microscopie THG un outil particulièrement intéressant en biologie, tant pour l'imagerie structurale (visualisation des mouvements tissulaires) que pour le suivi ou la quantification spécifique de corps lipidiques dans des tissus variés. Sa complémentarité avec des techniques plus classiques de microscopie non linéaire comme la microscopie SHG ou 2PEF et sa facilité d'implantation sur les dispositifs existants permettent d'envisager à court terme son utilisation dans de nombreux domaines de la biologie.

Annexe A

Définition des susceptibilités non linéaires

Plusieurs conventions sont couramment utilisées dans la littérature pour la définition des susceptibilités non linéaires dont il est important de tenir compte lorsque l'on cherche à comparer les résultats obtenus à ceux de la littérature ou à des calculs théoriques. Nous avons choisi ici d'utiliser celles de la référence [124] dont les valeurs de $\chi^{(3)}(-3\omega;\omega,\omega,\omega)$ pour la silice et le BK7 ont servi de références aux mesures effectuées ici. Ainsi, nous définissons le champ électrique et la polarisation du milieu comme :

$$\begin{aligned} \boldsymbol{E}(\boldsymbol{r},t) &= \tfrac{1}{2}\sum_m \{\boldsymbol{E}_m(\boldsymbol{r},\omega_m)\exp\left[i(k_m z-\omega_m t)\right]+c.c.\} \\ \boldsymbol{P}(\boldsymbol{r},t) &= \tfrac{1}{2}\sum_m \{\boldsymbol{P}_m(\boldsymbol{r},\omega_m)\exp\left[i(k_m z-\omega_m t)\right]+c.c.\} \end{aligned} \tag{A.1}$$

La polarisation induite par le champ se propageant dans le milieu s'écrit [1] :

$$\boldsymbol{P}(t) = \boldsymbol{P_0}+\epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(1)}.\boldsymbol{E}(t)+\epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(2)}.\boldsymbol{E}(t).\boldsymbol{E}(t)+\epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(3)}.\boldsymbol{E}(t).\boldsymbol{E}(t).\boldsymbol{E}(t)+\ldots \tag{A.2}$$

Dans ce manuscrit on considère uniquement les processus : $\omega\rightarrow\omega$, $\omega+\omega\rightarrow 2\omega$ (SHG) et $\omega+\omega+\omega\rightarrow 3\omega$ (THG). Les polarisations correspondantes s'écrivent :

$$\begin{aligned} \boldsymbol{P}^{(1)}(\omega) &= \epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(1)}(-\omega;\omega).\boldsymbol{E}(\omega) \\ \boldsymbol{P}^{(2)}(2\omega) &= \tfrac{1}{2}\epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(2)}(-2\omega;\omega,\omega).\boldsymbol{E}(\omega).\boldsymbol{E}(\omega) \\ \boldsymbol{P}^{(3)}(3\omega) &= \tfrac{1}{4}\epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(3)}(-3\omega;\omega,\omega,\omega).\boldsymbol{E}(\omega).\boldsymbol{E}(\omega).\boldsymbol{E}(\omega) \end{aligned} \tag{A.3}$$

Enfin, l'intensité de l'onde à la fréquence ω est donnée par :

$$I_\omega = \frac{n_\omega}{2}\epsilon_0 c\,|\boldsymbol{E}(\omega)|^2 \tag{A.4}$$

Dans certains articles cités dans cette étude, les auteurs utilisent le système d'unités CGS. Toutes les données sont exprimées ici dans le systèmes SI, avec les unités :

- Intensité I en W/m^2
- Champ électrique E en V/m
- Susceptibilité d'ordre n $\chi^{(n)}$ en $(m/V)^{(n-1)}$

Pour la relation entre les grandeurs exprimées en unités CGS et en unités SI, voir par exemple [1, 124, 234].

Annexe B

Formulation générale du champ de troisième harmonique diffusé - différentes approximations

On dérive ici une expression pour le champ de troisième harmonique en champ lointain diffusé par un échantillon quelconque. Dans la section B.1, on donne tout d'abord la forme générale du champ THG, puis dans un deuxième temps, on précise les différentes approximations utilisées dans ce manuscrit.

B.1 Expression exacte

La polarisation à la pulsation 3ω induite dans un milieu de susceptibilité $\boldsymbol{\chi}^{(3)}(-3\omega;\omega,\omega,\omega)$ (notée plus simplement $\chi^{(3)}$ dans la suite) s'écrit :

$$\boldsymbol{P}_{3\omega}(x,y,z) \;=\; \frac{\epsilon_0}{4}\boldsymbol{\chi}^{(3)}\boldsymbol{E}_{\omega}(x,y,z)\cdot\boldsymbol{E}_{\omega}(x,y,z)\cdot\boldsymbol{E}_{\omega}(x,y,z) \tag{B.1}$$

où $\boldsymbol{\chi}^{(3)}$ est un tenseur de rang 4. Le champ de pulsation 3ω est solution de l'équation de Maxwell avec terme-source [1] :

$$\boldsymbol{\nabla}\times\boldsymbol{\nabla}\times\boldsymbol{E}_{3\omega}(\boldsymbol{r}) - k_{3\omega}^2\boldsymbol{E}_{3\omega}(\boldsymbol{r}) \;=\; \frac{4\pi(3\omega)^2}{c^2}\boldsymbol{P}_{3\omega}(\boldsymbol{r}) \tag{B.2}$$

dont la solution peut être exprimée à l'aide de fonctions de Green [88] (voir figure B.1) :

$$\boldsymbol{E}_{3\omega}(\boldsymbol{r}) \;=\; -\frac{4\pi(3\omega)^2}{c^2}\iiint_V \mathrm{dV}\left(\mathbb{I}+\frac{\boldsymbol{\nabla}\boldsymbol{\nabla}}{k_{3\omega}^2}\right)G(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r_1})\boldsymbol{P}_{3\omega}(\boldsymbol{r_1}) \tag{B.3}$$

où V est le volume de l'échantillon étudié et :

$$G(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r_1}) = \frac{\exp\left[ik_{3\omega}\left|\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r_1}\right|\right]}{4\pi\left|\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r_1}\right|} \tag{B.4}$$

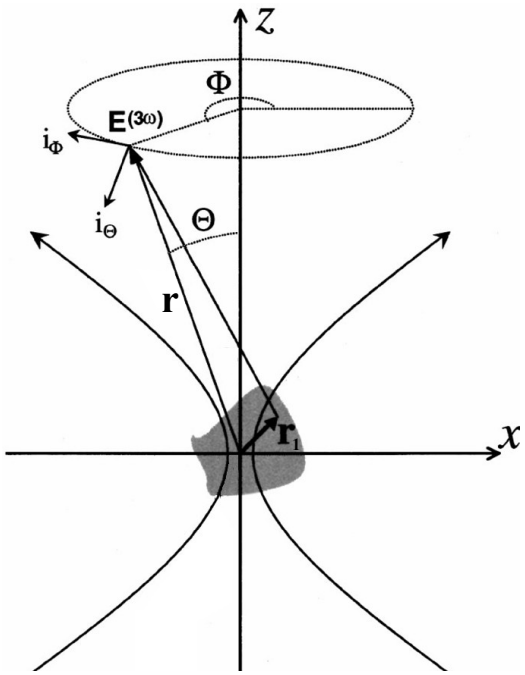


FIG. B.1 – NOTATIONS UTILISÉES.
Le vecteur $\boldsymbol{r}$ de coordonnées (r, θ, ϕ) (en coordonnées sphériques) ou (x, y, z) (en coordonnées cartésiennes) désigne la direction d'observation, tandis que le vecteur $\boldsymbol{r_1}$ indique la position du point considéré dans l'échantillon. Figure tirée de [88].

est la fonction de Green scalaire. Comme on détecte le signal rayonné en champ lointain, on peut utiliser la forme asymptotique de cette fonction en coordonnées sphériques [235] :

$$\lim_{|\boldsymbol{r}|\to\infty}\left(\mathbb{I}+\frac{\boldsymbol{\nabla}\boldsymbol{\nabla}}{k_{3\omega}^2}\right)G(\boldsymbol{r}-\boldsymbol{r_1}) = \frac{\exp\left[ik_{3\omega}\left|\boldsymbol{r}\right|\right]}{4\pi\left|\boldsymbol{r}\right|}\times\exp\left[\frac{-ik_{3\omega}\boldsymbol{r}.\boldsymbol{r_1}}{|\boldsymbol{r}|}\right] \times\begin{bmatrix} 1-\cos^2\phi\,\sin^2\theta & -\sin\phi\,\cos\phi\,\sin^2\theta & -\cos\phi\,\sin\theta\,\cos\theta \\ -\sin\phi\,\cos\phi\,\sin^2\theta & 1-\sin^2\phi\,\sin^2\theta & -\sin\phi\,\sin\theta\,\cos\theta \\ -\cos\phi\,\sin\theta\,\cos\theta & -\sin\phi\,\sin\theta\,\cos\theta & \sin^2\theta \end{bmatrix} \tag{B.5}$$

Finalement on trouve pour le champ diffusé :

$$\begin{bmatrix} E_{3\omega,x}(\boldsymbol{r}) \\ E_{3\omega,y}(\boldsymbol{r}) \\ E_{3\omega,z}(\boldsymbol{r}) \end{bmatrix} = -\frac{9\omega^2}{c^2}\frac{\exp\left[ik_{3\omega}\left|\boldsymbol{r}\right|\right]}{\left|\boldsymbol{r}\right|}\iiint_V \mathrm{dV}\exp\left[-ik_{3\omega}(\cos\phi\,\sin\theta\,x_1+\sin\phi\,\sin\theta\,y_1+\cos\theta\,z_1)\right]$$
$$\times\begin{bmatrix} 1-\cos^2\phi\,\sin^2\theta & -\sin\phi\,\cos\phi\,\sin^2\theta & -\cos\phi\,\sin\theta\,\cos\theta \\ -\sin\phi\,\cos\phi\,\sin^2\theta & 1-\sin^2\phi\,\sin^2\theta & -\sin\phi\,\sin\theta\,\cos\theta \\ -\cos\phi\,\sin\theta\,\cos\theta & -\sin\phi\,\sin\theta\,\cos\theta & \sin^2\theta \end{bmatrix}\times\begin{bmatrix} P_{3\omega,x}(\boldsymbol{r_1}) \\ P_{3\omega,y}(\boldsymbol{r_1}) \\ P_{3\omega,z}(\boldsymbol{r_1}) \end{bmatrix} \tag{B.6}$$

et la puissance totale rayonnée s'écrit :

$$\mathcal{P}_{3\omega} = \frac{n}{2}\epsilon_0 c\int_0^{\pi} d\theta\int_0^{2\pi}\boldsymbol{r}^2\sin\theta d\phi\left|\boldsymbol{E}_{3\omega}(\boldsymbol{r})\right| \tag{B.7}$$

B.2 Approximations

B.2.1 Direction de la polarisation induite

On fait ici deux hypothèses complètement indépendantes : la première concerne le milieu dans lequel l'onde harmonique est créée. On suppose que ce milieu est isotrope, c'est-à-dire que sa susceptibilité non linéaire est scalaire pour un faisceau polarisé linéairement et qu'il n'est pas biréfringent. Cette hypothèse est peu restrictive en biologie et est vérifiée dans les différents échantillons que nous avons étudié. La deuxième concerne le champ excitateur : on suppose que celui-ci est polarisé linéairement (dans la suite, on prendra cette polarisation selon l'axe x) et que même pour des conditions de forte focalisation, les composantes du champ excitateur selon les axes y et z peuvent être négligées dans la construction du signal THG. Cette approximation est pertinente puisque d'après Cheng et al. [88, 117], même dans le cas d'une ouverture numérique de focalisation de 1.4, on a :

$$\begin{aligned} \frac{\max\left[E_y^2\right]}{\max\left[E_x^2\right]} &\leq 0.003 \\ \frac{\max\left[E_z^2\right]}{\max\left[E_x^2\right]} &\leq 0.12 \end{aligned} \tag{B.8}$$

d'où les auteurs déduisent que leur contribution au signal rayonné est effectivement très faible (la THG étant un phénomène d'ordre élevé). Nous avons donc toujours utilisé cette approximation.

Dans ce cas, on peut considérer que la polarisation à 3ω induite dans le milieu par l'onde excitatrice est entièrement polarisée selon x et s'écrit :

$$\boldsymbol{P}_{3\omega}(x,y,z) = \frac{\epsilon_0}{4}\chi^{(3)}(x,y,z)E_{\omega}^3(x,y,z).\boldsymbol{e}_x \tag{B.9}$$

où $\boldsymbol{e}_x$ est le vecteur unitaire selon l'axe x. On peut alors réécrire l'équation du champ THG diffusé par l'échantillon :

$$\begin{bmatrix} E_{3\omega,x}(\boldsymbol{r}) \\ E_{3\omega,y}(\boldsymbol{r}) \\ E_{3\omega,z}(\boldsymbol{r}) \end{bmatrix} = -\frac{9\omega^2\epsilon_0}{4c^2}\frac{\exp\left[ik_{3\omega}\left|\boldsymbol{r}\right|\right]}{\left|\boldsymbol{r}\right|}\iiint_V \mathrm{dV}\exp\left[-ik_{3\omega}(\cos\phi\ \sin\theta\, x_1 + \sin\phi\ \sin\theta\, y_1 + \cos\theta\, z_1)\right]$$
$$\times\chi^{(3)}(x_1,y_1,z_1)E^3_\omega(x_1,y_1,z_1)\times\begin{bmatrix} 1-\cos^2\phi\ \sin^2\theta \\ -\sin\phi\ \cos\phi\ \sin^2\theta \\ -\cos\phi\ \sin\theta\ \cos\theta \end{bmatrix} \tag{B.10}$$

B.2.2 Forme du faisceau excitateur

Une autre hypothèse simplificatrice consiste à utiliser pour le faisceau excitateur une forme gaussienne-lorentzienne. Cette hypothèse est justifiée dans le cas d'un faisceau "faiblement focalisé" (NA≤0.7) et non diaphragmé au niveau de la pupille arrière de l'objectif de focalisation. Elle l'est moins dans le cas d'un faisceau diaphragmé par l'objectif, où la forme du faisceau est plutôt du type gaussienne-gaussienne [4].

Cette hypothèse d'un faisceau gaussien-lorentzien a cependant l'avantage de permettre une simplification importante de la formule du champ diffusé, et notamment de permettre d'effectuer de façon analytique au moins l'une des intégrales de l'équation B.10. Ainsi, afin de raccourcir le temps de calcul dans les simulations présentées, nous avons toujours utilisé cette approximation.

B.2.3 Approximation paraxiale pour l'onde diffusée

Finalement, nous avons pour certaines géométries utilisé une approximation supplémentaire : dans le cas d'un échantillon constitué d'une ou plusieurs tranches de milieu perpendiculaires au faisceau et d'épaisseur grande devant la longueur d'onde, nous avons considéré que le rayonnement à la fréquence harmonique se faisait selon l'axe optique, permettant d'utiliser l'approximation paraxiale. Cette hypothèse est justifiée notamment par les diagrammes de rayonnement calculés présentés dans le chapitre 2, section 2.3 (page 72).

Dans ce cas, on a :

$$|\boldsymbol{r}| \approx z + \frac{x^2+y^2}{2z} \quad \text{pour les termes de phase}$$

$$|\boldsymbol{r}| \approx z \quad \text{pour les termes d'amplitude}$$

$$\frac{\boldsymbol{r}.\boldsymbol{r_1}}{|\boldsymbol{r}|} \approx z_1 + \frac{xx_1+yy_1}{z} \tag{B.11}$$

$$\begin{bmatrix} 1-\cos^2\phi\ \sin^2\theta \\ -\sin\phi\ \cos\phi\ \sin^2\theta \\ -\cos\phi\ \sin\theta\ \cos\theta \end{bmatrix} \approx \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

Ces simplifications seront utilisées dans l'appendice suivant pour calculer le champ diffusé par deux interfaces perpendiculaires à l'axe optique.

Annexe C

Calcul de l'intensité THG créée par une interface perpendiculaire à l'axe optique

On cherche à dériver une expression analytique approchée pour l'intensité de troisième harmonique diffusée par l'échantillon décrit sur la figure C.1.

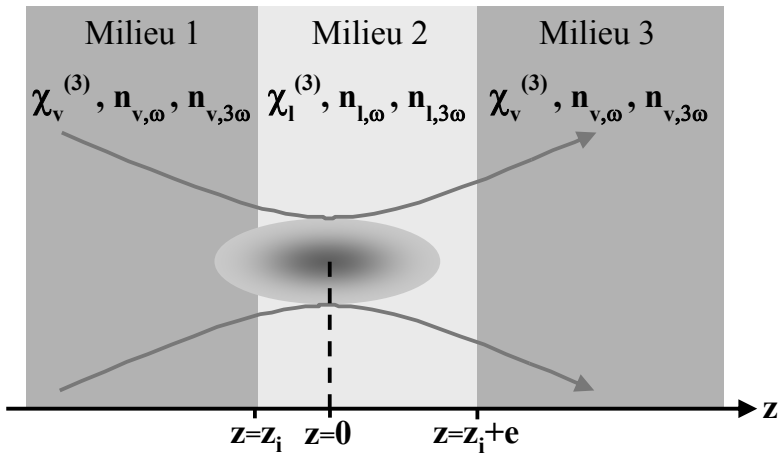


Fig. C.1 – Géométrie étudiée.
Une tranche de liquide (milieu 2) d'épaisseur e est entourée par deux parois en verre, semi-infinies à l'échelle du volume excitateur (milieux 1 et 3).

Le calcul de l'intensité diffusée étant complexe, il est ici décomposé selon les étapes suivantes : dans la première partie, on étudie la propagation d'une onde excitatrice monochromatique dans l'échantillon. La deuxième partie est consacrée au calcul du champ diffusé par un milieu semi-infini. Dans la troisième partie, les contributions des différents milieux sont sommées pour obtenir le champ total diffusé par l'échantillon dans le cas d'une onde monochromatique puis d'une impulsion courte polychromatique (quatrième partie). Enfin on présente dans la cinquième partie une équation simple pour l'analyse des courbes obtenues.

C.1 Propagation de l'onde excitatrice dans l'échantillon

Considérons tout d'abord la propagation d'un faisceau gaussien dans un tel échantillon : on se limite au cas où l'onde incidente se propageant dans le milieu 1 (verre) a pour expression[1] :

$$E_{1,\omega}(x,y,z,\omega,t) = \frac{E_0}{\sqrt{b}(1+i\frac{z}{n_{v,\omega}b})}\exp\left[\frac{-\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1+i\frac{z}{n_{v,\omega}b})}+\frac{2i\pi n_{v,\omega}z}{\lambda}\right]\exp\left[\frac{-\pi(\omega-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}-i\omega t\right] \tag{C.1}$$

où b est la longueur de Rayleigh, $n_{v,\omega}$ l'indice du milieu à la pulsation $\omega = 2\pi c/\lambda$,[2] ω_0 est la pulsation centrale de l'impulsion incidente et $\Delta\omega$ sa largeur spectrale.

On considère dans l'équation ci-dessus que la longueur confocale n'est pas fonction de la pulsation et que le profil spectral de l'impulsion est tout entier contenu dans la seconde exponentielle. De plus par souci de simplicité on s'est placé dans le cas simple d'un profil spectral gaussien (bien que cette hypothèse ne soit pas vérifiée dans le cas de notre source) dont la largeur est supposée « suffisamment faible » (ici $\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \approx 0.025$, voir la figure 1.15 à la page 30) pour pouvoir négliger les variations d'indice des différents milieux dans l'intervalle $\Delta\lambda$ (et donc entre autres l'étirement de l'impulsion). Enfin, on se limite ici à l'approximation gaussienne pour la propagation du faisceau.

Dans un premier temps et pour alléger les calculs, on va laisser de côté la dépendance spectrale de l'onde incidente pour ne considérer qu'une onde monochromatique de pulsation ω. La propagation de cette onde étant linéaire, on peut ensuite sommer directement les contributions obtenues aux différentes fréquences considérées pour obtenir l'impulsion propagée. Au niveau de l'interface verre/liquide située en $z = z_i$, le champ de l'onde vaut donc :

$$E_{1,\omega}(x,y,z_i) = \frac{E_0}{\sqrt{b}(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})}\exp\left[\frac{-\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})}+\frac{2i\pi n_{v,\omega}z_i}{\lambda}\right] \tag{C.2}$$

Lors du passage du milieu 1 (verre) au milieu 2 (liquide), cette expression doit être multipliée par le coefficient de transmission en amplitude sous incidence normale :

$$t_{vl}^{(\omega)} = \frac{2n_{v,\omega}}{n_{v,\omega}+n_{l,\omega}} \tag{C.3}$$

où $n_{v,\omega}$ est l'indice de réfraction du verre à la pulsation ω et $n_{l,\omega}$ celui du liquide étudié.

Le champ se propageant dans le liquide peut ensuite être calculé simplement dans l'approximation gaussienne par diffraction de Fresnel :

$$\begin{aligned} E_{2,\omega}(x,y,z\geq z_i) = & t_{vl}^{(\omega)}\frac{-i}{\lambda}\int_{-\infty}^{\infty}dx_1\int_{-\infty}^{\infty}dy_1\frac{E_{1,\omega}(x_1,y_1,z_i)}{z-z_i} \\ & \times\exp\left[\frac{2i\pi n_{l,\omega}}{\lambda}\left((z-z_i)+\frac{(x-x_1)^2+(y-y_1)^2}{2(z-z_i)}\right)\right] \end{aligned} \tag{C.4}$$

[1] On se restreint au cas d'un milieu isotrope, pour lequel quelle que soit la polarisation de l'onde incidente, les indices linéaires et non linéaires sont scalaires et de même valeur. Ainsi on écrira toutes les équations de cet appendice sous forme scalaire

[2] λ est donc la longueur d'onde dans le vide de l'onde incidente.

soit encore :

$$E_{2,\omega}(x,y,z\geq z_i) = t_{vl}^{(\omega)}\frac{-iE_0}{\lambda\sqrt{b}(z-z_i)(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})}\exp\left[\frac{2i\pi}{\lambda}(n_{v,\omega}z_i+n_{l,\omega}(z-z_i))\right] \int_{-\infty}^{\infty}dx_1\int_{-\infty}^{\infty}dy_1\exp\left[\frac{-\pi(x_1^2+y_1^2)}{\lambda b(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})}+\frac{i\pi n_{l,\omega}}{\lambda}\frac{(x-x_1)^2+(y-y_1)^2}{z-z_i}\right] \tag{C.5}$$

qui donne :

$$E_{2,\omega}(x,y,z\geq z_i) = t_{vl}^{(\omega)}\frac{E_0}{\sqrt{b}(1+i\frac{z-(1-(n_{l,\omega}/n_{v,\omega}))z_i}{n_{l,\omega}b})} \times\exp\left[\frac{2i\pi}{\lambda}(n_{v,\omega}-n_{l,\omega})z_i\right]\exp\left[\frac{-\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1+i\frac{z-(1-(n_{l,\omega}/n_{v,\omega}))z_i}{n_{l,\omega}b})}+\frac{2i\pi n_{l,\omega}z}{\lambda}\right] \tag{C.6}$$

De la même façon, on obtient dans le milieu 3 :

$$E_{3,\omega}(x,y,z\geq z_i+e) = t_{vl}^{(\omega)}t_{lv}^{(\omega)}\frac{E_0}{\sqrt{b}(1+i\frac{z-(1-(n_{v,\omega}/n_{l,\omega}))e}{n_{v,\omega}b})} \times\exp\left[\frac{2i\pi}{\lambda}(n_{l,\omega}-n_{v,\omega})e\right]\exp\left[\frac{-\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1+i\frac{z-(1-(n_{v,\omega}/n_{l,\omega}))e}{n_{v,\omega}b})}+\frac{2i\pi n_{v,\omega}z}{\lambda}\right] \tag{C.7}$$

On a négligé ici dans l'approximation gaussienne l'aberration sphérique liée à la focalisation à travers un dioptre plan : ceci se justifie dans le cas d'un faisceau faiblement focalisé ($NA \leq 0.35$, voir [135]), mais pas dans le cas d'un faisceau fortement focalisé. Dans ce cas, les aberrations résultantes vont clairement influer sur la propagation du faisceau et donc le signal THG obtenu (voir par exemple la figure 2.32, page 64) mais la prise en compte de ces aberrations rend le calcul de l'intensité diffusée très complexe et nous avons donc choisi de les négliger systématiquement dans les calculs effectués.

C.2 Génération de troisième harmonique par un milieu semi-infini

On considère maintenant le milieu présenté sur la figure C.2, dans lequel l'onde harmonique est produite seulement dans le milieu 1 (correspondant au demi-espace $z \leq z_i$).

D'après l'appendice B, en utilisant l'approximation paraxiale pour le champ rayonné, on

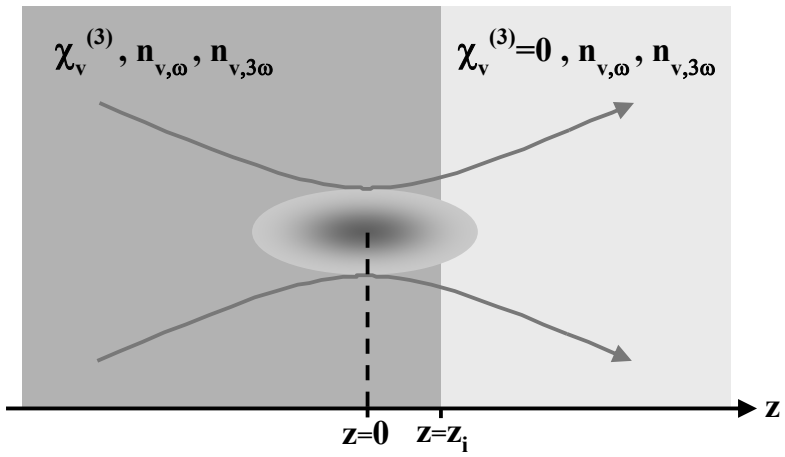


FIG. C.2 – GÉOMÉTRIE ÉTUDIÉE DANS CETTE SECTION.
La première paroi de verre est supposée accolée à un milieu de mêmes indices linéaires mais de susceptibilité non linéaire nulle.

obtient (voir équations B.10 et B.11) :

$$E_{3\omega,x}(x,y,z) = -\frac{9\omega^2\epsilon_0}{4c^2}\frac{\exp\left[ik_{v,3\omega}(z+\frac{x^2+y^2}{2z})\right]}{z}\iiint_V \mathrm{dV}\exp\left[-ik_{v,3\omega}(z_1+\frac{xx_1+yy_1}{z})\right] \times\chi_v^{(3)}(x_1,y_1,z_1)E_\omega^3(x_1,y_1,z_1) \tag{C.8}$$

soit en remplaçant le champ excitateur par son expression (équation C.2) et $\chi_v^{(3)}(x_1,y_1,z_1)$ par $\chi_v^{(3)}\times\theta(z_i-z_1)$ (où $\theta(z)$ est la fonction de Heavyside à une dimension) :

$$E_{3\omega,x}(x,y,z) = -\frac{9\pi^2\epsilon_0\chi_v^{(3)}E_0^3}{\lambda^2 b^{3/2}}\frac{\exp\left[ik_{v,3\omega}(z+\frac{x^2+y^2}{2z})\right]}{z}\iiint_V \mathrm{dV}\frac{\exp\left[-ik_{v,3\omega}(z_1+\frac{xx_1+yy_1}{z})\right]}{\left(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b}\right)^3} \times\exp\left[-i\frac{3\pi}{\lambda b}\frac{x_1^2+y_1^2}{1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b}}+\frac{6i\pi n_{v,\omega}z_1}{\lambda}\right] \tag{C.9}$$

On pose tout d'abord :

$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} dx_1 \exp\left[\frac{-3\pi x_1^2}{\lambda b(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})}+\frac{6i\pi n_{v,3\omega}xx_1}{\lambda z}\right]$$

$$I(y) = \int_{-\infty}^{\infty} dy_1 \exp\left[\frac{-3\pi y_1^2}{\lambda b(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})}+\frac{6i\pi n_{v,3\omega}yy_1}{\lambda z}\right] \tag{C.10}$$

Ces intégrales se résolvent analytiquement pour donner :

$$I(x) = \sqrt{\frac{\lambda b(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})}{3}}\exp\left[\frac{-3\pi b n_{v,3\omega}^2 x^2}{\lambda z^2}(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})\right]$$
$$I(y) = \sqrt{\frac{\lambda b(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})}{3}}\exp\left[\frac{-3\pi b n_{v,3\omega}^2 y^2}{\lambda z^2}(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})\right] \quad \text{(C.11)}$$

Pour $z >> z_1$, on peut négliger la dépendance en z_1 dans le terme de phase pour obtenir :

$$I(x) = \sqrt{\frac{\lambda b(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})}{3}}\exp\left[\frac{-3\pi b n_{v,3\omega}^2 x^2}{\lambda z^2}\right]$$
$$I(y) = \sqrt{\frac{\lambda b(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})}{3}}\exp\left[\frac{-3\pi b n_{v,3\omega}^2 y^2}{\lambda z^2}\right] \quad \text{(C.12)}$$

D'où finalement :

$$E_{v,3\omega}(x,y,z\geq z_i) = \frac{-3\pi^2\epsilon_0\chi_v^{(3)}E_0^3}{b^{1/2}\lambda}\frac{\exp\left[\frac{6i\pi n_{v,3\omega}}{\lambda}(z+\frac{x^2+y^2}{2z})-\frac{3\pi b n_{v,3\omega}^2}{\lambda z^2}(x^2+y^2)\right]}{z}$$
$$\times\int_{-\infty}^{z_i}\frac{dz_1}{(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b})^2}\exp\left[\frac{6i\pi(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})z_1}{\lambda}\right] \quad \text{(C.13)}$$

qui toujours pour $z >> b$ peut se réécrire :

$$E_{v,3\omega}(x,y,z\geq z_i) = \frac{-3i\pi^2\epsilon_0\chi_v^{(3)}E_0^3}{n_{v,3\omega}b\lambda}\exp\left[\frac{6i\pi n_{v,3\omega}}{\lambda}z\right]\frac{\exp\left[-\frac{3\pi}{\lambda b}\frac{x^2+y^2}{(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})}\right]}{\sqrt{b}\left(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b}\right)}$$
$$\times\int_{-\infty}^{z_i}\frac{dz_1}{\left(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b}\right)^2}\exp\left[\frac{6i\pi(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})z_1}{\lambda}\right] \quad \text{(C.14)}$$

L'intégrale obtenue ne peut être résolue analytiquement, mais il est possible dans deux cas particuliers de la simplifier notablement. En effet la fonction à intégrer peut être considérée comme le produit de deux termes, dont les échelles caractéristiques de variation sont notablement différentes : d'une part, la fonction $f(z_1)$ définie par :

$$f(z_1) = \frac{1}{\left(1+i\frac{z_1}{n_{v,\omega}b}\right)^2} \quad \text{(C.15)}$$

a pour échelle caractéristique $n_{v,\omega}b$; d'autre part, le terme $exp\left[\frac{6i\pi(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})z_1}{\lambda}\right]$ varie sur une taille typique :

$$l_c = \frac{\lambda}{3\left|n_{v,\omega}-n_{v,3\omega}\right|} \tag{C.16}$$

l_c est la longueur de cohérence du milieu (voir chapitre 2, section 2.1).

On va s'intéresser par la suite aux cas où ces deux échelles de variation sont suffisamment différentes l'une de l'autre pour pouvoir considérer que l'un des termes varie lentement par rapport à l'autre. Le cas intermédiaire nécessite un traitement numérique.

Dans un premier temps, on se placera dans le cas d'un milieu non dispersif ou très fortement focalisé, c'est-à-dire l_c est très grande devant la longueur de Rayleigh de l'onde incidente. Dans ce cas l'exponentielle est constante de valeur 1 et on s'intéressera seulement aux variations de la fonction f. On envisagera ensuite le cas d'un milieu dispersif éclairé par une onde peu focalisée, cas pour lequel la longueur de Rayleigh est grande devant la longueur de cohérence. Dans ce cas c'est la fonction f dont les variations ne seront considérées qu'au premier ordre[3].

a Cas d'un milieu non dispersif ou d'une onde fortement focalisée. Dans ce cas, on confond dans l'équation C.14 les indices $n_{v,\omega}$ et $n_{v,3\omega}$ [4] et seule la fonction f varie en fonction de z_1. On obtient donc :

$$E_{v,3\omega}(x,y,z\geq z_i) = \frac{-3i\pi^2\epsilon_0\chi_v^{(3)}E_0^3}{n_v b\lambda}\exp\left[\frac{6i\pi n_v}{\lambda}z\right]\frac{\exp\left[-\frac{3\pi}{\lambda b}\frac{x^2+y^2}{(1+i\frac{z}{n_v b})}\right]}{\sqrt{b}\left(1+i\frac{z}{n_v b}\right)}\int_{-\infty}^{z_i}\frac{dz_1}{\left(1+i\frac{z_1}{n_v b}\right)^2} \tag{C.17}$$

Soit finalement :

$$E_{v,3\omega}(x,y,z\geq z_i) = \frac{-3i\pi^2\epsilon_0\chi_v^{(3)}E_0^3}{\lambda\left(1+i\frac{z_i}{n_v b}\right)}\exp\left[\frac{6i\pi n_v}{\lambda}z\right]\frac{\exp\left[-\frac{3\pi}{\lambda b}\frac{x^2+y^2}{(1+i\frac{z}{n_v b})}\right]}{\sqrt{b}\left(1+i\frac{z}{n_v b}\right)} \tag{C.18}$$

C'est-à-dire en intensité :

$$I_{v,3\omega}(x,y,z\geq z_i) = \frac{9\pi^4\epsilon_0^3 c\, n_v\chi_v^{(3)2}E_0^6}{2\lambda^2\left(1+\left(\frac{z_i}{n_v b}\right)^2\right)}\times\frac{1}{b\left(1+\left(\frac{z}{n_v b}\right)^2\right)}\exp\left[-\frac{6\pi}{\lambda b}\frac{x^2+y^2}{1+(\frac{z}{n_v b})^2}\right] \tag{C.19}$$

On obtient donc pour l'onde harmonique un faisceau gaussien dont l'amplitude varie en lorentzienne en fonction de la distance entre l'interface et le point de focalisation de l'onde

[3] Voir la section 2.1 du chapitre 2, page 35, pour les zones de validité de ces approximations.

[4] Dans la suite de ce paragraphe on notera $n_{v,\omega} = n_{v,3\omega} = n_v$

incidente (voir figure 2.5-a, page 40). La puissance rayonnée vaut :

$$\mathcal{P}_{3\omega} = \frac{3\pi^4 \epsilon_0^3 c\, n_v \chi_v^{(3)2} E_0^6}{4\lambda\Big(1+\Big(\frac{z_i}{n_v b}\Big)^2\Big)} \tag{C.20}$$

b Cas d'un milieu très dispersif ou d'une onde faiblement focalisée. Dans ce cas on réécrit l'équation C.14 comme :

$$E_{v,3\omega}(x,y,z\geq z_i) \;=\; A\int_{-\infty}^{z_i} dz_1 f(z_1)\exp\left[\frac{2i\pi z_1}{l_c}\right]$$

$$A \;=\; \frac{-3i\pi^2\epsilon_0\chi_v^{(3)}E_0^3}{n_{v,3\omega}b\lambda}\exp\left[\frac{6i\pi n_{v,3\omega}}{\lambda}z\right]\frac{\exp\left[-\frac{3\pi}{\lambda b}\frac{x^2+y^2}{(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})}\right]}{\sqrt{b}\left(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b}\right)} \tag{C.21}$$

Que l'on peut décomposer :

$$\begin{aligned} E_{v,3\omega}(x,y,z\geq z_i) \;&= A\exp\left[-\frac{2i\pi z_i}{l_c}\right]\int_{-\infty}^{0} f(z_1+z_i)dz_1\exp\left[-\frac{2i\pi z_1}{l_c}\right] \\ &= A\exp\left[-\frac{2i\pi z_i}{l_c}\right]\times\sum_{j=0}^{+\infty}\int_{-(j+1)l_c}^{-j\,l_c} dz_1 f(z_i+z_1)\exp\left[-\frac{2i\pi z_1}{l_c}\right] \end{aligned} \tag{C.22}$$

Dans l'approximation où f varie lentement par rapport à l'exponentielle, on peut estimer f au premier ordre dans chacune des intégrales, pour obtenir :

$$\begin{aligned} E_{v,3\omega}(x,y,z\geq z_i) \;= A\exp\left[-\frac{2i\pi z_i}{l_c}\right]\Bigg[&\sum_{j=0}^{+\infty} f(z_i-j\,l_c)\int_0^{l_c}\exp[\frac{-2i\pi z_1}{l_c}]dz_1 \\ &+\sum_{j=0}^{+\infty} f'(z_i-j\,l_c)\int_0^{l_c} z_1\exp[\frac{-2i\pi z_1}{l_c}]dz_1\Bigg] \end{aligned} \tag{C.23}$$

La première des deux sommes obtenues est nulle par périodicité de l'exponentielle. Dans la

deuxième somme, les intégrales s'intègrent par partie pour donner finalement :

$$\begin{aligned} E_{v,3\omega}(x,y,z \geq z_i) &= A\,\frac{l_c}{2i\pi}\exp\left[-\frac{2i\pi z_i}{l_c}\right]\sum_{j=0}^{+\infty} l_c f^{'}(z_i - jl_c) \\ &= A\frac{l_c}{2i\pi}\exp\left[-\frac{2i\pi z_i}{l_c}\right]\int_{-\infty}^{0} dz_1 f^{'}(z_i + z_1) \\ &= A\frac{l_c}{2i\pi}\exp\left[-\frac{2i\pi z_i}{l_c}\right][f(z_i) - f(-\infty)] \end{aligned} \tag{C.24}$$

et on a de plus :

$$\begin{aligned} f(z_i) &= \frac{1}{\left(1 + i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b}\right)^2} \\ f(-\infty) &= 0 \end{aligned} \tag{C.25}$$

d'où l'expression du champ diffusé :

$$\begin{aligned} E_{v,3\omega}(x,y,z \geq z_i) =& \frac{\pi\epsilon_0\chi_v^{(3)}E_0^3}{2n_{v,3\omega}(n_{v,\omega} - n_{v,3\omega})b}\frac{\exp\left[\frac{6i\pi(n_{v,\omega} - n_{v,3\omega})z_i}{\lambda}\right]}{\left(1 + i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b}\right)^2}\frac{1}{b^{1/2}\left(1 + i\frac{z}{n_{v,3\omega}b}\right)} \\ &\times \exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1 + i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})} + \frac{6i\pi n_{v,3\omega}z}{\lambda}\right] \end{aligned} \tag{C.26}$$

C'est-à-dire en intensité :

$$\begin{aligned} I_{v,3\omega}(x,y,z \geq z_i) =& \frac{\pi^2\,\epsilon_0^3\,c\,\chi_v^{(3)2}E_0^6}{8b^2 n_{v,3\omega}(n_{v,\omega} - n_{v,3\omega})^2\left(1 + \left(\frac{z_i}{n_{v,\omega}b}\right)^2\right)^2} \\ &\times \frac{1}{b\left(1 + \left(\frac{z}{n_{v,3\omega}b}\right)^2\right)}\exp\left[-\frac{6\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1 + (\frac{z}{n_{v,3\omega}b})^2)}\right] \end{aligned} \tag{C.27}$$

On obtient donc pour l'onde harmonique un faisceau gaussien dont l'amplitude varie en lorentzienne au carré en fonction de la distance entre l'interface et le point de focalisation de

l'onde incidente (voir figure 2.5-b, page 40). La puissance rayonnée vaut :

$$\mathcal{P}_{3\omega} = \frac{\pi^2\,\epsilon_0^3\,c\,\lambda\,\chi_v^{(3)2}E_0^6}{48b^2 n_{v,3\omega}(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})^2\Big(1+\Big(\frac{z_i}{n_{v,\omega}b}\Big)^2\Big)^2} \tag{C.28}$$

C.3 Signal total de troisième harmonique

Le champ total diffusé par l'échantillon est obtenu en sommant les contributions provenant des trois milieux (verre, liquide, verre) le composant. Nous allons donc considérer ces trois milieux les uns après les autres, en établissant pour chacun l'expression du champ excitateur, le champ harmonique diffusé et enfin son expression à la sortie de l'échantillon. Pour cela il suffit de noter que l'onde harmonique étant elle-même gaussienne, les règles de propagation établies à la section C.1 s'appliquent à condition de tenir compte du changement des indices et des coefficients de transmission. Nous allons nous restreindre ici au cas d'un faisceau faiblement focalisé pour lequel la longueur de cohérence du milieu est faible par rapport à la longueur de Rayleigh.

a Champ créé par le milieu 1. Nous avons vu à l'équation C.1 à la page 194 l'expression du champ excitateur dans le milieu 1. De plus la valeur du champ harmonique créé a été établie dans le paragraphe b (équation C.26, page 200). Il reste donc simplement à faire propager le champ diffusé dans les milieux 2 et 3, ce qui donne en utilisant le même raisonnement que dans la section C.1 :

$$\begin{aligned} E_{1,3\omega}(x,y,z>>z_i+e) =& \frac{t_{vl}^{(3\omega)}t_{lv}^{(3\omega)}\,\pi\epsilon_0\chi_v^{(3)}E_0^3}{2n_{v,3\omega}(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})b}\frac{\exp\left[\dfrac{6i\pi((n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})z_i+(n_{l,3\omega}-n_{v,3\omega})e)}{\lambda}\right]}{\Big(1+i\dfrac{z_i}{n_{v,\omega}b}\Big)^2} \\ &\times\frac{1}{b^{1/2}\Big(1+i\dfrac{z-e(1-n_{v,3\omega}/n_{l,3\omega})}{n_{v,3\omega}b}\Big)} \\ &\times\exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b\Big(1+i\dfrac{z-e(1-n_{v,3\omega}/n_{l,3\omega})}{n_{v,3\omega}b}\Big)}+\frac{6i\pi n_{v,3\omega}z}{\lambda}\right] \end{aligned} \tag{C.29}$$

soit en champ lointain pour $z >> e$:

$$E_{1,3\omega}(x,y,z >> z_i + e) = \frac{t_{vl}^{(3\omega)} t_{lv}^{(3\omega)} \pi\epsilon_0 \chi_v^{(3)} E_0^3}{2n_{v,3\omega}(n_{v,\omega} - n_{v,3\omega})b} \frac{\exp\left[\dfrac{6i\pi((n_{v,\omega} - n_{v,3\omega})z_i + (n_{l,3\omega} - n_{v,3\omega})e)}{\lambda}\right]}{\left(1 + i\dfrac{z_i}{n_{v,\omega}b}\right)^2}$$
$$\times \frac{1}{b^{1/2}\left(1 + i\dfrac{z}{n_{v,3\omega}b}\right)} \exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b\left(1 + i\dfrac{z}{n_{v,3\omega}b}\right)} + \frac{6i\pi n_{v,3\omega} z}{\lambda}\right] \tag{C.30}$$

b Champ créé par le milieu 2. Nous avons vu à l'équation C.6 à la page 195 l'expression du champ excitateur dans le milieu 2. La valeur du champ harmonique créé dans le milieu 2 est donc :

$$E_{2,3\omega}(x,y,z \geq z_i + e) = -t_{vl}^{(\omega)3} \frac{\pi\epsilon_0 \chi_l^{(3)} E_0^3}{2n_{l,3\omega}(n_{l,\omega} - n_{l,3\omega})b} \frac{\exp\left[\dfrac{6i\pi(n_{v,\omega} - n_{l,3\omega})z_i}{\lambda}\right]}{(1 + i\dfrac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2} \frac{1}{b^{1/2}(1 + i\dfrac{z}{n_{l,3\omega}b})}$$
$$\times \exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1 + i\dfrac{z}{n_{l,3\omega}b})} + \frac{6i\pi n_{l,3\omega} z}{\lambda}\right]$$
$$+ t_{vl}^{(\omega)3} \frac{\pi\epsilon_0 \chi_l^{(3)} E_0^3}{2n_{l,3\omega}(n_{l,\omega} - n_{l,3\omega})b} \frac{\exp\left[\dfrac{6i\pi((n_{v,\omega} - n_{l,3\omega})z_i + (n_{l,\omega} - n_{l,3\omega})e)}{\lambda}\right]}{(1 + i\dfrac{z_i + e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2} \frac{1}{b^{1/2}(1 + i\dfrac{z}{n_{l,3\omega}b})}$$
$$\times \exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1 + i\dfrac{z}{n_{l,3\omega}b})} + \frac{6i\pi n_{l,3\omega} z}{\lambda}\right] \tag{C.31}$$

soit en sortie de l'échantillon :

$$E_{2,3\omega}(x,y,z \geq z_i + e) = -\frac{t_{vl}^{(\omega)3} t_{lv}^{(3\omega)} \pi\epsilon_0 \chi_l^{(3)} E_0^3}{2n_{l,3\omega}(n_{l,\omega} - n_{l,3\omega})b} \times \frac{\exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})} + \frac{6i\pi n_{v,3\omega} z}{\lambda}\right]}{b^{1/2}(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})}$$

$$\times \left[\frac{\exp\left[\frac{6i\pi((n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})z_i + (n_{l,3\omega}-n_{v,3\omega})e)}{\lambda}\right]}{(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2} + \frac{\exp\left[\frac{6i\pi((n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})z_i + (n_{l,\omega}-n_{v,3\omega})e)}{\lambda}\right]}{(1+i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2}\right] \tag{C.32}$$

c Champ créé par le milieu 3. Nous avons vu à l'équation C.7 à la page 195 l'expression du champ excitateur dans le milieu 3. La valeur du champ harmonique créé dans le milieu 3, qui est également celle en sortie de l'échantillon, est donc (toujours pour$z >> z_i, z_i + e$) :

$$E_{3,3\omega}(x,y,z \geq z_i) = -t_{vl}^{(\omega)3} t_{lv}^{(\omega)3} \frac{\pi\epsilon_0 \chi_v^{(3)} E_0^3}{2n_{v,3\omega}(n_{v,\omega} - n_{v,3\omega})b} \frac{\exp\left[\frac{6i\pi((n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})z_i + (n_{l,\omega}-n_{v,3\omega})e\right]}{\lambda}}{(1+i\frac{z_i+(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})e}{n_{v,\omega}b})^2}$$

$$\times \frac{1}{b^{1/2}(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})} \exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})} + \frac{6i\pi n_{v,3\omega} z}{\lambda}\right] \tag{C.33}$$

d Champ total diffusé. Le champ total diffusé est obtenu en sommant les différentes contributions explicitées dans les équations C.30, C.32 et C.33 :

$$E_{tot,3\omega}(x,y,z>>z_i+e) = \frac{\pi\epsilon_0 E_0^3 \exp\left[\frac{6i\pi(n_{v,3\omega}z+(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})z_i+(n_{l,3\omega}-n_{v,3\omega})e)}{\lambda}\right]}{2b^{3/2}(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})}$$
$$\exp\left[-\frac{3\pi(x^2+y^2)}{\lambda b(1+i\frac{z}{n_{v,3\omega}b})}\right]\times\left[\frac{\exp\left[\frac{6i\pi(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{\lambda}\right]}{(1+i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2}\left(\frac{\chi_l^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{l,3\omega}(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})}-\frac{\chi_v^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(\omega)3}}{n_{v,3\omega}(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})}\right)\right.$$
$$\left.+\frac{1}{(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2}\left(\frac{\chi_v^{(3)}t_{vl}^{(3\omega)}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{v,3\omega}(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})}-\frac{\chi_l^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{l,3\omega}(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})}\right)\right] \tag{C.34}$$

La quantité mesurée dans ces expériences est en fait la puissance du signal de troisième harmonique rayonnée, collectée par une lentille dont le diamètre est très supérieur à celui du faisceau gaussien diffusé par l'échantillon. On peut donc obtenir l'expression de cette puissance en combinant la formule B.7 et l'expression C.34 du champ total rayonné, ce qui donne finalement :

$$\mathcal{P}_{tot,3\omega} = \frac{\pi^2\epsilon_0^3 n_{v,3\omega}\, c\,\lambda E_0^6}{48b^2}\left|\frac{\exp\left[\frac{6i\pi(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{\lambda}\right]}{(1+i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2}\left(\frac{\chi_l^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{l,3\omega}(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})}-\frac{\chi_v^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(\omega)3}}{n_{v,3\omega}(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})}\right)\right.$$
$$\left.+\frac{1}{(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2}\left(\frac{\chi_v^{(3)}t_{vl}^{(3\omega)}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{v,3\omega}(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})}-\frac{\chi_l^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{l,3\omega}(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})}\right)\right|^2 \tag{C.35}$$

De plus dans les expériences menées ici, on a avec une précision supérieure à 0.1% (erreur qui est négligeable par rapport aux incertitudes expérimentales) :

$$t_{vl}^{(3\omega)}t_{lv}^{(3\omega)} \approx t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(\omega)3}$$

$$\frac{\chi_l^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{l,3\omega}(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})}-\frac{\chi_v^{(3)}t_{vl}^{(3\omega)}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{v,3\omega}(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})} \approx \frac{\chi_l^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(3\omega)}}{n_{l,3\omega}(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})}-\frac{\chi_v^{(3)}t_{vl}^{(\omega)3}t_{lv}^{(\omega)3}}{n_{v,3\omega}(n_{v,\omega}-n_{v,3\omega})}=\alpha \tag{C.36}$$

soit :

$$\mathcal{P}_{tot,3\omega} = \frac{\pi^2\epsilon_0^3 n_{v,3\omega}\, c\,\lambda E_0^6\,|\alpha|^2}{48b^2}\left|\frac{\exp\left[\frac{6i\pi(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{\lambda}\right]}{(1+i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2}+\frac{1}{(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2}\right|^2 \tag{C.37}$$

C.4 Cas d'une impulsion courte polychromatique

Considérons le cas simple d'une impulsion femtoseconde dont le spectre est supposé gaussien. On écrira sans tenir compte de la dépendance spatiale du champ :

$$E_\omega(\omega,t) \;=\; \frac{E_0}{\sqrt{\Delta\omega}}\exp\left[\frac{-\pi(\omega-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}-i\omega t\right] \tag{C.38}$$

Lors de la construction de l'onde harmonique dans le milieu, on aura un mélange de fréquences aboutissant à différentes fréquences harmoniques proches de ω_0, correspondant à des ondes incohérentes entre elles et dont on sommera finalement l'intensité. Compte tenu de la faible valeur de la largeur spectrale de la source considérée (voir figure 1.15, page 30), on peut justifier l'approximation selon laquelle les propriétés de l'échantillon (à savoir les indices linéaires et non-linéaires des différents milieux) sont constantes sur cette gamme. Ceci assure que la dépendance spatiale de l'onde harmonique ne dépend que de la somme des trois fréquences la composant. Ainsi on peut écrire simplement le champ harmonique créé à la pulsation 3ω comme :

$$E_{THG}(3\omega,t) \;=\; f_{THG}(x,y,z)\int_{-\infty}^{\infty}d\omega_1\int_{-\infty}^{\infty}d\omega_2 E(\omega_1,t)E(\omega_2,t)E(3\omega-\omega_1-\omega_2,t) \tag{C.39}$$

où la fonction $f_{THG}(x,y,z)$ décrit la dépendance spatiale du champ harmonique. En substituant le champ excitateur par son expression de l'équation C.38, on obtient :

$$\begin{aligned}E_{THG}(3\omega,t) \;=& f_{THG}(x,y,z)\frac{E_0^3}{\Delta\omega^{3/2}}\int_{-\infty}^{\infty}d\omega_1\int_{-\infty}^{\infty}d\omega_2\exp\left[\frac{-\pi(\omega_1-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}-i\omega_1 t-\frac{\pi(\omega_2-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}-i\omega_2 t\right]\\ &\times\exp\left[\frac{-\pi(3\omega-\omega_1-\omega_2-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}-i(3\omega-\omega_1-\omega_2)t\right]\end{aligned} \tag{C.40}$$

que l'on peut réécrire :

$$\begin{aligned}E_{THG}(3\omega,t) \;=& f_{THG}(x,y,z)\frac{E_0^3}{\Delta\omega^{3/2}}\exp\left[-3i\omega t\right]\int_{-\infty}^{\infty}d\omega_1\int_{-\infty}^{\infty}d\omega_2\\ &\times\exp\left[-\frac{\pi((\omega_1-\omega_0)^2+(\omega_2-\omega_0)^2+(3\omega-\omega_1-\omega_2-\omega_0)^2)}{\Delta\omega^2}\right]\end{aligned} \tag{C.41}$$

soit encore :

$$\begin{aligned}E_{THG}(3\omega,t) \;=& f_{THG}(x,y,z)\frac{E_0^3}{\Delta\omega^{3/2}}\exp\left[-3i\omega t-\frac{3\pi(\omega_0-\omega)^2}{\Delta\omega^2}\right]\\ &\times\int_{-\infty}^{\infty}d\omega_1\int_{-\infty}^{\infty}d\omega_2\exp\left[-\frac{\pi(2(\omega_1+(\frac{\omega_2}{2}-\frac{3\omega}{2}))^2+\frac{3}{2}(\omega_2-\omega)^2)}{\Delta\omega^2}\right]\end{aligned} \tag{C.42}$$

qui s'intègre pour donner :

$$E_{THG}(3\omega,t) \;=\; f_{THG}(x,y,z)\frac{E_0^3\sqrt{\Delta\omega}}{\sqrt{3}}\exp\left[-3i\omega t-\frac{3\pi(\omega_0-\omega)^2}{\Delta\omega^2}\right] \tag{C.43}$$

On obtient ainsi la répartition spectrale de l'impulsion diffusée. De là on peut déduire l'intensité collectée sur le détecteur, dont la réponse est supposée plate sur la gamme de longueur d'onde considérée, en intégrant sur la fréquence l'intensité diffusée :

$$\begin{aligned}\mathcal{P}_{tot} \;&=\Delta\omega\int_{-\infty}^{\infty}d\omega\frac{\pi^2\epsilon_0^3\,n_{v,3\omega}\,c\,\lambda E_0^6\,|\alpha|^2}{144b^2}\exp\left[-\frac{6\pi(\omega_0-\omega)^2}{\Delta\omega^2}\right]\\ &\times\left|\frac{\exp\left[\frac{3i\omega(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{c}\right]}{(1+i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2}+\frac{1}{(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2}\right|^2\end{aligned} \tag{C.44}$$

qui donne après intégration :

$$\begin{aligned}\mathcal{P}_{tot} \;=&\frac{\pi^2\epsilon_0^3\Delta\omega^2\,n_{v,3\omega}\,c\,\lambda E_0^6\,|\alpha|^2}{144\sqrt{6}b^2}\left[\frac{1}{\left(1+(\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2\right)^2}+\frac{1}{\left(1+(\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2\right)^2}\right.\\ &\left.+\;\frac{\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\exp\left[\frac{3i\omega_0(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{c}\right]}{(1+i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2(1-i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2}+\frac{\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\exp\left[-\frac{3i\omega_0(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{c}\right]}{(1-i\frac{z_i+e(n_{v,\omega}/n_{l,\omega})}{n_{v,\omega}b})^2(1+i\frac{z_i}{n_{v,\omega}b})^2}\right]\end{aligned} \tag{C.45}$$

où

$$l_a \;=\; \frac{\sqrt{\frac{8\pi}{3}}c}{(n_{l,3\omega}-n_{l,\omega})\Delta\omega} \tag{C.46}$$

C.5 Exploitation des expériences de mesure de la susceptibilité

Dans les expériences de mesure de la susceptibilité non linéaire décrites dans le chapitre 3, on repère l'intensité maximale obtenue en fonction de z_i pour chaque valeur de l'épaisseur e et on cherche à déterminer l'équation de la courbe $I = f(e)$ correspondante afin d'en déduire les valeurs des susceptibilités non linéaires. On obtient l'équation :

$$\mathcal{P}_{max} \;=\; \frac{\pi^2\epsilon_0^3\Delta\omega^2\,n_{v,3\omega}\,c\,\lambda E_0^6\,|\alpha|^2}{72\sqrt{6}b^2}\times\frac{1+\exp\left[-(\frac{e}{l_a})^2\right]\cos\left[\frac{3\omega_0(n_{l,\omega}-n_{l,3\omega})e}{c}-4\arctan(\frac{e}{2n_{l,\omega}b})\right]}{\left(1+(\frac{e}{2n_{l,\omega}b})^2\right)^2} \tag{C.47}$$

Ces valeurs maximales sont obtenues pour $z_i = -\frac{n_{v,\omega}}{n_{l,\omega}}\frac{e}{2}$, soit lorsque le point de focalisation se situe à égale distance des deux interfaces (aux effets de réfraction de l'onde excitatrice près). Cette équation permet un ajustement simple des courbes obtenues avec une amplitude proportionnelle à $|\alpha|^2$.

Annexe D

Indices linéaires pour les différents verres et liquides utilisés dans cette étude

Les valeurs des indices linéaires pour l'eau ont été obtenues en combinant les données des références [112, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242]. La courbe obtenue à partir de ces différentes sources est présentée sur la figure D.1. Nous l'avons ajustée pour obtenir une formule de Cauchy pour l'indice en fonction de la longueur d'onde. Cette formule a servi à calculer les valeurs utilisées dans ce travail. La bonne qualité de l'ajustement et la concordance des données trouvées dans la litérature attestent de l'acuité des valeurs choisies.

De la même façon, nous avons réalisé un ajustement par la même formule pour les valeurs d'indices de l'éthanol, obtenues à partir des références [236, 237, 238, 240, 241, 242].

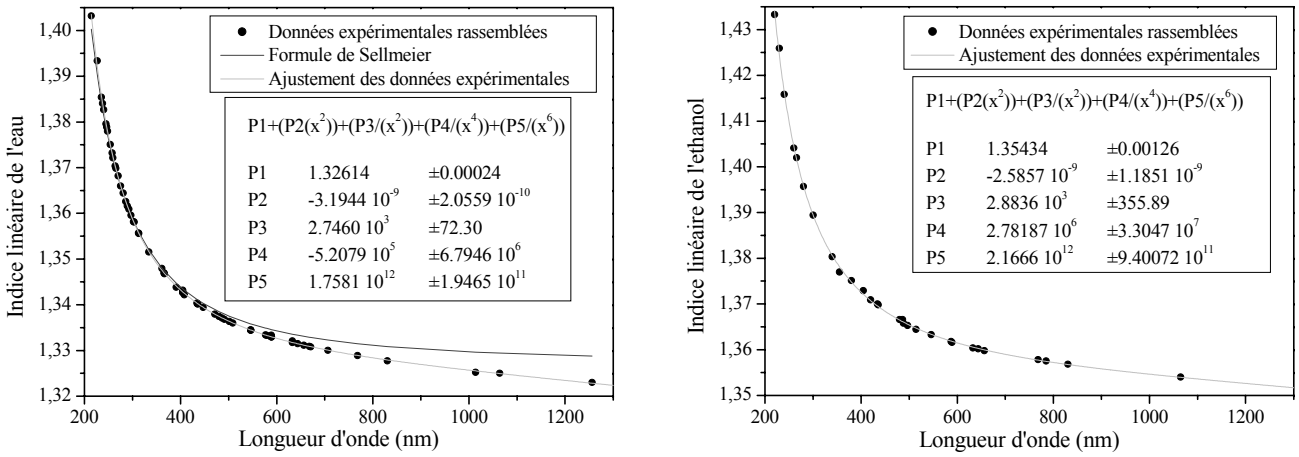


FIG. D.1 – INDICES LINÉAIRES UTILISÉS POUR L'EAU ET L'ÉTHANOL.
Les valeurs collectées à partir de différentes sources précisées dans le texte divergent notablement des valeurs utilisées par Kajzar et al [130] (formule de Sellmeier extraite de la référence [243]), induisant d'importantes différences dans les valeurs de $\chi^{(3)}$ calculées.

Les indices utilisés pour les différents composés ioniques ont été obtenus pour une longueur

d'onde de 633 nm dans la référence [236]. La dispersion d'indice a quant à elle été mesurée à partir de la période des franges de Maker (voir section 3.1).

Les indices des verres ont été calculés par la formule de Sellmeier :

$$n(\lambda)^2 - 1 = \frac{A_1\lambda^2}{\lambda^2 - A_4} + \frac{A_2\lambda^2}{\lambda^2 - A_5} + \frac{A_3\lambda^2}{\lambda^2 - A_6} \tag{D.1}$$

où $n(\lambda)$ est l'indice du verre considéré et $A_1, A_2, A_3, A_4, A_5, A_6$ sont des coefficients donnés dans la table D.1 (pour λ exprimée en µm).

Coefficients	Silice	BK7
A_1 (µm^{-2})	0.69617	1.03961
A_2 (µm^{-2})	0.40794	0.23179
A_3 (µm^{-2})	0.89748	1.01047
A_4 (µm^2)	0.004679	0.006001
A_5 (µm^2)	0.013512	0.020018
A_6 (µm^2)	97.934	103.561

TAB. D.1 – COEFFICIENTS DE SELLMEIER POUR LA SILICE ET LE BK7.
Coefficients extraits du catalogue Schott.

L'indice utilisé pour le mélange de triglycérides à 633 nm est celui de la triacétine (ou triacétate de glycérine), pour laquelle le standard européen est 1.465 (http ://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/addit_flavor/flav05_fr.pdf). La dispersion d'indice a quant à elle été mesurée à partir de la période des franges de Maker (voir section 3.1).

L'indice de l'huile végétale (huile d'olive) utilisé à 633 nm est conforme au standard français de 1.435 (http ://r0.unctad.org/francais/olive/doc/Cxs_033f.pdf). La dispersion d'indice a quant à elle été mesurée à partir de la période des franges de Maker (voir section 3.1).

Annexe E

Compléments de matériels et méthodes

1. Préparation des gels de billes.

Les billes (Sigma et Polysciences, Inc.) de polystyrène de diamètre calibré sont diluées jusqu'à une concentration 4 fois plus élevée que la concentration finale recherchée dans 500 µL d'eau distillée (le facteur de dilution des billes dépend de leur taille car leur concentration initiale - 10% de la solution en volume - est variable selon leur taille). Un gel d'agarose à 3% en masse est ensuite préparé par chauffage d'agarose dans de l'eau distillée, puis 1.5 mL de ce mélange est ajouté aux billes diluées. Après agitation, le tout est versé dans une boîte de Pétri de 3 cm de diamètre. Après refroidissement, le gel obtenu est démoulé et coupé aux dimensions latérales voulues. Pour mesurer l'influence de la rétrodiffusion incohérente sur la détection du signal, des gels plus épais sont obtenus en multipliant par 8 les quantités utilisées.

2. Embryons de drosophile

Lignées utilisées

Lignée sauvage. La lignée Oregon R a été utilisée comme souche sauvage de *Drosophila melanogaster*.

Marquage fluorescent des noyaux. La souche nls-GFP obtenue auprès du stock de Bloomington (Bloomington, 5630) exprime l'eGFP fusionnée avec une séquence de localisation nucléaire [193].

Marquage fluorescent des membranes cellulaires. La souche sGMCA-3.1, don de D.P. Kiehart et R.A. Montague (Duke University Medical Center, États-Unis), exprime l'eGFP fusionnée avec le fragment de la moesine lié à l'actine [192].

Marquage fluorescent des mitochondries, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. La souche Psqh-EYFP-Mito3 obtenue auprès du stock de Bloomington (Bloomington, 7194) exprime la eYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) fusionnée avec une séquence de localisation mitochondriale. La souche Psqh-EYFP-ER3 obtenue auprès du stock de Bloomington (Bloomington, 7195) exprime la eYFP fusionnée avec une séquence de localisation

vers le réticulum endoplasmique. La souche Psqh-EYFP-Golgi3 obtenue auprès du stock de Bloomington (Bloomington, 7193) exprime la eYFP fusionnée avec une séquence de localisation vers l'appareil de Golgi [244].

Mutations *Concertina* et *Dorsal*. Les lignées mutantes exprimant l'allèle amorphe cta^{RC10} (mutant *Concertina*) et l'allèle dl^1 (mutant *Dorsal*) ont été fournis par M. Leptin (Köln, Allemagne).

Préparation des embryons pour l'imagerie

Il est possible de retirer le chorion (optiquement très aberrant) sans compromettre le développement de l'embryon à condition de le maintenir dans de bonnes conditions d'oxygénation. Celles-ci sont assurées par l'utilisation d'objectifs ayant une grande distance de travail (2 mm).

Les embryons sont sélectionnés à 25°C dans l'huile (permettant de mieux visualiser le stade de développement) au tout début du stade 5, rincés puis déchorionés dans l'eau de Javel non diluée pendant 20-30 s. Ils sont ensuite soigneusement rincés puis déposés sur leur face latérale sur une lamelle sur laquelle a été préalablement déposée une couche de colle[1] [245]. Ils sont ensuite recouverts d'une goutte de PBS. La température de la pièce où se fait l'imagerie est de 19°C, et 20°C pour certaines expériences (dans ce cas la température est précisée dans le texte).

Après imagerie, l'embryon imagé est repéré par une marque parmi la dizaine d'embryons collés sur chaque lamelle. La lamelle est ensuite immergée dans le PBS dans une boîte de Pétri de diamètre 5 cm scellée par du parafilm, et l'ensemble est conservé à 25°C. Au bout de 24 h environ, on vérifie à la loupe binoculaire l'éclosion des larves pour déterminer quels embryons ont survécu. Les embryons non imagés servent de témoins pour vérifier que la préparation des embryons n'a pas compromis leur survie.

Fixation et marquage

Les embryons déchorionnés sont fixés à l'interface d'une phase d'heptane (Sigma) et de formaldéhyde à 4% (Sigma) pendant environ une heure, sous agitation douce et à température ambiante. L'heptane est nécessaire pour perméabiliser la membrane vitelline de l'embryon. Les embryons (qui sont à ce stade insolubles en phase aqueuse) sont ensuite rincés soigneusement par un mélange PBS + 0.1% Triton (Sigma), puis par de l'eau distillée, et de nouveau par le mélange PBS + 0.1% Triton. Les embryons sont alors solubilisés et flottent dans le liquide. Enfin, la solution est remplacée par un mélange PBS + 0.5% BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma). A ce stade, les embryons peuvent être stockés à 4°C.

Le marquage s'effectue dans la même solution en ajoutant le colorant Nile Red (à partir d'une solution stock à 0.5 mg/mL dans l'acétone) à une concentration finale de 1.6 µg/mL, et en incubant pendant une heure. Finalement, les embryons sont rincés soigneusement et montés dans la même solution.

[1] La colle est obtenue en dissolvant celle provenant de scotch double-face (marque Tésa) dans de l'heptane.

3. Solutions pour les mesures de susceptibilité

Les différents composés ioniques, l'éthanol, le glucose, l'acide glutamique, la triglycine, le cytochrome c et la BSA ont été achetés chez Sigma. Les solutions ont été préparées en dissolvant une masse adéquate de composé dans de l'eau distillée, à l'exception du cytochrome c, dissout dans un tampon Tris-HCl (pH=7.2). La conversion des concentrations massiques en concentrations molaires a été effectuée à partir des données de la référence [236]. Les solutions obtenues ont été utilisées dans les heures suivant leur préparation.

Le mélange de triglycérides (glyceryl trihexanoate, glyceryl tridecanoate, glyceryl trioctanoate, triacetin et tributyrin, à parts égales en masse) et le cholestérol ont été achetés chez Sigma.

4. Préparation des vésicules unilamellaires géantes

Le protocole de préparation des GUVs est adapté de la référence [137]. Brièvement, les vésicules ont été préparées à partir de DOPC (Avanti Polar Lipids, Inc.) en solution dans le chloroforme (10 mg/mL). 30 µL de cette solution stock sont dilués sous hotte dans 270 µL d'un mélange 2/3 dichlorométhane, 1/3 éthanol[2]. La solution obtenue est déposée entièrement sur deux lames de verre recouvertes d'ITO (*indium tin oxide*), préalablement nettoyées à l'éthanol. Les lames sont laissées sous hotte 1 h 30, puis placée pendant une nuit dans une cloche à vide pour parfaire l'évaporation du solvant.

Les lames sont ensuite placées face-à-face et maintenue à 1 mm d'écart par une cale de téflon pour former une chambre étanche d'électroformation. Dans cette chambre est injectée une solution de gonflement de sucrose de concentration 300 mmol/L additionnée de quelques grains d'azide de sodium. Un courant alternatif de 1.2 V à une fréquence de 15 Hz est appliqué entre les deux électrodes pendant 3 h. La chambre est ensuite maintenue à 4°C pendant une nuit puis la solution est extraite et diluée dans une solution de glucose (300 mmol/L) de même osmolarité mais de densité inférieure. Les GUVs sédimentent alors au fond du tube eppendorf utilisé et peuvent être conservées ainsi plusieurs semaines.

5. Préparation des hépatocytes

Les hépatocytes sont isolés par digestion enzymatique limitée d'un foie de rat fraîchement

[2]Le protocole de la référence [137] utilise un mélange chloroforme/méthanol, mais nous avons choisi de les remplacer par des solvants moins toxiques.

sacrifié, selon la procédure décrite dans la référence [138].

Pour la vérification de la viabilité des cellules après imagerie THG, les hépatocytes sont maintenus à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO_2 dans un milieu adapté (Williams E + 10% de sérum de veau fœtal + pénicilline à 200000 U/mL + streptomycine à 100mg/mL). Dans ces conditions, la vérification de la survie par coloration au bleu Trypan indique un taux de survie supérieur à 95% au bout de 24 h.

La fixation éventuelle est effectuée par une solution de formaldéhyde à 4% pendant 10 min, après avoir laissé reposer les cellules durant 2 h sur une lamelle de microscope recouverte de collagène.

Le marquage des hépatocytes est effectué après fixation par incubation dans une solution de PBS contenant 5 µg/mL de Nile Red (à partir d'une solution stock à 0.5 mg/mL dans l'acétone) pendant 10 min. Les hépatocytes sont ensuite soigneusement rincés au PBS et immédiatement montés dans le PBS pour imagerie.

6. Échantillons de poumon

Des souris agées de 6 à 7 semaines ont été sacrifiées, et les poumons ont été rincés et placés dans du sérum physiologique pour l'imagerie. Les images ont été faites dans les heures suivant l'excision.

Le marquage par Nile Red a été effectué sur une tranche de poumon frais d'environ 800 µm d'épaisseur à une concentration de 5µg/mL de Nile Red (à partir d'une solution stock à 0.5 mg/mL dans l'acétone) dans du sérum physiologique pendant 20 min. Après le marquage, le poumon est rincé soigneusement au sérum physiologique.

7. Échantillons de plantes

Des graines vertes d'*Arabidopsis thaliana* ont été prélevées dans leur silique et imagées dans l'heure suivante. Le marquage au Nile Red nécessite une digestion partielle des parois cellulaires par une solution enzymatique ($CaCl_2$, 2 mmol/L ; KCl, 1 mmol/L ; tampon MES/Tris, pH 5.5 ; cellulase RS, 0.3% ; pectolyase Y23, 0.03%), pendant 40 min à 24°C. Les graines ont ensuite été incubées pendant 40 min dans une solution contenant 5µg/mL de Nile Red (à partir d'une solution stock à 0.5 mg/mL dans l'acétone), puis rincées soigneusement à l'eau.

Des graines sèches de *Medicago truncatula* (luzerne), *Brassica napus* (colza) et *Glycine max* (soja) ont été hydratées durant 24 h dans l'eau puis coupées en tranches d'environ 200 µm d'épaisseur. Les tranches ont été marquées pendant 30 min dans une solution contenant 5 µg/mL de Nile Red (à partir d'une solution stock à 0.5 mg/mL dans l'acétone), puis rincées soigneusement à l'eau.

Enfin, des feuilles fraîches d'*Arabidopsis thaliana* ont été prélevées sur des plants et imagés dans l'heure suivante en milieu aqueux.

8. Adultes et embryons de *C.elegans*

La souche N2 a été utilisée comme souche sauvage de C.elegans. Les vers ont été élevés à 20°C sur des lames contenant un milieu de culture NGM (*Nematode Growth Medium*) et nourris avec la souche OP50 d'Escherichia Coli [246].

Pour l'imagerie, les animaux sont anesthésiés par une solution contenant 10 mmol/L d'azide de sodium, puis placés sur un gel d'agarose d'environ 500 µm d'épaisseur et recouverts d'une lamelle de microscope reposant sur l'agarose pour éviter leur dessèchement. Les images ont été obtenues dans les 3 h suivant l'anesthésie.

Bibliographie

[1] R.W. Boyd. *Nonlinear optics, 2nd edition.* Academic Press, 2003.

[2] W.R. Zipfel, R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences*, Nat. Biotechnol., **21** (2003), pp. 1369–1377.

[3] W. Denk, J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*, Science, **248** (1990), pp. 73–76.

[4] J. Mertz, *Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy*, Eur. Phys. J. D, **3** (1998), pp. 53–66.

[5] M. Gu and C.J.R. Sheppard, *Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy*, J. Microsc., **177** (1995), pp. 128–137.

[6] A. Periasamy, P. Skoglund, C. Noaks, and R. Keller, *An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in xenopus morphogenesis*, Microsc. Res. Tech., **47** (1999), pp. 172–181.

[7] H. Helmchen and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*, Nat. Methods, **2** (2005), pp. 932–940.

[8] E. Beaurepaire, M. Oheim, and J. Mertz, *Ultra-deep two-photon excitation in turbid media*, Opt. Commun., **188** (2001), pp. 25–29.

[9] M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, and S. Charpak, *Two-photon microscopy in brain tissue : parameters influencing the imaging depth*, J. Neurosci. Meth., **111** (2001), pp. 29–37.

[10] P. Theer, M. T. Hasan, and W. Denk, *Two-photon imaging to a depth of 1000 µm in living brains by use of a $tial_2o_3$ regenerative amplifier*, Opt. Lett., **28** (2003), pp. 1022–1024.

[11] J. Mertz, *Nonlinear microscopy : new techniques and applications*, Curr. Opin. Neurobiol., **14** (2004), pp. 610–616.

[12] P. Theer and W. Denk, *On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy*, Proc. SPIE, **5463** (2004), pp. 45–55.

[13] E. Beaurepaire and J. Mertz, *Epifluorescence collection in two-photon microscopy*, Appl. Opt., **41** (2002), pp. 5376–5382.

[14] S. Charpak, J. Mertz, E. Beaurepaire, L. Moreaux, and K. Delaney, *Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98** (2001), pp. 1230–1234.

[15] J. Bewersdorf, R. Pick, and S.W. Hell, *Multifocal multiphoton microscopy*, Opt. Lett., **23** (1998), pp. 655–657.

[16] V. Andresen, A. Egner, and S.W. Hell, *Time-multiplexed multifocal multiphoton microscope*, Opt. Lett., **26** (2001), pp. 75–77.

[17] J.E. Jureller, H.Y. Kim, and N.F. Scherer, *Stochastic scanning multiphoton multifocal microscopy*, Opt. Express, **14** (2006), pp. 3406–3414.

[18] G.J. Brakenhoff, J. Squier, T. Norris, A.C. Bliton, M.H. Wade, and B. Athey, *Real-time two-photon confocal microscopy using a femtosecond, amplified ti :sapphire system*, J. Microsc., **181** (1996), pp. 253–259.

[19] D. Oron and Y. Silberberg, *Third-harmonic generation with cylindrical gaussian beams*, J. Opt. Soc. Am. B, **21** (2004), pp. 1964–1968.

[20] D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, *Scanningless depth-resolved microscopy*, Opt. Express, **13** (2005), pp. 1468–1476.

[21] E. Tal, D. Oron, and Y. Silberberg, *Improved depth resolution in video-rate line-scanning multiphoton microscopy using temporal focusing*, Opt. Lett., **30** (2005), pp. 1686–1688.

[22] R. Salome, Y. Kremer, S. Dieudonné, J.-F. Léger, O. Krichevsky, C. Wyart, D. Chatenay, and L. Bourdieu, *Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acousto-optic deflectors*, J. Neurosci. Meth., **in press** (2006).

[23] J.M. Squirrell, D.L. Wokosin, J.G. White, and B.D. Bavister, *Long-term two photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability*, Nat. Biotechnol., **17** (1999), pp. 763–767.

[24] C.-K. Sun, S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, and H.-J. Tsai, *Higher harmonic generation microscopy for developmental biology*, J. Struct. Biol., **147** (2004), pp. 19–30.

[25] D. Débarre, W. Supatto, E. Farge, B. Moulia, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, *Velocimetric third-harmonic generation microscopy : micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos*, Opt. Lett., **29** (2004), pp. 2881–2883.

[26] R. Yuste and W. Denk, *Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration.*, Nature, **375** (1995), pp. 682–684.

[27] Z.F. Mainen, R. Malinow, and K. Svoboda, *Synaptic calcium transients in single spines indicates that nmda receptors are not saturated*, Nature, **399** (1999), pp. 151–155.

[28] C. Stosiek, O. Garaschuk, K. Holthoff, and A. Konnerth, *In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, pp. 7319–7324.

[29] E.B. Brown, R. Campbell, Y. Tsuzuki, L. Xu, P. Carmeliet, D. Fukumura D, and R.K. Jain, *In vivo measurement of gene expression, angiogenesis, and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy*, Nat. Medicine, **7** (2001), pp. 864–868.

[30] D.M. McDonald and P.L. Choyke, *Imaging of angiogenesis : from microscope to clinic*, Nat. Medicine, **9** (2003), pp. 713–725.

[31] W. Wang, J.B. Wyckoff, V.C. Frohlich, Y. Oleynikov, S. Hüttelmaier, J. Zavadil, Bottinger E.P. Cermak, L., R.H. Singer, J.G. White, J.E. Segall, and J.S. Condeelis, *Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling*, Cancer Res., **62** (2002), pp. 6278–6288.

[32] K. Wolf, I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U.H. Von Adrian, E.I. Deryugina, A.Y. Strongin, E.B. Bröcker, and P. Frield, *Compensation mechanism in tumor cell migration : mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis*, J. Cell Biol., **160** (2003), pp. 267–277.

[33] N.D. Lawson and B.M. Weinstein, *In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish*, Dev. Biol., **248** (2002), pp. 307–318.

[34] S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, H.-J. Tsai, and C.-K. Sun, *In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy*, Opt. Express, **11** (2003), pp. 3093–3099.

[35] W. Supatto, D. Debarre, B. Moulia, E. Brouzes, J. L. Martin, E. Farge, and E. Beaurepaire, *In vivo modulation of morphogenetic movements in drosophila embryos with femtosecond laser pulses*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, pp. 1047–1052.

[36] M.D. Cahalan, M.D. Parker, S.H. Wei, and M.J. Miller, *Two-photon tissue imaging : seeing the immune system in a fresh light*, Nat. Rev. Immunol., **2** (2002), pp. 872–880.

[37] M.J. Miller, S.H. Wei, M.D. Calahan, and I. Parker, *Autonomous t cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100** (2003), pp. 2604–2609.

[38] W.R. Zipfel, R.M. Williams, R. Christie, A.Y. Nikitin, B.T. Hyman, and W.W. Webb, *Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second-harmonic generation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100** (2003), pp. 7075–7080.

[39] P.J. Campagnola and L.M. Loew, *Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms*, Nat. Biotechnol., **21** (2003), pp. 1356–1360.

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

[41] C. Xu, W. Zipfel, J.B. Shear, R.M. Williams, and W.W. Webb, *Multiphoton fluorescence excitation : new spectral window for biological nonlinear spectroscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93** (1996), pp. 10763–10768.

[42] J.W. Lichtman and J.A. Conchello, *Fluorescence microscopy*, Nat. Methods, **2** (2005), pp. 910–919.

[43] C. Xu and W.W. Webb, *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*, J. Opt. Soc. Am. B, **13** (1996), pp. 481–491.

[44] M. Stroh, J.P. Zimmer, D.G. Duda, T.S. Levchenko, K.S. Cohen, E.B. Brown, D.T. Scadden, V.P. Torchilin, M.G. Bawendi, D. Fukumura, and R.K. Jain, *Quantum dots*

spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu in vivo, Nat. Medicine, **11** (2005), pp. 678–682.

[45] G.A. Blab, P.H.M. Lommerse, L. Cognet, G.S. Harms, and T. Schmidt, *Two-photon excitation cross-sections of the autofluorescent proteins*, Chem. Phys. Lett., **350** (2001), pp. 71–77.

[46] E. Spiess, F. Bestvater, A. Heckel-Pompey, K. Toth, M. Hacker, G. Stobrawa, T. Feurer, C. Wotzlaw, U. Berchner-Pfannschmidt, T. Porwol, and H. Acker, *Two-photon excitation and emission spectra of the green fluorescent protein variants ecfp, egfp and eyfp*, J. Microsc., **217** (2005), pp. 200–204.

[47] A. M. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, and M. C. Schanne-Klein, *Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy*, Opt. Express, **13** (2005), pp. 6268–6274.

[48] J. P. Ogilvie, D. Debarre, X. Solinas, J. L. Martin, E. Beaurepaire, and M. Joffre, *Use of coherent control for selective two-photon fluorescence microscopy in live organisms*, Opt. Express, **14** (2006), pp. 759–766.

[49] S. Maiti, J.B. Shear, R.M. Williams, W.R. Zipfel, and W.W. Webb, *Measuring serotonin distribution in live cells with three- photon excitation*, Science, **275** (1997), pp. 530–532.

[50] J. Balaji, R. Desai, S.K. Kaushalya, M.J. Eaton, and S. Maiti, *Quantitative measurement of serotonin synthesis and sequestration in individual live neuronal cells*, J. Neurochemistry, **95** (2005), pp. 1217–1226.

[51] T. Boulesteix, A.M. Pena, N. Pages, G. Godeau, M.P. Sauviat, E. Beaurepaire, and M.C. Schanne-Klein, *Micrometer scale ex vivo multiphoton imaging of unstained arterial wall structure*, Cytometry A, **69A** (2006), pp. 20–26.

[52] G.H. Patterson, S.M. Knobel, P. Arkhammar, O. Thastrup, and D.W. Piston, *Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial nad(p)h reponses in pancreatic islet beta cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97** (2000), pp. 5203–5207.

[53] S. Huang, A.A. Heikal, and W.W. Webb, *Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of nad(p)h and flavoprotein*, Biophys. J., **82** (2002), p. 2811.

[54] H. Oehring, I. Riemann, P. Fischer, K.-J. Halbhuber, and K. König, *Ultrastructure and reproduction behaviour of single cho-k1 cells exposed to near infrared femtosecond laser pulses*, Scanning, **22** (2000), pp. 263–270.

[55] I. Freund and M. Deutsch, *Second-harmonic microscopy of biological tissue*, Opt. Lett., **11** (1986), pp. 94–96.

[56] L. Moreaux, O. Sandre, M. Blanchard-Desce, and J. Mertz, *Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy*, Opt. Lett., **25** (2000), pp. 320–322.

[57] L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz, *Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy*, J. Opt. Soc. Am. B, **17** (2000), pp. 1685–1694.

[58] P. J. Campagnola, W. Mohler, and A. E. Millard, *3-dimensional high-resolution second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues*, Biophys. J., **82** (2002), pp. 175A–175A.

[59] A.M. Pena, T. Boulesteix, T. Dartigalongue, and M.C. Schanne-Klein, *Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens i and iv*, J. Am. Chem. Soc., **127** (2005), pp. 10314–10322.

[60] G. Cox, N. Moreno, and J. Feijo, *Second-harmonic imaging of plant polysaccharides*, J. Biomed. Opt., **10** (2005), p. 02413.

[61] S.V. Plotnikov, A.C. Millard, P.J. Campagnola, and W.A. Mohler, *Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres*, Biophys. J., **90** (2006), pp. 693–703.

[62] J. Mertz and L. Moreaux, *Multi-harmonic light microscopy : theory and applications in membrane imaging*, Proc. SPIE, **4262** (2001), pp. 9–17.

[63] T. Boulesteix, E. Beaurepaire, M.P. Sauviat, and M.C. Schanne-Klein, *Second-harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes : measurements of sarcomere length with 20-nm accuracy*, Opt. Lett., **269** (2004), pp. 2031–2033.

[64] D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, M. Ingelsson, B. T. Hyman, and W. W. Webb, *Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100** (2003), pp. 7081–7086.

[65] M. Han, L. Zickler, G. Giese, M. Walter, F.H. Loesel, and Blle J.F., *Second-harmonic imaging of cornea after intrastromal femtosecond laser ablation*, J. Biomed. Opt., **9** (2004), pp. 760–766.

[66] S.J. Lin, R.J. Wu, H.Y. Tan, W. Lo, W.C. Lin, T.H. Young, C.J. Hsu, J.S. Chen, S.H. Jee, and C.Y. Dong, *Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy*, Opt. Lett., **30** (2005), pp. 2275–2277.

[67] M.D. Duncan, J. Reintjes, and T.J. Manuccia, *Scanning coherent anti-stokes raman microscope*, Opt. Lett., **7** (1982), pp. 350–352.

[68] A. Zumbusch, G.R. Holtom, and X.S. Xie, *Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering*, Phys. Rev. Lett., **82** (1999), pp. 4142–4145.

[69] A. Volkmer, J.-X. Cheng, and X.S. Xie, *Vibrational imaging with high sensitivity via epidetected coherent anti-stokes raman scattering microscopy*, Phys. Rev. Lett., **87** (2001), p. 23901.

[70] A. Volkmer, *Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-stokes raman scattering microscopy*, J. Phys. D, **38** (2005), pp. R59–R81.

[71] H.F. Wang, Y. Fu, P. Zickmund, R.Y. Shi, and J.X. Cheng, *Coherent anti-stokes raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues*, Biophys. J., **89** (2006), pp. 581–591.

[72] L. Li, H.F. Wang, and J.X. Cheng, *Quantitative coherent anti-stokes raman scattering imaging of lipid distribution in coexisting domains*, Biophys. J., **89** (2005), pp. 3480–3490.

[73] B. Rakic, S.M. Sagan, M. Noestheden, S. Belanger, X.L. Nan, C.L. Evans, X.S. Xie, and J.P. Pezacki, *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha antagonism inhibits hepatisis c virus replication*, Chem. Biol., **13** (2006), pp. 23–30.

[74] D. Yelin, D. Oron, S. Thiberge, E. Moses, and Y. Silberberg, *Multiphoton plasmon-resonance microscopy*, Opt. Express, **11** (2003), pp. 1385–1391.

[75] M. Lippitz, M. A. van Dijk, and M. Orrit, *Third-harmonic generation from single gold nanoparticles*, Nano Lett., **5** (2005), pp. 799–802.

[76] M.H. Niemz. *Laser-Tissue Interactions : fundamentals and Applications*. Springer, Berlin, 2004.

[77] H.J. Van Staveren, C.J.M. Moes, J. Van Marie, S.A. Prahl, and M.J.C. Van Gemert, *Light scattering in intralipid-10% in the wavelength range 400-1100nm*, Appl. Opt., **30** (1991), pp. 4507–4514.

[78] M. Schwerter, M.J. Booth, and T. Wilson, *Characterizing specimen induced aberrations for high na adaptive optical microscopy*, Opt. Express, **12** (2004), pp. 6540–6552.

[79] T. H. Tsai, S. P. Tai, W. J. Lee, H. Y. Huang, Y. H. Liao, and C. K. Sun, *Optical signal degradation study in fixed human skin using confocal microscopy and higher-harmonic optical microscopy*, Opt. Express, **14** (2006), pp. 749–758.

[80] M. J. Booth, M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, *Adaptive aberration correction in a confocal microscope*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99** (2002), pp. 5788–5792.

[81] I.-H. Chen, S.-W. Chu, C.-K. Sun, P.-C. Cheng, and B.-L. Lin, *Wavelength dependent damage in biological multiphoton confocal microscopy : A micro-spectroscopic comparison between femtosecond ti :sapphire and cr :forsterite laser sources*, Opt. Quant. Electron., **34** (2002), pp. 1251–1266.

[82] A. Vogel, J. Noack, G. Huttman, and G. Paltauf, *Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues*, Appl. Phys. B, **81** (2005), pp. 1015–1047.

[83] A.A. Heikal, S.T. Hess, G.S. Baird, R.Y. Tsien, and W.W. Webb, *Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins : Coral red (dsred) and yellow (citrine)*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97** (2000), pp. 11996–12001.

[84] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg, *Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation*, Appl. Phys. Lett., **70** (1997), pp. 922–924.

[85] D. Yelin and Y. Silberberg, *Laser scanning third-harmonic generation microscopy in biology*, Opt. Express, **5** (1999).

[86] J.A. Squier, M. Müller, G.J. Brakenhoff, and K.R. Wilson, *Third harmonic generation microscopy*, Opt. Express, **3** (1998), pp. 315–324.

[87] A.C. Millard, P.W. Wiseman, D.N. Fittinghoff, K.R. Wilson, J.A. Squier, and M. Müller, *Third-harmonic generation microscopy by use of a compact, femtosecond fiber laser source*, Appl. Opt., **38** (1999), pp. 7393–7397.

[88] J.-X. Cheng and X.S. Xie, *Green's function formulation for third harmonic generation microscopy*, J. Opt. Soc. Am. B, **19** (2002), pp. 1604–1610.

[89] S.W. Chu, I.H. Chen, T.M. Liu, P.C. Chen, and C.K. Sun, *Multimodal nonlinear spectral microscopy based on a femtosecond cr :forsterite laser*, Opt. Lett., **26** (2001), pp. 1909–1911.

[90] C.-K. Sun, C.-C. Chen, S.-W. Chu, T.-H. Tsai, Y.-C. Chen, and B.-L. Lin, *Multiharmonic-generation biopsy of skin*, Opt. Lett., **28** (2003), pp. 2488–2490.

[91] D. Oron, E Tal, and Y. Silberberg, *Depth-resolved multiphoton polarization microscopy by third-harmonic generation microscopy*, Opt. Lett., **28** (2003), pp. 2315–2317.

[92] D. Oron, D. Yelin, E. Tal, S. Raz, R. Fachima, and Y. Silberberg, *Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy*, J. Struct. Biol., **147** (2004), pp. 3–11.

[93] S.-W. Chu, S.-Y. Chen, G.W. Chern, T.-H. Tsai, Y.-C. Chen, B.-L. Lin, and C.-K. Sun, *Studies of chi(2)/chi(3) tensors in submicron-scaled bio-tissues by polarization harmonics optical microscopy*, Biophys. J., **86** (2004), pp. 3914–3922.

[94] L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, R. Barille, P. Vacher, and P. Voisin, *Imaging of ca(2+) intracellular dynamics with a third-harmonic generation microscope*, Opt. Lett., **26** (2001), pp. 515–517.

[95] R. Barille, L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, P. Vacher, and T. Ducret, *Visualization of intracellular ca2+ dynamics with simultaneous two-photon-excited fluorescence and third-harmonic generation microscopes*, Appl. Phys. Lett., **79** (2001), pp. 4045–4047.

[96] S. Rivet, L. Canioni, L. Sarger, R. Barille, P. Vacher, and T. Ducret, *Visualization of intracellular ca(2+) dynamics with simultaneous 2-photon excited fluorescence and third harmonic generation microscope*, J. Fluoresc., **12** (2002), pp. 197–199.

[97] V. Schcheslavskiy, G.I. Petrov, and V.V. Yakovlev, *Nonlinear optical susceptibility measurements of solutions using third-harmonic generation on the interface*, Appl. Phys. Lett., **82** (2003), pp. 3982–3984.

[98] V. Schcheslavskiy, G.I. Petrov, S. Saltiel, and V.V. Yakovlev, *Quantitative characterization of aqueous solutions probed by the third-harmonic generation microscopy*, J. Struct. Biol., **147** (2004), pp. 42–49.

[99] G.O. Clay, A.C. Millard, C. B. Schaffer, J. Aus-der Au, P.S. Tsai, J.A. Squier, and D. Kleinfeld, *Spectroscopy of third harmonic generation : evidence for resonances in model compounds and ligated hemoglobin*, J. Opt. Soc. Am. B, **23** (2006), pp. 932–950.

[100] V. Barzda, C. Greenhalgh, J. Aus der Au, S. Elmore, J. Van Beek, and J. Squier, *Visualization of mitochondria in cardiomyocytes by simultaneous harmonic generation and fluorescence microscopy*, Opt. Express, **13** (2005), pp. 8263–8276.

[101] T.M. Liu, S.P. Tai, C.H. Yu, Y.C. Wen, L.J. Chu, S.W. Chen, M.R. Prasad, K.J. Lin, and C.K. Sun, *Measuring plasmon-resonance enhanced third-harmonic chi(3) of ag nanoparticles*, Appl. Phys. Lett., **89** (2006), p. 043122.

[102] Y. Shen, J. Swiatkiewicz, P. Markowicz, and P.N.) Prasad, *Near-field microscopy and spectroscopy of third-harmonic generation and two-photon excitation in nonlinear organic crystals*, Appl. Phys. Lett., **79** (2001), pp. 2681–2683.

[103] D. Oron and Y. Silberberg, *Harmonic generation with temporally focused ultrashort pulses*, J. Opt. Soc. Am. B, **22** (2005), pp. 2660–2663.

[104] R.L. Fork, O.E. Martinez, and J.P. Gordon, *Negative dispersion using pairs of prisms*, Opt. Lett., **9** (1984), pp. 150–152.

[105] R.E. Sherriff, *Analytic expressions for group-delay dispersion and cubic dispersion in arbitrary prism sequences*, J. Opt. Soc. Am. B, **15** (1998), pp. 1224–1230.

[106] A. E. Siegman. *Lasers*. University Science Books, 1986.

[107] F. Kajzar and J. Messier, *Original technique for third-harmonic-generation measurements in liquids*, Rev. Sci. Instr., **58** (1987), pp. 2081–2085.

[108] J. Mertz and L. Moreaux, *Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers*, Opt. Commun., **196** (2001), pp. 325–330.

[109] S.V. Fomichev, S.V. Popruzhenko, D.F. Zaretsky, and W. Becker, *Laser-induced nonlinear excitation of collective electron motion in a cluster*, J. Phys. B, **36** (2003), pp. 3817–3834.

[110] S.V. Fomichev, S.V. Popruzhenko, D.F. Zaretsky, and W. Becker, *Nonlinear excitation of the mie resonance in a laser-irradiated cluster*, Opt. Express, **11** (2003), pp. 2433–2439.

[111] V. I. Shcheslavskiy, S. M. Saltiel, A. Faustov, G. I. Petrov, and V. V. Yakovlev, *Third-harmonic rayleigh scattering : theory and experiment*, J. Opt. Soc. Am. B, **22** (2005), pp. 2402–2408.

[112] G. M. Hale and M. R. Querry, *Optical-constants of water in 200-nm to 200-mum wavelength region*, Appl. Opt., **12** (1973), pp. 555–563.

[113] X. Y. Ma, J. Q. Lu, R. S. Brock, K. M. Jacobs, P. Yang, and X. H. Hu, *Determination of complex refractive index of polystyrene microspheres from 370 to 1610 nm*, Phys. Med. Biol., **48** (2003), pp. 4165–4172.

[114] A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, and S. Chu, *Observation of a single beam gradient force optical trap for dielectric particles*, Opt. Lett., **11** (1986), pp. 288–290.

[115] D. Débarre, W. Supatto, and E. Beaurepaire, *Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy*, Opt. Lett., **30** (2005), pp. 2134–2136.

[116] R.M. Williams, W.R. Zipfel, and W.W. Webb, *Interpreting second-harmonic generation images of collagen i fibrils*, Biophys. J., **88** (2005), pp. 1377–1386.

[117] J.-X. Cheng, A. Volkmer, and X.S. Xie, *Theoretical and experimental characterization of coherent anti-stokes raman scattering microscopy*, J. Opt. Soc. Am. B, **19** (2002), pp. 1363–1375.

[118] J. I. Dadap, J. Shan, and T. F. Heinz, *Theory of optical second-harmonic generation from a sphere of centrosymmetric material : small-particle limit*, J. Opt. Soc. Am. B, **21** (2004), pp. 1328–1347.

[119] I. Ishimaru. *Wave propagation and scattering in random media*. Wiley-IEEE Press, New York, 1999.

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

[121] C. Bosshard, U. Gubler, P. Kaatz, W. Mazerant, and U. Meir, *Non-phase-matched optical third-harmonic generation in noncentrosymmetric media : cascaded second-order contributions for the calibration of third-order nonlinearities*, Phys. Rev. B, **61** (2000), pp. 10688–10701.

[122] G.R. Meredith, *Cascading in optical third-harmonic generation by cristalline quartz*, Phys. Rev. B, **24** (1981), pp. 5522–5532.

[123] B. Buchalter and G.R. Meredith, *Third-order optical susceptibility of glasses determined by third harmonic generation*, Appl. Opt., **21** (1982), pp. 3221–3224.

[124] U. Gubler and C. Bosshard, *Optical third-harmonic generation of fused silica in gas atmosphere : absolute value of the third-order nonlinear optical susceptibility chi3*, Phys. Rev. B, **61** (2000), pp. 10702–10710.

[125] R.C. Eckardt, H. Masuda, Y.X. Fan, and R.L. Byer, *Absolute an relative nonlinear optical coefficients of kdp, kd-star-p, bab204, liio3, mgo-linbo3, and ktp measured by phase-matched 2nd-harmonic generation*, IEEE J. Quantum Electron., **26** (1990), pp. 922–933.

[126] D.A. Roberts, *Simplified characterization of uniaxial and biaxial nonlinear optical-crystals - a plea for standardization of nomenclature and conventions*, IEEE J. Quantum Electron., **28** (1992), pp. 2057–2074.

[127] A. Kitamoto, T. Kondo, I. Shoji, and R. Ito, *Absolute measurement of 2nd-order nonlinear-optical coefficient of libno3 by parametric processes*, Opt. Rev., **2** (1995), pp. 280–284.

[128] G.R. Meredith, B. Buchalter, and C. Hanzlik, *Third-order optical susceptibility determination by third harmonic generation. i*, J. Chem. Phys., **78** (1983), pp. 1533–1542.

[129] G.R. Meredith, B. Buchalter, and C. Hanzlik, *Third-order optical susceptibility determination by third harmonic generation. ii*, J. Chem. Phys., **78** (1983), pp. 1543–1551.

[130] F. Kajzar and J. Messier, *Third-harmonic generation in liquids*, Phys. Rev. A, **32** (1985), pp. 2352–2363.

[131] X.H. Wang, D.P. West, N.B. McKeown, and T.A. King, *Determining the cubic susceptibility x(3) of films or glasses by the maker fringe method : a representative study of spin-coated films of copper phthalocyanine derivation*, J. Opt. Soc. Am. B, **15** (1998), pp. 1895–1903.

[132] F. Kajzar, J. Messier, and C. Rosilio, *Nonlinear optical properties of thin films of polysilane*, J. Appl. Phys., **60** (1986), pp. 3040–3044.

[133] J. F. Ward and G. H. C. New, *Optical third harmonic generation in gases by a focused laser beam*, Phys. Rev., **185** (1969), pp. 57–72.

[134] R. Barille, L. Canioni, L. Sarger, and G. Rivoire, *Nonlinearity measurements of thin films by third-harmonic-generation microscopy*, Phys. Rev. E, **66** (2002), pp. 1–4.

[135] R. S. Pillai, G. J. Brackenhoff, and M. Müller, *Analysis of the influence of spherical aberration from focusing through a dielectric slab in quantitative nonlinear optical susceptibility measurements using third-harmonic generation*, Opt. Express, **14** (2006), pp. 260–269.

[136] T. Tsang, *Optical third-harmonic generation at interfaces*, Phys. Rev. A, **52** (1995), pp. 4116–4125.

[137] O. Sandre. *Thèse de doctorat.* Université Paris VI, Paris, 2000.

[138] T. Tordjmann, B. Berthon, M. Claret, and L. Combettes, *Coordinated intercellular calcium waves induced by noradrenaline in rat hepatocytes : dual control by gap junction permeability and agonist*, EMBO J., **16** (1997), pp. 5398–5407.

[139] R. Koopman, G. Schaart, and M. K. C. Hesselink, *Optimisation of oil red o staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids*, Histochem. Cell Biol., **116** (2001), pp. 63–68.

[140] X. Nan, J.-X. Cheng, and X. S. Xie, *Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-stokes raman scattering microscopy*, J. Lipid Res., **44** (2003), pp. 2202–2208.

[141] D.J. Murphy, *The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms*, Prog. Lipid Res., **40** (2001), pp. 325–438.

[142] P. Greenspan, E.P. Mayer, and S.D. Fowler, *Nile red : a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets*, J. Cell Biol., **100** (1985), pp. 965–973.

[143] E. Wieschaus and C. Nusslein-Volhard. *Looking at embryos.* In *Drosophila, a practical approach.* Oxford University Press, Oxford, 1998.

[144] M.A. Welte, S.P. Gross, M. Postner, S.M. Block, and E.F. Wieschaus, *Developmental regulation of vesicle transport in drosophila embryos : forces and kinetics*, Cell, **92** (1998), pp. 547–557.

[145] P. Dietl and T. Haller, *Exocytosis of lung surfactant : from the secretory vesicle to the air-liquid interface*, Annu. Rev. Physiol., **67** (2005), pp. 595–621.

[146] G. Dirami, G.D. Massaro, L.B. Clerch, U.S. Ryan, P.R. Reczek, and D. Massaro D, *Lung retinol storing cells synthesize and secrete retinoic acid, an inducer of alveolus formation*, Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol., (2004), pp. L249–256.

[147] B. Vollmard, M. Rucker, and M.D. Menger, *A new method for the intravital microscopic quantification of hepatic sinusoidal perfusion failure using the dye bisbenzamide h33342*, Microvasc. Res., **51** (1996), pp. 250–259.

[148] M. Burkhardt, B. Vollmard, and M.D. Menger, *In vivo analysis of hepatic nadh fluorescence. methodological approach to exclude ito-cell vitamin a-derived autofluorescence*, Adv. Exp. Med. Biol., **454** (1998), pp. 83–89.

[149] D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal, and Y. Silberberg, *Third-harmonic microscopy with a titanium-sapphire laser*, Appl. Phys. B, **74** (2002), pp. S97–S101.

[150] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, and T.F. Schilling. *Stages of embryonic development of the zebrafish.* Wiley, New York, 1995.

[151] Y. Imanishi, V. Gerke, and K. Palczewski, *Retinosomes : new insights into intracellular managing of hydrophobic substances in lipid bodies*, J. Cell Biol., **166** (2004), pp. 447–453.

[152] I. M. Tolic-Norrelykke, L. Sacconi, G. Thon, and F. S. Pavone, *Positioning and elongation of the fission yeast spindle by microtubule-based pushing*, Curr. Biol., **14** (2004), pp. 1181–1186.

[153] T. Shimada, W. Watanabe, S. Matsunaga, T. Higashi, H. Ishii, K. Fukui, K. Isobe, and K. Itoh, *Intracellular disruption of mitochondria in a living hela cell with a 76-mhz femtosecond laser oscillator*, Opt. Express, **13** (2005), pp. 9869–9880.

[154] B.R. Masters, P.T.C. So, C. Buehler, N. Barry, J.D. Sutin, W.W. Mantulin, and E. Gratton, *Mitigating thermal mechanical damage potential during two-photon dermal imaging*, J. Biomed. Opt., **9** (2004), pp. 1265–1270.

[155] S. Martin and R.G. Parton, *Caveolin, cholesterol, and lipid bodies*, Sem. Cell Dev. Biol., **16** (2005), pp. 163–174.

[156] D.J. Murphy and J. Vance, *Mechanisms of lipid-body formation*, TIBS, **24** (1999), pp. 109–115.

[157] H.W. Heid and T. W. Keenan, *Intracellular origin and secretion of milk fat globules*, Eur. J. Cell Biol., **84** (2005), pp. 245–258.

[158] C.P. Day and O.F.W. James, *Hepatic steatosis : Innocent bystander or guilty party ?*, Hepatology, **27** (1998), pp. 1463–1750.

[159] T.J. Delahunty and D. Rubinstein, *Accumulation and release of triglycerides by rat liver following partial hepatectomy*, J. Lipid Res., **11** (1970), pp. 536–543.

[160] E. Shteyer, Y. Liao, L.J. Muglia, P.W. Hruz, and D.A. Rudnick, *Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice*, Hepatology, **40** (2004), pp. 1322–1332.

[161] H.O. Jauregui, N. Hayner, J.L. Driscoll, R. Williams-Holland, M.H. Lipsky, and P.M. Galletti, *Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes-freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures*, In vitro, **17** (1981), pp. 1100–1110.

[162] M.R. Shanks, D. Cassio, O. Lecoq, and A.L. Hubbard, *An improved polarized rat hepatoma hybrid cell line. generation and comparison with its hepatoma relatives and hepatocytes in vivo*, J. Cell Sci., **107** (1994), pp. 813–825.

[163] G. Zahrebelski, A.L. Nieminen, K. Al-Ghoul, T. Qian, B. Herman, and J.J. Lemasters, *Progression of subcellular changes during chemical hypoxia to cultured rat hepatocytes ; a laser scanning confocal microscopic study*, Hepatology, **21** (1995), pp. 1361–1372.

[164] S.P. Gross, M.A. Welte, S.M. Block, and E.F. Wieschaus, *Dynein-mediated cargo transport in vivo : a switch controls travel distance*, J. Cell Biol., **148** (2000), pp. 945–955.

[165] Y. Guo, S. Jangi, and M.A. Welte, *Organelle-specific control of intracellular transport : distinctly targeted isoforms of the regulator klar*, Mol. Biol. Cell, **16** (2005), pp. 1406–1416.

[166] S.P. Gross, M.A. Welte, S.M. Block, and E.F. Wieschaus, *Coordination of opposite-polarity microtubule motors*, J. Cell Biol., **156** (2002), pp. 715–724.

[167] S.P. Gross, M.C. Tuma, S.W. Deacon, A.S. Serpinskaya, A.R. Reilin, and V.I. Gelfand, *Interactions and regulation of molecular motors in Xenopus melanophores*, J. Cell Biol., **156** (2002), pp. 855–865.

[168] W. Supatto. *Thèse de doctorat*. Université Paris VII, Paris, 2005.

[169] L. Wolpert. *Principles of development*. Oxford University Press, 1998.

[170] M. Ashburner. *Drosophila : a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

[171] A. Spradling. *Developmental genetics of oogenesis*. In *The development of Drosophila melagonaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.

[172] J. Slack. *Essential developmental biology*. Blackwell Publishing, Oxford, 2003.

[173] M.E. Foe, M.O. Odell, and B.A. Edgar. *Mitosis and gastrulation in the drosophila embryo : point and conterpoint*. In *The development of Drosophila melagonaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.

[174] U. Tram, B. Riggs, and W. Sullivan. *Cleavage and gastrulation in drosophila embryos*. In *Encyclopedia of life science*. Macmillan Publisher Ltd, Nature Publishing Group, 2002.

[175] T. Lecuit and E. Wieschaus, *Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the drosophila embryo*, J. Cell Biol., **150** (2000), pp. 849–860.

[176] E. Schejter and E. Wieschaus, *Functional elements of cytoskeleton in the early drosophila embryo*, Annu. Rev. Cell Biol., **13** (2003), pp. 1365–1377.

[177] J.H. Thomas and E. Wieschaus, *src64 and tec29 are required for microfilament contraction during drosophila cellularization*, Development, **131** (2003), pp. 863–871.

[178] A. Royou, C. Field, J.C. Sisson, W. Sullivan, and R. Karess, *Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin ii during formation in early drosophila embryos*, Mol. Biol. Cell, **15** (2004), pp. 838–850.

[179] M. Costa, D. Sweeton, and E. Wieschaus. *Gastrulation in drosophila : cellular mechanisms of morphogenetic movements*. In *The development of Drosophila melagonaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.

[180] K.D. Irvine and E. Wieschaus, *Cell intercalation during drosophila germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes*, Development, **120** (1994), pp. 827–841.

[181] L. Solnica-Krezel and S. Eaton, *Embryo morphogenesis : getting down to cells and molecules*, Development, **130** (2003), pp. 4229–4233.

[182] E. Brouzes, W. Supatto, and E. Farge, *Is mechano-sensitive expression of twist involved in mesoderm formation ?*, Biol. Cell., **96** (2004), pp. 471–7..

[183] E. Brouzés and E. Farge, *Interplay of mechanical deformation and patterned gene expression in developing embryos.*, Curr. Opin. Genet. Dev., **14** (2004), pp. 367–374.

[184] F. Serluca, I. Drummond, and M. Fishman, *Endothelial signaling in kidney morphogenesis : a role for hemodynamic forces*, Curr. Biol., **12** (2002), pp. 492–497.

[185] J.R. Hove, R.W. Köster, A.S. Forouhar, G. Acevedo-Bolton, S.E. Fraser, and M. Gharib, *Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis*, Nature, **421** (2003), pp. 172–177.

[186] M.J. Miller, S.H. Wei, M.D. Calahan, and I. Parker, *Mechanical control of tissue growth : function follows form*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102** (2005), pp. 11571–11572.

[187] C. Coutand and B. Moulia, *Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation : local strain sensing and spatial integration of the signal*, J. Exp. Bot., **51** (2000), pp. 1825–1842.

[188] J. Braam, *In touch : plant responses to mechanical stimuli*, New phytol., **165** (2005), pp. 373–389.

[189] R. Turner and P. Mahowald, *Scanning electron microscopy of drosophila melanogaster embryogenesis. ii. gastrulation and segmentation*, Dev. Biol., **57** (1977), pp. 403–416.

[190] M. Leptin and B. Grunewald, *Cell shape changes during gastrulation in drosophila*, Development, **110** (1990), pp. 73–84.

[191] Z. Kam, J.S. Minden, D.A. Agard, J.W. Sedat, and M. Leptin, *Drosophila gastrulation : analysis of cell shape changes in living embryos by three-dimensional fluorescence microscopy*, Development, **112** (1991), pp. 365–370.

[192] D.P. Kiehart, C.G. Galbraith, K.A. Edwards, W.L. Rickoll, and R.A. Montague, *Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in drosophila*, J. Cell Biol., **149** (2000), pp. 471–490.

[193] I. Davis, C.H. Girdham, and P.H. O'Farrell, *A nuclear gfp that marks nuclei in living drosophila embryos : maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence*, Dev. Biol., **170** (1995), pp. 726–729.

[194] H. Oda and S. Tsukita, *Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that drosophila mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells*, J. Cell Sci., **114** (2001), pp. 493–501.

[195] M.S. Hutson, Y. Tokutake, M.-S. Chang, J.W. Bloor, S. Venakides, D.P. Kiehart, and G.S. Edwards, *Forces for morphogenesis investigated with laser microsurgery and quantitative modeling*, Science, **300** (2003), pp. 145–149.

[196] K. König, H. Liang, M.W. Berns, and B.J. Tromberg, *Cell damage in near-infrared multimode optical traps as a result of multiphoton absorption*, Opt. Lett., **21** (1996), pp. 1090–1092.

[197] K. König, T.W. Becker, P. Fischer, I. Riemann, and K.J. Halbhuber, *Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes*, Opt. Lett., **24** (1999), pp. 113–115.

[198] U. K. Tirlapur, K. Konig, C. Peuckert, R. Krieg, and K. J. Halbhuber, *Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death*, Exp. Cell Res., **263** (2001), pp. 88–97.

[199] M. Concha and R. Adams, *Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula : a time-lapse analysis*, Development, **125** (1998), pp. 983–994.

[200] L. Davidson, B. Hoffstrom, R. Keller, and D. DeSimone, *Mesendoderm extension and mantle closure in xenopus laevis gastrulation : combined roles for integrin a5b1, fibronectin, and tissue geometry*, Dev. Biol., **242** (2002), pp. 109–129.

[201] F. Ulrich, M. Concha, P. Heid, E. Voss, S. Witzel, H. Roehl, M. Tada, S. Wilson, R. Adams, D. Soll, and C. Heisenberg, *Slb/wnt11 controls hypoblast cell migration and morphogenesis at the onset of zebrafish gastrulation*, Development, **130** (2003), pp. 5375–5384.

[202] N. Glickman, C. Kimmel, M. Jones, and R. Adams, *Shaping the zebrafish notochord*, Development, **130** (2003), pp. 873–887.

[203] S. Hu, J. Chen, B. Fabry, Y. Numaguchi, A. Gouldstone, D. Ingber, J. Fredberg, J. Butler, and N. Wang, *Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytosqueleton of living cells*, Am. J. Physiol. Cell Physiol., **285** (2003), pp. C1082–1090.

[204] M. Raffel, C. Willert, and J. Kompenhans. *Particle Image Velocimetry : a practical guide.* Springer-Verlag, Berlin, 1998.

[205] J. Nauen and G. Lauder, *Quantification of the wake of rainbow trout (oncohynchus mykiss) using three-dimensional stereoscopic digital particle image velocimetry*, J. Exp. Biol., **205** (2005), pp. 1515–1526.

[206] R. Bomphrey, N. Lawson, N. Harding, G. Taylor, and A. Thomas, *The aerodynamics of manduca sexta : digital particle image velocimetry analysis of the leading-edge vortex*, J. Exp. Biol., **208** (2005), pp. 1079–1094.

[207] D. Schmundt, M. Stitt, B. Jahne, and U. Schurr, *Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis*, Plant J., **16** (1998), pp. 505–514.

[208] J.K. Sveen, *An introduction to matpiv v.1.4. documentation and code*, Internet publication : http ://www.math.uio.no/∼jks/matpiv/MatPIVtut, (2000).

[209] M.F. Yanik, H. Cinar, H.N. Cinar, A.D. Chisholm, Y. Jin, and A. Ben-Yakar, *Neurosurgery : Functional regeneration after laser axotomy*, Nature, **432** (2004), p. 822.

[210] T. Karu, *Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-ir radiation on cells*, J. Photochem. Photobiol. B, **49** (1999), pp. 1–17.

[211] P.E. Hockberger, T.A. Skimina, V.E. Centonze, C. Lavin, S. Chu, J.K. Dadras, S. Reddy, and J.G. White, *Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of h2o2 in mammalian cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96** (1999), pp. 6255–6260.

[212] R. Lavi, A. Shainberg, H. Friedmann, V. Shneyvays, O. Rickover, M. Eichler, D. Kaplan, and R. Lubart, *Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells*, J. Biol. Chem., **278** (2003), pp. 40917–40922.

[213] S.K. Mohanty, A. Rapp, S. Monajembashi, P.K. Gupta, and K.O. Greulich, *Comet assay measurements of dna damage in cells by laser microbeams with wavelengths spanning a range of 308nm to 1064nm*, Rad. Res., **157** (2002), pp. 378–385.

[214] S.K. Mohanty, M. Sharma, and P.K. Gupta, *Generation of ros in cells on exposure to cw and pulsed near-infrared laser tweezers*, Photochem. Photobiol. Sci., **5** (2006), pp. 134–139.

[215] G. Leitz, E. Fällman, S. Tuck, and O. Axner, *Stress response in caenorhabditis elegans caused by optical tweezers : wavelength, power, and time dependance*, Biophys. J., **89** (2005), pp. 3480–3490.

[216] K.C. Neuman, E.H. Chadd, G.F. Liou, K. Bergman, and S.M. Block, *Characterization of photodamage to escherichia coli in optical traps*, Biophys. J., **77** (1999), pp. 2856–2863.

[217] M.L. Denton, K.J. Schuster, and B.A. Rockwell, *Accurate measure of laser irradiance threshold for near-infrared photo-oxidation with a modified confocal microscope*, J. Microsc., **221** (2006), pp. 164–171.

[218] A. Hopt and E. Neher, *Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy*, Biophys. J., **80** (2001), pp. 2029–2036.

[219] K. König, P.T.C. So, W.W. Mantulin, B.J. Tromberg, and E. Gratton, *Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during uva and nir photostress*, J. Microsc., **200** (2000), pp. 83–104.

[220] K. König, P.T.C. So, W.W. Mantulin, and E. Gratton, *Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes*, Opt. Lett., **22** (1997), pp. 135–136.

[221] A. Vogel, J. Noack, K. Nahen, D. Theisen, S. Bush, U. Parlitz, D.X. Hammer, G.D. Noojin, B.A. Rockwell, and R. Birngruber, *Energy of optical breakdown in water at nanosecond to femtoseconds time scales*, Appl. Phys. B, **68** (1999), pp. 271–280.

[222] A. Vogel and V. Venugopalan, *Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues*, Chem. Rev., **103** (2003), pp. 577–644.

[223] K. König, *Laser tweezers and multiphoton microscopes in life sciences*, Histochem. Cell Biol., **114** (2000), pp. 79–92.

[224] K. König, I. Riemann, and W. Fritzsche, *Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses*, Opt. Lett., **26** (2001), pp. 819–821.

[225] M.G. Nichols, E.E. Barth, and J.A. Nichols, *Reduction in dna synthesis during two-photon microscopy of intrisic reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence*, Photochem. Photobiol., **81** (2005), pp. 259–269.

[226] F. Joubert, H.M. Fales, H. Wen, C.A. Combs, and R.S. Balaban, *Nadh enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching : appilcation to enzyme and mitochondrial reactions kinetics, in vitro*, Biophys. J., **86** (2004), pp. 629–645.

[227] H. Friedmann, R. Lubart, L. Laulicht, and S. Rochkind, *A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures*, J. Photochem. Photobiol. B, **11** (1999), pp. 87–91.

[228] H.J. Koester, D. Baur, R. Uhl, and S.W. Hell, *Ca(2+) fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation : signal and photodamage*, Biophys. J., **77** (1999), pp. 2226–2236.

[229] K. König and U.K. Tirlapur. *Cellular and subcellular perturbations during multiphoton microscopy.* In *Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances.* Wiley-Liss, New-York, 2002.

[230] A. Schönle and S. W. Hell, *Heating by absorption in the focus of an objective lens*, Opt. Lett., **23** (1998), pp. 325–327.

[231] Y. Liu, G.J. Sonek, M.W. Berns, and B.J. Tromberg, *Physiological monitoring of optically trapped cells : assessing the effects of confinement by 1064 nm laser tweezers using microfluorometry*, Biophys. J., **71** (1996), pp. 2158–2167.

[232] R.J. Stanley, *Advances in flavin and flavoprotein optical spectroscopy*, Antiox. Redox Signal., **3** (2001), pp. 847–865.

[233] W. Supatto, D. Débarre, E. Farge, and E. Beaurepaire, *Femtosecond pulse-induced microprocessing of live drosophila embryos*, Med. Las. Appl., **20** (2005), pp. 207–216.

[234] D. Shelton and J. Rice, *Measurements and calculations of the hyperpolarizabilities of atoms and small molecules in the gas phase*, Chem. Rev., **94** (1994), pp. 3–29.

[235] L. Novotny, *Allowed and forbidden light in near-field optics .2. interacting dipolar particles*, J. Opt. Soc. Am. A, **14** (1997), pp. 105–113.

[236] *Handbook of chemistry and physics, 84th edition.* CRC Press, 2003.

[237] Landolt-Börnstein. *Numerical data and functional relationships in science and technology.* New Series III/38A and B. Springer, 1974.

[238] S. Sainov, Y. Sarov, and S. Kurtev, *Wide-spectral-range laser refractometer*, Appl. Opt., **42** (2003), pp. 2327–2328.

[239] N.D. Nikogosyan. *Properties of optical and laser-related materials : a handbook.* Wiley, 1997.

[240] E. Moreels, C. Degreef, and R. Finsy, *Laser-light refractometer*, Appl. Opt., **23** (1984), pp. 3010–3013.

[241] S. Nemoto, *Measurement of the refractive-index of liquid using laser-beam displacement*, Appl. Opt., **31** (1992), pp. 6690–6694.

[242] J. Rheims, J. Koser, and T. Wriedt, *Refractive-index measurements in the near-ir using an abbe refractometer*, Meas. Sci. Tech., **8** (1997), pp. 601–605.

[243] R.W. Hellwarth, Prog. Quantum Electron., **5** (1977).

[244] D.R. LaJeunesse, S.M. Buckner, J. Lake, C. Na, A. Pirt, and K. Fromson, *Three new drosophila markers of intracellular membranes*, Biotechniques, **36** (2004), pp. 784–790.

[245] I. Davis. *Visualizing fluorescence in drosophila - optimal detection in thick specimen.* In *Protein localization by fluorescence microscopy : a practical approach.* Oxford University Press, Oxford, 2000.

[246] S. Brenner, *Genetics of caenorhabditis -elegans*, Genetics, **77** (1974), pp. 71–94.

Résumé Cette thèse a porté sur le développement pour la biologie de la microscopie par génération de troisième harmonique (THG), qui permet la visualisation sans marquage de cellules et de tissus avec une résolution sub-micrométrique. Son application en biologie était jusqu'à présent limitée par le manque d'études du mode de création du signal dans l'échantillon, des sources de contrastes biologiques endogènes ainsi que de la phototoxicité induite. Le travail présenté ici a essentiellement porté sur ces trois questions. Nous avons d'abord étudié théoriquement et expérimentalement l'influence de la structure de l'échantillon et de la focalisation du faisceau excitateur sur le signal THG. Nous avons montré que l'imagerie THG agit sur l'échantillon comme un filtre passe-bande pour les fréquences spatiales et qu'ajuster de la focalisation de l'excitation permet de moduler la visibilité des structures selon leur forme au sein d'un système complexe. Par ailleurs, nous avons caractérisé les propriétés optiques de différents liquides biologiques, qui prédisent qu'un corps lipidique dans un environnement aqueux doit constituer une source efficace de signal intracellulaire. Nous avons démontré que de telles structures peuvent effectivement être suivies et quantifiées par microscopie THG dans de nombreux types de tissus biologiques non marqués, ouvrant la voie à des applications dans la recherche sur l'athérosclérose, le diabète ou la stéatose hépatique. Finalement, nous avons appliqué la microscopie THG à la visualisation *in vivo* et sans marquage du développement embryonnaire précoce chez la drosophile. Sur ce modèle, nous avons étudié les mécanismes de phototoxicité liés à l'imagerie THG et démontré la possibilité de visualiser les embryons en 3D sans perturbation du développement et de quantifier les mouvements morphogénétiques à partir des séquences obtenues.

Mots-clés : *microscopie THG, génération de troisième harmonique, microscopie multiphotonique, imagerie des tissus, gouttelettes lipidiques, phototoxicité, Drosophila melanogaster*

Abstract This work aimed at developing third-harmonic generation microscopy for biology, a recent technique allowing the visualization of unstained cells and tissues with sub-micrometer resolution. Its application to biological imaging was to date limited by the lack of study of signal creation inside samples, endogenous sources of contrast in biology, and induced phototoxicity. The work presented here mainly addresses those three issues. Firstly, we studied theoretically and experimentally the influence of sample structure and focusing of the excitation beam on THG signal. We showed that THG imaging acts on the sample as a bandpass filter for spatial frequencies and that adjusting the focusing of the excitation beam allows to modulate the signal from structures different shapes inside a complex sample. Secondly, we characterized optical properties of various biologically relevant liquids, showing that lipid bodies embedded in an aqueous environment should provide a strong intracellular source of contrast. We then demonstrated that those structures can indeed be tracked and quantified in a variety of unstained tissues using THG microscopy. Finally, we applied THG microscopy to the visualization of early development of live unstained Drosophila embryos. On this model, we studied mechanisms of induced phototoxicity and demonstrated that THG microscopy can provide a complete 3D description of morphogenetic movements in wild-type and mutant embryos without perturbation.

Keywords : *THG microscopy, third-harmonic generation, multiphoton microscopy, tissue imaging, lipid droplets, phototoxicity, Drosophila melanogaster*