



UNIVERSITÉ DE LILLE
LABORATOIRE DE PHYSIQUE DES LASERS, ATOMES ET MOLÉCULES (PhLAM)
ÉCOLE DOCTORALE 104 : SCIENCES DE LA MATIÈRE, DU RAYONNEMENT ET DE
L'ENVIRONNEMENT (SMRE)

Développement d'une sonde miniaturisée pour la micro-endoscopie par diffusion Raman stimulée

*Thèse présentée pour l'obtention
du grade universitaire de Docteur en Physique*

Soutenue le 16 décembre 2025 par :
Eloïse LEFEBVRE

Membres du jury :

Olivier PIOT	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne	Rapporteur
Frédéric LOURADOUR	Professeur, Université de Limoges	Rapporteur
Sylvie MAGNIER	Professeure, Université de Lille	Présidente
Alexandra FRAGOLA	Professeure, Université Paris-Saclay	Examinatrice
Mickaël LELEK	Ingénieur de recherche, Institut Pasteur, Paris	Examineur
Alexandre KUDLINSKI	Professeur, Université de Lille	Directeur
Andy CASSEZ	Ingénieur de recherche, Université de Lille	Co-encadrant



UNIVERSITÉ DE LILLE
LABORATOIRE DE PHYSIQUE DES LASERS, ATOMES ET MOLÉCULES (PhLAM)
ÉCOLE DOCTORALE 104 : SCIENCES DE LA MATIÈRE, DU RAYONNEMENT ET DE
L'ENVIRONNEMENT (SMRE)

Development of a miniaturized probe for stimulated Raman scattering microendoscopy

*A thesis submitted for the
degree of Doctor of Physics*

Defended on the 16th of december 2025 by :
Eloïse LEFEBVRE

Defense committee :

Olivier PIOT	Professor, Université de Reims Champagne-Ardenne	Reviewer
Frédéric LOURADOUR	Professor, Université de Limoges	Reviewer
Sylvie MAGNIER	Professor, Université de Lille	President
Alexandra FRAGOLA	Professor, Université Paris-Saclay	Examiner
Mickaël LELEK	Research engineer, Institut Pasteur, Paris	Examiner
Alexandre KUDLINSKI	Professor, Université de Lille	Supervisor
Andy CASSEZ	Research engineer, Université de Lille	Co-advisor

À mes parents,

À mon chéri

Résumé

Développement d'une sonde miniaturisée pour la micro-endoscopie par diffusion Raman stimulée

Par Eloïse LEFEBVRE

Ce manuscrit présente la conception d'une sonde endoscopique miniaturisée dédiée à l'imagerie non destructive et sans marquage à diffusion Raman stimulée (SRS). Basée sur une fibre optique à cœur creux et à courbure négative, cette sonde transmet des impulsions lasers ultracourtes avec une dispersion minimale. L'extrémité distale de la fibre est fonctionnalisée à l'aide d'une fibre à gradient d'indice afin de réduire la taille du mode en sortie et ainsi d'améliorer la résolution spatiale de l'endoscope. L'ensemble du système est intégré dans un tube piézoélectrique miniaturisé doublement résonant, assurant un balayage sur l'échantillon sous forme de spirale sur un champ de vue de plusieurs centaines de microns. La tête endoscopique a été spécialement conçue pour s'adapter au processus SRS et réaliser une collection "vers l'avant" du signal non linéaire généré dans l'échantillon. Des images histologiques SRS ont été obtenues sur des échantillons frais et non fixés, ouvrant ainsi la voie à un diagnostic histologique *in vivo* en temps réel. Un second dispositif endoscopique de fluorescence par absorption à trois photons (3PEF) est également présenté. Des impulsions lasers ultracourtes (< 100 fs), sont transmises à travers une fibre de déport vers un système endoscopique mobile. Ce dispositif, développé en collaboration avec Lightcore Technologies, intègre une unité de couplage optique et de détection, un système de calibration ainsi que l'électronique de contrôle de l'endoscope. Des expériences d'imagerie 3PEF ont été réalisées sur divers échantillons biologiques, frais et non marqués.

Sonde miniaturisée, Imagerie non linéaire, Fibres creuses

Abstract

Development of a miniaturized probe for stimulated Raman scattering microendoscopy

By Eloïse LEFEBVRE

This manuscript presents the design of a miniaturized endoscopic probe dedicated to non-destructive, label-free imaging using stimulated Raman scattering (SRS). Based on a negative curvature hollow-core optical fiber, the probe enables the delivery of ultrashort laser pulses with minimal dispersion. The distal end of the optical fiber is functionalized with a graded index fiber to reduce the fiber mode size and improve spatial resolution. The entire system is integrated into a miniaturized, doubly resonant piezoelectric tube, enabling spiral scanning of the sample over a field of view of several hundred micrometers. The endoscopic head has been specifically designed to meet the requirements of SRS imaging, and enables the "forward" collection of the nonlinear signal generated in the sample. SRS histological images have been obtained from fresh and unfixed samples, thus paving the way for *in-vivo* real-time histological diagnosis. A second endoscopic device, based on three-photon excited fluorescence (3PEF) is also presented. Ultrashort laser pulses (< 100 fs) are delivered through a delivery fiber to a mobile endoscopic system. This device, developed in collaboration with Lightcore Technologies, integrates an optical coupling and detection unit, a calibration system, and the endoscope's control electronics. 3PEF imaging was performed on various fresh, label-free biological samples.

Miniaturized probe, Nonlinear imaging, Hollow core fibers

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'Université de Lille ainsi que l'entreprise Lightcore Technologies pour avoir financé ces travaux de thèse. Je remercie Cristian Focsa, directeur du laboratoire et Laurent Grisoni, directeur de l'Ircica, pour m'avoir accueillie durant ces trois années. Je remercie également les rapporteurs, Olivier Piot et Frédéric Louradour, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche, ainsi que pour la qualité et la richesse de nos échanges. Merci à Sylvie Magnier d'avoir présidé la soutenance, ainsi qu'à Alexandra Frangola et Mickaël Lelek pour leur bienveillance et leurs échanges enrichissants.

Je souhaite adresser un immense merci à toi, Alexandre, pour ces trois années. Merci de m'avoir fait confiance pour ce projet et de m'avoir permis de m'épanouir pleinement. J'ai énormément appris à tes côtés, tant sur le plan professionnel que personnel; tu as été un véritable mentor. Tu as ce don de transmettre ta rigueur scientifique et ta volonté constante de bien faire. Grâce à toi, je ressors grandie - et sans doute un peu plus intelligente qu'au début de la thèse. Merci pour ta disponibilité, ton écoute, et pour avoir relu ma thèse dans un temps record. Tu as toujours su trouver les mots justes pour m'encourager et m'aider à avancer, en particulier durant cette dernière année. Je suis sincèrement heureuse et reconnaissante d'avoir eu la chance de travailler sous ta direction.

Merci à toi Andy, pour toutes nos discussions, ton écoute et tes précieux conseils. Tu as été un véritable soutien humain tout au long de cette thèse, et je t'en suis très reconnaissante.

Je remercie nos collègues de Marseille, en particulier Hervé, de l'Institut Fresnel, pour ton soutien, ton aide et le temps que tu m'as accordé afin de m'accueillir et de m'expliquer le projet avec clarté. Je remercie également les collègues de Lightcore Marseille, et tout particulièrement Jim, Elliot et Naveen, pour leur collaboration et leur disponibilité.

Un immense merci à toi, Dylan. J'ai vraiment adoré travailler avec toi au quotidien. Ton expertise, ton calme légendaire et ta bienveillance rendent chaque collaboration particulièrement agréable. Merci pour tous ces moments partagés, pour ton humour qui a souvent égayé mes journées et pour tout ce que j'ai appris à tes côtés. Je remercie également Gaëlle pour ton soutien et ton aide tout au long du projet. Et bien sûr... vive les endoscopes!

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe pour leur aide et leur bonne humeur : Vincent, Sarah, Damien, Rémy, Arnaud, Hicham, Laurent et Rédha. Merci à tous ceux avec qui j'ai eu le plaisir de partager ces années : Simon, Nolan, Adrien, Stefano, Thomas, Alice, Giulia, Erwan, Imane, Serge, Matteo et Géraud.

J'en profite enfin pour souhaiter beaucoup de courage et de réussite aux doctorants actuels et futurs, et tout particulièrement à Erwan qui reprend le flambeau de l'endoscopie SRS. J'espère sincèrement que tu t'épanouiras autant que moi dans cette aventure.

Je ne pourrais conclure ces remerciements sans adresser quelques mots à ma famille et à mes proches, qui ont été mon véritable pilier tout au long de cette thèse. Merci à mes parents, mon pilier depuis toujours. Votre présence, votre amour et votre confiance m'ont portée à

chaque étape de ma vie, dans les moments de joie comme dans les moments plus difficiles. Vous avez toujours cru en moi et vous m'avez donné la force d'aller au bout de mes objectifs. Je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous avez fait, pour vos encouragements, vos mots rassurants, vos sacrifices silencieux et pour cette confiance inébranlable que vous m'avez offerte sans jamais faillir. Vous êtes ma plus grande force et c'est grâce à vous que j'en suis arrivée là aujourd'hui. J'espère être un jour à la hauteur de tout ce que vous m'avez transmis. Merci d'être simplement vous. Je vous aime énormément.

Un immense merci à ma sœur Marie, pour ton amour et ton soutien quotidien. Merci d'avoir été là, tous les midis, pour m'encourager et m'aider à tenir pendant cette période difficile. Merci d'être une sœur formidable, et même si je ne le dis pas assez, sache que je suis profondément fière de toi.

Merci à ma marraine et à mon deuxième parrain, pour votre accompagnement et votre présence précieuse au fil des années - et pour avoir eu le courage de filmer ma soutenance en entier !

Merci à Cécile et à Ancelin, ma deuxième famille, pour votre amour, votre bonne humeur et votre présence précieuse depuis toutes ces années. Merci pour tous les moments partagés, pour les rires et pour votre soutien. J'espère de tout cœur vous avoir à mes côtés encore très longtemps, et continuer à partager avec vous autant de souvenirs que de joie.

Enfin, je tiens à remercier ma moitié, Lucas, pour ton soutien et ton amour depuis maintenant plus de 12 ans. Merci pour ta présence, ta bonne humeur et ton humour. Tu as toujours cru en moi, toujours su m'écouter, me conseiller et m'orienter quand j'en avais besoin, et c'est grâce à toi que j'ai pu tenir et mener ce projet à son terme. Merci d'avoir été là quand j'avais juste besoin de râler, et d'avoir pris le temps de m'écouter. Merci d'avoir tout géré et de m'avoir soutenue cette dernière année. Je suis tellement heureuse de pouvoir publier cette thèse et encore plus de pouvoir partager cette réussite avec toi. Je t'aime tellement.

Table des matières

Introduction	1
I Imagerie microscopique et micro-endoscopique sans marquage	5
1.1 Principes fondamentaux de l'optique non linéaire	6
1.1.1 Interaction lumière - matière	6
1.1.2 Processus optiques incohérents	7
1.1.3 Processus optiques cohérents	10
1.2 Techniques de microscopie non linéaire	14
1.2.1 Microscopie de fluorescence multiphotonique et de génération d'harmoniques	14
1.2.2 Microscopie par diffusion Raman cohérente anti-Stokes	15
1.2.3 La microscopie par diffusion Raman stimulée : un cas particulier . . .	16
1.3 Techniques de micro-endoscopie non linéaire	19
1.3.1 Transmission d'impulsions ultracourtes par fibres optiques	20
1.3.2 Systèmes de balayage et optiques miniaturisés	25
1.3.3 Collection du signal non linéaire	26
1.3.4 Micro-endoscopie à fibre creuse et balayage par fibre résonante	27
1.3.5 Tentatives et défis de la micro-endoscopie par diffusion Raman stimulée	28
II Conception d'un micro-endoscope dédié à l'imagerie par diffusion Raman stimulée	31
2.1 Architecture de la tête endoscopique	32
2.2 Développement d'une fibre creuse à courbure négative	33
2.2.1 Mécanisme de guidage dans les fibres à cœur creux	33
2.2.2 Propriétés de la fibre endoscopique	37
2.3 Fonctionnalisation de la fibre optique	44
2.3.1 Propriétés des fibres à gradient d'indice	45
2.3.2 Fabrication	47
2.4 Dispositif de balayage par fibre résonante	49
2.4.1 Contrôle du tube piézoélectrique	50
2.5 Conception des micro-objectifs	52
2.5.1 Micro-objectif de focalisation	52
2.5.2 Micro-objectif de collection	54
2.5.3 Assemblage de la tête endoscopique	55

III	Preuve de concept d'imagerie micro-endoscopique par diffusion Raman stimulée	57
3.1	Mise en œuvre expérimentale	58
3.1.1	Source laser et génération des impulsions	58
3.1.2	Modulation et recombinaison des faisceaux	58
3.1.3	Synchronisation temporelle des impulsions laser	59
3.1.4	Chaîne de détection	60
3.1.5	Acquisition numérique et reconstitution de l'image	62
3.2	Caractérisation des performances optiques de la sonde endoscopique	64
3.2.1	Résolution transverse et axiale de la sonde endoscopique	64
3.2.2	Résolution spectrale	65
3.3	Imagerie par diffusion Raman stimulée	66
3.4	Mesure du bruit	68
3.4.1	Bruit induit par la fibre optique seule	68
3.4.2	Bruit induit par le micro-endoscope complet	69
3.4.3	Influence de la polarisation	70
IV	Développement et mise en œuvre d'une sonde endoscopique SRS intégrée	73
4.1	Conception de la tête endoscopique	74
4.1.1	Micro-objectif de focalisation	74
4.1.2	Micro-objectif de collection	76
4.1.3	Intégration de la tête endoscopique	76
4.1.4	Architecture complète de la sonde endoscopique	77
4.2	Caractérisation des performances optiques de la sonde	78
4.3	Imagerie par diffusion Raman stimulée en régime femtoseconde	79
4.3.1	Montage expérimental	79
4.3.2	Imagerie multimodale	79
4.4	Imagerie par diffusion Raman stimulée en régime picoseconde	82
4.4.1	Montage expérimental	82
4.4.2	Évaluation de la résolution spectrale de la sonde	83
4.4.3	Mesure du bruit de la sonde	84
4.4.4	Imagerie SRH sur des échantillons frais et non fixés	84
	Conclusion	89
	Annexe	91
A	Système endoscopique mobile pour l'imagerie non linéaire multimodale	91
1.1	Présentation du système InSplorer	92
1.1.1	Architecture optique du système	92
1.1.2	Électronique et calibration du système d'imagerie	93
1.1.3	Sonde endoscopique	93
1.2	Déport d'impulsions pour l'imagerie 3PEF et THG	95

1.2.1	Montage expérimental	95
1.2.2	Caractérisation de la fibre de déport	96
1.2.3	Compensation de la dispersion pour l'imagerie 3PEF	97
1.3	Imagerie non linéaire multimodale	98
1.3.1	Résolution spatiale du système	98
1.3.2	Imagerie multimodale de végétaux	100
1.3.3	Imagerie multimodales d'échantillons biologiques	102
Bibliographie de l'autrice		105

Introduction

L'étude *in situ* des systèmes biologiques est essentielle pour la compréhension du fonctionnement des organismes vivants. En observant à l'échelle microscopique l'organisation des cellules, leur spécialisation, ainsi que leur interaction avec le micro-environnement tissulaire, il est possible d'établir un lien direct entre la structure moléculaire des tissus et leur fonction physiologique [1]. Cette approche permet également d'identifier les premières perturbations liées aux maladies bien avant l'apparition de symptômes visibles.

Pour mener à bien ces analyses, il est nécessaire d'utiliser des techniques d'imagerie à haute résolution, capables de distinguer les différents composants chimiques des tissus sans les perturber. Parmi les méthodes les plus répandues figurent la microscopie confocale de fluorescence [2, 3] et la microscopie en champ large marquée à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) [4]. Ces techniques ont largement contribué aux avancées en biologie cellulaire et en histologie [5], mais elles présentent plusieurs limitations majeures : la nécessité de fixer chimiquement les échantillons, le photo-blanchiment des fluorophores, et l'introduction de marqueurs exogènes susceptibles d'altérer l'état des tissus. Ces contraintes ont conduit au développement de nouvelles techniques d'imagerie sans marquage [6], capables de fournir des informations morphologiques et biochimiques plus rapidement, et potentiellement *in vivo*.

Avec l'avènement des sources lasers ultra-rapides de forte puissance, l'imagerie non linéaire a connu un essor considérable dans les années 1990 [7]. En exploitant des processus multi-photoniques, elle permet d'imager les tissus en profondeur, avec un excellent contraste, une faible photo-toxicité et une résolution comparable à celle de la microscopie confocale. Parmi les différentes techniques non linéaires, la microscopie Raman s'est imposée comme une méthode de référence pour l'analyse non destructive des tissus biologiques. La diffusion Raman anti-Stokes (CARS) et la diffusion Raman stimulée (SRS) permettent de sonder les vibrations moléculaires sans ajout de marqueurs. En particulier, la microscopie SRS présente plusieurs avantages notables : un signal proportionnel à la concentration des molécules ciblées, une absence de bruit de fond non résonant, une acquisition rapide et une compatibilité avec les environnements biologiques complexes [8]. Elle s'est révélée particulièrement prometteuse en histologie [9], où elle permet d'imager les noyaux, cytoplasmes et acides nucléiques avec un contraste proche de celui d'une coloration H&E. Cette approche est aujourd'hui connue sous le nom d'**histologie Raman stimulée (SRH)**. Cependant, l'imagerie SRS reste pour l'instant limitée aux microscopes de laboratoire et aucun diagnostic histologique et *in vivo* ne peut être réalisé.

De nombreux groupes se sont donc intéressés à la conception d'endoscopes miniaturisés non linéaires [10], capables d'imager les tissus *in vivo*. Combinant une fibre optique, un scanner miniaturisé et des micro-optiques, ces dispositifs permettent d'imager des zones tissulaires inatteignables avec les techniques de microscopie conventionnelles [11]. Le signal non linéaire est alors collecté dans la direction contra-propagative, le plus souvent à travers la même sonde endoscopique. Les modalités actuellement réalisables en endoscopie non linéaire incluent la fluorescence à 2 photons (2PEF), à 3 photons (3PEF), ainsi que la génération de second (SHG) et de troisième harmonique (THG). Ces techniques fournissent des informations structurelles, mais ne permettent pas d'obtenir l'information spectroscopique que fournit le processus SRS.

Implémenter la modalité SRS en endoscopie représente un défi scientifique majeur. Contrairement aux autres signaux non linéaires, le signal SRS ne peut pas être efficacement collecté dans la direction contra-propagative, ce qui limite fortement son application dans les configurations endoscopiques classiques [12]. De nouvelles solutions optiques et mécaniques doivent être mises en place, afin d'intégrer le SRS dans une configuration endoscopique. L'objectif à terme est de rendre possible le diagnostic SRH en temps réel, directement sur le patient et en contexte clinique.

Le **chapitre 1** décrit les processus non linéaires utilisés en microscopie, en détaillant leurs principes physiques, leurs avantages ainsi que leurs applications en imagerie biomédicale. Les différentes modalités instrumentales sont présentées, en soulignant notamment le potentiel du processus SRS pour l'histologie sans marquage. Le chapitre aborde également les avancées dans le développement des endoscopes non linéaires, en mettant en avant les dispositifs à fibre creuse et à balayage résonant. Enfin, les principaux verrous technologiques liés à l'implémentation du processus SRS en configuration endoscopique sont présentés.

Le **chapitre 2** présente le développement d'une sonde endoscopique miniaturisée, dédiée à l'imagerie SRS. Les impulsions laser sont transmises vers l'échantillon grâce à une fibre optique à cœur creux et à courbure négative (NCHCF). La fabrication ainsi que les performances optiques de la fibre sont détaillées. L'extrémité distale de la fibre est fonctionnalisée à l'aide d'une fibre à gradient d'indice afin de réduire la taille du mode en sortie et ainsi améliorer la résolution spatiale de l'endoscope. L'ensemble du système est encapsulé dans un dispositif de scanner à balayage par fibre résonante. Les micro-objectifs contenus dans la tête endoscopique sont présentés, ainsi que leurs performances associées.

Le **chapitre 3** est consacré à la preuve de concept expérimentale du dispositif endoscopique conçu. Les performances optiques de la sonde sont détaillées, de même que l'ensemble du montage expérimental. Des premières démonstrations d'imagerie endoscopique SRS sont réalisées sur des échantillons biologiques fixés. Les principales limitations du système ainsi que les sources de bruit qui lui sont propres sont analysées, notamment celles liées à l'architecture optique de la sonde et celles liées à la fibre optique.

Le **chapitre 4** décrit le développement d'une nouvelle génération de sonde endoscopique SRS intégrée. Une optimisation des éléments optiques est menée afin d'améliorer les performances de la première sonde réalisée. Des images SRH ont été obtenues sur des échantillons biologiques frais et non fixés, mettant en évidence l'intérêt de la sonde dans le milieu clinique.

L'**annexe A** décrit un nouveau dispositif endoscopique compact dédié à l'imagerie endoscopique 3PEF. Une fibre optique NCHCF délivre des impulsions laser ultracourtes issues d'un amplificateur laser ultrarapide vers le système endoscopique. Les unités de couplage, de détection et de calibration sont également intégrées. De l'imagerie à 3 photons a été réalisée sur divers échantillons biologiques, y compris sur un cerveau de souris transgénique.

Chapitre I

Imagerie microscopique et micro-endoscopique sans marquage

L'imagerie optique biomédicale a connu un tournant majeur avec le développement du premier microscope multiphotonique en 1990 par W. Denk et ses collaborateurs [7]. Basée sur les interactions non linéaires entre la lumière et la matière, cette technologie permet d'imager les structures moléculaires avec une résolution sub-micronique, tout en minimisant la phototoxicité et le photoblanchiment. L'utilisation de longueurs d'onde dans le proche infrarouge favorise une pénétration tissulaire accrue par rapport aux techniques d'imagerie linéaire, éliminant ainsi la nécessité d'un sectionnement préalable des échantillons [13]. Contrairement aux approches conventionnelles, le contraste est généré intrinsèquement par les propriétés moléculaires et structurales des tissus, ce qui évite le recours à des marqueurs exogènes. Il devient alors possible d'observer la fluorescence naturelle de certaines molécules (comme le NADH ou la flavine), l'organisation du collagène dans le milieu, ou encore d'exploiter la signature vibrationnelle des liaisons moléculaires. Ses applications couvrent des domaines clés tels que la biologie, où elles permettent des analyses à la fois structurales et fonctionnelles non invasives.

Ce chapitre présente les principes physiques sous-jacents aux techniques d'imagerie non linéaire, en mettant l'accent sur leur implémentation en microscopie. Une attention particulière est portée à l'imagerie SRS, dont les développements récents permettent de réaliser des images histologiques sans marquage ni préparation. Un état de l'art des sondes endoscopiques multiphotoniques est également proposé, soulignant leur intérêt dans l'imagerie *in vivo*. Enfin, la nécessité de concevoir de nouveaux dispositifs endoscopiques compatibles avec l'imagerie SRS est discutée, dans la perspective d'un bilan histopathologique en temps réel et *in vivo*.

1.1 Principes fondamentaux de l'optique non linéaire

1.1.1 Interaction lumière - matière

Un tissu biologique est un milieu diélectrique. Il est constitué de N atomes ou molécules, présentant des charges positives et négatives réparties aléatoirement dans le milieu, comme illustré sur la Figure 1.1 a.

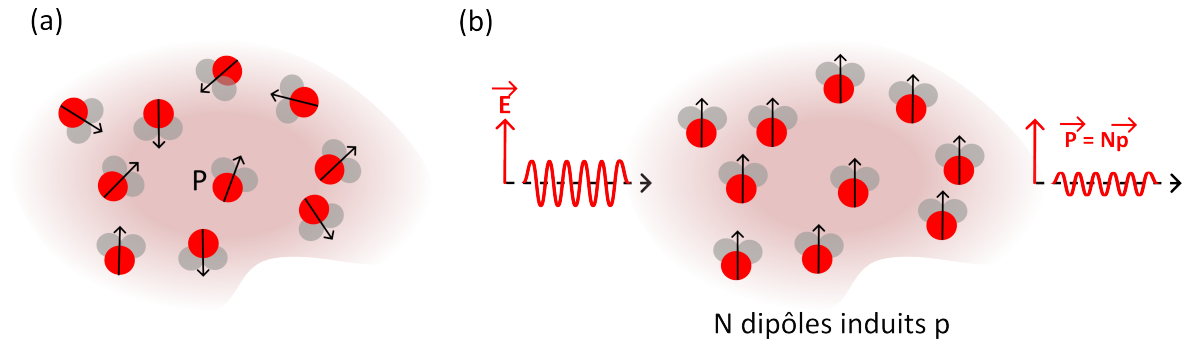


FIGURE 1.1 – (a) Schéma de la molécule d'eau avec son moment dipolaire $\vec{p}$. En l'absence de champ électrique $\vec{E}$ extérieur, les moments dipolaires des molécules d'eau sont orientés de manière aléatoire. (b) Polarisation induite dans le milieu diélectrique sous l'action d'un champ électrique $\vec{E}$ incident.

Lorsqu'un champ électrique $\vec{E}$ de fréquence ω interagit avec un milieu homogène et isotrope, la distribution ionique est modifiée, créant ainsi un moment dipolaire à l'échelle microscopique :

$$p(\omega) = \alpha E(\omega) \quad (1.1)$$

avec α la polarisabilité linéaire. À l'échelle macroscopique, la polarisation $P(\omega)$ s'exprime comme la somme de tous les dipôles microscopiques (Figure 1.1 b) :

$$P(\omega) = \epsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) E(\omega) \quad (1.2)$$

avec ϵ_0 la permittivité du vide et $\chi^{(1)}$ la susceptibilité linéaire du milieu.

Lorsque le champ électrique incident atteint des intensités élevées (typiquement entre 10^6 et 10^{10} V.m⁻¹), son amplitude devient comparable aux champs inter-atomiques liant les électrons à leur noyau. Dans ce régime, la force de rappel exercée sur les électrons n'est plus purement harmonique et la réponse du milieu ne peut plus être décrite par une simple relation linéaire entre la polarisation $P(\omega)$ et le champ électrique $E(\omega)$. Cette non-linéarité se traduit par l'apparition de termes d'ordres supérieurs dans le développement de la polarisation [14] :

$$P = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E E + \chi^{(3)} E E E + \dots) \quad (1.3)$$

où $\chi^{(n)}$ désigne la susceptibilité non linéaire d'ordre n . Ces termes d'ordres supérieurs sont généralement négligeables devant $\chi^{(1)}$, mais deviennent significatifs à très haute intensité lumineuse, telle que celle délivrée par certains lasers. Physiquement, cela signifie qu'en plus

de la polarisation linéaire induite dans le milieu, chaque électron va osciller avec une amplitude plus importante dans son puits de potentiel et ressentir l'anharmonicité du puits associé. Lorsque le système s'éloigne du régime linéaire, des interactions entre photons émergent et de nouvelles fréquences harmoniques sont créées. Ces mécanismes peuvent être incohérents ou cohérents, selon la réponse diélectrique du milieu et les propriétés de phase des ondes émises.

- **Les processus incohérents** correspondent à une réponse stochastique du milieu, associée à des mécanismes de dissipation et de relaxation. Il n'existe pas de corrélation de phase entre les champs incident et généré. Ces processus s'accompagnent généralement d'un transfert d'énergie avec le milieu. La fluorescence, la fluorescence multiphotonique et la diffusion Raman spontanée font partie des processus incohérents.
- **Les processus cohérents** résultent d'une interaction déterministe entre le champ optique incident et le milieu. Ils se caractérisent par le maintien d'une relation de phase fixe entre les champs incident et généré. L'efficacité de ces processus est gouvernée par une condition d'accord de phase entre les ondes impliquées, imposant une contrainte directionnelle stricte. Parmi ces processus figurent le mélange à trois ondes (ex. : SHG), le mélange à quatre ondes (ex. : THG) ainsi que les processus Raman cohérents (ex. : SRS, CARS).

1.1.2 Processus optiques incohérents

a) Fluorescence par excitation à 2 photons

Parmi les différentes techniques d'imagerie non linéaire, la microscopie par fluorescence à 2 photons (2PEF) s'est imposée comme la méthode de référence pour l'imagerie tridimensionnelle d'échantillons biologiques [15]. Ce processus non linéaire du troisième ordre repose sur l'absorption simultanée de deux photons identiques et de faible énergie par une molécule fluorescente. Cette interaction est régie par l'équation suivante :

$$P^{NL}(\omega) = \epsilon_0 \chi^{(3)}(\omega; \omega, \omega, -\omega) E(\omega) E(\omega) E^*(\omega) \quad (1.4)$$

avec $\chi^{(3)}$ la susceptibilité non linéaire du troisième ordre.

Après excitation, la molécule se relaxe vers l'état fondamental en émettant un photon de fluorescence. Cette émission est liée à la partie imaginaire de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre $\chi^{(3)}$. L'absence de corrélation de phase entre les photons incidents et émis classe ce processus parmi les phénomènes incohérents, marqués par un transfert d'énergie vers le milieu. Ainsi, l'énergie du photon émis est inférieure à la somme des énergies des photons incidents, ce qui entraîne un décalage entre les spectres d'absorption et d'émission, connu sous le nom de décalage de Stokes [16]. La Figure 1.2 illustre schématiquement les mécanismes de fluorescence par absorption à un photon (1PEF, Figure 1.2 a) et à deux photons (2PEF, Figure 1.2 b).

L'utilisation de faisceaux laser dans le proche infrarouge ($\lambda \in [700 - 1000]$ nm) en microscopie 2PEF offre deux avantages déterminants pour l'imagerie biologique. Tout d'abord,

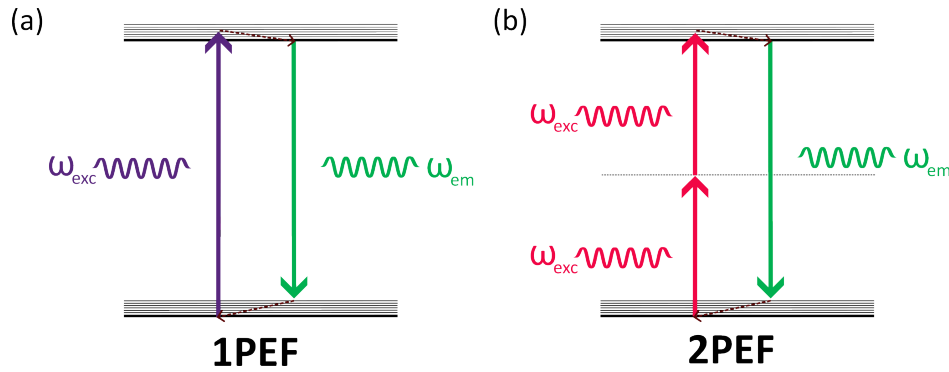


FIGURE 1.2 – Diagrammes d'énergie des mécanismes de fluorescence à un (a) et à deux (b) photons.

la faible absorption et diffusion à ces longueurs d'onde permet une pénétration plus importante dans les tissus, atteignant typiquement des profondeurs de quelques centaines de micromètres [15]. De plus, la faible énergie requise réduit la phototoxicité dans les tissus, permettant une observation prolongée des tissus biologiques.

b) Fluorescence par excitation à 3 photons

En 1996, David Wokosin démontre la possibilité de réaliser de l'imagerie de fluorescence à 3 photons (3PEF) sur des échantillons biologiques [17]. Dans ce processus du cinquième ordre, trois photons sont absorbés simultanément par une molécule, donnant lieu à l'émission d'un signal de fluorescence. Cette interaction est régit par l'équation suivante :

$$P^{NL}(\omega) = \epsilon_0 \chi^{(5)}(-\omega; \omega, \omega, \omega, -\omega, -\omega) E(\omega) E(\omega) E(\omega) E^*(\omega) E^*(\omega) \quad (1.5)$$

avec $\chi^{(5)}$ la susceptibilité non linéaire du cinquième ordre. Ce mécanisme est illustré sur la Figure 1.3, en comparaison avec l'absorption 1PEF.

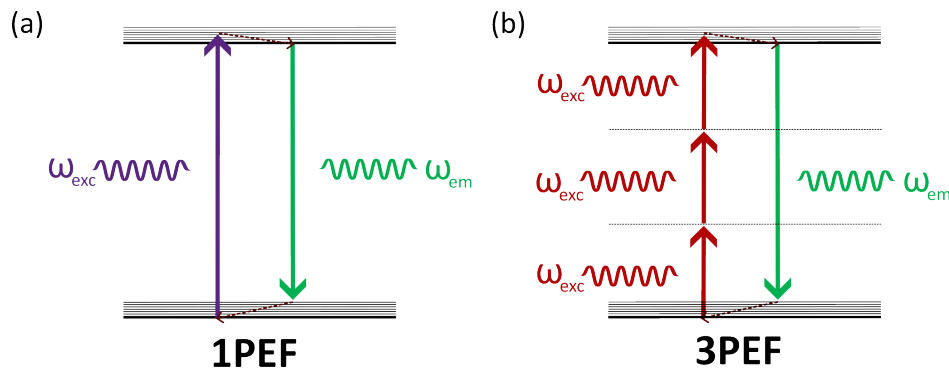


FIGURE 1.3 – Diagrammes d'énergie des mécanismes de fluorescence à un (a) et à trois (b) photons.

En utilisant des faisceaux lasers dans l'infrarouge ($\lambda \in [1000 - 1700]$ nm), l'absorption et la diffusion dans les tissus sont réduites, ce qui permet d'atteindre des profondeurs de pénétration supérieures à celles de l'imagerie à deux photons, jusqu'à 1 mm [18]. Par ailleurs, comme illustré sur la Figure 1.4, la dépendance cubique du signal vis-à-vis de l'intensité

d'excitation (I^3 contre I^2 pour la 2PEF), conduit à une meilleure résolution axiale, ce qui est particulièrement utile pour l'imagerie de structures fines.

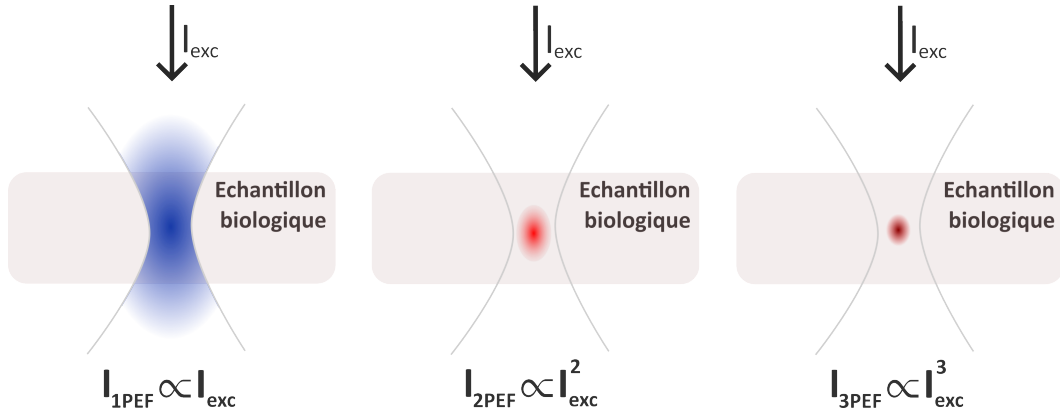


FIGURE 1.4 – Représentation schématique du volume d'émission de fluorescence au foyer du faisceau laser d'excitation pour les processus 1PEF, 2PEF et 3PEF.

La microscopie de fluorescence multiphotonique est principalement utilisée pour mesurer la fluorescence des biomolécules endogènes telles que le NADH et la flavine, ce qui fournit des informations sur l'activité métabolique des cellules et des tissus.

c) Diffusion Raman spontanée

La diffusion Raman spontanée est un phénomène optique non linéaire très répandu en microscopie car elle permet d'étudier les vibrations moléculaires d'un échantillon. Une molécule est constituée d'atomes reliés entre eux par des liaisons chimiques, qui peuvent vibrer de différentes façons (par étirement, flexion ou torsion), selon la structure chimique de la molécule [19]. Ces modes vibrationnels modifient la polarisabilité de la molécule, influençant ainsi son interaction avec une onde électronique incidente.

Lorsqu'un faisceau laser monochromatique de pulsation w_p interagit avec un milieu matériel, la majorité des photons diffusés le sont de manière élastique, c'est-à-dire sans transfert d'énergie avec le milieu. Ce phénomène est connu sous le nom de diffusion Rayleigh. Néanmoins, une très faible fraction des photons incidents (environ 1 sur $10^6 - 10^8$) subit une diffusion inélastique, caractérisée par un échange d'énergie avec les vibrations moléculaires des molécules présentes dans le milieu. Ce processus, connu sous le nom de diffusion Raman spontanée, a été découvert en 1928 par le physicien C.V. Raman [20]. Il se traduit par un léger décalage de fréquence des photons diffusés, directement lié aux modes vibrationnels propres des molécules du matériau.

Dans le cas de la diffusion de Stokes, le photon incident cède de l'énergie à la molécule, ce qui diminue la fréquence w_s du photon émis. À l'inverse, dans le cas de la diffusion anti-Stokes, une molécule déjà excitée transfère de l'énergie au photon, augmentant ainsi sa fréquence w_{AS} .

Ces fréquences sont données par :

$$\omega_S = \omega_P - \Omega_R \quad (\text{Stokes}) \quad (1.6)$$

$$\omega_{AS} = \omega_P + \Omega_R \quad (\text{anti-Stokes}) \quad (1.7)$$

avec ω_P , la fréquence de l'onde incidente et Ω_R celle du mode vibrationnel excité. Ces mécanismes sont schématisés sur la Figure 1.5, qui illustre les diagrammes d'énergie des photons impliqués dans chacun des processus de diffusion.

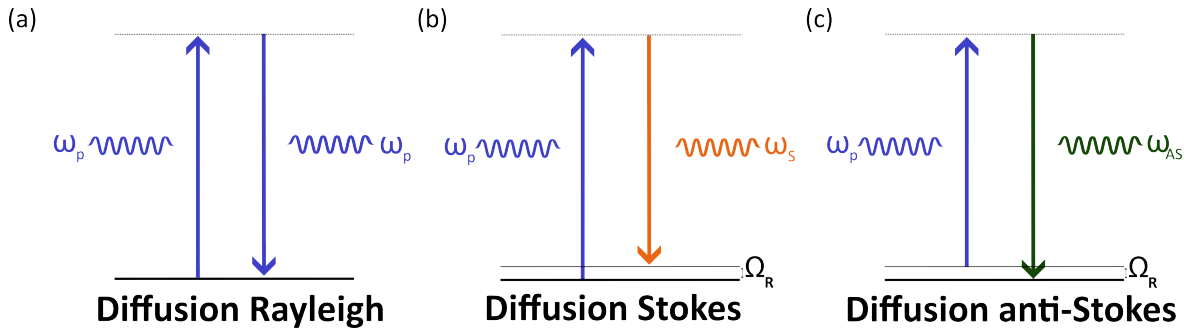


FIGURE 1.5 – Diagrammes d'énergie des processus de diffusion Rayleigh (a) et Raman spontanée : Stokes (b) et anti-Stokes (c).

1.1.3 Processus optiques cohérents

Au-delà de la fluorescence multiphotonique, la microscopie non linéaire exploite également divers processus cohérents qui fournissent des informations complémentaires sur les propriétés structurales et moléculaires des échantillons.

a) Conversion de fréquence : génération d'harmoniques

Parmi elles, la génération de second harmonique (SHG) est un processus cohérent du second ordre dans lequel deux photons incidents de fréquence ω sont convertis en un photon unique de fréquence 2ω . Cette interaction est régie par l'équation suivante :

$$P^{NL}(2\omega) = \epsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega; \omega, \omega) E(\omega) E(\omega) \quad (1.8)$$

avec $\chi^{(2)}$ la susceptibilité non linéaire du second ordre.

Le processus étant cohérent, aucune énergie n'est transmise au milieu et l'intensité du signal SHG est proportionnelle au carré du module de $\chi^{(2)}(2\omega; \omega; \omega)$. Comme le processus est directement dépendant de la partie réelle de la susceptibilité $\chi^{(2)}$, alors ce processus n'est présent que dans les structures moléculaires et interfaces non centrosymétriques, tels que le collagène [21, 22], la myosine [23], les microtubules [24] ou encore les cellules tumorales métastatiques [25, 26].

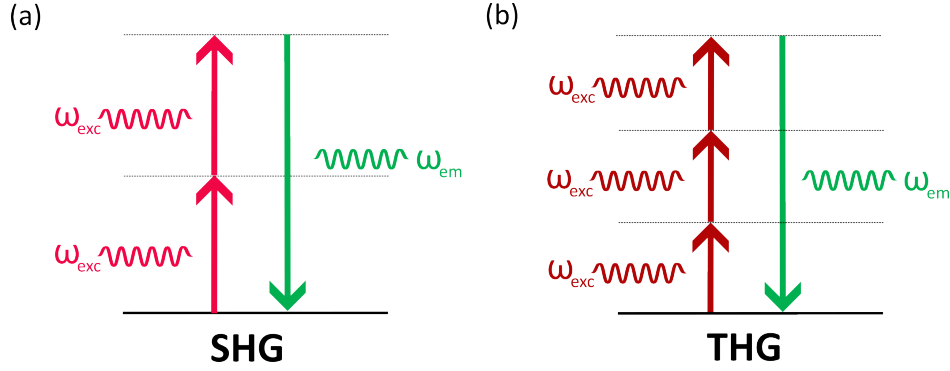


FIGURE 1.6 – Diagrammes d'énergie des mécanismes de génération de second (a) et troisième (b) harmonique.

Le mécanisme sous-jacent à la génération de troisième harmonique (THG) est identique. Trois photons de même énergie sont convertis en un photon unique de fréquence 3ω . Cette conversion est décrite par l'équation suivante :

$$P^{NL}(3\omega) = \epsilon_0 \chi^{(3)}(3\omega; \omega, \omega, \omega) E(\omega) E(\omega) E(\omega) \quad (1.9)$$

avec $\chi^{(3)}$ la susceptibilité non linéaire du troisième ordre.

Contrairement à la SHG, elle se produit aux interfaces ou dans les milieux présentant des gradients d'indice de réfraction et ne nécessite pas de symétrie particulière du milieu. Elle est ainsi utilisée pour imager les membranes cellulaires [27, 28], par exemple. Ces processus sont schématisés sur la Figure 1.6.

b) Diffusion Raman cohérente

Le processus de diffusion Raman spontanée, présenté dans la section 1.1.2, est très intéressant pour analyser la composition chimique d'un milieu sans recourir à des marqueurs exogènes. Néanmoins, son utilisation reste limitée en raison de sa très faible efficacité, avec une section efficace de l'ordre de 10^{-33} cm^2 . L'intensité faible du signal entraîne des temps d'acquisition prolongés (plusieurs minutes) et rend difficile son application à l'imagerie biologique dynamique. La démonstration expérimentale du premier laser à rubis en 1960 [29] a permis de concevoir de nouvelles méthodes de spectroscopie Raman, capables de surmonter ces limitations. En 1962, G. Eckhardt *et al.* [30] ont montré qu'il est possible de stimuler la diffusion Raman en utilisant deux faisceaux laser de longueurs d'onde différentes. Cette stimulation se produit lorsque la différence de fréquence entre les deux faisceaux correspond à la fréquence Ω_R d'un mode vibrationnel propre de la molécule. Cette découverte a marqué l'émergence de la diffusion Raman cohérente, qui regroupe un ensemble de techniques non linéaires exploitant la partie imaginaire de la susceptibilité optique du troisième ordre $\chi^{(3)}$. Seuls les processus les plus répandus de diffusion Raman cohérente anti-Stokes (CARS) et de diffusion Raman stimulée (SRS) seront présentés. Une présentation plus complète des autres processus est disponible dans la référence [19].

Les techniques de diffusion Raman cohérentes reposent sur l'utilisation de deux faisceaux laser, dans le visible ou le moyen infrarouge, pour cibler les modes vibrationnels des molécules présentes dans le milieu [31]. Un faisceau laser de pompe de fréquence ω_p et un faisceau de Stokes de fréquence ω_s interagissent simultanément avec une même molécule du milieu. La fréquence ω_s est choisie de manière à satisfaire la condition $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$; où Ω_R correspond à la fréquence d'un mode vibrationnel propre de la molécule.

Lorsque cette condition de résonance est remplie, elle induit dans le milieu une polarisation non linéaire du troisième ordre $\chi^{(3)}$, entraînant l'apparition de nouveaux signaux optiques (CARS), ou la modification de l'intensité des faisceaux incidents (SRS). Ces mécanismes sont schématisés sur la Figure 1.7.

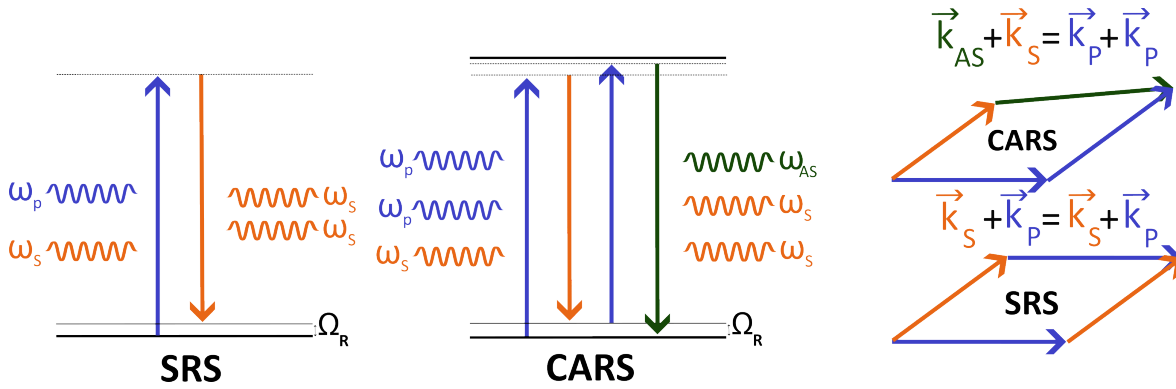


FIGURE 1.7 – Diagrammes d'énergie des processus Raman cohérents, issus de la propagation de deux faisceaux laser sur une molécule, dont le mode vibrationnel vaut Ω_R .

Dans le **processus CARS**, un nouveau signal lumineux est émis à la fréquence anti-Stokes $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s$. Ce signal résulte d'un mélange à quatre ondes, entre deux photons de pompe et un photon de Stokes. La polarisation non linéaire associée s'écrit :

$$P^{NL}(\omega_{AS}) = \epsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_{AS}; \omega_p, \omega_p, -\omega_s) E(\omega_p) E(\omega_p) E^*(\omega_s) \quad (1.10)$$

Pour que ce processus se développe spatialement, il faut assurer une vitesse de phase égale entre la polarisation induite et le champ optique généré $\Delta \vec{k} = 2\vec{k}_p - \vec{k}_s - \vec{k}_{AS} = \vec{0}$, pour les champs générés puissent interférer constructivement.

L'intensité du signal CARS est proportionnelle au module au carré de la polarisation induite $I_{CARS} \propto |P^{(NL)}(\omega_{AS})|^2$. Elle dépend de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre $\chi^{(3)}$, que l'on peut décomposer en deux contributions :

$$\chi^{(3)} = \chi_{NR}^{(3)} + \chi_{RES}^{(3)} \quad (1.11)$$

où $\chi_{RES}^{(3)}$ est la composante résonante liée à la condition $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$, avec Ω_R la fréquence d'un mode vibrationnel. La partie imaginaire de $\chi^{(3)}$ est dominante à la résonance et porte l'information spectroscopique sur la vibration moléculaire. La composante non résonante

$\chi_{NR}^{(3)}$ est associée à la réponse électronique instantanée Kerr du milieu. Sa partie réelle produit un signal à la même fréquence que le processus résonant CARS [32]. Ce signal non résonant est présent même en l'absence de liaison moléculaire. L'intensité du signal CARS peut alors s'écrire sous la forme :

$$I_{CARS} \propto | \text{Im}(\chi_{RES}^{(3)}) + \text{Re}(\chi_{NR}^{(3)}) |^2 \quad (1.12)$$

L'interférence cohérente entre ces deux contributions entraîne une diminution du contraste chimique et une distorsion des spectres obtenus. Ce bruit constitue l'une des principales limites de la microscopie CARS, souvent contournée par des techniques de suppression du fond non résonant [33].

Le processus SRS permet de s'affranchir du bruit de fond non résonant en ne mesurant que l'information liée à la partie imaginaire de $\chi_{RES}^{(3)}$. Dans ce processus, aucun nouveau photon n'est généré, mais l'intensité des ondes incidentes de pompe et de Stokes est modifiée par transfert d'énergie. Le processus de gain Raman stimulé (SRG) active une polarisation non linéaire qui rayonne à $\omega_S = \omega_P - \omega_S + \omega_S$:

$$P^{NL}(\omega_{SRG}) = \epsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_{SRG}; \omega_P, \omega_S, -\omega_P) E(\omega_P) E(\omega_S) E^*(\omega_P) \quad (1.13)$$

Le champ SRG rayonné interfère constructivement avec le champ Stokes incident, ce qui se traduit par une augmentation de l'intensité du faisceau Stokes, définie comme $I = |E|^2$. Le processus de perte Raman stimulée (SRL) est la symétrie du processus SRG. Il active la polarisation suivante qui rayonne à $\omega_P = \omega_S - \omega_S + \omega_P$:

$$P^{NL}(\omega_{SRL}) = \epsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_{SRL}; \omega_S, \omega_P, -\omega_S) E(\omega_S) E(\omega_P) E^*(\omega_S) \quad (1.14)$$

Ce champ interfère de manière destructive avec le champ pompe incident, entraînant une diminution de l'intensité du faisceau de pompe. Ces interactions ayant lieu à la fréquence des ondes incidentes, la condition d'accord de phase $\Delta \vec{k} = \vec{k}_P - \vec{k}_P - \vec{k}_S + \vec{k}_S = \vec{0}$ est automatiquement satisfaite dans un milieu homogène. Dans les milieux inhomogènes, tels que les échantillons biologiques, seules les composantes des champs non linéaires diffusées dans les directions colinéaires aux faisceaux incidents sont amplifiées et conduisent à une variation mesurable d'intensité. Il est donc crucial de détecter le signal SRS vers l'avant, pour observer ce transfert de modulation.

Contrairement au processus CARS, aucun signal de fond non résonant n'est présent car la détection repose sur la mesure directe de la variation d'intensité (ΔI_{SRG} ou ΔI_{SRL}) des faisceaux d'excitation. Cette variation étant linéairement proportionnelle à la concentration moléculaire, la microscopie SRS est très utilisée pour l'analyse des tissus tumoraux [34, 35], le suivi de la distribution intracellulaire des médicaments [36] ou encore dans la détection de contaminants (pesticides, microplastiques, etc.) [37], par exemple.

1.2 Techniques de microscopie non linéaire

1.2.1 Microscopie de fluorescence multiphotonique et de génération d'harmoniques

L'imagerie non linéaire repose sur l'utilisation d'impulsions laser à puissance crête élevée (10^3 à 10^5 W). En utilisant des impulsions ultra-courtes (typiquement entre 50 fs à 10 ps), il est possible d'atteindre de telles puissances tout en maintenant une puissance moyenne de l'ordre de quelques dizaines de milliwatts sur l'échantillon. Cette configuration permet ainsi de limiter les risques de dommages thermiques ou photochimiques, tout en assurant l'efficacité des processus d'excitation multiphotonique.

Les sources laser utilisées en microscopie dépendent du processus non linéaire étudié. Les lasers titane-saphir (Ti :Sa) sont les plus couramment employés pour l'imagerie 2PEF et SHG. Accordables entre 700 et 1000 nm, ils offrent une excellente stabilité spectrale et permettent d'exciter la plupart des fluorophores biologiques : le NADH (720–750 nm), les flavoprotéines (750–800 nm) ou la GFP (900–950 nm), tout en visualisant les fibres de collagène (800–880 nm). L'imagerie 3PEF et THG requiert des impulsions de puissance de crête plus élevée (de l'ordre de 10^6 W) et de durée inférieure à 100 fs. Les longueurs d'onde d'excitation se situent dans l'infrarouge (1300–1700 nm). Pour atteindre ces caractéristiques, les sources combinent un amplificateur paramétrique optique (OPA) pompé par un oscillateur à fibre dopé aux ions Ytterbium. L'association du Monaco (pompe) et de l'Opera (OPA) de chez Coherent constitue aujourd'hui l'une des configurations les plus répandues pour ces applications.

Le montage expérimental typique d'un microscope multiphotonique est représenté sur la Figure 1.8. Le faisceau laser d'excitation est focalisé sur l'échantillon à l'aide d'un objectif de microscope. Le balayage spatial du point focal dans le plan XY est assuré par un

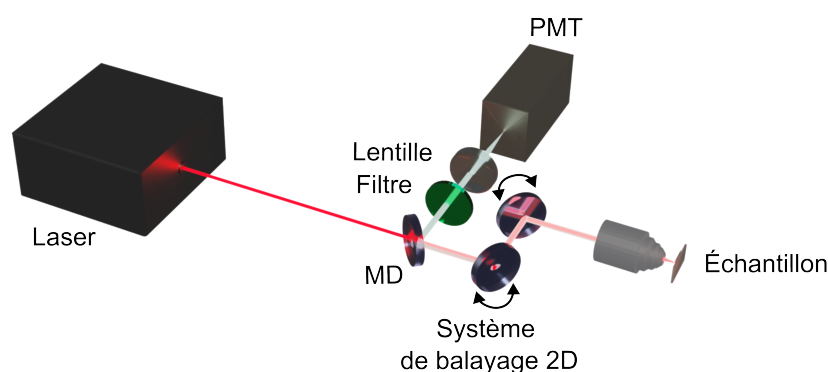


FIGURE 1.8 – Schéma du montage expérimental d'un microscope multiphotonique.

système à deux miroirs galvanométriques, permettant la reconstruction d'une image bidimensionnelle. Le signal non linéaire généré dans l'échantillon est collecté soit en transmission à l'aide d'un second objectif, soit en rétrodiffusion *via* le même objectif de microscope. Un miroir dichroïque (MD) permet de séparer le faisceau excitateur (proche infrarouge) des signaux émis (visibles), et un filtre est placé devant un tube photomultiplicateur (PMT) afin

de récupérer le signal d'intérêt. Notons que le signal non linéaire issu des processus incohérents est émis de manière isotrope et peut donc être collecté dans les deux configurations. Dans le cas des processus cohérents, le signal est émis préférentiellement vers l'avant, ce qui nécessite des échantillons minces. Une détection vers l'arrière est possible, mais seule la quantité de signal non linéaire rétrodiffusée par l'échantillon après le point focal sera collectée. Il est donc indispensable d'utiliser un PMT bas bruit.

Pour cartographier en 3 dimensions l'échantillon, un système de translation motorisé déplace l'objectif selon l'axe Z avec une résolution submicronique. L'acquisition séquentielle d'images 2D à différentes profondeurs permet ensuite de reconstruire un volume 3D complet de l'échantillon.

1.2.2 Microscopie par diffusion Raman cohérente anti-Stokes

La microscopie vibrationnelle CARS requiert un montage optique spécifique utilisant deux faisceaux laser synchronisés, appelés faisceaux de pompe et de Stokes. L'écart fréquentiel entre ces deux faisceaux doit être accordable afin de cibler les différents modes vibrationnels des molécules étudiées. Idéalement, des impulsions picosecondes sont utilisées, car leur spectre étroit permet d'obtenir une imagerie à haute résolution spectrale, capable de distinguer les bandes vibrationnelles proches. Des impulsions plus courtes (100–300 fs) peuvent également être employées. Leur forte puissance crête génère un signal cohérent intense qui est adapté à l'imagerie rapide. Toutefois, la largeur spectrale de ces impulsions femtosecondes limite la résolution spectroscopique du système. La source laser privilégiée pour l'imagerie CARS est la source PicoEmerald FT de chez APE, qui combine un oscillateur paramétrique optique (OPO) pompé par un laser à verrouillage de modes émettant à 1030 nm. Ce laser permet de générer deux faisceaux synchronisés et accordables, dont la différence de fréquence couvre une plage de décalages Raman allant de 210 à 5450 cm^{-1} .

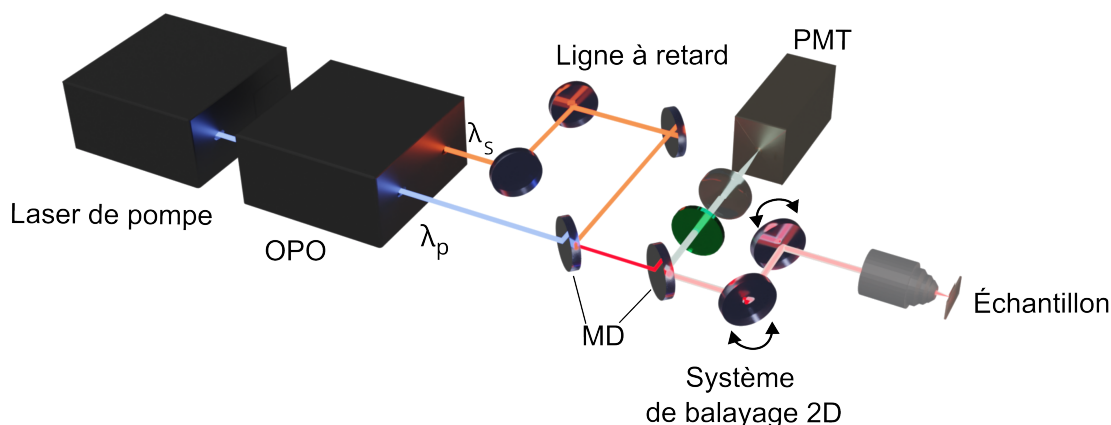


FIGURE 1.9 – Schéma du montage expérimental d'un système d'imagerie CARS.

Le montage typique d'un microscope CARS est illustré sur la Figure 1.9. Les faisceaux de pompe et de Stokes en sortie du laser sont superposés spatialement à l'aide d'un miroir dichroïque, tandis que leur synchronisation temporelle est assurée par une ligne à retard optique placée sur l'un des trajets. Comme pour les modalités multiphotoniques, les faisceaux

sont focalisés sur l'échantillon à l'aide d'un objectif de microscope et le signal CARS rétro-diffusé est collecté par le même objectif. Ce signal est ensuite séparé des faisceaux incidents grâce à un miroir dichroïque, puis isolé des autres émissions non linéaires (2PEF, SHG, etc.) à l'aide d'un filtre placé devant un PMT.

L'intégration de plusieurs unités de détection en parallèle, chacune équipée de filtres et de photomultiplicateurs adaptés, permet d'exploiter simultanément plusieurs contrastes d'imagerie non linéaire : le processus SHG met en évidence les structures fibrillaires, les processus 2PEF et 3PEF renseignent sur le métabolisme cellulaire, tandis que le processus CARS apporte des informations sur la composition chimique du milieu.

1.2.3 La microscopie par diffusion Raman stimulée : un cas particulier

a) Microscopie par diffusion Raman stimulée

Le montage expérimental utilisé en microscopie SRS est similaire à celui employé en microscopie CARS, seule la détection du signal non linéaire diffère. Tandis que la microscopie CARS repose sur la détection d'un signal anti-Stokes émis à une longueur d'onde différente de celles des faisceaux excitateurs, la microscopie SRS consiste à détecter directement de faibles variations d'intensité sur les faisceaux incidents après interaction avec l'échantillon : un gain d'intensité pour le faisceau de Stokes (ΔI_{SRG}) ou une perte sur le faisceau de pompe (ΔI_{SRL}). Le transfert de modulation entre les faisceaux, après interaction avec l'échantillon, est illustré sur la Figure 1.10 a. En pratique, ces gains et pertes différentiels sont très faibles $|\frac{\Delta I_{SRG}}{I_S}| \approx |\frac{\Delta I_{SRL}}{I_P}| \approx 10^{-4} - 10^{-6}$ et nécessitent une détection synchrone. Pour y parvenir, l'un des faisceaux est modulé en amplitude à l'aide d'un modulateur acousto-optique (MAO), à une fréquence suffisamment élevée pour s'affranchir des bruits issus du laser et de l'électronique du système microscopique [38]. Dans le montage illustré sur la Figure 1.10 b, c'est le faisceau de pompe qui est modulé à une fréquence f_m .

Comme pour la microscopie CARS, un laser pompe un OPO pour produire les deux faisceaux laser. Ces faisceaux sont ensuite focalisés sur l'échantillon grâce à un objectif de microscope. Les synchronisations spatiale et temporelle sont assurées à l'aide d'un miroir dichroïque et d'une ligne à retard, positionnée ici sur le faisceau de Stokes. Les signaux sont collectés en transmission à l'aide d'un second objectif de microscope. Le faisceau de Stokes est ensuite isolé du faisceau de pompe à l'aide d'un filtre puis transmis vers une photodiode (PD) reliée à un amplificateur à détection synchrone. Cette unité permet d'extraire uniquement le signal modulé à la fréquence f_m , soit ΔI_{SRG} . En balayant l'échantillon dans le plan XY grâce à des miroirs galvanométriques (MG), le signal est acquis pour plusieurs positions dans l'échantillon et permet ainsi de reconstruire une image SRS. Le signal SRS rétrodiffusé n'est généralement pas exploitable. Sa détection s'effectue donc uniquement en transmission, ce qui nécessite l'utilisation d'échantillons fins et semi-transparents.

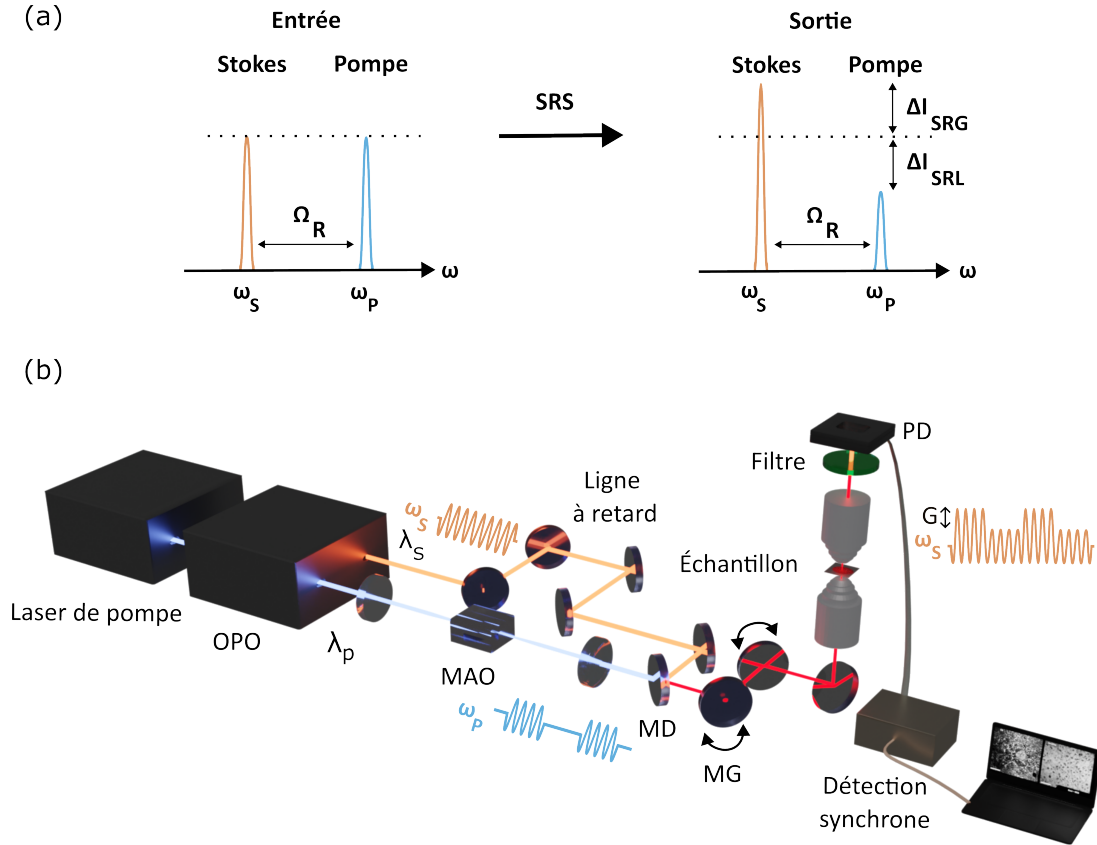


FIGURE 1.10 – (a) Représentation du spectre des faisceaux de pompe et de Stokes avant interaction (gauche) puis après interaction (droite) avec l'échantillon. (b) Schéma du montage expérimental d'un microscope SRS. Un laser picoseconde vient pomper un OPO.

b) Histologie Raman stimulée

Récemment développée, l'histologie Raman stimulée (SRH) [9] représente une avancée majeure en imagerie biomédicale. Cette technique exploite l'imagerie SRS pour générer des images histologiques virtuelles reproduisant fidèlement les colorations conventionnelles de type H&E, sans recourir à aucun marquage chimique [39]. Le principe repose sur la détection simultanée de deux signatures moléculaires spécifiques : les vibrations CH_2 à 2845 cm^{-1} , associées aux lipides et aux cytoplasmes cellulaires, et CH_3 à 2930 cm^{-1} , caractéristiques des protéines, de l'ADN et donc des noyaux cellulaires. Les récents développements instrumentaux ont permis la conception de microscopes SRH, capables d'imager simultanément ces deux liaisons moléculaires [40]. Cette acquisition double permet de reconstruire des images histologiques complètes révélant noyaux, cytoplasmes et structures fibrillaires, sans nécessiter les étapes fastidieuses et chronophages de fixation ou de coloration.

Une fois les images CH_2 et CH_3 obtenues, un algorithme de coloration virtuelle utilise les canaux CH_2 et $(\text{CH}_3 - \text{CH}_2)$ pour générer des images en tons rose-violet semblables aux images obtenues avec les colorations conventionnelles H&E. La soustraction $(\text{CH}_3 - \text{CH}_2)$ permet de révéler les noyaux cellulaires - élément clé du diagnostic histopathologique [41]. En effet, le seul canal CH_3 ne permet pas d'isoler les noyaux, car une partie

du spectre des liaisons CH_2 est également présent à 2930 cm^{-1} . La Figure 1.11 illustre les spectres Raman typiques des lipides (courbe verte) et des protéines (courbe bleue).

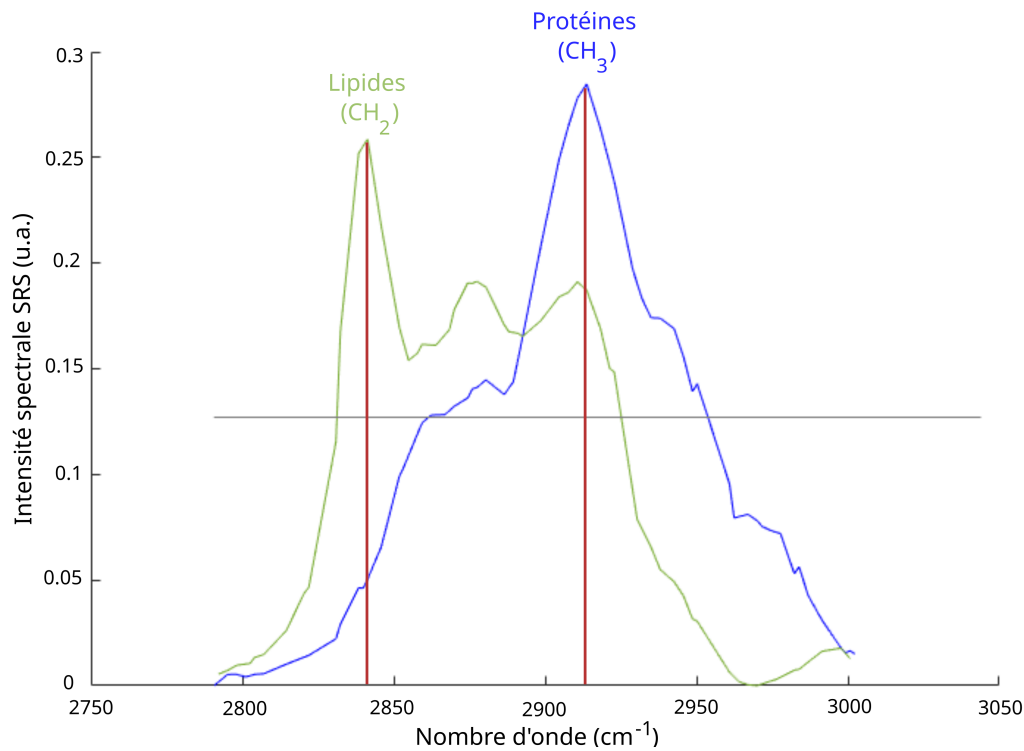


FIGURE 1.11 – Spectres Raman des lipides (courbe verte) et des protéines (courbe bleue), associés respectivement aux liaisons CH_2 à $\sigma = 2850 \text{ cm}^{-1}$ et CH_3 à $\sigma = 2930 \text{ cm}^{-1}$.

Un champ de vue de $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ est imagé en quelques secondes, et $1 \times 1 \text{ mm}^2$ en quelques minutes, réduisant radicalement les délais comparé à l'examen extemporané qui prend en moyenne 20 à 40 minutes. L'histologie SRH démontre une forte corrélation avec l'histologie standard [42] comme présenté sur la Figure 1.12. Le degré de concordance entre les deux techniques d'histologie est supérieur à 98% [39], ce qui renforce l'intérêt de la technique en oncologie. L'intégration de l'intelligence artificielle dans ces dispositifs permet même une classification automatique des tissus (bénins/malins) avec une précision dépassant 95% [35].

Malgré ces nombreux avantages, l'analyse histologique par microscopie SRS requiert encore une biopsie préalable, limitant son potentiel pour l'imagerie *in vivo* ou l'intervention guidée. Cette contrainte, commune à tous les dispositifs d'imagerie microscopique non linéaire, a motivé le développement d'outils portables et miniaturisés, capables de produire une imagerie directement *in vivo*, notamment *via* des sondes endoscopiques.

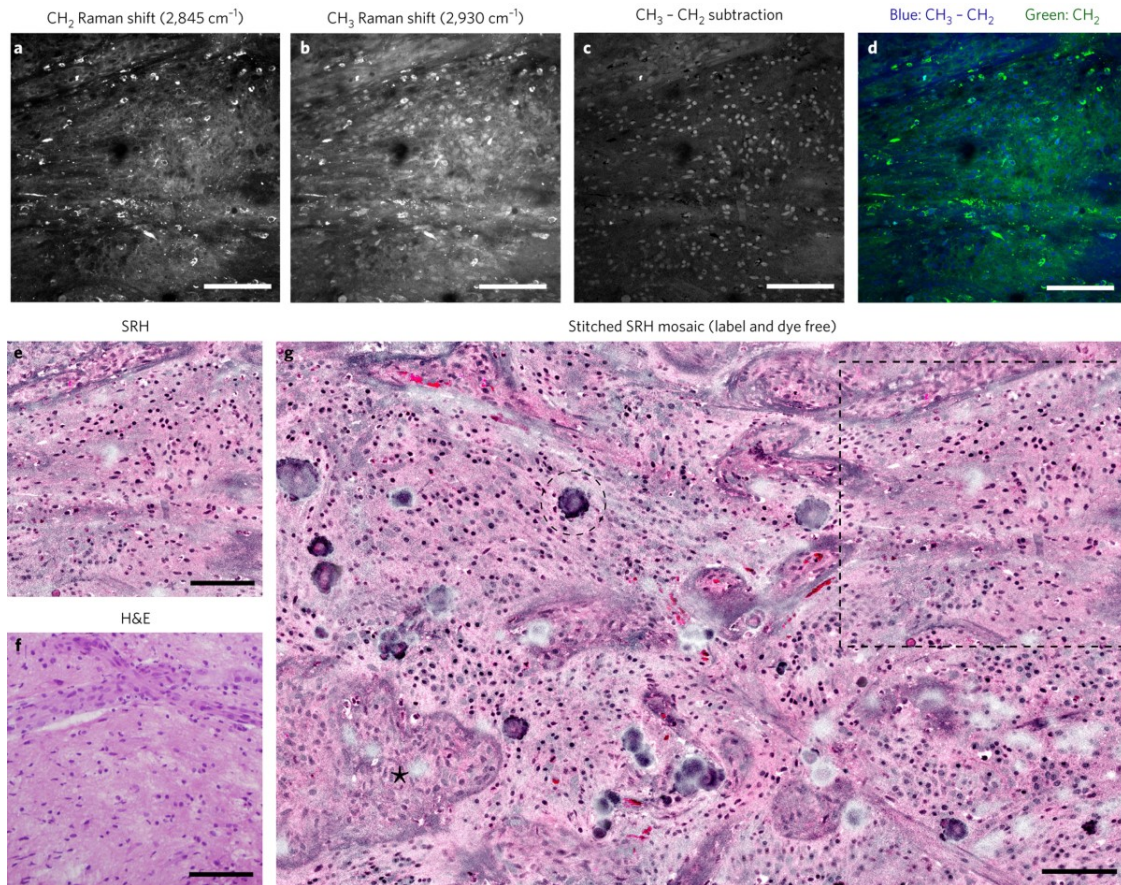


FIGURE 1.12 – Images histologiques de prélèvements chirurgicaux frais et non colorés de tissu cérébral humain. (a) Image SRS des liaisons CH_2 abondantes dans les lipides; (b) Image SRS des liaisons CH_3 caractéristiques des protéines et de l'ADN. En attribuant l'image $\text{CH}_3 - \text{CH}_2$ au canal bleu (c) et l'image CH_2 au canal vert, on obtient un contraste adapté à la détection de tumeurs cérébrales (d). L'image SRH ainsi générée (e) est comparée à une coloration H&E (f). Enfin, en assemblant plusieurs images SRH, une mosaïque (g) du tissu est reconstituée pour une cartographie globale de l'échantillon. Adapté de : Orringer *et al.*, *Nat Biomed Eng*, 2017 [39]

1.3 Techniques de micro-endoscopie non linéaire

La micro-endoscopie consiste à réaliser des images microscopiques à travers un endoscope, c'est-à-dire en utilisant un dispositif d'imagerie miniaturisé. La micro-endoscopie non linéaire concerne donc les modalités non linéaires exposées précédemment et repose sur l'utilisation de fibres optiques pour acheminer les impulsions laser ultracourtes vers l'échantillon. À l'extrémité distale de la fibre, un système de balayage miniaturisé, associé à des éléments optiques compacts, permet de focaliser le faisceau et de balayer la zone d'intérêt. Le signal non linéaire généré dans le tissu est ensuite collecté dans la direction contra-propagative (appelée épi-détection en microscopie). Cette technique permet de réaliser différents contrastes optiques non linéaires, tels que les processus 2PEF, SHG, 3PEF, THG ou encore CARS. La modalité SRS n'est pas réalisable avec cette technique car la quantité rétro-diffusée par l'échantillon est trop faible pour réaliser de l'imagerie.

Les sections suivantes décrivent les technologies utilisées pour concevoir ces sondes

endoscopiques, en particulier celles dédiées au transport des impulsions ultracourtes, au balayage du faisceau et à la collecte des signaux non linéaires. Enfin, l'architecture des dispositifs développés au sein du laboratoire est présentée, ainsi qu'un état de l'art des premières tentatives d'intégration du processus SRS en endoscopie multiphotonique.

1.3.1 Transmission d'impulsions ultracourtes par fibres optiques

La miniaturisation de la microscopie multiphotonique repose sur l'utilisation de fibres optiques pour acheminer les impulsions laser vers l'échantillon. Ces fibres doivent présenter une faible dispersion chromatique afin de préserver l'intégrité des impulsions ultracourtes (100 fs à 10 ps) lors de leur propagation. Deux approches principales sont utilisées dans la littérature : les fibres à saut d'indice associées à un système de pré-compensation et les fibres micro-structurées à cœur creux. Les principes de base associés à la propagation des impulsions dans les fibres seront présentés, ainsi que les notions nécessaires à la compréhension du manuscrit.

a) Fibres optiques à saut d'indice

Les fibres à saut d'indice constituent l'une des technologies les plus répandues pour le guidage de la lumière, notamment dans le domaine des télécommunications. Elles sont composées d'un cœur cylindrique en silice, d'indice de réfraction n_1 , entouré d'une gaine optique d'indice de réfraction légèrement plus faible $n_2 < n_1$. Cette différence d'indice permet de confiner et de propager la lumière par réflexion totale interne à l'interface cœur - gaine, comme illustré sur la Figure 1.13. La fibre est protégée par une ou plusieurs gaines extérieures en polymère, qui assurent la robustesse mécanique de la fibre et la protègent des micro-fissures. Comme l'indice de réfraction n_3 du polymère est supérieur à celui de la

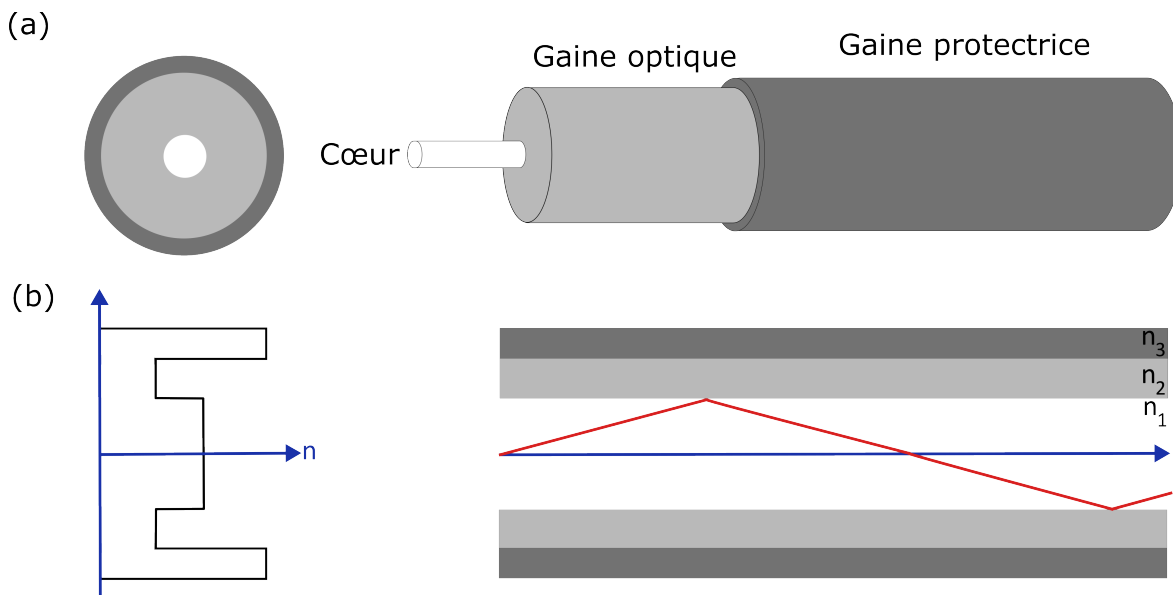


FIGURE 1.13 – (a) Schéma de l'architecture interne d'une fibre optique à saut d'indice. (b) Profil d'indice de réfraction de la fibre (gauche) et représentation du phénomène de réflexion totale à l'interface cœur-gaine (droite).

gaine, les modes guidés dans la gaine sont évacués.

Ces fibres sont parfaitement adaptées au transport de signaux continus ou modulés dans les télécommunications. Toutefois, lorsqu'il s'agit de transmettre des impulsions ultra-courtes (< 10 ps), plusieurs limitations apparaissent.

i) Dispersion chromatique (GVD)

Le principal défi provient de la dispersion chromatique (GVD) inhérente du matériau et du guide. Dans les fibres optique à saut d'indice, l'indice effectif du mode fondamental n_{eff} dépend de la longueur d'onde λ [43, 44]. Par conséquent, chaque composante spectrale d'une impulsion large bande, comme une impulsion femtoseconde de largeur $\Delta\lambda$, se déplace à une vitesse légèrement différente, ce qui entraîne un étalement de l'impulsion au cours de la propagation. La GVD est quantifiée par le coefficient de dispersion β_2 , exprimé en $\text{fs}^2 \cdot \text{m}^{-1}$, défini comme :

$$\beta_2 = \frac{d^2}{d\omega^2} \beta \quad (1.15)$$

où $\beta = k_0 n_{eff}$ est la constante de propagation, dépendante du vecteur d'onde dans le vide $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ et de l'indice effectif du mode fondamental n_{eff} . Après propagation sur une longueur L , la durée de l'impulsion Δt_f peut être approximée par :

$$\Delta t_f \approx -2\pi c L \frac{\Delta\lambda}{\lambda^2} \beta_2 \quad (1.16)$$

avec c la célérité de la lumière, λ la longueur d'onde de l'impulsion et $\Delta\lambda$ sa largeur. On distingue deux régimes de dispersion, illustrés sur la Figure 1.14 :

- **Dispersion normale** ($\beta_2 > 0$) : Les longueurs d'onde plus courtes (bleu) se propagent plus lentement que les longueurs d'onde plus longues (rouge).
- **Dispersion anormale** ($\beta_2 < 0$) : L'inverse se produit, les longueurs d'onde plus longues (rouge) se propagent plus lentement.

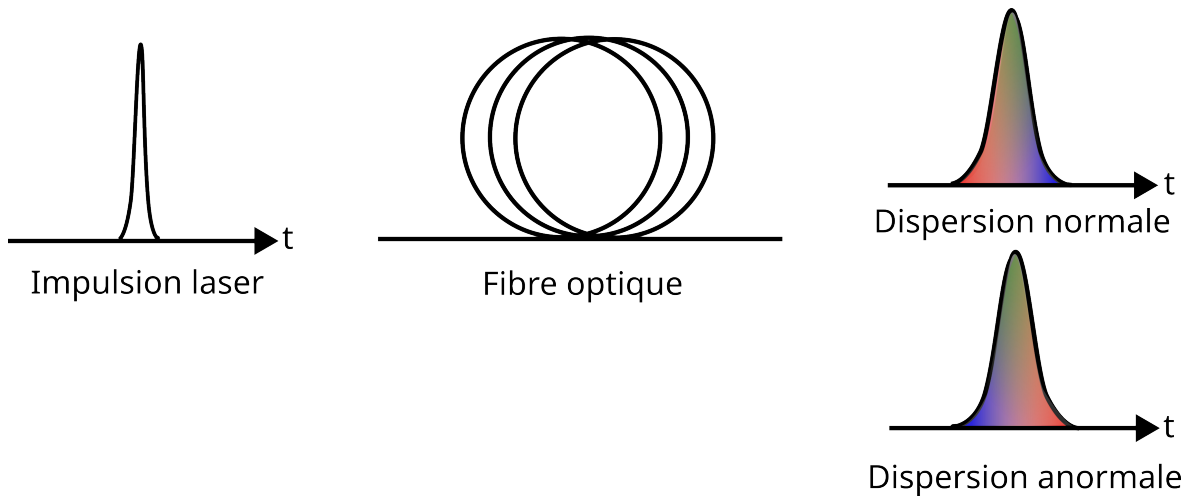


FIGURE 1.14 – Illustration de l'effet de la dispersion chromatique sur des impulsions laser ultracourtes après propagation dans une fibre optique, pour les régimes de dispersion normale et anormale.

Cet étalement temporel réduit la puissance crête de l'impulsion, essentielle à l'excitation multiphotonique. Par ailleurs, le confinement spatial et temporel d'impulsions à forte puissance crête induit des effets non linéaires tels que l'automodulation de phase (SPM) et le mélange à quatre ondes (FWM), qui modifient la phase, le spectre et la forme des impulsions [45, 46, 47].

ii) Pré-compensation de la dispersion

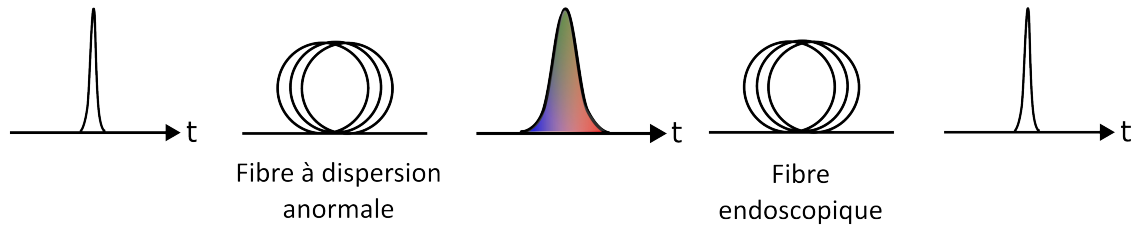
Pour corriger ces effets et restaurer une impulsion ultracourte en sortie, des systèmes de pré-compensation sont introduits avant l'injection dans la fibre optique. L'objectif est de compenser la dispersion induite par la fibre, représentée par le terme $\beta_{2_{fibre}} L_{fibre}$, au moyen d'un système introduisant une dispersion de signe opposé $\beta_{2_{pre-comp}}$ sur une longueur effective $L_{pre-comp}$. La condition de compensation idéale s'écrit :

$$\beta_{2_{pre-comp}} L_{pre-comp} + \beta_{2_{fibre}} L_{fibre} = 0 \quad (1.17)$$

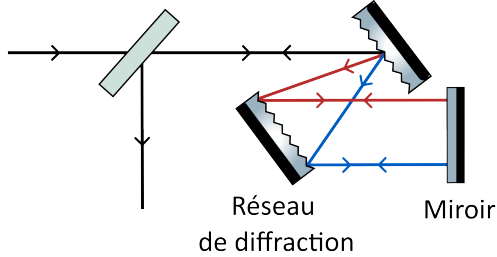
Plusieurs méthodes sont utilisées pour introduire une dispersion négative :

- **Fibres à dispersion compensée (DCF)** : Ces fibres possèdent un coefficient de dispersion opposé à celui de la fibre endoscopique. Lorsqu'elles sont correctement dimensionnées, elles permettent une compensation complète de la dispersion, tout en maintenant un système entièrement fibré et compact [48]. Cependant, leur efficacité est limitée à une longueur d'onde donnée, ce qui restreint leur usage en imagerie multiphotonique où les longueurs d'onde d'excitation sont multiples. De plus, elles peuvent introduire des effets non-linéaires tels que l'auto-modulation de phase, dégradant l'impulsion.
- **Paire de réseaux de diffraction** : Un réseau de diffraction décompose spatialement les composantes spectrales de la lumière incidente, les courtes longueurs d'onde subissant une plus grande déviation que les longues. En utilisant deux réseaux et en ajustant leur distance, il est possible de contrôler la dispersion négative de ce système afin de satisfaire l'équation 1.17 [49]. Cette approche, bien qu'efficace, engendre des pertes significatives et nécessite un réalignement pour chaque longueur d'onde incidente.
- **Compresseur à GRISM** : Cette technique repose sur la traversée de la lumière à travers une paire de prismes, généralement en silice [50, 51, 52]. Pour accentuer la dispersion du matériau, l'une des faces du prisme est usinée pour former un réseau de diffraction. Ce composant permet de disperser les différentes longueurs d'onde, tout en maintenant la direction centrale du faisceau non déviée. Plus compact et moins sujet aux pertes que les réseaux de diffraction seuls, ce système est particulièrement adapté aux systèmes nécessitant une bonne conservation de l'alignement optique. Il permet également de compenser la dispersion du second et troisième ordre. Toutefois, cette méthode reste limitée à la compensation de faibles dispersions et peut introduire des aberrations spatiales (faisceau elliptique) qu'il convient de corriger.

(a)



(b)



(c)

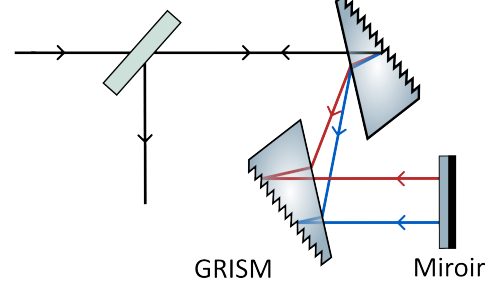


FIGURE 1.15 – Représentation schématisée des principales méthodes de pré-compensation de la dispersion utilisées en micro-endoscopie multiphotonique : (a) Fibre à dispersion compensée, (b) système à paire de réseaux de diffraction et (c) compresseur à GRISM.

Malgré leur efficacité, ces systèmes de pré-compensation restent encombrants, sensibles à l'alignement, et peu adaptés aux contraintes de l'imagerie endoscopique multiphotonique. Pour s'affranchir de ces systèmes, de nouvelles fibres optiques ont été développées, capables de préserver la durée des impulsions sans introduire d'effets non linéaires.

b) Fibres micro-structurées à cœur creux

Les fibres micro-structurées, également appelées fibres à cristal photonique (PCF), ont été introduites dans les années 1990 par P. St. J. Russel et son équipe [53, 54, 55]. Contrairement aux fibres à saut d'indice, les PCF utilisent une structuration périodique de la gaine autour du cœur pour guider la lumière, par réflexion totale interne modifiée [56]. La Figure 1.16 présente différentes configurations de fibres micro-structurées.

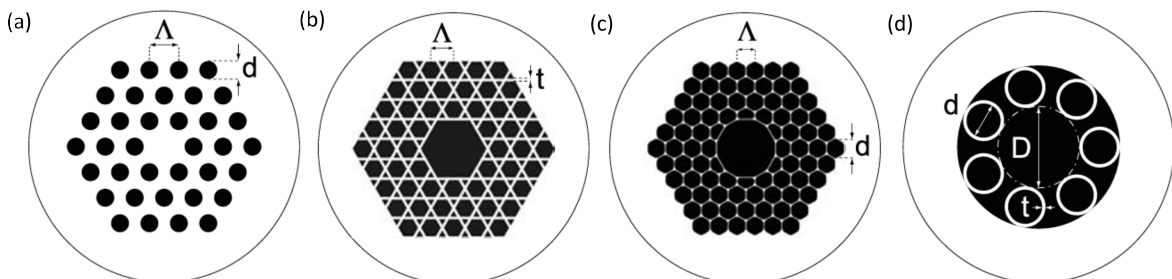
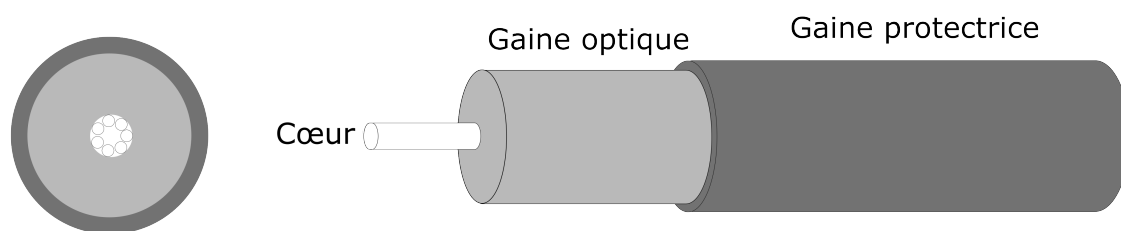


FIGURE 1.16 – Représentation schématisée de différentes structures de fibres micro-structurées. Les régions noires correspondent aux régions remplies d'air, les régions blanches à la silice pure, et les régions grises à la silice dopée. Fibres micro-structurées à cœur à haut indice (a), fibres à cœur creux de type Kagomé (b), à bandes interdites (c) et à courbure négative (d). Adapté de [57].

L'un des avantages majeurs de cette architecture est qu'elle permet le guidage de la lumière dans un cœur d'indice de réfraction plus faible, grâce à des mécanismes alternatifs à la réflexion totale interne ou à la réflexion interne modifiée. En 1998, P. St. J. Russel introduit la première fibre à cristal photonique à cœur creux [58]. Dans cette architecture, la lumière est confinée dans un cœur rempli d'air, ce qui permet de propager des impulsions laser de forte puissance sans effets non linéaires indésirables et sans risque d'endommagement du matériau, grâce au seuil de dommage plus élevé de l'air par rapport à celui de la silice [59, 60]. Depuis, plusieurs catégories de fibres micro-structurées à cœur creux ont été développées, classées selon leur mécanisme de guidage : guidage par bande interdite photonique [61, 62] ou par couplage anti-résonant [63]. Ces principes seront décrits dans le Chapitre 2.

Les fibres privilégiées en endoscopie multiphotonique sont les fibres à cœur creux et à courbure négative (NCHCF) [64]. Leur structure repose sur un cœur creux rempli d'air, entouré d'un arrangement de capillaires en silice, comme représenté sur la Figure 1.17 a. Les bandes de transmission de la fibre sont déterminées par l'épaisseur des capillaires. Leur largeur importante les rend particulièrement adaptées à l'imagerie multiphotonique, qui requiert plusieurs longueurs d'onde d'excitation. La dispersion de groupe de la fibre, éga-

(a)



(b)

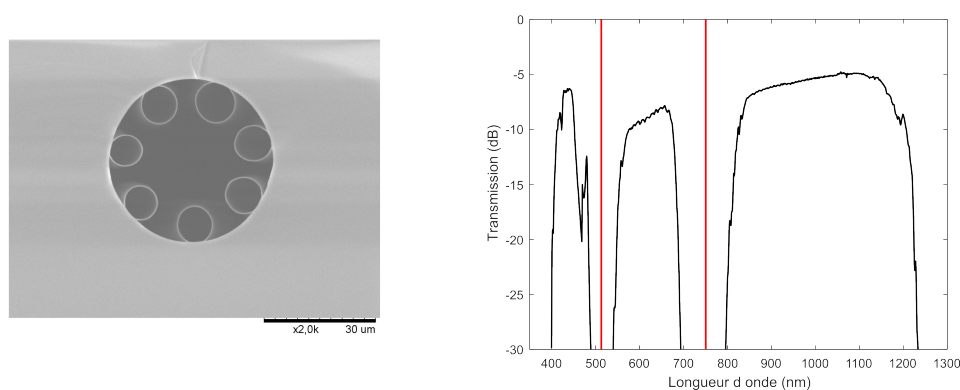


FIGURE 1.17 – (a) Schéma de l'architecture interne d'une fibre à cœur creux et à courbure négative. (b) Image MEB d'une NCHCF à 7 capillaires (à gauche), accompagnée de son spectre de transmission et de dispersion (à droite).

lement fixée par l'épaisseur des capillaires, reste très faible sur l'ensemble du spectre de transmission. Enfin, les pertes de la fibre dépendent de sa géométrie. La Figure 1.17 b présente une photo d'une fibre NCHCF à 7 capillaires, prise au microscope électronique à balayage (MEB), accompagnée de son spectre de transmission typique, mettant en évidence la présence de plusieurs bandes de transmission.

1.3.2 Systèmes de balayage et optiques miniaturisés

Pour balayer le faisceau laser sur l'échantillon et reconstruire une image, un dispositif de balayage miniaturisé est positionné à l'extrémité distale de la fibre optique. Ce dispositif, associé à des optiques compactes, est encapsulé dans un tube biocompatible constituant la tête endoscopique. Les technologies de balayage les plus répandues en endoscopie sont les miroirs à systèmes micro-électromécaniques rapides (MEMS) et les tubes piézoélectriques doublement résonants.

a) Miroirs MEMS

Un miroir MEMS [65] est un miroir miniature monté sur un support rotatif motorisé bidimensionnel. Les moteurs peuvent être programmés pour déplacer rapidement le point focal dans le plan de l'échantillon, avec des fréquences de balayage typiques comprises entre 1 et 10 kHz. Ce système, illustré sur la figure 1.18, permet d'obtenir un champ de vue carré de quelques dizaines à plusieurs centaines de micromètres. Associé à des optiques miniaturisées, il est principalement utilisé dans les sondes microscopiques compactes [66], et sa taille varie généralement entre 1 et 3 mm.

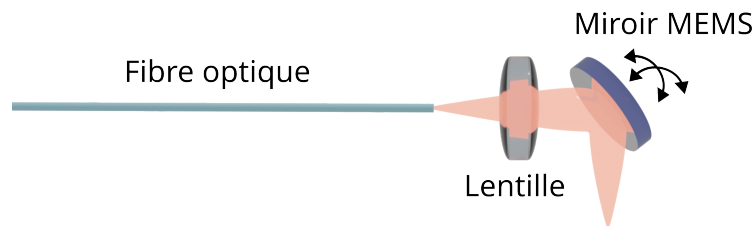


FIGURE 1.18 – Schéma d'un système MEMS à balayage rapide placé en sortie de fibre optique.

b) Tubes piézoélectriques doublement résonants

Une autre approche consiste à utiliser un tube piézoélectrique doublement résonant, placé autour de la fibre optique. Lorsqu'une tension électrique est appliquée à ses électrodes, le tube se déforme mécaniquement : il peut se dilater, se contracter ou se courber selon l'orientation des électrodes et du signal appliqué. En micro-endoscopie, cette déformation est exploitée pour déplacer l'extrémité distale de la fibre optique et balayer le faisceau laser sur l'échantillon [67, 11, 10]. En excitant le tube à la fréquence de résonance de la fibre [68], l'amplitude de déflexion est maximisée pour une faible tension appliquée. Ce mécanisme, présenté sur la Figure 1.19, permet de couvrir un champ de vue circulaire de plusieurs centaines de micromètres. Les systèmes piézoélectriques peuvent être très compacts, avec un diamètre de l'ordre du millimètre et atteindre jusqu'à 10 images par seconde, ce qui les rend particulièrement adaptés à l'imagerie rapide.

Outre ces dispositifs, d'autres solutions miniaturisées existent pour le balayage et la reconstruction d'images, telles que le **codage spectral** [69, 70] ou encore les **endoscopes lensless**, dits "sans lentilles" [71, 72]. Cette dernière approche ne nécessite ni optiques ni mécanismes de balayage à l'extrémité distale. L'image est reconstruite numériquement à

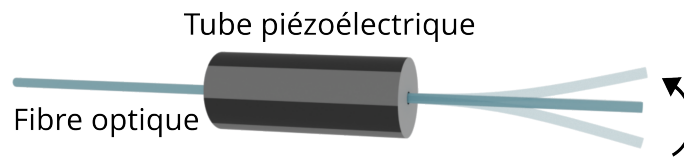


FIGURE 1.19 – Schéma d'un tube piézoélectrique doublement résonant dédié à l'imagerie endoscopique.

partir des signaux transmis par une fibre multicœur. Le front d'onde d'entrée est modulé à l'aide d'un modulateur spatial de lumière (SLM) ou de miroirs déformables. Chaque motif lumineux émis en sortie de fibre sonde une portion différente de l'échantillon, et des algorithmes permettent ensuite de reconstruire l'image. Leur diamètre très réduit (100-300 μm) et leur extrémité souple rendent ces sondes particulièrement intéressantes pour l'imagerie peu invasive, offrant des perspectives intéressantes pour des applications telles que l'imagerie cérébrale.

1.3.3 Collection du signal non linéaire

Le signal non linéaire généré par les tissus est collecté dans la direction contra-propagative par rapport au faisceau excitateur. La collection peut être réalisée soit par une fibre optique dédiée, soit *via* la même fibre utilisée pour l'acheminement des impulsions laser vers l'échantillon.

Dans la première configuration, une fibre collectrice est intégrée à la tête endoscopique pour transmettre directement le signal non linéaire vers la chaîne de détection. Bien que cette solution soit simple à mettre en œuvre, elle réduit la compacité du système, ce qui la rend peu adaptée à l'imagerie minimalement invasive.

Pour maintenir la compacité du système, des fibres à double gaine ont été développées. Le cœur central monomode transporte le faisceau excitateur, tandis qu'une gaine périphérique multimode assure la collecte du signal non linéaire rétro-diffusé par le tissu [73, 74]. Le guidage du signal dans la gaine est rendu possible par l'ajout d'une gaine externe en polymère d'indice de réfraction plus faible autour de la structure optique. Cette architecture, représentée sur la Figure 1.20 a, permet d'atteindre des ouvertures numériques élevées, typiquement de l'ordre de 0,4.

Une autre approche consiste à remplacer la gaine en polymère par une couronne d'air [75, 76, 77], créant un contraste d'indice plus important autour de la gaine multimode. Cette configuration, illustrée sur la Figure 1.20 b, permet d'atteindre une ouverture numérique encore plus élevée ($> 0,9$), à condition que l'épaisseur des capillaires entourant la gaine soit inférieure typiquement à la moitié de la longueur d'onde du signal [77]. Pour un signal compris entre 400 et 700 nm, cela implique des capillaires de moins de 200 nm d'épaisseur, rendant le procédé de fabrication beaucoup plus complexe.

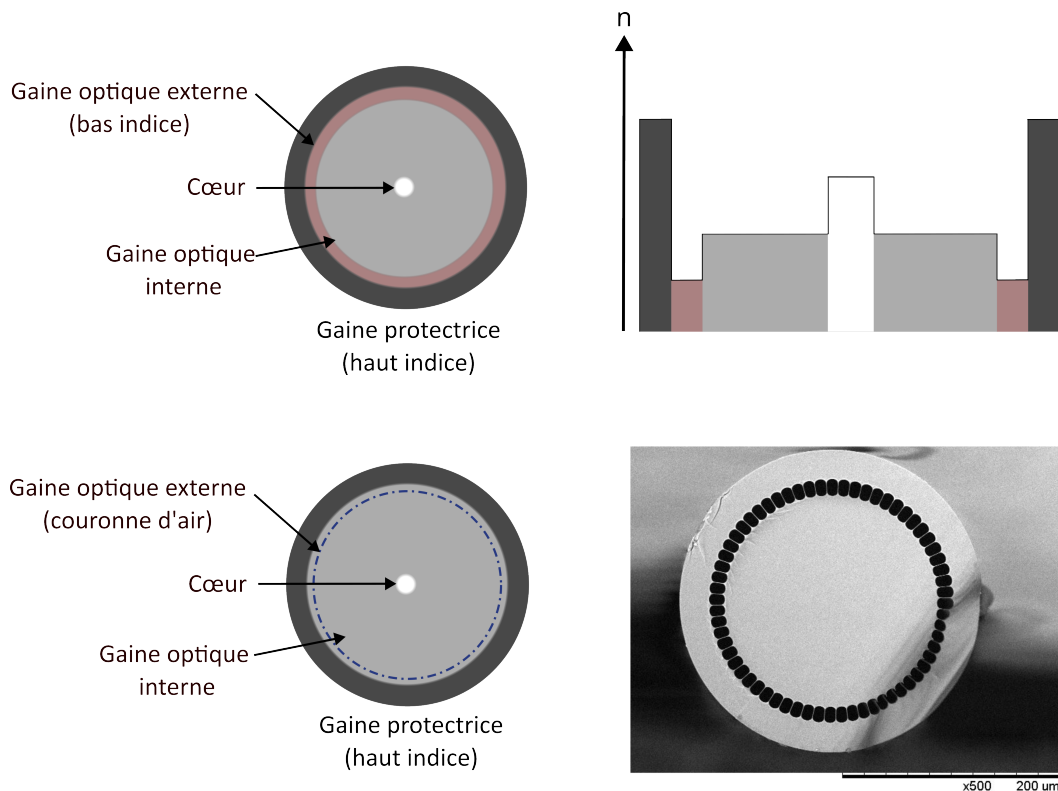


FIGURE 1.20 – Représentation schématique d’une fibre à double gaine. Le faisceau d’excitation est guidé dans le cœur monomode, tandis que la gaine multimode, entourée d’une couche de polymère de bas indice (a) ou d’une couronne d’air (b), collecte le signal non linéaire. Le profil d’indice (a) et une image MEB de la fibre (b) sont représentés à gauche de chaque schéma.

1.3.4 Micro-endoscopie à fibre creuse et balayage par fibre résonante

Les sondes endoscopiques développées au laboratoire, en collaboration avec la société Lightcore Technologies et la plateforme technologique FiberTech Lille, s’appuient sur une fibre NCHCF associée à un tube piézoélectrique doublement résonant. L’architecture interne de la sonde est présentée sur la Figure 1.21.

Les impulsions laser sont transportées jusqu’à l’échantillon à travers une NCHCF à double gaine [73]. L’extrémité distale est fonctionnalisée avec une fibre à gradient d’indice (GRIN) afin de réduire le diamètre du faisceau à la sortie et ainsi améliorer la résolution spatiale du système endoscopique. Cette fonctionnalisation sera détaillée au chapitre suivant. L’ensemble est encapsulé dans un tube piézoélectrique doublement résonant (Physik Instrumente) [78], assurant un balayage en spirale de l’échantillon sur plusieurs centaines de micromètres. Ce dispositif fibré est intégré dans un tube métallique et maintenu à celui-ci grâce à deux pièces en céramiques. Le point focal en sortie de fibre est ensuite imagé sur l’échantillon grâce à un micro-objectif GRIN ou un système à quatre lentilles [79], monté à l’extrémité du tube. Le signal non linéaire généré est collecté par la double gaine de la fibre.

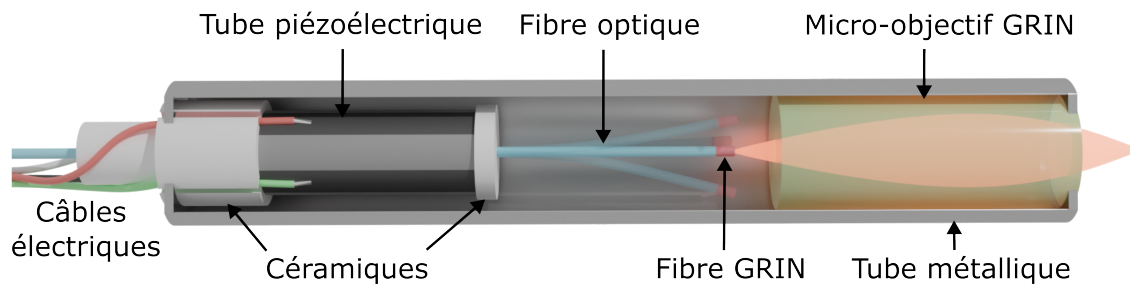


FIGURE 1.21 – Architecture interne de la tête endoscopique multiphotonique. Les impulsions lasers sont guidées à travers une fibre optique à cœur creux et à courbure négative. À l'extrémité distale, un micro-objectif GRIN focalise les impulsions sur l'échantillon. Le balayage est assuré par un tube piézoélectrique situé autour de la fibre optique fonctionnalisée. Adaptée de D. Septier [80]

Cette sonde endoscopique est utilisée pour faire de l'imagerie non linéaire 2PEF ou 3PEF [81, 82], ainsi que de l'imagerie CARS [83]. Ce système constitue l'état de l'art au début du projet doctoral au laboratoire [80].

1.3.5 Tentatives et défis de la micro-endoscopie par diffusion Raman stimulée

Contrairement au processus CARS, l'imagerie SRS demeure très peu développée en micro-endoscopie. L'une des limitations majeures réside dans la directionnalité du signal : le signal SRS modulé est émis dans la même direction que les faisceaux excitateurs, ce qui rend sa détection incompatible avec la plupart des architectures endoscopiques actuelles. Par conséquent, très peu d'endoscopes SRS ont été développés jusqu'à présent. L'un des rares exemples notables est celui présenté par Saar *et al.* en 2011 [12]. Son architecture repose sur l'intégration dans la tête endoscopique d'une photodiode percée en son centre, pour col-

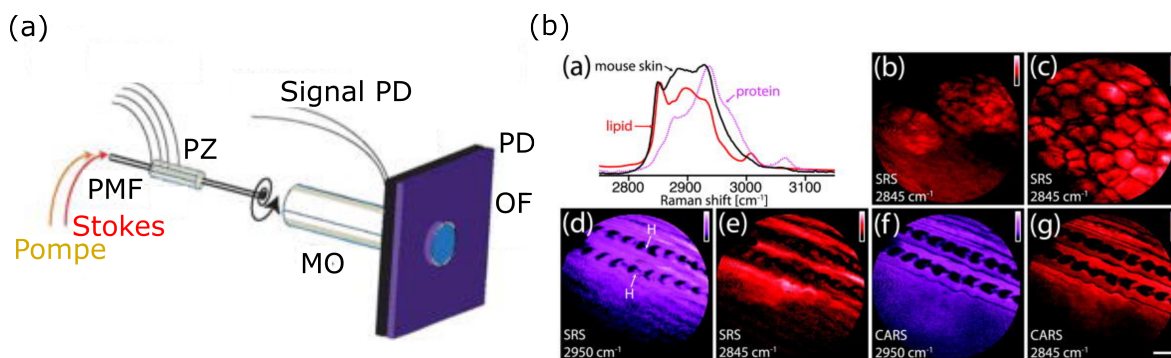


FIGURE 1.22 – (a) Vue détaillée de la sonde endoscopique SRS proposée dans la référence [12]. Une fibre monomode à maintien de polarisation (PMF) est insérée dans un tube piézoélectrique (PZ) contrôlé par quatre électrodes, assurant le balayage spatial des faisceaux. Les impulsions sont transmises vers un micro-objectif (MO) qui focalise les faisceaux sur l'échantillon. Les signaux sont collectés dans la direction contra-propagative, puis l'un des faisceaux est isolé à l'aide d'un filtre optique (OF) avant d'être détecté par une photodiode (PD). (b) Images endoscopiques SRS et CARS obtenues sur une peau de souris pour différentes profondeurs de pénétrations. Adapté de : Saar *et al.*, *Opt. Lett.*, 2011 [12]

lecter le signal SRS rétrodiffusé par l'échantillon. La Figure 1.22 a présente le schéma de la

tête endoscopique conçue. Bien que des images endoscopiques SRS aient été obtenues pour différentes fréquences de vibrations moléculaires (Figure 1.22 b), les auteurs soulignent l'importance de la taille de la photodiode dans ce système. Si l'on souhaite intégrer la détection directement dans la tête endoscopique et collecter uniquement le signal SRS rétrodiffusé, alors la photodiode doit posséder un rayon minimal de 5 mm. Cette configuration permet de collecter près de 75% du signal rétrodiffusé [84]. Cependant, un tel dispositif perd toute compacité, ce qui le rend inadapté à l'imagerie *in-vivo*. De plus, le signal rétrodiffusé est plus faible de plusieurs ordres de grandeur que le signal SRS généré.

L'objectif du projet de thèse est de surmonter ces limitations en développant une nouvelle sonde endoscopique capable de collecter efficacement le signal SRS dans la direction co-propagative. Cette nouvelle architecture permettra potentiellement la réalisation d'un bilan SRH *in-vivo*.

Conclusion

Les principales modalités non linéaires utilisées en microscopie ainsi que leurs propriétés ont été présentées dans ce chapitre. Les avancées récentes en histologie Raman ont mis en évidence l'intérêt d'intégrer la modalité d'imagerie SRS dans les sondes endoscopiques actuelles, afin de permettre un bilan histologique *in vivo*. Le projet de thèse s'inscrit dans cette perspective avec pour objectif de concevoir une nouvelle architecture endoscopique capable de collecter efficacement le signal SRS. Pour cela, les mécanismes de transmission, de balayage et de collecte présentés précédemment seront exploités et adaptés aux spécificités de l'imagerie SRS.

Chapitre II

Conception d'un micro-endoscope dédié à l'imagerie par diffusion Raman stimulée

Ce chapitre présente la conception d'un endoscope miniaturisé développé pour l'imagerie SRS. Contrairement aux micro-endoscopes multiphotoniques conventionnels, qui collectent le signal non linéaire dans la direction contra-propagative [82, 83, 80], la géométrie de la tête endoscopique a été modifiée pour permettre une détection en transmission, c'est-à-dire dans la même direction que la propagation des faisceaux. Cette configuration permet de collecter plus efficacement le signal SRS et ainsi d'améliorer le rapport signal sur bruit par rapport à une configuration en épi-collection.

Les sections suivantes présentent l'architecture globale de la tête endoscopique. Une fibre optique NCHCF a été conçue pour transporter les impulsions ultracourtes de pompe et de Stokes vers l'échantillon. L'extrémité distale de la fibre est intégrée dans un tube piézo-électrique doublement résonant, assurant le balayage des faisceaux laser sur l'échantillon. Deux micro-objectifs sont intégrés à la tête endoscopique : l'un dédié à la focalisation des impulsions sur l'échantillon, l'autre à la collecte du signal non linéaire. Enfin, les performances optiques de la sonde sont présentées.

2.1 Architecture de la tête endoscopique

Les dispositifs endoscopiques actuels, conçus pour une détection en configuration épi, sont particulièrement bien adaptés aux processus incohérents tels que la fluorescence multiphotonique, où le signal non linéaire est émis de manière isotrope. Pour les processus cohérents nécessitant un accord de phase, le signal collecté est plus faible dans cette configuration. Malgré cela, l'imagerie SHG, THG ou CARS reste possible à travers ces systèmes, car la quantité de signal rétrodiffusé suffit à former une image. En revanche, dans le processus SRS, le signal d'intérêt correspond à une très faible variation d'intensité des faisceaux laser incidents. La détection de cette modulation en configuration épi est difficilement mesurable. Pour intégrer cette modalité en endoscopie, la tête de la sonde a été modifiée afin d'inclure deux micro-objectifs : l'un dédié à la focalisation des impulsions sur l'échantillon et l'autre à la collection du signal SRS généré. L'architecture de la tête endoscopique est illustrée sur la Figure 2.1.

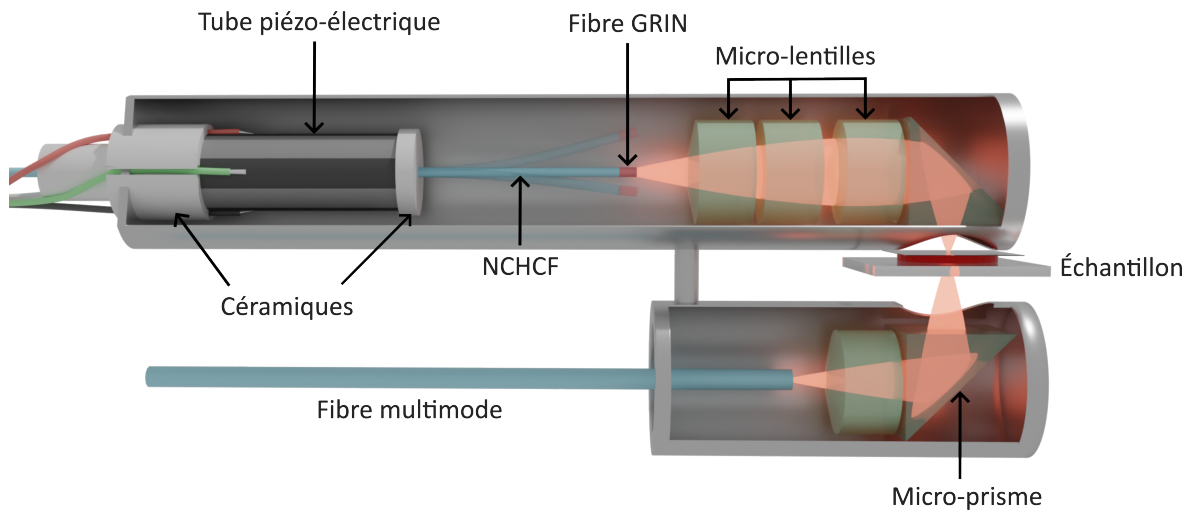


FIGURE 2.1 – Architecture interne de la tête endoscopique.

L'ensemble des éléments constituant le micro-endoscope est présenté dans les sections suivantes. Les impulsions de pompe et de Stokes sont transmises jusqu'à l'échantillon grâce à une fibre optique NCHCF représentée en bleu sur le schéma. L'extrémité distale de la fibre est fonctionnalisée avec une fibre à gradient d'indice, pour réduire la taille du mode de sortie et ainsi améliorer la résolution spatiale du micro-endoscope. L'ensemble est encapsulé dans un tube piézoélectrique doublement résonant, qui assure le balayage des faisceaux sur l'échantillon. Le point focal à la sortie de la fibre est imagé sur l'échantillon grâce à un premier micro-objectif, composé de micro-lentilles et d'un prisme à angle droit en silice, qui réfléchit les faisceaux incidents avec un angle de 90° . Le signal SRS généré est ensuite collecté par un second micro-objectif placé derrière l'échantillon. Ce dernier intègre un prisme identique au premier et une lentille. Le signal non linéaire est transmis à l'unité de détection grâce à une fibre fortement multimode. Les sections suivantes détaillent le développement et la fonctionnalisation de la fibre optique, ainsi que la conception des micro-objectifs.

2.2 Développement d'une fibre creuse à courbure négative

Les fibres optiques micro-structurées à cœur creux sont régulièrement utilisées en micro-endoscopie non linéaire pour le transport d'impulsions ultracourtes (femtoseconde ou picoseconde) à forte puissance crête (de l'ordre du kilowatt), en raison de leur capacité à limiter les effets non linéaires et la dispersion. On distingue deux grandes catégories de fibres, classées selon leur mécanisme de guidage : le guidage par bande interdite photonique (PBG) et le guidage par anti-résonance (AR).

2.2.1 Mécanisme de guidage dans les fibres à cœur creux

a) Guidage par bande photonique interdite

Les premières fibres micro-structurées à cœur creux exploitaient le mécanisme de guidage par bande photonique interdite pour confiner la lumière. Dans ces fibres, le mode spatial est confiné dans le cœur grâce au phénomène de bande photonique interdite induit par la structuration périodique 2D de la gaine [53]. Cette organisation permet de guider les impulsions laser dans un cœur dont l'indice de réfraction est inférieur à celui de la gaine environnante [58, 56]. Une image prise au microscope électronique à balayage d'une fibre PBG est présentée sur la Figure 2.2 a.

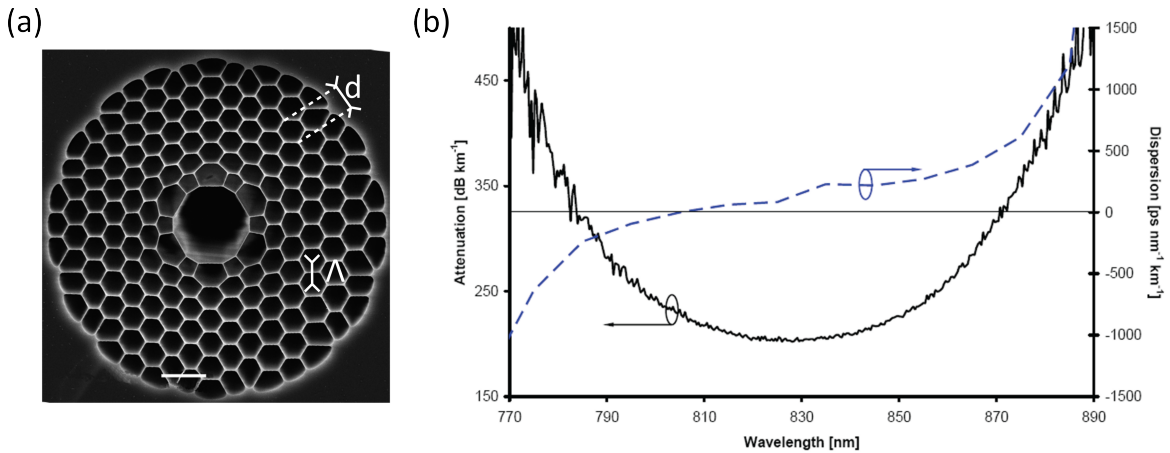


FIGURE 2.2 – (a) Image d'une fibre à cœur creux guidée par bande photonique interdite acquise au microscope électronique à balayage. Échelle : 10 µm. (b) Spectre d'atténuation (courbe noire) et de dispersion (courbe bleue) d'une fibre PBG de NKT Photonics (HC-800-01). Adapté de [85]

Ces fibres sont très adaptées au transport d'impulsions à forte puissance crête, car le cœur constitué d'air permet d'éviter les effets non linéaires au sein de la fibre. En revanche, leur dispersion chromatique reste comparable à celle des fibres à cœur solide (courbe bleue, Figure 2.2 b), ce qui les rend peu adaptées au transport d'impulsions ultracourtes (sub-picoseconde). Par ailleurs, leur bande de transmission, déterminée par la fraction d'air de la gaine $\frac{d}{\Lambda}$ [61], demeure relativement étroite (quelques centaines de nanomètres), ce qui limite leur utilisation pour l'imagerie multiphotonique nécessitant plusieurs longueurs d'onde d'excitation.

b) Guidage par anti-résonance

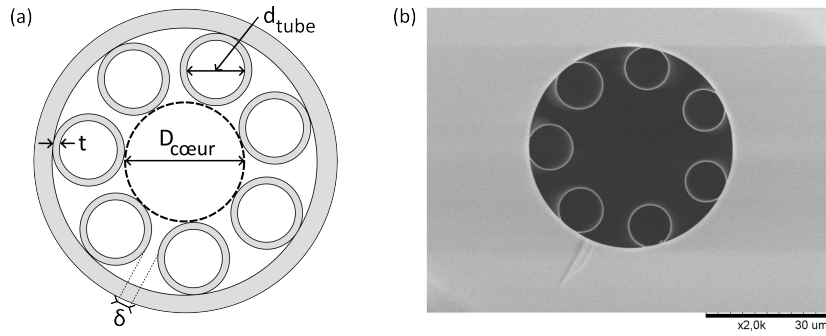


FIGURE 2.3 – Représentation schématique (a) et image acquise au microscope électronique à balayage (b) d'une fibre NCHCF.

Pour surmonter les limitations des fibres PBG, des fibres à cœur creux et à courbure négative (NCHCF) ont été développées. Ces fibres représentent une évolution des fibres Kagomé, offrant une meilleure transmission et une réduction des pertes [86, 87, 88]. Dans cette architecture, représentée sur la Figure 2.3, la gaine est constituée d'un unique anneau de capillaires entourant le cœur creux. Le diamètre du cœur $D_{cœur}$ peut être estimé à partir du diamètre externe des capillaires d_{tube} , de leur épaisseur t et du nombre total de capillaires N selon la relation :

$$D_{cœur} = \frac{d_{tube} + 2t}{\sin(\frac{\pi}{N})} - (d_{tube} + 2t) \quad (2.1)$$

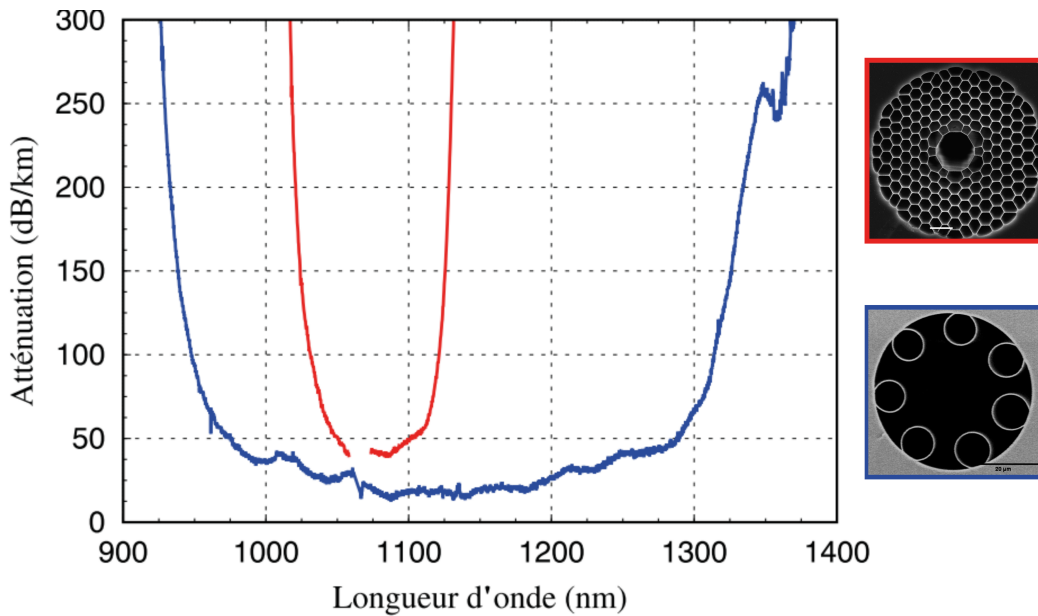


FIGURE 2.4 – Comparaison des spectres d'atténuation entre une fibre à couplage par anti-résonance (courbe bleue) et une fibre à guidage par bande photonique interdite (courbe rouge). Adapté de [57].

Ces fibres offrent une bande passante très large (jusqu'à 1000 nm contre 100 nm pour

les fibres à PBG), une dispersion beaucoup plus faible, tout en limitant les pertes et les effets non linéaires. La Figure 2.4 compare les spectres d'atténuation d'une fibre à guidage par anti-résonance (courbe bleue) et d'une fibre à guidage par bande photonique interdite (courbe rouge).

Le guidage dans le cœur creux repose sur une réflexion anti-résonante sur les parois des capillaires en silice. Pour illustrer ce mécanisme, un modèle simplifié à une dimension peut être utilisé, dans lequel chaque capillaire se comporte comme un guide d'onde plan composé de deux couches diélectriques [89]. Ce modèle est appelé modèle à guide d'ondes optique à réflexion anti-résonante (ARROW, "Anti-Resonant Reflecting Optical Waveguide"). Une représentation schématisée du guide d'onde plan est présentée sur la Figure 2.5. Les régions grisées correspondent aux capillaires en silice (n_1), tandis que la région centrale blanche correspond au cœur creux rempli d'air (n_0), avec $n_1 > n_0$.

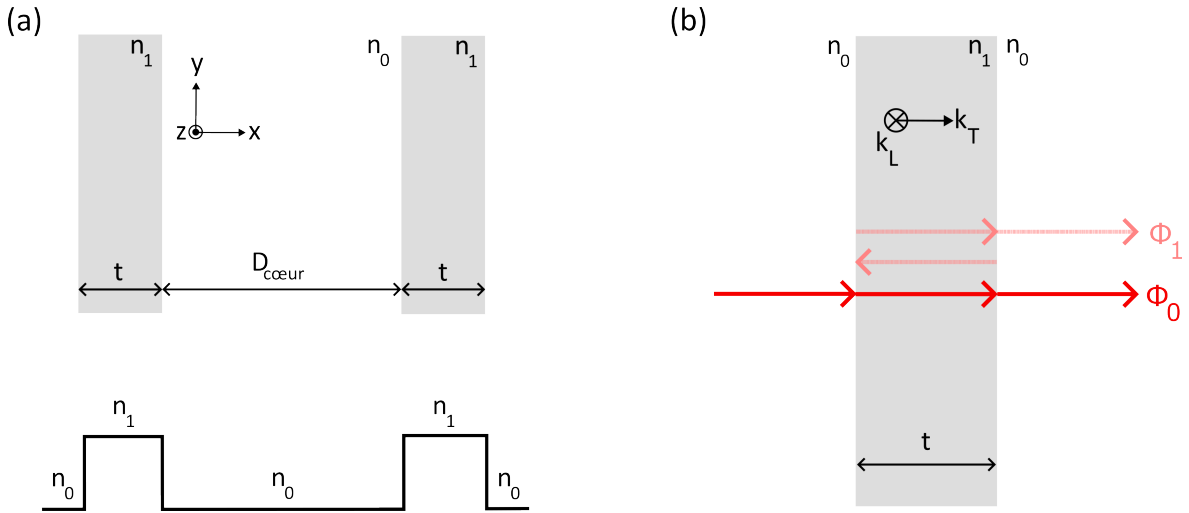


FIGURE 2.5 – (a) Modèle simplifié d'un guide d'onde plan représentant un capillaire avec son profil d'indice associé. (b) Schéma illustrant l'accumulation de phase entre une onde transmise directement (Φ_0) et une onde ayant subi une réflexion dans la paroi en silice (Φ_1).

Lorsque le diamètre du cœur $D_{\text{cœur}}$ est suffisamment important ($D_{\text{cœur}} \gg \lambda$), le vecteur d'onde longitudinal $\vec{k}_L$ peut être approximé par $n_0 k_0$ et le vecteur d'onde transversal par $k_0 \sqrt{n_1^2 - n_0^2}$, avec $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_0}$ le vecteur d'onde dans le vide. La différence de phase $\Delta\Phi$ entre l'onde transmise par le capillaire et celle réfléchie à l'intérieur de la paroi est donnée par :

$$\Delta\Phi = 2t \cdot k_0 \cdot \sqrt{n_1^2 - n_0^2} \quad (2.2)$$

Lorsque $\Delta\Phi = 2\pi m$, les ondes sont en phase et interfèrent de manière constructive. Ce phénomène définit le régime de résonance et l'entier $m \in \mathbb{N}^*$ détermine l'ordre de résonance. Dans ce cas, l'énergie est efficacement couplée à travers le capillaire vers la gaine, ce qui entraîne une augmentation des pertes de confinement dans la fibre. L'épaisseur des capillaires t et la longueur d'onde λ_R pour laquelle la résonance se produit sont reliées par la relation suivante :

$$\lambda_R = \frac{2t}{m} \cdot \sqrt{n_1^2 - n_0^2} \quad (2.3)$$

Lorsque $\Delta\Phi = (2m - 1)\pi$, les ondes sont en opposition de phase. Cette condition d'anti-résonance assure un confinement de la lumière dans le cœur creux. Les longueurs d'onde anti-résonantes λ_{AR} sont alors données par :

$$\lambda_{AR} = \frac{4t}{2m - 1} \cdot \sqrt{n_1^2 - n_0^2} \quad (2.4)$$

Dans cette vue simpliste, chaque capillaire se comporte alors comme un résonateur de Fabry-Pérot, ce qui se traduit par un spectre de transmission présentant plusieurs bandes distinctes. Lorsque l'épaisseur t des parois est correctement ajustée ($t > \lambda_0$) [90], le guidage par anti-résonance permet de confiner la lumière dans le cœur creux. Les positions des bandes de transmission sont indépendantes de la taille du cœur et dépendent uniquement de l'épaisseur t des capillaires et de leur indice de réfraction n_1 . La largeur des bandes est quant à elle inversement proportionnelle à t [91]. La Figure 2.6 présente un spectre de transmission d'une fibre NCHCF pour une épaisseur de capillaires de $t = 900$ nm, avec un diamètre de cœur de $D_{cœur} = 26$ μm . Les traits verticaux représentent les longueurs d'onde d'anti-résonance (vert) et de résonance (rouge).

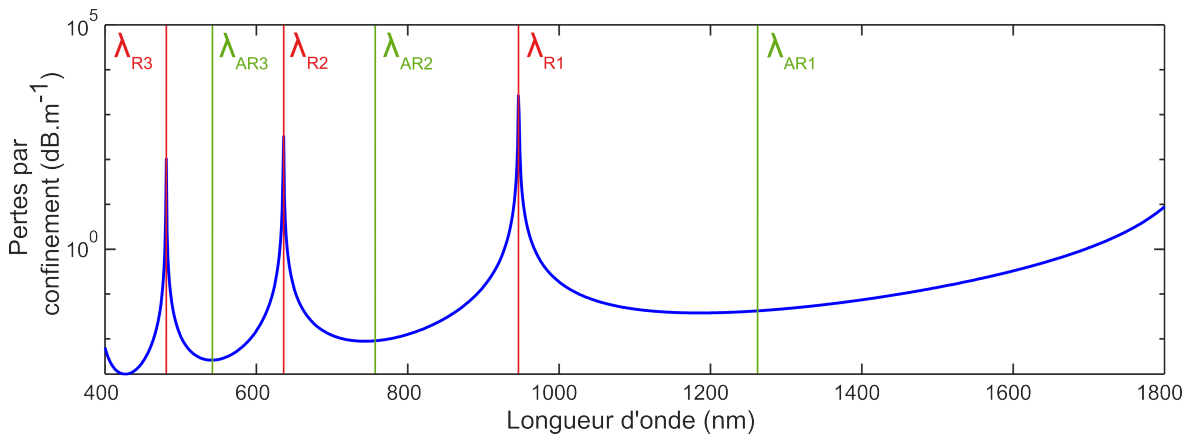


FIGURE 2.6 – Pertes par confinement simulées pour une fibre NCHCF ($t = 900$ nm, $D_{cœur} = 26$ μm) selon le modèle de Zeisberger [92].

Le guidage monomode peut être obtenu en ajustant le rapport $\frac{d_{tube}}{D_{cœur}}$ [93]. Les principales pertes dans les fibres anti-résonantes proviennent des pertes par confinement ou par fuite vers la gaine, et sont gouvernées par la géométrie de la fibre [63, 94]. Les pertes par confinement peuvent être réduites en utilisant des capillaires larges, séparés par une faible distance δ [95, 89], et diminuent lorsque le diamètre du cœur augmente. La dispersion chromatique dépend également de l'épaisseur des capillaires t [96].

En résumé, les fibres NCHCF possèdent une large bande passante, une très faible dispersion et de faibles pertes. Elles sont particulièrement adaptées au transport d'impulsions ultracourtes, ce qui les rend compatibles avec des systèmes endoscopiques. Dans le cadre de l'imagerie SRS, la largeur spectrale des bandes de transmission permet de propager simultanément les impulsions de pompe et de Stokes sans engendrer d'effets non linéaires.

Cette architecture sera exploitée pour concevoir un micro-endoscope dédié à cette modalité d'imagerie.

2.2.2 Propriétés de la fibre endoscopique

a) Conception de la fibre optique

La fibre endoscopique NCHCF repose sur une architecture composée de sept capillaires. Cette configuration permet d'obtenir une fibre quasiment monomode en pratique, tout en minimisant les pertes par courbure [63]. En microscopie SRS, les longueurs d'onde de pompe et de Stokes se situent généralement autour de 790 nm et 1024 nm. Pour assurer la transmission simultanée de ces deux impulsions, une approche consiste à centrer la bande de transmission sur une longueur d'onde intermédiaire, par exemple à 900 nm. À cette longueur d'onde d'anti-résonance, l'épaisseur des capillaires calculée à partir de l'équation 2.4, est de 214 nm. Une telle épaisseur est difficile à fabriquer sans introduire de fortes disparités entre les capillaires. Afin de simplifier la fabrication, l'épaisseur des capillaires a donc été fixée à 280 nm. Cette configuration garantit une bande de transmission supérieure à 594 nm, suffisante pour couvrir l'ensemble des longueurs d'onde d'excitation. Les spectres d'atténuation et de dispersion de la vitesse de groupe ont été calculés à l'aide du modèle semi-empirique de Zeisberger [92]. Les résultats sont présentés sur la Figure 2.7.

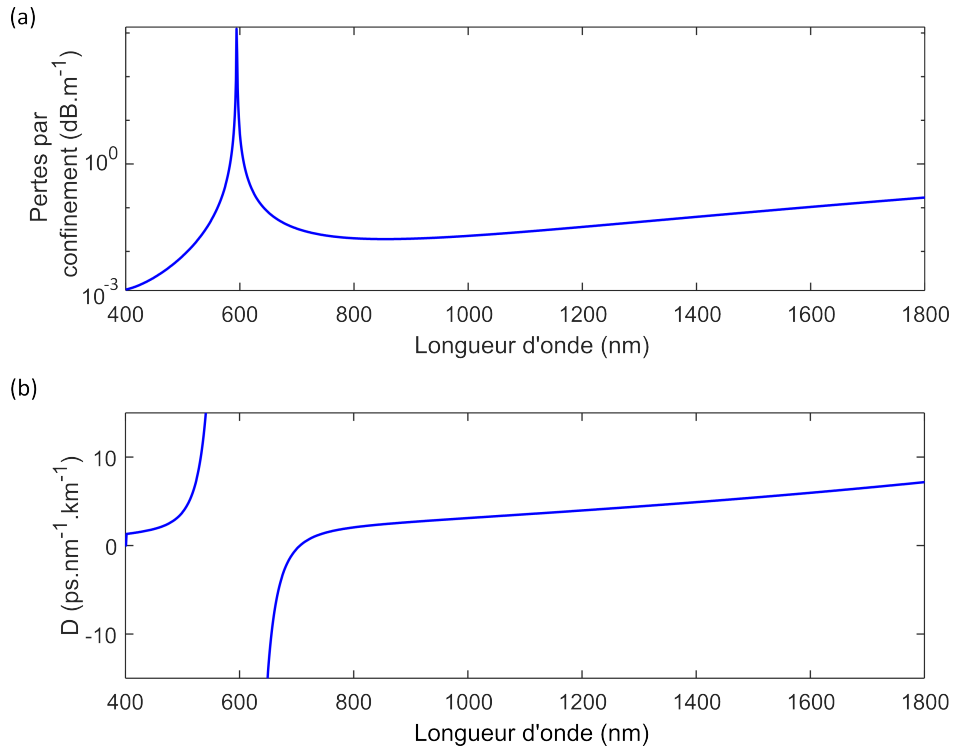


FIGURE 2.7 – (a) Simulations des pertes par confinement selon le modèle de Zeisberger [92] (a) et de la dispersion de vitesse de groupe (b) pour une épaisseur de capillaires de $t = 280$ nm.

Le diamètre du cœur a été fixé à $D_{\text{cœur}} = 26 \mu\text{m}$ afin de minimiser les pertes dans la fibre. Le spectre d'atténuation présente des pertes estimées à 20 dB.km^{-1} . La dispersion

de la fibre est comprise entre $-0,4 \text{ ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$ et $4,9 \text{ ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$ entre 700 et 1400 m. Cela représente une amélioration de près de deux ordres de grandeur par rapport à la dispersion des fibres à cœur solide ou PBG.

b) Fabrication de la fibre optique

La fibre optique a été fabriquée selon la méthode dite d'empilement et d'étirage (*stack and draw*) [97]. La Figure 2.8 montre une représentation schématique de la méthode d'empilement et d'étirage. Les capillaires en silice ont d'abord été conçus à partir d'un tube creux de quelques centimètres de diamètre externe. L'étirage du tube est réalisé en contrôlant la température du four, la vitesse et la tension de tirage, ce qui permet d'obtenir des capillaires d'environ 1 mètre de long, avec un diamètre externe de quelques millimètres. Les capillaires obtenus sont ensuite assemblés manuellement dans un tube creux de diamètre supérieur, jouant le rôle de gaine externe. Les capillaires sont maintenus à la surface interne du tube par soudure thermique [98, 99]. L'empilement est conçu de manière à former, au centre de la structure, une cavité creuse qui constituera le cœur de la fibre optique.

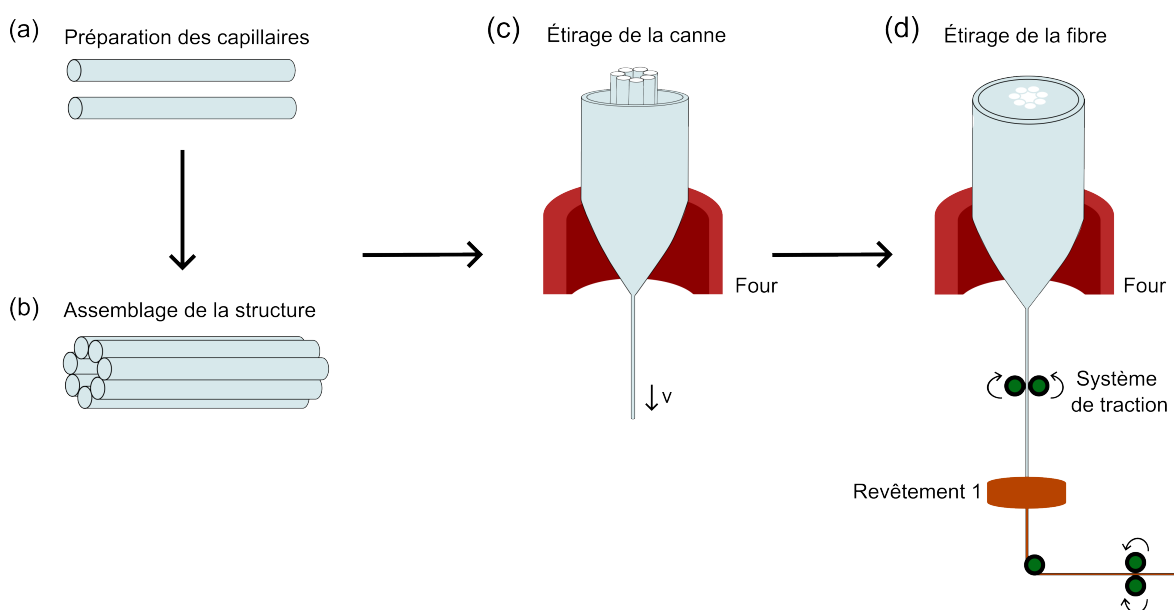


FIGURE 2.8 – Représentation schématique de la méthode d'empilement et d'étirage. (a) Préparation des capillaires en silice à partir d'un tube creux. (b) Assemblage des capillaires pour former la structure souhaitée. (c) Intégration de l'ensemble dans un tube creux en silice. (d) Étirement de la structure pour obtenir la fibre finale.

Une fois l'empilement finalisé, celui-ci est introduit dans un four à haute température pour être étiré. En général, ce processus s'effectue en deux étapes [100, 101] : l'empilement est d'abord réduit en canne (préforme intermédiaire de quelques millimètres de diamètre), puis la canne est insérée de nouveau dans un tube creux en silice, permettant d'augmenter le diamètre de la gaine de silice entourant le cœur de la fibre. L'ensemble est étiré une seconde fois pour produire la fibre dont le diamètre externe est typiquement inférieur à 400 μm . Le rapport entre la vitesse d'étirage de la fibre et la vitesse de descente de la préforme

dans le four détermine le diamètre de la fibre. Le diamètre et l'épaisseur des capillaires sont ajustés en contrôlant séparément la pression à l'intérieur du cœur et des capillaires creux. Une couche de polymère à indice élevé est ensuite ajoutée autour de la fibre pour renforcer la protection mécanique.

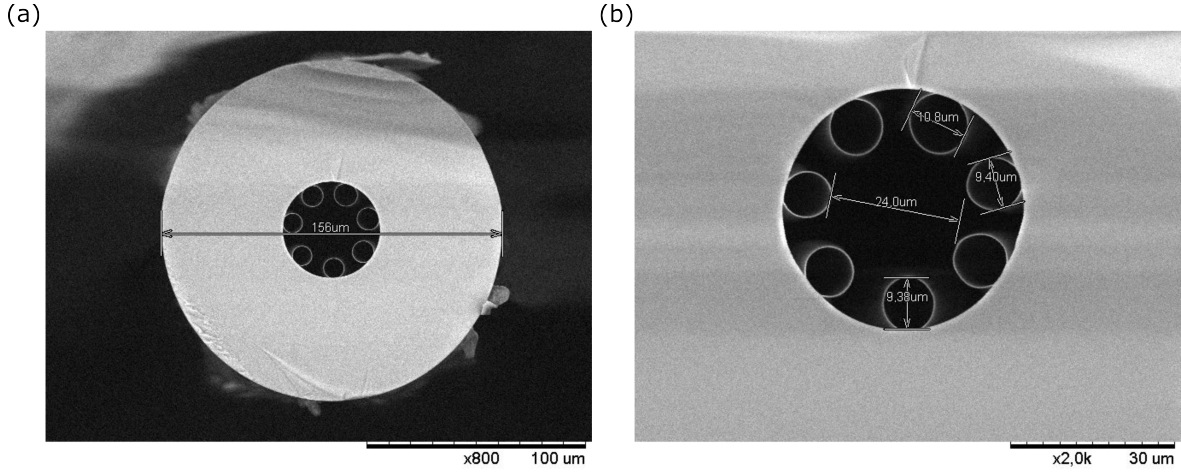


FIGURE 2.9 – Images obtenues par microscopie électronique à balayage de la fibre à cœur creux et à courbure négative développée.

La fibre fabriquée est présentée sur la Figure 2.9. Elle comporte sept capillaires et possède un diamètre de cœur $D_{cœur} = 24 \mu\text{m}$ pour un diamètre externe de $\varnothing_{ext} = 156 \mu\text{m}$. Le diamètre externe moyen des capillaires est de $d_{tube} = 9,86 \pm 0,94 \mu\text{m}$, leur épaisseur moyenne de $t = 288 \pm 38 \text{ nm}$, et l'écart entre chaque capillaire est de $\delta = 5,15 \pm 3 \mu\text{m}$.

c) Spectre de transmission

La transmission de la fibre optique a été mesurée en utilisant une source supercontinuum (YSL). La source a été injectée dans le cœur d'une fibre monomode ESM ("Endlessly Single-Mode") et son extrémité distale a été placée à quelques micromètres de distance de la fibre NCHCF. Cette méthode dite d'aboutage ("butt coupling") permet de s'assurer que seule la propagation dans le cœur de la fibre NCHCF est effective, en évitant d'exciter les modes des capillaires ou de la gaine. Pour le vérifier, la sortie de la fibre NCHCF a été imagée sur une caméra (SU320KTS, Goodrich) et l'injection a été optimisée pour maximiser la transmission. La sortie de la fibre a ensuite été insérée dans un analyseur de spectre (OSA, AQ-6315A, Ando) pour mesurer le spectre de transmission.

Le spectre d'atténuation a été obtenu à partir de la méthode du "cutback". Sans changer l'injection, un premier spectre de transmission a été obtenu pour une longueur $L_{long} = 75 \text{ cm}$. La fibre a ensuite été coupée et un second spectre de transmission a été mesuré pour une longueur $L_{court} = 32,5 \text{ cm}$. Le spectre d'atténuation α , présenté sur la Figure 2.10, a été calculé à partir de ces deux mesures selon la relation :

$$\alpha = \frac{10}{L_{long} - L_{court}} \cdot \log\left(\frac{P_{court}}{P_{long}}\right) \quad (2.5)$$

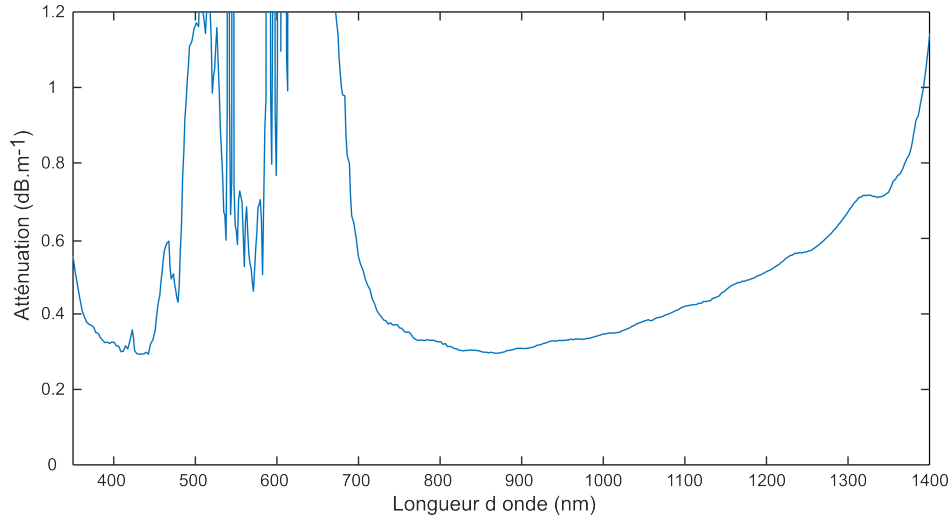


FIGURE 2.10 – Spectre d'atténuation mesuré de la fibre endoscopique.

La variation des épaisseurs des capillaires dans la fibre optique entraîne une réduction de la largeur de la bande de transmission, ainsi qu'un décalage vers les grandes longueurs d'onde du début de cette bande. Néanmoins, les longueurs d'onde de pompe et de Stokes sont transmissibles à travers la fibre, avec des pertes de l'ordre de $0,3 \text{ dB.m}^{-1}$.

d) Dispersion de vitesse de groupe

La dispersion de la fibre a été mesurée selon la méthode d'interférométrie à faible cohérence (Figure 2.11 a) [102]. Une source supercontinuum incohérente (YSL) est séparée en deux faisceaux par un miroir semi-réfléchissant, formant ainsi un interféromètre de Mach-Zehnder. Le premier faisceau sert de référence, tandis que le second est injecté dans la fibre optique à l'aide d'une lentille. Les deux faisceaux sont ensuite superposés spatialement à l'aide d'un miroir dichroïque avant d'être dirigés vers le détecteur. Une ligne à retard placée sur le trajet du faisceau de référence permet de synchroniser temporellement les impulsions issues des deux bras de l'interféromètre, générant ainsi la figure d'interférences.

La dispersion de la fibre est alors définie à partir de la position de la ligne à retard Δx , de la différence de longueur d'onde $\Delta \lambda$ et de la longueur L de la fibre :

$$D(\lambda) = \frac{2\Delta x}{\Delta \lambda} \frac{1}{cL} \quad (2.6)$$

avec $c \approx 3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$, la célérité de la lumière dans le vide et $L = 1 \text{ m}$, la longueur de fibre utilisée.

Les résultats obtenus pour la première bande de transmission de la fibre sont présentés sur la Figure 2.11 b. La dispersion mesurée est en accord avec les simulations précédentes, elle varie de $-5,8 \text{ ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$ à $5 \text{ ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$ entre 700 et 1400 nm.

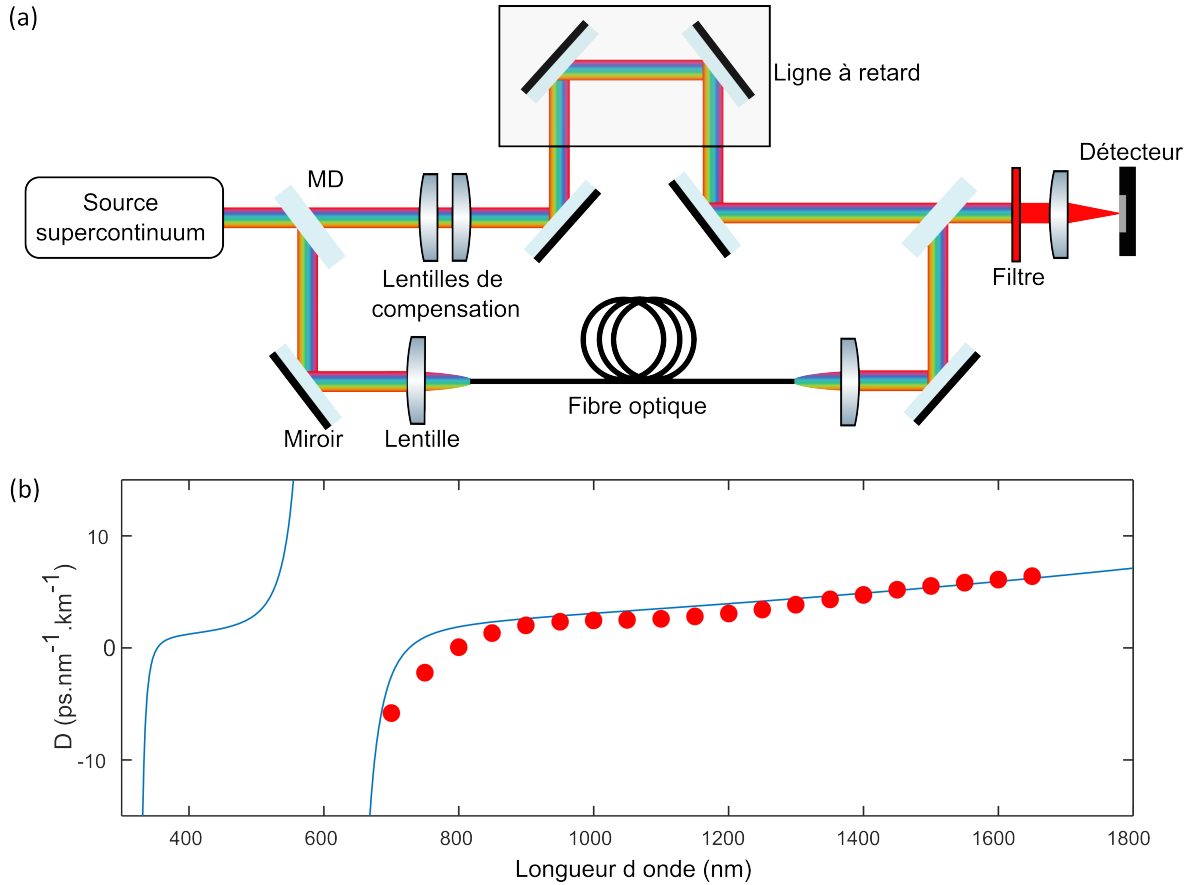


FIGURE 2.11 – (a) Schéma du montage expérimental utilisé pour mesurer la dispersion de vitesse de groupe de la fibre optique. (b) Comparaison entre la GVD mesurée (points rouges) et la GVD simulée (courbe bleue).

Pour vérifier la capacité de la fibre à transmettre des impulsions ultracourtes sans élargissement significatif, la durée d'impulsion des faisceaux de pompe ($\lambda_P = 760 \text{ nm}$) et de Stokes ($\lambda_S = 1000 \text{ nm}$) a été mesurée à l'entrée et à la sortie de la fibre. Les impulsions sont issues d'une source laser femtoseconde Ti : Sa (Chameleon, Coherent) pompant un oscillateur paramétrique optique (Chameleon compact OPO, Coherent). Les traces d'auto-corrélation, mesurées à l'aide d'un autocorrélateur (pulseCheck, APE), sont présentées sur la Figure 2.12. Les courbes en trait plein correspondent aux impulsions à l'entrée de la fibre, tandis que les courbes en pointillés présentent les impulsions à la sortie. La longueur de la fibre utilisée pour cette expérience est de 2,5 m.

Les durées mesurées en sortie de fibre optique, obtenues par un ajustement gaussien, sont de 205 fs pour le faisceau de pompe et de 321 fs pour le faisceau de Stokes. Ces écarts peuvent s'expliquer par un chirp résiduel des impulsions laser.

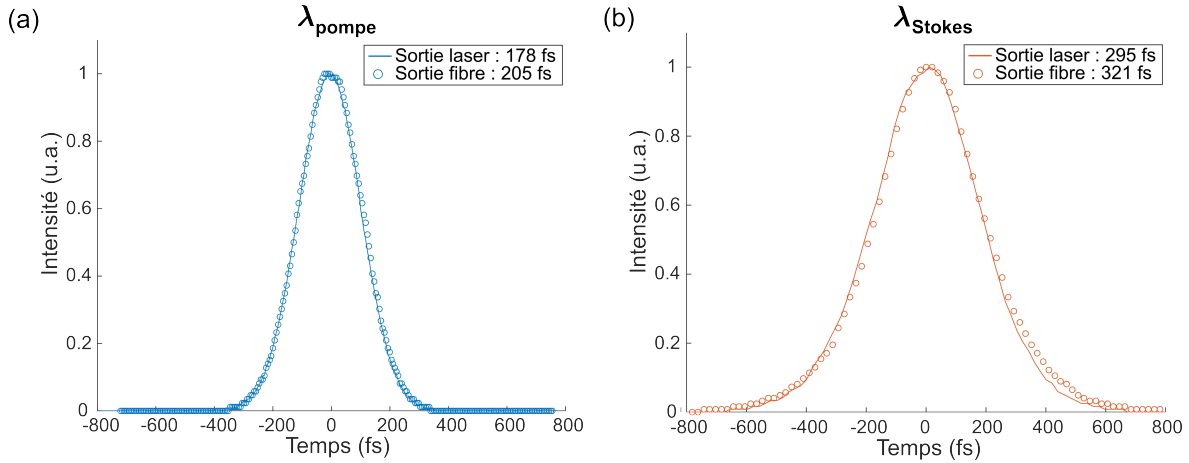


FIGURE 2.12 – Traces d'autocorrélation des impulsions mesurées à l'entrée (trait plein) et à la sortie (pointillé) de la fibre optique, pour les impulsions de (a) pompe ($\lambda_P = 760$ nm) et de Stokes ($\lambda_S = 1000$ nm).

e) Mode fondamental

La taille du mode fondamental en sortie de fibre optique a été mesurée à l'aide du montage expérimental présenté sur la Figure 2.13 a. Les impulsions de pompe ($\lambda_P = 760$ nm) et de Stokes ($\lambda_S = 1000$ nm), générées par une source laser femtoseconde (Chameleon, Coherent), ont été injectées dans la fibre optique à l'aide d'une lentille de distance focale $f' = 25$ mm. En sortie, un objectif de microscope associé à une lentille "tube" est utilisé pour collimater et focaliser les impulsions laser sur une caméra. La réponse observée sur la caméra correspond au mode fondamental de la fibre optique, à une longueur d'onde donnée. Le profil d'intensité mesuré a été ajusté à l'aide d'une fonction gaussienne :

$$G(x) = A \cdot \exp\left(-\frac{(x - x_0)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (2.7)$$

où A est l'intensité maximale, x_0 la position centrale et σ l'écart-type. Le diamètre du mode fondamental (MFD) à $\frac{I_{max}}{e^2}$ et à mi-hauteur (FWHM) sont alors définis comme :

$$MFD = 4\sigma \cdot \frac{d_p}{G} \quad (2.8)$$

$$\varnothing_{FWHM} = 2 \cdot \sqrt{2\ln(2)} \cdot \sigma \cdot \frac{d_p}{G} \quad (2.9)$$

où d_p est la taille des pixels de la caméra et G est le grandissement du système optique.

La Figure 2.13 b présente le profil spatial du mode fondamental observé sur la caméra. En extrayant le profil d'intensité le long de l'axe représenté en pointillé, les tailles des modes des faisceaux de pompe et de Stokes peuvent être déterminées. Ces profils d'intensité, centrés et normalisés, sont présentés sur la Figure 2.13 c pour les longueurs d'onde de pompe (courbe bleue) et de Stokes (courbe orange). Le MFD, déterminé par ajustement gaussien, est de $19,5 \mu\text{m}$ pour le faisceau de pompe et de $18,6 \mu\text{m}$ pour le faisceau de Stokes.

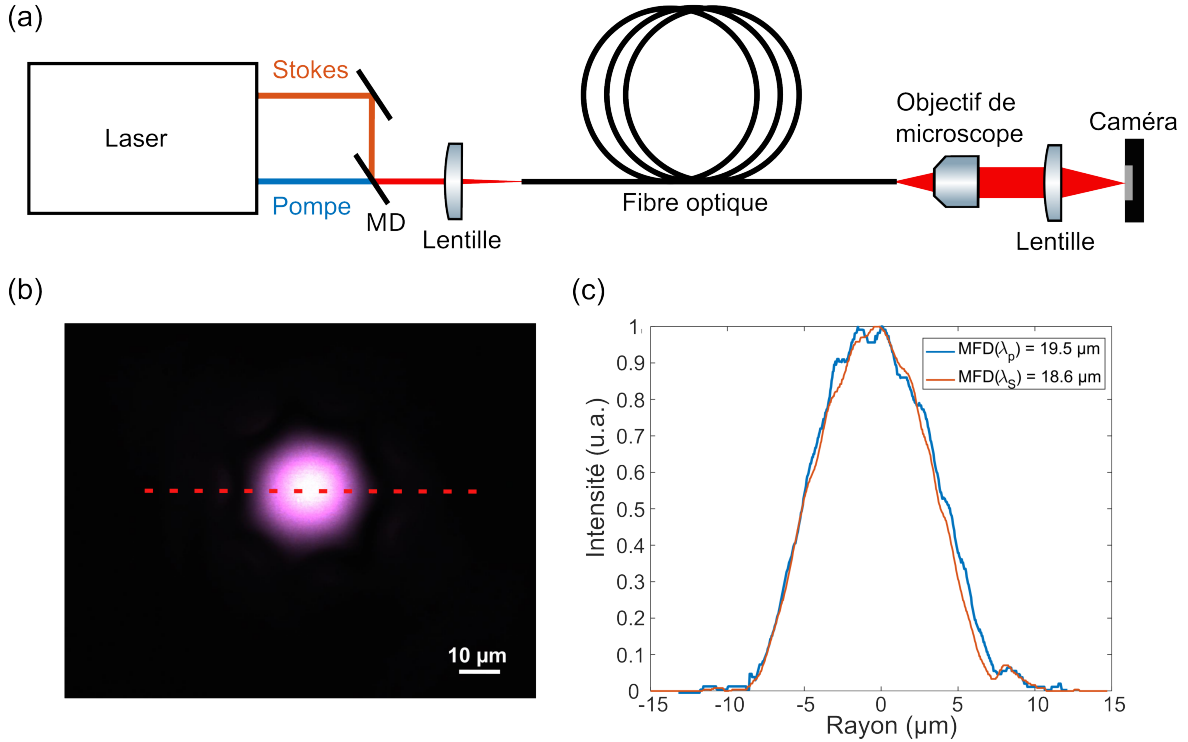


FIGURE 2.13 – (a) Montage expérimental utilisé pour mesurer la taille du mode en sortie de fibre optique. (b) Profil spatial du mode fondamental observé sur la caméra. (c) Diamètre du mode mesuré pour les faisceaux de pompe et de Stokes.

Dans un dispositif d'imagerie, la taille du faisceau excitateur au point focal est désignée sous le nom de fonction d'étalement du point (PSF) et correspond au diamètre à mi-hauteur $\varnothing_{FWHM}$. Comme la fibre a été conçue pour l'imagerie endoscopique, seule cette grandeur sera considérée dans la suite des travaux. Cela correspond à diamètres à mi-hauteur de 11,48 μm et de 10,95 μm pour les faisceaux de pompe et de Stokes, respectivement.

f) Ouverture numérique

L'ouverture numérique d'une fibre optique définit l'angle maximal sous lequel la lumière incidente peut être guidée dans le cœur. En sortie de fibre, elle se traduit par la divergence du faisceau émergent. Pour déterminer l'ouverture numérique à la sortie de la fibre, une caméra est placée dans l'axe de propagation, à proximité de la sortie de fibre. La caméra est ensuite translatée progressivement le long de cet axe afin de mesurer la taille du faisceau pour différentes distances de propagation dans l'air. Le montage expérimental est présenté sur la Figure 2.14 a.

Lorsque la distance augmente, le diamètre du faisceau croît linéairement : cette expansion traduit la divergence du mode guidé. En ajustant les données mesurées par une régression linéaire, la pente obtenue fournit directement l'ouverture numérique, car celle-ci est suffisamment faible pour considérer que $\tan(\theta) \approx \sin(\theta) \approx \theta$. La Figure 2.14 b présente les résultats pour les deux longueurs d'onde : la courbe bleue correspond au faisceau de

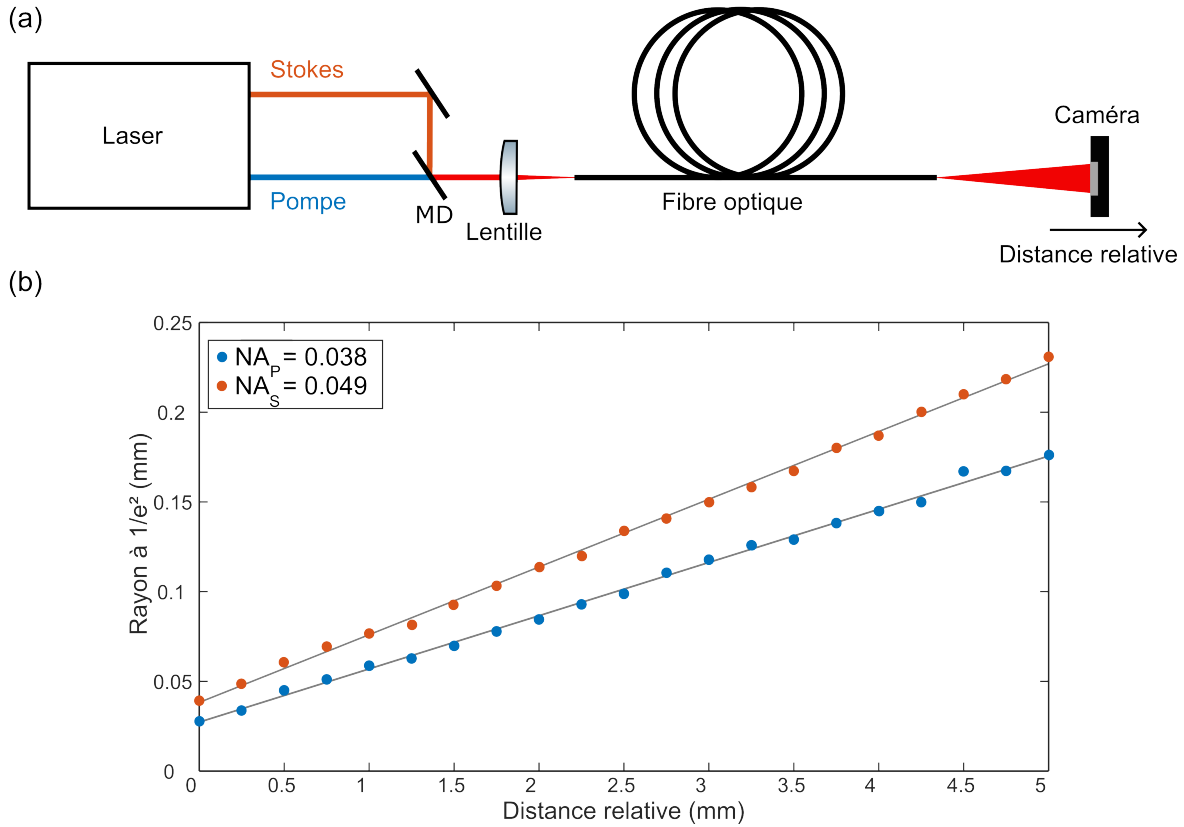


FIGURE 2.14 – (a) Montage expérimental utilisé pour mesurer l'ouverture numérique de la fibre optique. (b) Rayon du mode mesuré à $1/e^2$ du faisceau en fonction de la distance, pour les faisceaux de pompe (courbe bleue) et de Stokes (courbe rouge).

pompe ($\lambda_P = 760$ nm) et la courbe orange au faisceau de Stokes ($\lambda_S = 1000$ nm). Les ouvertures numériques mesurées sont inférieures à 0,05, ce qui devra être pris en compte pour optimiser l'injection des faisceaux laser dans le cœur.

2.3 Fonctionnalisation de la fibre optique

La fibre NCHCF développée précédemment présente des caractéristiques bien adaptées à l'imagerie SRS. Sa large bande de transmission permet d'acheminer simultanément les impulsions de pompe et de Stokes jusqu'à l'échantillon, tout en maintenant une faible dispersion et en évitant l'apparition d'effets non linéaires lors de la propagation. Néanmoins, la taille importante du mode en sortie de la fibre constitue un facteur limitant pour la résolution spatiale du système d'imagerie. Pour visualiser des structures subcellulaires telles que les noyaux, dont la dimension typique est de l'ordre de quelques micromètres, la PSF doit être la plus faible possible. Cependant, la fibre endoscopique présente un $\varnothing_{FWHM}$ d'environ 11 μm aux longueurs d'onde de travail. Il est donc nécessaire de réduire significativement la taille du mode en sortie de la fibre afin d'améliorer la résolution spatiale.

Deux approches principales peuvent être envisagées. La première consiste à insérer une micro-bille de silice à l'intérieur du cœur creux de la fibre. Le faisceau laser incident, provenant de la fibre optique, est focalisé en générant un nanojet photonique [103, 104].

Cette technique permet d'obtenir des PSF de l'ordre de 1 μm lorsque la taille du faisceau incident avoisine les 20 μm [80, 83]. Cependant, la bille de silice a tendance à déformer les capillaires voisins et des impuretés peuvent se loger dans les structures remplies d'air de la fibre, ainsi que de l'humidité. De plus, celle-ci a tendance à se détacher lors du scan de l'échantillon. Une autre approche consiste à souder une portion de fibre à gradient d'indice (GRIN) à l'extrémité distale de la fibre NCHCF. Cette solution sera intégrée au dispositif endoscopique et détaillée dans les sections suivantes.

2.3.1 Propriétés des fibres à gradient d'indice

Les fibres GRIN possèdent la particularité de se comporter comme une lentille lorsque leur longueur est correctement ajustée, en raison du phénomène d'auto-imagerie spatiale (*Spatial Self-Imaging*, SSI).

Contrairement aux fibres à saut d'indice, les fibres GRIN présentent un profil d'indice parabolique : l'indice de réfraction est maximal au centre du cœur et décroît progressivement vers la périphérie. Ce profil est défini par :

$$n(r) = \begin{cases} n_c - (n_c - n_g) \cdot \left(\frac{r}{r_c}\right)^2 & \text{si } r \leq r_c \\ n_g & \text{si } r > r_c \end{cases} \quad (2.10)$$

avec n_c et n_g les indices de réfraction du cœur et de la gaine, respectivement, et r_c le rayon du cœur de la fibre GRIN.

Cette variation parabolique assure que les modes guidés dans la fibre aient des constantes de propagation β équidistantes. Ainsi, tous les modes se retrouvent périodiquement en phase le long de la fibre [105]. Cette distance caractéristique entre deux focalisations successives est appelée la période d'auto-imagerie spatiale, notée z_{SSI} [106]. Elle dépend du rayon du cœur r_c de la fibre GRIN, ainsi que des indices de réfraction du cœur n_c et de la gaine n_g , selon la relation suivante [107] :

$$z_{SSI} = \pi r_c \cdot \sqrt{\frac{n_c^2}{n_c^2 - n_g^2}} \quad (2.11)$$

Le profil d'intensité du champ lumineux d'entrée est ainsi reproduit périodiquement tout au long de la propagation. Une simulation (Figure 2.15), fondée sur le modèle présenté dans [108], permet d'illustrer ce comportement. Le profil 2D de l'intensité est représenté en fonction de la distance de propagation z à $\lambda = 1000 \text{ nm}$.

Les indices de réfraction ont été fixés à $n_c = 1,4815$ et $n_g = 1,4515$, ce qui correspond à une préforme dopée au germanium disponible dans le commerce. Le diamètre de mode d'entrée a été défini à $\varnothing_{FWHM} = 10,95 \mu\text{m}$, valeur mesurée pour le faisceau de Stokes à la sortie de la fibre NCHCF. Pour ce diamètre de mode, le rayon de cœur optimal de la fibre

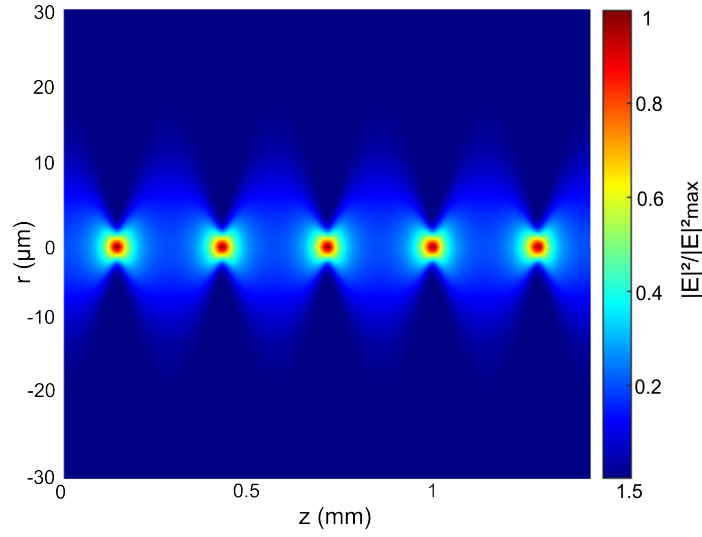


FIGURE 2.15 – Simulation numérique du profil d'intensité en fonction de la distance de propagation dans la fibre GRIN, basée sur le modèle présenté dans [108].

GRIN a été estimé à $r_c = 17,5 \mu\text{m}$. Cette valeur a été déterminée à partir de simulations numériques s'appuyant sur le même modèle que celui décrit dans la référence [108].

Avec ces paramètres, la fibre GRIN possède une période d'auto-imagerie spatiale de $z_{SSI} = 274,6 \mu\text{m}$. En ajustant la longueur de la fibre GRIN, il est alors possible de contrôler le diamètre du mode en sortie et la position du point focal à l'extrémité de la fibre. La Figure 2.16 a présente l'évolution de la distance entre le point focal et l'extrémité de la fibre GRIN Δz , pour des longueurs inférieures ou égales à la moitié de la période d'auto-imagerie. La Figure 2.16 b illustre quant à elle la variation de la largeur à mi-hauteur ϕ_{FWHM} du faisceau en sortie en fonction de la longueur L_{GRIN} de la fibre.

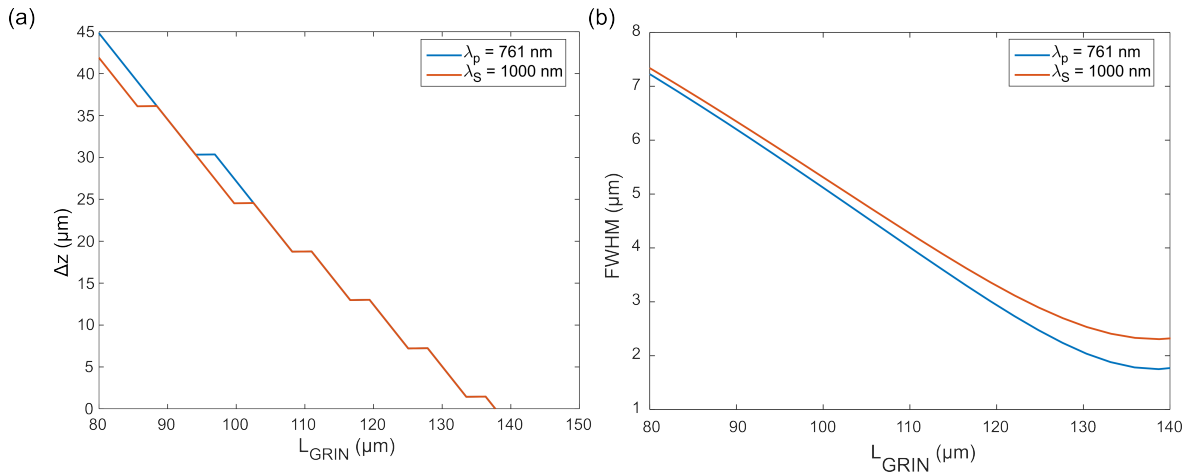


FIGURE 2.16 – (a) Distance entre le point focal à l'extrémité de la fibre GRIN et (b) largeur à mi-hauteur (FWHM) du faisceau en sortie, en fonction de la longueur L_{GRIN} , pour les longueurs d'onde de pompe (bleu) et de Stokes (orange).

Ces résultats montrent que la taille de mode minimale est obtenue lorsque la longueur de la fibre GRIN, L_{GRIN} , est égale à la moitié de la période d'auto-imagerie z_{SSI} . Dans cette

configuration, les faisceaux de pompe et de Stokes sont focalisés à l'extrémité distale de la fibre GRIN. La longueur de fibre GRIN sera donc fixée à $L_{GRIN} = 137,5 \mu\text{m}$ pour la suite de l'étude.

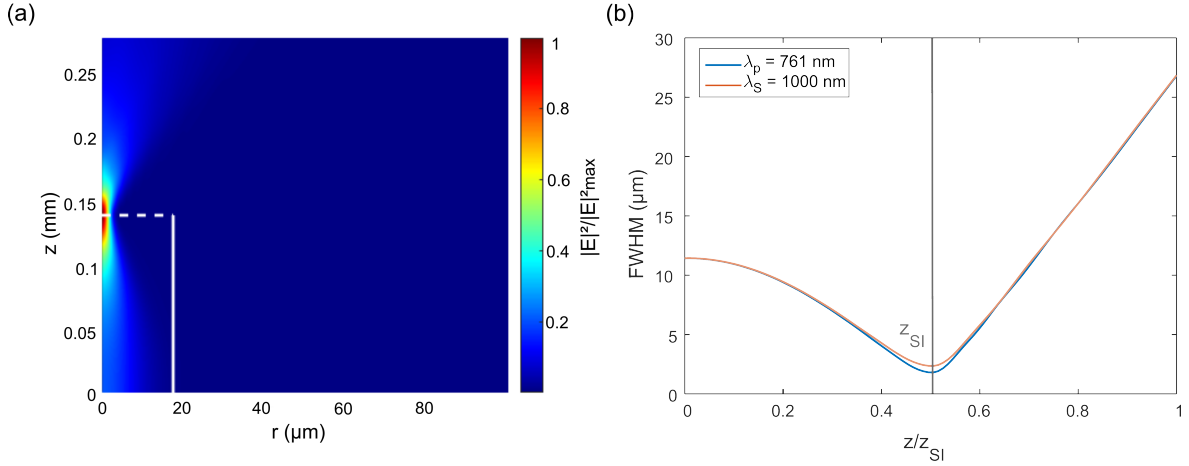


FIGURE 2.17 – Simulations numériques du profil d'intensité le long de l'axe de propagation z pour $L_{GRIN} = 137,3 \mu\text{m}$ (a), et largeur à mi-hauteur des impulsions de pompe (courbe bleue) et de Stokes (courbe orange) en fonction de la distance normalisée $\frac{z}{z_{SI}}$.

Ainsi, pour cette longueur de fibre L_{GRIN} , le profil d'intensité le long de l'axe de propagation est représenté sur la Figure 2.17 a. Le trait vertical correspond à la longueur L_{GRIN} . La Figure 2.17 b illustre l'évolution de la largeur à mi-hauteur des faisceaux de pompe et de Stokes en fonction de la distance normalisée $\frac{z}{z_{SI}}$. Lors de leur propagation à l'intérieur de la fibre GRIN (pour $\frac{z}{z_{SI}} < 0,5$), le diamètre de mode $\varnothing_{FWHM}$ suit une évolution parabolique, conséquence directe du profil d'indice de la fibre. À la sortie de la fibre GRIN, les faisceaux divergent dans l'air selon un comportement de faisceau gaussien. Le $\varnothing_{FWHM}$ minimal obtenu est de $1,8 \mu\text{m}$ pour le faisceau de pompe et de $2,35 \mu\text{m}$ pour le faisceau de Stokes.

2.3.2 Fabrication

L'extrémité distale de la fibre NCHCF a été fonctionnalisée à l'aide d'une fibre GRIN présentant un diamètre de cœur de $\varnothing_c = 35 \mu\text{m}$ et un diamètre externe de $\varnothing_{ext} = 156 \mu\text{m}$.

Avant de réaliser la soudure, l'extrémité des fibres a été préparée à l'aide d'une cliveuse (CT-106, Fujikura). Dans cette étape les fibres sont maintenues tendues dans des étaux, puis un couteau diamanté effectue une incision perpendiculaire à l'axe de chaque fibre. La fissure ainsi créée se propage naturellement, produisant une coupure nette, plane et perpendiculaire au cœur de la fibre, avec un angle inférieur à 1° . Cette étape est essentielle pour minimiser les pertes et réflexions optiques au niveau de la jonction après la soudure. Les surfaces obtenues pour la fibre NCHCF et la fibre GRIN sont respectivement visibles sur les Figures 2.18 a et 2.18 b. La fissure observée sur la section de la fibre NCHCF résulte de l'onde de choc générée par la lame lors du clivage.

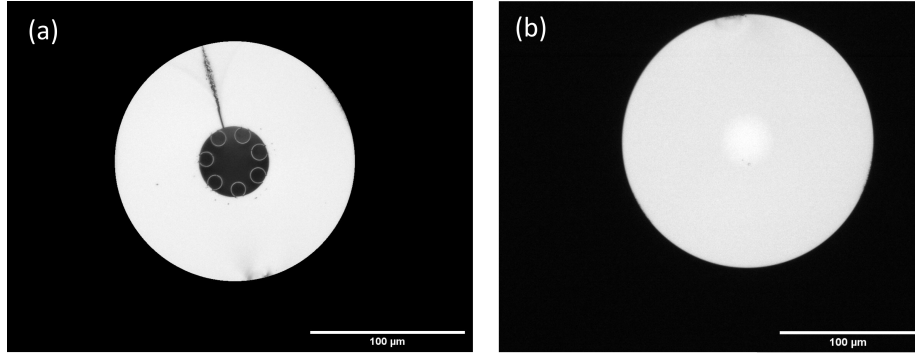


FIGURE 2.18 – Surfaces obtenues pour les fibres NCHCF (a) et GRIN (b).

Les deux extrémités ont ensuite été alignées et soudées à l'aide d'une soudeuse à laser CO₂ (LZM-100, Fujikura), qui utilise un faisceau laser focalisé au niveau des extrémités des deux fibres. Une vue latérale de la soudure acquise au microscope est représentée sur la Figure 2.19 a. La jonction entre les deux fibres a été examinée au microscope à travers la fibre GRIN (Figure 2.19 b) afin de s'assurer que les capillaires n'avaient pas été déformés pendant le processus de soudure.

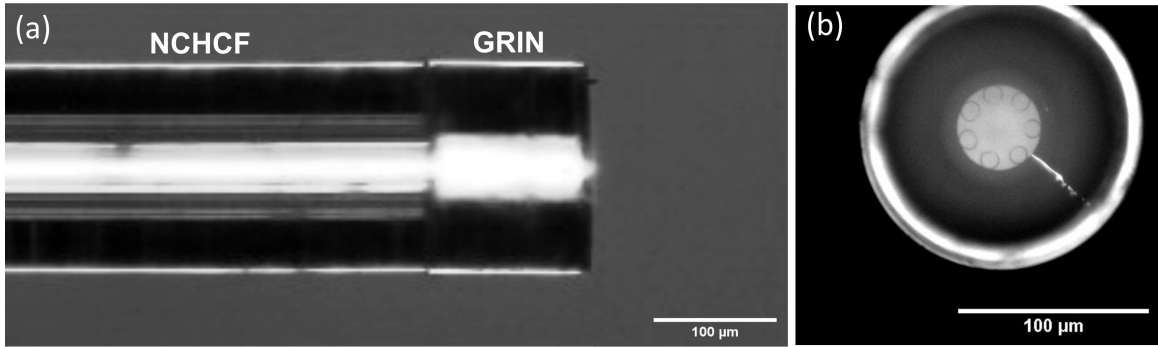


FIGURE 2.19 – Images obtenues au microscope de la fibre fonctionnalisée (a) et de la jonction entre les extrémités des fibres après soudure (b).

Après la soudure, l'extrémité de la fibre GRIN a été polie afin d'atteindre la longueur souhaitée. La longueur finale mesurée est de $L_{GRIN} = 135 \mu\text{m}$, légèrement inférieure à la longueur cible de $137,3 \mu\text{m}$. Dans cette configuration, les impulsions de pompe et de Stokes sont focalisées à environ $2 \mu\text{m}$ après l'extrémité distale de la fibre GRIN. Le $\varnothing_{FWHM}$ des faisceaux en sortie de la fibre GRIN a été mesuré selon le montage expérimental présenté à la section 2.2.2.

Les résultats, présentés sur la Figure 2.20, ont été comparés aux $\varnothing_{FWHM}$ de la fibre NCHCF seule. Avec une longueur de fibre GRIN de $L_{GRIN} = 135 \mu\text{m}$, les $\varnothing_{FWHM}$ mesurées sont de $\varnothing_{FWHM_p} = 1,80 \mu\text{m}$ pour le faisceau de pompe et de $\varnothing_{FWHM_s} = 2,3 \mu\text{m}$ pour le faisceau de Stokes. Les valeurs mesurées sont en bon accord avec celles prédites par les simulations numériques, soit de $1,8$ et $2,35 \mu\text{m}$ pour les faisceaux de pompe et de Stokes, respectivement.

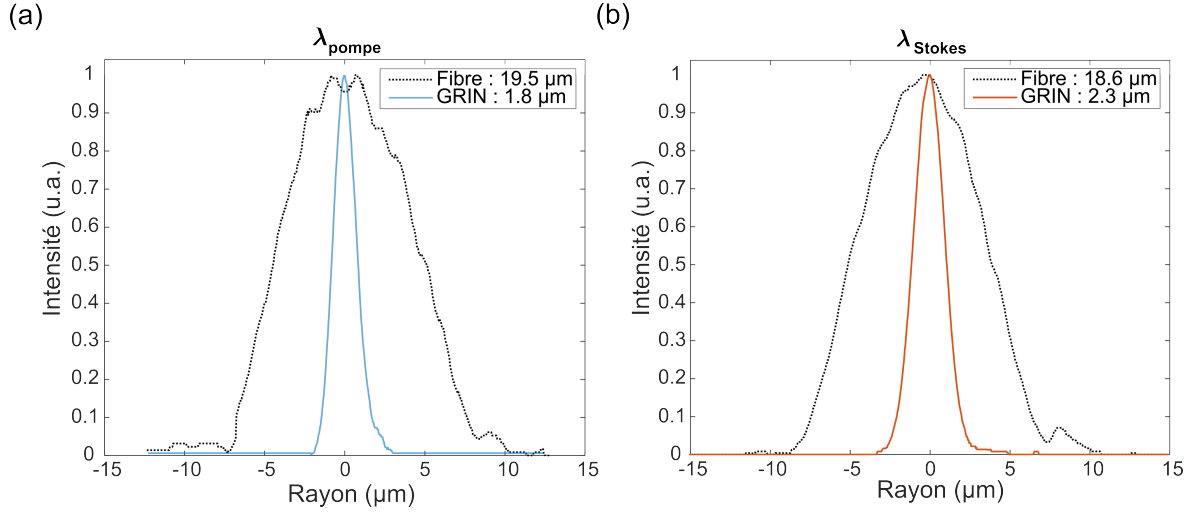


FIGURE 2.20 – FWHM mesurés pour les faisceaux de pompe (a) et de Stokes (b) en sortie de fibre GRIN, et comparaison avec les PSF de la fibre NCHCF seule (courbe noire)

2.4 Dispositif de balayage par fibre résonante

Le balayage de l'échantillon est assuré par un tube piézoélectrique doublement résonant, positionné autour de la fibre optique. Ce dispositif compact et peu coûteux est couramment utilisé en micro-endoscopie non linéaire pour ses performances et sa simplicité de mise en œuvre [79, 78, 109]. Les résultats présentés dans cette section s'appuient sur les travaux initiaux de G. Ducourthial [75], tels que révisés et complétés par A. Lombardini [79], V. Mytskaniuk [109] et D. Septier [80].

Le tube piézoélectrique utilisé, fabriqué par Physik Instrumente, mesure 10 mm de long et possède un diamètre interne de 0,9 mm et un diamètre externe de 1,5 mm. Réalisé en céramique PIC255, il est recouvert de quatre électrodes en cuivre-nickel, déposées de manière symétrique sur sa surface externe. Pour maximiser la flexion du tube, ces électrodes fonctionnent par paires opposées. Les positions $\pm X$ et $\pm Y$ sont contrôlées par deux signaux, V_x et V_y , de même amplitude mais de signes contraires.

La fibre optique est insérée à l'intérieur du tube piézoélectrique et collée à celui-ci au moyen de deux éléments en céramique. La portion libre de la fibre se comporte comme un oscillateur harmonique forcé lorsqu'un signal est appliqué aux électrodes. L'amplitude de l'oscillation varie avec la fréquence du signal et atteint un maximum lorsque celle-ci correspond à la fréquence de résonance mécanique de la fibre. Cette fréquence dépend de plusieurs paramètres mécaniques et géométriques de la fibre, comme son rayon interne R_i , son rayon externe R_e , sa longueur libre L , sa densité volumique ρ , ainsi que son module de Young E . Elle peut être théoriquement estimée par le modèle d'Euler-Bernoulli appliqué à une poutre encastré-libre, selon la formule suivante :

$$f_{\text{res}}^{(n)} = \frac{\alpha_n^2}{2\pi L^2} \cdot \sqrt{\frac{EI}{\rho S}} \quad (2.12)$$

où

- $S = \pi \cdot (R_e^2 - R_i^2)$ est la surface de section effective de la fibre,
- $I = \frac{\pi}{64} \cdot [(2R_e)^4 - (2R_i)^4]$ est le moment d'inertie de la section,
- α_n est le coefficient de résonance du mode n , qui dépend des conditions aux limites de la poutre.

Pour le premier mode de résonance, correspondant au mode fondamental, $\alpha_1 \approx 1,875$. Ce mode est privilégié en imagerie car il présente la plus grande amplitude de déflexion. Dans le système considéré, la longueur libre de la fibre est de 12,94 mm, ce qui correspond à une fréquence de résonance d'environ 900 Hz pour le mode fondamental.

Ainsi, en appliquant une faible tension au tube piézoélectrique (< 50 V), le mouvement micrométrique du tube est transmis à la fibre. L'amplitude d'oscillation de cette dernière peut alors atteindre plusieurs centaines de micromètres lorsque la fréquence du signal appliqué coïncide avec la fréquence de résonance f_{res} de la fibre.

2.4.1 Contrôle du tube piézoélectrique

En supposant que le système est idéal, c'est-à-dire que la réponse de la fibre optique est identique selon les deux axes, l'excitation du tube par des signaux sinusoïdaux de même fréquence f_{res} et déphasés de $\pi/2$ produit un motif circulaire. Les tensions appliquées peuvent s'exprimer comme :

$$V_x = V_{max} \cdot \sin(2\pi f_{res} t) \quad (2.13)$$

$$V_y = V_{max} \cdot \cos(2\pi f_{res} t) \quad (2.14)$$

avec V_{max} l'amplitude d'oscillation et t le temps. Dans cette configuration, l'extrémité de la fibre décrit un mouvement circulaire, de rayon proportionnel à V_{max} .

Pour transformer ce mouvement en une spirale en expansion, une modulation d'amplitude est appliquée aux signaux. Les tensions appliquées aux axes X et Y peuvent alors s'exprimer comme :

$$V_x = V_{max} \cdot \sin(2\pi f_{mod} t) \cdot \sin(2\pi f_{res} t) \quad (2.15)$$

$$V_y = V_{max} \cdot \sin(2\pi f_{mod} t) \cdot \cos(2\pi f_{res} t) \quad (2.16)$$

où f_{mod} est la fréquence de modulation ($f_{mod} \ll f_{res}$). Cette modulation lente permet au mouvement circulaire initial, généré à f_{res} , de s'élargir progressivement en une spirale en expansion. Un exemple de tension appliquée au tube piézoélectrique et le motif de spirale associé sont présentés sur la Figure 2.21 a et b, pour $f_{res} = 900$ Hz, $f_{mod} = 10$ Hz et $V_{max} = 1$ V.

Après la phase d'expansion et en l'absence de signal appliqué aux électrodes, la fibre optique se comporte comme un oscillateur harmonique amorti et revient progressivement à sa position initiale. Ce temps correspond au temps de relaxation de la fibre et peut atteindre plusieurs centaines de millisecondes [75]. Pour augmenter la cadence d'imagerie, un freinage actif peut être appliqué au tube piézoélectrique. Celui-ci est réalisé en inversant

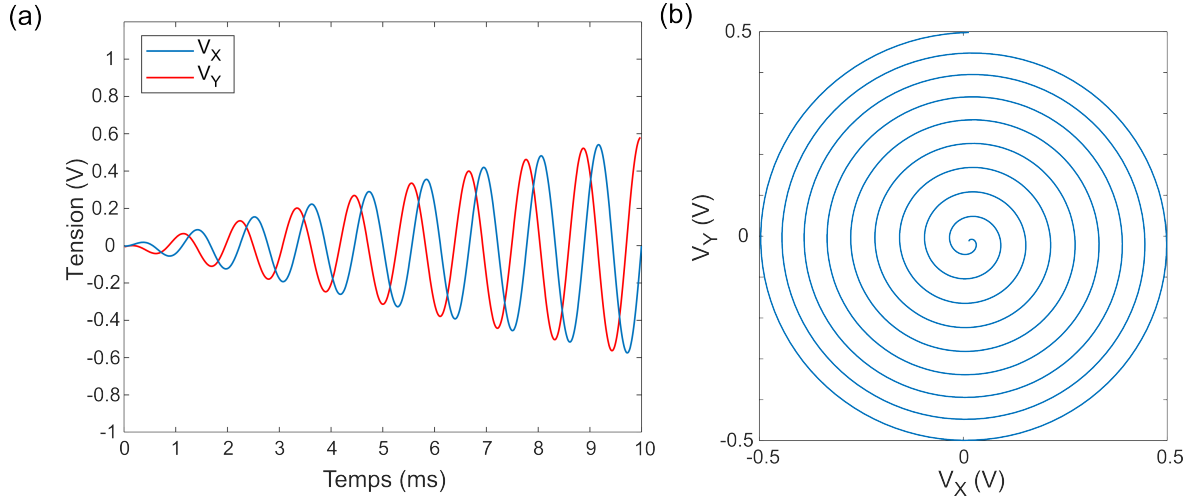


FIGURE 2.21 – (a) Exemple schématique des tensions de commande appliquées au tube piézoélectrique selon l'axe x (courbe bleue) et l'axe y (courbe rouge), permettant de générer un balayage en spirale illustré en (b).

la phase des signaux d'excitation. La tension de contrôle correspondant à cette séquence est illustrée sur la Figure 2.22 a pour des fréquences de $f_{res} = 900$ Hz et $f_{mod} = 10$ Hz, avec une amplitude de $V_{max} = 0.8$ V. La fréquence de modulation utilisée lors du freinage actif est choisie cinq fois plus élevée que celle du scan, afin de réduire le temps d'acquisition global. Cette phase de freinage est suivie d'une période de repos, pendant laquelle aucun signal n'est appliqué au tube piézoélectrique. Bien que non obligatoire, cette étape permet de s'assurer que la fibre a bien retrouvé sa position initiale avant le début du cycle suivant. Le motif de spirale associé est présenté sur la Figure 2.22 b.

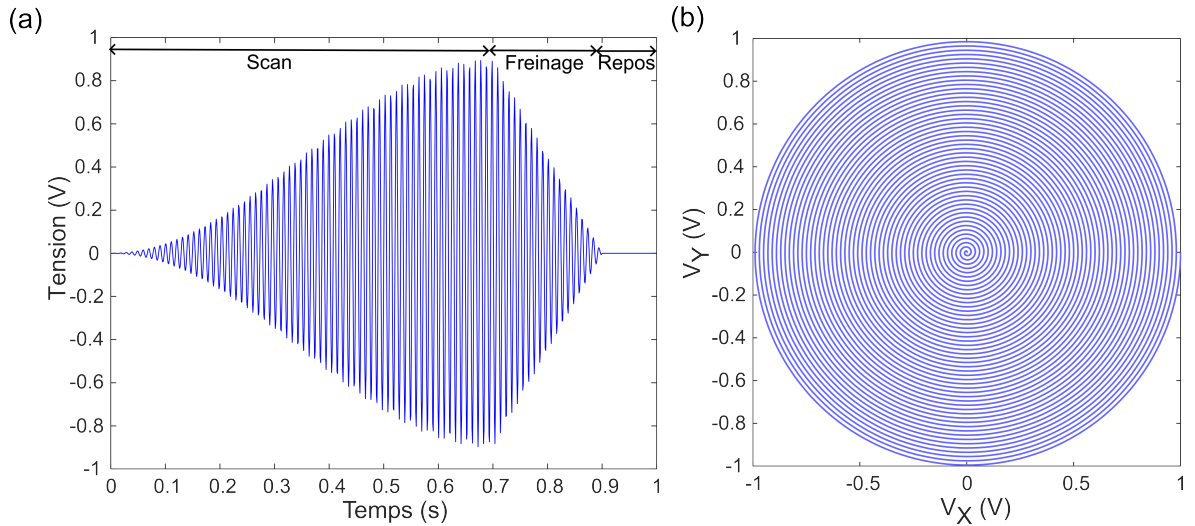


FIGURE 2.22 – Exemple de la tension de commande appliquée au tube piézoélectrique lors d'un cycle

En pratique, les signaux appliqués aux axes X et Y ne sont pas parfaitement identiques, car la réponse de la fibre diffère légèrement selon l'axe considéré. La dissymétrie du

tube piézoélectrique et le collage de la fibre entraînent des fréquences de résonance légèrement différentes le long des axes X (f_{res_x}) et Y (f_{res_y}). Cet écart est mesuré à l'aide d'un détecteur de position (PSD) et est inférieur à 1 %. La fréquence de résonance du système est ajustée pour se situer entre les deux fréquences f_{res_x} et f_{res_y} . Le montage de calibration du micro-endoscope est présenté au Chapitre 3.

Le champ de vue (FoV) du système est déterminé par l'amplitude de modulation V_{max} , tandis que le temps d'acquisition est fixé par la fréquence de modulation f_{mod} . En ajustant ces paramètres, il est possible d'obtenir un champ de vue supérieur à 600 μm et d'atteindre une cadence d'imagerie pouvant aller jusqu'à 10 images par seconde [110]. Il convient toutefois de noter que ces grandeurs sont limitées par la fréquence de résonance f_{res} de la fibre optique. Le champ de vue maximal est ainsi borné par :

$$FoV \leq \frac{PSF \cdot 2f_{res}}{\tau} \quad (2.17)$$

avec τ le taux d'acquisition. Le contrôle du tube piézoélectrique ainsi que la reconstitution des images seront détaillés au Chapitre 3.

2.5 Conception des micro-objectifs

La fonctionnalisation de la fibre optique ne suffit pas à réaliser de l'imagerie SRS. Les faisceaux laser sont focalisés à seulement 2 μm de l'extrémité distale de la fibre GRIN, et celle-ci demeure trop fragile pour être insérée directement dans les tissus biologiques. Pour remédier à ce problème, le point focal de sortie est ré-imagé sur l'échantillon grâce à un premier micro-objectif placé derrière la fibre optique. Celui-ci est constitué de lentilles miniaturisées et d'un système réfléchissant qui redirige les impulsions laser vers l'échantillon. Le signal non linéaire est collecté en transmission grâce à un second micro-objectif placé en face du premier micro-objectif, derrière l'échantillon.

Les sections suivantes détaillent l'architecture optique de ces deux micro-objectifs ainsi que leurs performances respectives.

2.5.1 Micro-objectif de focalisation

Le micro-objectif de focalisation est constitué de trois lentilles achromatiques, de 2 mm de diamètre et de distances focales f' respectives de 12, 6 et 3 mm, traitées dans la gamme VIS-NIR et disponibles chez Edmund Optics. Un prisme à angle droit de 2 mm, placé derrière les lentilles, réfléchit les faisceaux laser vers l'échantillon. L'architecture optique complète est présentée sur la Figure 2.23 a.

Ce système présente un grandissement théorique de 0,62 pour les longueurs d'onde de pompe ($\lambda_p = 760 \text{ nm}$) et de Stokes ($\lambda_s = 1000 \text{ nm}$). La distance entre l'extrémité distale de la fibre et la première lentille est de 3,5 mm, tandis que la distance de travail côté échantillon est de 541 μm . Cette configuration permet d'atteindre une ouverture numérique de 0,40

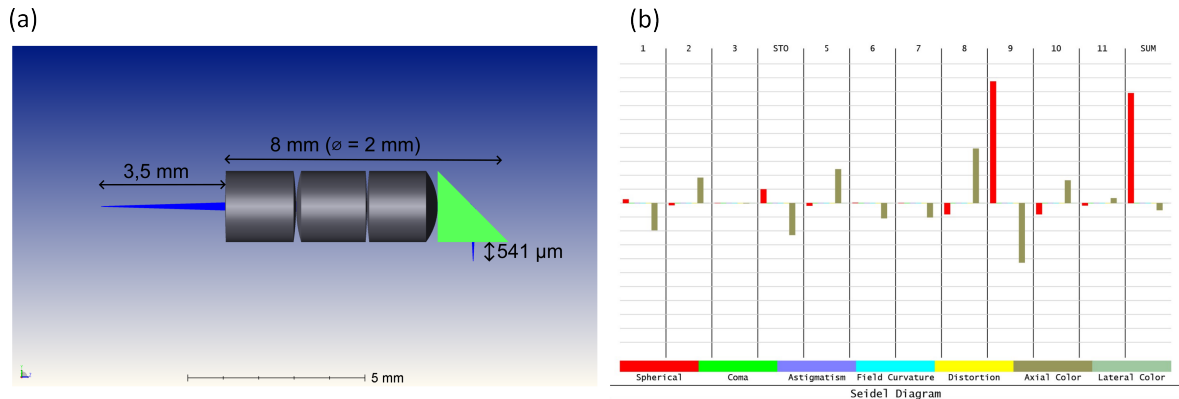


FIGURE 2.23 – Modélisation du micro-objectif sous Zemax (a) et diagramme de Seidel associé (b), illustrant les principales aberrations optiques du système.

pour le faisceau de pompe et de 0,36 pour le faisceau de Stokes à la sortie du micro-objectif. Comme le dispositif de scanner agit directement sur la fibre optique, le grandissement du micro-objectif s'applique également au motif de balayage, ce qui réduit le champ de vue sur l'échantillon d'une quantité égale au grandissement.

Le micro-objectif est sensible aux aberrations, comme indiqué sur le diagramme de Seidel de la Figure 2.23 b. Chaque numéro correspond à une surface optique traversée par le faisceau et la surface 11 représente le plan focal en sortie du micro-objectif. La face bombée de la troisième lentille, orientée vers le prisme, génère des aberrations sphériques au foyer image. Des aberrations chromatiques sont également présentes dans le système mais restent négligeables, car l'écart entre les deux longueurs d'onde est suffisamment faible. L'impact de ces aberrations sur les performances optiques du micro-objectif est évalué dans la section suivante.

a) Influence des aberrations sur les performances optiques du système

L'architecture optique du micro-objectif a été modélisée avec le logiciel Zemax. Le grandissement paraxial décrit l'agrandissement de l'image lorsque les rayons lumineux sont proches de l'axe optique. Dans ces conditions, les PSF théoriques au foyer image des faisceaux de pompe et de Stokes sont respectivement de $PSF_p = 1,12 \mu\text{m}$ et $PSF_s = 1,43 \mu\text{m}$. Cependant, ce grandissement ne tient pas en compte des aberrations présentes dans le système, en particulier des aberrations sphériques qui tendent à augmenter la taille de la PSF au foyer image. Pour quantifier leur impact, la PSF de Huygens a été calculée sous Zemax pour les longueurs d'onde de pompe et de Stokes définies précédemment.

Dans ce calcul, le faisceau d'entrée, correspondant au faisceau de sortie de la fibre GRIN, est décomposé en une série de sources ponctuelles parfaites, chacune associée à une amplitude et une phase. Chaque source émet une « ondelette » sphérique, appelée « ondelette de Huygens ». Les interférences entre ces ondelettes, après passage dans le micro-objectif, déterminent l'intensité de diffraction en chaque point de l'image, obtenue par la somme complexe de toutes les ondes sphériques, au carré. La PSF est ainsi calculée sur

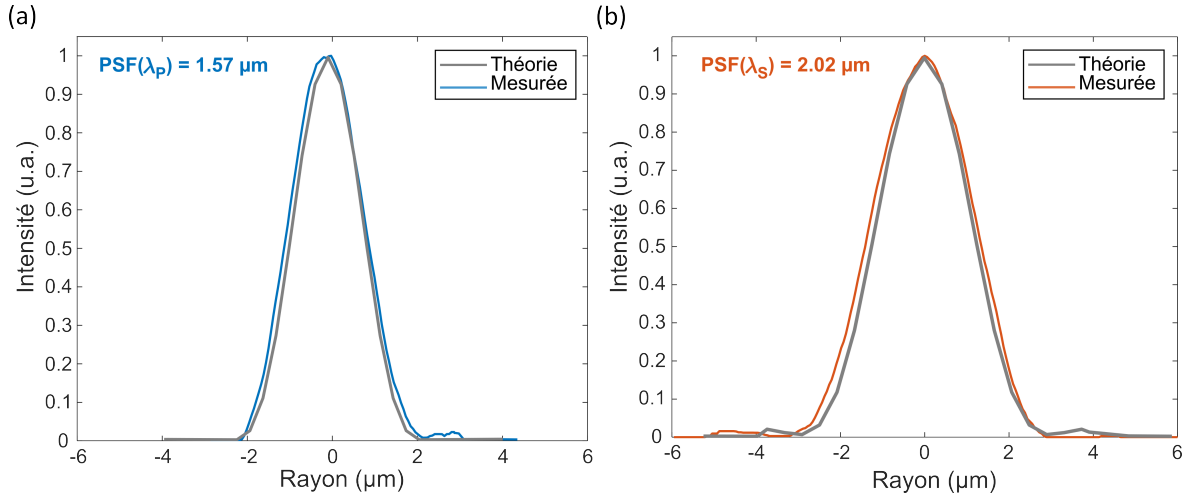


FIGURE 2.24 – Comparaison des PSF théoriques (Huygens) et mesurées pour les faisceaux de pompe (a) et de Stokes (b).

toute la grille d'image. Les résultats numériques, représentés par les courbes grises de la Figure 2.24, sont comparés aux PSF mesurées expérimentalement pour les faisceaux de pompe (Figure 2.24 a) et de Stokes (Figure 2.24 b), selon le protocole décrit à la section 2.2.2 de ce chapitre. Les PSF mesurées sont de $1,57 \mu m$ pour le faisceau de pompe et de $2,02 \mu m$ pour le faisceau de Stokes. Elles sont en bon accord avec les PSF de Huygens simulées sous Zemax, mais restent nettement supérieures aux valeurs prédites uniquement à partir du grandissement paraxial du micro-objectif. Cela montre que, pour un système d'imagerie présentant des aberrations significatives, le grandissement paraxial seul ne permet pas de déterminer la taille réelle des PSF. L'impact de ces aberrations sur la résolution axiale du système d'imagerie sera présenté au Chapitre 3. Malgré la présence d'aberrations, les performances optiques du micro-objectif sont suffisantes pour une preuve de concept et la réalisation d'images SRS.

2.5.2 Micro-objectif de collection

Le signal SRS généré dans l'échantillon est collecté à l'aide d'un second micro-objectif, placé derrière l'échantillon. Ce micro-objectif repose sur un prisme à angle droit identique à celui utilisé avant la focalisation, associé à une lentille de distance focale $f' = 3 \text{ mm}$. Son ouverture numérique est de 0,46. Celle-ci est supérieure à l'ouverture numérique du micro-objectif de focalisation afin d'éviter les effets non linéaires parasites [111]. Le signal non linéaire est ensuite transmis à l'unité de détection *via* une fibre optique multimode. L'architecture complète du système de collection est présentée à la Figure 2.25. La fibre collectrice est un barreau de silice de 2 mm de diamètre externe, positionné à 1,8 mm de la lentille de collection. Le micro-objectif est placé à 2 mm du système de focalisation, ce qui permet de collecter 76,2 % du signal SRS généré dans l'échantillon. Cette valeur a été déterminée expérimentalement.

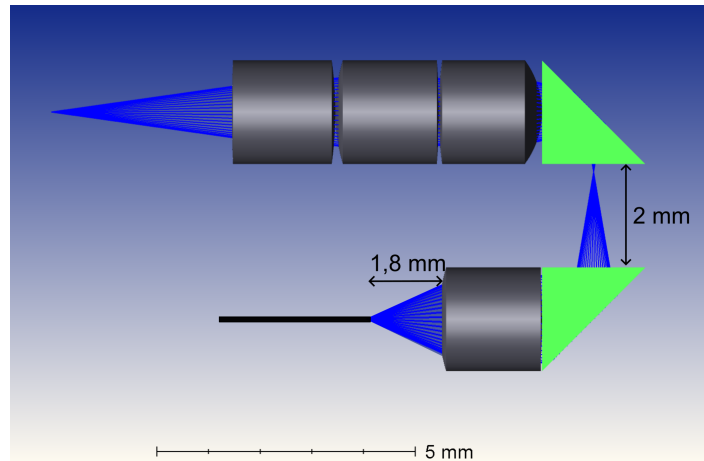


FIGURE 2.25 – Modélisation des deux micro-objectifs sous Zemax.

2.5.3 Assemblage de la tête endoscopique

Un premier prototype de sonde endoscopique SRS a été conçu et est présenté sur la Figure 2.26. La fibre endoscopique a été insérée dans une gaine protectrice noire afin de la renforcer. Son extrémité a été insérée dans un tube piézoélectrique et l'ensemble a été intégré dans une structure métallique constituant le corps de l'endoscope. L'alimentation du tube piézoélectrique s'effectue par des câbles électriques, regroupés dans une gaine protectrice blanche. Les lentilles du micro-objectif de focalisation ont été montées dans un tube métallique de 3 mm de diamètre externe et la dernière lentille a été collée à l'extrémité du tube. Le micro-objectif est vissé directement au corps de l'endoscope et un contre-écrou permet de le maintenir en place. Le prisme a quant à lui été posé simplement sur une platine placé derrière les lentilles. Le micro-objectif de collection n'a pas été intégré dans un support mécanique car l'objectif était de valider expérimentalement la faisabilité de l'imagerie SRS à travers cette configuration. Des tests d'imagerie sur des échantillons biologiques ont ensuite été réalisés avec cette architecture et les résultats sont présentés au Chapitre 3.

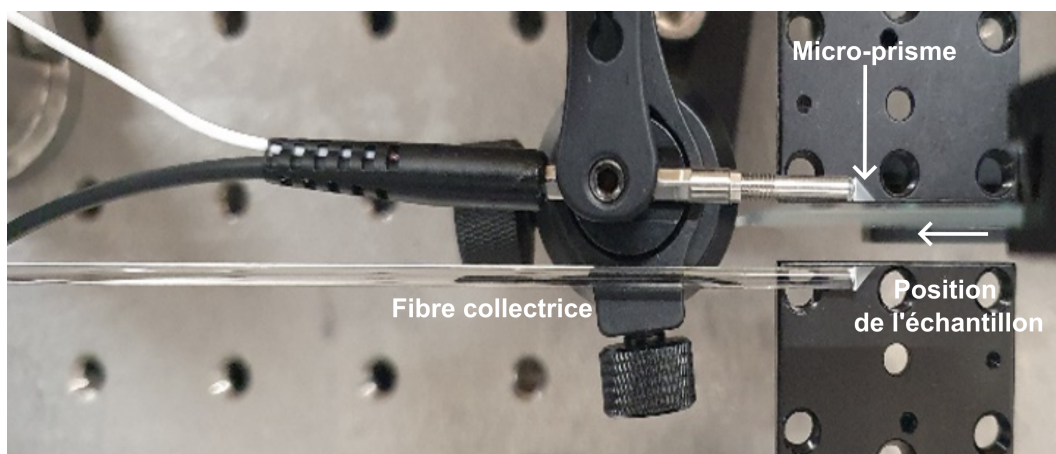


FIGURE 2.26 – Photographie du micro-endoscope assemblé.

Conclusion

Un micro-endoscope dédié à l'imagerie SRS a été présenté dans ce chapitre. La fibre NCHCF a été développée et fonctionnalisée afin de réduire la taille du mode en sortie de fibre, améliorant ainsi la résolution spatiale du micro-endoscope. Un dispositif de balayage miniaturisé a été intégré autour de la fibre optique pour permettre le balayage de l'échantillon sur un champ de vue supérieur à 600 μm . Un premier micro-objectif, composé d'optiques miniatures, a été placé à l'extrémité distale de la fibre pour ré-imager les faisceaux laser sur l'échantillon. Le signal non linéaire généré sur le tissu est ensuite collecté par un second micro-objectif placé derrière l'échantillon. Pour la première fois, un système de redirection des faisceaux laser a été intégré dans une configuration endoscopique, permettant de collecter le signal non linéaire en transmission. L'architecture de la sonde endoscopique a fait l'objet d'un dépôt de brevet.

Chapitre III

Preuve de concept d'imagerie micro-endoscopique par diffusion Raman stimulée

Ce chapitre décrit la mise en œuvre expérimentale de la sonde endoscopique SRS présentée au Chapitre 2. Le fonctionnement complet du système est présenté, depuis la génération et la modulation des impulsions laser jusqu'à la détection et la reconstruction des images. Les performances optiques de la sonde, en particulier sa résolution spatiale et spectrale, sont caractérisées. Des images endoscopiques SRS sont réalisées sur des échantillons fixés, montrant la visualisation de structures biologiques avec une résolution microscopique. Enfin, les effets non linéaires parasites, notamment ceux induits par la fibre optique sont analysés, pour évaluer leur impact sur la qualité du signal SRS.

3.1 Mise en œuvre expérimentale

3.1.1 Source laser et génération des impulsions

L'imagerie SRS a été réalisée à l'aide du montage expérimental illustré sur la Figure 3.1. Un laser femtoseconde Ti :Sa (Chameleon, Coherent), accordable entre 690 et 1020 nm, délivre des impulsions de l'ordre de 180 fs avec une puissance moyenne de 2,5 W à 800 nm et une fréquence de répétition de 80 MHz. Ce laser pompe un oscillateur paramétrique optique (Chameleon Compact OPO, Coherent), produisant des impulsions de l'ordre de 300 fs dont la longueur d'onde est accordable de 1000 à 1600 nm.

Pour cibler les modes vibrationnels des liaisons CH₂ et CH₃, respectivement situés à $\sigma = 2850 \text{ cm}^{-1}$ et $\sigma = 2930 \text{ cm}^{-1}$, le faisceau de Stokes a été fixé à $\lambda_S = 1000 \text{ nm}$, tandis que le faisceau de pompe était ajustable entre 760 et 780 nm. Cette longueur d'onde du faisceau de Stokes a été choisie afin de coïncider avec le pic de sensibilité de la photodiode utilisée pour la détection synchrone, décrite dans la section 3.1.4.

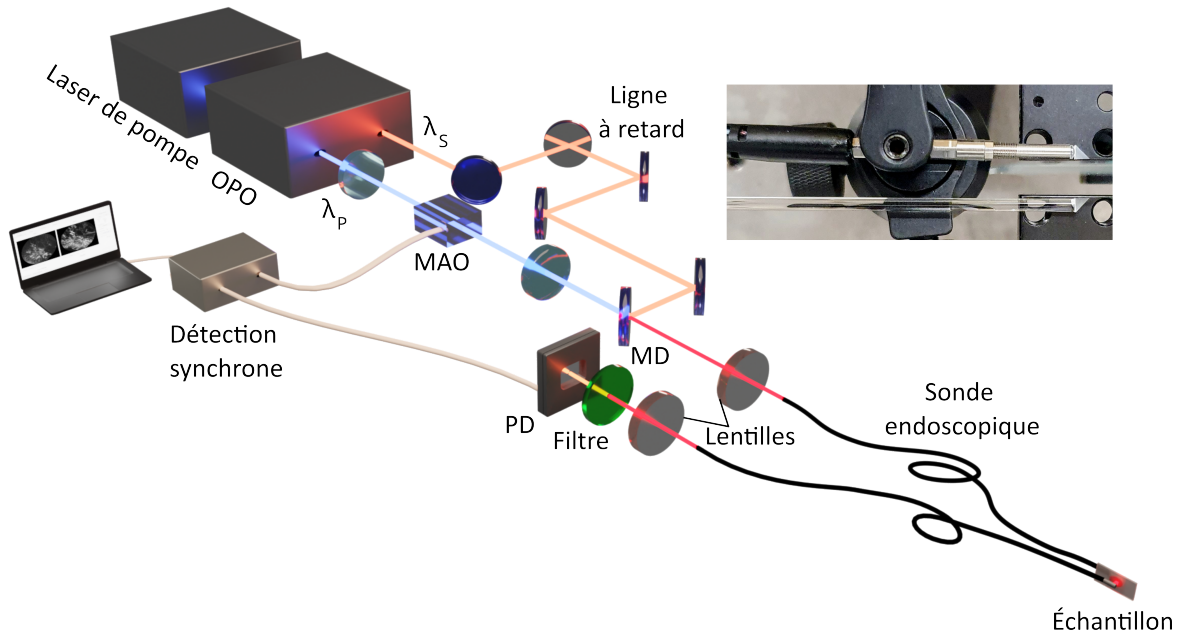


FIGURE 3.1 – Montage expérimental utilisé pour l'imagerie endoscopique SRS.

3.1.2 Modulation et recombinaison des faisceaux

Lorsque la condition de résonance entre les deux faisceaux, $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$, est satisfaite, un transfert de modulation apparaît entre les deux faisceaux. Ce phénomène correspondant au processus SRS, se traduit par une perte d'intensité sur le faisceau de pompe (SRL) et un gain correspondant sur le faisceau de Stokes (SRG).

Pour extraire le gain SRG sur le faisceau de Stokes, le faisceau de pompe est modulé en intensité à $f_m = 10 \text{ MHz}$ à l'aide d'un modulateur acousto-optique (MAO) (MT200-A0.5-800, AA-Optoelectronique). Le faisceau est d'abord focalisé dans le MAO à l'aide d'une lentille

de distance focale $f' = 250$ mm. Une platine de rotation permet d'aligner le MAO pour maximiser la transmission dans l'ordre 1, configuration dans laquelle 43 % de la puissance incidente est transmise. Le faisceau diffracté est ensuite collimaté avec une lentille de distance focale $f' = 150$ mm, choisie pour obtenir un diamètre équivalent à celui du faisceau Stokes.

Le signal de modulation transmis au contrôleur du MAO est issu d'un générateur de fonctions arbitraires (33120A, Hewlett Packard). Celui-ci délivre un signal sinusoïdal de 0,65 V d'amplitude à 10 MHz. La fréquence a été choisie de manière à éviter les plages fréquentielles dominées par le bruit du système, issu du laser (bruit électronique, mécanique, bruit en $1/f$, bruit quantique, etc.) ou du détecteur (courant d'obscurité, bruit thermique, bruit électronique, etc.) [38]. En effet, toute fluctuation d'intensité est convertie en photo-courant par le détecteur et interprétée comme un signal SRS. Pour cette raison, la modulation doit se situer au-delà de la plage fréquentielle perturbée, typiquement inférieure à 1 MHz. La fréquence de 10 MHz utilisée ici garantit une meilleure immunité à ces perturbations et un meilleur rapport signal sur bruit.

Les faisceaux sont ensuite recombinaés à l'aide d'un miroir dichroïque (FF875-Di01-25x36, Semrock), puis injectés dans la fibre creuse du micro-endoscope grâce à une lentille de distance focale $f' = 20$ mm. L'efficacité de couplage est d'environ 60% pour la pompe et 50 % pour la Stokes. L'état de polarisation des faisceaux est contrôlé avant l'injection grâce à une lame demi-onde positionnée sur chaque trajet. La polarisation des faisceaux est alignée avec les axes neutres de la fibre optique.

3.1.3 Synchronisation temporelle des impulsions laser

La synchronisation temporelle des impulsions de pompe et de Stokes à la sortie de la sonde endoscopique a été réalisée grâce à une ligne à retard motorisée (ODL220/M, Thorlabs) placée sur le trajet du faisceau Stokes. Elle permet de compenser les décalages temporels avec une précision de 33 fs.

La synchronisation est obtenue en mesurant le signal de corrélation croisée généré dans une photodiode en silicium placée au plan focal, à la sortie du micro-endoscope [112]. Le maximum du signal, résultant d'un processus d'absorption à deux photons (TPA) impliquant un photon de pompe et un photon Stokes, correspond à la synchronisation des impulsions. Le montage expérimental correspondant est illustré sur la Figure 3.2 a. Pour quantifier le décalage introduit par la fibre et le micro-objectif, cette mesure a été comparée à celle réalisée à l'entrée du micro-endoscope. Les courbes de corrélation croisée obtenues sont présentées sur la Figure 3.2 b. Le décalage observé entre l'entrée et la sortie du micro-endoscope est de 65 fs. Cette différence peut s'expliquer par des effets de chirp sur les faisceaux.

La superposition spatiale des impulsions en sortie du micro-endoscope ne peut pas être ajustée et dépend uniquement de l'achromaticité du micro-objectif. Dans la configuration actuelle, les faisceaux présentent un décalage longitudinal d'environ 1 μm , ce qui réduit le recouvrement spatial des impulsions. Néanmoins, l'imagerie SRS reste possible, car les

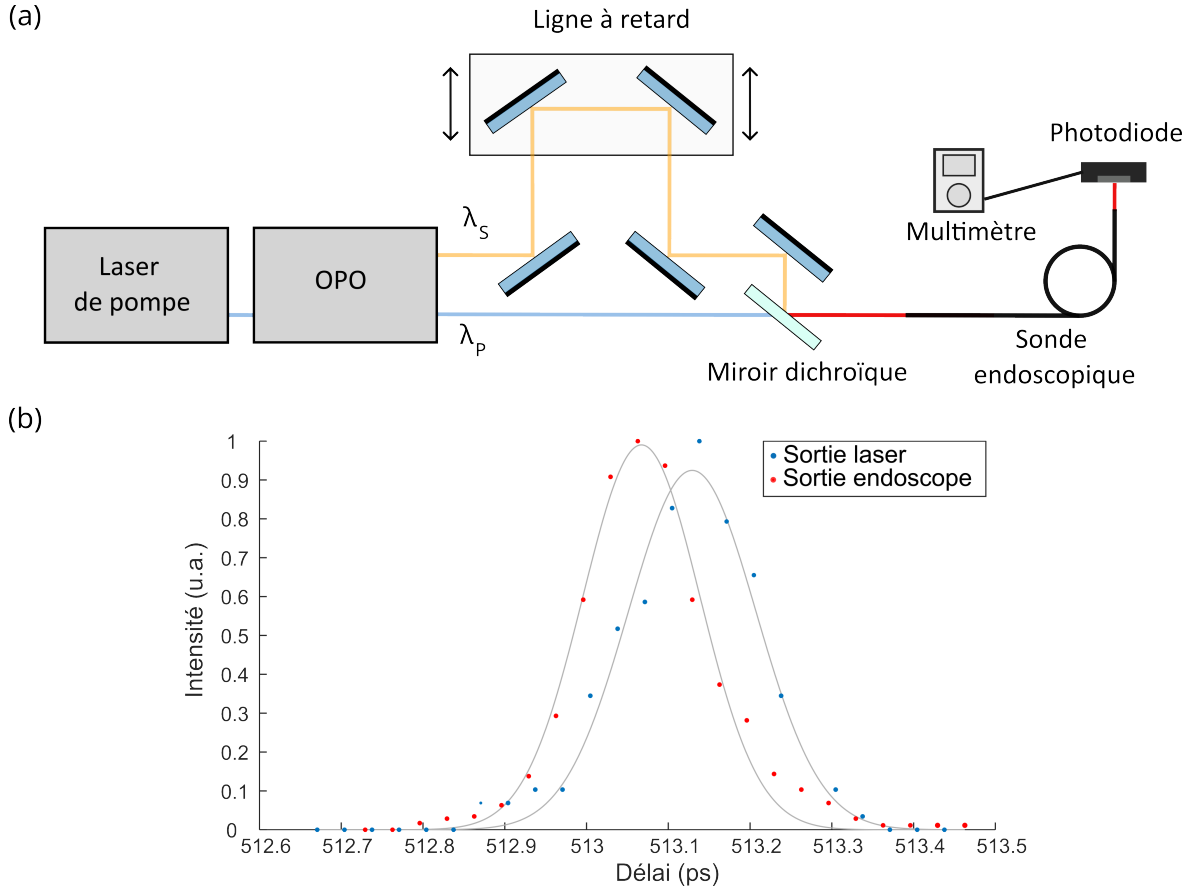


FIGURE 3.2 – (a) Montage expérimental utilisé pour synchroniser temporellement les impulsions laser à la sortie du micro-endoscope. (b) Mesures de corrélation croisée avant (bleu) et après (rouge) le micro-endoscope, accompagnées d'un ajustement gaussien (ligne grise). La synchronisation temporelle des impulsions correspond au maximum de la courbe ajustée.

longueurs de Rayleigh des faisceaux ($6,14 \mu\text{m}$ pour le faisceau pompe et $5,47 \mu\text{m}$ pour le faisceau Stokes) assurent un recouvrement suffisant pour générer le signal non linéaire.

3.1.4 Chaîne de détection

Le signal SRS généré dans l'échantillon est collecté par le second micro-objectif, puis transmis vers l'unité de détection à l'aide d'une fibre multimode (barreau de silice, $\varnothing_{\text{gaine}} = 250 \mu\text{m}$, FiberTech). En sortie de fibre, les faisceaux sont collimatés par une lentille de distance focale $f' = 8 \text{ mm}$ et d'ouverture numérique $\text{NA} = 0,55$. Cette ouverture numérique a été choisie pour limiter les effets non linéaires parasites, notamment ceux liés à la modulation de phase croisée [111]. Le faisceau de pompe est ensuite filtré (LP02-980RE-25, Semrock), afin de ne transmettre que le faisceau de Stokes vers l'unité de détection. Cette dernière, développée par APE GmbH, intègre une photodiode APE optimisée à $1031,2 \text{ nm}$ et un amplificateur à détection synchrone. Le système permet d'obtenir un temps d'intégration inférieur à 100 ns , avec une bande passante de $1,6 \text{ MHz}$. L'ensemble est contrôlé par un logiciel APE, dans lequel les paramètres de phase, gain, offset et temps d'intégration peuvent être modifiés.

a) Choix de la détection synchrone en micro-endoscopie SRS

La détection synchrone joue un rôle crucial dans l'imagerie SRS. Pour permettre la reconstitution d'une image, il est indispensable que le système de détection puisse fonctionner avec des temps d'intégration très courts, idéalement inférieurs à 20 μ s.

Contrairement à la microscopie conventionnelle, où le temps passé sur chaque pixel est contrôlé par des miroirs galvanométriques (et peut varier de quelques centaines de nanosecondes à plusieurs microsecondes), ce paramètre ne peut être ajusté en micro-endoscopie. En effet, le temps passé sur une zone donnée de l'échantillon dépend directement des propriétés mécaniques de la sonde, et notamment de la fréquence de résonance de la fibre notée f_{res} . Cette fréquence dépend elle-même de la longueur de fibre dépassant du tube piézoélectrique : plus cette longueur est grande, plus f_{res} est faible [78, 82, 113]. Dans le dispositif endoscopique, la fréquence de résonance est de $f_{res} = 900$ Hz, ce qui correspond à un temps de balayage d'environ 1,1 ms.

Pour obtenir un champ de vue de 150 μ m, l'extrémité distale de la fibre parcourt un périmètre de $2\pi R = 471$ μ m en 1,1 ms. La taille de la PSF étant de 1,45 μ m à 761 nm, la fibre traverse une distance équivalente à la PSF en environ 3,4 μ s. Ce temps peut être considéré comme l'équivalent du "pixel dwell time" en microscopie. Une comparaison de la forme du scanner en endoscopie (a) et en microscopie (b) est illustrée sur la Figure 3.3 suivante. Le temps d'intégration minimal τ_{int} requis dépend alors de la fréquence de résonance du

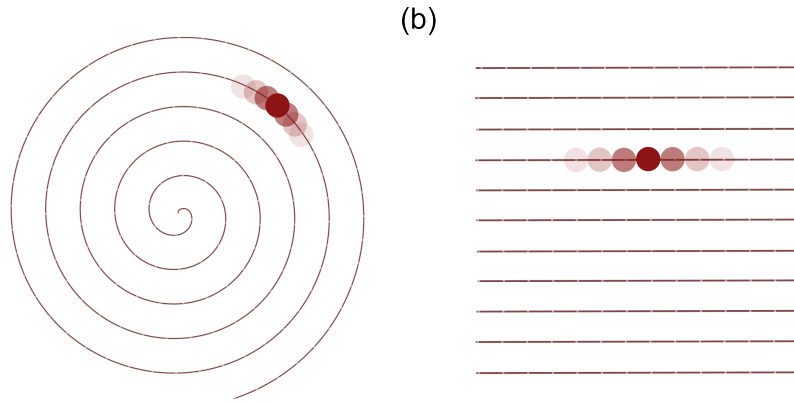


FIGURE 3.3 – Comparaison de la trajectoire de balayage obtenue en configuration micro-endoscopique (a) et en configuration microscopique (b).

scanner f_{res} , la taille de la PSF et le champ de vue souhaité, selon la relation :

$$\tau_{int} \leq \frac{PSF}{f_{res}\pi FoV} \quad (3.1)$$

Toute augmentation du champ de vue entraîne alors une hausse de la vitesse de balayage, et donc une diminution du temps d'intégration. Il est donc essentiel que le système de détection synchrone puisse s'adapter à ces contraintes, avec des temps d'intégration inférieurs à quelques microsecondes.

3.1.5 Acquisition numérique et reconstitution de l'image

L'acquisition du signal et la reconstruction des images sont assurées par un programme développé par Lightcore Technologies.

Tout d'abord le contrôle du tube piézoélectrique s'effectue *via* quatre signaux analogiques, comme expliqué dans le Chapitre 2. Pour générer ces signaux, deux terminaux (BNC-2110, National Instruments) sont utilisés, connectés à une carte d'acquisition (PCIe-6363, National Instrument). Les sorties analogiques de la carte sont ensuite amplifiées à l'aide d'un amplificateur haute tension développé par la société, car la carte d'acquisition ne délivre qu'une tension maximale de ± 5 V. Les signaux amplifiés sont ensuite appliqués sur le tube piézoélectrique.

a) Calibration du système d'imagerie

Avant de pouvoir reconstruire une image, il est nécessaire d'enregistrer le mouvement de la fibre optique durant le balayage. Cette calibration est réalisée à l'aide d'un détecteur de position (PSD) (PDP90A, Thorlabs), qui permet d'enregistrer les coordonnées spatiales en temps réel.

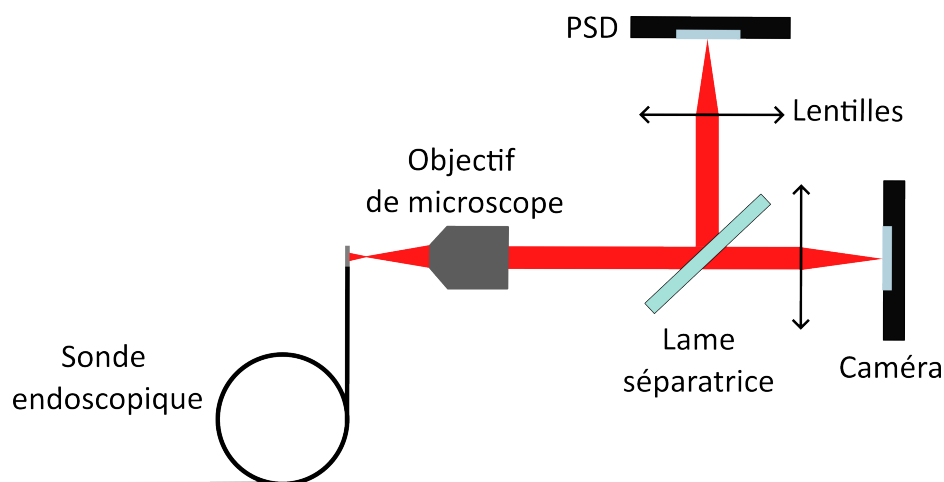


FIGURE 3.4 – Schéma du montage expérimental utilisé pour la calibration du micro-endoscope. Le faisceau laser en sortie de fibre est collimaté à l'aide d'un objectif de microscope, puis séparé en deux à l'aide d'une lame séparatrice. Une première partie est focalisée sur un détecteur de position (PSD) pour l'enregistrement du mouvement de la fibre, tandis que la seconde est dirigée vers une caméra pour l'observation en temps réel du balayage.

Comme illustré sur la Figure 3.4, le micro-endoscope - sans le micro-objectif de collection - est placé devant une unité de calibration. Un objectif de microscope est utilisé pour collimater le faisceau laser en sortie du micro-endoscope. Ce faisceau est ensuite séparé par une lame séparatrice vers deux unités :

- la première, équipée d'une lentille de distance focale $f' = 75$ mm focalise le faisceau sur le PSD,
- la seconde, également munie d'une lentille de distance focale $f' = 75$ mm, permet d'observer le balayage en temps réel sur une caméra (CS165MU, Thorlabs).

Le PSD connecté à une seconde carte d'acquisition, fournit trois sorties analogiques correspondant aux positions X , Y et $X+Y$. Ces signaux permettent de générer une matrice 2D de coordonnées représentant le trajet du faisceau durant le balayage.

Afin d'augmenter la cadence d'imagerie, un freinage actif est appliqué au tube piézo-électrique pour accélérer le retour de la fibre à sa position initiale [75, 114, 115]. Cette action est obtenue en appliquant un déphasage de π au signal de commande pendant une durée τ_f , forçant ainsi la fibre à se recentrer dans l'axe. Une représentation de la forme du scan obtenue après calibration est représentée sur la Figure 3.5, avec les phases d'expansion et de freinage.

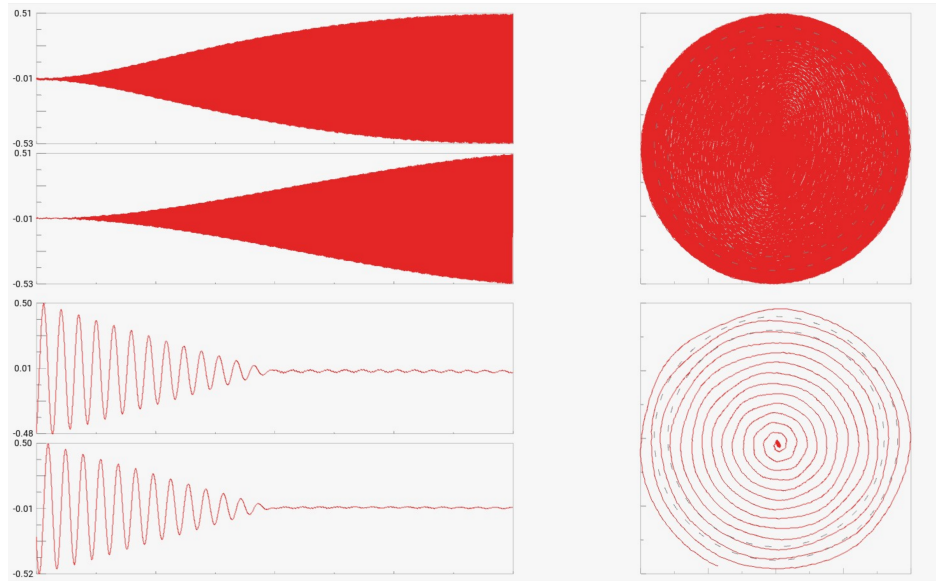


FIGURE 3.5 – Représentation de la calibration réalisée avec le micro-endoscope SRS. Les phases d'expansion du système de balayage sont représentées dans la partie supérieure de la figure pour les deux axes x et y , tandis que les phases de freinage apparaissent dans la partie inférieure.

b) Reconstruction de l'image SRS

Une fois la calibration réalisée, l'acquisition d'images SRS peut être effectuée en utilisant le montage décrit sur la Figure 3.1. La sortie du module de détection synchrone est connectée à une entrée analogique de la carte d'acquisition. Durant chaque cycle de balayage, les signaux SRS (SRG) sont enregistrés par la carte d'acquisition et chaque valeur du signal est alors associée à une coordonnée (X, Y) issue de la matrice de calibration. Un détecteur additionnel (PMT) peut également être connecté à une entrée numérique pour enregistrer les signaux 2PEF, SHG, etc. Un organigramme de l'algorithme de reconstruction d'image est présenté sur la Figure 3.6.

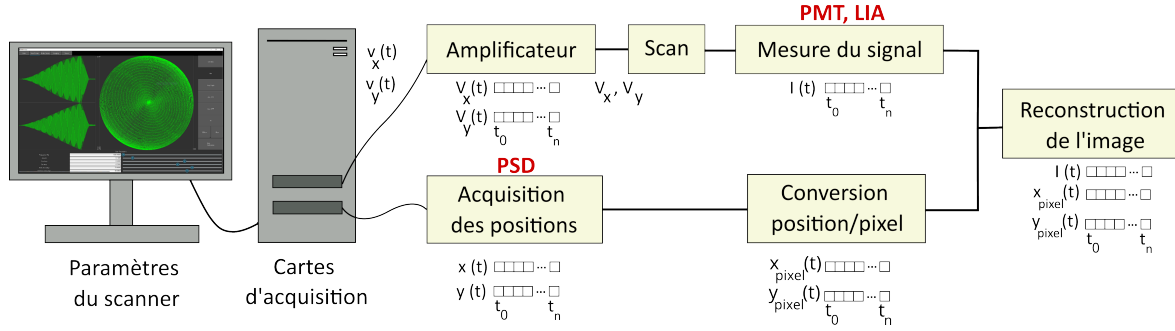


FIGURE 3.6 – Organigramme de l'algorithme de reconstruction d'image. Deux signaux sont générés à partir d'une carte d'acquisition pour contrôler le balayage de la fibre optique. Le mouvement résultant est enregistré à l'aide d'un détecteur de position (PSD), permettant de cartographier la trajectoire du faisceau pendant le scan. Ces données de position sont ensuite utilisées pour reconstruire l'image, en associant chaque valeur d'intensité enregistrée à un pixel de l'image finale. La mesure du signal peut s'effectuer grâce à une tube photomultiplicateur (PMT) ou une détection synchrone (LIA).

3.2 Caractérisation des performances optiques de la sonde endoscopique

3.2.1 Résolution transverse et axiale de la sonde endoscopique

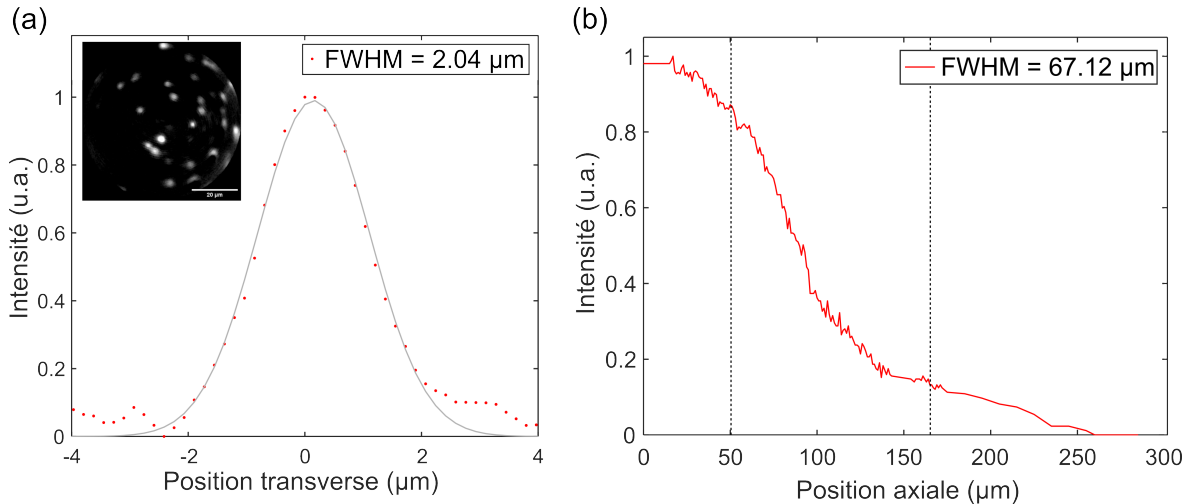


FIGURE 3.7 – Résolutions SRS latérale et axiale. (a) Image SRS de billes de polystyrène de 1 µm de diamètre, déposées sur une lame de microscope à $\sigma = 3054,8 \text{ cm}^{-1}$ ($P_p = 31 \text{ mW}$, $P_s = 30,5 \text{ mW}$). Profil d'intensité SRS mesuré d'une bille de polystyrène isolée (point rouge) et ajustement gaussien (courbe grise). (b) Résolution axiale SRS à $\sigma = 2949,6 \text{ cm}^{-1}$ ($P_p = P_s = 30 \text{ mW}$). La ligne rouge représente les données expérimentales et les lignes grises les intensités à $\frac{I_{max}}{e^2}$.

La résolution transverse de la sonde endoscopique a été mesurée à l'aide de billes de polystyrène de 1 µm de diamètre. Ces billes sont considérées comme des objets ponctuels, car leur taille est inférieure à la résolution transverse théorique du système ($> 1,6 \text{ µm}$). Pour limiter les effets d'agrégation, elles ont été diluées dans l'eau avec un rapport de 1:1000 puis déposées entre lame et lamelle. Les longueurs d'onde des faisceaux de pompe et de Stokes ont été choisies pour cibler le pic vibrationnel du polystyrène à $\sigma = 3054,5 \text{ cm}^{-1}$ [116], soit

$\lambda_{pompe} = 766 \text{ nm}$ et $\lambda_{Stokes} = 1000 \text{ nm}$. Le profil d'intensité SRS obtenu pour une bille de polystyrène isolée, présenté sur la Figure 3.7 a, révèle une largeur FWHM de $2,04 \mu\text{m}$.

La résolution axiale a été mesurée en utilisant un échantillon homogène d'huile d'olive et en ciblant le pic vibrationnel aux alentours de $\sigma = 2946,6 \text{ cm}^{-1}$. Le profil d'intensité SRS a été enregistré en déplaçant l'échantillon longitudinalement. Le profil obtenu est présenté sur la Figure 3.7 b. Il montre une atténuation progressive du signal à mesure que le plan focal s'éloigne de l'interface de l'échantillon. La FWHM axiale, déterminée à partir de la pente du signal, est de $67,12 \mu\text{m}$. Cette valeur relativement élevée est principalement due aux aberrations sphériques du micro-objectif, en particulier le rayon de courbure de la dernière lentille, qui élargit le point focal le long de Z.

3.2.2 Résolution spectrale

La résolution spectrale détermine la capacité du système d'imagerie à distinguer des modes vibrationnels proches. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est couramment utilisé comme étalon de référence en raison de ses pics Raman étroits et intenses, notamment dans la région $2850 - 3850 \text{ cm}^{-1}$ correspondant aux étirements C-H [117].

Le spectre Raman théorique du DMSO est présenté sur la Figure 3.8 a. Les différents modes vibrationnels ont été modélisés par des fonctions de Lorentz, avec des intensités relatives reflétant les contributions proportionnelles de chaque mode. Pour mesurer le spectre,

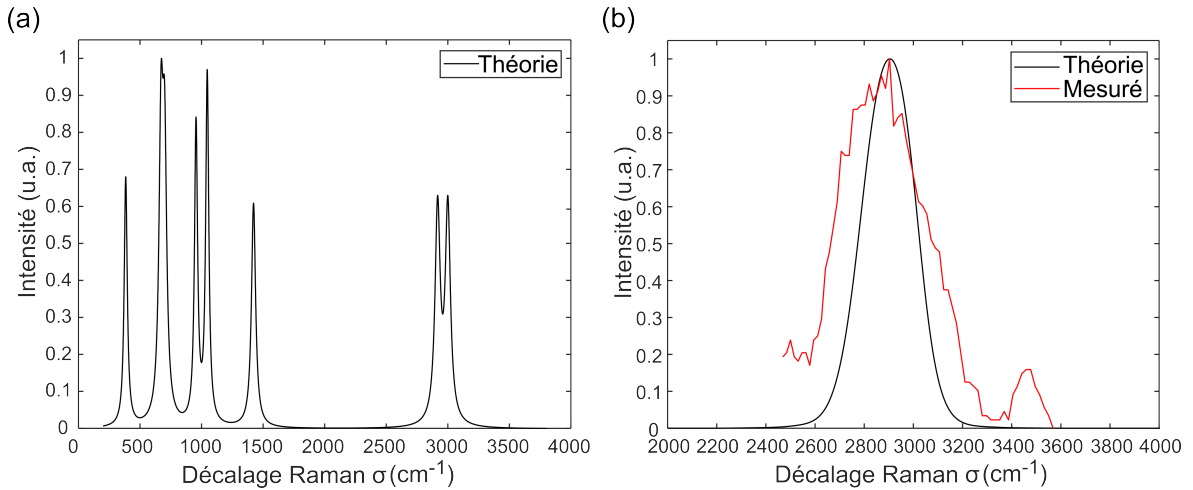


FIGURE 3.8 – (a) Spectre théorique du DMSO, simulé à l'aide de fonctions de Lorentz pour chaque mode vibrationnel [117]. (b) Spectre Raman mesuré du DMSO (courbe rouge). La courbe noire correspond à la réponse spectrale attendue, obtenue par convolution du spectre théorique du DMSO avec les spectres des impulsions femtosecondes utilisées.

un échantillon de DMSO pur a été placé au plan focal de la sonde endoscopique. La longueur d'onde du faisceau Stokes a été maintenue fixe à $\lambda_{Stokes} = 1000 \text{ nm}$, tandis que la longueur d'onde du faisceau pompe a été balayée pour sonder les différentes transitions vibrationnelles. Les résultats expérimentaux sont illustrés par la courbe rouge sur la Figure 3.8 b. La largeur du spectre à mi-hauteur vaut 398 cm^{-1} et correspond à la résolution spectrale du système endoscopique.

La réponse spectrale attendue, représentée en noir sur la même figure, a été calculée en convoluant le spectre Raman théorique du DMSO $S_{Raman}(\sigma)$ avec la largeur spectrale des impulsions femtosecondes utilisées, notée $\Delta S_{laser}(\sigma)$:

$$S_{th}(\sigma) = S_{Raman}(\sigma) * \Delta S_{laser}(\sigma) \quad (3.2)$$

Pour déterminer $\Delta S_{laser}(\sigma)$, les spectres des impulsions à la sortie du laser ont été mesurés pour $\lambda_P = 766$ nm et $\lambda_S = 1000$ nm. Ces spectres ont été convertis dans le domaine fréquentiel puis convolués pour obtenir la largeur effective $\Delta S_{laser}(\sigma)$. La convolution avec $S_{Raman}(\sigma)$ fournit la prédiction du spectre Raman du DMSO attendu avec ce système. La résolution spectrale théorique vaut 263 cm^{-1} .

La résolution spectrale est principalement limitée par la largeur spectrale des impulsions laser. Une légère différence est visible entre le spectre expérimental et la prédiction théorique, due à des effets de *chirp* sur l'un des faisceaux. Ce *chirp* réduit la cohérence temporelle de l'impulsion, entraînant un élargissement du spectre mesuré.

3.3 Imagerie par diffusion Raman stimulée

Pour démontrer les capacités d'imagerie de la sonde endoscopique, des acquisitions ont été réalisées sur différents échantillons fixés et marqués provenant du laboratoire Nu-blat. Chaque échantillon a été placé entre lame et lamelle. Le micro-endoscope était maintenu horizontalement sur un support fixe, tandis que l'échantillon était positionné verticalement sur une platine de translation tridimensionnelle. Les images obtenues ont ensuite été colorées virtuellement à l'aide du logiciel Fiji.

Dans un premier temps, des tests ont été réalisés sur des échantillons présentant un fort signal Raman afin de valider le bon fonctionnement de la sonde. Un échantillon de papier optique imbibé d'huile d'olive a ainsi été imagé à $\sigma = 2949,6 \text{ cm}^{-1}$ ($P_P = P_S = 40 \text{ mW}$). L'image obtenue, présentée sur la Figure 3.9 a, montre un contraste important entre l'huile d'olive et les struc-

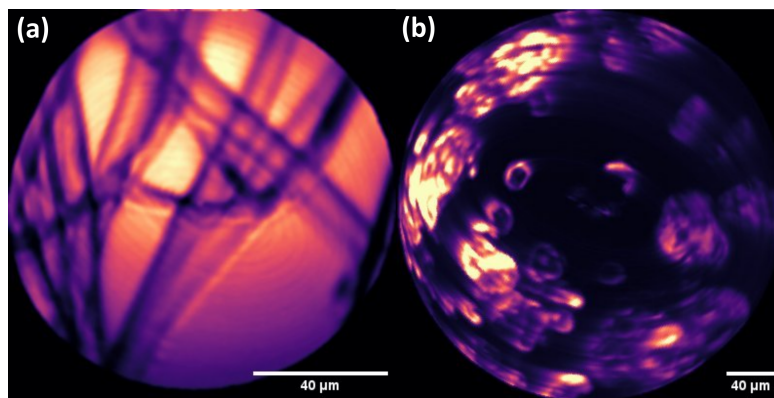


FIGURE 3.9 – Images endoscopiques SRS : (a) Papier optique imbibé d'huile d'olive, imagé à $\sigma = 2949,6 \text{ cm}^{-1}$ ($P_P = P_S = 40 \text{ mW}$), champ de vue : $115 \mu\text{m}$; (b) Amidon de pomme de terre, imagé à $\sigma = 2946,6 \text{ cm}^{-1}$ ($P_P = P_S = 30 \text{ mW}$), champ de vue : $316 \mu\text{m}$. Toutes les images ont été acquises à 1 image par seconde.

tures fibrillaires du tissu optique, démontrant la sensibilité chimique de la sonde. Un second test a été réalisé sur de l'amidon de pomme de terre fixé, imagé à $\sigma = 2946,6 \text{ cm}^{-1}$ (Figure 3.9 b). Les principaux signaux détectés sont associés aux vibrations C - H des groupes méthylènes, situées entre 2800 et 3000 cm^{-1} , caractéristiques des chaînes polysaccharidiques de l'amylopectine. Toutes les images ont été acquises à 1 image par seconde.

Dans une perspective histologique, des images SRS ont ensuite été acquises sur des tissus biologiques fixés, autour de la bande d'étirement des liaisons C - H. En raison de la résolution spectrale limitée du micro-endoscope, les liaisons CH_2 et CH_3 ne peuvent pas être différenciées. Les images contiennent donc toutes les informations relatives aux bandes lipidiques et peptidiques. L'image d'un tissu adipeux non dégraissé (Figure 3.10 a) met en évidence les triglycérides, constituants majeurs du tissu, *via* les bandes C - H symétriques et asymétriques des acides gras. Sur des échantillons de peau de mammifère (Figure 3.10 b) et de moelle osseuse (Figure 3.10 c), les images révèlent les structures lipidiques et peptidiques présentes autour des cellules et dans les zones riches en matrice extracellulaire. Enfin, les Figures 3.10 (d-f) présentent les images acquises sur un tissu d'ossification d'un os long cartilagineux. On y observe notamment les zones de matrice immature, riches en lipides et localisées autour des cellules osseuses.

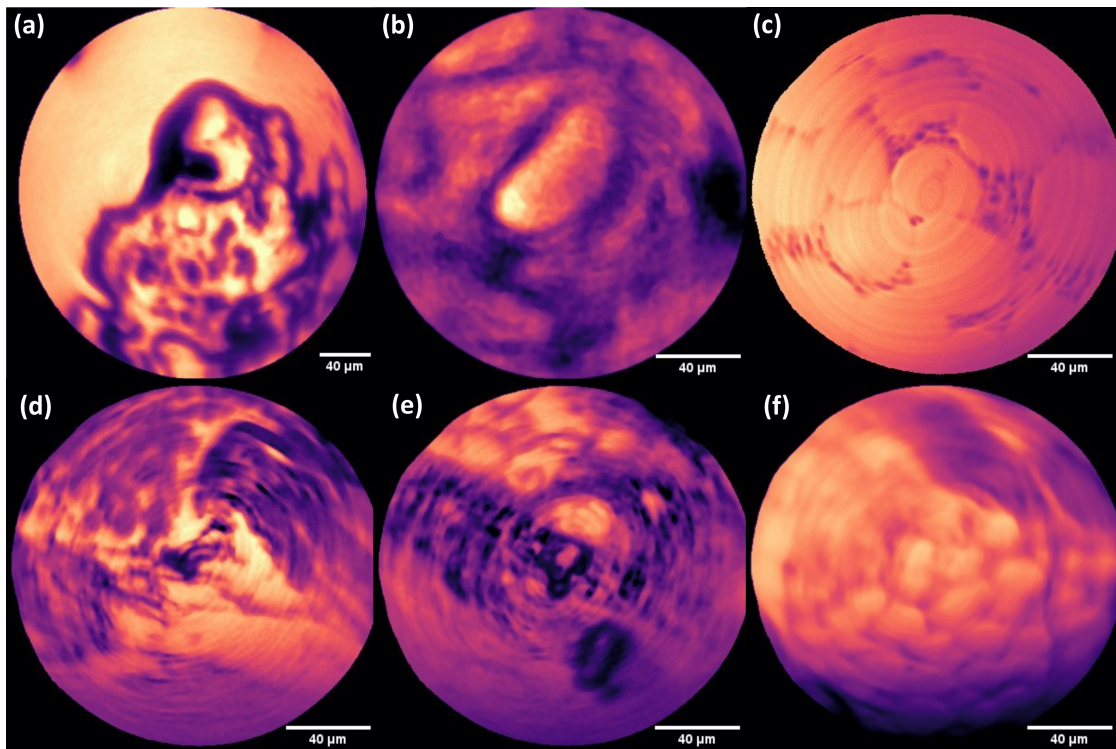


FIGURE 3.10 – Images endoscopiques SRS de tissus biologiques, acquises à $\sigma = 2946,6 \text{ cm}^{-1}$ (a,b) et à $\sigma = 2875 \text{ cm}^{-1}$ (c-f). (a) Tissu adipeux non dégraissé ($P_P = 36,6 \text{ mW}$, $P_S = 30,0 \text{ mW}$), champ de vue : $293 \text{ }\mu\text{m}$; (b) Peau de mammifère avec poils en coupe ($P_P = 36,6 \text{ mW}$, $P_S = 30,0 \text{ mW}$), champ de vue : $147 \text{ }\mu\text{m}$; (c) Moelle osseuse ($P_P = 14,6 \text{ mW}$, $P_S = 17,4 \text{ mW}$), champ de vue : $176 \text{ }\mu\text{m}$; (d)-(f) Ossification d'un os long de cartilage, imagées à différentes positions ($P_P = 19,5 \text{ mW}$, $P_S = 18,7 \text{ mW}$), champ de vue : $176 \text{ }\mu\text{m}$. Toutes les images ont été acquises à 1 image par seconde.

Ces résultats constituent la première démonstration d'imagerie SRS en transmission à

l'aide d'une sonde endoscopique. Le dispositif permet d'obtenir des images sur une grande variété d'échantillons, illustrant son potentiel pour l'analyse de tissus biologiques. Toutefois, certaines sources de bruit inhérentes au système persistent, comme détaillé dans la section suivante.

3.4 Mesure du bruit

Bien que l'utilisation de fibres creuses pour réaliser de l'imagerie Raman cohérente présente de nombreux avantages, il existe plusieurs sources de bruit liées à la fibre optique elle-même ou aux composants optiques de l'endoscope.

3.4.1 Bruit induit par la fibre optique seule

Malgré le fait que la non-linéarité de l'air soit inférieure de plusieurs ordres de grandeur à celle du verre [118], la propagation de deux impulsions courtes dans une fibre creuse s'accompagne d'un bruit d'origine non-linéaire, comme cela a été montré dans la référence [119] dans le cas d'une fibre creuse de type Kagomé. Ce bruit est attribué à une modulation de phase croisée entre les impulsions pompe et Stokes, qui est convertie en modulation d'intensité parasite (à la même fréquence que la fréquence de modulation) par la dépendance spectrale de l'atténuation de la fibre [119].

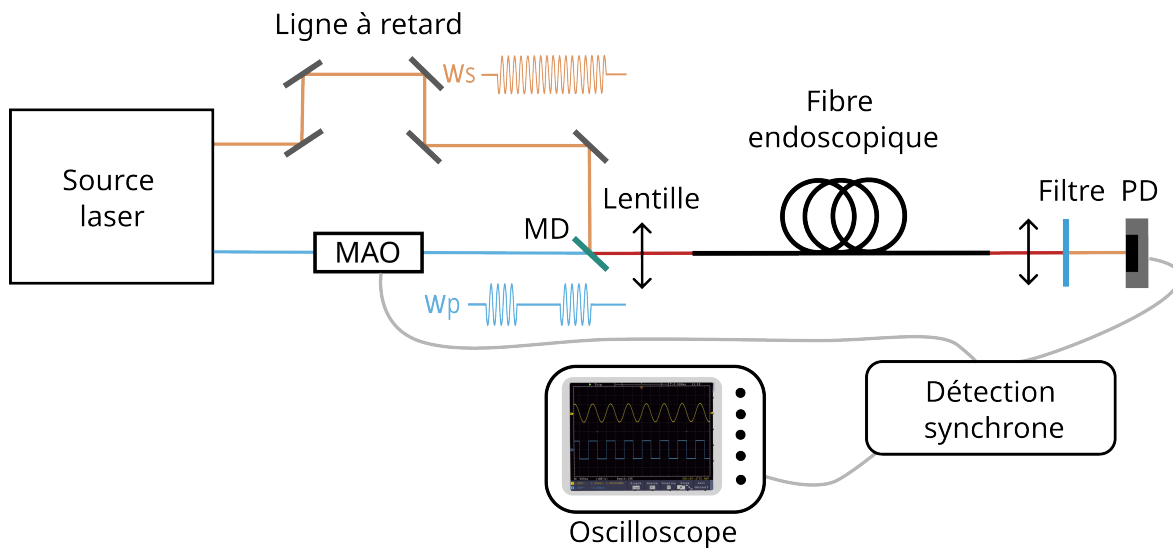


FIGURE 3.11 – Montage expérimental utilisé pour mesurer le bruit au sein de la fibre endoscopique. Le faisceau pompe est modulé en intensité avec un modulateur acousto-optique (MAO), puis recombinaison avec le faisceau de Stokes à l'aide d'un miroir dichroïque (MD). Le signal parasite résultant est détecté en sortie par une photodiode (PD).

Le bruit généré par la fibre a été mesuré à l'aide du montage expérimental illustré sur la Figure 3.11. Le faisceau de pompe est modulé en intensité par un modulateur acousto-optique à une fréquence $f_m = 10$ MHz. Une ligne à retard est placée sur le trajet du faisceau Stokes pour ajuster la synchronisation temporelle entre les deux faisceaux. Les faisceaux

sont ensuite superposés spatialement et injectés dans la fibre à l'aide d'une lentille de distance focale $f' = 20$ mm. En sortie, les faisceaux sont collimatés avec une lentille de distance focale $f' = 8$ mm et d'ouverture numérique $NA = 0,55$. Le faisceau pompe est filtré spectralement, tandis que le faisceau Stokes est dirigé vers la photodiode. Le signal issu de la détection synchrone est mesuré par un oscilloscope.

Les longueurs d'onde sont fixées à $\lambda_p = 774$ nm et $\lambda_s = 1000$ nm, avec une puissance d'entrée de 80 mW par faisceau. Le temps d'intégration de la détection synchrone vaut $\tau = 20$ μ s. La Figure 3.12 a présente l'évolution de la modulation parasite en fonction du retard entre les deux impulsions. La modulation parasite augmente linéairement avec la puissance du faisceau de pompe modulé, comme présenté sur la Figure 3.12 b.

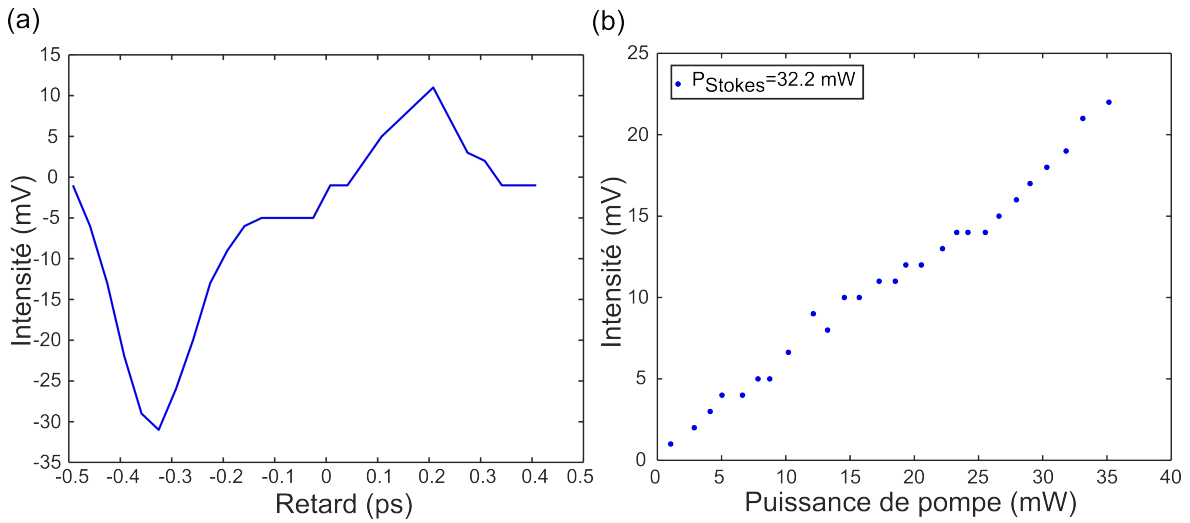


FIGURE 3.12 – Évolution de la modulation parasite en fonction du retard entre les deux impulsions (a) et de la puissance de pompe (b).

3.4.2 Bruit induit par le micro-endoscope complet

Le même protocole de mesure a été réalisé sur le micro-endoscope complet, dans les mêmes conditions expérimentales. La fibre optique a été remplacée par la sonde endoscopique dans le montage expérimental illustré sur la Figure 3.11. Les résultats, présentés sur la Figure 3.13 a montrent une nette augmentation du bruit par rapport à la fibre seule. Cette hausse est principalement due à la propagation des impulsions femtosecondes à travers la fibre GRIN et les optiques distales du système. L'origine de ce bruit n'est pour l'instant pas clairement identifiée.

Pour évaluer si ce bruit compromet l'imagerie, une comparaison a été faite avec le signal obtenu dans un échantillon d'huile d'olive (Figure 3.13 b). Un échantillon d'huile d'olive, placé au plan focal du micro-endoscope, présente un signal SRS beaucoup plus élevé que le bruit de fond. Néanmoins, pour des échantillons ayant une faible réponse Raman, comme des échantillons biologiques, le bruit induit peut devenir limitant.

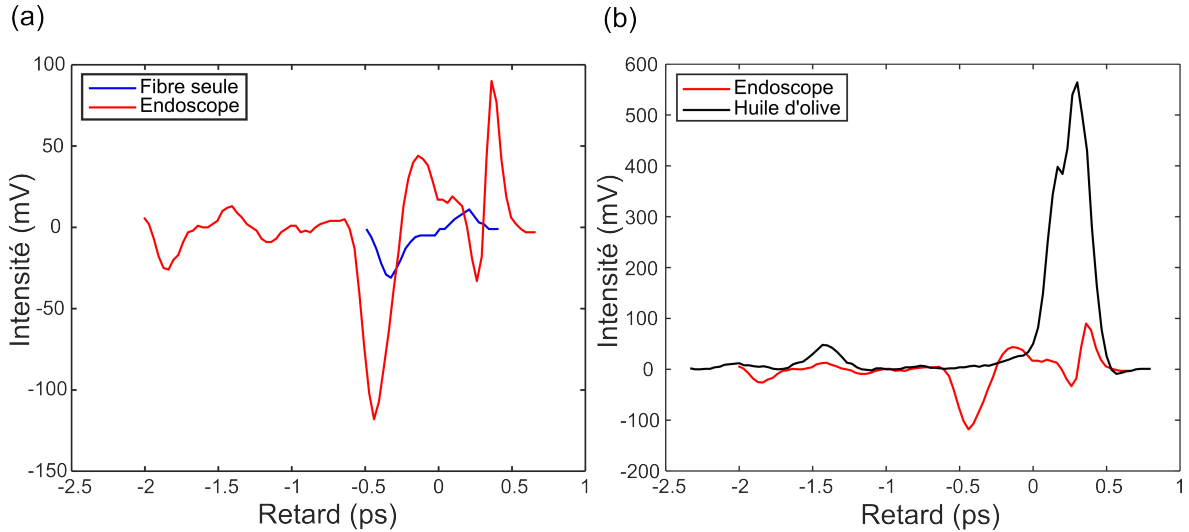


FIGURE 3.13 – Évolution de la modulation parasite en fonction du retard entre les deux impulsions (a) et de la puissance de pompe (b) après propagation dans la fibre optique.

3.4.3 Influence de la polarisation

La fibre NCHCF n'étant pas strictement monomode sur une longueur de l'ordre de quelques mètres, l'état de polarisation n'est pas maintenu et dépend fortement des conditions d'injection. Des variations du signal parasite ont été observées en fonction de l'état de polarisation des faisceaux incidents. Ces variations sont dues principalement à la présence résiduelle des modes d'ordres supérieurs. Bien que l'origine physique de ce bruit ne soit pas totalement identifiée, l'alignement des faisceaux le long des axes neutres de la fibre permet de le minimiser. La Figure 3.14 présente les résultats obtenus, à la fois pour la fibre seule et pour le micro-endoscope. Pour diminuer le bruit, toutes les expériences d'imagerie présentées précédemment ont été réalisées en alignant les faisceaux sur les axes neutres de la fibre optique.

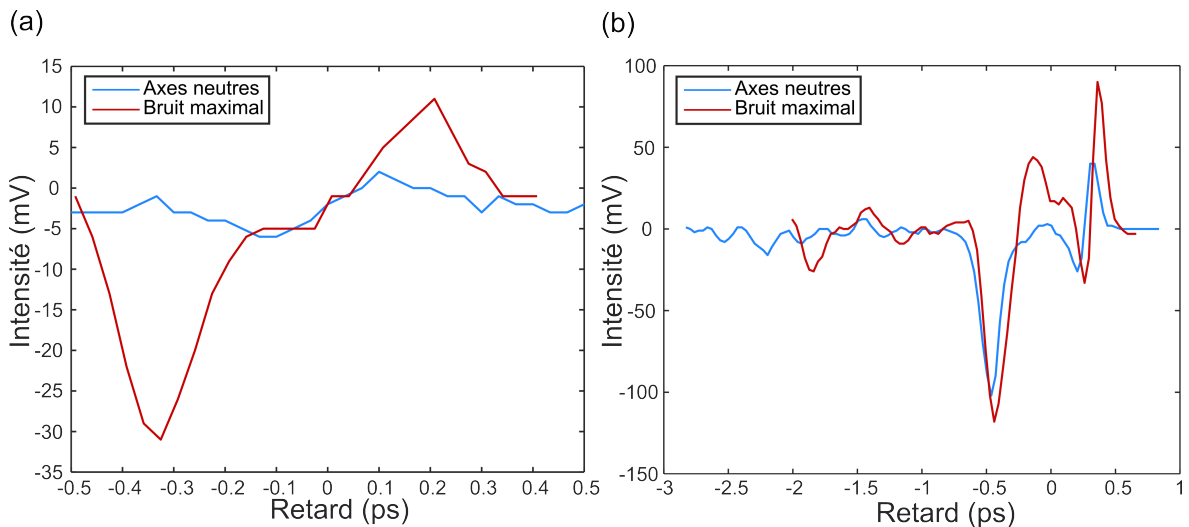


FIGURE 3.14 – Influence de la polarisation sur la modulation parasite mesurée dans la fibre seule (a) et dans le micro-endoscope complet (b).

Conclusion

Ce chapitre a présenté la mise en œuvre expérimentale d'un système d'imagerie endoscopique SRS. L'ensemble du montage optique a été détaillé, depuis la génération et la modulation des impulsions jusqu'à la chaîne de détection adaptée à la micro-endoscopie. Des images ont été acquises sur plusieurs échantillons biologiques fixés, démontrant la capacité de la sonde à fournir des images SRS. Pour la première fois, des images SRS ont été obtenues en configuration endoscopique avec une détection en transmission.

Toutefois, les performances du dispositif restent limitées. La faible résolution axiale dégrade la qualité d'image, notamment dans les échantillons épais. Par ailleurs, la résolution spectrale ne permet pas de distinguer des bandes Raman proches, restreignant ainsi son intérêt pour l'histologie Raman. Enfin, la sensibilité du système est altérée par une modulation parasite issue de la propagation des impulsions dans la fibre optique. L'origine du bruit n'est pas entièrement identifiée notamment car l'état de polarisation dans la fibre n'est pas connu. Ces résultats sont néanmoins très encourageants pour le développement futur de systèmes d'imagerie SRS endoscopique intégrant une détection en transmission. Des améliorations sont encore nécessaires pour envisager une utilisation *in vivo*, notamment *via* l'emploi d'impulsions picosecondes. Le chapitre suivant présente la conception d'un nouveau micro-endoscope SRS intégré, visant à dépasser les contraintes rencontrées avec le premier prototype.

Chapitre IV

Développement et mise en œuvre d'une sonde endoscopique SRS intégrée

La sonde endoscopique présentée précédemment a permis de démontrer la faisabilité de l'imagerie SRS à travers un système fibré et miniaturisé. Des images ont été obtenues sur des tissus biologiques, révélant le potentiel de ce dispositif pour des applications biomédicales. Néanmoins, ce système présente certaines limites qui restreignent son utilisation en conditions *in situ*. La résolution axiale de 67 μm reste insuffisante pour distinguer certaines structures subcellulaires, telles que les noyaux, notamment dans les tissus épais. Par ailleurs, le bruit intrinsèque du système limite la détection des signaux SRS faibles, compliquant l'analyse des tissus peu contrastés. Pour pallier ces inconvénients, une nouvelle sonde endoscopique a été développée. Cette seconde génération vise à améliorer les performances optiques du système dans le but de réaliser un bilan SRH sur des tissus frais et non fixés.

Ce chapitre décrit la conception opto-mécanique de la tête endoscopique, intégrant les micro-objectifs de focalisation et de collection dans une structure compacte. Les performances optiques de la nouvelle sonde sont évaluées, notamment en termes de résolution spatiale et spectrale. Une première série d'images SRS, acquises en régime femtoseconde sur divers échantillons biologiques frais, est présentée. Ces résultats sont complétés par d'autres modalités d'imagerie non linéaire (2PEF, SHG, CARS) pour permettre une analyse multimodale des tissus. Enfin, le potentiel de la sonde pour des applications histologiques est démontré en régime picoseconde. Pour la première fois, des images SRH ont été obtenues en configuration endoscopique sur des échantillons de foie de rat cirrhotique. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus avec un microscope SRH commercial afin d'évaluer la qualité et la pertinence des informations fournies par la sonde.

4.1 Conception de la tête endoscopique

La sonde endoscopique présentée au Chapitre 2 a été modifiée afin d'améliorer les performances optiques du système. Les optiques de focalisation et de collection ont été repensées à cet effet, tandis que le dispositif de scanner fibré a été conservé en raison de ses bonnes performances et de sa stabilité.

Les sections suivantes présentent la conception des micro-objectifs et l'intégration mécanique du système, conduisant à une sonde endoscopique compacte et intégrée. Une synthèse des caractéristiques finales de la sonde SRS est présentée.

4.1.1 Micro-objectif de focalisation

L'étude de l'architecture optique de la première version de la sonde a montré que les aberrations sphériques entraînaient une dégradation de la résolution axiale du système. Pour y remédier, un nouveau micro-objectif de focalisation a été conçu. Il est constitué de trois lentilles achromatiques traitées dans la gamme VIS-NIR, disponibles chez Edmund Optics, de 2 mm de diamètre et de distances focales f' respectives de 9, 6 et 4 mm. Un barreau en verre poli à 45°, de longueur 4 mm, est placé après les lentilles et permet de réfléchir les impulsions laser vers l'échantillon. Ce composant a été fabriqué sur mesure par l'entreprise Ecoptik. La surface polie du barreau a été traitée avec un revêtement hautement réfléchissant, permettant de réfléchir 98,8 % des faisceaux de pompe et de Stokes. L'architecture optique complète est représentée sur la Figure 4.1 a.

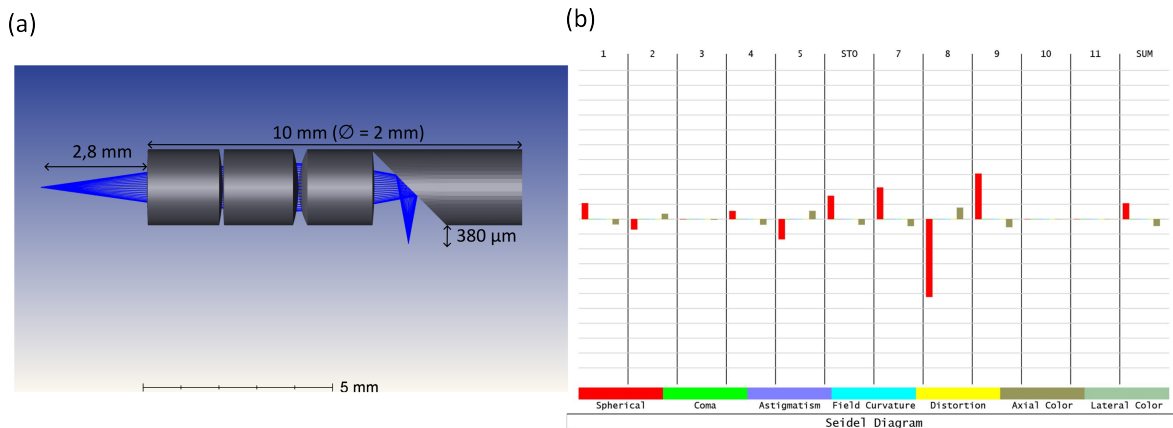


FIGURE 4.1 – Modélisation du micro-objectif sous Zemax (a) et diagramme de Seidel associé (b), illustrant les principales aberrations optiques du système.

Ce système optique présente un grandissement théorique de 0,78 pour les longueurs d'onde de pompe ($\lambda_p = 760$ nm) et de Stokes ($\lambda_s = 1000$ nm). La distance entre l'extrémité distale de la fibre et la première lentille est de 2,8 mm, tandis que la distance de travail côté échantillon est de 380 μm. Cette configuration permet d'obtenir une ouverture numérique du côté de l'échantillon de 0,19 et de 0,17 pour les faisceaux de pompe et de Stokes, respectivement. En tenant compte du grandissement du système optique, les PSF en sortie sont respectivement 1,40 μm et 1,79 μm.

Le micro-objectif possède peu d'aberrations, comme l'illustre le diagramme de Seidel sur la Figure 4.1 b. Chaque numéro correspond à une surface optique traversée par le faisceau, et la surface 11 représente le plan focal à la sortie du micro-objectif. Des aberrations sphériques et chromatiques sont présentes au plan focal, engendrées par la dernière lentille du système.

a) Mesure des PSF

La PSF des faisceaux de pompe et de Stokes a été mesurée selon le protocole expérimental décrit au Chapitre 2. La PSF correspond à la largeur à mi-hauteur de la réponse impulsionnelle observée sur la caméra.

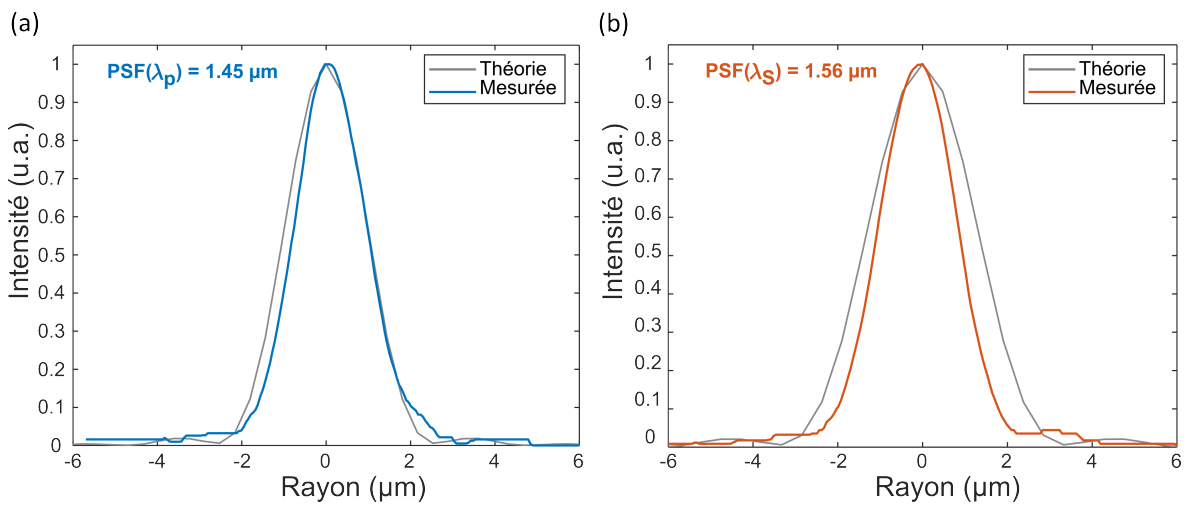


FIGURE 4.2 – Comparaison des PSF théoriques (Huygens) et mesurées pour les faisceaux de pompe (a) et de Stokes (b).

Les PSF mesurées sont de $1,45 \mu m$ pour le faisceau de pompe et de $1,56 \mu m$ pour le faisceau de Stokes, correspondant à des erreurs relatives de 3,6 % et de 12,8 % par rapport aux PSF théoriques. Contrairement au premier micro-objectif développé, ces valeurs sont proches de celles obtenues théoriquement à partir du grandissement du système. Cela signifie que les aberrations de ce micro-objectif sont suffisamment faibles pour ne pas provoquer d'élargissement significatif de la taille de la PSF.

L'écart plus important observé sur le faisceau de Stokes s'explique principalement par la mesure du grandissement optique du montage, réalisé uniquement à $\lambda = \lambda_p$, sans correction pour la longueur d'onde de Stokes λ_s . La lentille suivant l'objectif de microscope n'étant pas achromatique, cela introduit une erreur systématique dans l'estimation de la PSF à cette longueur d'onde. La Figure 4.2 compare les PSF théoriques (Huygens) et mesurées pour les deux faisceaux.

4.1.2 Micro-objectif de collection

Pour maximiser l'efficacité de collection du signal SRS, le micro-objectif de collection a également été modifié. Celui-ci repose sur un barreau en verre poli à 45°, identique à celui utilisé dans le système de focalisation, associé à une lentille bi-convexe (65-296, Edmund Optics) de distance focale $f' = 1,5$ mm. Le signal non linéaire est transmis à l'unité de détection grâce à une fibre optique multimode. L'architecture complète du système optique est illustrée sur la Figure 4.3 a.

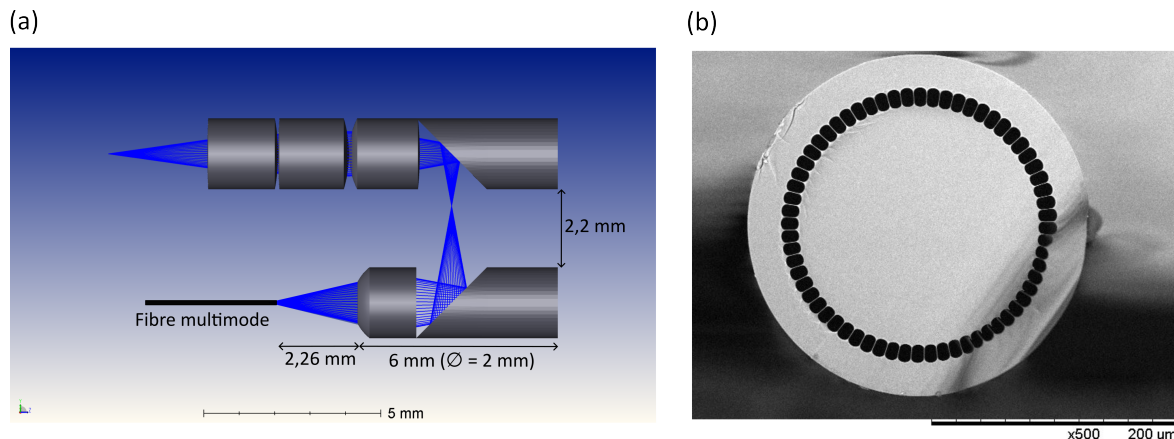


FIGURE 4.3 – Modélisation des micro-objectifs de focalisation et de collection sous Zemax (a), et image MEB de l'extrémité de la fibre collectrice (b).

La fibre collectrice est une fibre à couronne d'air fabriquée par FiberTech Lille. Elle possède un cœur en silice de 194 μ m de diamètre, entouré de capillaires de 590 μ m d'épaisseur. Son diamètre externe est de 278 μ m et son ouverture numérique, mesurée à 500 nm, est de 0,41. La fibre est positionnée à 2,26 mm de la lentille de collection. Une image MEB est présentée sur la Figure 4.3 b. Le micro-objectif de collection est positionné à 2,2 mm du micro-objectif de focalisation, ce qui permet de collecter 92 % du signal SRS généré dans l'échantillon. Cette valeur correspond à la valeur mesurée.

4.1.3 Intégration de la tête endoscopique

L'ensemble du système optique est encapsulé dans un tube métallique de 3 mm de diamètre externe. La Figure 4.4 présente les plans mécaniques de la tête endoscopique (a) ainsi qu'une photographie de l'ensemble assemblé (b). Le micro-objectif de focalisation est fixé mécaniquement au corps de l'endoscope par un système de vissage. Une ouverture circulaire a été réalisée dans le support mécanique, sous la surface polie à 45° du barreau de verre, pour transmettre les impulsions laser vers l'échantillon. L'épaisseur du tube métallique est de 100 μ m. Le micro-objectif de collection est positionné à 2 mm de l'optique de focalisation et fixé à celle-ci au moyen d'un système de vissage. Cette partie est rendue amovible, indépendamment de la partie de focalisation, pour faciliter la calibration du système d'imagerie. Une ouverture circulaire a également été pratiquée dans le support mécanique du micro-objectif, au-dessus du barreau en verre, afin de collecter le signal SRS. La fibre

collectrice, insérée dans une gaine de protection, est directement collée à l'arrière du micro-objectif de collection.

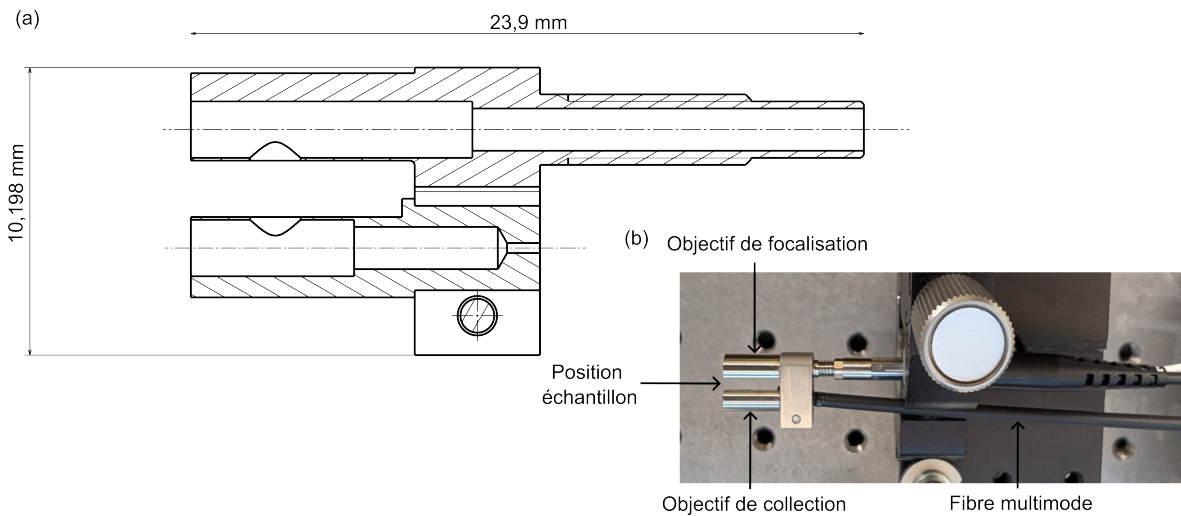


FIGURE 4.4 – Plan mécanique de la tête endoscopique SRS (a) et photographie de la tête endoscopique une fois assemblée (b).

4.1.4 Architecture complète de la sonde endoscopique

En résumé, la sonde endoscopique, illustrée sur la Figure 4.5, est constituée d'une fibre NCHCF d'une longueur de 2,5 m. Son extrémité distale est fonctionnalisée avec une fibre GRIN afin d'obtenir une PSF inférieure à $2\text{ }\mu\text{m}$ pour chacun des faisceaux. L'ensemble est collé à l'intérieur d'un tube piézoélectrique doublement résonant, afin de balayer l'échantillon sur un champ de vue supérieur à $300\text{ }\mu\text{m}$ à une fréquence de résonance de 900 Hz. Ce dispositif fibré est intégré au corps de l'endoscope et collé à celui-ci grâce à deux supports en céramique. Les faisceaux sont focalisés sur l'échantillon à l'aide d'un micro-objectif vissé directement sur le corps de l'endoscope. Les PSF obtenues sur l'échantillon sont de l'ordre de $1,5\text{ }\mu\text{m}$ par faisceau. Les transmissions optiques mesurées du micro-endoscope sont de

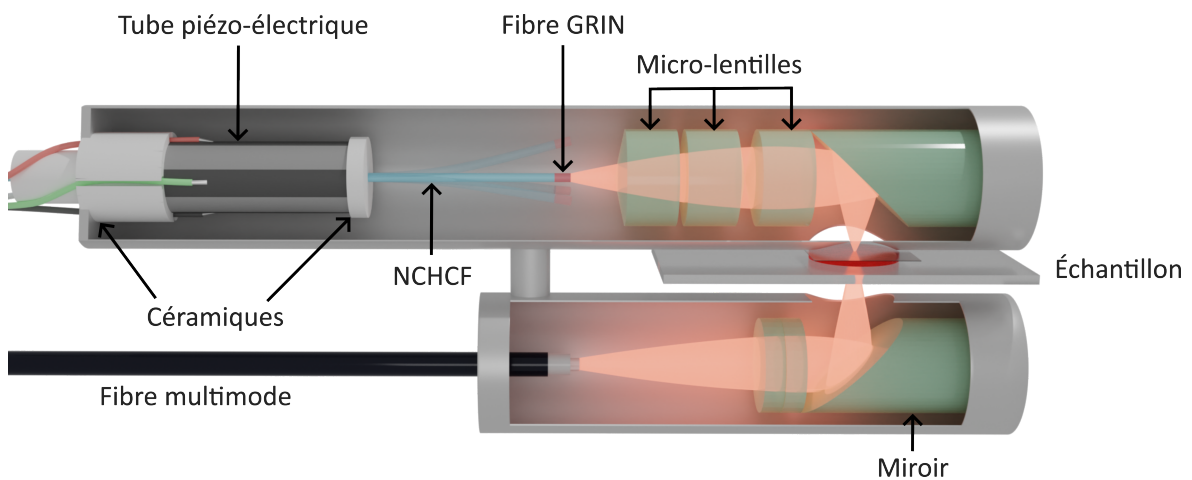


FIGURE 4.5 – Architecture interne de la tête endoscopique.

60 % et 50 % pour les faisceaux pompe et Stokes, respectivement. Le signal SRS est collecté à

92 % grâce au micro-objectif de collection positionné derrière l'échantillon. La distance entre les deux montures optiques est de 2 mm, et la tête endoscopique complète mesure 10,2 mm.

4.2 Caractérisation des performances optiques de la sonde

La résolution spatiale du micro-endoscope a été évaluée selon le même protocole que celui décrit au chapitre précédent.

La résolution transverse a été mesurée avec des billes de polystyrène de 1 μm de diamètre, déposées entre lame et lamelle. Les longueurs d'onde des faisceaux pompe et Stokes ont été ajustées pour exciter le mode vibrationnel du polystyrène à $\sigma = 3054,5 \text{ cm}^{-1}$ [116], ce qui correspond à $\lambda_p = 766 \text{ nm}$ et $\lambda_s = 1000 \text{ nm}$. Le profil d'intensité SRS obtenu pour une bille isolée est représenté sur la Figure 4.6 a. La résolution latérale, évaluée à partir de la largeur à mi-hauteur, est de 1,88 μm .

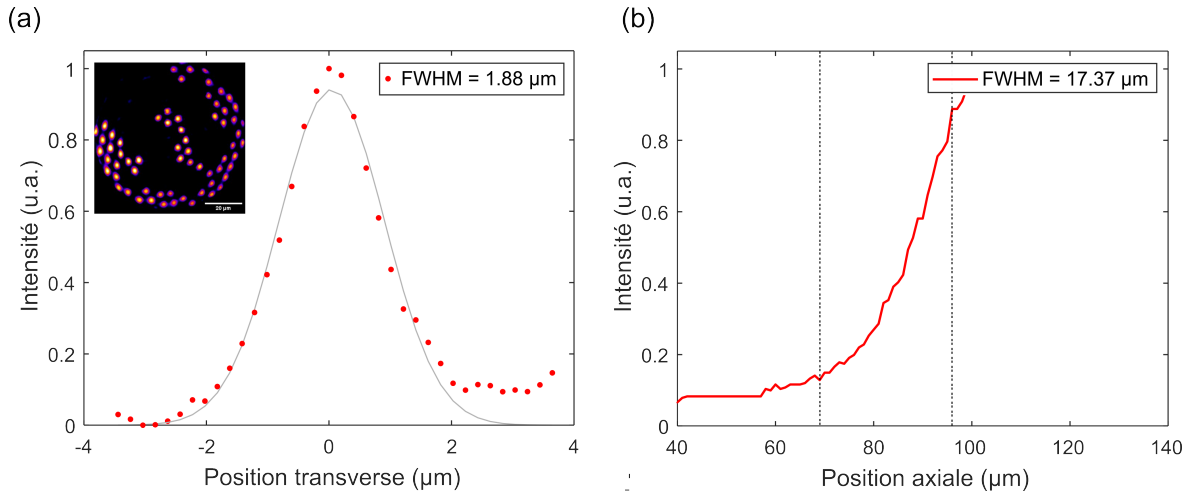


FIGURE 4.6 – Résolutions SRS latérale et axiale. (a) Image SRS de billes de polystyrène de 1 μm de diamètre, acquise à $\sigma = 3054,8 \text{ cm}^{-1}$. Le profil d'intensité (points rouges) est ajusté par une fonction gaussienne (courbe grise). (b) Mesure de la résolution axiale à $\sigma = 2930 \text{ cm}^{-1}$ ($P_p = P_s = 16 \text{ mW}$). Le profil rouge correspond aux données expérimentales, et les lignes grises indiquent les niveaux d'intensité à $\frac{I_{\text{max}}}{e^2}$.

La résolution axiale a été déterminée à partir d'un échantillon homogène d'huile d'olive, en ciblant le mode vibrationnel à $\sigma = 2930 \text{ cm}^{-1}$. Le profil d'intensité résultant, présenté sur la Figure 4.6 b, révèle une largeur à mi-hauteur de 17,37 μm , correspondant à la résolution axiale du système d'imagerie. Bien qu'elle ne soit pas encore optimale, cette valeur représente une amélioration de 73 % par rapport à la première version de la sonde endoscopique.

4.3 Imagerie par diffusion Raman stimulée en régime femtoseconde

4.3.1 Montage expérimental

L'imagerie SRS a été réalisée en régime femtoseconde selon le montage expérimental présenté sur la Figure 4.7. Ce montage est identique à celui décrit dans le chapitre précédent, à l'exception de la chaîne de détection qui a été modifiée pour réaliser, en parallèle de l'imagerie SRS, l'imagerie multiphotonique.

Un miroir dichroïque placé à la sortie de la fibre collectrice transmet les longueurs d'onde supérieures à 850 nm et réfléchit les longueurs d'onde inférieures. Une première unité de détection, placée en transmission, est dédiée à l'imagerie SRS. Elle se compose d'un filtre et d'une photodiode couplée à un amplificateur à détection synchrone. Une seconde unité de détection, placée en réflexion, est utilisée pour l'imagerie 2PEF, SHG et CARS. Les impulsions laser sont focalisées sur un PMT à l'aide d'une lentille, et un filtre placé devant le détecteur sélectionne l'effet non linéaire souhaité. Cette configuration permet de reconstruire des images multimodales des échantillons.

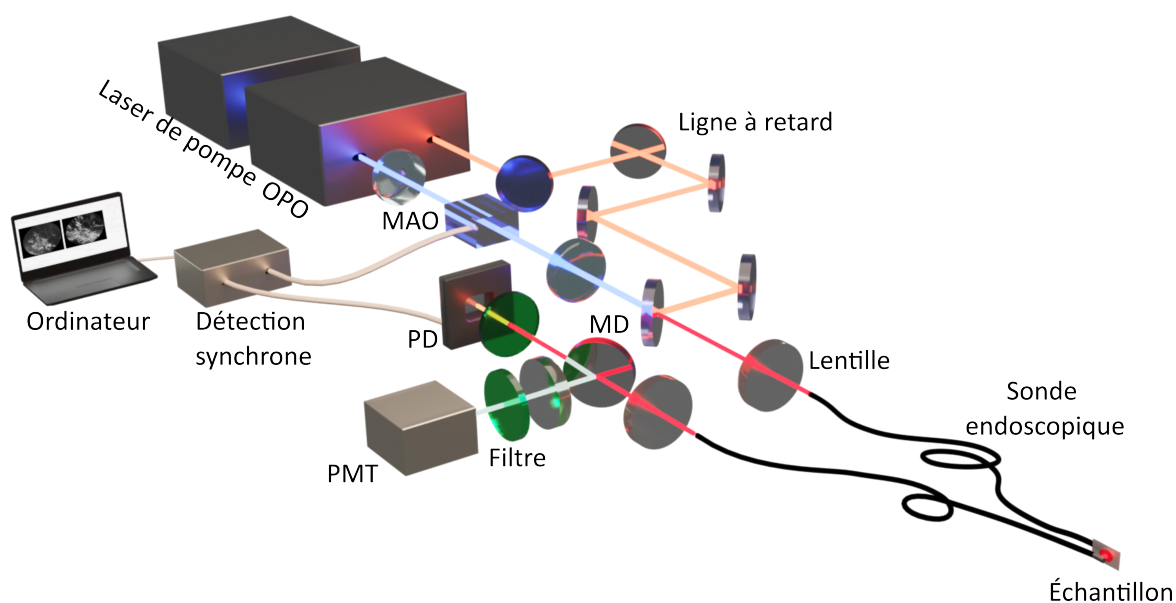


FIGURE 4.7 – Montage expérimental utilisé pour l'imagerie multimodale SRS.

4.3.2 Imagerie multimodale

a) Imagerie sur des échantillons végétaux

Pour cette étude, différents échantillons de plantes frais et non fixés ont été imagés. La Figure 4.8 (a-d) présente les résultats obtenus sur un échantillon de pollen de châtaignier, placé entre lame et lamelle. L'imagerie 2PEF (Figure 4.8 a) permet de visualiser les vacuoles et le cytoplasme des cellules. Les fibres de cellulose (microfibrilles) sont révélées grâce au processus SHG (Figure 4.8 b), tandis que l'imagerie SRS (Figure 4.8 c) met en évidence les

groupements méthylène (liaisons CH_2) et méthyle (liaisons CH_3). L'image composite finale, combinant les trois contrastes non linéaires, est illustrée à la Figure 4.8 d.

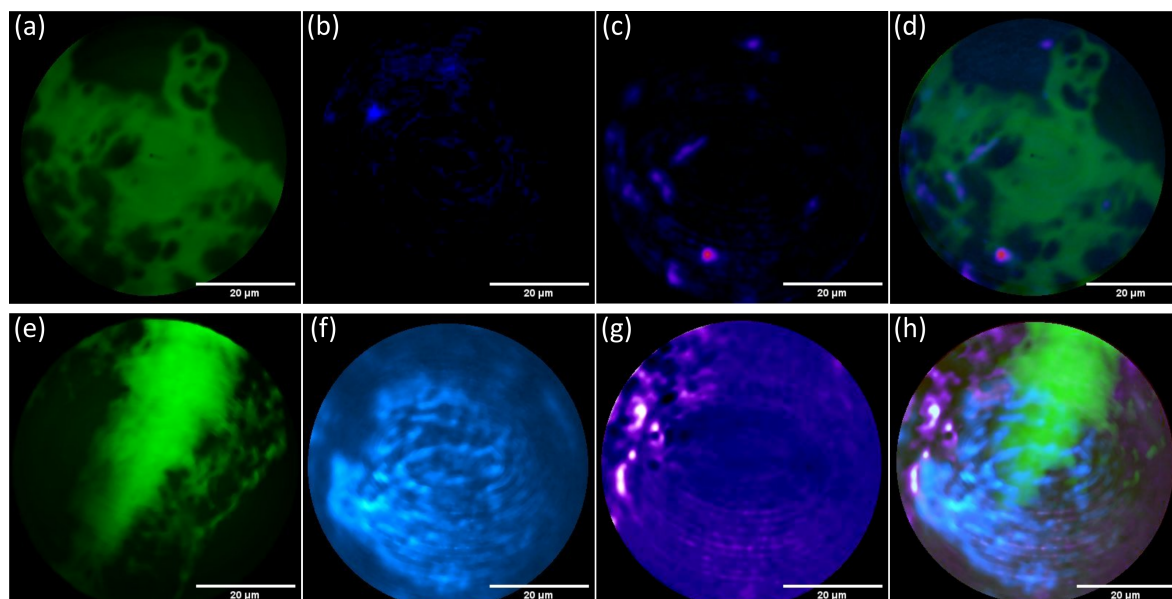


FIGURE 4.8 – Images endoscopiques multimodales de végétaux, acquises à $\sigma = 2920 \text{ cm}^{-1}$ avec une puissance moyenne de 45 mW par faisceau sur l'échantillon.

(a-d) : Images 2PEF (a), SHG (b), SRS (c) et image composite (d) d'un échantillon de pollen de châtaignier.

(e-h) : Images 2PEF (e), SHG (f), SRS (g) et image composite (h) d'un échantillon de Ficus ginseng. Toutes les images ont été acquises à une image par seconde, sur un champ de vue de 59 μm .

Une image multimodale a également été acquise sur un échantillon de Ficus ginseng. Une feuille de la plante a été découpée au scalpel, puis placée entre lame et lamelle, avec une épaisseur d'environ 1 mm. Les résultats, présentés sur la Figure 4.8 (e-h), mettent en évidence les mêmes structures que celles observées dans le pollen de châtaignier. Le signal SHG (Figure 4.8 f) est plus intense, car la coupe de l'échantillon permet de visualiser les microfibrilles longitudinalement.

b) Imagerie sur des échantillons biologiques

Un échantillon de cerveau de rat, frais et fixé, a été analysé à l'aide de différentes techniques d'imagerie non linéaire. La Figure 4.9 (a-b) illustre les résultats obtenus avec les modalités CARS et SRS. La modalité SRS présente l'avantage d'être exempte de signal non résonant de fond, contrairement au processus CARS, où ce dernier contribue à augmenter le bruit de l'image. Le processus SRS offre également la possibilité de détecter les noyaux cellulaires. Toutefois, les impulsions femtosecondes utilisées ici ne permettent pas de distinguer les vibrations CH_2 et CH_3 . L'image obtenue correspond donc à la somme des contributions de ces deux liaisons, rendant l'observation des noyaux cellulaires impossible dans cette configuration. Des images 2PEF (Figure 4.9 c) et SHG (Figure 4.9 d) ont également été acquises sur cet échantillon, et l'image composite finale est présentée sur la Figure 4.9 f.

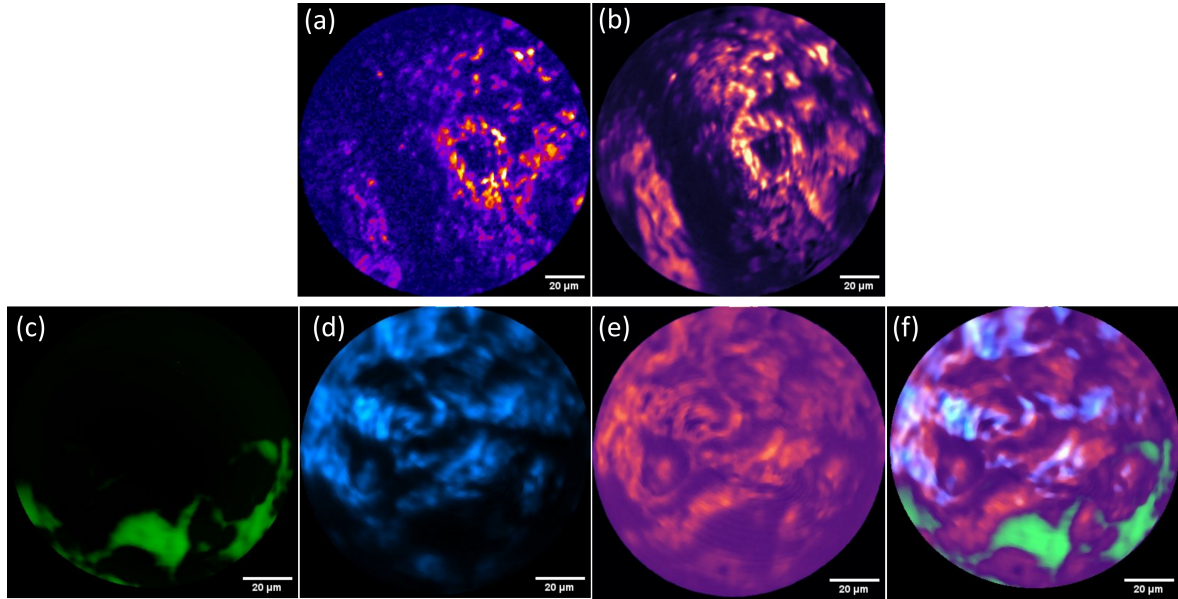


FIGURE 4.9 – Images endoscopiques multimodales d’un échantillon de cerveau de rat, frais et fixé, acquises à $\sigma = 2920 \text{ cm}^{-1}$ avec une puissance moyenne de 40 mW par faisceau sur l’échantillon. (a-b) : Comparaison entre l’imagerie CARS (a) et SRS (b) sur une même zone de l’échantillon (champ de vue : $147 \text{ }\mu\text{m}$). (c-f) : Images 2PEF (c), SHG (d), SRS (e) et image composite (f), acquises sur un champ de vue de $118 \text{ }\mu\text{m}$. Toutes les images ont été acquises à une image par seconde.

Des images 2PEF et SRS ont également été acquises sur un échantillon frais et non fixé de rein de rat. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.10 (a-c). Des images 2PEF et SRS ont également été acquises sur un échantillon frais et non fixé de rein de rat. Afin d’évaluer

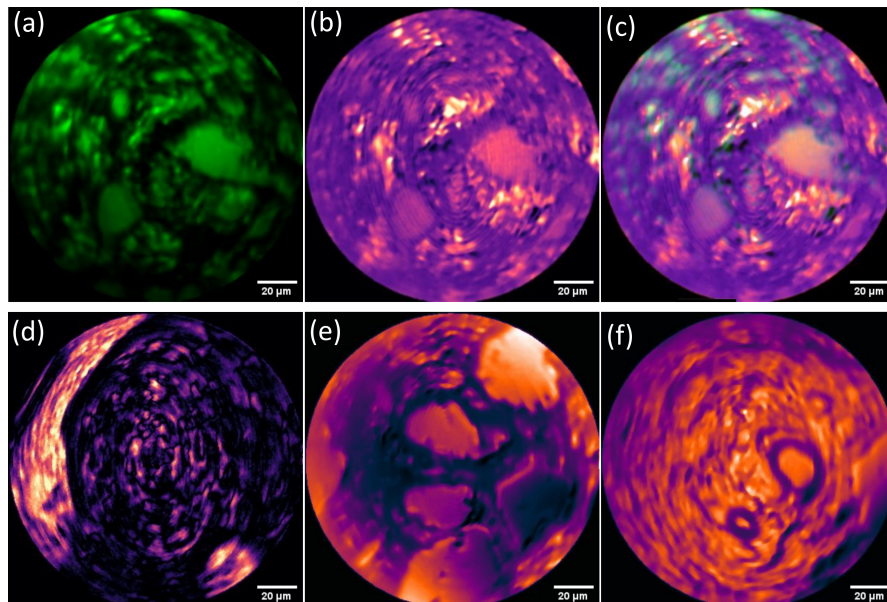


FIGURE 4.10 – Images 2PEF et SRS d’échantillons de foie de rat, frais et non fixés, acquises à $\sigma = 2845 \text{ cm}^{-1}$ avec une puissance moyenne de 25 mW par faisceau sur l’échantillon. (a-c) : Images 2PEF (a), SRS (b) et image composite (c) acquises sur une même zone de l’échantillon. (d-f) : Images SRS d’échantillons de foie de rat sain (d) et cirrosé (e-f). Toutes les images ont été acquises à une image par seconde, sur un champ de vue de $147 \text{ }\mu\text{m}$.

le potentiel de la sonde endoscopique pour la détection de pathologies, des échantillons de foie de rat sain (Figure 4.10 d) et cirrhoté (Figure 4.10 (e-f)) ont été analysés. La cirrhose est une pathologie hépatique chronique caractérisée par la destruction progressive des cellules du foie et le développement d'une fibrose hépatique. Cette pathologie se caractérise par une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques (Figure 4.10 e), tandis que les structures fibrillaires apparaissent nettement plus denses que dans un foie sain (Figure 4.10 f). La capacité de la sonde endoscopique à révéler ces changements morphologiques au sein des tissus souligne son intérêt pour le diagnostic précoce des tissus pathologiques. Ces résultats ouvrent la voie vers un diagnostic histologique réalisable directement sur le patient. C'est la première fois que des altérations tissulaires ont pu être observées, en configuration endoscopique dans une configuration de transmission vers l'avant.

4.4 Imagerie par diffusion Raman stimulée en régime picoseconde

4.4.1 Montage expérimental

Dans l'optique de réaliser un bilan SRH en temps réel, la sonde endoscopique a été testée en régime picoseconde à l'aide du montage expérimental illustré sur la Figure 4.11. Ces expériences ont été menées dans les locaux de Lightcore Technologies, en raison de l'absence de source laser picoseconde adaptée à Lille. La source laser utilisée (deltaEmerald,

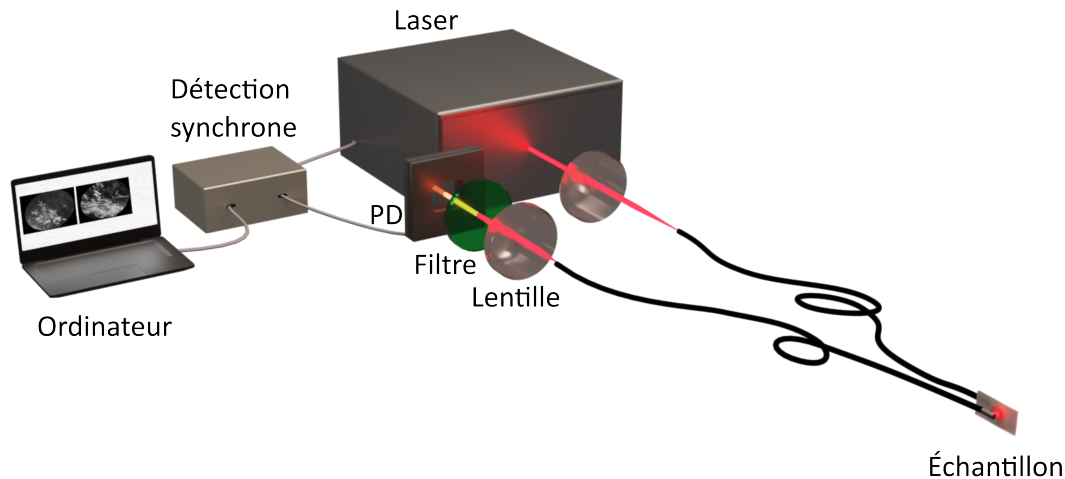


FIGURE 4.11 – Montage expérimental utilisé pour réaliser de l'imagerie SRS.

APE) est spécifiquement conçue pour l'imagerie SRS "bi-couleur" [40], car elle permet d'exciter simultanément deux bandes vibrationnelles dans un même système. Elle génère un faisceau pompe accordable entre 740 et 990 nm, ainsi que deux faisceaux Stokes fixes, centrés à $\lambda_{S_1} = 1034$ nm et $\lambda_{S_2} = 1025$ nm et modulés respectivement à 10 MHz et 13 MHz. Les faisceaux Stokes sont spatialement superposés au faisceau pompe, et une ligne à retard intégrée sur le trajet de la pompe assure leur synchronisation temporelle. Chaque faisceau

délivre des impulsions de 1 ps avec une puissance moyenne de quelques centaines de milliwatts. En fixant la pompe à $\lambda_P = 793,5$ nm, les bandes vibrationnelles des liaisons CH_2 ($\sigma = 2850 \text{ cm}^{-1}$ et CH_3 ($\sigma = 2930 \text{ cm}^{-1}$) sont excitées simultanément.

Les trois faisceaux sont injectés dans le micro-endoscope à l'aide d'une lentille de distance focale $f' = 30$ mm. Le taux de transmission à travers l'endoscope est de 43 % pour le faisceau pompe, et de 60 % pour les faisceaux Stokes. Une lentille est placée après la fibre collectrice ($f' = 8$ mm, $\text{NA} = 0,55$) pour collimater les faisceaux. Les faisceaux Stokes sont ensuite filtrés (FESH1000, Thorlabs), et le faisceau de pompe est transmis à l'unité de détection. Celle-ci est composée d'une photodiode et d'un amplificateur à détection synchrone.

Les signaux SRS (SRL), générés respectivement à 10 MHz et 13 MHz, sont détectés simultanément, puis séparés en deux voies distinctes à la sortie de la détection synchrone. Ces signaux sont ensuite transmis à la carte d'acquisition et associés à une position dans le champ de vue, comme décrit au Chapitre 3. Cela permet la reconstruction en temps réel d'images SRH, avec des temps d'intégration ajustables entre 100 ns et 20 μs . Un logiciel dédié permet de contrôler la phase, le gain, l'offset ainsi que le temps d'intégration de la détection synchrone.

4.4.2 Évaluation de la résolution spectrale de la sonde

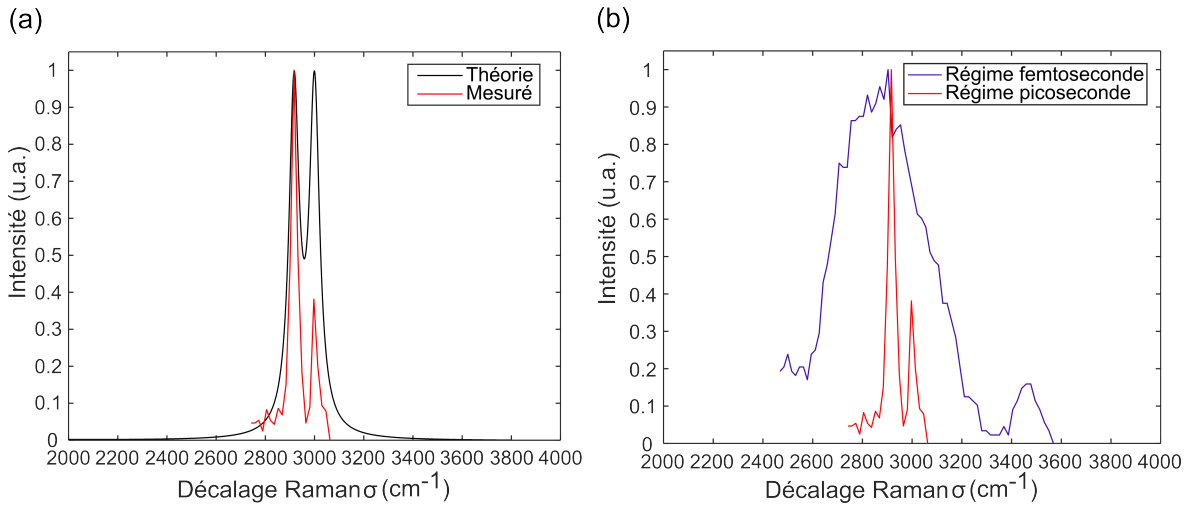


FIGURE 4.12 – (a) Spectre Raman du DMSO mesuré en régime picoseconde (courbe rouge). La courbe noire représente le spectre simulé à l'aide de fonctions de Lorentz pour chaque mode vibrationnel. (b) Comparaison de la résolution spectrale entre les régimes femtoseconde (courbe violette) et picoseconde (courbe rouge).

La résolution spectrale a été mesurée à partir d'un échantillon pur de DMSO [117], placé au plan focal du micro-endoscope. Le spectre Raman du DMSO mesuré (courbe rouge) est comparé au spectre Raman théorique simulé à l'aide de fonctions de Lorentz (courbe noire) sur la Figure 4.12 a. En régime picoseconde, la résolution spectrale est de 30 cm^{-1} . Dans ces conditions, les deux pics vibrationnels situés aux alentours de 2800 et 3200 cm^{-1} sont différenciables, contrairement au régime femtoseconde qui présente une résolution

spectrale de 398 cm^{-1} (Figure 4.12 b). Cette résolution spectrale accrue est indispensable à la reconstruction d'images SRH.

4.4.3 Mesure du bruit de la sonde

Le bruit de la sonde endoscopique a été mesuré selon le protocole décrit au Chapitre 3. Aucun échantillon n'est placé au plan focal du micro-endoscope et le signal mesuré en sortie du système est évalué pour plusieurs positions de la ligne à retard. La longueur d'onde du faisceau de pompe est fixée à $\lambda_P = 793,5 \text{ nm}$ et le faisceau de Stokes à $\lambda_{S_1} = 1034 \text{ nm}$. La puissance d'entrée vaut $99,5 \text{ mW}$ et $74,5 \text{ mW}$, respectivement. Le signal de bruit mesuré est illustré sur la Figure 4.13.

En régime picoseconde (Figure 4.13 a), le bruit est significativement réduit par rapport au régime femtoseconde (Figure 4.13 b), car des impulsions temporellement plus longues entraînent une puissance crête plus faible. Cette diminution limite les effets indésirables, tels que la XPM dans la fibre optique, ce qui améliore le rapport signal sur bruit du système.

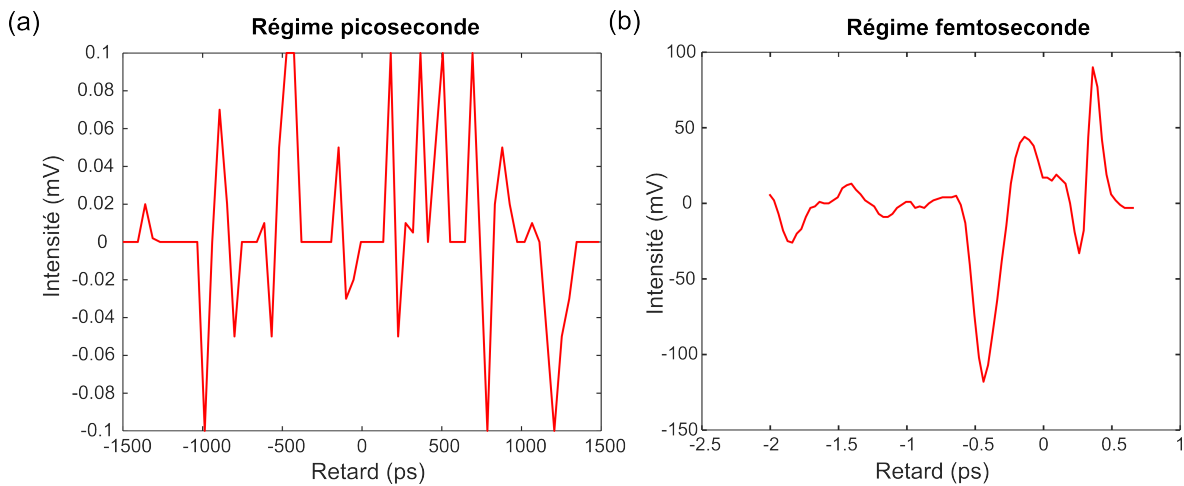


FIGURE 4.13 – Évolution de la modulation parasite en fonction du délai entre les deux impulsions après propagation dans le micro-endoscope.

4.4.4 Imagerie SRH sur des échantillons frais et non fixés

L'imagerie SRH a été réalisée *ex vivo* sur des échantillons de foie de rat atteints de cirrhose, présentant différents degrés de sévérité. Les échantillons ont été classés dans différentes catégories pathologiques (de A à C), permettant ainsi d'observer l'évolution progressive des altérations tissulaires, de l'état sain à l'état fortement pathologique.

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'aide d'un cryostat Leica CM1950, produisant des sections de $10 \mu\text{m}$ à partir de tissus congelés. Chaque coupe a été placée entre lame et lamelle, puis conservée à -80°C jusqu'à l'imagerie.

Les images SRS des liaisons CH_2 ($\sigma = 2850 \text{ cm}^{-1}$) et CH_3 ($\sigma = 2930 \text{ cm}^{-1}$) ont été acquises simultanément en fixant le faisceau de pompe à $\lambda_P = 793,3 \text{ nm}$. Chaque échantillon a été imagé à la fois avec la sonde endoscopique et avec un microscope SRH commercial

(BondXplorer, Lightcore Technologies). Les champs de vue ont été ajustés pour être identiques entre les deux systèmes.

La Figure 4.14 présente les résultats obtenus pour les différentes catégories de foie, classées de la moins atteinte (catégorie A) à la plus sévèrement atteinte (catégorie C). Les images endoscopiques (à gauche) sont comparées aux images issues du microscope SRH (à droite) pour les liaisons moléculaires CH_2 et CH_3 . Les images présentées sont les images brutes, sans coloration virtuelle, moyennées sur 10 acquisitions. Le bruit a été soustrait aux images endoscopiques.

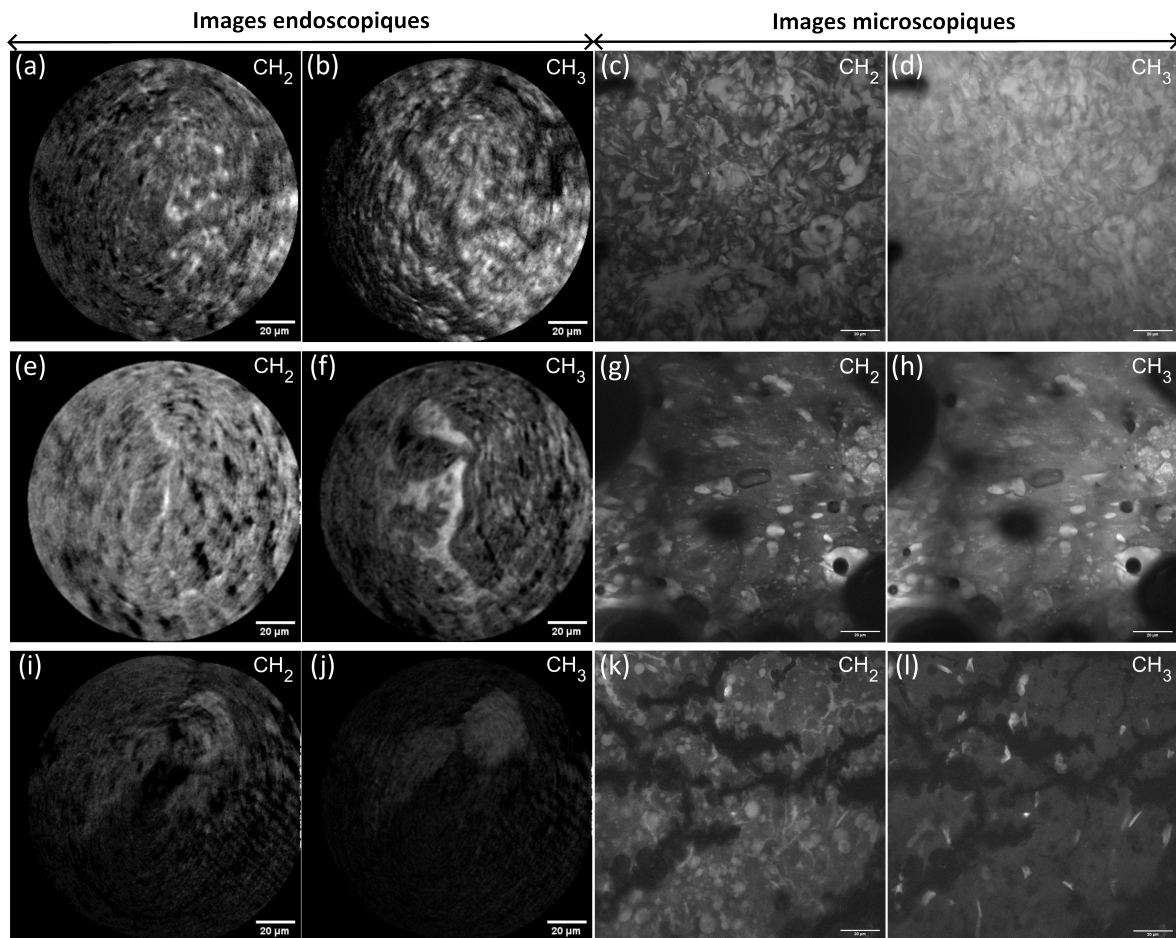


FIGURE 4.14 – Comparaison des images SRS obtenues en configuration endoscopique et microscopique sur des échantillons de foie de rat sain et cirrhotique. La première colonne correspond aux images endoscopiques des liaisons CH_2 , la deuxième colonne aux liaisons CH_3 . Les troisième et quatrième colonnes présentent les images microscopiques correspondantes sur les mêmes échantillons. Les images (i-l) ont été acquises sur une biopsie de foie de 2 mm d'épaisseur.

Les images endoscopiques et microscopiques ont été acquises sur un champ de vue de $147\ \mu\text{m}$, avec une puissance de 101 mW pour la pompe et de 84 mW pour les faisceaux de Stokes.

Le signal SRS collecté étant plus faible en configuration endoscopique, les images sont plus bruitées que celles issues de la microscopie. Par ailleurs, l'utilisation d'optiques miniaturisées limite la résolution du micro-endoscope et ainsi la détection des structures fines. Néanmoins, les systèmes permettent de visualiser des structures comparables, comme les

altérations morphologiques associées à la progression de la maladie. Les structures fibrillaires apparaissent plus denses que dans un foie sain, tandis que les gouttelettes lipidiques sont à la fois plus nombreuses et de plus grande taille. L'imagerie sur une biopsie de foie (≈ 2 mm d'épaisseur, Figure 4.14 (i-l)) met en évidence la capacité de la sonde à fournir un bilan histologique Raman fidèle, dans une configuration potentiellement compatible avec une utilisation *in vivo*, bien que son diamètre reste encore relativement important.

a) Reconstruction des images SRH virtuelles

Une coloration virtuelle SRH [39] a été appliquée aux images acquises précédemment, afin d'obtenir des coupes histologiques similaires à celles de l'histologie standard (H&E). La Figure 4.15 (a-h) représente les images individuelles des liaisons CH_2 , CH_3 , de leur différence $\text{CH}_3 - \text{CH}_2$, ainsi que des composites. Les images SRH reconstruites sont illustrées

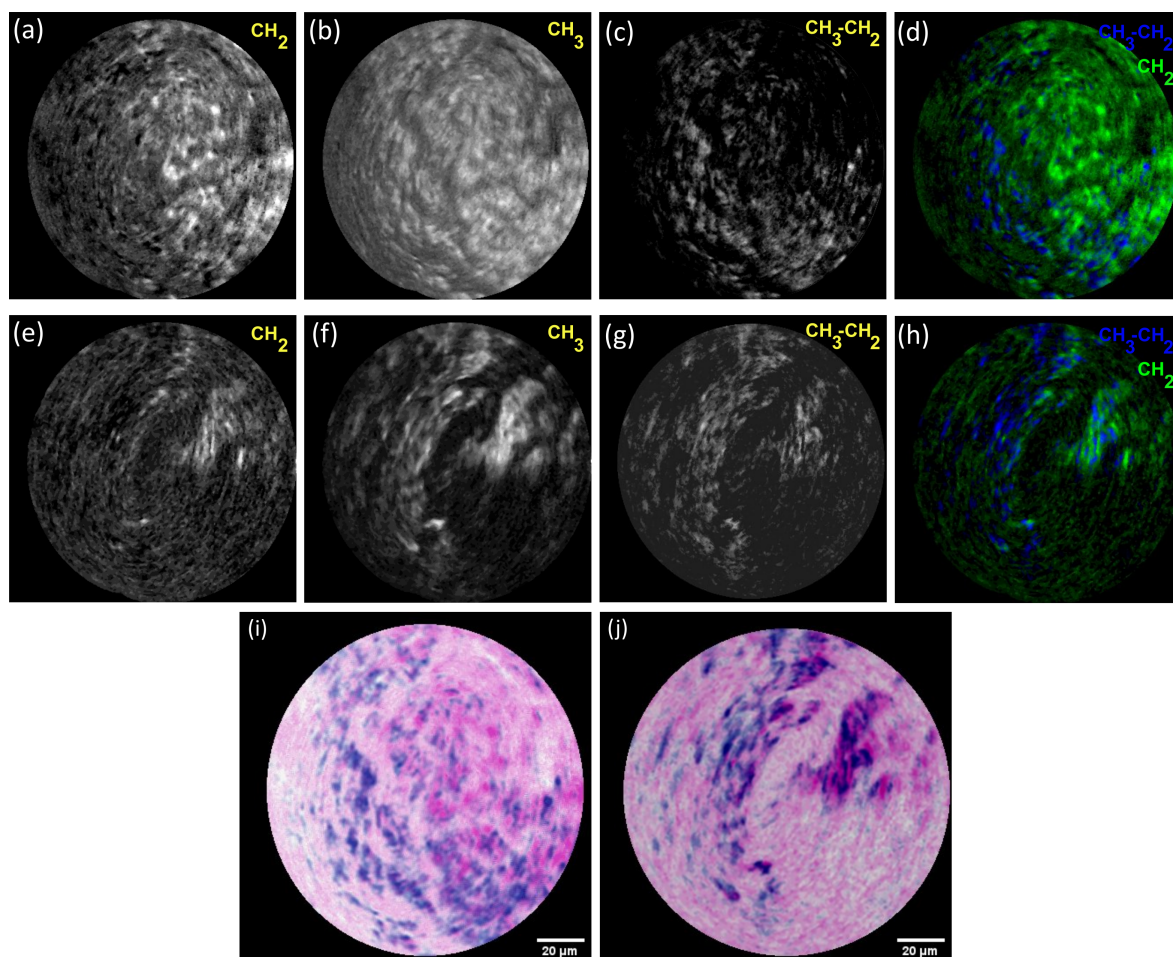


FIGURE 4.15 – Images histologiques d'échantillons de foie de rat frais et non fixés. (a)-(e) Images SRS des liaisons CH_2 abondantes dans les lipides; (b)-(f) Images SRS des liaisons CH_3 caractéristiques des protéines et de l'ADN. En attribuant l'image $\text{CH}_3 - \text{CH}_2$ au canal bleu ((c)-(g)) et l'image CH_2 au canal vert, on obtient un contraste adapté à la l'histologie (d)-(h). Les images SRH ainsi générées sont représentées dans les Figures (i) et (j).

sur la Figure 4.15 (i-j). Les signaux $\text{CH}_3 - \text{CH}_2$ révèlent les noyaux cellulaires, tandis que les liaisons CH_2 mettent en évidence les structures fibreuses associées à la fibrose hépatique

ainsi que les régions riches en lipides. Cette coloration virtuelle facilite l'interprétation par les spécialistes, sans recourir aux techniques de coloration chimique.

Conclusion

Dans ce chapitre, une version améliorée de la sonde endoscopique a été développée. Les deux micro-objectifs ont été intégrés dans une structure compacte, spécifiquement conçue pour des applications endoscopiques. Par rapport à la première génération, les performances optiques ont été significativement améliorées, avec une augmentation de 73 % de la résolution axiale. En régime femtoseconde, l'imagerie SRS a été couplée à d'autres modalités non linéaires (2PEF, SHG, CARS), permettant d'établir une cartographie multimodale des échantillons biologiques.

Pour la première fois, des images SRH ont été obtenues *ex vivo* sur des tissus frais et non fixés, en configuration endoscopique. Les expériences réalisées sur des tissus de foie de rat atteints de cirrhose ont démontré la capacité de cette technologie à révéler des altérations morphologiques associées aux différents stades de la pathologie. Comparée à un microscope de laboratoire, la sonde présente un degré de miniaturisation rendant son utilisation *in vivo* envisageable, tout en conservant une qualité d'image suffisante pour identifier les structures biologiques.

Néanmoins, certaines limitations subsistent, notamment en ce qui concerne les performances optiques et la compacité du dispositif. Pour améliorer les résolutions latérale et axiale, l'architecture optique du système doit être repensée. Les lentilles actuellement utilisées ont été sélectionnées parmi des composants disponibles dans le commerce, sans être spécifiquement optimisées pour l'imagerie SRS. Afin de pallier cette contrainte, une architecture optique sur mesure a été développée en collaboration avec l'entreprise Bena Optics. Pour accroître la quantité de signal non linéaire collectée, l'intégration d'une photodiode directement au sein du micro-objectif de collection a également été imaginée. Cette configuration vise à éviter les pertes induites par la fibre collectrice. Enfin, la structure mécanique assurant le maintien des deux micro-objectifs demeure trop encombrante pour une application *in vivo*. Une modification de l'architecture mécanique a donc également été engagée, dans le but de rendre l'ensemble plus compact et mieux adapté aux contraintes cliniques.

À la clôture du projet doctoral, les nouveaux composants optiques et mécaniques commandés n'avaient pas encore été livrés.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont porté sur le développement d'une sonde endoscopique miniaturisée dédiée à l'imagerie par diffusion Raman stimulée. Dans un premier temps, les principes fondamentaux des modalités d'imagerie non linéaire ont été présentés, ainsi que leurs principales applications en microscopie. Ces techniques sont très intéressantes pour l'imagerie biomédicale, car elles permettent une imagerie sans marquage et offrent une plus grande profondeur de pénétration que les méthodes d'imagerie conventionnelles. Parmi elles, la modalité de diffusion Raman stimulée s'est distinguée par sa capacité à fournir un diagnostic histologique rapide et non invasif. Grâce à sa sélectivité chimique intrinsèque, elle permet la reconstruction d'images reproduisant fidèlement le contraste et le code couleur des colorations H&E, tout en s'affranchissant de l'usage de marqueurs exogènes. Cette approche ouvre ainsi la voie à une imagerie histologique quasiment en temps réel sur des tissus biologiques frais. Dans la perspective d'un diagnostic histologique *in vivo*, une attention particulière a été portée aux sondes endoscopiques multiphotoniques. Les contraintes associées au transport d'impulsions ultracourtes (< 10 ps) ont été analysées, de même que les solutions technologiques permettant de limiter les effets de dispersion et de non-linéarité. Les principaux verrous à surmonter pour l'intégration du processus de diffusion Raman stimulée dans un dispositif endoscopique compact ont également été identifiés.

Une sonde endoscopique à diffusion Raman intégrant une détection en configuration épi a été développée. Les impulsions laser sont transmises vers l'échantillon grâce à une fibre optique à cœur creux à courbure négative. La bande de transmission de la fibre s'étend de 700 à 1400 nm, avec des pertes inférieures à 40 dB.km^{-1} . La dispersion mesurée est inférieure à $5 \text{ ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$ sur l'ensemble de la bande de transmission. L'extrémité distale de la fibre a été fonctionnalisée afin de réduire le diamètre du mode de sortie et d'améliorer la résolution du système. Pour cela, un segment de fibre à gradient d'indice a été soudé, permettant d'obtenir des diamètres de mode inférieurs à $2 \mu\text{m}$ pour chacune des longueurs d'onde utilisées. Le balayage de l'échantillon est assuré par un tube piézoélectrique doublement résonant, qui permet d'exciter la fibre à sa fréquence de résonance, selon deux axes orthogonaux. Le motif de balayage en spirale généré permet de couvrir un champ de vue jusqu'à $600 \mu\text{m}$. Un premier micro-objectif placé derrière la fibre endoscopique focalise les faisceaux de pompe et de Stokes sur l'échantillon. Celui-ci est composé de micro-lentilles et d'un système réfléchissant. Le signal non linéaire généré dans l'échantillon est collecté par un second micro-objectif, positionné derrière l'échantillon. Le signal non linéaire est ensuite transmis vers l'unité de détection grâce à une fibre optique fortement multimode.

Deux sondes endoscopiques ont été développées au cours de ce projet. La première a permis de démontrer la faisabilité de l'imagerie par diffusion Raman stimulée à travers un dispositif miniaturisé fibré, en configuration épi. Une seconde génération de micro-endoscope a ensuite été élaborée, permettant une amélioration de 73 % de la résolution axiale par rapport à la première version. L'ensemble des composants a été intégré dans une structure métallique compacte de 3 mm de diamètre externe, 40 mm de longueur et 10,2 mm d'épaisseur.

Pour la première fois, des images histologiques Raman ont été obtenues sur des échantillons de foie cirrhotique à l'aide de cette sonde endoscopique. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux issus d'un microscope de laboratoire, démontrant la capacité de la sonde à restituer les mêmes structures biologiques. Grâce à son architecture compacte, le micro-endoscope ouvre la voie à une imagerie par diffusion Raman stimulée *in vivo*, jusque-là inaccessible avec les microscopes de laboratoire.

Ce travail a permis de valider expérimentalement la faisabilité de l'imagerie Raman stimulée à travers un dispositif endoscopique compact, et d'en démontrer la pertinence pour l'imagerie biomédicale. À terme, cette technologie pourrait constituer un outil de diagnostic histologique *in vivo* performant, permettant une détection rapide et sans marquage des altérations tissulaires, directement au bloc opératoire. Dans ce contexte, la sonde développée dans ces travaux a pour but d'être valorisée par la société Lightcore Technologies, qui prévoit sa commercialisation à des fins de transfert clinique.

Annexe A

Système endoscopique mobile pour l'imagerie non linéaire multimodale

Les sondes endoscopiques multiphotoniques constituent un outil précieux pour l'imagerie *in vivo* et peu invasive [11, 114, 109]. Cependant, leur usage reste généralement limité au laboratoire en raison du nombre et du volume des composants nécessaires à leur fonctionnement.

Pour surmonter cette limitation, un dispositif endoscopique intégré et autonome a été développé. Tous les éléments indispensables à l'imagerie multiphotonique — source laser, électronique, systèmes de calibration et de détection — ont été regroupés au sein d'une plateforme mobile compacte. Ce système, nommé InSplorer, est désormais commercialisé par Lightcore Technologies et permet l'imagerie basée sur les processus 2PEF, SHG et CARS.

Pour accéder aux contrastes 3PEF et THG, l'utilisation d'impulsions laser sub-100 fs est nécessaire. Toutefois, les sources capables de générer de telles impulsions restent actuellement trop volumineuses pour être intégrées dans un système endoscopique compact. Une solution de déport des impulsions par fibre optique a donc été mise en place, permettant d'acheminer des impulsions ultracourtes (inférieures à 100 fs) depuis une source laser externe vers le dispositif endoscopique intégré.

Ce chapitre décrit en détail le système endoscopique InSplorer et le montage expérimental développé pour le déport d'impulsions laser dans le cadre de l'imagerie 3PEF et THG. Les performances optiques du système seront évaluées pour chacune des modalités étudiées (2PEF, 3PEF, SHG, THG), et des expériences d'imagerie non linéaire seront menées sur une variété d'échantillons biologiques frais et non fixés.

1.1 Présentation du système InSplorer

Le système InSplorer, représenté sur la Figure 1.1 a, est un dispositif endoscopique entièrement intégré et autonome, conçu pour l'imagerie multiphotonique. Les sections suivantes détaillent chacun des composants du dispositif.

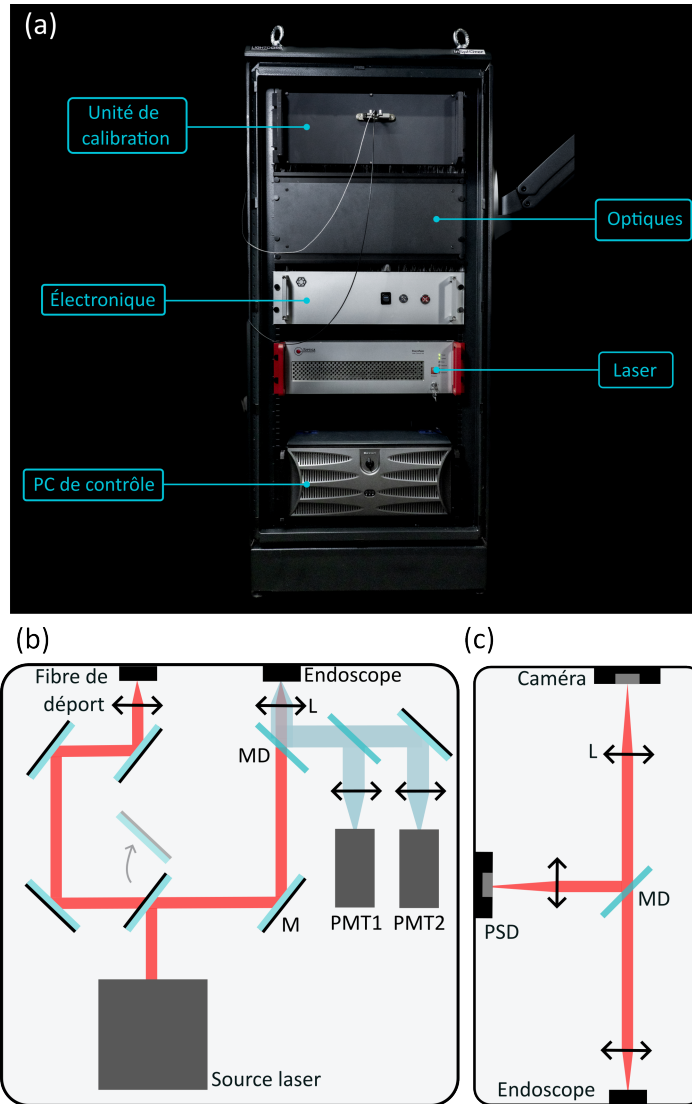


FIGURE 1.1 – (a) Photographie du dispositif endoscopique InSplorer, (b) unité optique du système, et (c) unité de calibration du micro-endoscope.

1.1.1 Architecture optique du système

Le système endoscopique possède deux unités optiques distinctes. La première, illustrée sur la Figure 1.1 b, est dédiée au couplage optique et à la détection du signal non linéaire. Elle intègre une source laser à fibre compacte femtoseconde pour l'imagerie multiphotonique. Dans cette étude, il s'agit d'un laser émettant à 920 nm, délivrant des impulsions d'une puissance moyenne supérieure à 1,5 W, avec une fréquence de répétition de 80 MHz et une durée d'impulsion légèrement inférieure à 100 fs (Femto Fiber ultra 920, Toptica).

Cette source peut être remplacée par tout autre laser intégrable à 780, 920 ou 1050 nm, délivrant des impulsions de 100 fs à 80 MHz, adaptées à l'imagerie 2PEF, SHG et éventuellement THG (1050 nm). Une source laser picoseconde peut également être utilisée pour l'imagerie CARS (Picus DUO OEM, Refined Laser).

Le faisceau laser est injecté dans la fibre à cœur creux du micro-endoscope. Un miroir placé sur un support pivotant permet de commuter entre les deux configurations. Le signal non linéaire généré dans l'échantillon (2PEF, SHG, CARS, etc.) est collecté par le micro-endoscope et séparé du faisceau d'excitation par un miroir dichroïque, puis dirigé vers l'unité de détection. Celle-ci est composée de deux PMT permettant la détection simultanée de deux signaux non linéaires distincts, en fonction des filtres utilisés. Le système présente une transmission globale supérieure à 40 %, offrant une puissance suffisante pour réaliser de l'imagerie non linéaire à partir d'une source laser de 1 W.

La seconde unité optique, illustrée sur la Figure 1.1 c, est l'unité de calibration. Cette unité est identique à celle présentée dans le Chapitre 3. La tête distale de l'endoscope est connectée à l'avant de l'armoire, et le point focal en mouvement est imagé simultanément par une caméra et un PSD, qui enregistre les positions (x , y) de la fibre lors du balayage. La calibration est effectuée automatiquement grâce au logiciel InSplorer développé par la société.

1.1.2 Électronique et calibration du système d'imagerie

Le système d'imagerie est piloté par un ordinateur intégré au dispositif. Le clavier est monté sur un bras articulé pour faciliter son utilisation lors des manipulations. Toute l'électronique de contrôle du tube piézoélectrique est également intégrée au dispositif. Les signaux générés par la carte d'acquisition sont amplifiés, puis transmis au tube piézoélectrique afin de contrôler précisément le déplacement de la fibre lors du balayage.

Pendant la séance d'imagerie, chaque intensité mesurée par les PMT est enregistrée et associée à une position dans la matrice de balayage. Le système permet typiquement d'imager un champ de vue de 600 μm , à une cadence pouvant atteindre 10 images par seconde.

1.1.3 Sonde endoscopique

Le micro-endoscope utilisé repose sur la même architecture que celui décrit dans le Chapitre I. La Figure 1.2 illustre l'architecture interne de la tête endoscopique. Une fibre à cœur creux à courbure négative et à double gaine est utilisée pour acheminer le faisceau laser jusqu'à l'échantillon. Cette fibre possède un diamètre de mode de 24 μm à 800 nm et des pertes inférieures à 0,7 dB.m^{-1} . Sa longueur est de 2,5 mètres. Son extrémité distale est fonctionnalisée avec une fibre GRIN pour obtenir une largeur à mi-hauteur de 4,2 μm . L'ensemble est intégré dans un tube piézoélectrique doublement résonant afin de balayer l'échantillon. Le faisceau laser focalisé à l'extrémité de la fibre GRIN est ré-imagé sur l'échantillon à l'aide d'un micro-objectif. Le signal non linéaire est récupéré en rétro-diffusion par

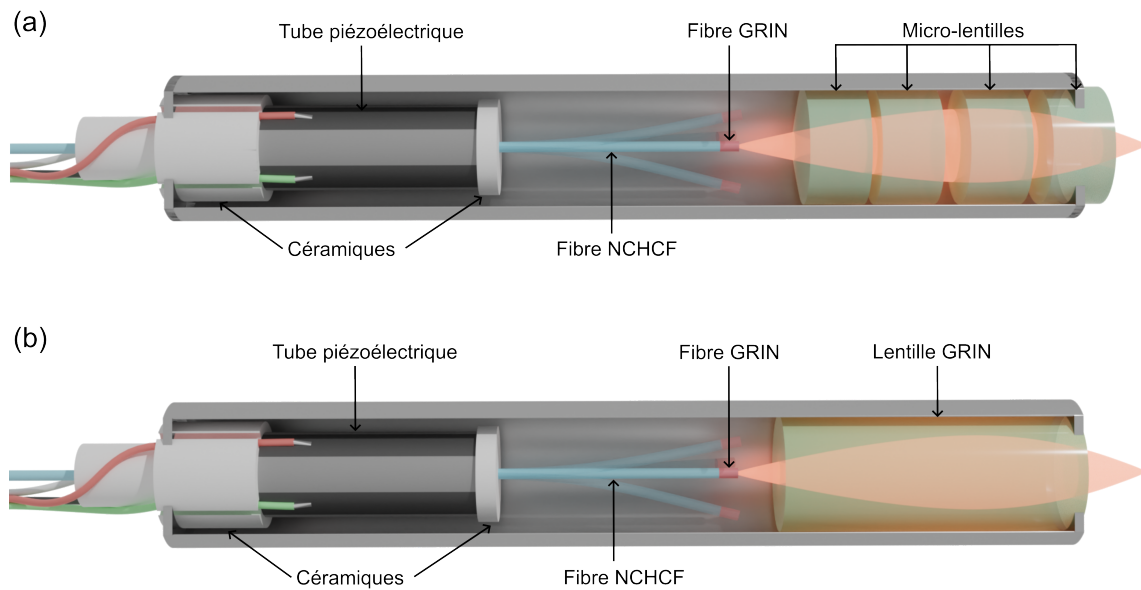


FIGURE 1.2 – Architecture interne du micro-endoscope InSplorer avec le micro-objectif 4 lentilles (a) et GRIN (b). Adapté de [80].

la double gaine de la fibre optique. Les caractéristiques complètes du micro-endoscope sont détaillées dans [110, 120].

Deux micro-objectifs (MO) peuvent être utilisés avec ce système. Le premier est un assemblage de quatre doublets achromatiques (4L), disponibles chez Edmund Optics [75]. Le second est un micro-objectif GRIN commercial (GT-MO-070-016-ACR-VISNIR-30-20, GRIN-TECH) [81]. Le tableau 1.1 présente les performances optiques de ces deux configurations. Le choix du micro-objectif dépend de l'application visée. Le système 4L est particulièrement adapté à l'imagerie en profondeur car la distance de travail (WD) est plus importante que celle du micro-objectif GRIN. En contrepartie, il présente une PSF plus large, ce qui peut limiter la résolution par rapport au micro-objectif GRIN.

MO	4L	GRIN
PSF* (μm)	2,65	1,52
WD (μm)	600 ± 15	230 ± 15
NA _{échantillon}	0,45	0,7

TABLE 1.1 – Performances optiques des micro-objectifs (valeurs constructeur, * : données mesurées).

La tête du micro-endoscope possède un diamètre distal de 2,2 mm avec le micro-objectif 4L et de 1,3 mm avec le micro-objectif GRIN.

1.2 Déport d'impulsions pour l'imagerie 3PEF et THG

Le système InSplorer présenté précédemment permet de réaliser de l'imagerie 2PEF, SHG, THG ou encore CARS. Néanmoins, pour réaliser de l'imagerie 3PEF, les sources laser ne peuvent pas être intégrées au système. Typiquement, l'imagerie 3PEF nécessite des impulsions plus énergétiques (de l'ordre du μJ) et beaucoup plus courtes (< 50 fs). Pour atteindre ces caractéristiques, la fréquence de répétition est généralement réduite à 1 MHz, et les sources utilisées combinent un oscillateur de pompe à un amplificateur paramétrique optique (OPA). Pour réaliser de l'imagerie 3PEF à travers le dispositif InSplorer, les impulsions laser issues de ces sources massives doivent être déportées vers le système endoscopique en utilisant une fibre de déport.

Les sections suivantes décrivent le montage expérimental mis en place pour transporter les impulsions laser vers le système endoscopique mobile, ainsi que les caractéristiques de la fibre de déport utilisée.

1.2.1 Montage expérimental

L'imagerie endoscopique multiphotonique a été réalisée à l'aide du montage expérimental illustré sur la Figure 1.3. Un oscillateur de pompe à fibre dopée aux ions Ytterbium (Monaco-1035, Coherent) alimente un amplificateur paramétrique optique (OPA) (Opera-F, Coherent). Ce système, accordable entre 650 nm et 2500 nm, délivre des impulsions de l'ordre de 50 fs avec une puissance moyenne de 2,5 W à 920 nm et 1300 nm, à une fréquence de répétition de 1 MHz.

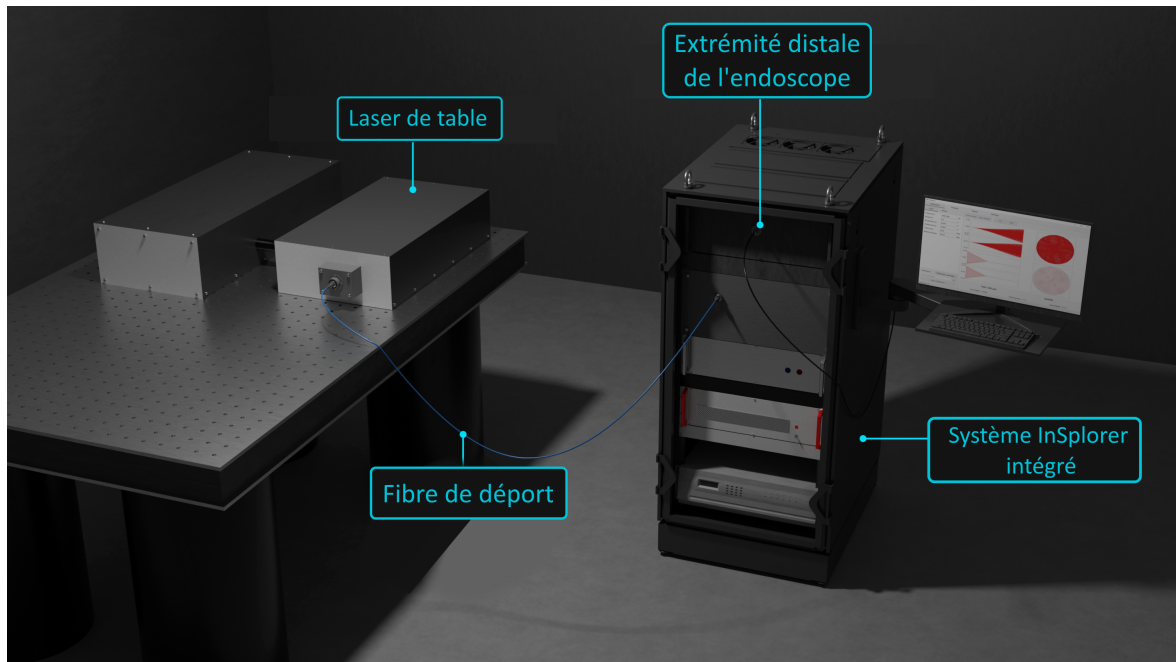


FIGURE 1.3 – Système endoscopique InSplorer alimenté par une source laser externe. Adapté de [120].

Le faisceau laser en sortie de l'OPA est injecté dans la fibre de déport à l'aide d'une lentille de distance focale $f' = 50$ mm (non représentée sur le schéma). Les caractéristiques de la fibre sont présentées dans la section 1.2.2 suivante. Le taux d'injection dans la fibre de déport atteint 75 % pour les deux longueurs d'onde utilisées. L'extrémité distale de la fibre est connectée à l'unité de couplage optique, comme représenté sur le schéma de la Figure 1.1 b. Les impulsions sont ensuite transmises à travers la fibre endoscopique avec une efficacité de 40 % pour chaque longueur d'onde. Cela permet d'obtenir une puissance moyenne de 30 mW en sortie du micro-endoscope pour une puissance moyenne initiale de 100 mW en sortie du laser. Afin de maintenir une durée d'impulsion typique de 50 fs au plan focal de l'échantillon, un système de pré-compensation de la dispersion a été utilisé. Ce dernier sera détaillé dans la section 1.2.3 suivante.

1.2.2 Caractérisation de la fibre de déport

La fibre utilisée pour le transport des impulsions laser est une fibre à cœur creux à courbure négative et à double gaine, composée de huit capillaires. Elle possède un diamètre de cœur de $\varnothing_c = 45$ μm et un diamètre externe de $\varnothing_{ext} = 345$ μm . Ses caractéristiques sont détaillées dans l'article de D. Septier [81]. La Figure 1.4 présente une image MEB de la fibre (a-b) ainsi que son profil d'atténuation (c) et de dispersion (d).

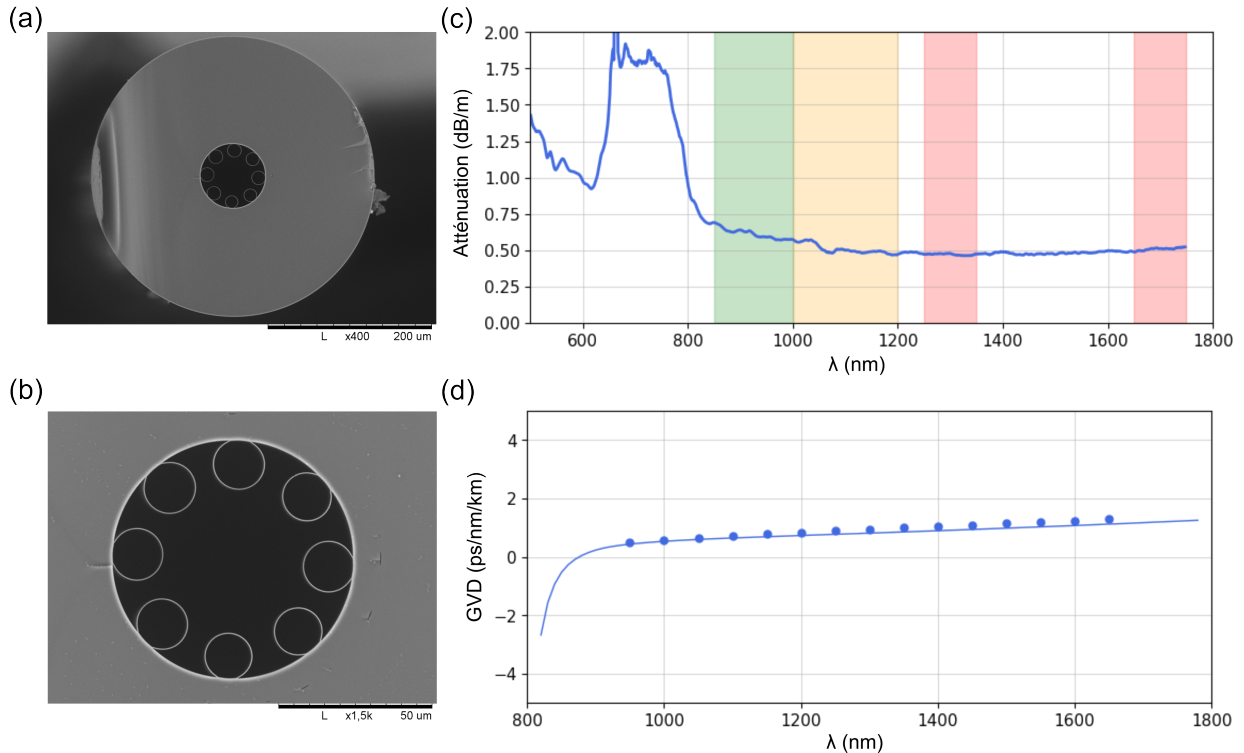


FIGURE 1.4 – Images MEB de la fibre de déport (a-b) et ses caractéristiques optiques : spectre d'atténuation (c) et courbe de dispersion chromatique simulée (trait plein) et mesurée (marqueurs) (d). Ces données ont été extraites de [80].

Le MFD du mode fondamental est de $37,3 \mu\text{m}$ à 920 nm . La fibre présente de faibles pertes ($< 0,14 \text{ dB.m}^{-1}$) entre 920 et 1300 nm , et a été conçue pour transmettre des impulsions ultracourtes ($< 50 \text{ fs}$) avec une dispersion minimale. À 1300 nm , sa dispersion est de $1 \text{ ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$. La fibre utilisée dans cette expérience a une longueur de $1,5 \text{ m}$, assurant une transmission d'environ 75% sur la plage spectrale $920\text{--}1300 \text{ nm}$.

1.2.3 Compensation de la dispersion pour l'imagerie 3PEF

Malgré la faible dispersion des fibres, la dispersion accumulée lors de la propagation à travers le système endoscopique est trop importante pour maintenir une durée de 50 fs au niveau de l'échantillon.

La durée d'impulsion, initialement de $\Delta\tau = 42 \text{ fs}$ à la sortie du laser, s'élargit progressivement jusqu'à atteindre $\Delta\tau = 340 \text{ fs}$ sur l'échantillon à 1300 nm . La Figure 1.5 présente les traces d'autocorrélation mesurées à la sortie du laser (courbe bleue) et à la sortie du micro-endoscope (pointillés rouge). À cause de cet élargissement temporel, il n'est pas possible de réaliser de l'imagerie 3PEF avec ce système endoscopique. Pour préserver une durée d'im-

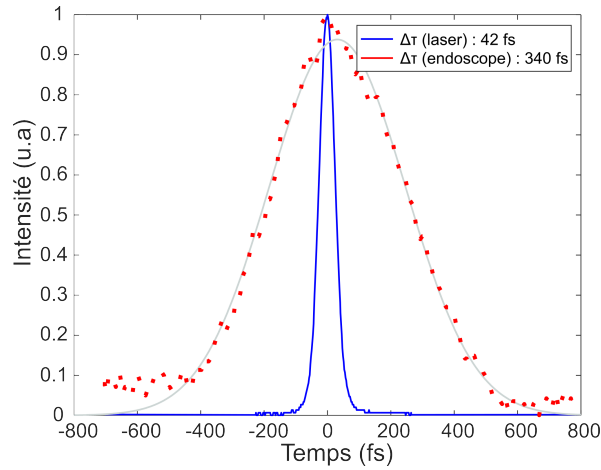


FIGURE 1.5 – Traces d'autocorrélation mesurées à la sortie du laser (courbe bleue) et à la sortie du micro-endoscope (pointillés rouge).

pulsion de $\Delta\tau = 42 \text{ fs}$ sur l'échantillon, il est nécessaire de compenser la dispersion totale du système, évaluée à $5.10^{-3} \text{ ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$. Cette valeur de dispersion correspond à la somme des dispersions des fibres optiques et des optiques du système. Pour ce faire, des lames de ZnSe ont été placées en amont de la fibre de déport. Ce matériau présente l'avantage d'avoir une dispersion négative importante à 1300 nm ($-500 \text{ ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$), comme illustré sur la Figure 1.6 a.

En utilisant un centimètre de ZnSe, la durée d'impulsion mesurée en sortie du micro-endoscope, illustrée par la courbe rouge de la Figure 1.6 b, est de $\Delta\tau = 47 \text{ fs}$. L'imagerie non linéaire 3PEF et THG est désormais possible avec ce système.

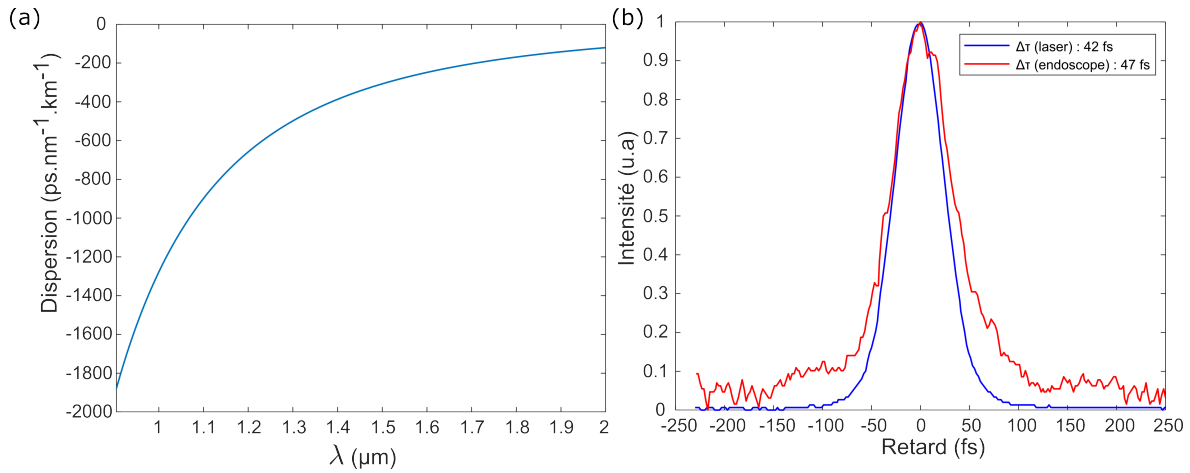


FIGURE 1.6 – (a) Courbe de la dispersion du matériau ZnSe et (b) traces d'autocorrélation mesurées à la sortie du laser (courbe bleue) et à la sortie du micro-endoscope (courbe rouge) après compensation de la dispersion.

1.3 Imagerie non linéaire multimodale

Le système InSplorer a été utilisé avec une source laser externe pour réaliser de l'imagerie multiphotonique sur des échantillons biologiques frais et non fixés. Les sections suivantes présentent les performances optiques du système d'imagerie ainsi que les résultats obtenus sur différents échantillons.

1.3.1 Résolution spatiale du système

La résolution spatiale du micro-endoscope a été caractérisée pour les micro-objectifs 4L et GRIN, ainsi que pour différentes modalités d'imagerie non linéaire (2PEF, SHG, 3PEF, THG).

Les résolutions latérales et axiales pour les modalités 2PEF et 3PEF ont été mesurées à l'aide de billes fluorescentes de 200 nm de diamètre. Les billes ont été diluées dans l'eau avec un rapport 1 :1000 pour limiter les effets d'agrégation, puis placées entre lame et lamelle. Pour l'imagerie SHG, le même protocole a été appliqué, en remplaçant les billes fluorescentes par des nanocristaux de KTP de 150 ± 100 nm [121]. La résolution en THG a été déterminée à l'aide d'un guide d'onde de résonateur intégré en silicium de 450 nm de largeur, encapsulé dans un revêtement oxydé [122].

Dans chaque cas, le profil d'intensité d'une structure isolée dans l'image a été ajusté par une fonction gaussienne, et la largeur à mi-hauteur de cet ajustement a été considérée comme la résolution latérale du système. La résolution axiale a été déterminée à partir d'un ajustement gaussien de l'évolution du signal non linéaire lorsque le micro-endoscope est déplacé dans la direction axiale. Le tableau 1.2 ci-dessous résume les mesures des PSF latérale et axiale, correspondant respectivement aux résolutions latérale et axiale pour chaque modalité d'imagerie.

MO	4L		GRIN	
	Latérale (μm)	Axiale (μm)	Latérale (μm)	Axiale (μm)
PSF 2PEF	1.37	10.90	1.12	11.64
PSF SHG	1.53	12.00	1.00	10.16
PSF 3PEF	1.77	16.16	1.49	3.75
PSF THG	1.42	14.39	1.62	4.93

TABLE 1.2 – Comparaison des résolutions latérales et axiales des micro-objectifs 4L et GRIN, pour différentes modalités d'imagerie.

La Figure 1.7 illustre les résolutions latérales et axiales obtenues avec le micro-objectif GRIN pour les processus 2PEF et 3PEF. Pour le processus 2PEF (Figure 1.7 a), les résolutions latérale et axiale valent respectivement $1,12 \mu\text{m}$ et $11,64 \mu\text{m}$. Pour le processus 3PEF (Figure 1.7 b), elles sont de $1,49 \mu\text{m}$ et $3,75 \mu\text{m}$. Les résolutions des autres modalités non linéaire ont été obtenues de manière analogue, mais ne sont pas présentées ici. Comme attendu, le

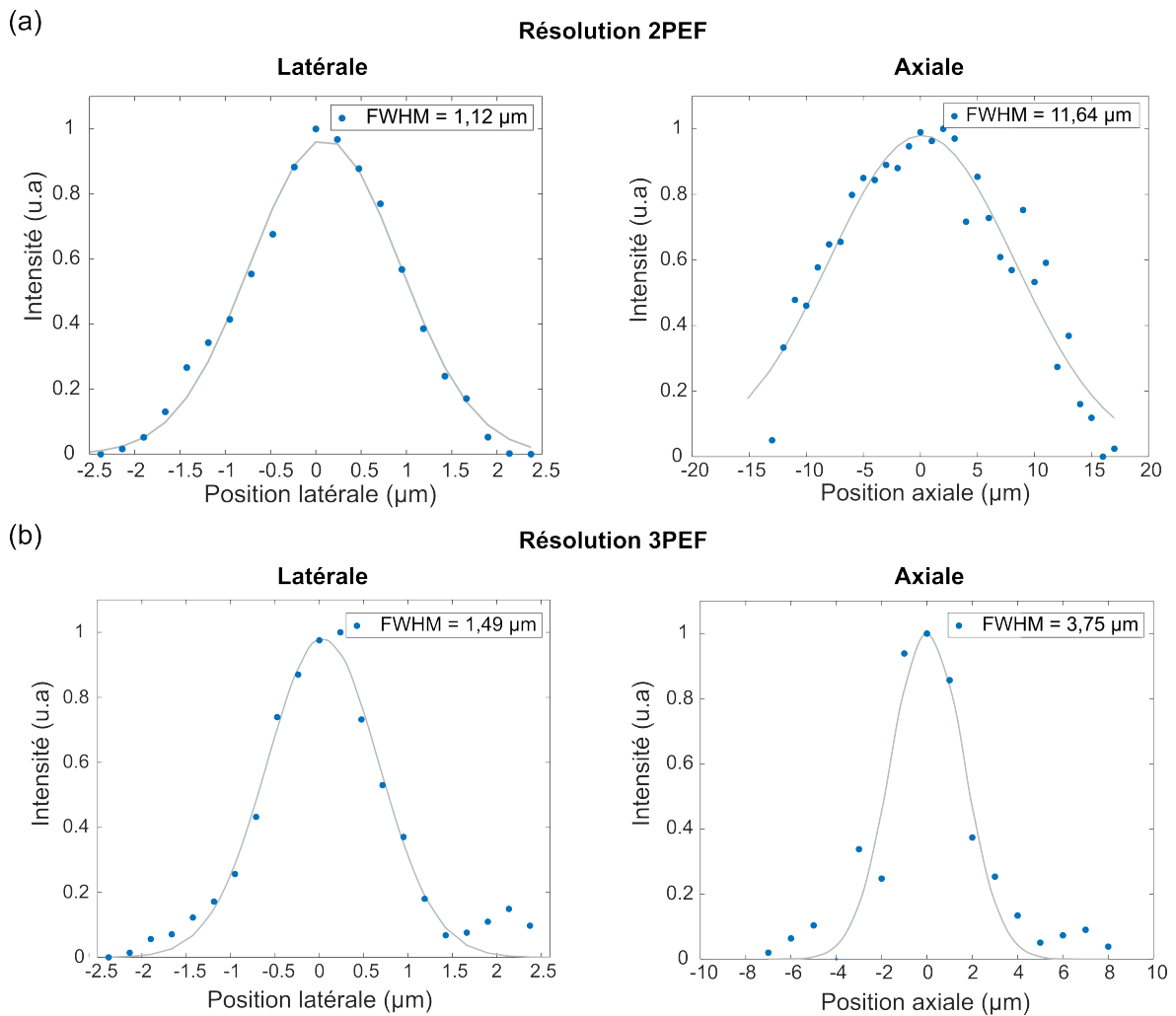


FIGURE 1.7 – Résolutions latérales et axiales pour l'imagerie 2PEF (a) et 3PEF (b). Ces mesures ont été réalisées avec le micro-objectif GRIN.

micro-objectif GRIN présente de meilleures performances optiques que le micro-objectif 4L. Par ailleurs, la résolution axiale est améliorée pour les processus 3PEF et THG par rapport aux processus 2PEF et SHG. Le volume focal effectif [123] est plus faible en 3PEF ($4,36 \mu\text{m}^3$) et en THG ($6,78 \mu\text{m}^3$), ce qui se traduit par un sectionnement optique supérieur à celui des processus 2PEF et SHG.

1.3.2 Imagerie multimodale de végétaux

L'imagerie multiphotonique a été réalisée avec la source laser externe présentée dans la section 1.2.1 de ce chapitre. Des échantillons de végétaux fixés et marqués provenant du laboratoire Nublats ont été utilisés. Chaque échantillon est placé entre lame et lamelle. Les images obtenues ont ensuite été colorées virtuellement grâce au logiciel Fiji.

Les images 2PEF et SHG ont été obtenues en fixant le faisceau d'excitation à $\lambda = 920 \text{ nm}$, tandis que les images 3PEF et THG ont été acquises à $\lambda = 1300 \text{ nm}$. Toutes les images ont été obtenues avec le micro-objectif GRIN.

Dans un premier temps, un échantillon de feuille de houx, marqué au lugol et au carmin vert d'iode, a été imagé selon les processus 2PEF et 3PEF. Les résultats sont présentés sur la Figure 1.8 (a-c). Pour détecter la fluorescence du fluorochrome, un filtre centré à 520 nm a été placé devant le PMT. L'imagerie par fluorescence permet de visualiser le polyphénol, composé issu du métabolisme secondaire des plantes. L'imagerie 2PEF (Figure 1.8 a) et

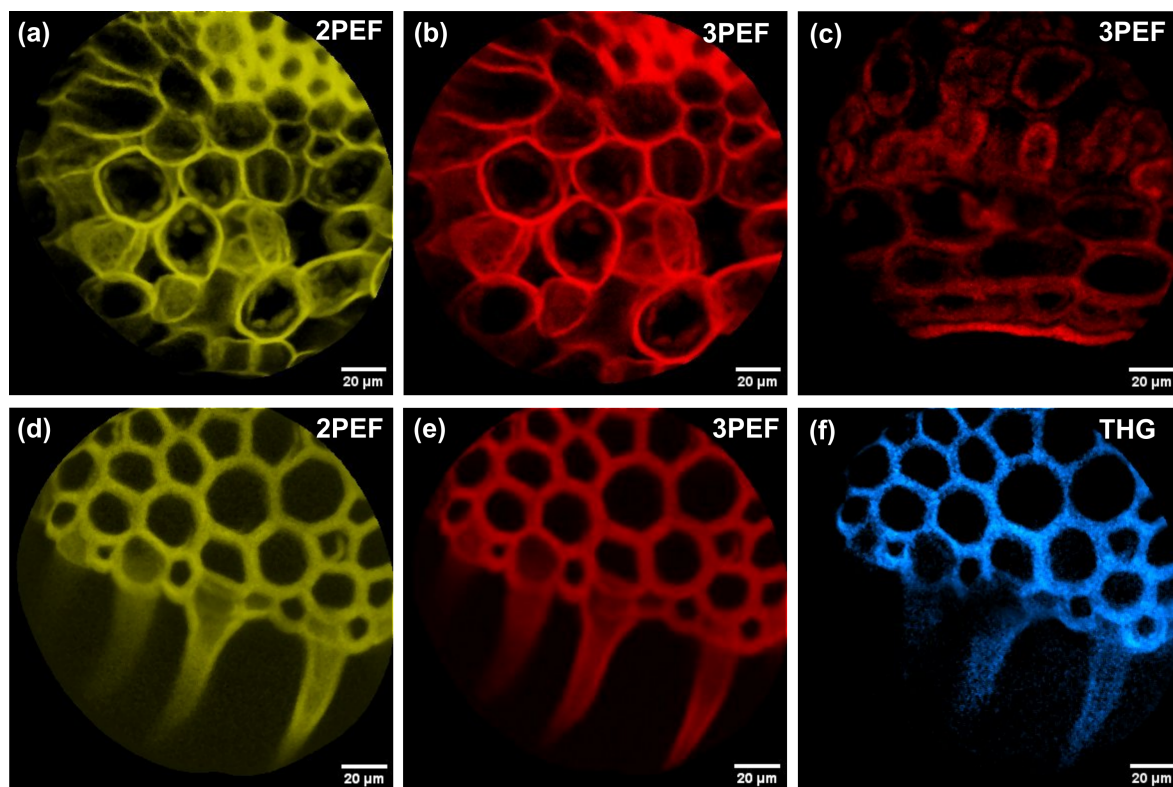


FIGURE 1.8 – Imagerie multiphotonique de feuilles de houx et d'oyat. 2PEF (a), 3PEF (b) et auto-fluorescence 3PEF (c) sur feuille de houx; 2PEF (d), 3PEF (e) et THG (f) sur feuille d'oyat. Images acquises à 1 fps, sur un champ de vue de $168 \mu\text{m}$ à une puissance P de 20 mW.

3PEF (Figure 1.8 b) révèlent des structures similaires dans le plan latéral car les résolutions sont semblables entre les deux modalités. L'auto-fluorescence de la plante a également été observée en 3PEF, en remplaçant le filtre par un filtre centré à 630 nm. Les résultats sont présentés sur la Figure 1.8 c. Une feuille d'oyat a également été imagée avec ce système, et les résultats sont regroupés sur la Figure 1.8 (d-f). Cet échantillon est marqué avec les mêmes fluorochromes que précédemment. Les processus 2PEF (Figure 1.8 d) et 3PEF (Figure 1.8 e) permettent d'observer le contour des cellules de la plante, tandis que le processus THG (Figure 1.8 f) permet ici de visualiser la chlorophylle, grâce au contraste généré par les interfaces optiques au sein des structures cellulaires.

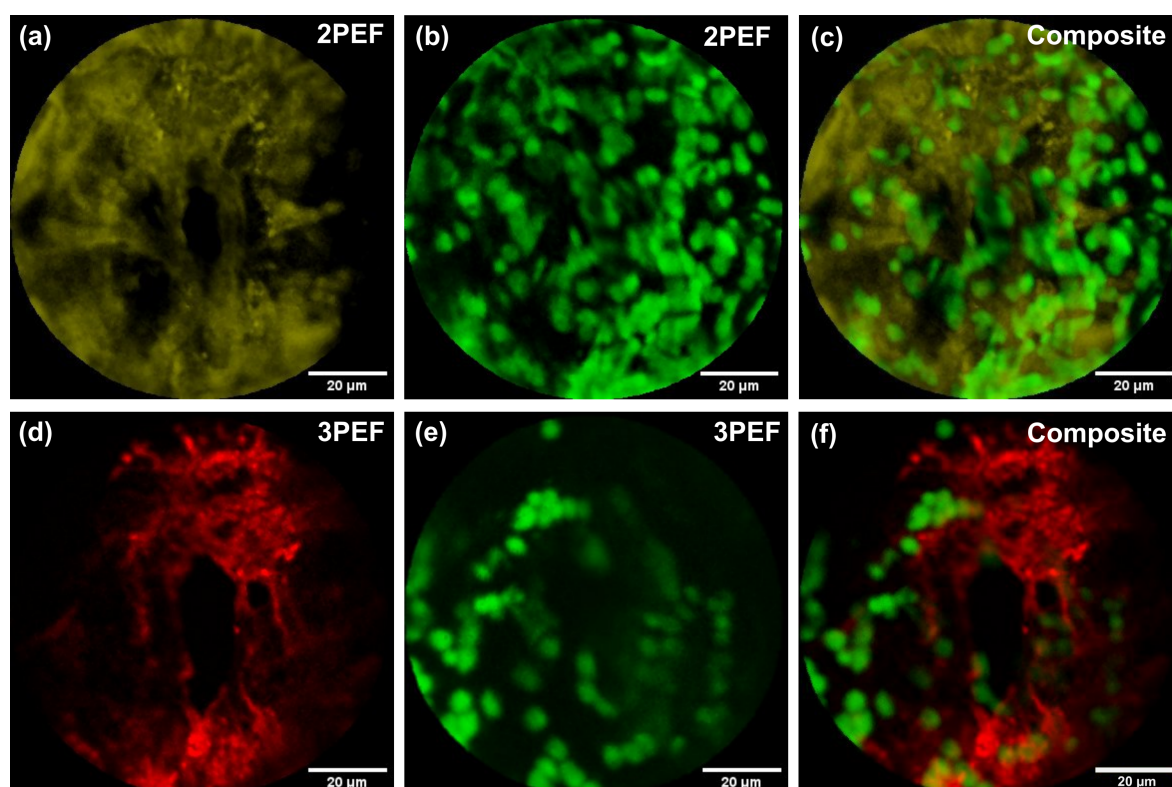


FIGURE 1.9 – Imagerie d'une feuille d'orchidée. Autofluorescence de la lignine en 2PEF (a) et 3PEF (d), détectée avec un filtre centré à 433 nm, et autofluorescence de la chlorophylle en 2PEF (b) et 3PEF (e), détectée avec un filtre centré à 650 nm. Images composites pour chaque modalité : (c) 2PEF et (f) 3PEF. Champ de vue : 98 µm, acquisition à 1 fps, puissance : 20 mW.

Enfin, des expériences d'imagerie 2PEF et 3PEF ont été réalisées sur un échantillon de feuille d'orchidée frais et non fixé. Une portion de la feuille a été découpée au scalpel, puis placée entre lame et lamelle avec une épaisseur d'environ 2 mm. La lignine, composant majeur des parois cellulaires végétales, émet un signal de fluorescence autour de 455 nm lorsqu'elle est excitée entre 335 et 488 nm. Un filtre centré à 433 nm a été positionné devant le détecteur afin d'isoler spécifiquement cette émission. Ce biopolymère joue un rôle clé dans la rigidité et la résistance mécanique des parois cellulaires [124], tout en contribuant à leur imperméabilité et à leur résistance face à la décomposition. Les résultats obtenus pour deux zones distinctes de l'échantillon, en imagerie 2PEF et 3PEF, sont illustrés respectivement sur les Figures 1.9 a et 1.9 d. La chlorophylle a également été imagée pour chaque modalité

(Figures 1.9 b et 1.9 e). Ces pigments, localisés dans les chloroplastes des cellules végétales, interviennent dans le processus de photosynthèse. Pour les visualiser, l'excitation doit se situer entre 465 et 665 nm, avec une émission de fluorescence détectable entre 673 et 726 nm.

1.3.3 Imagerie multimodales d'échantillons biologiques

Des échantillons biologiques, fournis par le laboratoire Nublat, ont été imagés selon différentes modalités non linéaires. Les résultats sont regroupés sur la Figure 1.10 (a-l). Un

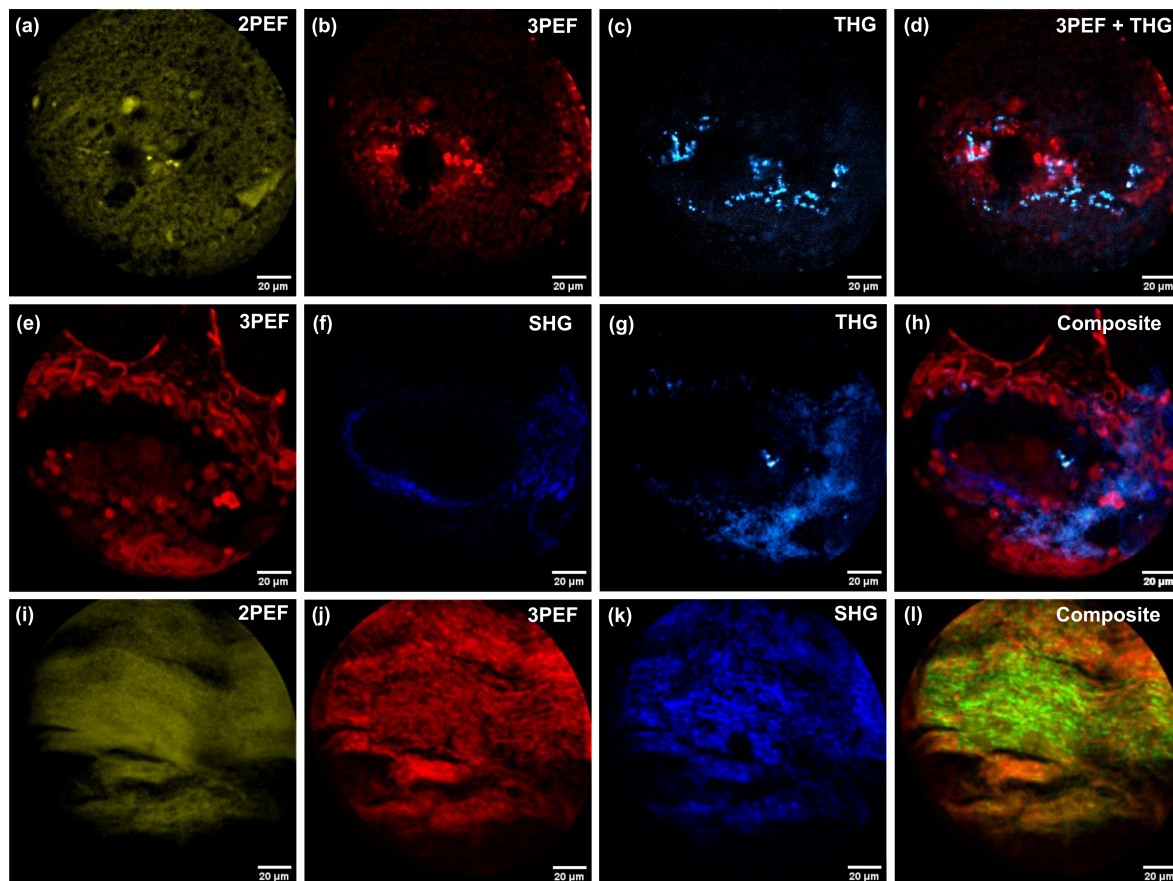


FIGURE 1.10 – Imagerie multimodale de tissus biologiques humains. Cerveau marqué H&E : 2PEF (a), 3PEF (b), THG (c), image composite (d). Tissu adipeux non dégraissé marqué au trichrome de Masson : 3PEF (e), SHG (f), THG (g), image composite (h). Tendon (tissu conjonctif élastique jaune) marqué H&E : 2PEF (i), 3PEF (j), SHG (k), image composite (l). Toutes les images ont été acquises à 1 fps, sur un champ de vue de 168 µm, avec une puissance $P = 15$ mW.

échantillon de cerveau a été imagé (Figures 1.10 (a-d)), ainsi qu'un tissu adipeux non dégraissé (Figures 1.10 (e-h)) et un tendon (Figures 1.10 (i-l)). L'imagerie 2PEF et 3PEF révèle la présence des noyaux cellulaires dans l'ensemble des tissus. La modalité SHG permet de visualiser les fibres de collagène et d'élastine, particulièrement dans le tissu adipeux et les tendons. Quant à la modalité THG, elle met en évidence les interfaces et hétérogénéités optiques, comme les contours cellulaires.

Une imagerie multimodale à deux photons a également été réalisée sur un échantillon de péritoine de rongeur, frais et fixé. Les résultats sont regroupés sur la Figure 1.11. Les

noyaux cellulaires sont détectés grâce à la 2PEF (Figure 1.11 a), tandis que les fibres de collagène et d'élastine sont visualisées par SHG (Figure 1.11 b). L'image composite finale est représentée sur la Figure 1.11 c.

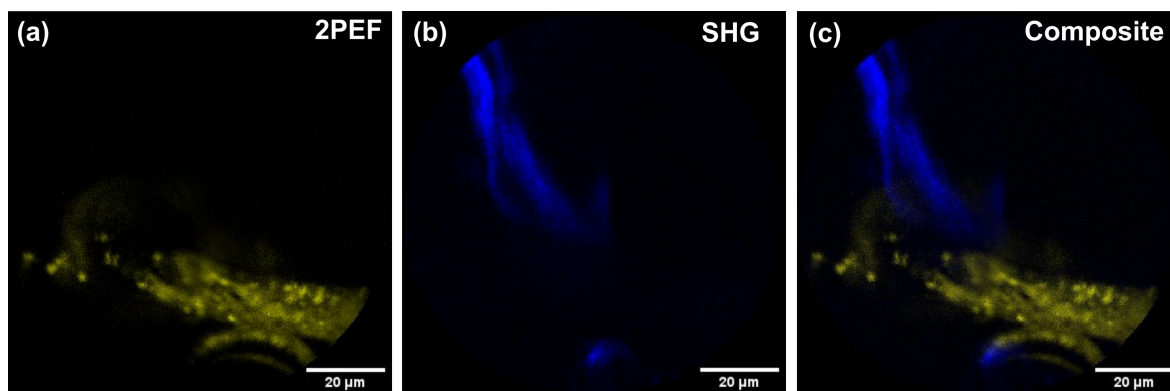


FIGURE 1.11 – Imagerie 2PEF (a) et SHG (b) d'un péritoine de rongeur, et image composite associée (c). FoV : 280 μm , 1,4 fps, $P = 25 \text{ mW}$.

a) Imagerie non linéaire 3PEF sur des échantillons biologiques

En utilisant une source laser externe, l'objectif était de réaliser de l'imagerie 3PEF à travers le système InSplorer. Pour cela, des échantillons biologiques frais et non marqués ont été étudiés. Le faisceau d'excitation a été fixé à 1300 nm. La Figure 1.12 a présente une image 3PEF d'une biopsie d'un cerveau de souris, tandis que les Figures 1.12 (b-c) illustrent les résultats obtenus sur une biopsie rétinienne de porc. L'autofluorescence des structures épithéliales (Figure 1.12 b) et endothéliales (Figure 1.12 c) de la rétine ont été imagées. Dans chaque échantillon, les noyaux cellulaires sont visibles grâce au processus 3PEF.

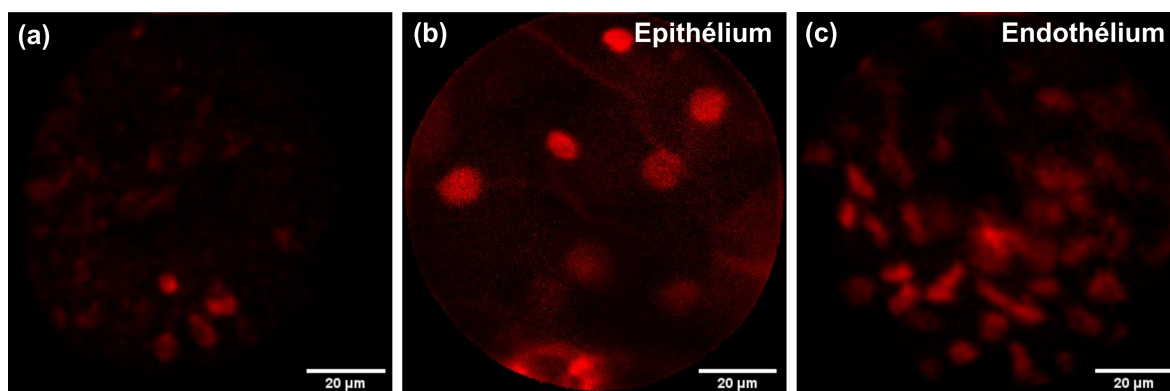


FIGURE 1.12 – Images 3PEF d'une biopsie d'un cerveau de souris (a) et d'une rétine de porc pour les parties épithéliales (b) et endothéliales (c). FoV : 98 μm , 1 fps, $P = 30 \text{ mW}$.

Conclusion

Un système endoscopique compact et autonome a été présenté dans ce chapitre. Tous les composants nécessaires à l'imagerie multiphotonique ont été intégrés de manière à permettre une utilisation en dehors du laboratoire.

Le micro-endoscope repose sur une fibre à cœur creux à courbure négative, capable de réaliser de l'imagerie non linéaire sur une large gamme de longueurs d'onde dans le proche infrarouge. De l'imagerie 2PEF, SHG, 3PEF et THG a été démontrée avec ce système, en utilisant une source laser externe.

La sonde endoscopique peut être utilisée avec deux micro-objectifs interchangeable. Un premier micro-objectif à quatre lentilles, adapté à l'imagerie en profondeur grâce à sa distance de travail supérieure à 600 μm . Pour l'imagerie à haute résolution, un second micro-objectif GRIN est disponible. La résolution spatiale du système est d'environ 1 μm , selon le micro-objectif utilisé.

Dans ces travaux, le système a permis de réaliser de l'imagerie multiphotonique *ex vivo* sur une grande variété d'échantillons frais et non marqués. Lightcore Technologies a également démontré la possibilité de réaliser de l'autofluorescence à deux photons directement *in vivo* [110].

Bibliographie de l'autrice

Publications

1. D.Septier, G. Brévalle-Wasilewski, E. Lefebvre, N. Gajendra Kumar, Y. J. Wang, A. Kaszas, H. Rigneault, A. Kudlinski. A hollow-core fiber based stand-alone multimodal (2-photon, 3-photon, shg, thg) nonlinear flexible imaging endoscope system, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 30(6), 1-12 (2024).
2. E. Lefebvre, D. Septier, G. Brévalle-Wasilewski, A. Cassez, H. Rigneault, A. Kudlinski. Miniaturized endoscopic probe dedicated to real-time stimulated Raman scattering imaging. **En préparation.**

Communications (orales)

1. E. Lefebvre, G. Brévalle-Wasilewski, D. Septier, Y. J. Wang, N. Gajendra Kumar, A. Cassez, L. Azzi, H. Rigneault, A. Kudlinski. Endoscopic 3PEF et THG imaging using a standalone rack. *Women in Photonics*, 2023.
2. E. Lefebvre, G. Brévalle-Wasilewski, D. Septier, Y. J. Wang, N. G. Kumar, A. Andy, H. Rigneault, A. Kudlinski. Endoscopic 3-photon fluorescence imaging using a standalone rack. *Photonics West (SPIE)*, 2024.
3. E. Lefebvre, D. Septier, G. Brévalle-Wasilewski, Y. J. Wang, A. Cassez, H. Rigneault, A. Kudlinski. Micro-endoscope à 3 photons et THG portable utilisant une fibre de déport. *JNOG (SFO)*, 2023.
4. E. Lefebvre, G. Brévalle-Wasilewski, D. Septier, H. Rigneault, A. Cassez, A. Kudlinski. Sonde endoscopique pour l'imagerie par diffusion Raman stimulée. *JNOG (SFO)*, 2025.

Brevet

1. E. Lefebvre, G. Brévalle-Wasilewski, H. Rigneault et A. Kudlinski, « Dispositif fibré pour la détection d'un signal optique émis par un échantillon et systèmes de caractérisation physico-chimique équipés de tels dispositifs », demande de brevet français déposée le 24 décembre 2024 sous le numéro No. FR2415243. Demande PCT prévue pour décembre 2025.

Bibliographie

- [1] T. Zheng, H. Zhou, X. Li, et al. RbmX is required for activation of atr on repetitive dnAs to maintain genome stability. *Cell Death & Differentiation*, 27 :3162–3176, 2020.
- [2] Marvin Minsky. Microscopy apparatus.
- [3] JB Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, Berlin, 3 edition, 2006.
- [4] John D. Bancroft and Marilyn Gamble. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, 2007.
- [5] J.A. Kiernan. *Histological and Histochemical Methods : Theory and Practice*. Scion Publishing, 5 edition, 2015.
- [6] N.T Shaked, S.A Boppart, L.V Wang, et al. Label-free biomedical optical imaging. *Nat.Photon*, pages 1031–1041, 2023.
- [7] Winfried Denk, James H. Strickler, and Watt W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.
- [8] Ji-Xin Cheng, Wei Min, et al. *Stimulated Raman Scattering Microscopy : Techniques and Applications*. Elsevier, 2021.
- [9] M. T. Cicerone and C. H. Camp. Histological coherent raman imaging : a prognostic review. *Analyst*, 143(1) :33–59, 2018.
- [10] V. Kučikas, V. Werner, M.P. Schmitz-Rode, and F. Louradour. Two-photon endoscopy : State of art and perspectives. *Molecular Imaging and Biology Journal*, 25 :3–17, 2023.
- [11] G. Ducourtial, P. Leclerc, T. Mansuryan, et al. Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal. *Sci Rep*, 5 :18303, 2015.
- [12] Brian G. Saar, Richard S. Johnston, Christian W. Freudiger, X. Sunney Xie, and Eric J. Seibel. Coherent raman scanning fiber endoscopy. *Opt. Lett.*, 36(13) :2396–2398, Jul 2011.
- [13] W.R. Zipfel, R.M. Williams, and W.W. Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21 :1369–1377, 2003.
- [14] R. Boyd. *Nonlinear Optics*. Elsevier, 2020.

-
- [15] F. Helmchen and W. Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2(12) :932–940, 2005.
 - [16] M. Göppert-Mayer. *Über Elementarakte Mit Zwei Quantensprüngen*. PhD thesis, Annalen der Physik, 1931.
 - [17] D.L Wokosin, V.E Centonze, S. Crittenden, and J. White. Three-photon excitation fluorescence imaging of biological specimens using an all-solid-state laser. *Bioimaging*, 4, pages 208–214, 1996.
 - [18] N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer, and C. Xu. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature Photon*, 7 :205–209, 2013.
 - [19] Hervé Rigneault and Pascal Berto. Tutorial : Coherent raman light matter interaction processes. *APL Photonics*, 3(9) :091101, 2018.
 - [20] C.V. Raman. A new radiation. *Indian J. Phys.* 2, pages 387–398, 1928.
 - [21] S. Bancelin, C. Aimé, I. Gusachenko, et al. Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals. *Nature Communications*, 5, 2014.
 - [22] M. Strupler, A.-M. Pena, M. Hernest, et al. Second harmonic imaging and scoring of collagene in fibrotic tissues. *Optics Express*, 15 :4054–4065, 2007.
 - [23] 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. *Biophysical Journal*, 90 :693–703, 2006.
 - [24] D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, et al. Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 :7081–7086, 2003.
 - [25] W. Mohler, A.C. Millard, and P.J. Campagnola. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods* 29, pages 97–109, 2003.
 - [26] K.P. Quinn et al. Optical metrics of the extracellular matrix predict compositional and mechanical changes after myocardial infarction. *Sci. Rep.* 6, page 35823, 2016.
 - [27] S.W Chu, S.P. Tai, C.L. Ho, C.H. Lin, and C.K Sun. High-resolution simultaneous three-photon fluorescence and third-harmonic-generation microscopy. *Micros. Res. Techn.* 66, pages 193–197, 2005.
 - [28] D. Débarre M. Zimmerley, P. Mahou and E. Beaurepaire. Probing ordered lipid assemblies with polarized third-harmonic generation microscopy. *Physical Review X*, 3 :011002, 2013.
 - [29] T. H. Maiman. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*, 187 :493–494, 1960.

- [30] Gisela Eckhardt, R. W. Hellwarth, F. J. McClung, S. E. Schwarz, D. Weiner, and E. J. Woodbury. Stimulated raman scattering from organic liquids. *Phys. Rev. Lett.*, 9 :455–457, 1962.
- [31] H. Rigneault and S. Heuke. Comprendre les processus raman cohérents. *Photonics*, 121 :52–56, 2023.
- [32] M. Müller and A. Zumbusch. Coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *ChemPhysChem*, 2007.
- [33] S. O. Konorov, M. W. Blades, and R. F. Turner. Non-resonant background suppression by destructive interference in coherent anti-stokes raman scattering spectroscopy. *Optics Express*, 19 :25925–25934, 2011.
- [34] Dane M. Drutis, Thomas M. Hancewicz, Eugene Pashkovski, et al. Three-dimensional chemical imaging of skin using stimulated raman scattering microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 19(11) :111604, 2014.
- [35] Lough, L. Sheng, M. Namekawa, T. Ion-Margineanua, et al. Detection and isolation of cancer in prostate biopsies using stimulated raman histology and artificial intelligence. *Journal of Visualized Experiments*, 2025.
- [36] W. J. Tipping, A. S. Merchant, R. Fearon, N. C. O. Tomkinson, K. Faulds, and D. Graham. Temporal imaging of drug dynamics in live cells using stimulated raman scattering microscopy and a perfusion cell culture system. *RSC Chem. Biol.*, 3 :1154–1164, 2022.
- [37] N. Qian, X. Gao, X. Lang, and W. Min. Rapid single-particle chemical imaging of nanoplastic by srs microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(3) :e2300582121, 2024.
- [38] Xavier Audier. *Spectroscopie Raman stimulée rapide et imagerie hyperspectrale*. PhD thesis, Institut Fresnel, 2018.
- [39] Daniel A. Orringer, Balaji Pandian, Yashar S. Niknafs, et al. Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated raman scattering microscopy. *Nature Biomedical Engineering*, 1, 2017.
- [40] S. Heuke, B. Sarri, X. Audier, and H. Rigneault. Simultaneous dual-channel stimulated raman scattering microscopy demultiplexed at distinct modulation frequencies. *Optics Letters*, 43 (15) :3582–3585, 2018.
- [41] Hervé Rigneault and Romain Appay. L’histologie raman stimulée. *Photonics*, 121 (123) :40–44, 2024.
- [42] B. Sarri, F. Poizat, S. Heuke, et al. Stimulated raman histology : one to one comparison with standard hematoxylin and eosin staining. *Biomedical Optics Express*, 10(10) :5378–5384, 2019.
- [43] Govind P. Agrawal. *Nonlinear Fiber Optics*. Academic Press, 2001.

-
- [44] M. Lelek. *Caractérisation d'impulsions brèves. Mise en forme temporelle et Spectrale pour une application à l'endomicroscopie bi-photonique*. PhD thesis, Université de Limoges, 2006.
 - [45] R. H. Stolen and Q. Lin. Self-phase modulation in silica optical fibers. *Phys. Rev. A.*, 17(4) :1448–1453, 1978.
 - [46] D. Anderson, M. Desaix, M. Lisak, and M. L. Quiroga-Teixeiro. Wave-breaking in nonlinear optical fibers. *J. Opt. Soc. Am. B.*, 9 :1358–1361, 1992.
 - [47] W. J. Tomlinson. Curious features of nonlinear pulse propagation in single-mode optical fibers. *Optics & Photonics News*, pages 7–11, 1989.
 - [48] Y. Wu, Y. Leng, J. Xi, and X. Li. Scanning all-fiber-optic endomicroscopy system for 3d nonlinear optical imaging of biological tissues. *Optics Express*, 17 :7907, 2009.
 - [49] E. Treacy. Optical pulse compression with diffraction gratings. *IEEE Quantum Electronics*, 5 :454–458, 1969.
 - [50] P. Tournois. New diffraction grating pair with very linear dispersion for laser pulse compression. *Electron. Lett.*, 29(16) :1414–1415, 1993.
 - [51] R. L. Fork, O. E. Martinez, and J. P. Gordon. Negative dispersion using pairs of prisms. *Optics Letters*, 5 :150–152, 1984.
 - [52] S. W. Clark, F. Ö. Ilday, and F. W. Wise. Fiber delivery of femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser. *Optics Letters*, 26 :1320–1322, 2001.
 - [53] P. S. J. Russell. Photonic band gaps. *Phys. World*, 5(8) :37–42, 1992.
 - [54] T. A. Birks, P. J. Roberts, P. S. J. Russell, D. M. Atkin, and T. J. Shepherd. Full 2-d photonic bandgaps in silica/air structures. *Electronics Letters*, 31(22) :1941–1943, 1995.
 - [55] P. Russell. Photonic crystal fibers. *Science*, 299(5605) :358–362, 2003.
 - [56] J. C. Knight, J. Broeng, T. A. Birks, and P. S. J. Russell. Photonic band gap guidance in optical fibers. *Science*, 282 :1476–1478, 1998.
 - [57] L. Provino, A. Monteville, D. Landais, O. Le Goffic, A. Haboucha, T. Taunay, and D. Mechin. Les fibres microstructurées : 20 ans d'existence et un vaste éventail d'applications. *Photoniques*, 99 :40–44, 2019.
 - [58] R. F. Cregan, B. J. Mangan, J. C. Knight, T. A. Birks, P. S. J. Russell, P. J. Roberts, and D. C. Allan. Single-mode photonic band gap guidance of light in air. *Science*, 285(5433) :1537–1539, 1999.
 - [59] J. D. Shephard, J. D. C. Jones, D. P. Hand, et al. High energy nanosecond laser pulses delivered single-mode through hollow-core pbfg fibers. *Optics Express*, 12 :717–723, 2004.

- [60] Y. Y. Wang, X. Peng, M. Alharbi, et al. Design and fabrication of hollow-core photonic crystal fibers for high-power ultrashort pulse transportation and pulse compression. *Optics Letters*, 37 :3111–3113, 2012.
- [61] P. J. Roberts, F. Couny, H. Sabert, B. J. Mangan, D. P. Williams, L. Farr, M. W. Mason, A. Tomlinson, T. A. Birks, J. C. Knight, and P. St J. Russel. Ultimate low loss of hollow-core photonic crystal fibres. *Optics Express*, 13(1) :236–244, 2005.
- [62] Natalie V. Wheeler, Alexander M. Heidt, Naveen K. Baddela, Eric Numkam Fokoua, John R. Hayes, Seyed R. Sandoghchi, Francesco Poletti, Marco N. Petrovich, and David J. Richardson. Low-loss and low-bend-sensitivity mid-infrared guidance in a hollow-core-photonic-bandgap fiber. *Opt. Lett.*, 39(2) :295–298, 2014.
- [63] B. Debord, A. Amsanpally, M. Chafer, A. Baz, M. Maurel, et al. Ultralow transmission loss in inhibited-coupling guiding hollow fibers. *Optica*, 4(2) :209, 2017.
- [64] F. Yu and J. C. Knight. Negative curvature hollow-core optical fiber. *IEEE Journal of Selected Topic in Quantum Electronics*, 22(2) :146–155, 2016.
- [65] V. Milanovic, G.A Matus, and D.T. McCormick. Gimbal-less monolithic silicon actuators for tip-tilt-piston micromirror applications. *IEEE J. Select. Topics Quantum Electron*, 10 :462–471, 2004.
- [66] W. Zong, R. Wu, S. Chen, J. Wu, H. Wang, Z. Zhao, G. Chen, R. Tu, D. Wu, Y. Hu, et al. Miniature two-photon microscopy forenlarged field-ofview, multi-plane and long-term brain imaging. *Nat. Methods*, 18 :46–49, 2021.
- [67] Mon Thiri Myaing, Daniel J. MacDonald, and Xingde Li. Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope. *Opt. Lett.*, 31(8) :1076–1078, Apr 2006.
- [68] E. J. Seibel, Q.Y. J. Smithwick, J. A. Myers, R. S. Johnston, and C. D. Melville. Compact scanning fiber device.
- [69] G. J. Tearney, R. H. Webb, and B. E. Bouma. Spectrally encoded confocal microscopy. *Optics Letters*, 23(1152), 1998.
- [70] D. Yelin, I. Rizvi, W. M. White, et al. Three-dimensional miniature endoscopy. *Nature*, 443 :765, 2006.
- [71] Victor Tsvirkun, Siddharth Sivankutty, Karen Baudelle, Rémi Habert, Géraud Bouwmans, Olivier Vanvincq, Esben Ravn Andresen, and Hervé Rigneault. Flexible lensless endoscope with a conformationally invariant multi-core fiber. *Optica*, 6(9) :1185–1189, 2019.
- [72] Esben Ravn Andresen, Géraud Bouwmans, Serge Monneret, and Hervé Rigneault. Two-photon lensless endoscope. *Opt. Express*, 21(18) :20713–20721, Sep 2013.
- [73] A. Kudlinski, A. Cassez, O. Vanvincq, D. Septier, A. Pastre, R. Habert, K. Baudelle, M. Douay, V. Mytskaniuk, V. Tsvirkun, H. Rigneault, and G. Bouwmans. Double clad

- tubular anti-resonant hollow core fiber for nonlinear microendoscopy. *Opt. Express*, 28(10) :15062–15070, May 2020.
- [74] E. Pshenay-Severin, H. Bae, K. Reichwald, et al. Multimodal nonlinear endomicroscopic imaging probe using a double-core double-clad fiber and focus-combining micro-optical concept. *Science & Applications*, 10(207), 2021.
- [75] G. Ducourthial. *Développement d'un endomicroscope multiphotonique compact et flexible pour l'imagerie in vivo haute résolution de tissus biologiques non marqués*. PhD thesis, École doctorale Sciences et ingénierie pour l'information, mathématiques, 2014.
- [76] S. Brustlein, P. Berto, R. Hostein, P. Ferrand, C. Billaudeau, D. Marguet, A. Muir, J. Knight, and H. Rigneault. Double-clad hollow core photonic crystal fiber for coherent raman endoscope. *Opt Express*, 19(13) :12562–12568, 2011.
- [77] W. Wadsworth, R. Percival, G. Bouwmans, et al. Very high numerical aperture fibers. *IEEE Photonics Technology Letters*, 16 :843–845, 2004.
- [78] M.T. Myaing, D. J. MacDonald, and X. Li. Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope. *Opt. Lett.*, 31(8) :1076, 2006.
- [79] A. Lombardini. *Endoscopie non-linéaire avec fibres optiques micro-structurées*. PhD thesis, Ecole Doctorale Physique et sciences de la matière (Marseille), 2016.
- [80] Dylan Septier. *Fibres creuses à double gaine dédiées à la micro-endoscopie non-linéaire*. PhD thesis, Université de Lille, 2022.
- [81] D. Septier, V. Mytskaniuk, R. Habert, D. Labat, K. Baudelle, A. Cassez, G. Brévalle-Wasilewski, M. Conforti, G. Bouwmans, H. Rigneault, and A. Kudlinski. Label-free highly multimodal nonlinear endoscope. *Opt. Express*, 30(14) :25020–25033, Jul 2022.
- [82] G. Ducourthial, P. Leclerc, T. Mansuryan, M. Fabert, J. Brevier, R. Habert, F. Braud, R. Batrin, C. Vever-Bizet, G. Bourg-Heckly, L. Thiberville, A. Druilhe, A. Kudlinski, and F. Louradour. Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal. *Sci. Rep.*, 5(1) :18303, 2015.
- [83] A. Lombardini, V. Mutskaniuk, S. Sivankutty, et al. High-resolution multimodal flexible coherent raman endoscope. *Light-Science & Applications*, 7(10), 2018.
- [84] Brian G. Saar, Christian W. Freudiger, Jay Reichman, C. Michael Stanley, Gary R. Holtom, and X. Sunney Xie. Video-rate molecular imaging in vivo with stimulated raman scattering. *Science*, 330(6009) :1368–1370, 2010.
- [85] NKT Photonics. Hc 800 01 hollow core photonic bandgap fiber. <https://www.nktphotonics.com/products/optical-fibers-and-modules/hollow-core-photonic-crystal-fibers/>.
- [86] F. Couny, F. Benabib, P. J. Roberts, P. S. Light, and M. G. Raymer. Generation and photonic guidance of multi-octave optical-frequency combs. *Science*, 318 :1118–1121, 2007.

- [87] F. Couny, F. Benabib, and P. S. Light. Large-pitch kagom-structured hollow-core photonic crystal fiber. *Optics Letters*, 31 :3574–3576, 2006.
- [88] B. Debord, M. Alharbi, T. Bradley, et al. Hypocycloid-shaped hollow-core photonic crystal fiber part 1 : Arc curvature effect on confinement loss. *Optics Express*, 21 :28597–28608, 2013.
- [89] C. Wei, R. J. Weiblen, C. R. Menyuk, and J. Hu. Negative curvature fibers. *Advances in Optics and Photonics*, 9(3) :504–561, 2017.
- [90] F. Yu, M. Xu, and J. C. Knight. Experimental study of low-loss single-mode performance in anti-resonant hollow-core fibers. *Optics Express*, 24 :12969–12975, 2016.
- [91] W. Ding, Y. Y. Wang, S. F. Gao, M. L. Wang, and P. Wang. Recent progress in low-loss hollow-core anti-resonant fibers and their applications. *IEEE Journal of Selected Topic in Quantum Electronics*, 26 :1–12, 2020.
- [92] M. Zeisberger and M. A. Schmidt. Analytic model for the complex effective index of the leaky modes of tube-type anti-resonant hollow core fibers. *Scientific Reports*, 7, 2017.
- [93] P. Uebel, M. C. Günendi, M. H. Frosz, et al. Broadband robustly single-mode hollow-core pcf by resonant filtering of higher-order modes. *Optics Letters*, 41 :1961–1964, 2016.
- [94] Y. Wang and W. Ding. Confinement loss in hollow-core negative curvature fiber : A multi-layered model. *Optic Express*, 35 :33122–33133, 2017.
- [95] F. Poletti. Nested antiresonant modeless hollow core fiber. *Optics Express*, 22(20) :23807–23828, 2014.
- [96] A. N. Kolyadin, G. K. Alagashev, A. D. Pryamikov, et al. Negative curvature hollow-core fibers : Dispersion properties and femtosecond pulse delivery. *Physics Procedia*, 73 :59–66, 2015.
- [97] L. R. Murphy, S. Yerolatsitis, T. A. Birks, and J. M. Stone. Stack, seal, evacuate, draw : a method for drawing hollow-core fiber stacks under positive and negative pressure. *Optics Express*, 30(21) :37303–37313, 2022.
- [98] I. A. Bufetov, A. F. Kosolapov, A. D. Pryamikov, A. V. Gladyshev, A. N. Kolyadin, A. A. Krylov, Y. P. Yatsenko, and A. S. Biriukov. Revolver hollow core optical fibers. *Fibers*, 6(2) :39–64, 2018.
- [99] N. Wheeler, P. Shardlow, , and F. Poletti. Method for fabricating an optical fibre pre-form, 2019.
- [100] S. F. Gao, Y. Y. Wang, W. Ding, D. L. Jiang, S. Gu, X. Zhang, and P. Wang. Hollow-core conjoined-tube negative-curvature fibre with ultralow loss. *Nat. Commun.*, 9(1), 2018.

-
- [101] G. T. Jasion, J. R. Hayes, N. V. Wheeler, Y. Chen, T. D. Bradley, D. J. Richardson, and F. Poletti. Fabrication of tubular anti-resonant hollow core fibers : modelling. *Opt. Express*, 27(15) :20567–20582, 2019.
 - [102] M. Tateda, N. Shibata, and S. Seikai. Interferometric method for chromatic dispersion measurement in a single-mode-optical fiber. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 17 :404–407, 1981.
 - [103] P. Ferrand, J. Wenger, A. Devilez, et al. Direct imaging of photonic nanojets. *Optics Express*, 16 :6930–6940, 2008.
 - [104] HP. Ghenuche, H. Rigneault, and J. Wenger. Photonic nanojet focusing for hollow-core photonic crystal fiber probes. *Applied Optics*, 51 :8637–8640, 2012.
 - [105] K. Iga. Theory for gradient-index imaging. *Applied Optics*, 19 :1039–1043, 1980.
 - [106] T. Hansson, A. Tonello, T. Mansuryan, et al. Nonlinear beam self-imaging and self-focusing dynamics in a grin multimode optical fiber : Theory and experiments. *Optics Express*, 28 :24005–24021, 2020.
 - [107] D. Globe and E. A. J. Marcatili. Multimode theory of graded-core fibers. *The Bell System Technical Journal*, 52 :1563–1578, 1973.
 - [108] M. Guizar-Sicairos and J. C. Gutiérrez-Vega. Computation of quasi-discrete hankel transforms of integer order for propagating optical wave fields. *JOSA A*, 21 :53–58, 2004.
 - [109] V. Mytskaniuk. *Endoscopie non-linéaire : instrumentation et applications*. PhD thesis, Aix Marseille Université, 2018.
 - [110] D. Septier, G. Brévalle-Wasilewski, E. Lefebvre, N. Gajendra Kumar, Y. J. Wang, A. Kaszas, H. Rigneault, and A. Kudlinski. A hollow-core fiber based stand-alone multimodal (2-photon, 3-photon, shg, thg) nonlinear flexible imaging endoscope system. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 30(6) :1–12, 2024.
 - [111] L. Genchi, S. P. Laptinok, and C. Liberale. Background signals in stimulated raman scattering microscopy and current solutions to avoid them. *Advances in Physics : X*, 8(1) :2176258, 2023.
 - [112] N. Djaker. *Microscopie par diffusion cohérente Raman CARS : Application à l'imagerie des milieux biologiques*. PhD thesis, Université de droit, d'économie et des sciences - Aix-Marseille III, 2006.
 - [113] D. Do, H. Yoo, and D-G. Gweon. Fiber-optic raster scanning two-photon endomicroscope using a tubular piezoelectric actuator. *Journal of Biomedical Optics*, 19(6) :066010, 2014.
 - [114] C. J. Engelbrecht, R. S. Johnston, E. J. Seibel, and F. Helmchen. Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging in vivo. *Opt. Express*, 16(8) :5556–5564, 2008.

- [115] M. J. Kundrat, P. G. Reinhall, C. M. Lee, and E. J. Seibel. High performance open loop control of scanning with a small cylindrical cantilever beam. *J. Sound Vib.*, 330(8) :1762–1771, 2009.
- [116] Raman for Life. Spectre raman du polystyrène. <https://ramanlife.com/library/polystyrene-raman/>.
- [117] A. Selvarajan. Raman spectrum of dimethyl sulfoxide (dms) and the influence of solvents. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, 64 :44–50, 1966.
- [118] E. T. J. Nibbering, G. Grillon, M. A. Franco, B. S. Prade, and A. Mysyrowicz. Determination of the inertial contribution to the nonlinear refractive index of air n₂, and o₂ by use of unfocused high-intensity femtosecond laser pulses. *J. Opt. Soc. Am. B*, 14 :650–660, 1997.
- [119] A. Lombardini, E. Ravn Andresen, A. Kudlinski, I. Rimke, and H. Rigneault. Origin and suppression of parasitic signals in kagomé lattice hollow core fibers used for srs microscopy and endoscopy. *Opt. Lett.*, 42 :1824–1827, 2017.
- [120] Lightcore Technologies. Système endoscopique intégré. <https://lightcore-technologies.com/insplorer-endoscope/>.
- [121] P. Mahou, G. Malkinson, E. Chaudan, T. Gacoin, E. Beaurepaire, and W. Supatto. Metrology of multiphoton microscopes using second harmonic generation nanoprobe. *Small*, 13(42) :1701442, 2017.
- [122] F. Akhouni, Y. Qin, N. Peyghambarian, J. K. Barton, and K. Kieu. Compact fiber-based multi-photon endoscope working at 1700 nm. *Biomedical Optics Express*, 9(5) :2326–2335, 2018.
- [123] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1369–1377, 2003.
- [124] P. Pereira, M. Rosa, M. Cioffi, K. Benini, A. Milanese, and A. Voorwald D. Mulinary. Vegetal fibers in polymeric composites : A review. *Polímeros*, 25 :9, 2015.