



HAL
open science

Nouveaux procédés de microspectroscopie Raman cohérente à bande ultralarge

Erwan Capitaine

► **To cite this version:**

Erwan Capitaine. Nouveaux procédés de microspectroscopie Raman cohérente à bande ultralarge. Optique / photonique. Université de Limoges, 2017. Français. NNT: . tel-01781566v1

HAL Id: tel-01781566

<https://hal.science/tel-01781566v1>

Submitted on 10 Jun 2020 (v1), last revised 30 Apr 2018 (v2)

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

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

UNIVERSITÉ DE LIMOGES
ÉCOLE DOCTORALE n° 521
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2017

Thèse N° X

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : **Électronique des Hautes Fréquences, Photonique et Systèmes**

présentée et soutenue par

Erwan CAPITAINE

le 20 décembre 2017

<p style="font-size: 1.2em;">Nouveaux procédés de microspectroscopie Raman cohérente à bande ultralarge</p>
--

Thèse dirigée par **Vincent COUDERC** et **Philippe LEPROUX**

JURY :

Guy MILLOT	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
Hervé RIGNEAULT	Directeur de recherche CNRS, Institut Fresnel, Université Aix-Marseille	Rapporteur
Frédéric DRUON	Directeur de recherche CNRS, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris Sud (Paris XI)	Examinateur
Philippe LÉVÊQUE	Directeur de recherche CNRS, Xlim, Université de Limoges	Président
Philippe ADAM	Docteur, Direction Générale de l'Armement	Invité
Vincent COUDERC	Directeur de recherche CNRS, Xlim, Université de Limoges	Encadrant
Philippe LEPROUX	Maître de Conférence, Xlim, Université de Limoges	Encadrant

*« Même au fond du Tartare, au séjour des supplices,
Le luth a suspendu le cours de la justice :
Cerbère au triple mufle a cessé d'aboyer ;
Le dieu des vents, Éole, oubliant de souffler,
Sur sa roue Ixion s'arrête de tourner ;
Et sur leurs fronts hideux les pâles Euménides
N'entendent plus siffler les serpents homicides.
Enfin, grâce à son luth, vainqueur du noir trépas,
L'aède harmonieux revenait sur ses pas. »*

Virgile, Géorgiques, IV, traduction de d'Henri Laignoux

À mes parents,

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury qui ont accepté d'étudier ce manuscrit de thèse. Leurs remarques m'ont permis de prendre du recul sur les travaux et résultats présentés. Au travers de leur regard d'experts j'ai pu entrevoir les limites de mes expériences, mais également, certaines améliorations auxquelles elles pouvaient prétendre.

Je suis très honoré du temps qu'ils m'ont consacré. J'espère que nos chemins pourront se croiser de nouveau et qu'ils me feront encore la faveur de partager leurs connaissances et leurs conseils.

Quand je me retourne sur ces trois années passées au sein du laboratoire Xlim, ce qui me surprend le plus c'est la facilité et la rapidité des doctorants et des post-doctorants à accepter un nouvel arrivant. J'ai vu ce phénomène s'opérer de nombreuses fois et je pense que c'est, en grande partie, grâce à cela que j'ai autant apprécié mon travail de thésard.

Bien sûr, il y a d'autres éléments à prendre en compte, par exemple les encadrants. Une nouvelle fois, j'ai eu de la chance. Philippe Leproux et Vincent Couderc ont toujours été à mon écoute. Que ce soit sur le plan théorique, pratique ou dans le cas de besoins basement matérialistes, ils m'ont toujours prêté une oreille attentive. Il y a eu de rares moments d'incompréhension que nous avons rapidement démêlés, sûrement grâce à leur patience et à leur expérience concernant les doctorants un peu trop motivés, ou pas assez. Philippe et Vincent, merci à vous, j'espère que cet ouvrage ne vous fera pas honte. J'ai essayé d'y insérer vos nombreuses remarques et les quelques illuminations que j'ai pu avoir grâce à vous.

Autours de cette équipe restreinte qui sont les deux piliers de cette thèse, gravitaient d'autres personnes qui ont, d'une manière ou d'une autre, apporté leur aide. Je tiens donc à remercier Julien Brevier, Guy Costa, Silvia Barde-Coste, Nathalie Buisson, Jean-René Duclere, Ludovic Duponchel, Marc Fabert, Tiffany Guerenne-Del Ben, Charles Henri Hage, Junya F. Kaneyasu, Claire Lefort, Dominique Pagnoux, Jean-Michel Petit, Idelette Plazanet, Arnaud Pothier et Badr Shalaby.

Viennent donc les compagnons avec lesquels j'ai cheminé le long de cette thèse. D'abord mon voisin de bureau, David Moreau, avec lequel j'ai pu établir des théories révolutionnaires dans le domaine de la biologie animale ou la thermodynamique appliquée à la cuisine. Nos idées, nous avons la chance de les présenter à des esprits supérieurs tels que Rémi Marie Florent De Molerat Du Jeu, Raphaël Florentin, Pierre Leclerc, Mathieu Jossent, Geoffroy Granger, Johann Sence, Damien Pomarède, Maryna Kudinova, Patrick Cadroas, Richard Bezin, Romain Dauliat, Baptiste Leconte, Christophe Louot ou Philippe Birembaux. Hélas, nous étions parfois un peu trop en avance sur notre temps et nous avons alors recours à quelques stratagèmes pour les persuader. Cela se faisait le plus souvent à la terrasse du CRIL. Merci à eux pour tous ces moments de franche rigolade que je n'oublierai jamais.

D'autres doctorants ont été les témoins gênés de ces élucubrations. Certains ont à peine achever leur thèses et d'autres la commence tout juste. Je sais pourtant que David Kergoustin, Martin Maurel, Matthieu Chafer, Dia Darwich, Fred Delahaye, Muhammad Adnan, Sylvain Lanzeray, Abhijeet Dasgupta, Abhilash Amsanpally, Coleman Buckley, Mostafa Sabra, Marie-Alicia Mallevile, Etienne Deliancourt, Jérémy Saucourt, Hugo Delahaye, Maxime Agaty et Flavien Beffara vont poursuivre cette tradition d'accueil. Tradition qui nous a été transmise par les grands anciens que sont David Kabeya, Ludovic Szemendera, Pascaline Darre, Ekatarina Ilinova, Etienne Tartaret et Ximeng Zheng, maintenant partis dans des contrées lointaines. Je veux ici, tous les remercier.

J'aimerais rendre hommage à mes coéquipiers du Rugby Club RC l'Aurence. Grâce à eux j'ai pu faire mes premiers pas sur un terrain. Après une saison très difficile, je les quitte alors qu'ils sont sur la voie du renouveau. (Peut-être est ce parce que je les quitte?) Je ne les remercierai jamais assez de m'avoir donné l'occasion de chausser des crampons.

Je tiens à m'excuser auprès de toutes les personnes que je n'ai pas nommées mais qui mériteraient de figurer sur cette page. Je pense à tout le personnel du laboratoire d'Xlim, mais aussi du groupe d'Hideaki Kano à Tsukuba ou bien toutes les rencontres que j'ai faites à Limoges durant ces trois ans.

Finalement, merci à mes parents, mes grands-parents et à Juliette.

Table des matières

Table des matières	1
Table des figures	4
Liste des tableaux	11
Introduction générale	13
Chapitre 1 : Principes de la spectroscopie Raman	17
1.1 La spectroscopie Raman	18
1.1.1 Vibrations d'une molécule	19
1.1.1.1 Point de vue classique	19
1.1.1.2 Point de vue quantique	22
1.1.2 Description de la diffusion Raman spontanée	22
1.2 La diffusion Raman anti-Stokes cohérente	30
1.2.1 Polarisation du troisième ordre engendrée par un champ électromagnétique	31
1.2.2 Avantages du processus CARS	39
1.3 Lutte contre le bruit de fond non résonant	46
1.3.1 Microspectroscopie CARS en épi-détection	47
1.3.2 Microspectroscopie CARS résolue en polarisation	49
1.3.3 Microspectroscopie CARS résolue temporellement	51
1.3.4 Microspectroscopie CARS interférométrique	52
1.3.5 Microspectroscopie CARS à modulation de fréquence	53
Bibliographie	56
Chapitre 2 : CARS multiplex	60
2.1 Génération de supercontinuum	61
2.1.1 Historique	61
2.1.2 Théorie	62
2.1.2.1 Effet de la dispersion chromatique	62
2.1.2.2 Effets non linéaires	63
2.1.2.3 Propagation solitonique	66
2.1.2.4 Mécanisme de génération	66
2.1.3 Les sources supercontinuum	67
2.2 Expériences M-CARS en transmission	71
2.2.1 Dispositif expérimental	72
2.2.2 Résultats	74
2.2.2.1 Échantillon minéral	74
2.2.2.2 Échantillon végétal	81
2.2.2.3 Échantillon animal	86
2.3 Analyses numériques	90
2.3.1 Correction multiplicative de signal (MSC)	90
2.3.2 Méthode d'entropie maximum (MEM)	94
Bibliographie	102

Chapitre 3 : Électro-CARS	105
3.1 Effets du champ électrique sur le CARS	106
3.1.1 Caractérisation de champs électriques par effet CARS	106
3.1.2 Application aux cristaux liquides	108
3.2 Expérience électro-CARS	111
3.2.1 Dispositif expérimental	111
3.2.2 Mesures M-CARS	115
3.2.3 Mesures EFISHG	124
3.2.3.1 Déstabilisation électronique de la molécule de n-alcane	128
3.3 Analyse numérique	129
Bibliographie	136
Chapitre 4 : Épi-CARS multiplex	138
4.1 État-de-l'art de la microspectroscopie épi-CARS	140
4.1.1 Résolution spectrale	140
4.1.2 Rapport d'intensité des signaux résonant et non résonant	141
4.1.3 Photodommage	143
4.1.4 Comparaison des dispositifs épi-CARS	146
4.2 Expériences M-CARS et SHG épi-détectées	148
4.2.1 Dispositif expérimental	148
4.2.2 Résultats	151
Bibliographie	165
Conclusion générale	168
Publications	172
Appendices	177
Annexe A : Expression de l'énergie d'un oscillateur harmonique selon la mécanique quantique	178
Annexe B : Calcul de la polarisabilité de premier ordre α par description semi-quantique	185
Annexe C : Champ électromagnétique produit par un dipôle oscillant	197
Annexe D : Courbes de transmission et réflexion de différents éléments optiques	202
Annexe E : Modes de vibration des liaisons moléculaires	207

Table des figures

1.1	Diagramme énergétique de la diffusion (a) Rayleigh, (b) Raman Stokes et (c) anti-Stokes.	24
1.2	Variation normalisée de $\Im \left\{ \chi_{yx}^{(1)} \right\}$ en fonction de la différence de fréquences angulaires $\omega - \omega_{v^i}$ pour une demi-largeur largeur de raie Raman $\Gamma = 10 \text{ cm}^{-1}$	29
1.3	Diagramme énergétique du processus CARS.	33
1.4	Diagramme de Feynman d'un chemin quantique résonant participant au processus CARS et correspondant au diagramme énergétique 1.3.	35
1.5	Diagramme de Feynman d'un chemin quantique non résonant apparaissant avec le processus CARS (a) et son diagramme énergétique correspondant (b).	37
1.6	Variations de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ (courbe bleue hachurée), $\Re \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ (courbe rouge hachurée) et de $\left \chi_{lmno}^{(3)} \right ^2$ (courbe noire) normalisées par rapport à l'amplitude de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ pour une demi-largeur largeur de raie Raman $\Gamma_{v^k+1v^k} = 10 \text{ cm}^{-1}$	38
1.7	Diagramme de Feynman d'un chemin quantique de résonance électronique participant au processus CARS (a) et son diagramme énergétique correspondant (b).	47
1.10	Cartographies du signal TR-CARS à 3054 cm^{-1} d'une bille de polystyrène pour un délai $\tau = 0 \text{ fs}$ et $\tau = 484 \text{ fs}$, complétées par une comparaison pour ces deux délais des profils latéraux correspondant à la ligne blanche. Image tirée de l'article de A. Volkmer <i>et al.</i> [34].	52
1.11	Comparaison de cartographies du signal FM-CARS à 2100 cm^{-1} d'une cellule cancéreuse de poumon humain obtenues par (a) F-CARS et (b) FM-CARS. Image tirée de l'article de F. Ganikhanov <i>et al.</i> [38].	54
2.1	Profils temporels normalisés de l'intensité d'une impulsion gaussienne (courbe noire) et de la fréquence instantanée due à la SPM (courbe hachurée rouge).	64
2.2	Schéma de principe du processus de mélange à quatre ondes	65
2.3	Courbes de dispersion du mode fondamental LP01 en fonction de la longueur d'onde pour les fibres (a) PCF 1 et (b) PCF 2, avec leur longueur d'onde du zéro de dispersion, λ_D , repérée par la droite rouge discontinue.	68
2.4	Spectres 1 : densités spectrales de puissance du supercontinuum obtenues avec la source PM et la fibre PCF 1 en sortie de fibre (courbe rouge, $\bar{P} = 28,7 \text{ mW}$) et après MD-notch 1064 (courbe bleue, $\bar{P} = 21,3 \text{ mW}$).	69
2.5	Spectres 2 : densités spectrales de puissance du supercontinuum obtenues avec la source PM et la fibre PCF 2 en sortie de fibre (courbe rouge, $\bar{P} = \text{mW}$) et après MD-notch 1064 (courbe bleue, $\bar{P} = \text{mW}$).	69
2.6	Spectres 3 : densités spectrales de puissance du supercontinuum obtenues avec la source MS ($f_r = 115 \text{ kHz}$) et la fibre PCF 1 en sortie de fibre (courbe rouge, $\bar{P} = 15,7 \text{ mW}$) et après MD-notch 1064 (courbe bleue, $\bar{P} = 7,3 \text{ mW}$).	70
2.7	Spectres 4 : densités spectrales de puissance du supercontinuum obtenues avec la source MS ($f_r = 120 \text{ kHz}$) et la fibre PCF 2 en sortie de fibre (courbe rouge, $\bar{P} = 50,3 \text{ mW}$) et après MD-notch 1064 (courbe bleue, $\bar{P} = 30,8 \text{ mW}$).	70

2.8	Diagramme énergétique du processus M-CARS.	71
2.9	Schéma du dispositif expérimental de mesure M-CARS <i>forward</i> . Légende : C, collimateur ; Echant., échantillon ; LP, filtre passe-haut ; M, miroir ; MP, miroir parabolique ; N1, miroir dichroïque <i>notch</i> ; N2, filtre <i>notch</i> ; Obj 1, objectif Olympus x60 ; Obj 2, objectif Nikon x60 ; PGT, polariseur Glan-Taylor ; Source PM/MS : source de pompe de type microlaser ou source à modes synchronisés ; SP, miroir dichroïque passe-bas ; $\lambda/2$, lame demi-onde.	73
2.10	Schéma de la molécule de n-alcane $C_{15}H_{32}$. Les atomes de carbone sont illustrés en gris et les atomes d'hydrogène en blanc.	74
2.11	Spectre CARS de la paraffine liquide (a) et agrandissement de la zone entre 2500 cm^{-1} et 800 cm^{-1} (b) obtenu avec la source PM.	76
2.12	Spectre CARS de la paraffine liquide (a) et agrandissement de la zone entre 2500 cm^{-1} et 800 cm^{-1} (b) obtenu avec la source MS.	77
2.13	Image d'une trachéide de sapin de douglas observée en lumière blanche par transmission (Olympus, UPlanSApo 60x O.N. = 1,2 immersion dans l'eau).	81
2.14	Spectre CARS d'une trachéide de sapin de douglas (a) et agrandissement de la zone entre 2500 cm^{-1} et 800 cm^{-1} (b) obtenus avec la source PM.	82
2.15	Spectre CARS d'une trachéide de sapin de douglas (a) et agrandissement de la zone entre 2500 cm^{-1} et 800 cm^{-1} (b) obtenu avec la source MS.	83
2.16	Cartographies de l'intensité de deux pics CARS d'une trachéide de sapin de douglas (a) à 1650 cm^{-1} signant pour la lignine ; (b) à 2878 cm^{-1} signant pour la cellulose ; et (c) combinaison de ces cartographies (la couleur jaune indiquant un recouvrement). Barre d'échelle : $10\text{ }\mu\text{m}$	85
2.17	Image de cellules (a) C2C12 et (b) HCT observées en lumière blanche par transmission (Olympus, UPlanSApo 60x O.N. = 1,2 Water).	86
2.18	Spectres CARS d'une cellule C2C12 (a) dans la zone C-H (b) et la zone d'empreintes digitales obtenus avec la source PM.	87
2.19	Spectres CARS d'une cellule HCT (a) dans la zone C-H (b) et la zone d'empreintes digitales obtenus avec la source MS.	88
2.20	Spectres d'une cellule C2C12 (a) dans la zone C-H (b) et la zone d'empreintes digitales obtenus avec la source PM et la méthode MSC. En cartouche : spectres bruts correspondant.	92
2.21	Spectres d'une cellule HCT (a) dans la zone C-H (b) et la zone d'empreintes digitales obtenus avec la source MS et méthode MSC. En cartouche : spectres bruts correspondant.	93
2.22	(a) Spectre CARS normalisé de la paraffine liquide obtenu avec la source MS et traité par MEM (courbe bleue), ligne de base estimée $f(\omega_{aS})$ (courbe rouge pointillé) et différence des deux (courbe noire), (b) comparaison entre un spectre CARS traité par MEM (courbe noire) et un spectre Raman normalisé de la paraffine liquide (courbe rouge, temps d'exposition de 5 s pour 2 accumulations). En cartouche : spectre M-CARS brut de la paraffine liquide.	97

2.23	(a) Spectre CARS normalisé de la zone C-H d'une cellule HCT obtenu avec la source MS et traité par MSC et MEM (courbe bleue), ligne de base estimée $f(\omega_{aS})$ (courbe rouge pointillé) et différence des deux (courbe noire); (b) comparaison entre un spectre CARS traité par MSC et MEM d'une cellule HCT (courbe noire) et un spectre Raman normalisé d'une cellule C2C12 (courbe rouge, temps d'exposition de 12 s pour 100 accumulations) dans la zone C-H. En cartouche : spectre M-CARS brut correspondant.	98
2.24	(a) Spectre CARS normalisé de la zone d'empreinte digitale d'une cellule HCT obtenu avec la source MS et traité par MSC et MEM (courbe bleue), ligne de base estimée $f(\omega_{aS})$ (courbe rouge pointillé) et différence des deux (courbe noire); (b) comparaison entre un spectre CARS traité par MSC et MEM d'une cellule HCT (courbe noire) et un spectre Raman normalisé d'une cellule C2C12 (courbe rouge, temps d'exposition de 12 s pour 100 accumulations) dans d'empreinte digitale. En cartouche : spectre M-CARS brut correspondant.	99
3.1	Diagrammes énergétiques de deux processus de diffusions cohérentes et résonnantes (CRS) : (a) diffusion à la fréquence vibrationnelle $\omega_{v,k+1v^k}$ et (b) diffusion anti-Stokes ω_{aS} ou CARS.	107
3.2	Schéma d'une molécule du mélange de cristaux liquides E7. L'atome d'azote est illustré en bleu, les atomes de carbone en gris et les atomes d'hydrogène en blanc.	109
3.3	Schéma du dispositif expérimental de mesure Électro-CARS <i>forward</i> . Légende : C, collimateur; Echant., échantillon; LP650, miroir dichroïque passe-haut 650 nm; LP1050, filtre passe-haut 1050 nm, M, miroir; N1, miroir dichroïque <i>notch</i> ; N2, filtre <i>notch</i> ; Obj 1, objectif Nikon x60; Obj 2, objectif Nikon x60; PGT, polariseur Glan-Taylor; SP650, filtre passe-bas 650 nm; $\lambda/2$, lame demi-onde.	112
3.4	(a) Mosaïques d'images en lumière blanche par transmission de la zone couverte par le champ électrique; (b) simulation numérique de la répartition du champ électrique lorsqu'une différence de tension de 2400 V est appliquée entre les électrodes. Les croix noires repèrent les points de mesures M-CARS et SHG.	114
3.5	Spectre CARS de solution de n-alcane mesuré avec les vecteurs de polarisation des ondes pompe et Stokes orientés selon x en absence de champ électrique continu.	115
3.6	(a) Spectres M-CARS d'une solution de n-alcane soumise à différentes amplitudes de E_{DC} pour des vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l'axe x . Agrandissements de (b) la zone C-H et (c) de la zone d'empreinte digitale.	116
3.7	(a) Spectres M-CARS d'une solution de n-alcane soumise à différentes amplitudes de E_{DC} pour des vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l'axe y . Agrandissements de (b) la zone C-H et (c) de la zone d'empreinte digitale.	117

3.8	Variations de l'intensité des pics CARS à 2929 cm ⁻¹ (courbe rouge), 2845 cm ⁻¹ (courbe noire), 1434 cm ⁻¹ (courbe bleue) et 1296 cm ⁻¹ (courbe verte) en fonction de l'amplitude du champ électrique lorsque les vecteurs polarisation des ondes pompe et Stokes sont orientées selon x	118
3.9	Variations de l'intensité des pics CARS à 2929 cm ⁻¹ (courbe rouge), 2845 cm ⁻¹ (courbe noire), 1434 cm ⁻¹ (courbe bleue) et 1296 cm ⁻¹ (courbe verte) en fonction de l'amplitude du champ électrique lorsque les vecteurs polarisation des ondes pompe et Stokes sont orientées selon y	118
3.10	Rapports entre les spectres M-CARS d'une solution de n-alcane soumise à différentes amplitudes de E_{DC} pour des vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l'axe x et le spectre M-CARS d'un échantillon non soumis à E_{DC}	119
3.11	Rapports des spectres M-CARS simulés d'une vibration à 2845 cm ⁻¹ , de demi-largeur de raie Raman Γ de 20 cm ⁻¹ , entre une amplitude A de 1 et des amplitudes de 1 à 2 par pas de 0,2 (u.a.).	120
3.12	Rapports entre les spectres M-CARS d'une solution de n-alcane soumise à différentes amplitudes de E_{DC} pour des vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l'axe y et le spectre M-CARS d'un échantillon non soumis à E_{DC}	121
3.13	Comparaison des rapports entre les spectres M-CARS d'une solution de n-alcane soumise à une amplitude de E_{DC} de 33 kV.cm ⁻¹ et le spectre M-CARS d'un échantillon non soumis à E_{DC} dans le cas de vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l'axe x (courbe continue) et à l'axe y (courbe discontinue).	123
3.14	Intensité du signal EFISHG en fonction de θ , l'angle entre le vecteur polarisation de l'onde fondamentale et l'axe x pour différentes amplitudes de E_{DC}	126
3.15	Ajustement par la fonction $f(\theta)$ des intensité du signal EFISHG pour des amplitudes de E_{DC} égales à 24 kV.cm ⁻¹ et 30 kV.cm ⁻¹	127
3.17	Variations de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ (courbe bleue hachurée), de $\left \chi_{lmno}^{(3)} \right ^2$ (courbe noire hachurée) et de $\partial S(\omega_{aS})/\partial \omega_{aS}$ (courbe rouge) normalisées par rapport à l'amplitude de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$	130
3.18	Différences de décalage Raman $\Delta\omega$ entre la position du pic de la dérivée d'un pic CARS $\partial S(\omega_{aS})/\partial \omega_{aS}$ et celle du pic Raman spontanée comparable à $\left \chi_{lmno}^{(3)} \right ^2$ en fonction de la demi-largeur de raie Raman Γ (courbe rouge) ; différences de décalage Raman $\Delta\omega$ entre la position d'un pic CARS $S(\omega_{aS})$ et celle du pic Raman spontanée comparable à $\left \chi_{lmno}^{(3)} \right ^2$ en fonction de la demi-largeur de raie Raman Γ (courbe noire).	130
3.19	Représentation en trois dimensions de l'évolution des dérivées par rapport au décalage Raman des spectres M-CARS, $\partial S(\omega_{aS})/\partial \omega_{aS}$, d'une solution de n-alcane soumis à différentes amplitudes de champ électrique continu, $ \vec{E}_{DC} $, colinéaire aux vecteurs polarisation des ondes excitatrices. Les droites noires illustrent l'évolution de certaines intensités de $\partial S(\omega_{aS})/\partial \omega_{aS}$ par rapport à $ \vec{E}_{DC} $	131

3.20	Moyenne des spectres M-CARS (courbe noire hachurée), moyenne des dérivées $\partial S(\omega_{aS})/\partial\omega_{aS}$ pour différentes amplitudes de E_{DC} (courbe bleue) et dérivée croisée $\partial S^2(\omega_{aS})/\partial E_{DC}\partial\omega_{aS}$ de la solution de n-alcane pour des vecteurs polarisation pompe et Stokes colinéaire à x comparée au spectre Raman de la solution de n-alcane (courbe noire).	132
3.21	Moyenne des spectres M-CARS (courbe noire hachurée), moyenne des dérivées $\partial S(\omega_{aS})/\partial\omega_{aS}$ pour différentes amplitudes de E_{DC} (courbe bleue) et dérivée croisée $\partial S^2(\omega_{aS})/\partial E_{DC}\partial\omega_{aS}$ de la solution de n-alcane pour des vecteurs polarisations pompe et Stokes colinéaire à y comparée au spectre Raman de la solution de n-alcane (courbe noire).	133
4.1	Résolution spectrale de la mesure CARS en fonction de la durée de l'impulsion sonde limitée par transformée de Fourier (bleu) et mise en évidence de la durée minimale permettant de résoudre une demi-largeur de raie Raman de 20 cm^{-1} (rouge).	141
4.2	Variation du rapport entre les intensités du signal résonant et non résonant $I_R(\omega_{aS})/I_{NR}(\omega_{aS})$ en fonction (a) de la durée de l'impulsion sonde limitée par transformée de Fourier τ et (b) de la résolution spectrale idéale du processus CARS $\Delta\bar{\omega}$	143
4.3	Spectres d'absorption des principaux absorbants intracellulaires. Les coefficients d'extinction moléculaire, ε , de l'hémoglobine oxygénée (HbO_2) et de la mélanine, et le coefficient d'absorption de l'eau, α , sont montrés. Image tirée de l'article de K. König [10].	144
4.4	Schéma du dispositif expérimental de mesure M-CARS et SHG épi-détectée. Légende : C, collimateur ; Echant., échantillon ; LP, filtre passe-haut ; M, miroir ; MP, miroir parabolique ; N1, miroir dichroïque <i>notch</i> ; N2, filtre <i>notch</i> ; Obj 1, objectif Olympus x60 ; PGT, polariseur de Glan-Taylor ; SP, miroir dichroïque passe-bas ; $\lambda/2$, lame demi-onde.	149
4.5	Densité spectrale de puissance du supercontinuum obtenue avec la source MS ($f_r = 110\text{ kHz}$) et la fibre PCF 2 au niveau de l'échantillon ($\bar{P}_{Stokes} = 4\text{ mW}$).	150
4.6	Schéma du fragment d'os pariétal de souris étudié.	151
4.7	Spectres M-CARS bruts épi-détectés du fragment d'os pariétal de souris cartographié de (a) la zone CH, (b) la zone d'empreinte digitale et (c) la réponse de second harmonique épi-détectée. Les coordonnées des points où ont été acquis les spectres sont données en μm dans les cartouches.	153
4.8	Parties imaginaires de $\chi^{(3)}$ normalisées et corrigées de la ligne de base (courbes noires) et dérivées des spectre CARS par rapport au décalage Raman (courbes rouges) de (a) la zone CH, (b) la zone d'empreinte digitale.	155
4.9	Distributions normalisées de l'intégration des signaux CARS provenant des vibrations symétriques (a-c) PO_4^{3-} , (d-f) CO_3^{2-} , (g-i) CH_3 et (j-l) asymétrique CH_3 . Chaque colonne représente un type de traitement numérique différent, de gauche à droite : spectres CARS bruts, corrigés par la MEM et dérivés par rapport au décalage Raman.	157
4.10	Répartitions des pixels des quatre cartographies provenant des vibrations symétriques (a) PO_4^{3-} , (b) CO_3^{2-} , (c) CH_3 et (d) asymétrique CH_3 selon les traitements par la MEM (barres bleues) et la dérivée (barres rouges).	159

4.11	Cartographies de l'intensité relative des pics de la dérivée des spectres M-CARS correspondant aux liaisons moléculaires (a) PO_4^{3-} , (b) CO_3^{2-} , (c-d) CH_3 (intégrée de 20 cm^{-1} autour des pics à 961 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 2878 cm^{-1} and 2950 cm^{-1} respectivement) et (e) la cartographie SHG correspondante. Barre d'échelle : $50 \mu\text{m}$. Les flèches en (a-b) et en (c-d) indiquent, respectivement, la position où ont été acquis les spectres présentés Fig. 4.7a et 4.7b.	161
4.12	Comparaison des cartographies de fragment d'os pariétal de souris. (a) Dérivées des spectres M-CARS de PO_4^{3-} (rouge) et CH_3 (bleu); fluorescence à deux-photon provenant de (b) cellules marquées par GFP (rouge), (c) cellules marquées par Rhodamine B (rouge) et cellules ostéogéniques marquées par GFP (rouge). Le signal SHG est montré en vert sur les images 4.12a à 4.12c. Barre d'échelle : $50 \mu\text{m}$. (e) Histogramme des populations de cellules selon le type de cartographie.	162
4.13	Schéma du dispositif expérimental de mesure M-CARS interférentielle. Légende : BS, séparatrice 90% réflexion/10% transmission; C, collimateur; Echant., échantillon; LP, filtre passe-haut; M, miroir; MP, miroir parabolique; N1, miroir dichroïque <i>notch</i> ; N2, filtre <i>notch</i> ; Obj 1, objectif Olympus x60; Obj 2, objectif Nikon x60; PGT, polariseur Glan-Taylor; SP, miroir dichroïque passe-bas; $\lambda/2$, lame demi-onde.	164
D.1	Courbe de transmission du filtre passe-haut à 1050 nm Thorlabs, FEL1050.	203
D.2	Courbe de transmission du miroir dichroïque coupe-bande à 1064 nm Semrock, NFD01-1064-25x36.	203
D.3	Courbe de réflexion du miroir dichroïque passe-bas à 1050 nm Edmund Optics, 1050 nm , $25.2 \times 35.6 \text{ mm}$, numéro de stock #86-696.	204
D.4	Courbe de réflexion du miroir dichroïque passe-bas à 1000 nm Thorlabs, DMSP1000R.	204
D.5	Courbe de transmission de l'objectif Olympus, UPlanSApo 60x, O.N. = 1,2 immersion dans l'eau.	205
D.6	Courbe de transmission de l'objectif Nikon x60, S Plan Fluor ELWD 60x, O.N. = 0,7.	205
D.7	Courbe de l'efficacité relative du réseau de diffraction Horiba, 520 29, 600 sillons. mm^{-1}	206
D.8	Courbe de l'efficacité quantique de la caméra CCD Horiba, Synapse.	206
E.1	Schéma des deux modes vibrationnels d'élongation (a) symétrique et (b) asymétrique.	208
E.2	Schéma des deux modes vibrationnels de déformation angulaire dans le plan (a) symétrique et (b) asymétrique.	209
E.3	Schéma des deux modes vibrationnels de déformation angulaire hors du plan (a) symétrique et (b) asymétrique.	210

Liste des tableaux

2.1	Tableau des différentes configurations source laser - PCF.	68
2.2	Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman et CARS de la paraffine liquide.	78
2.3	Tableau des intensités mesurées des pics CARS de la paraffine pour les sources PM et MS, en relation avec la densité spectrale de puissance de l'onde Stokes au niveau de l'échantillon, de leur intensité normalisée et du coefficient γ	79
2.4	Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman et CARS des trachéides de douglas.	84
2.5	Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman des cellules de type C2C12.	89
2.6	Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman des cellules de type HCT.	89
2.7	Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman de l'eau.	89
2.8	Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman et CARS corrigés par MEM de la paraffine liquide et de cellules HCT.	100
3.1	Tableau des attributions vibrationnelles de pics CARS de la solution de n-alcanes.	115
4.1	État-de-l'art des dispositifs de microspectroscopie épi-CARS.	148
4.2	Tableau des moyennes et des écart-types des intensités des pixels des quatre cartographies selon les traitements MEM et dérivée.	160

Introduction générale

Au début des années 20, un jeune scientifique indien nommé Chandrasekhara Venkata Raman navigue sur les eaux de la Méditerranée. Il s'interroge alors sur l'origine des couleurs si particulières de cette mer, et ne peut admettre qu'elles sont simplement dues au reflet du ciel. De retour chez lui, il commence alors des expériences de diffusion lumineuse dans différents liquides aidé par un étudiant : Rappal Sangameswara Iyer Krishnan. En 1928, les conclusions de ses recherches sont résumées dans un article du journal *Nature* intitulé *A Change of Wave-length in Light Scattering* : une modification de longueur d'onde dans la diffusion de la lumière. Il y démontre qu'une radiation lumineuse se propageant dans un milieu peut subir une diffusion avec un changement de longueur d'onde. La description théorique de ce phénomène viendra plus tard, et afin de rendre honneur à son découvreur il portera le nom d'effet Raman.

Cette variation de la longueur d'onde de l'onde incidente est basée sur un échange énergétique déséquilibré entre la lumière et la matière. Dans le cas de la diffusion Raman Stokes, le milieu peut capter une part de l'énergie véhiculée par l'onde et la restituer sous forme de vibration ou de rotation moléculaire. Ainsi, la longueur d'onde de la lumière diffusée est supérieure à celle de la lumière incidente. Grâce à ce processus, on s'est alors rendu compte que l'on pouvait caractériser et identifier les vibrations et donc les molécules constitutives de différents milieux. En traçant les intensités de la lumière diffusée en fonction de la fréquence on pouvait obtenir le spectre Raman d'un objet. Un nouveau type de spectroscopie était né.

Cette technique de spectroscopie Raman originelle, basée sur la diffusion Raman Stokes, est toujours un procédé standard utilisé pour la caractérisation de gaz, de liquides, de solides et de plasmas. Elle est un outil employé dans de nombreux domaines de recherche qui s'étendent de la thermodynamique à la médecine, en passant par la science des matériaux. Pourtant, depuis la découverte de l'effet Raman, plus de vingt-cinq autres types de spectroscopies ont en découlé. Ils sont, par exemple, basées sur la diffusion hyper Raman, la diffusion Raman anti-Stokes cohérente, la diffusion Raman stimulée, etc.

Le travail de recherche visant la mise au point de spectroscopies innovantes est motivé par les inconvénients auxquels se confrontent les utilisateurs de la technique de diffusion Raman spontanée. C'est dans cette optique que le projet de recherche des nouveaux procédés de spectroscopie Raman pour l'analyse d'agents biologiques (NEOSPRAM) a été soutenu par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) et la Direction Générale de l'Armement (DGA). Ma thèse concerne donc des techniques de spectroscopie basées sur la diffusion Raman anti-Stokes cohérente (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering* ou CARS) qui sont adaptées à l'étude d'objets biologiques, tout en permettant de s'exonérer du défaut majeur de la technique CARS : le bruit de fond non-résonant (*Non Resonant Background* ou NRB).

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, je présenterai les principes théoriques sur

lesquels reposent la diffusion Raman spontanée et le CARS. De ces descriptions nous pourrons tirer les propriétés inhérentes à ces deux techniques qui s'illustrent sous forme d'atouts et de désavantages. Leur comparaison me permettra de justifier le choix de la méthode CARS pour l'étude d'objets biologiques malgré la présence du bruit de fond non-résonant. L'origine de ce bruit sera expliquée et j'exposerai les différentes techniques CARS qui ont été mises en place jusqu'ici afin de parvenir à sa diminution ou sa suppression.

Dans le chapitre suivant, je décrirai la technique CARS particulière que j'ai choisie lors de ma thèse : la spectroscopie CARS multiplex (ou M-CARS). Elle permet l'étude de plusieurs vibrations moléculaires de manière simultanée. Pour cela une onde possédant un spectre ultralarge, appelé également supercontinuum, est utilisée. Je décrirai théoriquement comment une onde supercontinuum peut être générée à partir d'une impulsion laser monochromatique et d'une fibre à cristal photonique, et je présenterai différents supercontinua obtenus au cours de mes travaux. Il me sera alors possible d'exposer les différentes mesures de microspectroscopie M-CARS effectuées sur trois types d'échantillons : minéral, végétal et animal. Je comparerai certains de ces résultats à des mesures de microspectroscopie Raman spontanée afin de valider le choix de notre méthode. Enfin, je présenterai, à partir de ces mesures M-CARS, deux méthodes de post-traitement des données permettant de supprimer le bruit de fond non-résonant.

Le chapitre 3 illustrera une nouvelle technique de discrimination de la part résonante et non-résonante du signal M-CARS basée sur l'application d'un champ électrique continu : l'électro-CARS. En préambule, je ferai un rapide inventaire des expériences CARS impliquant un champ électrique continu. Nourri des observations tirées de ces expériences, je décrirai les effets que j'attends sur l'information vibrationnelle et le NRB contenus dans un signal M-CARS provenant d'un échantillon soumis à un champ électrique continu. Je présenterai alors l'expérience d'électro-CARS que j'ai testée sur une solution de molécules non-polaires : les n-alcanes. J'exposerai les résultats qui en sont issus et je pourrai alors faire des hypothèses quant à l'action du champ électrique sur les molécules impliquées. Une expérience complémentaire, basée sur la génération de second harmonique induite par un champ électrique, sera alors introduite. Les conclusions qu'elle apportera permettront de juger de la consistance des hypothèses auparavant émises. Finalement, des analyses numériques nous permettront d'émettre un avis sur la capacité d'un champ électrique à discriminer le NRB de la part résonante d'un signal CARS.

Dans le chapitre 4, j'exposerai une technique de microspectroscopie innovante visant l'étude d'objets biologiques et réduisant la part de signaux CARS parasites : la microspectroscopie M-CARS épi-déTECTÉE. Elle est fondée sur la détection de signaux CARS contra propagatifs. De part les conditions d'accord de phase régissant la génération de ces signaux, on évite de collecter le signal provenant d'objets de grande taille devant la longueur d'onde. On peut ainsi se dispenser de la présence d'ondes anti-Stokes

provenant du solvant, qui en configuration de transmission noierait la réponse CARS de l'objet biologique. Afin de mener ce travail j'ai dû étudier les différents facteurs qui permettent d'obtenir la meilleure efficacité de génération de signal anti-Stokes et de prévenir l'altération de l'échantillon. Je montrerai en quoi la durée d'impulsion laser, la cadence de répétition, les puissances moyennes et crêtes peuvent modifier les trois paramètres que j'ai jugés primordiaux : la résolution spectrale de la mesure CARS, le ratio signal résonant sur NRB et le photodommage. Grâce à cela je pourrai établir l'état de l'art de la microspectroscopie CARS en épi-détection et je justifierai le choix de ma source laser. Je décrirai alors le dispositif expérimental qui a mené, à ma connaissance, à la première mesure bimodale M-CARS et SHG épi-détections sur un objet biologique. Les avantages de cette méthode seront énumérés et illustrés par des cartographies spectrales. J'utiliserai et comparerai à nouveau les deux méthodes de post-traitement permettant de supprimer le NRB. Je pourrai ainsi choisir lequel de ces algorithmes est le plus adapté à l'étude de cartes spectrales munies de nombreux points de mesure. Une confrontation des images M-CARS traitées, avec des cartographies réalisées par fluorescence à deux photons sur le même type d'échantillon, sera présentée. Je conclurai alors sur la capacité de notre système à détecter et discriminer différents types de cellules présents dans notre échantillon. Finalement je ferai part des expériences futures qui pourront être menées sur la base des différents dispositifs que j'ai montés.

Chapitre 1 :

Principes de la spectroscopie Raman

La diffusion Raman est un des processus sur lesquels s'est établie cette thèse. Elle est à la base de la méthode de spectroscopie éponyme, c'est-à-dire l'analyse basée sur l'observation de la diffusion lumineuse inélastique. Malgré son utilisation très largement répandue de nos jours, elle admet des limitations importantes, dont la principale est un temps d'acquisition conséquent. Cela a justifié le développement d'une nouvelle méthode utilisant un phénomène parent : le CARS. Cette technique permet une amélioration sensible de la vitesse de détection mais intègre, elle aussi, un défaut important qui est la superposition d'un signal parasite, appelé bruit de fond non résonant. Cet ajout déforme, sinon noie l'information obtenue, empêchant d'extraire directement les signatures vibrationnelles du spectre lumineux observé. C'est la correction ou le contournement de cette limitation liée à la méthode de spectroscopie CARS qui a motivé l'initiation de cette thèse.

Les phénomènes à la base des méthodes de spectroscopie Raman et CARS sont présentés dans ce chapitre afin de comprendre précisément leurs propriétés, leurs avantages et leurs faiblesses. J'expose ensuite différentes voies suivies pour limiter les effets néfastes du NRB tout en soulignant les avantages et désavantages de ces nouvelles solutions.

1.1 La spectroscopie Raman

En 1928 C. V. Raman et K. S. Krishnan [1] utilisent la lumière du Soleil et une diode à vapeur de mercure pour illuminer différents matériaux. En étudiant la lumière diffusée par ces derniers ils découvrent que de nouvelles longueurs d'onde apparaissent. Ce n'est que plus tard que sera finalement compris comment est créée, ce qu'on appelle désormais, la diffusion Raman.

Afin d'expliquer ce processus de manière phénoménologique, il nous faut descendre au sein de la matière jusqu'à atteindre le niveau moléculaire. Nous allons montrer plus tard qu'il est difficile de comparer des objets de cette dimension à ceux qui nous entourent, mais nous nous permettons ici d'esquisser une image afin de préparer la description plus orthodoxe qui suivra. Arrivés, donc, devant cet édifice moléculaire, nous pouvons distinguer les éléments qui le composent : les noyaux atomiques, chargés positivement, lourds et lents, liés entre eux par les électrons, chargés négativement, légers et rapides. Ces derniers sont d'ailleurs si véloces qu'ils sont les seuls à pouvoir se mouvoir lorsqu'une onde électromagnétique visible ou infrarouge vient ébranler la molécule. Ce déplacement des électrons sous l'effet de cette onde excitatrice produit un moment dipolaire électrique. Plus l'attachement d'un électron à un noyau est faible et plus la magnitude du moment dipolaire est grande.

Considérant ce phénomène particulier de "déplacement" d'électrons (clé de tous les mécanismes que nous allons rencontrer dans cet ouvrage) nous pouvons alors remonter

dans l'échelle de la matière afin d'en voir l'effet au niveau molaire. Dans un ensemble de molécules, l'addition des moments dipolaires induits par le champ incident va faire apparaître une polarisation macroscopique du milieu. Cette dernière est, finalement, produite par l'onde électromagnétique, qui, si elle possède une intensité assez faible, peut alors être liée directement, plus exactement, linéairement à la polarisation du milieu. Dans ces conditions, $\chi^{(1)}$ est la grandeur physique couplant le champ électromagnétique à la polarisation et se nomme la susceptibilité électrique, et représente donc la propriété du milieu à se polariser électriquement sous l'action d'un champ faible.

La polarisation du milieu va alors être la source d'une nouvelle onde électromagnétique dont les propriétés dépendront aussi bien du milieu que de l'onde excitatrice. En connaissant, *a priori*, les propriétés du champ incident nous pouvons logiquement supposer que des informations concernant le matériau pourront être déduites de l'examen de l'onde diffusée. Cette étude se nomme spectroscopie, et lorsque la différence énergétique entre l'onde excitatrice et l'onde générée correspond à l'énergie vibrationnelle d'une molécule, nous sommes en présence de diffusion Raman.

Il nous faut clore cette description empirique pour laisser place à une explication plus poussée des différents mécanismes que nous avons introduits ici. Nous allons notamment développer la notion de vibration moléculaire ; puis nous enchaînerons avec la description de la polarisation pouvant provoquer une diffusion de la lumière en fonction des propriétés de ce milieu. À partir de ces discussions nous pourrions conclure sur la valeur de l'intensité de la diffusion Raman dans un milieu.

1.1.1 Vibrations d'une molécule

1.1.1.1 Point de vue classique

Comment se fait-il qu'une molécule vibre ? Qu'est-ce qui entraîne cette vibration ? Pour répondre à ces questions il nous faut débiter l'étude d'un système simple en adoptant un point de vue ondulatoire classique. Ce système simple est une molécule diatomique homonucléaire avec ses deux atomes alignés sur l'axe des x . L'énergie potentielle, ou le potentiel, dans lequel se trouve la molécule dépend des interactions entre les différentes particules qui la composent, les électrons et les atomes. Il est donc assez ardu de déterminer le déplacement des atomes car il entraîne alors une modification du nuage électronique, entraînant à son tour une modification du déplacement des atomes.

Pour contourner cet obstacle on utilise l'approximation de Born-Oppenheimer ou approximation adiabatique [2]. Comme nous l'avons dit plus haut, les électrons, de part leur faible masse ($m_e = 9,109 \times 10^{-31}$ kg) comparée à celle d'un noyau atomique

1. Toutes les valeurs des constantes fondamentales de la Physique présentées dans ce manuscrit sont celles recommandées par le CODATA (*Committee on Data for Science and Technology*) [3].

(par exemple celui de l'hydrogène, $m_p = 1,673 \times 10^{-27}$ kg), se meuvent beaucoup plus rapidement que ces derniers. Quand la distance entre les noyaux varie de x_1 à x_2 , le potentiel que ces derniers créent sur les électrons est modifié. Mais cette modification va être très rapide, quasiment instantanée : le système électronique auparavant dans son état énergétique fondamental $\mathcal{E}_e(x_1)$ (J)², va revenir à un état fondamental $\mathcal{E}_e(x_2)$ et n'aura pas le temps d'affecter les noyaux. De leur point de vue, il semble que les électrons s'adaptent immédiatement aux variations de distance : on dit qu'ils suivent les déplacements des noyaux de manière adiabatique. Le déplacement des électrons est décorrélé de ceux des noyaux et l'énergie du système électronique $\mathcal{E}_e(x)$ va apparaître comme une énergie potentielle s'ajoutant à celle créée par la force de Coulomb entre les noyaux. Ainsi si on considère le système des deux noyaux comme une particule fictive dans le référentiel du centre de masse, on peut exprimer le potentiel qui s'exerce sur la particule de cette façon :

$$V(x) = \mathcal{E}_e(x) + \frac{Z^2 e^2}{4\pi \varepsilon_0 x} \quad (1.1)$$

avec Z le nombre atomique des atomes de la molécule (sans unité), e la charge élémentaire (C) et ε_0 la permittivité du vide (F.m^{-1} ou $\text{C.V}^{-1}.\text{m}^{-1}$). Ce potentiel va admettre un minimum en x_0 (m), qui correspond à l'état d'équilibre de la molécule. Si on le développe en série de Taylor, nous obtenons :

$$V(x) = V(x_0) + \frac{1}{2} \frac{d^2V}{dx^2} \Big|_{x=x_0} (x - x_0)^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3V}{dx^3} \Big|_{x=x_0} (x - x_0)^3 + \dots \quad (1.2)$$

dV/dx étant nul pour $x = x_0$. La norme de la force de restauration, dérivée du potentiel est alors :

$$F_r = -\frac{dV}{dx} = -\frac{d^2V}{dx^2} \Big|_{x=x_0} (x - x_0) - \frac{1}{2} \frac{d^3V}{dx^3} \Big|_{x=x_0} (x - x_0)^2 + \dots \quad (1.3)$$

À partir de là, nous pouvons utiliser une deuxième approximation si l'on considère que le déplacement de la particule fictive est assez petit autour du minimum x_0 : on peut négliger les termes d'ordre supérieur à 2. Cette force étant la seule à s'exercer sur le système on utilise logiquement la relation fondamentale de la dynamique afin d'obtenir l'équation du mouvement de la particule :

$$\mu \frac{d^2x}{dt^2} \approx -\frac{d^2V}{dx^2} \Big|_{x=x_0} (x - x_0) \quad (1.4)$$

avec μ la masse réduite de la molécule telle que $\mu = m/2$ et m la masse d'un des deux noyaux de la molécule. On reconnaît clairement ici l'équation de la dynamique d'un

2. Nous ferons suivre chaque nouvelle grandeur physique de son unité dans le système internationale entre parenthèses.

oscillateur harmonique, on peut donc qualifier, dans la limite des faibles déplacements de la particule autours de la position d'équilibre x_0 , que le potentiel se comporte comme un potentiel harmonique.

Une solution de cette équation est alors :

$$x = x_M \cos(\omega_k t - \phi) + x_0 \quad (1.5)$$

avec x_M l'amplitude du déplacement, ϕ le déphasage à l'origine et ω_k (rad.s⁻¹) la fréquence angulaire telle que :

$$\omega_k = \sqrt{\frac{1}{\mu} \frac{d^2V}{dx^2} \Big|_{x=x_0}}. \quad (1.6)$$

Cette dernière est en fait la fréquence angulaire d'un mode d'oscillation k des deux noyaux autours de la position d'équilibre x_0 , encore appelée, vibration. De cette relation on peut extraire quelques informations quant à la fréquence angulaire de vibration. On voit que plus la masse réduite de la molécule est grande et plus la fréquence est faible. Elle est aussi fonction de $d^2V/dx^2|_{x=x_0}$, et comme la position d'équilibre pour la plupart des molécules diatomiques est du même ordre de grandeur (quelques angströms), ce qui pèse dans ce terme est la profondeur du potentiel, soit $V(x_0)$, donc la stabilité de l'édifice moléculaire. Ainsi plus une molécule est stable et plus sa fréquence de vibration est grande.

Afin d'obtenir l'énergie \mathcal{E} de cette particule nous calculons son énergie cinétique \mathcal{E}_c :

$$\mathcal{E}_c = \frac{1}{2} \mu \left(\frac{dx}{dt} \right)^2 = \frac{p_x^2}{2\mu} \quad (1.7)$$

avec p_x la quantité de mouvement de la particule (kg.m.s⁻¹). Nous obtenons alors :

$$\mathcal{E} = V(x) + \frac{p_x^2}{2\mu} \quad (1.8a)$$

$$= V(x_0) + \frac{1}{2} \mu \omega_k^2 (x - x_0)^2 + \frac{p_x^2}{2\mu} \quad (1.8b)$$

$$= V(x_0) + \frac{1}{2} \mu \omega_k^2 x_M^2 \cos^2(\omega_k t - \phi) + \frac{1}{2} \mu \omega_k^2 x_M^2 \sin^2(\omega_k t - \phi) \quad (1.8c)$$

$$= V(x_0) + \frac{1}{2} \mu \omega_k^2 x_M^2. \quad (1.8d)$$

Nous constatons que l'énergie de la particule ne dépend pas du temps, elle est donc conservée. L'amplitude de déplacement x_M de la particule fictive est donc fixée par son énergie \mathcal{E} et par le potentiel $V(x_0)$ à l'équilibre. Il nous faut maintenant faire appel à la mécanique quantique pour démontrer que cette énergie, qui est donc une énergie vibrationnelle, ne peut prendre que certaines valeurs.

1.1.1.2 Point de vue quantique

En utilisant l'équation précédente issue de la description classique, et après plusieurs développements mathématiques présentés en annexe A, nous pouvons exprimer l'énergie d'un oscillateur harmonique selon la mécanique quantique telle que :

$$\mathcal{E}_k^p = \hbar\omega_k \left(p + \frac{1}{2} \right) + V(x_0) \quad (1.9)$$

avec \mathcal{E}_k^p l'énergie du $p^{\text{ième}}$ harmonique du $k^{\text{ième}}$ mode de vibration, avec les nombres entiers p et k , et \hbar la constante de Planck réduite (J.s.rad⁻¹). Grâce à cette équation nous constatons que dans le cas de la mécanique quantique, l'énergie d'un oscillateur harmonique est quantifiée et a un minimum différent de $V(x_0)$. À partir de cela nous pouvons déterminer l'énergie de la vibration fondamentale et celles de tous ses harmoniques. Si l'on étudie la différence énergétique du $k^{\text{ième}}$ mode entre deux vibrations harmoniques successives on obtient :

$$\Delta\mathcal{E}_k = \mathcal{E}_k^{p+1} - \mathcal{E}_k^p \quad (1.10a)$$

$$\Delta\mathcal{E}_k = \hbar\omega_k \quad (1.10b)$$

ainsi la fréquence angulaire du photon permettant le passage d'un état énergétique vibrationnel à l'état énergétique vibrationnel supérieur est égale à la fréquence angulaire fondamentale de la vibration moléculaire. Cette différence énergétique, si elle peut être mesurée, peut donc permettre l'obtention de la fréquence angulaire de la vibration de la molécule. En spectroscopie, cette mesure de l'énergie vibrationnelle est plus communément donnée en cm⁻¹, soit l'inverse de la longueur d'onde en cm. Pour la majorité des molécules ces énergies se situent entre 200 et 3600 cm⁻¹ [4].

Ainsi, j'ai démontré que la molécule vibrante possède des niveaux énergétiques définis. C'est pourquoi, lorsqu'un électron est excité par une onde électromagnétique dont l'énergie est égale à la différence d'énergie entre deux niveaux vibrationnels, il est autorisé à atteindre le niveau énergétique supérieur, augmentant alors le potentiel de la molécule. Dans le cas de la diffusion Raman, on utilise pourtant des énergies plus importantes que celles des vibrations. Je vais expliquer dans la section suivante comment ces transitions énergétiques sont possibles.

1.1.2 Description de la diffusion Raman spontanée

Dans le cas de la spectroscopie Raman, des ondes excitatrices plus énergétiques que les vibrations moléculaires sont employées. Elles vont faire osciller le nuage électronique

des molécules ce qui va entraîner l'apparition d'un moment dipolaire électrique \vec{D} (C.m) pour chacune des molécules. La capacité d'une molécule à générer un moment dipolaire sous l'action d'un champ est donnée par la polarisabilité de premier ordre α (C.V⁻¹.m²), un tenseur d'ordre deux tel que :

$$\vec{D} = \alpha \vec{E}. \quad (1.11)$$

L'ensemble des vecteurs dipolaires des molécules va produire dans le matériau une polarisation électrique, qui au premier ordre $\vec{P}^{(1)}$ (C.m⁻²), s'exprime de la manière suivante :

$$\vec{P}^{(1)} = \frac{1}{V} \sum_N \langle \vec{D} \rangle \quad (1.12a)$$

$$= \frac{1}{V} \sum_N \langle \alpha \vec{E} \rangle \quad (1.12b)$$

avec V le volume d'intérêt et N le nombre de molécules dans ce volume.

L'intensité du champ rayonné par les molécules excitées va dépendre de $\vec{P}^{(1)}$. Il nous faut donc obtenir une expression de la polarisabilité de premier ordre pour remonter à celle du moment dipolaire et enfin à la polarisation. Pour révéler ces propriétés du matériau qui gouvernent l'oscillation de l'électron nous faisons appel à une description mixte du phénomène d'excitation d'une molécule par une onde électromagnétique. C'est la description semi-quantique de l'interaction lumière-matière qui considère une onde électromagnétique incidente classique, entrant en interaction avec un objet quantique.

Les grandeurs qui caractérisent les objets quantiques que sont la molécule et l'électron seront donc des grandeurs quantiques comme les fonctions d'onde représentées par la notation de Dirac (sous forme de bra-ket) et les opérateurs décrits en préambule de l'annexe A. Le développement de la description semi-quantique de l'interaction photon-molécule est, elle, donnée en annexe B. Elle nous permet d'obtenir l'expression d'une composante de l'opérateur de polarisabilité de premier ordre $(\alpha_{yx})_{v^f, v^i}$ décrivant la transition entre un niveau vibrationnel initial v^i et final v^f :

$$(\alpha_{yx})_{v^f, v^i} = \frac{1}{\hbar} \sum_q \frac{\langle v^f | D_y(Q) | v^q \rangle \langle v^q | D_x(Q) | v^i \rangle}{\omega_{v^q i} - \omega - i\Gamma_{v^q i}} \quad (1.13)$$

avec l'index yx indiquant que le vecteur polarisation de l'onde excitatrice est selon un axe x et le moment dipolaire est orienté selon un autre axe y ; q l'index des états non perturbés de la molécule; $D_y(Q)$ et $D_x(Q)$ des composantes du moment dipolaire adiabatique avec Q l'index des coordonnées vibrationnelles; $\omega_{v^q i}$ la différence de fréquence angulaire entre l'état énergétique du niveau v^q et du niveau initial v^i ; ω la fréquence angulaire de l'onde incidente et $\Gamma_{v^q i}$ la demi-largeur de la raie Raman.

Grâce à cette expression de la polarisabilité on peut traduire la diffusion sous forme de diagramme énergétique dans le cas d'une vibration moléculaire isolée : l'électron ne peut atteindre qu'un seul niveau v^q et tout phénomène de résonance vibronique ou électronique est exclu. Ce niveau est dit virtuel car il ne correspond pas aux niveaux énergétiques vibrationnels dont nous avons donné l'expression à l'équation 1.9. Il est illustré figure 1.1 par un trait discontinu. On voit, grâce à l'équation 1.13, que lorsque le champ excitateur a une fréquence angulaire ω égale à la fréquence angulaire correspondant à la différence d'énergie entre l'état initial $|v^i\rangle$ et l'état virtuel $|v^q\rangle$, soit $\omega_{v^q i}$, nous sommes à la résonance : $(\alpha_{yx})_{v^f, v^i}$ est alors purement complexe et sa norme prend une valeur importante. Au numérateur, sont illustrées les transitions entre les niveaux énergétiques $|v^i\rangle$ et $|v^q\rangle$ d'une part, et entre $|v^q\rangle$ et $|v^f\rangle$ d'autre part. Néanmoins, ces transitions ne sont permises que sous certaines conditions, qui diffèrent selon que nous avons affaire à une diffusion Rayleigh, Raman Stokes ou anti-Stokes.

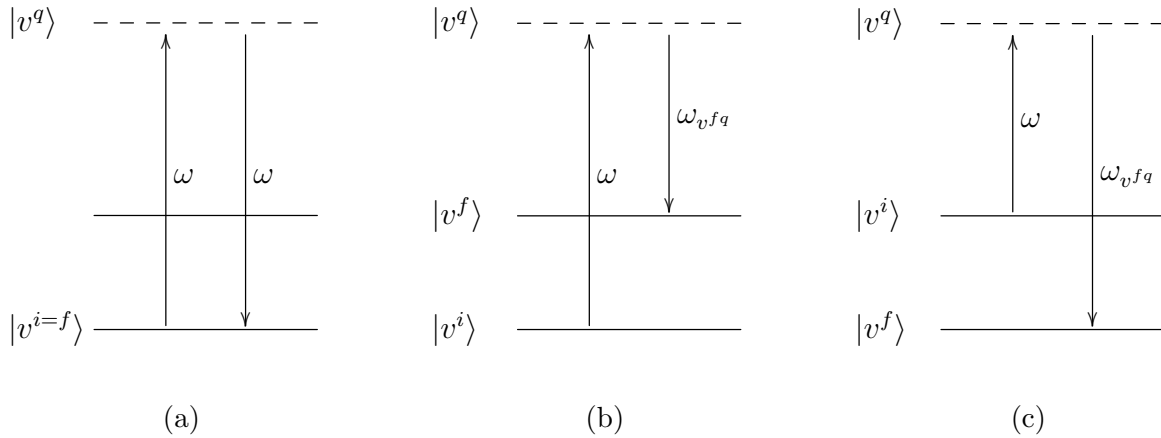


FIGURE 1.1 – Diagramme énergétique de la diffusion (a) Rayleigh, (b) Raman Stokes et (c) anti-Stokes.

Afin de déterminer ces conditions nous devons développer $(\alpha_{yx})_{v^f, v^i}$ en série de Taylor :

$$(\alpha_{yx})_{v^f, v^i} = \alpha_{yx}(Q)_0 \langle v^f | v^i \rangle + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{yx}(Q)}{\partial Q_k} \right) \Big|_0 \langle v^f | Q_k | v^i \rangle. \quad (1.14)$$

En utilisant l'approximation harmonique nous pouvons développer les fonctions d'onde vibrationnelles sous forme de produit de fonctions d'onde d'oscillateurs harmoniques, $\phi_{v^p}^k(Q)$, correspondant aux k modes de vibration de la molécule :

$$|v^p\rangle = \prod_k \phi_{v^p}^k(Q) \quad (1.15)$$

avec v_k^p le nombre quantique du $p^{\text{ième}}$ harmonique du $k^{\text{ième}}$ mode vibrationnel de la

molécule. Cela donne :

$$(\alpha_{yx})_{v^f, v^i} = \alpha_{yx}(Q)_0 \prod_k \langle \phi_{v^f}^k | \phi_{v^i}^k \rangle + \frac{1}{2} \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{yx}(Q)}{\partial Q_k} \right) \Big|_0 \prod_k \langle \phi_{v^f}^k | Q_k | \phi_{v^i}^k \rangle. \quad (1.16)$$

Grâce à l'équation 1.16 nous pouvons déterminer les transitions permises lors de l'excitation de la molécule par l'onde électromagnétique incidente. Pour cela il nous faut nous aider des propriétés des fonctions d'onde des oscillateurs harmoniques [5] :

$$\langle \phi_{v^f}^k | \phi_{v^i}^k \rangle = \begin{cases} 1 & \text{si } v_k^f = v_k^i \\ 0 & \text{si } v_k^f \neq v_k^i \end{cases} \quad (1.17)$$

$$\langle \phi_{v^f}^k | Q_k | \phi_{v^i}^k \rangle = \begin{cases} \sqrt{\frac{\hbar}{2\omega_k}} (v_k^i + 1) & \text{si } v_k^f = v_k^i + 1 \\ \sqrt{\frac{\hbar}{2\omega_k}} v_k^i & \text{si } v_k^f = v_k^i - 1 \\ 0 & \text{autrement.} \end{cases} \quad (1.18)$$

Dans le cas de la diffusion Rayleigh ($v_k^f = v_k^i$) seul le premier terme de l'équation 1.16 sera non nul, à condition qu'au moins une des composantes $\alpha_{yx}(Q)_0$ soit non nulle, ce qui est toujours vrai. Nous pouvons donc dire que lors de l'excitation d'une molécule par une onde électromagnétique il y a toujours une diffusion Rayleigh.

Dans le cas de la diffusion Raman Stokes ($v_k^f = v_k^i + 1$) et anti-Stokes ($v_k^f = v_k^i - 1$), le deuxième terme de l'équation 1.16 sera non nul si la dérivée d'une des composantes $\alpha_{yx}(Q)_0$ par rapport aux coordonnées vibrationnelles Q_k est non nulle. Ce terme dépend donc de la géométrie de la molécule et notamment de la variation de la valeur des composantes de la polarisabilité adiabatique au cours d'une vibration.

Maintenant que nous connaissons les transitions permises lors d'une diffusion Raman Stokes, nous pouvons réécrire la valeur du moment dipolaire électrique de la molécule à partir des équations 1.13 et B.45 pour une vibration moléculaire isolée afin de réduire la sommation à un seul état non perturbé q de la molécule :

$$(D_y^{(1)})_{v_k^i+1, v_k^i} = (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \tilde{E}_x \cos((\omega - \omega_k)t) \quad (1.19a)$$

$$= -\frac{1}{\hbar} \frac{\langle v_k^i + 1 | D_y(Q) | v^q \rangle \langle v^q | D_x(Q) | v_k^i \rangle}{\omega - \omega_{v^q i} + i\Gamma_{v^q i}} \tilde{E}_x \cos((\omega - \omega_k)t). \quad (1.19b)$$

avec ω_k la fréquence angulaire de la transition fixée par $v_k^f = v_k^i + 1$: soit la fréquence angulaire de la vibration fondamentale donnée équation 1.10b.

Par ailleurs, à partir de l'annexe C nous savons que le moment dipolaire électrique oscillant à la fréquence angulaire ω provoque la diffusion d'une onde électromagnétique à cette même fréquence. Il vient donc que l'intensité du champ électrique polarisé selon la

direction y produit par $(D_y^{(1)})_{fi}$ est :

$$I_y(\vec{r}) = (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{16\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \left| (D_y^{(1)})_{v_k^i+1, v_k^i} \right|^2 \quad (1.20a)$$

$$= (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \tilde{E}_x^2 \left| (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \right|^2 \quad (1.20b)$$

$$= (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \tilde{E}_x^2 \frac{1}{\hbar^2} \left| \frac{\langle v_k^i + 1 | D_y(Q) | v^q \rangle \langle v^q | D_x(Q) | v_k^i \rangle}{\omega - \omega_{v^q i} + i\Gamma_{v^q i}} \right|^2 \quad (1.20c)$$

avec $n(\omega - \omega_k)$ l'indice de réfraction à la fréquence angulaire $\omega - \omega_k$; θ l'angle entre la liaison moléculaire et le vecteur polarisation de l'onde excitatrice; et r la distance à laquelle est mesurée l'intensité.

Ces dernières relations ne donnent l'intensité de la diffusion Stokes émise que par une unique molécule. L'onde électrique excite plusieurs molécules, qui au temps t_0 de l'excitation ne vibrent pas en phase. C'est pourquoi le champ émis par une molécule n'est pas corrélé avec le champ émis par une autre molécule. Pour en tenir compte on somme les normes au carré de la polarisabilité des molécules

$$I_y^{total}(\vec{r}) = (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \tilde{E}_x^2 \left| \sum_N (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \right|^2 \quad (1.21)$$

$$= (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \tilde{E}_x^2 \sum_N \left| (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \right|^2 \quad (1.22)$$

avec N le nombre de molécules. Il vient alors simplement que :

$$I_y^{total}(\vec{r}) = (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \tilde{E}_x^2 N \left| (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \right|^2. \quad (1.23)$$

Les fonctions d'onde dans le terme de droite de l'équation 1.20c peuvent être considérées comme réelles et peuvent être englobées dans la valeur K_1 (ayant alors la dimension de $D_y^2(Q)$, donc en $C^2.m^2$). On obtient alors :

$$I_y^{total}(\vec{r}) = (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \tilde{E}_x^2 N \frac{K_1^2}{\hbar^2} \left| \frac{1}{\omega - \omega_{v^q i} + i\Gamma_{v^q i}} \right|^2 \quad (1.24a)$$

$$= (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \tilde{E}_x^2 N \frac{K_1^2}{\hbar^2} \frac{1}{(\omega - \omega_{v^q i})^2 + \Gamma_{v^q i}^2} \quad (1.24b)$$

$$= (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k)}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \theta}{r^2} \tilde{E}_x^2 N \frac{K_1}{\hbar \Gamma_{v^q i}} \Im \left\{ (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \right\}. \quad (1.24c)$$

Ainsi l'intensité de l'onde électrique diffusée par toutes les molécules va être proportionnelle à N . Plus précisément, en utilisant la loi de distribution de Maxwell-

Boltzmann sur les deux niveaux énergétiques du mode de vibration k , nous pouvons obtenir, parmi les N molécules, la fraction de molécules $f_{v_k^i}$ dans l'état vibrationnel v_k^i qui va être excitée vers l'état $v_k^f = v_k^i + 1$, et la fraction de molécules $f_{v_{k+1}^i}$ dans l'état vibrationnel v_{k+1}^i qui va être excitée vers l'état $v_k^f = v_k^i$:

$$f_{v_k^i} = \frac{1}{1 + e^{-\hbar\omega_k/k_B T}} \quad (1.25a)$$

$$f_{v_{k+1}^i} = \frac{1}{1 + e^{\hbar\omega_k/k_B T}} \quad (1.25b)$$

avec k_B la constante de Boltzmann ($J.K^{-1}$) et T la température (K). Ces fractions vont bien sûr déterminer le nombre de molécules induisant une diffusion Stokes, la fraction $f_{v_k^i}$, et une diffusion anti-Stokes, $f_{v_{k+1}^i}$. Il vient alors que le rapport entre les intensités Stokes et anti-Stokes est :

$$\frac{I(\vec{r})_{Stokes}}{I(\vec{r})_{anti-Stokes}} = \frac{n(\omega - \omega_k)}{n(\omega + \omega_k)} \left(\frac{\omega - \omega_{v_{k+1}^i, v_k^i}}{\omega - \omega_{v_k^i, v_{k+1}^i}} \right)^4 \frac{f_{v_k^i}}{f_{v_{k+1}^i}} \quad (1.26a)$$

$$= \frac{n(\omega - \omega_k)}{n(\omega + \omega_k)} \left(\frac{\omega - \omega_k}{\omega + \omega_k} \right)^4 e^{\hbar\omega_k/k_B T}. \quad (1.26b)$$

Ce rapport est toujours très largement supérieur à 1, sauf pour des températures excessivement hautes. Ceci explique la probabilité plus grande de rencontrer une diffusion Stokes qu'une diffusion anti-Stokes.

En exprimant cette intensité rayonnée par plusieurs molécules, nous venons de passer de l'échelle microscopique à macroscopique. À ce niveau il est d'usage d'employer d'autres grandeurs physiques afin de décrire le processus de diffusion. Par exemple, pour la diffusion Raman Stokes, la composante de la polarisation électrique du premier ordre vue équations 1.12 est :

$$\vec{P}_y^{(1)} = \frac{1}{V} \sum_{f_{v_k^i} N} \langle (\vec{D}_y^{(1)})_{v_k^i+1, v_k^i} \rangle \quad (1.27a)$$

$$= \frac{1}{V} \sum_{f_{v_k^i} N} \langle (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \rangle \cdot \vec{E}_x \quad (1.27b)$$

avec $\langle (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \rangle$ la moyenne des composantes du tenseur de polarisabilité par molécule. Or une autre équation lie la polarisation du milieu avec le champ électrique :

$$\vec{P}_y^{(1)} = \varepsilon_0 \chi_{yx}^{(1)} \vec{E}_x \quad (1.28)$$

avec $\chi_{yx}^{(1)}$ une composante de la susceptibilité électrique du premier ordre sans unité,

évoquée en début de cette partie. Nous pouvons donc en déduire que :

$$\chi_{yx}^{(1)} = \frac{1}{V\varepsilon_0} \sum_{f_{v_k^i}^i N} \langle (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \rangle. \quad (1.29)$$

Mais ce qui nous intéresse est la norme au carré de la moyenne des composantes du tenseur de polarisabilité qui donne :

$$\left| \chi_{yx}^{(1)} \right|^2 = f_{v_k^i}^i N \frac{1}{V^2 \varepsilon_0^2} \left| \langle (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \rangle \right|^2 \quad (1.30)$$

car les N molécules ne vibrent pas en phase à l'origine comme dit précédemment. Cette dernière relation nous permet de transiter entre les grandeurs microscopique et macroscopique, respectivement $(\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i}$ et $\chi_{yx}^{(1)}$, rentrant en jeu lors de la diffusion Raman. Nous remarquons alors que $|\chi_{yx}^{(1)}|^2$ est proportionnel à N , ce qui entraîne la linéarité de l'intensité du champ diffusé et le nombre de molécules. Selon 1.23 et 1.29, on peut réécrire cette intensité pour une diffusion Raman Stokes :

$$I_y(\vec{r})_{total} = (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k) \varepsilon_0 \sin^2 \theta}{32\pi^2 c^3} \frac{1}{r^2} V^2 \tilde{E}_x^2 \left| \chi_{yx}^{(1)} \right|^2 \quad (1.31a)$$

$$= (\omega - \omega_k)^4 \frac{n(\omega - \omega_k) \varepsilon_0 \sin^2 \theta}{32\pi^2 c^3} \frac{1}{r^2} V^2 \tilde{E}_x^2 \mathfrak{S} \{ \chi_{yx}^{(1)} \}. \quad (1.31b)$$

Or nous pouvons exprimer l'intensité du champ électrique incident telle que :

$$I_x(\omega) = \frac{1}{2} n \varepsilon_0 c \tilde{E}_x^2. \quad (1.32)$$

Et donc, en définissant la fréquence angulaire de la diffusion Raman Stokes $\omega_S = \omega - \omega_k$ nous obtenons l'intensité totale :

$$I_y(\omega_S, \vec{r})_{total} = \omega_S^4 \frac{n(\omega_S)}{n(\omega)} \frac{\sin^2 \theta}{16\pi^2 c^4} V^2 I_x(\omega) \mathfrak{S} \{ \chi_{yx}^{(1)} \}. \quad (1.33)$$

Dans la plupart des cas une expression aussi explicite de l'intensité n'est pas utile, si ce n'est qu'elle démontre la faible efficacité du phénomène. Par exemple, dans les conditions normales de température et de pression, l'efficacité de la diffusion Raman Stokes de la molécule de diazote est : $\int I(\omega_S, \vec{r})_{total} dS / \int I(\omega) dS \approx 10^{-8}$ [5] (avec dS la surface élémentaire d'intégration). Il nous suffira de nous rappeler des dépendances de l'intensité de la diffusion Raman lorsque nous la comparerons avec l'intensité de la diffusion anti-Stokes cohérente :

$$I_y(\omega_S, \vec{r})_{total} \propto \omega_S^4 I_x(\omega) \mathfrak{S} \{ \chi_{yx}^{(1)} \}. \quad (1.34)$$

Outre, la linéarité entre l'intensité de l'onde incidente et l'intensité de la diffusion Raman,

il est judicieux d'étudier l'allure de $\Im \left\{ \chi_{yx}^{(1)} \right\}$, notamment sa dépendance fréquentielle selon ω_{vqi} qui est la même que celle de $\Im \left\{ (\alpha_{yx})_{v_k^i+1, v_k^i} \right\}$ donnée 1.24b :

$$\Im \left\{ \chi_{yx}^{(1)} \right\} \propto \frac{1}{(\omega - \omega_{vqi})^2 + \Gamma_{vqi}^2}. \quad (1.35)$$

Cette variation, illustrée figure 1.2, donne l'allure d'un pic Raman "typique" qui est celle d'une fonction lorentzienne.

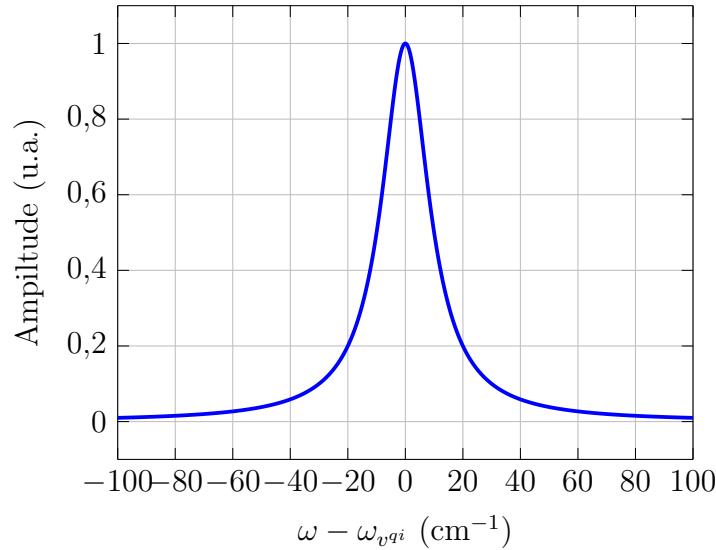


FIGURE 1.2 – Variation normalisée de $\Im \left\{ \chi_{yx}^{(1)} \right\}$ en fonction de la différence de fréquences angulaires $\omega - \omega_{vqi}$ pour une demi-largeur largeur de raie Raman $\Gamma = 10 \text{ cm}^{-1}$.

Une caractéristique déjà énoncée de la diffusion Raman Stokes est le passage d'un état vibrationnel v_k^i à $v_k^i + 1$, se traduisant par l'émission d'un photon à la fréquence angulaire $\omega_S = \omega - \omega_k$. Ce photon est donc moins énergétique que le photon de l'onde excitatrice. Il semble donc aisé, si l'on possède les outils adaptés, de différencier lors d'une expérience les photons issus de cette diffusion. Malheureusement dans certains milieux, un autre phénomène, également dû à l'onde excitatrice, peut avoir lieu : la fluorescence. Or le photon de fluorescence possède aussi une énergie plus faible que celui du photon incident. Cette valeur d'énergie peut s'étendre le long d'un spectre assez large et peut venir parasiter, sinon noyer la collecte des photons issus de la diffusion Raman Stokes. À l'inverse, le photon issu de la diffusion Raman anti-Stokes possède une fréquence angulaire plus importante que celle du photon excitateur $\omega_{aS} = \omega + \omega_k$. La récolte de ces photons est donc dépourvue de toute fluorescence. Cependant comme nous l'avons constaté aux équations 1.25b et 1.26b le nombre de molécules à ce niveau vibrationnel et donc l'intensité d'une telle diffusion est très faible devant l'intensité de la diffusion Raman Stokes, elle-même déjà peu intense. Pour remédier à cela il a fallu recourir à une autre technique.

1.2 La diffusion Raman anti-Stokes cohérente

Nous venons de voir qu'une onde électromagnétique pouvait provoquer la polarisation d'un milieu, produisant alors d'autres ondes électromagnétiques de fréquences différentes. Il a aussi été montré que l'intensité de ces ondes évoluait linéairement avec l'intensité de l'onde excitatrice, d'où l'appellation de phénomène linéaire. Grâce à l'invention du laser [6], les ondes électromagnétiques peuvent aujourd'hui atteindre des intensités permettant d'aborder les effets non linéaires. Selon les propriétés de symétrie du milieu, l'intensité d'une onde électromagnétique produite par une onde excitatrice peut évoluer selon l'intensité de cette dernière à la puissance n , si le champ exciteur est assez intense pour provoquer la polarisation à l'ordre n de ce milieu. Ces effets non linéaires promettent ainsi une meilleure efficacité d'utilisation de la puissance du champ exciteur. En 1965, P. D. Maker et R. W. Terhune [7] publient leurs travaux sur différents effets optiques provoqués par des polarisations du troisième ordre induites par des ondes électromagnétiques. Ils exposent dans leur article un phénomène provoqué par deux faisceaux lasers : l'un à la fréquence angulaire ω et l'autre à $\omega - \Delta$. Ces deux ondes produisent une polarisation du troisième ordre dans le milieu telle que :

$$P_l^{(3)}(\omega + \Delta) = 3\varepsilon_0 \chi_{lmno}^{(3)}(-(\omega + \Delta); \omega, -(\omega - \Delta), \omega) E_m(\omega) E_n(\omega) E_o(\omega - \Delta) e^{i(2k_\omega - k_{\omega - \Delta})r} \quad (1.36)$$

avec l, m, n et o des indices muets de direction et $\chi_{lmno}^{(3)}$, en $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-2}$, une composante de la susceptibilité électrique d'ordre trois ayant la dimension d'un tenseur d'ordre quatre.

Cette polarisation, à la manière de la polarisation d'ordre un dont nous avons parlé dans la partie précédente, peut générer une nouvelle onde électromagnétique à la fréquence angulaire $\omega + \Delta$. Une propriété toute particulière de ce mélange à quatre ondes est que lorsque Δ est égale à la fréquence angulaire d'une vibration moléculaire ω_k , un phénomène de résonance moléculaire cohérente se produit, et la fréquence de l'onde émise vaut alors $\omega + \omega_k$. On reconnaît la fréquence caractéristique d'une diffusion Raman anti-Stokes dont on peut alors se servir pour étudier le milieu polarisé : établir une mesure de spectroscopie. C'est en 1974 que le terme *Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy* [8] (spectroscopie Raman anti-Stokes cohérente) est employé pour décrire cette technique, par la suite en découlera l'acronyme CARS³.

3. L'acronyme CARS sera par la suite employé pour désigner le terme *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering* [9, 10] (diffusion Raman anti-Stokes cohérente).

1.2.1 Polarisation du troisième ordre engendrée par un champ électromagnétique

De la même manière que nous avons exprimé la polarisation du premier ordre engendrée par un seul champ électrique perturbateur, il nous faut maintenant exprimer la polarisation du troisième ordre engendrée, logiquement, par trois ondes perturbatrices afin de la lier plus tard à l'expression précédente. D'après 1.12a il vient que :

$$\vec{P}^{(3)} = \frac{1}{V} \sum_{f_{v_k^i}^N} \langle (\vec{D}^{(3)})_{v_k^f, v_k^i} \rangle. \quad (1.37)$$

Encore une fois, c'est le calcul de $\langle (\vec{D}^{(3)})_{v_k^f, v_k^i} \rangle$, l'opérateur de moment dipolaire moyen de troisième ordre, qui est crucial. Afin de l'obtenir il nous faut introduire un nouvel opérateur : l'opérateur densité $\rho(t)$ [11]. Cette opérateur densité se définit tel que :

$$\rho(t) = \sum_{qr} \rho_{qr}(\omega) |v_k^q\rangle \langle v_k^r|. \quad (1.38)$$

L'opérateur densité peut également se développer en une série de différents ordres. À l'ordre zéro il vaut :

$$\rho^{(0)}(t) = \rho(-\infty) = \frac{e^{H/k_B T}}{\text{tr} \{e^{H/k_B T}\}}. \quad (1.39)$$

À l'ordre trois il vaut :

$$\begin{aligned} \rho^{(3)}(t) = \left(-\frac{i}{\hbar}\right)^3 \int_0^\infty d\tau_3 \int_0^\infty d\tau_2 \int_0^\infty d\tau_1 \mathbb{G}(\tau_3) \mathbb{H}_p(t - \tau_3) \mathbb{G}(\tau_2) \mathbb{H}_p(t - \tau_3 - \tau_2) \\ \times \mathbb{G}(\tau_1) \mathbb{H}_p(t - \tau_3 - \tau_2 - \tau_1) \rho(-\infty). \end{aligned} \quad (1.40)$$

avec τ_n l'intervalle de temps entre l'instant d'application d'un champ à t_{n-1} et l'application d'un autre champ à t_n .

Une nouvelle notation a aussi été introduite, celle des superopérateurs agissant comme des commutateurs. Ainsi \mathbb{H}_p est le superopérateur de l'hamiltonien de perturbation et il peut agir sur l'opérateur A tel que :

$$\mathbb{H}A = [H, A]. \quad (1.41)$$

Quant à \mathbb{G} , il désigne le superopérateur de la fonction de Green défini tel que :

$$\mathbb{G} = \theta(\omega) e^{i\mathbb{H}\omega/\hbar} \quad (1.42)$$

avec $\theta(\omega)$ la fonction d'Heaviside ou fonction échelon.

En reprenant l'équation 1.40 nous pouvons décrire phénoménologiquement l'opérateur densité d'ordre trois : avant toute perturbation l'opérateur densité d'ordre zéro décrit le système; puis intervient une perturbation à $t - \tau_3 - \tau_2 - \tau_1$; après cette perturbation, durant un interval τ_1 le système évolue selon $\mathbb{G}(\tau_1)$; puis il est de nouveau perturbé à $t - \tau_3 - \tau_2$; durant un nouvelle intervalle de temps τ_2 évolue selon $\mathbb{G}(\tau_2)$; intervient une dernière perturbation à $t - \tau_3$ et le système arrive finalement à l'instant t après un dernier intervalle t_3 pendant lequel il évolue selon $\mathbb{G}(\tau_3)$.

Grâce à cette description de $\rho^{(3)}(t)$ nous pouvons établir la valeur de $\langle\langle \vec{D}^{(3)} \rangle\rangle_{v_k^f, v_k^i}$ en utilisant cette relation :

$$\langle\langle \vec{D}^{(3)} \rangle\rangle_{v_k^f, v_k^i} = \text{tr}[D\rho^{(3)}(t)] \quad (1.43)$$

et il vient donc que :

$$\begin{aligned} \langle\langle (D_l^{(3)}) \rangle\rangle_{v_k^f, v_k^i} &= \left(-\frac{i}{\hbar}\right)^3 \sum_{lmno} \int_0^\infty d\tau_3 \int_0^\infty d\tau_2 \int_0^\infty d\tau_1 \langle D_l \mathbb{G}(\tau_3) D_m \mathbb{G}(\tau_2) D_n \mathbb{G}(\tau_1) D_o \rho(-\infty) \rangle \\ &\quad \times E_m(t - \tau_3) E_n(t - \tau_3 - \tau_2) E_o(t - \tau_3 - \tau_2 - \tau_1). \end{aligned} \quad (1.44)$$

Il est plus aisé d'exprimer $\langle\langle (D_l^{(3)}) \rangle\rangle_{v_k^f, v_k^i}$ dans le domaine spectral. Dans l'approximation où la durée des champs perturbatifs E est courte nous pouvons écrire :

$$\begin{aligned} \langle\langle (D_l^{(3)}) \rangle\rangle_{v_k^f, v_k^i}(\omega_3 + \omega_2 + \omega_1) &= \\ \left(-\frac{1}{\hbar}\right)^3 \sum_{lmno} \langle D_l \mathbb{G}(\omega_3 + \omega_2 + \omega_1) D_m \mathbb{G}(\omega_2 + \omega_1) D_n \mathbb{G}(\omega_1) D_o \rho(\infty) \rangle & E_m(\omega_3) E_n(\omega_2) E_o(\omega_1). \end{aligned} \quad (1.45)$$

Nous pouvons alors reprendre 1.37 pour exprimer la polarisation du matériel dans la direction l . Pour plus de clarté $\langle\langle (D_l^{(3)}) \rangle\rangle_{v_k^f, v_k^i}(\omega_3 + \omega_2 + \omega_1)$ sera réécrit $\langle\langle (D_l^{(3)}) \rangle\rangle_{v_k^f, v_k^i}(\omega_4)$, avec $\omega_4 = \omega_3 + \omega_2 + \omega_1$ et donc :

$$P_l^{(3)}(\omega_4) = \frac{1}{V} \sum_{f_{v_k^i}^N} \langle\langle (D_l^{(3)}) \rangle\rangle_{v_k^f, v_k^i}(\omega_4). \quad (1.46)$$

Or, à l'instar de l'équation 1.28, nous pouvons lier $P_l^{(3)}(\omega_4)$ à une susceptibilité électronique du troisième ordre $\chi_{lmno}^{(3)}$ telle que :

$$P_l^{(3)}(\omega_4) = 6\varepsilon_0 \chi_{lmno}^{(3)}(\omega_4; \omega_3, \omega_2, \omega_1) E_m(\omega_3) E_n(\omega_2) E_o(\omega_1). \quad (1.47)$$

Il vient donc d'après 1.45 que :

$$\chi_{lmno}^{(3)}(\omega_4; \omega_3, \omega_2, \omega_1) = -\frac{1}{6\varepsilon_0 \hbar^3 V} \sum_{f_{v_k}^i} \sum_{N l m n o} \langle D_l \mathbb{G}(\omega_4) D_m \mathbb{G}(\omega_2 + \omega_1) D_n \mathbb{G}(\omega_1) D_o \rho(-\infty) \rangle. \quad (1.48)$$

Dans le cas qui nous intéresse nous devons provoquer l'apparition d'une susceptibilité du troisième ordre correspondant à celle de l'équation 1.36. Nous pouvons la réécrire de la manière suivante : $\chi_{lmno}^{(3)}(-2\omega - \omega_S; \omega, -\omega_S, \omega)$, avec $\omega - \omega_k$ remplacé par ω_S faisant référence à l'onde Stokes de la diffusion spontanée. La lecture des termes dans la parenthèse permet d'obtenir le comportement des champs électromagnétiques : les fréquences angulaires négatives et positives désignent respectivement les champs émis et les champs absorbés comme illustré sur la figure 1.3.

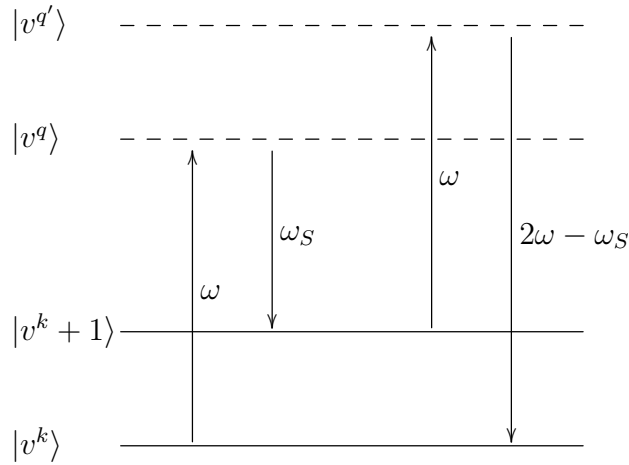


FIGURE 1.3 – Diagramme énergétique du processus CARS.

Néanmoins ce diagramme ne reflète pas qu'un seul des chemins quantiques réunis dans la somme de l'équation 1.48. Pour comprendre de quelle manière ces chemins contribuent à $\chi_{lmno}^{(3)}$ il nous faut utiliser un modèle simple de description de l'opérateur densité $\rho^{(3)}$. Ce modèle, dit de relaxation, nous permet d'écrire une composante du superopérateur de la fonction de Green dans le domaine spectrale de telle manière [12] :

$$G_{v^p v^{p'}}(\omega) = \frac{1}{\omega - \omega_{v^p v^{p'}} + i\Gamma_{v^p v^{p'}}} \quad (1.49)$$

avec $v^p v^{p'}$ illustrant l'état du système selon le ket $|v^p\rangle$ et le bra $\langle v^{p'}|$.

On peut alors développer le terme dans la somme de l'équation 1.48. Dans le cas où l'arrivée des champs n'est pas déterminé chronologiquement, il faut prendre en compte toutes les permutations de champs. En guise d'exemple nous allons développer le cas où

l'arrivée est déterminée chronologiquement avec $\omega_1 = \omega$, $\omega_2 = -\omega_S$ et $\omega_3 = \omega$:

$$\begin{aligned} \langle D_l \mathbb{G}(2\omega - \omega_S) D_m \mathbb{G}(\omega - \omega_S) D_n \mathbb{G}(\omega) D_o \rho(-\infty) \rangle = \\ \langle D_l \left[G(2\omega - \omega_S) D_m, \left[G(\omega - \omega_S) D_n, [G(\omega) D_o, \rho(-\infty)] \right] \right] \rangle \end{aligned} \quad (1.50a)$$

$$\begin{aligned} \langle D_l \mathbb{G}(2\omega - \omega_S) D_m \mathbb{G}(\omega - \omega_S) D_n \mathbb{G}(\omega) D_o \rho(-\infty) \rangle = \\ \langle D_l \left\{ G(2\omega - \omega_S) D_m G(\omega - \omega_S) D_n G(\omega) D_o \rho(-\infty) - \rho(-\infty) G(\omega) D_o G(\omega - \omega_S) D_n G(2\omega - \omega_S) D_m \right. \\ + G(\omega) D_o \rho(-\infty) G(\omega - \omega_S) D_n G(2\omega - \omega_S) D_m - G(2\omega - \omega_S) D_m G(\omega - \omega_S) D_n \rho(-\infty) G(\omega) D_o \\ + G(\omega - \omega_S) D_n \rho(-\infty) G(\omega) D_o G(2\omega - \omega_S) D_m - G(2\omega - \omega_S) D_m G(\omega) D_o \rho(-\infty) G(\omega - \omega_S) D_n \\ \left. + G(2\omega - \omega_S) D_m \rho(-\infty) G(\omega) D_o G(\omega - \omega_S) D_n - G(\omega - \omega_S) D_n G(\omega) D_o \rho(-\infty) G(2\omega - \omega_S) D_m \right\} \rangle \end{aligned} \quad (1.50b)$$

Nous remarquons alors que l'équation se développe en huit termes différents. Ces termes correspondent à huit chemins quantiques distincts. Ainsi pour trois permutations des champs excitateurs, nous avons dans le cas du phénomène CARS vingt-quatre chemins quantiques à prendre en compte.

Nous pouvons étudier plus précisément des termes de cette première permutation. Pour cela nous allons nous aider de diagrammes de Feynman [13] qui vont nous servir à illustrer les chemins quantiques. En prenant par exemple le premier terme :

$$\langle D_l G(2\omega - \omega_S) D_m G(\omega - \omega_S) D_n G(\omega) D_o \rho(-\infty) \rangle \quad (1.51)$$

les termes à gauche de l'opérateur densité seront en lien avec le ket du terme, les termes à droite, ici absents, seront en lien avec le bra. Le bra et le ket vont être représentés par deux lignes verticales. Au temps initial nous considérons le système dans l'état $|v^k\rangle\langle v^k|$, on peut ainsi réécrire l'opérateur densité $\rho(-\infty) = \rho_{v^k v^k}(-\infty)$. Différents processus vont modifier l'état du ket $|v^k\rangle$ et du bra $\langle v^k|$ au cours du temps, ils seront tracés chronologiquement du bas vers le haut le long des traits. Dans notre cas, le premier champ excitateur est le champ à la fréquence ω : il va y avoir transition du moment dipolaire D_o du niveau énergétique v^k à v^q : D_o devient $D_o^{v^q v^k}$; le vecteur ket passe de $|v^k\rangle$ à $|v^q\rangle$, quant au vecteur bra $\langle v^k|$ il restera dans cet état faute de terme à droite de $\rho(\infty)$. Ainsi la composante du superopérateur de la fonction de Green est :

$$G_{v^q v^k}(\omega) = \frac{1}{\omega - \omega_{v^q v^k} + i\Gamma_{v^q v^k}}. \quad (1.52)$$

Cette étape est illustrée par la première flèche du diagramme de Feynman figure 1.4.

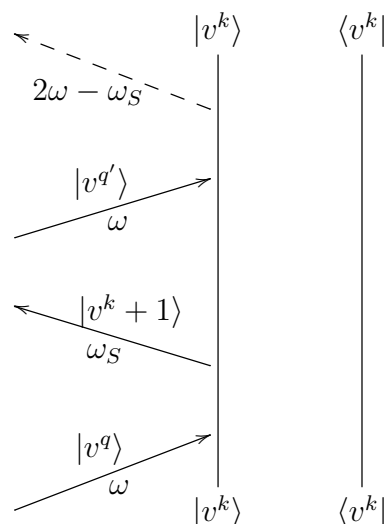


FIGURE 1.4 – Diagramme de Feynman d'un chemin quantique résonant participant au processus CARS et correspondant au diagramme énergétique 1.3.

Du côté du ket ou du côté bra, une excitation est symbolisée par une flèche allant vers la droite et une désexcitation serait illustrée par une flèche allant vers la gauche.

Le deuxième processus est la désexcitation par le champ ω_S du niveau v^q à $v^k + 1$; le ket passe de $|v^q\rangle$ à $|v^k + 1\rangle$ et le bra reste inchangé : c'est l'existence de cet état $|v^k + 1\rangle\langle v^k|$ que l'on nomme cohérence entre les niveaux $v^k + 1$ et v^k , ou encore cohérence Raman, qui affecte seulement quatre des vingt-quatre chemins quantiques [12]! Cet état défini tous les processus de cohérence Raman, ainsi que le CARS, mais il ne peut pas apparaître dans le cas de la diffusion Raman spontanée car il manque un champ excitateur pour amener le système à ce niveau.

Le troisième processus est l'excitation par le champ ω du niveau $v^k + 1$ à v^q' ; le ket passe de $|v^k + 1\rangle$ à $|v^q'\rangle$ et le bra reste inchangé.

Enfin la dernière transition de l'opérateur moment dipolaire D_l définie comme une désexcitation est toujours à gauche de l'opérateur densité et affecte donc toujours le côté ket. Cette transition doit par ailleurs respecter le mélange de fréquence, et on passe donc du niveau énergétique $\omega_{v^q'}$ à ω_{v^k} et il y a émission d'un champ à la fréquence $2\omega - \omega_S$. Le ket lui, auparavant dans l'état $|v^q'\rangle$ va devoir passer au même état que le bra $\langle v^k|$ soit $|v^k\rangle$. Cette dernière désexcitation est particulière car elle représente l'émission due à la matrice densité perturbée; toutes les autres excitations ou désexcitations permettraient seulement de passer de l'opérateur densité non perturbée à l'opérateur densité perturbée. C'est pourquoi dans le diagramme de Feynman cette dernière interaction est représentée différemment, dans notre cas selon une flèche discontinue.

Grâce à cette représentation nous pouvons réécrire l'équation 1.51, qui dans le cas

d'une vibration moléculaire devient :

$$\begin{aligned} \langle D_l G(2\omega - \omega_S) D_m G(\omega - \omega_S) D_n G(\omega) D_o \rho(-\infty) \rangle &= \rho_{v^k v^k}(-\infty) \\ \times \frac{D_l^{v^k v^{q'}} D_m^{v^{q'} v^{k+1}} D_n^{v^{k+1} v^q} D_o^{v^q v^k}}{(2\omega - \omega_S - \omega_{v^{q'} v^k} + i\Gamma_{v^{q'} v^k}) (\omega - \omega_S - \omega_{v^{k+1} v^k} + i\Gamma_{v^{k+1} v^k}) (\omega - \omega_{v^q v^k} + i\Gamma_{v^q v^k})} \end{aligned} \quad (1.53)$$

Pour maximiser ce terme il faut bien entendu que le dénominateur soit le plus petit possible. La minimisation la plus intéressante ici se trouve au deuxième terme du dénominateur : nous observons que lorsque la différence entre la fréquence angulaire du premier champ et du champ Stokes est égale à $\omega_{v^{k+1} v^k}$, soit la fréquence angulaire de la vibration moléculaire, nous avons un phénomène de résonance. Ce chemin quantique présente donc bien une résonance, mais cela n'est pas vrai pour les huit termes que nous avons développés. Par exemple pour le cinquième terme :

$$\langle D_l G(\omega - \omega_S) D_n \rho(-\infty) G(\omega) D_o G(2\omega - \omega_S) D_m \rangle \quad (1.54)$$

nous voyons que l'excitation à ω va agir sur le bra $\langle v^k |$ et le faire passer à l'état $\langle v^q |$: la transition du moment dipolaire restera la même que précédemment $D_o^{v^q v^k}$ mais la composante du superopérateur de la fonction de Green devient $G_{v^k v^q}(\omega)$ car seul le bra a changé. En poursuivant avec la désexcitation à ω_S à gauche de l'opérateur densité, le ket $|v^k\rangle$ va passer à l'état $|v^{q'}\rangle$, la transition du moment dipolaire devient $D_n^{v^{q'} v^q}$ accompagné de $G_{v^{q'} v^q}(\omega - \omega_S)$. Puis, une nouvelle excitation à ω opérant sur la droite de l'opérateur densité va amener le bra $\langle v^q |$ à l'état $\langle v^k + 1 |$, la transition du moment dipolaire devient $D_m^{v^k + 1 v^{q'}}$ accompagné de $G_{v^{q'} v^k + 1}(2\omega - \omega_S)$. Finalement le vecteur ket va passer de l'état $|v^{q'}\rangle$ à celui correspondant au bra $\langle v^k + 1 |$, soit $|v^k + 1\rangle$, la transition du moment dipolaire est alors $D_l^{v^k + 1 v^k}$ pour respecter l'émission à $2\omega - \omega_S$. Cela correspond à l'équation 1.55, au diagramme de Feynman et au diagramme énergétique présentés figure 1.5 :

$$\begin{aligned} \langle D_l G(\omega - \omega_S) D_n \rho(\infty) G(\omega) D_o G(2\omega - \omega_S) D_m \rangle &= \rho_{v^k v^k}(-\infty) \\ \times \frac{D_l^{v^k + 1 v^k} D_m^{v^k + 1 v^{q'}} D_n^{v^{q'} v^q} D_o^{v^q v^k}}{(2\omega - \omega_S - \omega_{v^{q'} v^k + 1} + i\Gamma_{v^{q'} v^k + 1}) (\omega - \omega_S - \omega_{v^{q'} v^q} + i\Gamma_{v^{q'} v^q}) (\omega - \omega_{v^k v^q} + i\Gamma_{v^k v^q})} \end{aligned} \quad (1.55)$$

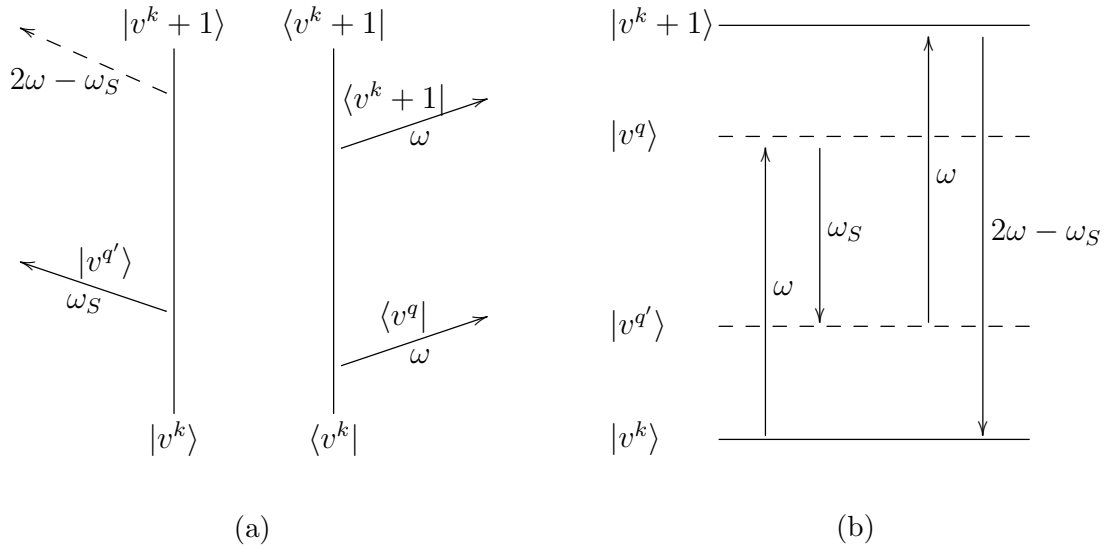


FIGURE 1.5 – Diagramme de Feynman d'un chemin quantique non résonant apparaissant avec le processus CARS (a) et son diagramme énergétique correspondant (b).

En étudiant le dénominateur de l'équation 1.55 nous constatons qu'au deuxième terme la minimisation se fait pour $\omega - \omega_S = \omega_{v^q', v^q}$. Cette dernière valeur ne correspond pas à une fréquence angulaire de vibration mais à la différence de fréquences entre deux niveaux virtuels : il n'y a pas résonance. On note que ce sera toujours ce deuxième terme au dénominateur qui déterminera la résonance ou la non-résonance d'un chemin quantique. De plus, le long de ces chemins non résonants il n'apparaît pas d'état $|v^k + 1\rangle\langle v^k|$: il n'y a pas cohérence entre les deux états.

Ce dernier cas, lié au terme présenté équation 1.54, est particulier car il suppose que la différence d'énergie entre les niveaux vibrationnels v^k et $v^k + 1$ soit supérieure à l'énergie du champ oscillant à ω comme illustré figure 1.5b. Cela n'est possible que si le niveau $v^k + 1$ appartient au niveau électronique supérieur. Or dans le cas de la diffusion Raman nous ne nous intéresserons pas à ces niveaux car l'énergie excitatrice est trop faible, néanmoins il nous est apparu important d'illustrer ce type de non-résonances.

Ainsi, comprenant un peu mieux les résonances et non-résonances au sein du processus CARS, nous pouvons, pour une vibration isolée, séparer les parties résonante et non résonante de $\chi_{lmno}^{(3)}$ de telle manière que selon l'équation 1.48 :

$$\chi_{lmno}^{(3)}(-(2\omega - \omega_S); \omega, -\omega_S, \omega) = \chi_{NR}^{(3)} + \chi_R^{(3)} \quad (1.56a)$$

$$= \chi_{NR}^{(3)} + \frac{A}{(\omega - \omega_S) - \omega_{v^k+1v^k} + i\Gamma_{v^k+1v^k}} \quad (1.56b)$$

avec $\chi_{NR}^{(3)}$ regroupant toutes les valeurs de $\chi_{lmno}^{(3)}$ non résonant, et A l'amplitude effective des résonances regroupées par leur dénominateur. Cette partie non résonante de $\chi_{lmno}^{(3)}$ est

réelle [7] et presque totalement indépendante de $\omega_{v^k+1v^k}$ [14].

Comme vu dans l'équation 1.31a l'intensité du champ diffusé lors du processus CARS va être dépendante, non pas de $\chi_{lmno}^{(3)}$ mais de sa norme au carré. On obtient alors :

$$\left| \chi_{lmno}^{(3)}(-2\omega - \omega_S; \omega, -\omega_S, \omega) \right|^2 = \chi_{NR}^{(3)2} + 2\chi_{NR}^{(3)} \frac{A((\omega - \omega_S) - \omega_{v^k+1v^k})}{((\omega - \omega_S) - \omega_{v^k+1v^k})^2 + \Gamma_{v^k+1v^k}^2} + \left| \frac{A}{(\omega - \omega_S) - \omega_{v^k+1v^k} + i\Gamma_{v^k+1v^k}} \right|^2 \quad (1.57a)$$

$$= \chi_{NR}^{(3)2} + 2\chi_{NR}^{(3)} \Re \left\{ \chi_R^{(3)} \right\} - \frac{A}{\Gamma_{v^k+1v^k}} \Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}. \quad (1.57b)$$

Contrairement à l'équation de l'intensité de la diffusion Raman, l'intensité CARS n'est pas uniquement liée à la partie imaginaire de la susceptibilité : un terme croisé, mêlant $\chi_{NR}^{(3)}$ et $\Re \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ vient s'ajouter. À l'instar de $\chi_{yx}^{(1)}$, figure 1.2, la norme au carré de $\chi_{lmno}^{(3)}$ peut aussi être tracée figure 1.6 en tenant compte de la contribution des trois termes de l'équation 1.57.

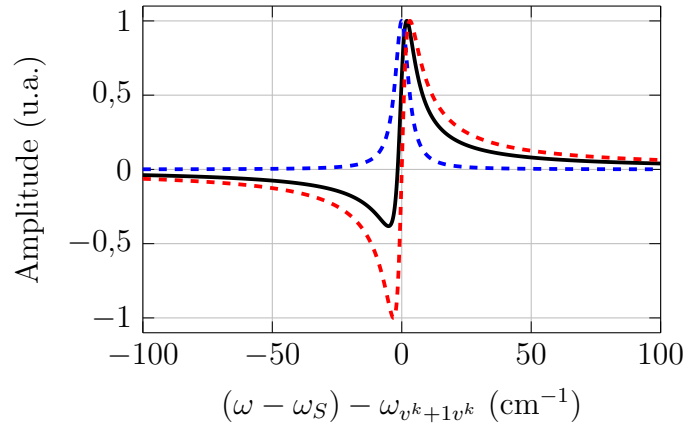


FIGURE 1.6 – Variations de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ (courbe bleue hachurée), $\Re \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ (courbe rouge hachurée) et de $\left| \chi_{lmno}^{(3)} \right|^2$ (courbe noire) normalisées par rapport à l'amplitude de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ pour une demi-largeur largeur de raie Raman $\Gamma_{v^k+1v^k} = 10 \text{ cm}^{-1}$.

On se rend alors compte que l'allure typique d'un pic CARS, tracé en noir, traduisant la présence d'une vibration, est différente de l'allure d'un pic Raman. Ce n'est pas seulement son aspect dispersif du côté des décalages Raman importants (côté gauche de l'axe des abscisse) qui peut poser problème, car ici nous sommes placés dans le cas où $\chi_{NR}^{(3)2}$ est faible : dans le cas contraire il peut venir noyer les deux autres termes parmi le bruit expérimental. Si l'on s'intéresse seulement à $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$, on voit qu'elle est très nettement similaire à $\Im \left\{ \chi_{xy}^{(1)} \right\}$ [15].

Mon but est d'extraire l'information vibrationnelle contenue dans $\mathfrak{S} \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ par la correction, voire la suppression de cet aspect du signal qui prend le nom particulier de "bruit de fond non résonant" ou NRB (*Non Resonant Background*).

1.2.2 Avantages du processus CARS

Après la description du processus CARS il m'était impossible de clore ce chapitre sans illustrer dans une section dédiée les différents avantages qu'il peut comporter lorsqu'il est comparé à la diffusion Raman spontanée.

Afin d'illustrer les premiers d'entre eux il nous faut décrire classiquement le champ électrique. Nous allons ici introduire une onde électromagnétique se propageant selon la direction z et donc le vecteur polarisation est selon y :

$$E_y(z, t) = \frac{1}{2} \tilde{E}_y e^{i(kz - \omega t)} + \text{c.c.} \quad (1.58)$$

avec k le vecteur d'onde (rad.m^{-1}). Dans le cas de la diffusion Raman, à partir de l'équation 1.29 et des annexes B et C, notamment les équations B.45 et C.20, il vient que le champ électrique d'une diffusion Stokes est :

$$E_y(\omega_S) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 c^2} \frac{\omega_S^2}{z} \sin \theta \sum_{f_{v_k^i}^i N} \langle (\vec{D}_y^{(1)})_{v_k^{i+1}, v_k^i} \rangle \quad (1.59a)$$

$$= \frac{1}{8\pi\epsilon_0 c^2} \frac{\omega_S^2}{z} \sin \theta \sum_{f_{v_k^i}^i N} \langle (\alpha_{yx})_{v_k^{i+1}, v_k^i} \rangle \tilde{E}_x(\omega) e^{i(kz - \omega_S t)} + \text{c.c.} \quad (1.59b)$$

$$= \frac{1}{8\pi c^2} \frac{\omega_S^2}{z} V \sin \theta \chi_{yx}^{(1)} \tilde{E}_x(\omega) e^{i(kz - \omega_S t)} + \text{c.c.} \quad (1.59c)$$

Il n'y a aucune condition de direction particulière du champ $E_y(\omega_S)$ à respecter, la diffusion Raman irradie de manière isotrope.

Dans le cas du processus CARS, il nous faut établir l'équation d'onde liant la polarisation du milieu $P_l^{(3)}(-2\omega - \omega_S)$ au champ $E_l((2\omega - \omega_S))$ se propageant selon la direction z et polarisée selon l , que nous renommerons respectivement $P_l^{(3)}(-\omega_{aS})$ et $E_l(\omega_{aS})$. Pour cela reprenons l'équation de l'induction électrique C.15c, dans le cas d'un milieu polarisé elle devient :

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (1.60)$$

la polarisation du milieu peut être divisée en une contribution linéaire et non linéaire, et comme dans le cas d'un milieu centrosymétrique les contributions d'ordre paires sont

nulles et en se limitant à l'ordre trois il vient :

$$\vec{\mathcal{D}} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P}^{(1)} + \vec{P}^{(3)} \quad (1.61)$$

selon 1.28 et en réécrivant la polarisation au premier ordre on obtient :

$$\vec{\mathcal{D}} = \varepsilon_0 \vec{E} + \varepsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E} + \vec{P}^{(3)}. \quad (1.62)$$

Nous pouvons regrouper les termes liés linéairement à \vec{E} à partir de la permittivité relative du milieu qui vaut :

$$\varepsilon = 1 + \chi^{(1)} \quad (1.63)$$

ce qui donne :

$$\vec{\mathcal{D}} = \varepsilon_0 \varepsilon \vec{E} + \vec{P}^{(3)}. \quad (1.64)$$

Si nous reprenons l'équation de Maxwell-Ampère C.14 pour un milieu sans source de courant ($\vec{J} = 0$) nous obtenons :

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \dot{\vec{\mathcal{D}}} \quad (1.65a)$$

$$= \varepsilon_0 \varepsilon \frac{\partial}{\partial t} \vec{E} + \frac{\partial}{\partial t} \vec{P}^{(3)} \quad (1.65b)$$

en utilisant la notation de Newton pour marquer la dérivée temporelle. En introduisant la relation liant le champ magnétique \vec{H} à l'induction magnétique \vec{B} donnée équation C.15a et en introduisant l'équation de Maxwell-Faraday :

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (1.66)$$

nous pouvons écrire l'équation d'onde de \vec{E} :

$$\vec{\nabla} \times \vec{\nabla} \times \vec{E} = -\mu_0 \varepsilon_0 \varepsilon \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E} - \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{P}^{(3)} \quad (1.67)$$

soit :

$$\vec{\nabla} \times \vec{\nabla} \times \vec{E} + \frac{n(\omega)^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{P}^{(3)} \quad (1.68a)$$

$$\vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E} + \frac{n(\omega)^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{P}^{(3)} \quad (1.68b)$$

avec $\mu_0 \varepsilon_0 = 1/c^2$ et l'indice du milieu $n(\omega) = \sqrt{\mu \varepsilon}$, et comme le milieu est assumé non magnétique il vient que $\mu = 1$. En nous aidant de l'équation de Maxwell-Gauss liant la

divergence du champ \vec{E} à la densité de la charge électrique ρ :

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_0} \quad (1.69)$$

nous obtenons la relation suivante :

$$\vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot \vec{E}) = \vec{\nabla}\left(\frac{\rho}{\varepsilon_0}\right). \quad (1.70)$$

En se plaçant dans un milieu isotrope, le gradient de la densité de la charge électrique est nul et l'équation d'onde 1.68b devient :

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{n(\omega)^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E} = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{P}^{(3)}. \quad (1.71)$$

Développons alors la partie gauche de l'équation pour $E_l(\omega_{aS})$ exprimée tel que :

$$E_l(\omega_{aS}) = \frac{1}{2} \tilde{E}_l^{(\omega_{aS})}(z) e^{i(k_{aS}z - \omega_{aS}t)} + \text{c.c.} \quad (1.72)$$

il vient alors :

$$\begin{aligned} \nabla^2 E_l(\omega_{aS}) - \frac{n(\omega_{aS})^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} E_l(\omega_{aS}) = \\ \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} \tilde{E}_l^{(\omega_{aS})} + 2ik_{aS} \frac{\partial}{\partial z} \tilde{E}_l^{(\omega_{aS})} - k_{aS}^2 \tilde{E}_l^{(\omega_{aS})} + \left(\frac{n(\omega_{aS})\omega_{aS}}{c} \right)^2 \tilde{E}_l^{(\omega_{aS})} \right) e^{i(k_{aS}z - \omega_{aS}t)} + \text{c.c.} \end{aligned} \quad (1.73)$$

avec les deux termes de droite dans la parenthèse s'annulant l'un l'autre car $k_{aS} = n(\omega_{aS})\omega_{aS}/c$. L'approximation de l'enveloppe lentement variable nous permet de considérer le terme en $\partial^2/\partial z^2$ très petit devant le reste de l'équation : l'amplitude $\tilde{E}_l^{(\omega_{aS})}(z)$ va très peu varier sur une distance de l'ordre de la longueur d'onde du champ, on comprend alors bien que la dérivée de cette amplitude va être prépondérante devant sa dérivée seconde. Nous obtenons alors cette expression :

$$\nabla^2 E_l(\omega_{aS}) - \frac{n(\omega_{aS})^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} E_l(\omega_{aS}) = ik_{aS} \frac{\partial}{\partial z} \tilde{E}_l^{(\omega_{aS})} e^{i(k_{aS}z - \omega_{aS}t)} + \text{c.c.} \quad (1.74)$$

Nous pouvons alors développer le terme de droite de l'équation 1.71 en exprimant $P_l^{(3)}(\omega_{aS})$ selon 1.47 :

$$P_l^{(3)}(\omega_{aS}) = 3\varepsilon_0 \chi_{lmno}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega, -\omega_S, \omega) \tilde{E}_m^{(\omega)} \tilde{E}_n^{*(\omega_S)} \tilde{E}_o^{(\omega)} e^{i((k-k_S+k)z - \omega_{aS}t)} + \text{c.c.} \quad (1.75)$$

Il vient ainsi :

$$\begin{aligned} \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} P_l^{(3)}(\omega_{aS}) = \\ - 3 \left(\frac{\omega_{aS}}{c} \right)^2 \chi_{lmno}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega, -\omega_S, \omega) \tilde{E}_m^{(\omega)} \tilde{E}_n^{*(\omega_S)} \tilde{E}_o^{(\omega)} e^{i((k-k_S+k)z-\omega_{aS}t)} + \text{c.c.} \end{aligned} \quad (1.76)$$

Nous pouvons réunir les deux côtés de l'équation 1.71 développés en 1.19 et 1.24 pour obtenir cette égalité :

$$\begin{aligned} ik_{aS} \frac{\partial}{\partial z} \tilde{E}_l^{(\omega_{aS})} e^{i(k_{aS}z-\omega_{aS}t)} + \text{c.c} = \\ - 3 \left(\frac{\omega_{aS}}{c} \right)^2 \chi_{lmno}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega, -\omega_S, \omega) \tilde{E}_m^{(\omega)} \tilde{E}_n^{*(\omega_S)} \tilde{E}_o^{(\omega)} e^{i((k-k_S+k)z-\omega_{aS}t)} + \text{c.c} \end{aligned} \quad (1.77)$$

et donc :

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial z} \tilde{E}_l^{(\omega_{aS})} + \text{c.c} = \\ 3i \frac{\omega_{aS}}{n(\omega_{aS})c} \chi_{lmno}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega, -\omega_S, \omega) \tilde{E}_m^{(\omega)} \tilde{E}_n^{*(\omega_S)} \tilde{E}_o^{(\omega)} e^{i\Delta kz} + \text{c.c} \end{aligned} \quad (1.78)$$

avec $\Delta k = 2k - k_S - k_{aS}$ le désaccord de phase. Si les champs excitateurs sont assez intenses nous pouvons considérer que leur amplitude varient faiblement lors de la propagation selon z dans le milieu, on peut alors intégrer $\tilde{E}_l^{(\omega_{aS})}$ sur toute la longueur L du milieu :

$$\begin{aligned} E_l(\omega_{aS}, L) = 3i \frac{\omega_{aS}}{n(\omega_{aS})c} \chi_{lmno}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega, -\omega_S, \omega) \tilde{E}_m^{(\omega)} \tilde{E}_n^{*(\omega_S)} \tilde{E}_o^{(\omega)} \int_0^L e^{i\Delta kz} dz + \text{c.c} \\ = 3i \frac{\omega_{aS}}{n(\omega_{aS})c} \chi_{lmno}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega, -\omega_S, \omega) \tilde{E}_m^{(\omega)} \tilde{E}_n^{*(\omega_S)} \tilde{E}_o^{(\omega)} L \text{sinc}(\Delta kL/2) e^{i\Delta kL/2} + \text{c.c} \end{aligned} \quad (1.79)$$

avec sinc la fonction sinus cardinal telle que $\text{sinc}(\Delta kL/2) = \sin(\Delta kL/2)/(\Delta kL/2)$. Cette fonction est décisive quant à la valeur de l'amplitude du champ $E_l(\omega_{aS}, L)$ après la traversée du matériau de longueur L . Si la polarisation $P_l^{(3)}(-\omega_{aS})$ peut osciller, ou battre, en phase avec les champs excitateurs alors le champ $E_l(\omega_{aS}, z)$ pourra se générer de manière constructive, autrement dit, il y a accord de phase et $\Delta k = 0$. Cette condition se retrouve dans l'équation 1.79 quand le maximum de la fonction $\text{sinc}(x)$ est 1 pour $x = 0$.

Il faut bien noter que cette relation ne tient que si $E_l(\omega_{aS})$ se propage dans le même sens que les autres champs excitateurs. Cette directivité du CARS est un atout car il permet de récolter facilement tout le signal, contrairement à la diffusion Raman qui rayonne dans toute les directions. Cette disposition de récolte dans la direction de propagation des champs excitateurs est communément appelée configuration F-CARS [16] (du terme *forward* : copropagatif). Dans cette configuration, à cause de la dispersion dans le matériau, l'accord de phase n'est généralement atteint que sur une certaine longueur

L_c nommée longueur de cohérence. Elle vaut : $L_c = 2\pi/|\Delta k|$ [17]. Nous pouvons établir un ordre de grandeur de cette longueur de cohérence à partir de l'indice de réfraction de l'eau pour les différentes longueurs d'onde des champs impliqués

Comme longueur d'onde des champs excitateurs $E(\omega)$ nous allons prendre $\lambda_p = 1064$ nm. Ces champs viennent de manière préférentielle exciter le système afin de l'amener, ou plus communément, de le "pomper" à un niveau énergétique plus élevé, nous les appellerons désormais champs pompe et ils seront annotés par l'indice p . Il faut bien noter que le troisième champ est normalement nommé champ sonde (*probe*) car il permet d'étudier l'excitation engendrée par les autres ondes. Il peut, dans certains dispositifs, avoir une longueur d'onde différente du faisceau pompe, mais dans notre cas le rôle de la sonde est aussi joué par la pompe, c'est pourquoi nous emploierons uniquement les termes de pompe et Stokes pour définir nos faisceaux. Concernant ce dernier, il aura une longueur d'onde λ_S choisie afin d'exciter une vibration moléculaire à $\omega_k = 3215$ cm⁻¹ : cette vibration étant une des vibrations prépondérantes de H₂O [18]. Il vient alors :

$$\lambda_S = \frac{1}{\frac{1}{\lambda_p} - \omega_k} \quad (1.80)$$

donc $\lambda_S = 1617$ nm.

La dernière longueur d'onde qui nous intéresse est celle du champ générée par le mélange des trois autres, soit la longueur d'onde anti-Stokes λ_{aS} qui vaut alors :

$$\lambda_{aS} = \frac{1}{\frac{1}{\lambda_p} + \omega_k} \quad (1.81)$$

donc $\lambda_{aS} = 793$ nm.

Les indices de réfraction de l'eau pour ces longueurs d'onde sont [19] :

- $n(\lambda_p) = 1,3260$
- $n(\lambda_S) = 1,3166$
- $n(\lambda_{aS}) = 1,3293$

Et ainsi le désaccord de phase Δk peut s'exprimer tel que :

$$\Delta k = 2\pi (2n(\lambda_p)/\lambda_p - n(\lambda_S)/\lambda_S - n(\lambda_{aS})/\lambda_{aS}) \quad (1.82)$$

soit $|\Delta k| = 1,2345 \times 10^4$ rad.m⁻¹.

Dans l'eau, pour cette vibration la longueur de cohérence L_c est alors de 509 μm. Cette longueur peut paraître faible mais il faut la comparer à la longueur sur laquelle le processus non linéaire peut avoir lieu. Dans le cas de la microspectroscopie, où les champs excitateurs

sont des faisceaux lasers focalisés par des objectifs de grandes ouvertures numériques (O.N.) la profondeur du volume de focalisation de ces derniers est très petite. Afin d'en avoir une idée nous pouvons calculer la résolution axiale d'une mesure confocale. Elle est donnée par la largeur à mi-hauteur (FWHM pour *Full Width Half Maximum*) d'un point observé individuellement et est définie telle que [20] :

$$\text{FWHM} = 0,89 \frac{\lambda}{n(\lambda) - \sqrt{n(\lambda)^2 - \text{O.N.}^2}}. \quad (1.83)$$

Si on prend $\lambda = \lambda_S$, $n(\lambda) = n(\lambda_S)$ et $\text{O.N.} = 1,2$ nous obtenons une résolution axiale de $1,86 \mu\text{m}$. Cette valeur nous donne l'ordre de grandeur de la profondeur du volume de focalisation. Comme ce dernier est plus petit que la longueur de cohérence qui limite le processus CARS *forward* nous pouvons considérer que nous sommes dans ce cas à l'accord de phase. Néanmoins ceci n'est qu'un exemple approximatif. Lorsque l'on a affaire à un effet non linéaire pour lequel de grandes intensités sont nécessaires, c'est la convolution des volumes de focalisations des faisceaux qui délimite l'espace dans lequel le phénomène peut avoir lieu. C'est pourquoi le phénomène CARS, et les effets non linéaires en général, sont intéressants à utiliser en microscopie : la condition de grandes intensités implique de petits volumes de focalisation donnant alors à la méthode une résolution axiale et latérale importante, soit une capacité confocale intrinsèque.

Pour conclure sur les avantages du phénomène CARS, comparons l'intensité de la diffusion Raman avec celle du CARS. Partons de l'expression de leur champ électrique avec, respectivement, les équations 1.59c et 1.79. Comme nous l'avons justifié plus haut, dans le cas de la microscopie, nous nous plaçons dans le cas de l'accord de phase pour le phénomène CARS, soit $\text{sinc}(\Delta kL/2) = 1$. Il sera aussi plus aisé de prendre des champs excitateurs avec un vecteur polarisation selon le même axe, par exemple x ; comme avec la diffusion Raman on imposera que le vecteur polarisation du champ anti-Stokes soit selon y . Ainsi :

$$E_y(\omega_S) = \frac{1}{8\pi c^2} \frac{\omega_S^2}{z} V \sin \theta \chi_{yx}^{(1)} \tilde{E}_x(\omega) e^{ikz} + \text{c.c} \quad (1.84a)$$

$$E_y(\omega_{aS}) = 3i \frac{\omega_{aS}}{n(\omega_{aS})c} \sin^3 \theta \chi_{yxxx}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega_p, -\omega_S, \omega_p) \tilde{E}_x^2(\omega_p) \tilde{E}_x^*(\omega_S) L e^{i\Delta kL/2} + \text{c.c.} \quad (1.84b)$$

avec $\sin^3 \theta$ la relation géométrique entre les vecteurs polarisation des champs excitateurs et les liaisons vibrationnelles.

Leur intensité vaut alors :

$$I_y(\omega_S) = \frac{1}{32\pi^2 z^2} V^2 \frac{n(\omega_S) \omega_S^4 \varepsilon_0}{c^3} \sin^2 \theta \left| \chi_{yx}^{(1)} \right|^2 \left| \tilde{E}_x(\omega) \right|^2 \quad (1.85a)$$

$$I_y(\omega_{aS}) = 18L^2 \frac{\omega_{aS}^2 \varepsilon_0}{n(\omega_{aS})c} \sin^6 \theta \left| \chi_{yxxx}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega_p, -\omega_S, \omega_p) \right|^2 \left| \tilde{E}_x^2(\omega_p) \tilde{E}_x^*(\omega_S) \right|^2 \quad (1.85b)$$

soit :

$$I_y(\omega_S) = \frac{1}{16\pi^2 z^2} V^2 \frac{n(\omega_S) \omega_S^4}{n(\omega) c^4} \sin^2 \theta \left| \chi_{yx}^{(1)} \right|^2 I_x(\omega) \quad (1.86a)$$

$$I_y(\omega_{aS}) = 144L^2 \frac{\omega_{aS}^2}{n(\omega_{aS}) n^2(\omega_p) n(\omega_S) \varepsilon_0^2 c^4} \sin^6 \theta \times \left| \chi_{yxxx}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega_p, -\omega_S, \omega_p) \right|^2 I_x^2(\omega_p) I_x(\omega_S). \quad (1.86b)$$

Ces formules “brutes” des intensités des deux phénomènes montrent leur dépendance vis-à-vis des intensités des champs excitateurs : dans le cas du Raman il est linéaire avec l’intensité du champ excitateur ; dans le cas du CARS il est linéaire avec l’intensité du champ Stokes et quadratique avec l’intensité du champ pompe. Une autre dépendance cruciale est le lien entre l’intensité CARS et la norme au carrée de la susceptibilité d’ordre trois. D’après 1.48 :

$$\left| \chi_{yxxx}^{(3)}(-\omega_{aS}; \omega_p, -\omega_S, \omega_p) \right|^2 = \frac{1}{36\varepsilon_0^2 \hbar^6 V^2} \left| \sum_{f_{v_i}^i} \sum_{N} \sum_{lmno} \langle D_l \mathbb{G}(\omega_{aS}) D_m \mathbb{G}(\omega_p - \omega_S) D_n \mathbb{G}(\omega_p) D_o \rho(\infty) \rangle \right|^2. \quad (1.87)$$

Pour $\chi_R^{(3)}$ nous avons dit qu’une cohérence entre le niveau fondamental et le niveau vibrationnel sondé va apparaître, les molécules vont alors vibrer en phase. Ainsi on ne peut plus extraire N de la somme précédente comme nous l’avons fait pour $\chi^{(1)}$ (voir équation 1.30). Il est établi que la norme au carrée de la susceptibilité d’ordre trois, et donc $I_y(\omega_{aS})$, varie selon N^2 . Cette dépendance est un atout majeur en microscopie, surtout lorsque la quantité des objets recherchés est faible.

Enfin, la diffusion anti-Stokes, qui est normalement très difficile à récolter en spectroscopie Raman spontanée, comme nous l’avons vu plus tôt, permet de n’étudier que les champs électriques décalés vers le bleu (*blue shifted*). Ainsi le bruit de fond dû à la fluorescence que l’on peut retrouver en spectroscopie Raman n’est pas visualisable lorsque l’on utilise le CARS. De ce point de vue, cela en fait une technique plus avantageuse car avec un meilleur rapport signal sur bruit.

La diffusion Raman partage néanmoins avec le CARS la qualité majeure d'établir un contraste dans un milieu à partir des caractéristiques vibrationnelles de ce dernier, rendant inutile le recours à des marqueurs extérieurs, plus complexes à mettre en place ou pouvant entraîner une modification de l'objet étudié. Cette capacité de contraste "naturel" rend ces deux techniques adéquates pour l'étude d'échantillons biologiques ne pouvant être marqués. Et au vu des capacités précédemment énoncées, le choix entre les deux techniques devrait se porter clairement vers le CARS. Pourtant, du fait de la présence du fond non résonant le CARS fut longtemps et continue dans une certaine mesure à être trop peu utilisé. Néanmoins, motivé par les importantes potentialités du CARS des stratégies ont été élaborées pour contourner cet obstacle.

1.3 Lutte contre le bruit de fond non résonant

Le CARS a d'abord été utilisé pour réaliser des mesures de spectroscopie sur des solides, des liquides [7, 21, 22], ainsi que dans des plasmas [23]. La première utilisation du CARS en microspectroscopie a été faite en 1982 [24], mais il a fallu attendre 1999 pour que Zumbusch *et al.* mettent au point un moyen de contrer une part du signal non résonant [16] et que soit véritablement lancé l'engouement pour ce processus dans le milieu de la biologie.

Cette part du signal non résonant se nomme la non-résonance exacerbée par deux photons. Un des chemins quantiques lui donnant source est illustré figure 1.7.

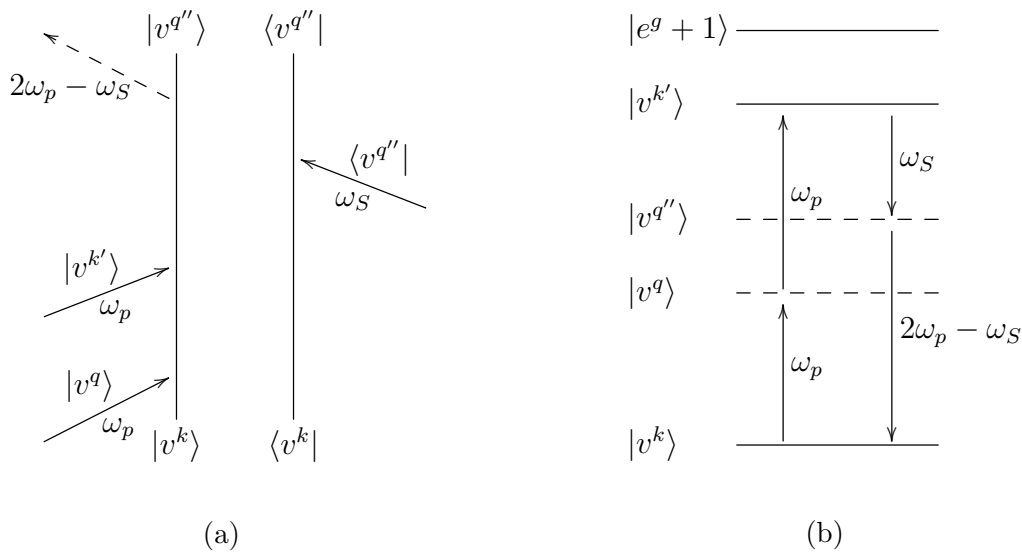


FIGURE 1.7 – Diagramme de Feynman d’un chemin quantique de résonance électronique participant au processus CARS (a) et son diagramme énergétique correspondant (b).

Le diagramme énergétique 1.7b prouve que deux photons de pompe peuvent entrer en résonance avec une état vibrationnel k' du fait de sa proximité avec un niveau électronique $|e^g + 1\rangle$. La fréquence de l’onde $2\omega_p - \omega_S$ mesurée ne correspond pas à celle de la diffusion Raman anti-Stokes de la vibration k' , mais à celle d’une autre vibration de fréquence plus basse. On parle alors de résonance électronique correspondant à un processus paramétrique à quatre ondes. Le signal qui en provient s’ajoute à celui du signal CARS conventionnel, et peut noyer la part résonante qui contient l’information concernant la bonne vibration. Le diagramme de Feynman 1.7a montre, quant à lui, qu’il y a une cohérence entre les deux niveaux vibrationnels k et k' mais pas une cohérence Raman car c’est par le biais de deux interactions avec l’onde pompe que la cohérence $|v^k\rangle\langle v^{k'}|$ est atteinte.

Le moyen, trouvé par Zumbusch *et al.*, fut d’abandonner le visible comme gamme spectrale des faisceaux pompe et Stokes et de passer à l’infrarouge ou proche infrarouge. Sous l’action d’une excitation moins énergétique, les molécules, ou plutôt leurs électrons, évitaient alors d’approcher les niveaux électroniques supérieurs et donc l’exacerbation de cette résonance électronique. Les signaux obtenus virent leur rapport signal sur bruit (*Signal to Noise Ratio* ou SNR) augmenter, améliorant par la même la sensibilité de la méthode. C’est sur cette base que se sont construites toutes les tentatives de minimisation du NRB pour la microspectroscopie CARS.

1.3.1 Microspectroscopie CARS en épi-détection

Nous avons démontré section 1.2.2 que le processus CARS devait respecter l’accord de phase entre les champs excitateurs et le champ diffusé. Pour ce faire, les directions de

propagation des champs anti-Stokes et Stokes doivent être colinéaires, et la direction des champs pompe et sonde doivent présenter des différences d'orientation. On peut atteindre ces conditions à l'aide d'objectif avec des O.N. importantes qui assurent la focalisation des faisceaux pompe et sonde selon les angles voulus. Cela justifie alors la disposition de mesure dite *forward*. Néanmoins un signal anti-Stokes orienté dans le sens contraire de la propagation des faisceaux excitateurs existe. Selon A. Volkmer et al. [25] ce signal anti-Stokes doit alors respecter une condition d'accord de phase différente, soit :

$$\Delta k = 2k_p - k_S + k_{aS}. \quad (1.88)$$

En utilisant les mêmes données que la section précédente il vient que la longueur de cohérence L_c pour un tel cas est de seulement $0,3 \mu\text{m}$ contre $509 \mu\text{m}$ en régime *forward*. On se rend compte que cette longueur de cohérence est plus petite que la résolution axiale d'une mesure microscopique confocale (FWHM $\approx 2 \mu\text{m}$) qui donne l'ordre de grandeur de la profondeur du volume de focalisation des faisceaux. Cela va entraîner l'apparition d'interférences destructives pour des objets plus épais que L_c . Cette limitation va ainsi jouer un rôle de filtre sur le signal collecté dans le sens contraire à l'excitation, qu'on appellera alors signal épi-déecté dans le cadre d'une mesure E-CARS [26] (du grec *épi* signifiant "sur", car l'excitation et donc l'épi-détection se font par le dessus lorsque l'on utilise un microscope conventionnel).

Ce filtrage est d'une grande aide lorsque que l'on étudie des petits objets biologiques noyés dans un solvant. En effet, en régime *forward*, la lumière issue du solvant se superpose à celle du signal utile et peut être, dans certaines conditions, beaucoup plus importante ce qui réduit le rapport signal sur bruit. L'épi-détection permet alors de contrer ce signal non désiré et d'extraire le signal des petits objets, améliorant ainsi la sensibilité de la mesure comme on peut le voir sur la comparaison illustrée figure 1.8.

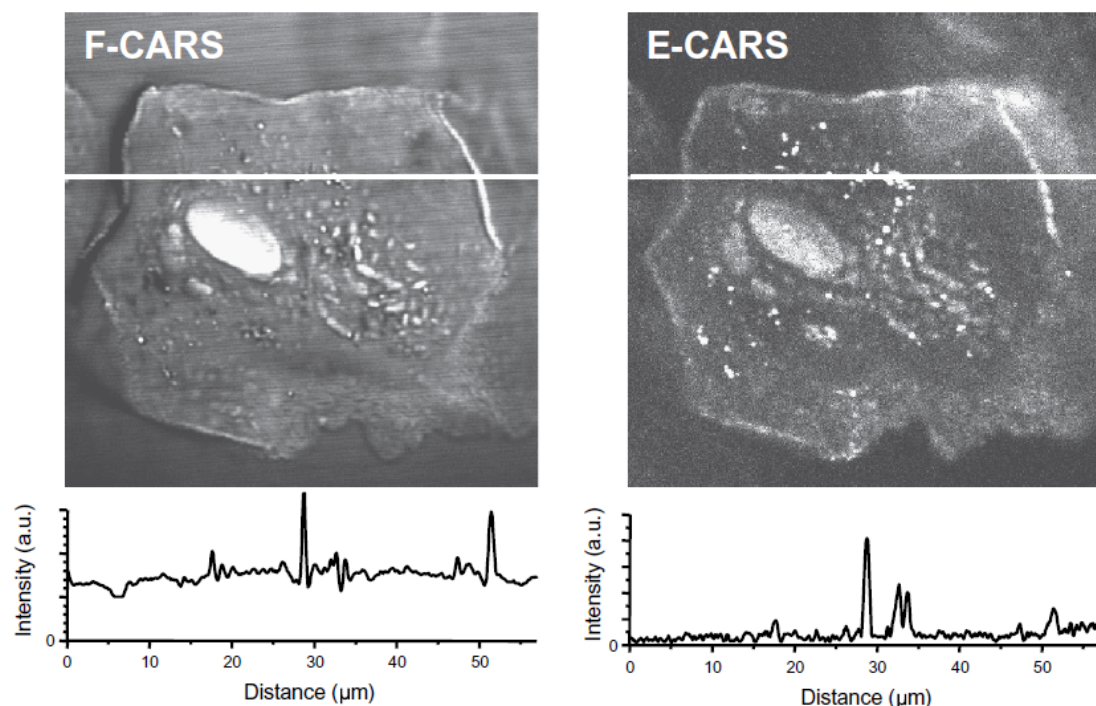


FIGURE 1.8 – Images d’une cellule épithéliale obtenues à partir de détection *forward* (F-CARS) et d’épi-détection (E-CARS) du signal à 2850 cm^{-1} correspondant au mode vibrationnel de l’élongation symétrique de la liaison C-H. Les profils d’intensité des deux lignes blanches sont montrés en dessous des images. Figure tirée des travaux de X. S. Xie *et al.* [27].

Néanmoins cette technique possède les défauts de ses avantages, car si la mesure est réalisée avec un signal provenant d’un objet de taille inférieure au micron, elle correspond donc à une faible quantité de molécules ce qui engendre des signaux de faible intensité [28]. De plus ce n’est pas le NRB de l’objet étudié qui est rejeté, mais le signal résonant et le bruit non résonant du solvant. Cette méthode minimise donc bien une partie du NRB étranger à l’objet d’étude, et ainsi augmente le SNR et la sensibilité de la mesure, mais ne corrige pas complètement les distorsions d’un spectre CARS dues à toutes les contributions non résonantes.

Pour dissocier clairement les contributions résonante et non résonante du signal CARS il faut trouver les propriétés qui les distinguent, c’est ce qui a été tenté avec les quatre méthodes suivantes.

1.3.2 Microspectroscopie CARS résolue en polarisation

Cette technique de discrimination par la polarisation fût utilisée dès 1977 [29, 30] en spectroscopie mais il fallut attendre 2001 pour voir appliqué le CARS résolu en polarisation, ou P-CARS, à la microspectroscopie [31].

Pour comprendre d'où vient cette discrimination, exprimons la polarisation d'un milieu induite par l'excitation d'une onde pompe avec un vecteur polarisation selon l'axe x et une onde Stokes avec un vecteur de polarisation selon une autre direction k faisant un angle θ avec l'axe x et donc un angle $\pi/2 - \theta$ avec l'axe y . Si l'on considère que l'axe de la vibration est aligné le long de x , selon 1.75 la polarisation peut se décomposer sur les deux axes x et y telle que :

$$P_x^{(3)}(\omega_{aS}) = 3\varepsilon_0 \cos \theta (\chi_{xxxx}^{NR} + \chi_{xxxx}^R) E_x^2(\omega_p) E_k^*(\omega_S) \quad (1.89a)$$

$$P_y^{(3)}(\omega_{aS}) = 3\varepsilon_0 \sin \theta (\chi_{yyxy}^{NR} + \chi_{yyxy}^R) E_x^2(\omega_p) E_k^*(\omega_S). \quad (1.89b)$$

La polarisation non résonante P^{NR} est :

$$P^{NR} = \sqrt{(P_x^{NR})^2 + (P_y^{NR})^2} \quad (1.90a)$$

$$= 3\varepsilon_0 \chi_{xxxx}^{NR} E_x^2(\omega_p) E_k^*(\omega_S) \sqrt{\cos^2 \theta + \left(\frac{\chi_{yyxy}^{NR}}{\chi_{xxxx}^{NR}} \right)^2 \sin^2 \theta}. \quad (1.90b)$$

Si on introduit l'angle α tel que :

$$\tan \alpha = \frac{\chi_{yyxy}^{NR}}{\chi_{xxxx}^{NR}} \tan \theta \quad (1.91)$$

il vient que :

$$P^{NR} = 3\varepsilon_0 \cos \theta \chi_{xxxx}^{NR} E_x^2(\omega_p) E_k^*(\omega_S) \sqrt{1 + \tan^2 \alpha} \quad (1.92a)$$

$$= 3\varepsilon_0 \frac{\cos \theta}{\cos \alpha} \chi_{xxxx}^{NR} E_x^2(\omega_p) E_k^*(\omega_S). \quad (1.92b)$$

L'angle que fait P^{NR} avec l'axe x est donc α comme cela est illustré figure 1.9.

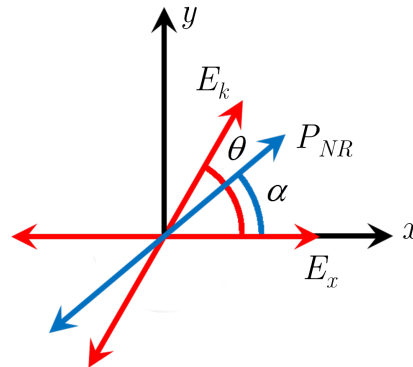


FIGURE 1.9 – Schéma de l'orientation des vecteurs polarisation des ondes pompe et Stokes et de la polarisation non résonante lors d'une mesure P-CARS.

En plaçant un analyseur perpendiculairement à cette direction le long du chemin optique on peut théoriquement filtrer la part non résonante du signal. Le signal résonant passant par l'analyseur sera issu de la polarisation perpendiculaire à cette axe et vaudra :

$$P^R\left(\alpha + \frac{\pi}{2}\right) = 3\varepsilon_0\chi_{xxxx}^R E_x^2(\omega_p) E_k^*(\omega_S) \left(\cos\theta \sin\alpha - \frac{\chi_{yyxx}^R}{\chi_{xxxx}^R} \sin\theta \cos\alpha \right). \quad (1.93)$$

Ainsi la discrimination entre la part résonante et non résonante peut se faire grâce à la différence des ratios de dépolarisation entre la part résonante et non résonante, respectivement $\chi_{yyxx}^R/\chi_{xxxx}^R$ et $\chi_{yyxx}^{NR}/\chi_{xxxx}^{NR}$.

Néanmoins, si cette méthode supprime efficacement le NRB, généralement la différence entre les ratios de dépolarisation est assez faible ce qui entraîne la mesure d'un signal peu important après passage par l'analyseur [28].

1.3.3 Microspectroscopie CARS résolue temporellement

L'autre méthode pouvant discriminer le signal résonant du non résonant concerne leur distribution énergétique au cours du temps. Encore une fois, c'est entre la fin des années 70 et le début des années 80, que ce concept de mesure CARS résolue temporellement (ou TR-CARS pour *Time Resolved CARS*) a été mis en place [32, 33] et dans les années 2000 qu'il fut appliqué à la microspectroscopie [34]. Il repose sur une différenciation permise par la contrainte chronologique des excitations.

Considérons que seules les deux premières excitations aux fréquences angulaires ω_p et ω_S atteignent une molécule. D'après les formulations de la partie précédente l'électron va pouvoir suivre un chemin quantique résonant ou non, ce qui revient respectivement à atteindre un niveau énergétique vibrationnel ou virtuel. Or ces deux types de niveaux vont avoir des temps de réponse différents : d'une fraction à quelques dizaines de picosecondes pour un niveau vibrationnel dans les liquides et les solides, et quasi-instantanément pour ce qui est des niveaux virtuels [33]. Ainsi, si avant la troisième excitation par le champ $E(\omega_p)$, on impose un délai plus long que le temps de vie d'un niveau virtuel, mais plus court que celui d'un niveau vibrationnel, on peut alors sonder la relaxation de la polarisation engendrée et distinguer les différents temps de réponse. Sur la figure 1.10 on constate que pour un retard $\tau = 0$ fs, soit une mesure *forward* classique, on observe un contraste faible du signal à 3054 cm^{-1} provenant de la bille de polystyrène. Alors que dans le cas d'un retard plus long, $\tau = 484$ fs, le contraste de la cartographie augmente, preuve que seule la partie résonante du signal a été collectée.

Cette technique requière donc des impulsions lasers de courte durée, de l'ordre de la centaine de femtosecondes. Nous reviendrons plus loin sur l'impact que peut avoir les propriétés temporelles des impulsions lasers sur le signal anti-Stokes.

Néanmoins, de la même manière que le P-CARS, une partie du signal est exclue de la mesure [28], comme on peut le constater sur la figure 1.10 lorsque l'on compare les intensités des profils latéraux pour un délai de 0 et 484 fs.

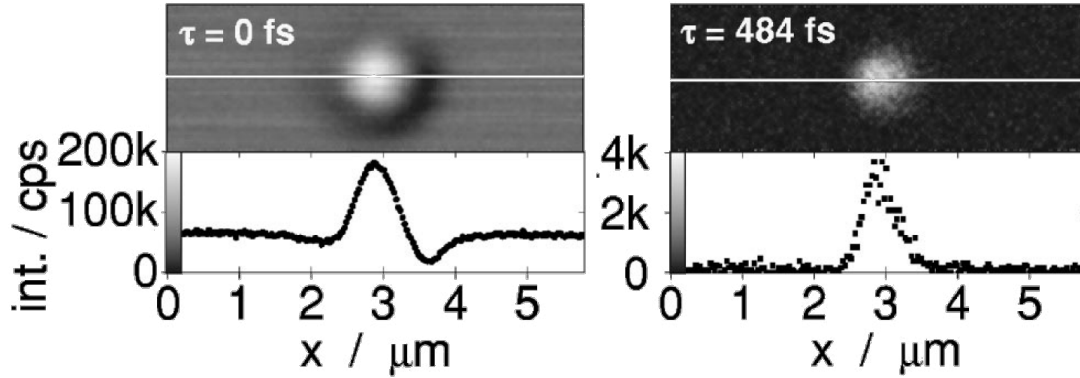


FIGURE 1.10 – Cartographies du signal TR-CARS à 3054 cm^{-1} d'une bille de polystyrène pour un délai $\tau = 0$ fs et $\tau = 484$ fs, complétées par une comparaison pour ces deux délais des profils latéraux correspondant à la ligne blanche. Image tirée de l'article de A. Volkmer *et al.* [34].

Ainsi, si le NRB est dans la plupart des cas supprimé, cette méthode impliquant la réponse temporelle s'applique mal à des échantillons très dilués ou avec une faible réponse CARS.

1.3.4 Microspectroscopie CARS interférométrique

Nous avons mis en évidence dans la section précédente une des différences majeures entre les parties résonante et non résonante du $\chi^{(3)}$: le caractère purement réel de $\chi^{(NR)}$. L'interférométrie CARS ou I-CARS fut donc instaurée afin de tirer partie de cette différence fondamentale [35]. Elle fût plus tard appliquée à la microspectroscopie [36]. Comme son nom l'indique elle se base sur l'interférence entre un signal CARS venant de l'échantillon étudié et le signal CARS d'un échantillon référence non résonant. L'utilisation de ce signal CARS de référence, qui a la même fréquence optique que le signal CARS de l'échantillon, fait entrer cette technique dans la catégorie des méthodes hétérodynes : le signal mesuré a la même fréquence que l'un des signaux utilisés pour le produire.

On peut exprimer le signal issu de l'interférence entre ces deux signaux CARS de la manière suivante :

$$I(\omega_{aS}) \propto |E(\omega_{aS})|^2 + |E^{ref}(\omega_{aS})|^2 + 2|E(\omega_{aS})E^{ref}(\omega_{aS})| \cos \Phi(\omega_{aS}) \quad (1.94)$$

avec $E(\omega_{aS})$ le champ du signal anti-Stokes venant de l'échantillon étudié ; $E^{ref}(\omega_{aS})$ le champ du signal anti-Stokes de l'échantillon de référence et $\Phi(\omega_{aS})$ la différence de phase

entre ces champs telle que :

$$\Phi(\omega_{aS}) = \omega_{aS}\tau + \phi_s(\omega_{aS}) + \phi_{inst}(\omega_{aS}) \quad (1.95)$$

où τ est le retard entre les champs anti-Stokes, $\phi_s(\omega_{aS})$ la différence de phase due à l'échantillon étudié et $\phi_{inst}(\omega_{aS})$ la différence de phase causée par les différentes optiques du systèmes. C'est le terme croisé de l'équation 1.94 qui importe ici, les autres termes pouvant êtres obtenus par des mesures individuelles des intensités CARS de l'échantillon et de la référence. À partir de ce terme il faut réussir à obtenir $\phi_s(\omega_{aS})$ qui est lié à $\chi^{(3)}(\omega_{aS})$ telle que :

$$\chi^{(3)}(\omega_{aS}) \propto e^{i\phi_s(\omega_{aS})} \quad (1.96)$$

et puisque χ^{NR} est réel il vient que la partie imaginaire de $\chi^{(3)}$ est la partie imaginaire de χ^R , d'où :

$$\Im \{ \chi^R \} \propto \sin \phi_s(\omega_{aS}). \quad (1.97)$$

L'obtention de $\phi_s(\omega_{aS})$ passe par la mesure de $\omega_{aS}\tau$ et de $\phi_{inst}(\omega_{aS})$, soit par la mesure de l'interférence pour deux échantillons de référence ($\phi_s(\omega_{aS})$ étant absent de $\Phi(\omega_{aS})$ dans ce cas).

En pratique deux signaux d'interférence sont mesurés simultanément pour deux orientations orthogonales du vecteur polarisation du signal CARS de l'échantillon étudié. Une lame quart d'onde est placée sur le parcours de ce dernier afin de transformer sa polarisation rectiligne en polarisation circulaire dans le but de créer deux signaux déphasés de $\pi/2$, donc pour chacun un terme croisé selon $\cos \Phi(\omega_{aS})$ et $\sin \Phi(\omega_{aS})$. C'est donc le rapport de ces derniers, soit $\tan \Phi(\omega_{aS})$, qui est mesuré pour obtenir $\Im \{ \chi^R \}$.

Cette méthode supprime efficacement le bruit de fond non résonant. Hélas, comme toute méthode hétérodyne, on perd alors la relation entre l'intensité mesurée et N^2 , car le terme croisé est alors linéaire avec le nombre de molécules. De plus cette technique n'est pas adaptée aux échantillons turbides comme les objets biologiques [17,28]. En effet, dans ce cas, des particules peuvent diffuser la réponse anti-Stokes de l'objet étudié. Cela provoque une différence entre la phase de ce signal et celui provenant directement de l'objet d'intérêt, et rend impossible l'extraction de la phase par la méthode I-CARS [37].

1.3.5 Microspectroscopie CARS à modulation de fréquence

Elle repose sur une modulation de la fréquence du faisceau pompe d'où son nom de FM-CARS (*Frequency-Modulated CARS*) [38]. En effet, en choisissant une fréquence vibrationnelle précise, et donc les fréquences des faisceaux pompe et Stokes, une réponse anti-Stokes résonante et non résonante est générée. Si on décale la fréquence du faisceau pompe afin que la réponse anti-Stokes générée corresponde à une zone spectrale non

représentative d'une vibration, donc non résonante, on perd logiquement le signal résonant et donc le pic CARS vibrationnel s'effondre. La modulation en fréquence de l'onde pompe provoque donc la modulation en amplitude de la réponse anti-Stokes résonante. Cette modulation en amplitude permet de détecter des objets en très faibles quantités (1000 fois moins que pour une détection *forward* conventionnelle), conférant ainsi à cette technique une grande sensibilité.

Néanmoins, si cette technique augmente de manière drastique le contraste entre signal résonant et non résonant comme on peut le constater figure 1.11, elle reste assez complexe à mettre en place [17], surtout si l'on veut étudier plusieurs fréquences vibrationnelles.

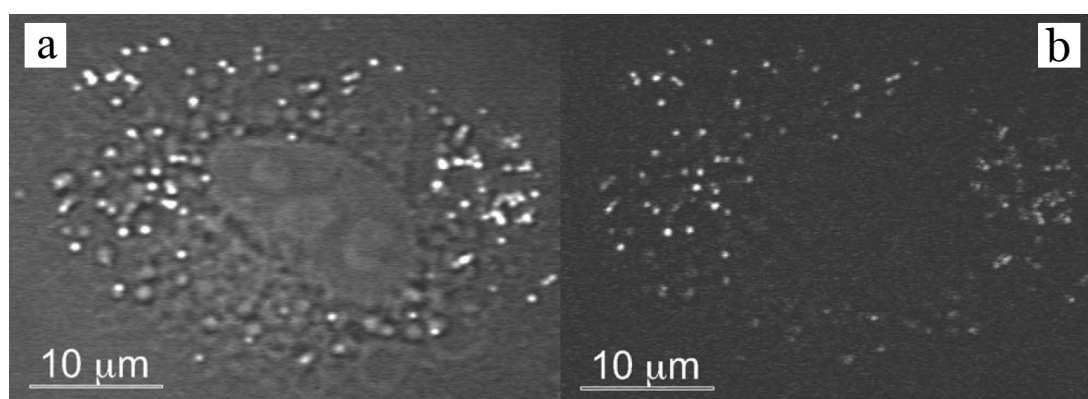


FIGURE 1.11 – Comparaison de cartographies du signal FM-CARS à 2100 cm^{-1} d'une cellule cancéreuse de poumon humain obtenues par (a) F-CARS et (b) FM-CARS. Image tirée de l'article de F. Ganikhanov *et al.* [38].

Conclusion

Dans ce chapitre j'ai présenté la description théorique de la diffusion Raman spontanée ainsi que celle de la diffusion anti-Stokes cohérente résonante. Nous avons constaté que la faible efficacité de la spectroscopie Raman avait motivé le développement du processus CARS. Néanmoins, si ce dernier permet de procéder à des mesures microspectroscopiques beaucoup plus rapides, intrinsèquement confocales et non entachées de fluorescence, sa sensibilité est tout de même réduite par un autre phénomène qui vient noyer, sinon distordre les spectres CARS. Il provient de mélanges à quatre ondes qui n'entrent pas en résonance avec les vibrations moléculaires du milieu étudié. N'apportant ainsi aucune information, nous comprenons pourquoi on nomme cette contribution le bruit de fond non résonant.

De nombreuses méthodes ont été mises en place afin de contrer ce bruit. L'épi-CARS, par exemple, a prouvé, dans le cas d'un échantillon biologique, qu'il pouvait augmenter la sensibilité de la mesure en supprimant les réponses résonante et non résonante du

solvant. Néanmoins la contribution non résonante des petits objets biologiques qu'il permet d'étudier est toujours présente.

La suppression de la non-résonance peut pourtant se faire grâce aux discriminations des vecteurs polarisation ou des distributions énergétiques au cours du temps des parts résonante et non résonante de la réponse anti-Stokes. C'est ce qu'ont respectivement prouvé les méthodes P-CARS et TR-CARS. Mais il faut bien noter que ces différenciations ne peuvent se faire que par l'exclusion d'une partie du signal reçu, ce qui proscrit l'étude d'échantillon dilué.

Afin de résoudre ce problème on peut se tourner vers une technique de mesure CARS interférométrique, mais il faut savoir que dans ce cas, la mesure d'échantillons biologiques est très difficile car ils présentent des éléments pouvant diffuser la réponse anti-Stokes et empêcher la recherche de la phase de l'objet d'étude.

Il reste alors la microspectroscopie CARS utilisant la modulation de la fréquence du faisceau pompe, qui elle permet de supprimer le bruit de fond non résonant, d'étudier des échantillons en faible quantité, dont des objets biologiques. Hélas, cette dernière méthode nécessite un montage complexe.

Le but de cette thèse est la poursuite de ces entreprises de lutte contre le bruit de fond non résonant. Mon objectif était de créer une nouvelle voie à celles déjà présentes, non pas afin d'éclipser ces dernières mais plutôt de les compléter. Je vais montrer dans les chapitres suivants que, si certaines des techniques de suppression du bruit de fond non résonant préexistantes sont incompatibles avec celle que j'ai construite, les autres pouvant parfaitement les augmenter. Il est temps à présent d'exposer la base de ma technique de microspectroscopie CARS.

Bibliographie

- [1] C. V. Raman, “A Change of Wave-length in Light Scattering,” *Nature*, vol. 121, no. 3051, pp. 619–619, apr 1928.
- [2] M. Born and R. Oppenheimer, “On the Quantum Theory of Molecules (translation by S. M. Blinder),” *Annalen der Physik*, vol. 84, 1927.
- [3] P. J. Mohr, D. B. Newell, and B. N. Taylor, “CODATA recommended values of the fundamental physical constants: 2014,” *Reviews of Modern Physics*, vol. 88, no. 3, p. 035009, sep 2016. [Online]. Available: <https://arxiv.org/pdf/1507.07956.pdf>
- [4] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Wiley, 2013, p. 7.
- [5] D. A. Long, *The Raman Effect*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, apr 2002, vol. 8, pp. 55,117,127.
- [6] T. H. Maiman, “Stimulated Optical Radiation in Ruby,” *Nature*, vol. 187, no. 4736, pp. 493–494, aug 1960.
- [7] P. D. Maker and R. W. Terhune, “Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength,” *Physical Review*, vol. 137, no. 3A, pp. A801–A818, feb 1965.
- [8] R. F. Begley, A. B. Harvey, and R. L. Byer, “Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy,” *Applied Physics Letters*, vol. 25, no. 7, pp. 387–390, oct 1974.
- [9] S. A. Druet and J.-P. E. Taran, “CARS spectroscopy,” *Progress in Quantum Electronics*, vol. 7, no. 1, pp. 1–72, jan 1981.
- [10] Y. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*, ser. Pure & Applied Optics Series: 1-349. Wiley, 1984, p. 267.
- [11] C. Cohen-Tannoudji, B. Diu, and F. Laloe, *Quantum Mechanics*, ser. Quantum Mechanics. Wiley, 1991, no. vol. 1, pp. 298,299,494.
- [12] E. O. Potma and S. Mukamel, “Theory of Coherent Raman Scattering,” in *Coherent Raman Scattering Microscopy*, ser. Series in Cellular and Clinical Imaging, J.-X. Cheng and X. S. Xie, Eds. CRC Press, 2012, ch. 1, pp. 27–28.
- [13] P. Hamm, “Principles of nonlinear optical spectroscopy: A practical approach or: Mukamel for dummies,” *University of Zurich*, 2005. [Online]. Available: <http://www.mitr.p.lodz.pl/evu/lectures/Hamm.pdf>

- [14] W. M. Tolles, J. W. Nibler, J. R. McDonald, and A. B. Harvey, “A Review of the Theory and Application of Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS),” *Applied Spectroscopy*, vol. 31, no. 4, pp. 253–271, jul 1977.
- [15] R. W. Hellwarth, “Third-order optical susceptibilities of liquids and solids,” *Progress in Quantum Electronics*, vol. 5, no. C, pp. 1–68, 1979.
- [16] A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, “Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering,” *Physical Review Letters*, vol. 82, no. 20, pp. 4142–4145, may 1999.
- [17] J.-X. Cheng and X. S. Xie, Eds., *Coherent Raman Scattering Microscopy*, ser. Series in Cellular and Clinical Imaging. CRC Press, 2012, pp. 27,28,100.
- [18] W. F. Murphy and H. J. Bernstein, “Raman spectra and an assignment of the vibrational stretching region of water,” *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 76, no. 8, pp. 1147–1152, apr 1972.
- [19] G. M. Hale and M. R. Querry, “Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- μm Wavelength Region,” *Applied Optics*, vol. 12, no. 3, pp. 555–563, Mar 1973.
- [20] T. Wilson, “Resolution and optical sectioning in the confocal microscope,” *Journal of Microscopy*, vol. 244, no. 2, pp. 113–121, nov 2011.
- [21] J. J. Wynne, “Nonlinear Optical Spectroscopy of $\chi^{(3)}$ in LiNbO_3 ,” *Physical Review Letters*, vol. 29, pp. 650–653, Sep 1972.
- [22] M. D. Levenson, C. Flytzanis, and N. Bloembergen, “Interference of Resonant and Nonresonant Three-Wave Mixing in Diamond,” *Physical Review B*, vol. 6, no. 10, pp. 3962–3965, nov 1972.
- [23] H. C. Praddaude, D. W. Scudder, and B. Lax, “Coherent four-wave scattering in plasmas—application to plasma diagnostics,” *Applied Physics Letters*, vol. 35, no. 10, pp. 766–768, nov 1979.
- [24] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, “Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope,” *Optics letters*, vol. 7, no. 8, pp. 350–2, 1982.
- [25] A. Volkmer, J.-X. Cheng, and X. Sunney Xie, “Vibrational Imaging with High Sensitivity via Epidetected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy,” *Physical Review Letters*, vol. 87, no. 2, p. 023901, jun 2001.

- [26] J.-x. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie, “An Epi-Detected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (E-CARS) Microscope with High Spectral Resolution and High Sensitivity,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, no. 7, pp. 1277–1280, feb 2001.
- [27] X. S. Xie, J.-X. Cheng, and E. Potma, *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006, pp. 595–606.
- [28] J.-x. Cheng and X. S. Xie, “Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications,” *Journal of physics Chemical B*, vol. 108, no. 1, pp. 827–840, jan 2004.
- [29] S. Akhmanov, A. Bunkin, S. Ivanov, and N. Koroteev, “Polarization active Raman spectroscopy and coherent Raman ellipsometry,” *Soviet Physics, Journal of Experimental and Theoretical Physics*, vol. 47, p. 667, 1978.
- [30] J.-L. Oudar, R. W. Smith, and Y. R. Shen, “Polarization-sensitive coherent anti-Stokes Raman spectroscopy,” *Applied Physics Letters*, vol. 34, no. 11, p. 758, 1979.
- [31] J. X. Cheng, L. D. Book, and X. S. Xie, “Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Optics Letters*, vol. 26, no. 17, pp. 1341–1343, sep 2001.
- [32] A. Laubereau and W. Kaiser, “Vibrational dynamics of liquids and solids investigated by picosecond light pulses,” *Reviews of Modern Physics*, vol. 50, no. 3, pp. 607–665, jul 1978.
- [33] F. M. Kamga and M. G. Sceats, “Pulse-sequenced coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy: a method for suppression of the nonresonant background,” *Optics Letters*, vol. 5, no. 3, p. 126, mar 1980.
- [34] A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie, “Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Imaging based on Raman free induction decay,” *Applied Physics Letters*, vol. 80, no. 9, pp. 1505–1507, 2002.
- [35] Y. Yacoby, R. Fitzgibbon, and B. Lax, “Coherent cancellation of background in four-wave mixing spectroscopy,” *Journal of Applied Physics*, vol. 51, no. 6, pp. 3072–3077, jun 1980.
- [36] C. L. Evans, E. O. Potma, and X. S. N. Xie, “Coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry: determination of the real and imaginary components of nonlinear susceptibility $\chi^{(3)}$ for vibrational microscopy,” *Optics Letters*, vol. 29, no. 24, pp. 2923–2925, dec 2004.

- [37] J. C. Ranasinghesagara, G. De Vito, V. Piazza, E. O. Potma, and V. Venugopalan, “Effect of scattering on coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) signals,” *Optics Express*, vol. 25, no. 8, p. 8638, apr 2017.
- [38] F. Ganikhanov, C. L. Evans, B. G. Saar, and X. S. Xie, “High-sensitivity vibrational imaging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering (FM CARS) microscopy.” *Optics letters*, vol. 31, no. 12, pp. 1872–4, 2006.

Chapitre 2 :

CARS multiplex

La technique de spectroscopie CARS que j'ai choisie se nomme le CARS multiplex (M-CARS). Elle utilise une bande spectrale couvrant toute la zone d'empreinte digitale des cellules biologiques ainsi que la zone associée aux liaisons vibrationnelles C-H [1]. Elle est basée sur l'utilisation d'une source laser produisant une impulsion qui va être scindée en deux parties : l'une monochromatique de forte puissance faisant office de faisceaux pompe et de sonde, et l'autre de faisceau Stokes couvrant une zone spectrale large. Le spectre CARS généré peut alors s'étendre de 0 à 4000 cm^{-1} . Les systèmes CARS classiques utilisent des faisceaux sondes avec des spectres étroits et produisent donc des spectres CARS spectralement restreints. Dans la plupart des cas deux sources lasers accordables sont utilisées conjointement pour produire des ondes pompe et Stokes avec des longueurs d'onde variables, ou une seule source non accordable est alliée à un oscillateur paramétrique optique (OPO). Si plusieurs vibrations moléculaires éloignées spectralement doivent être étudiées, l'utilisateur est contraint de faire varier les paramètres de son système afin de générer un faisceau Stokes à la longueur d'onde adéquate, ralentissant alors la vitesse d'analyse de son échantillon. Dans le cas d'un système utilisant une source à spectre large, aussi appelé supercontinuum, les réponses CARS issues de liaisons moléculaires différentes peuvent être mesurées simultanément. Malheureusement, du fait de l'obtention simultanée de plusieurs réponses anti-Stokes de longueurs d'onde différentes, l'utilisation de photomultiplicateur n'est plus permise en tant qu'appareil de collection des photons anti-Stokes. Il faut alors faire évoluer l'agencement du système d'analyse afin que l'appareil de mesure puisse discriminer différentes longueurs d'onde anti-Stokes, et qu'il y soit suffisamment sensible. Néanmoins, nous verrons par la suite que nous pouvons tirer parti d'autres avantages du M-CARS, tels que l'utilisation de méthodes numériques permettant l'extraction de $\Im\{\chi^{(3)}\}$: la partie imaginaire de la susceptibilité d'ordre trois et donc la partie résonante du signal. Avant cela j'expliquerai comment un supercontinuum spectral peut être généré et je poursuivrai par l'exposé de mesures M-CARS produites par différentes sources lasers.

2.1 Génération de supercontinuum

2.1.1 Historique

À partir de 1960 du laser de nombreux domaines scientifiques et techniques ont pu mettre à profit la cohérence spatiale et la forte densité de puissance que les sources lasers peuvent produire. Il ne manquait qu'à lever la restriction monochromatique pour en faire un outil adapté au plus grand nombre d'expériences possibles. C'est dans ce but que dès 1961 on a tenté par différents procédés de générer de nouvelles fréquences en faisant interagir un faisceau laser avec certains matériaux [2]. En 1970 Alfano et

Shapiro [3, 4] montrèrent qu'une impulsion laser spectralement étroite pouvait élargir son spectre lors de son passage au travers d'un verre en silice. À la sortie de ce dernier un spectre continu le long d'une très large bande de longueurs d'onde pouvait être obtenu, ce phénomène fut donc appelé génération d'un supercontinuum (SC). Des phénomènes non linéaires étant à la base de cette génération, il fut donc logiquement envisagé de les favoriser en contraignant le rayonnement laser initiale à traverser une fibre optique, permettant alors un meilleur confinement de l'énergie optique [5]. Par la suite un meilleur contrôle des propriétés du supercontinuum a pu être obtenu grâce à l'invention des fibres microstructurées [6]. Depuis lors, les innovations n'ont cessé de se succéder afin de produire des supercontinua selon les durées d'impulsions lasers et les gammes spectrales à atteindre. Je vais ici uniquement parler des supercontinua produits par des impulsions dont la durée est comprise entre la dizaine de picosecondes et la nanoseconde. Il est néanmoins important de noter que ces faisceaux polychromatiques peuvent aussi être produits par des impulsions beaucoup plus courtes (de l'ordre de la femtoseconde) mais aussi bien plus longues (supérieures à la nanoseconde jusqu'au régime continu). La dynamique d'évolution du spectre est alors changée mais les effets physiques impliqués ne sont pas différents : ils sont généralement associés à l'effet Kerr optique et à la dispersion chromatique de la fibre.

2.1.2 Théorie

La génération d'un supercontinuum procède de différents mécanismes qui peuvent apparaître dans une fibre optique [7]. Ils se divisent en deux familles de processus : de type linéaire comme la dispersion chromatique et de type non linéaire telles que l'auto-modulation de phase (*Self-Phase Modulation* ou SPM), la modulation de phase croisée (*Cross Phase Modulation* ou XPM), les mélanges paramétriques et la diffusion Raman stimulée (*Stimulated Raman Scattering* ou SRS). Le soliton, qui est lié à la dispersion chromatique et à la SPM, sera également introduit. Il faut noter que d'autres combinaisons de plusieurs des effets précédemment mentionnés permettent d'obtenir des processus riches et variés comme par exemple l'instabilité de modulation et l'auto-raidissement. Après une description succincte de certains de ces phénomènes, nous verrons de quelle manière ils interviennent lors de la génération d'un supercontinuum dans une fibre à cristal photonique (*Photonic Crystal Fiber* ou PCF).

2.1.2.1 Effet de la dispersion chromatique

Les conditions de propagation dans une fibre dépendent, entre autres, du matériau et donc de la dispersion de vitesse de groupe (*group-velocity dispersion* ou GVD) que va rencontrer l'onde optique. La grandeur physique liée à la GVD et qui est responsable,

entre autres, de la variation de la durée des impulsions est le paramètre β_2 . Il est défini comme la dérivée seconde de la constante de propagation β par rapport à ω la fréquence angulaire, tels que :

$$\beta = n(\omega) \frac{\omega}{c} \quad (2.1)$$

$$\beta_2 = \frac{1}{c} \left(2 \frac{dn}{d\omega} + \omega \frac{d^2n}{d\omega^2} \right) \quad (2.2)$$

avec $n(\omega)$ l'indice de réfraction de la fibre optique pour la fréquence angulaire ou longueur d'onde correspondante.

Si β_2 est positif, les basses fréquences d'une impulsion vont voyager plus vite que ses hautes fréquences, on parle alors de régime de dispersion normale. À l'inverse, lorsque β_2 est négatif, ce sont les hautes fréquences qui vont voyager plus vite et nous sommes donc en régime de dispersion anormale. Il existe également un troisième cas : celui où le paramètre de GVD ou β_2 nul. Cela correspond à une longueur d'onde particulière nommée la longueur d'onde du zéro de dispersion, notée λ_D . Elle permet de définir une limite entre la GVD normale et anormale.

2.1.2.2 Effets non linéaires

Les effets non linéaires peuvent se subdiviser en deux catégories : les effets élastiques et non élastiques. Les premiers, agissant sans échange d'énergie avec le milieu, apparaissent grâce à un changement d'indice de réfraction de ce dernier. Cette biréfringence induite correspond à l'effet Kerr optique. Un type particulier de cet effet est l'automodulation de phase, ou SPM. Elle est due à la variation d'indice de réfraction du milieu, provoquée par l'intensité de l'impulsion elle-même. L'indice du milieu dans le sens du vecteur polarisation du champ électrique est alors :

$$n = n_l + n_{nl}I(t) \quad (2.3)$$

avec n_l l'indice linéaire, n_{nl} l'indice non linéaire et $I(t)$ l'intensité du l'onde. Cette variation d'indice provoque une modulation non linéaire de la phase de l'onde optique qui vaut alors :

$$\phi(t) = -\frac{2\pi}{\lambda_p} L (n_l + n_{nl}I(t)) \quad (2.4)$$

avec L la longueur de la fibre. Cette variation de la phase est responsable de la variation de la fréquence instantanée ω de l'onde :

$$\omega = \omega_0 + \frac{d\phi}{dt} \quad (2.5)$$

avec ω_0 la fréquence de l'onde incidente. La fréquence instantanée devient alors :

$$\omega = \omega_0 - \frac{2\pi}{\lambda_p} L n_{nl} \frac{dI(t)}{dt}. \quad (2.6)$$

Sur la figure 2.1 on peut voir l'évolution de l'intensité d'une impulsion gaussienne ainsi que celle de sa fréquence instantanée due à la SPM.

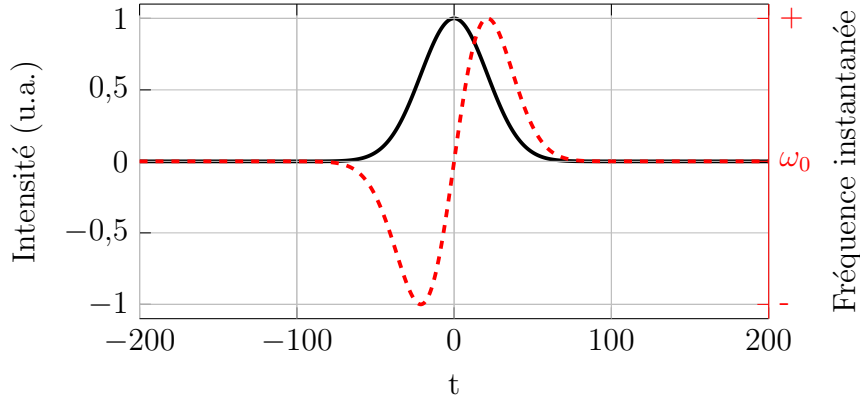


FIGURE 2.1 – Profils temporels normalisés de l'intensité d'une impulsion gaussienne (courbe noire) et de la fréquence instantanée due à la SPM (courbe hachurée rouge).

On peut voir que le front de l'impulsion, arrivant en avance, subit un décalage vers les basses fréquences et que l'arrière subit un décalage vers les hautes fréquences. Dans le cas d'une impulsion optique à profil symétrique, la SPM provoque un élargissement spectral symétrique.

Un phénomène similaire est la modulation de phase croisée ou XPM, qui implique deux impulsions de longueurs d'onde différentes. Dans ce cas la variation d'indice influençant les impulsions n'est plus uniquement due à leur propre intensité mais également à celle de l'autre impulsion. Par exemple, une onde optique de longueur d'onde λ_i subit une modulation de phase croisée ϕ_{XPM} due à l'intensité d'une seconde impulsion de longueur d'onde λ_j qui vaut :

$$\phi_{XPM}(t) = -\frac{4\pi}{\lambda_i} L n_{nl} I_j(t) \quad (2.7)$$

avec $I_j(t)$ l'intensité de l'impulsion à la longueur d'onde λ_j . Il faut bien noter que pour qu'un tel phénomène apparaisse, les deux impulsions doivent se superposer temporellement.

Un autre effet non linéaire élastique à l'origine d'un supercontinuum est le mélange à quatre ondes. À partir de la combinaison de deux photons de fréquences ω_1 et ω_2 , deux autres photons de fréquences ω_3 et ω_4 vont être produits de telle sorte que l'accord de

phase et la conservation de l'énergie soient respectés :

$$\vec{k}_1 + \vec{k}_2 = \vec{k}_3 + \vec{k}_4 \quad (2.8)$$

$$\omega_1 + \omega_2 = \omega_3 + \omega_4. \quad (2.9)$$

La figure 2.2 illustre ce processus : le photon généré avec la fréquence la plus basse est nommé photon Stokes, et celui avec la fréquence la plus haute est appelé anti-Stokes.

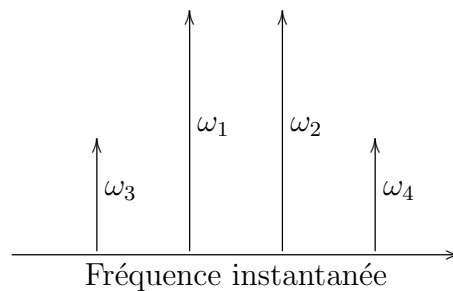


FIGURE 2.2 – Schéma de principe du processus de mélange à quatre ondes

Par comparaison avec des objectifs de microscope, les fibres optiques ont de faibles ouvertures numériques, c'est pourquoi il est difficile de respecter l'accord de phase que requière le CARS. Néanmoins, en ce qui concerne le mélange à quatre ondes impliquant deux photons excitateurs, ces conditions se relâchent. Elles sont encore plus faciles à atteindre lorsque ces deux photons ont la même fréquence : $\omega_1 = \omega_2$. Grâce à ce cas dégénéré, une impulsion monochromatique peut voir son spectre s'étendre vers les hautes et basses longueurs d'onde lors de son parcours dans une fibre.

Le processus de diffusion Raman stimulée (*Stimulated Raman Scattering* ou SRS) est, lui, un effet non linéaire inélastique : il y a échange d'énergie entre les ondes optiques et le milieu. Il peut être considéré comme un mélange à quatre ondes qui n'obéit pas à la condition d'accord de phase et à la conservation de l'énergie décrites précédemment. Deux photons de pompe sont absorbés par le milieu pour engendrer un photon Stokes et un photon anti-Stokes avec des probabilités d'existence très différentes. Le décalage spectral obtenu correspond à celle d'une vibration moléculaire spécifique. L'onde Stokes étant largement plus amplifiée que son homologue anti-Stokes, elle peut donner naissance au même phénomène de génération d'onde créant, par effet de cascade, un train de radiations vers les hautes longueurs d'onde.

En régime de dispersion normale, il n'est pas rare d'observer des cascades de raies Raman donnant alors naissance à un spectre discret. Dans le régime anormale, le gain Raman disponible est souvent utilisé pour obtenir un autodécalage d'impulsions solitoniques. Cette évolution donne alors naissance à un spectre continu large.

Généralement, dans le cas d'une fibre optique, la fréquence vibrationnelle impliquée dans la SRS est celle de la silice à 13,2 THz.

2.1.2.3 Propagation solitonique

Un soliton est une solution d'une équation de propagation non linéaire qui, dans les fibres optiques, correspond à la compensation de l'effet de dispersion chromatique par l'effet d'automodulation de phase. Cet équilibre entre des effets de phase linéaire et non linéaire donne naissance à une impulsion, généralement femtoseconde, qui se propage sans déformation.

2.1.2.4 Mécanisme de génération

Nous nous plaçons dans le cas d'un supercontinuum produit à partir d'impulsions sub-nanosecondes. Par comparaison avec les impulsions femtosecondes, elles peuvent être considérées, en première approximation, comme continues. L'approche, introduisant la notion d'enveloppe lentement variable, permet de simplifier la description mathématique liée à la génération de supercontinuum et de limiter le temps de calcul. Il est néanmoins important de noter que, dans ces conditions, le résultat obtenu ne permet d'avoir qu'une analyse grossière de l'enveloppe du spectre et cela dans le cadre d'une perturbation considérée comme faible [8].

Il existe un grand nombre d'arrangements qui peuvent engendrer un supercontinuum, nous allons ici décrire la génération dans un cas particulier où la longueur d'onde de pompe est proche mais supérieure à la longueur d'onde de dispersion nulle λ_D . Après l'apparition de l'automodulation de phase, l'effet de la dispersion anormale permet d'engendrer une instabilité de modulation qui à pour effet de briser l'impulsion initiale en plusieurs sous impulsions plus courtes [9]. Dans ces conditions, on observe la naissance d'ondes solitoniques pouvant alors engendrer, grâce aux perturbations de l'effet Raman ou des ordres supérieurs de la dispersion un très grand nombre de solitons fondamentaux. Le recouvrement de leur spectre avec le gain Raman permet alors de changer leur fréquence centrale donnant naissance à un autodécalage appelé : *Soliton Self Frequency Shift* ou SSFS [10]. Un spectre large couvrant plusieurs centaines de nanomètres peut ainsi être engendré vers les longueurs d'ondes hautes.

Grâce à la propagation d'ondes intenses en régime de dispersion anormale, des processus paramétriques tels que les mélanges à quatre ondes ou les ondes dispersives peuvent apparaître. Ces phénomènes permettent alors un transfert de l'énergie vers les basses longueurs d'onde en régime de dispersion normale. Il est à noter que l'introduction d'une biréfringence et de modes transverses supplémentaires lors de la propagation dans la fibre permet d'augmenter la potentialité d'accord des vitesses entre les ondes et donne

naissance à d'autres processus paramétriques large bande. La combinaison complexe de tous ces processus non linéaires permet alors d'engendrer un spectre large couvrant toute la bande de transparence de la silice (350 nm - 1,4 μm).

Nous comprenons ainsi un peu mieux comment une impulsion monochromatique sub-nanoseconde, au cours de son passage dans un fibre optique, peut se transformer en un supercontinuum : une onde couvrant une très large gamme de longueurs d'onde autour de sa longueur d'onde initiale. Mais si j'ai présenté ici le cas particulier de la génération de supercontinua dans les fibres optique microstructurées, il est bien connu que ces faisceaux polychromatiques peuvent également être obtenus dans d'autres composant et matériaux avec d'autres non-linéarités, comme les liquides, les gaz, ainsi que les cristaux.

2.1.3 Les sources supercontinuum

Je vais présenter les supercontinua que nous avons pu obtenir à l'aide de plusieurs sources laser à 1064 nm et différentes fibres à cristal photonique. Je vais tout d'abord lister les caractéristiques des sources puis celles des PCF.

- Sources laser
 - Source de pompe de type microlaser, noté PM : $\tau = 1$ ns, $f_r = 20$ kHz, $\bar{P} = 400$ mW
 - Source à modes synchronisés, découpage temporel et amplification (Spark, Sirius), noté MS : $\tau = 60$ ps, 20 kHz $\leq f_r \leq 1$ MHz, $\bar{P} \leq 10$ W
- PCF
 - PCF 1 : $L = 636$ cm, $\lambda_D = 1008$ nm
 - PCF 2 : $L = 281$ cm, $\lambda_D = 1063$ nm

avec τ la durée de l'impulsion, f_r la fréquence de répétition, \bar{P} la puissance moyenne en sortie du laser, L la longueur de fibre et λ_D la longueur du zéro de dispersion de la fibre. On peut retrouver ce paramètre sur la figure 2.3 où sont présentées les courbes de dispersion du mode fondamental LP01 en fonction de la longueur d'onde pour les deux types de fibre.

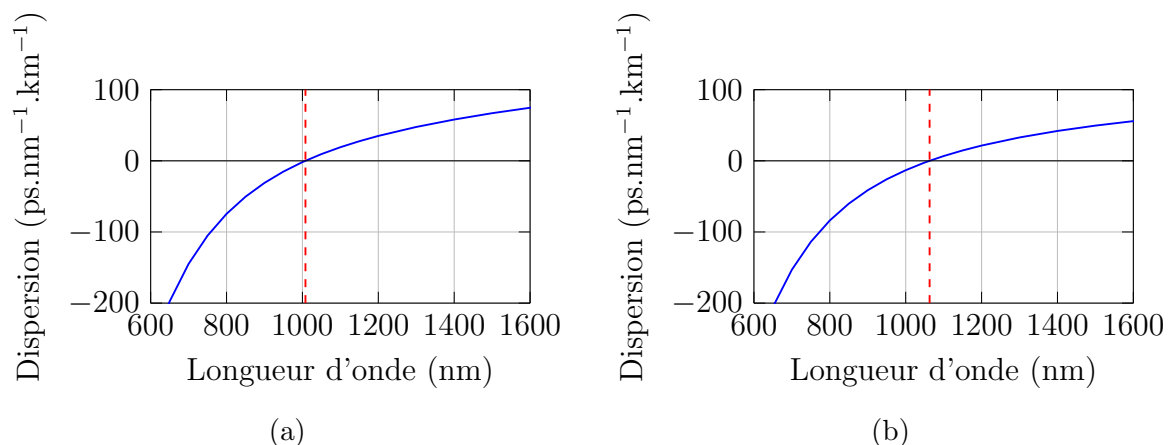


FIGURE 2.3 – Courbes de dispersion du mode fondamental LP01 en fonction de la longueur d'onde pour les fibres (a) PCF 1 et (b) PCF 2, avec leur longueur d'onde du zéro de dispersion, λ_D , repérée par la droite rouge discontinue.

Nous avons pu obtenir différents supercontinua à partir de diverses associations de lasers et de fibres. Les configurations expérimentales donnant lieu à quatre couples de spectres différents sont listées dans le tableau 2.1.

Source laser \ PCF	PCF 1	PCF 2
PM	Spectres 1	Spectres 2
MS	Spectres 3	Spectres 4

Tableau 2.1 – Tableau des différentes configurations source laser - PCF.

Les couples de spectres 1 à 4 illustrent les densités spectrales de puissance des supercontinua mesurées par un analyseur de spectre optique (Ando, AQ-6315A) en sortie de fibre et après passage par un miroir dichroïque coupe-bande (ou *notch*) à 1064 nm (Semrock, NFD01-1064-25x36; largeur à mi-hauteur, *full width at half-maximum* ou FWHM, de 82 nm; angle d'incidence, *angle of incidence* ou AOI, de 45° et renommé MD-notch 1064). Ils sont présentés sur les figures 2.4 à 2.7.

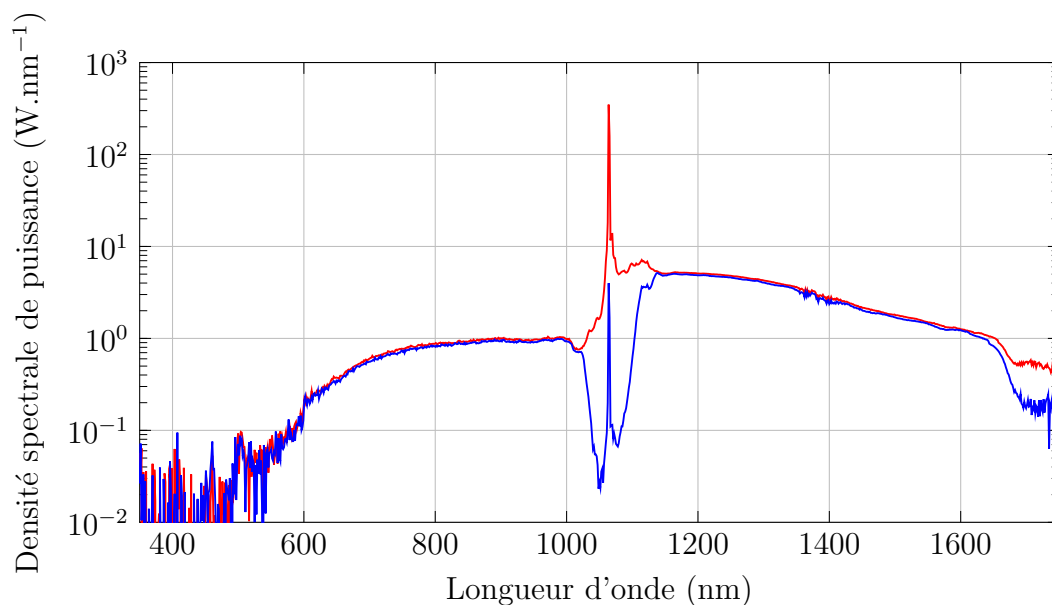


FIGURE 2.4 – Spectres 1 : densités spectrales de puissance du supercontinuum obtenues avec la source PM et la fibre PCF 1 en sortie de fibre (courbe rouge, $\bar{P} = 28,7$ mW) et après MD-notch 1064 (courbe bleue, $\bar{P} = 21,3$ mW).

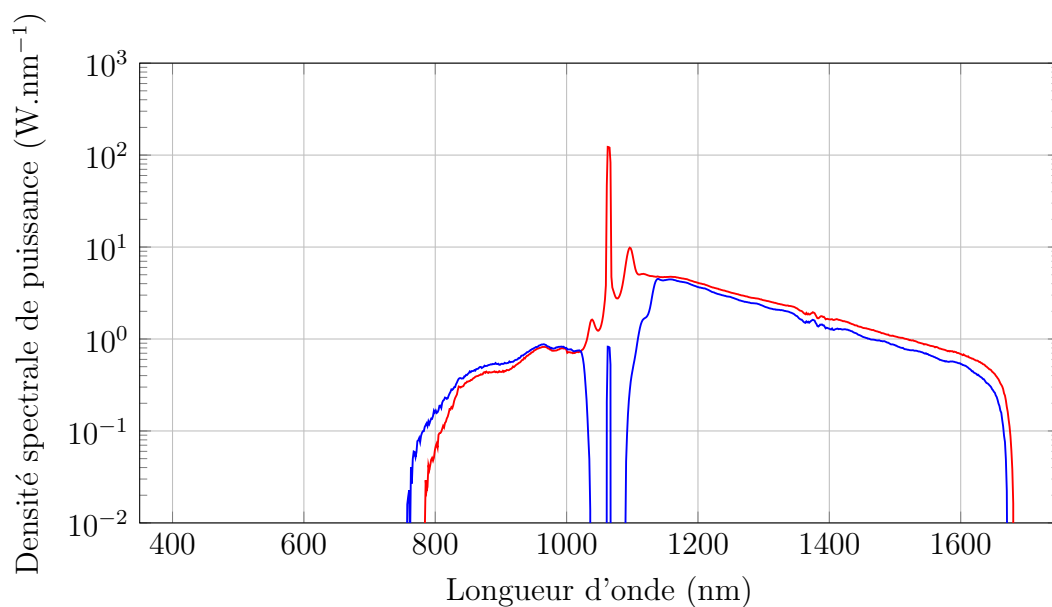


FIGURE 2.5 – Spectres 2 : densités spectrales de puissance du supercontinuum obtenues avec la source PM et la fibre PCF 2 en sortie de fibre (courbe rouge, $\bar{P} =$ mW) et après MD-notch 1064 (courbe bleue, $\bar{P} =$ mW).

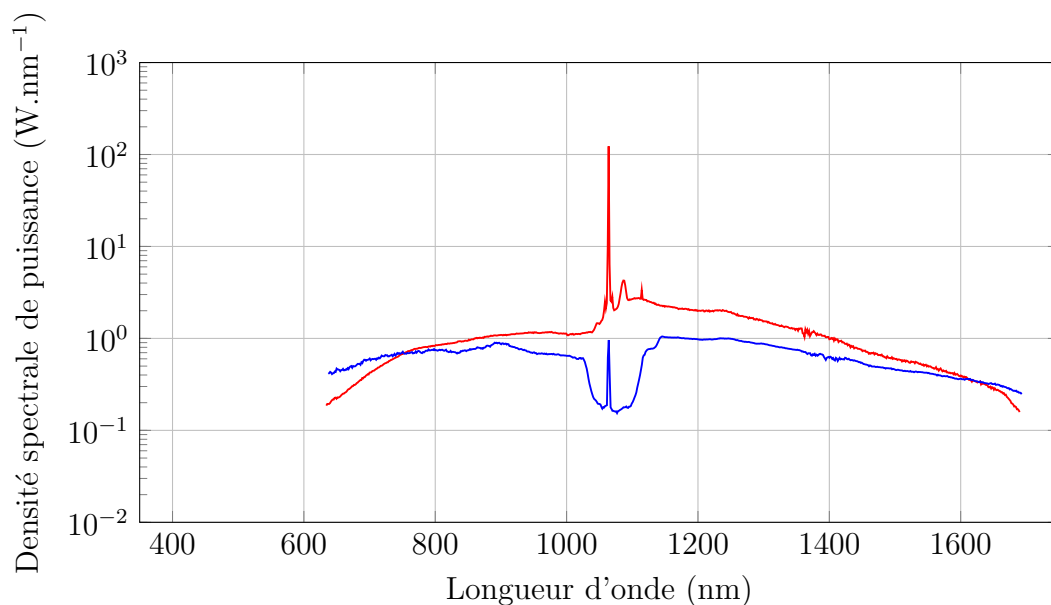


FIGURE 2.6 – Spectres 3 : densités spectrales de puissance du supercontinuum obtenues avec la source MS ($f_r = 115$ kHz) et la fibre PCF 1 en sortie de fibre (courbe rouge, $\bar{P} = 15,7$ mW) et après MD-notch 1064 (courbe bleue, $\bar{P} = 7,3$ mW).

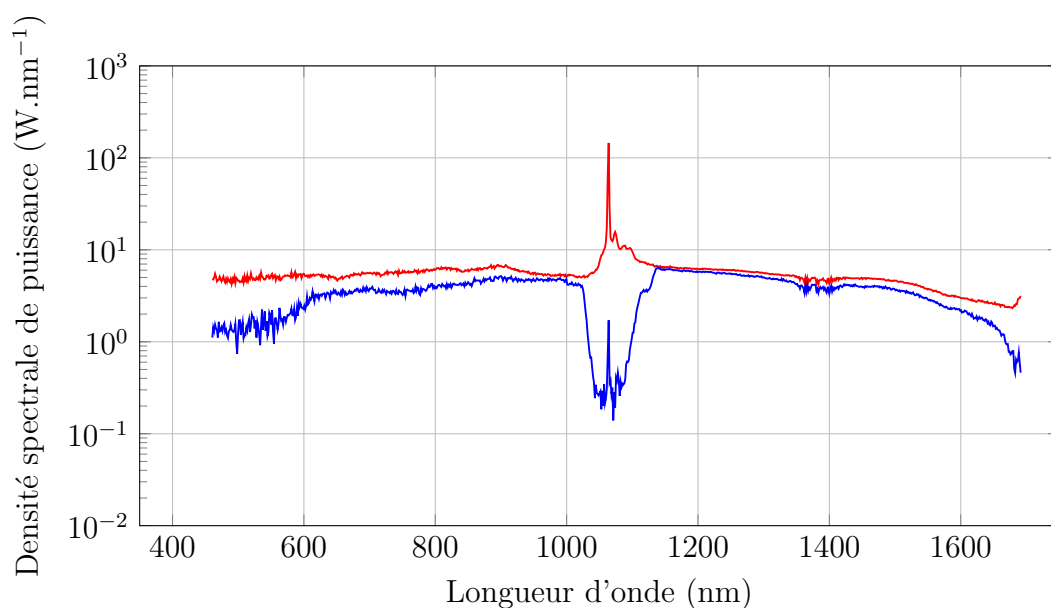


FIGURE 2.7 – Spectres 4 : densités spectrales de puissance du supercontinuum obtenues avec la source MS ($f_r = 120$ kHz) et la fibre PCF 2 en sortie de fibre (courbe rouge, $\bar{P} = 50,3$ mW) et après MD-notch 1064 (courbe bleue, $\bar{P} = 30,8$ mW).

Les mesures de puissance moyenne de tous les spectres ont été faites avec un puissance-mètre (Thorlabs, PM100D).

L'évaluation de la densité spectrale de puissance du continuum dans sa partie infrarouge au delà de l'onde de pompe permet d'évaluer l'intensité du signal anti-Stokes

que nous utiliserons par la suite. Bien que les sources lasers et les fibres optiques utilisées aient des caractéristiques légèrement différentes, on peut néanmoins affirmer que la construction du spectre a été assez similaire dans tous les cas de figure. Après l'automodulation de phase et la création d'une instabilité de modulation autour de l'onde de pompe, l'apparition d'ondes solitoniques a permis d'obtenir une structuration temporelle fine de l'impulsion. La propagation en régime anormal a alors été exacerbée par le gain Raman grâce et l'autodécalage solitonique. Dans la région visible, le spectre a été alimenté par les mélanges paramétriques et notamment par la génération d'ondes dispersives créées à partir des solitons.

2.2 Expériences M-CARS en transmission

À l'aide de filtres optiques nous pouvons sélectionner dans le supercontinuum les longueurs d'onde supérieures à celle de la longueur d'onde de pompe, λ_p . Nous obtenons alors une onde Stokes qui s'étale entre 1100 nm et 1600 nm avec une planéité meilleure qu'une décade sur toute la plage utile. Nous pouvons alors en déduire le diagramme énergétique du processus M-CARS (figure 2.8).

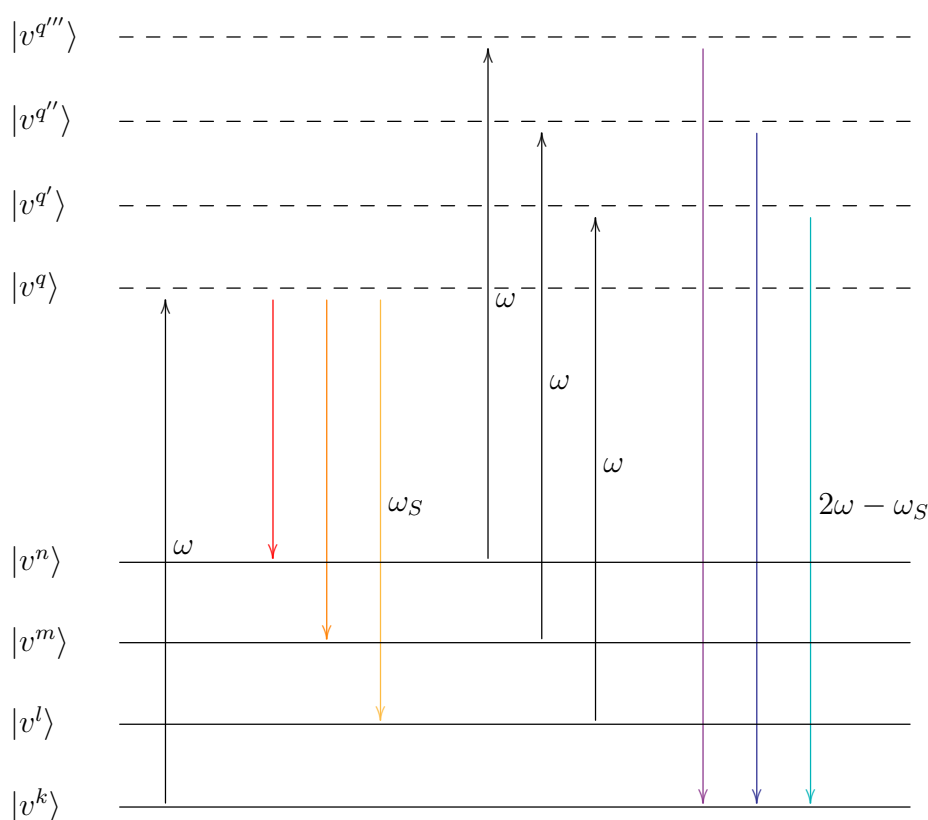


FIGURE 2.8 – Diagramme énergétique du processus M-CARS.

Nous constatons que, selon la largeur spectrale de l'onde Stokes, nous acquérons de manière simultanée un nombre plus ou moins important d'informations vibrationnelles éloignées spectralement : d'où le caractère multiplexé de cette mesure. Le calcul de l'étendue du spectre M-CARS se fait de la manière suivante :

$$\bar{\omega}_{max} = \left| \frac{1}{\max \lambda_{pr}} - \frac{1}{\lambda_p} \right| \quad (2.10a)$$

$$\bar{\omega}_{min} = \left| \frac{1}{\min \lambda_{pr}} - \frac{1}{\lambda_p} \right| \quad (2.10b)$$

avec $\bar{\omega}_{min}$ et $\bar{\omega}_{max}$ (cm^{-1}) les décalages Raman minimum et maximum délimitant la réponse anti-Stokes produite par le processus M-CARS.

En prenant en exemple le spectre filtré par le MD-notch 1064 présenté figure 2.4 et en définissant une valeur seuil arbitraire de densité spectrale de puissance égale à 1 W.nm^{-1} , il vient que $\min \lambda_{pr} = 1103 \text{ nm}$ et $\max \lambda_{pr} = 1635 \text{ nm}$. La longueur d'onde de la pompe étant de 1064 nm , les équations 2.10a et 2.10b donnent $\bar{\omega}_{min} = 332 \text{ cm}^{-1}$ et $\bar{\omega}_{max} = 3282 \text{ cm}^{-1}$. Ces décalages Raman devraient normalement être négatifs car il s'agit de réponses anti-Stokes, néanmoins par commodité et afin de comparer sommairement le spectre CARS d'un échantillon avec son spectre Raman correspondant, les décalages Raman CARS sont passés en positif, d'où la mise en valeur absolue dans les équations précédentes.

2.2.1 Dispositif expérimental

Au cours de cette thèse plusieurs sources lasers ont été utilisées. Elles ont été incorporées à l'arrangement expérimental représenté sur la figure 2.9.

à 1064 nm (Thorlabs, NF-1064-44) est placé avant le spectromètre (Horiba, LabRam Evolution). À l'intérieur de l'appareil, le faisceau anti-Stokes est réfléchi vers un des deux réseaux de diffraction disponibles ($600 \text{ sillons.mm}^{-1}$ ou $1800 \text{ sillons.mm}^{-1}$). Il subit alors une diffraction qui va permettre de distinguer spatialement les différentes longueurs d'onde. Une caméra dotée d'une barrette CCD (Horiba, Synapse) permet de transcrire l'intensité du spectre anti-Stokes. Les courbes de transmission, de réflexion et d'efficacité des différents éléments sont données en annexe D.

2.2.2 Résultats

À l'aide de ce système nous avons pu caractériser de nombreux échantillons de différents types. Nos objets d'étude se divisent en trois catégories : minéral, végétal et animal. Dans chaque cas les niveaux du signal CARS obtenus pour deux types de configurations expérimentales sont comparés : la source PM associée, soit à une fibre PCF 2, soit à une PCF 1, et la source MS alliée à une fibre PCF 2 dont les spectres des ondes Stokes correspondent aux spectres 1 et 4 (figures 2.4 et 2.7).

2.2.2.1 Échantillon minéral

Le premier objet d'étude que nous avons choisi est la paraffine liquide. Il s'agit d'un mélange de n-alcane, des molécules composées d'atomes d'hydrogène et de carbone dont la formule chimique est C_mH_{2m+2} , avec m compris entre 15 et 40. Le schéma d'une molécule de n-alcane est donné figure 2.10.

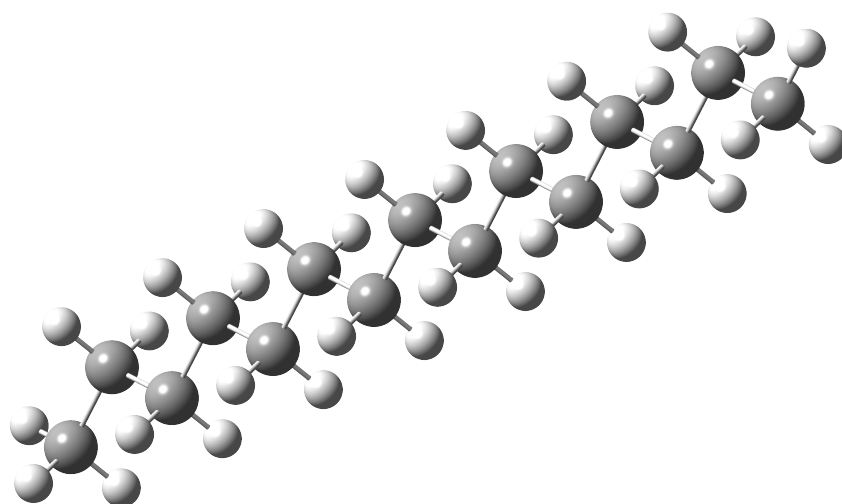


FIGURE 2.10 – Schéma de la molécule de n-alcane $C_{15}H_{32}$. Les atomes de carbone sont illustrés en gris et les atomes d'hydrogène en blanc.

On peut remarquer qu'elle possède des liaisons moléculaires CH_2 et CH_3 , les mêmes liaisons présentes dans les lipides, constituants de la membrane des cellules animales [11].

Grâce à la paraffine liquide nous avons donc pu tester la capacité de notre système à détecter les vibrations typiques des lipides.

Un premier spectre de paraffine liquide a été mesuré à l'aide de la source PM et de la fibre PCF 2.

- temps d'acquisition de la CCD : 1 ms
- accumulations : 20
- τ : 1 ns
- f_r : 20 kHz
- \bar{P}_p : 112,5 mW ; P_p : 5,625 kW
- \bar{P}_S : 8,37 mW ; P_S : 0,419 kW.

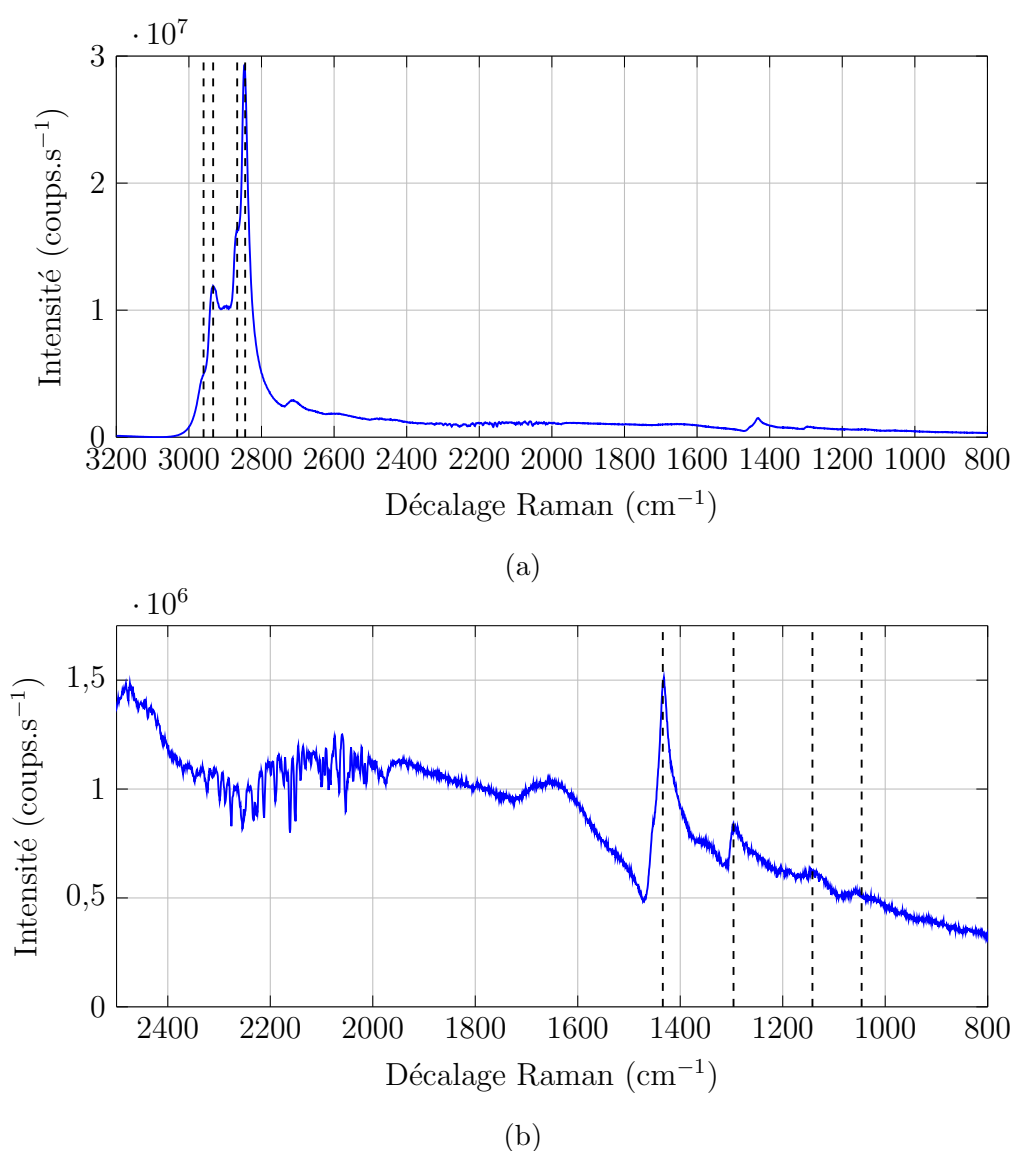
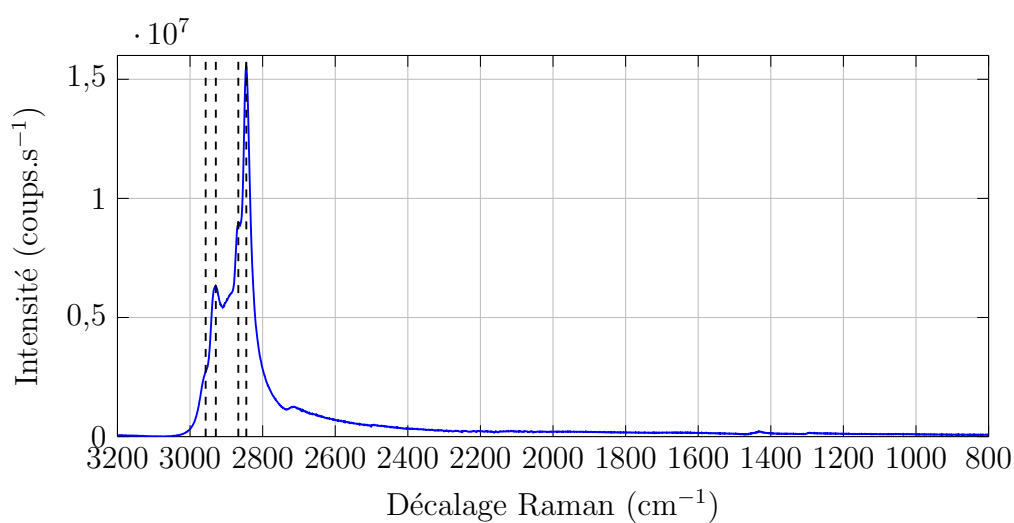


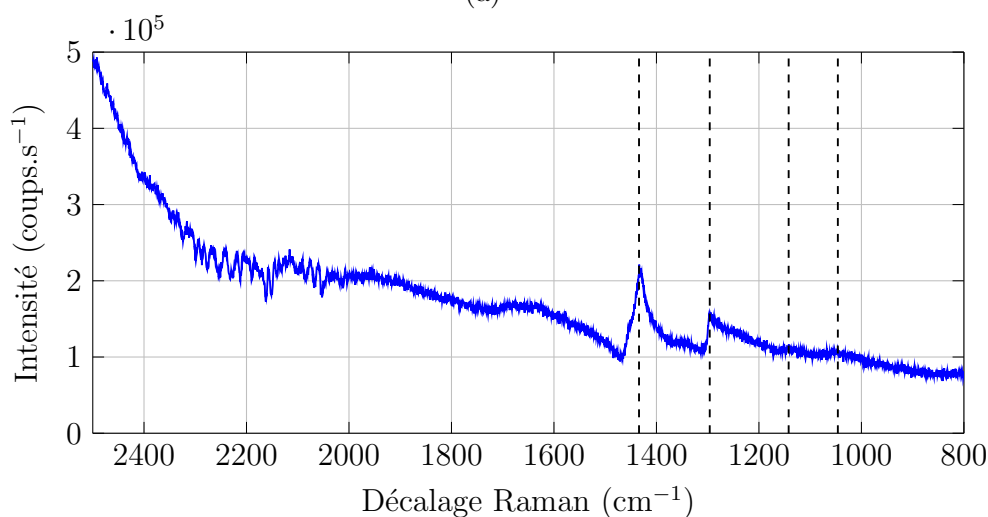
FIGURE 2.11 – Spectre CARS de la paraffine liquide (a) et agrandissement de la zone entre 2500 cm^{-1} et 800 cm^{-1} (b) obtenu avec la source PM.

Un second spectre de paraffine liquide a été obtenu grâce à la source MS et la fibre PCF 2.

- temps d'acquisition de la CCD : 1 ms
- accumulations : 20
- τ : 60 ps
- f_r : 120 kHz
- \bar{P}_p : 22,5 mW ; P_p : 3,125 kW
- \bar{P}_S : 8,52 mW ; P_S : 1,183 kW.



(a)



(b)

FIGURE 2.12 – Spectre CARS de la paraffine liquide (a) et agrandissement de la zone entre 2500 cm^{-1} et 800 cm^{-1} (b) obtenu avec la source MS.

L'étude du spectre Raman de la paraffine liquide a déjà été effectuée et a permis l'attribution de vibrations moléculaires aux pics Raman observés [12]. Par analogie nous avons pu faire coïncider les pics CARS observés précédemment à ces vibrations¹, comme cela est illustré tableau 2.2.

Pics Raman (cm ⁻¹)	Pics CARS (cm ⁻¹)	Vibrations
2959	2957	élongation asymétrique (ν asym.) CH ₃
2931	2929	élongation symétrique (ν sym.) CH ₃
2890	2867	ν asym. CH ₂
2850	2845	ν sym. CH ₂
1460-1440	1434	déformation (δ) CH ₂
1300	1296	déformation en torsion (δ twist.) CH ₂
1130	\approx 1142	ν asym. C-C
1060	\approx 1046	ν sym. C-C

Tableau 2.2 – Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman et CARS de la paraffine liquide.

Nous constatons que les décalages Raman de la grande majorité des pics CARS sont légèrement inférieurs à ceux des pics Raman (de 2 à 14 cm⁻¹). Comme illustré figure 1.6 cette différence de position du maximum de l'intensité CARS s'explique par la combinaison du profil lorentzien de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ avec $\Re \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$, de nature dispersive. Le maximum du signal n'est alors plus porté par le sommet de la lorentzienne mais va migrer vers les bas décalages Raman.

Outre la position des pics CARS, nous observons que l'intensité des signaux CARS est différente d'une source à une autre. L'intensité mesurée par la caméra dépend à la fois de la puissance crête de pompe (P_p), de la densité spectrale de puissance de l'onde Stokes dP ainsi que de la fréquence de répétition de la source et de la durée de l'impulsion. De ce fait nous pouvons établir la relation suivante :

$$I(\lambda_{AS}) \propto P_p^2 dP(\lambda_S) \tau f_r \quad (2.11)$$

avec λ_{AS} la longueur d'onde anti-Stokes liée à la longueur d'onde Stokes λ_S par les équations 2.10.

Le coefficient qui manque à cette équation et qui permet d'avoir la valeur de l'intensité CARS est bien entendu la norme au carré de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois. Néanmoins la prise en compte de ces grandeurs physiques, que sont les puissances crêtes et la fréquence de répétition de la source laser, peut nous aider à comparer l'efficacité de génération d'un signal anti-Stokes pour deux sources différentes. Pour ce faire nous

1. Une description des différents modes vibrationnels est donnée annexe E.

introduisons le coefficient γ qui lie l'intensité CARS mesurée aux paramètres de la source :

$$\gamma = \frac{I_{mes}}{P_p^2 dP(\lambda_S)\tau f_r}. \quad (2.12)$$

Les coefficients obtenus pour les pics CARS de la paraffine sortant clairement du bruit de fond non résonant pour chacun des spectres obtenus avec les deux sources, sont listés dans le tableau 2.3.

Pics CARS (cm^{-1})	$dP(\lambda)$ ($\text{W}\cdot\text{nm}^{-1}$)		I_{mes} ($\times 10^6$ coups. s^{-1})		I_{norm}		γ ($\times 10^3$)	
	PM	MS	PM	MS	PM	MS	PM	MS
2957	0,67	2,87	5,11	2,72	0,177	0,175	12,05	13,48
2929	0,69	2,99	11,72	6,28	0,406	0,405	26,84	29,87
2867	0,75	3,22	16,32	8,98	0,565	0,579	34,39	39,66
2845	0,75	3,33	28,89	15,52	1	1	60,87	66,28
1434	2,76	5,46	1,00	0,124	0,035	0,008	5,73	3,22
1296	3,03	5,57	0,73	0,05	0,006	0,003	3,81	1,28

Tableau 2.3 – Tableau des intensités mesurées des pics CARS de la paraffine pour les sources PM et MS, en relation avec la densité spectrale de puissance de l'onde Stokes au niveau de l'échantillon, de leur intensité normalisée et du coefficient γ .

Nous constatons à la lecture de ce tableau que malgré une densité spectrale de puissance supérieure, la source à modes synchronisés présente des intensités CARS plus faibles que celles de la source de pompe de type microlaser. Nous remarquons aussi que les intensités normalisées sont similaires entre les deux sources lasers, mis à part pour les pics à 1434 cm^{-1} et 1296 cm^{-1} qui sont respectivement quatre et deux fois moins intenses dans le cas de la source à modes synchronisés. Cette différence relative entre les signaux de la zone C-H, entre 3000 cm^{-1} et 2700 cm^{-1} , et la zone d'empreinte digitale, entre 1700 cm^{-1} et 500 cm^{-1} , pourrait être due à la distorsion temporelle de l'onde Stokes. Les longueurs d'onde utilisées pour générer la réponse CARS dans la zone C-H semblent être synchronisées temporellement avec l'impulsion pompe, tandis que les longueurs d'onde Stokes utilisées pour engendrer le signal CARS dans la zone d'empreinte digitale arrivent légèrement en avance par rapport à l'onde pompe. Cette mauvaise synchronisation des ondes Stokes et pompe dans une partie du spectre est imputable à la durée d'impulsion de 60 ps qui est l'ordre de grandeur du décalage temporel cumulé introduit par la dispersion chromatique de la fibre non linéaire. Il est alors très difficile de parfaitement optimiser le recouvrement temporel sur toute la bande d'analyse. L'utilisation d'une fibre plus courte ou d'une impulsions plus longue peut recoudre ce problème. Ces expériences nous permettent également de montrer que la source impulsionnelle idéale devrait avoir ici une durée de l'ordre d'une centaine de picosecondes.

Il faut aussi noter que la puissance crête de l'onde pompe et la fréquence de répétition peuvent fortement influencer les intensités CARS. Le coefficient γ permet alors de prendre en compte ces paramètres ce qui facilitera la comparaison entre les sources utilisées. Dans ces conditions, il apparaît que la source PM présente des coefficients légèrement inférieurs à ceux de la source MS, mis-à-part pour les pics CARS de la paraffine dans la zone d'empreinte digitale. Nous pouvons alors faire le rapport entre les coefficients γ des sources PM et MS afin d'obtenir une efficacité relative de génération du processus CARS. Il apparaît que pour les pics CARS de la paraffine à 2957 cm^{-1} , 2845 cm^{-1} , 2867 cm^{-1} et 2845 cm^{-1} l'efficacité de génération du processus anti-Stokes est similaire. Pour ces quatre pics, l'efficacité est supérieure de 10 % lorsque l'on utilise la source de pompe à modes synchronisés, en comparaison à la source de type microlaser. Par contre, ce rapport est difficilement interprétable pour les pics à 1434 cm^{-1} et 1296 cm^{-1} . En effet, la différence de vitesse de groupe subit dans la fibre ne permet pas d'optimiser le recouvrement temporelle entre les ondes pompe et Stokes sur toute la bande d'analyse. Dans ce cas, l'optimisation du décalage temporel pour les raies vers 3000 cm^{-1} introduit une désynchronisation pour celles vers 1300 cm^{-1} ce qui diminue d'autant l'efficacité de conversion.

Les mesures réalisées sur cet échantillon ont mis en évidence la capacité de mon système à capturer un spectre CARS de 3200 cm^{-1} à 800 cm^{-1} . Il m'a aussi permis d'estimer concrètement les caractéristiques d'un spectre CARS : un aspect dispersif des pics CARS et un déplacement de leur position vers les bas décalages Raman. De plus, j'ai pu générer ces spectres CARS à partir de deux sources lasers avec des régimes de fonctionnement différents. Cela m'a permis de montrer que si la génération large bande de l'onde Stokes ne subissait pas trop l'influence de la différence de vitesse de groupe, l'efficacité de génération de l'onde CARS pouvait être la même sur la totalité de la bande spectrale.

2.2.2.2 Échantillon végétal

Au cours de cette thèse j'ai pu collaborer avec le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges (LCSN). Dans ce cadre, j'ai testé les capacités du système M-CARS sur des objets variés et notamment des coupes de sapin de douglas (*Pseudotsuga menziesii*) présentant des épaisseurs de 15 μm . Une image d'une de ces coupes observée au microscope est présentée figure 2.13.

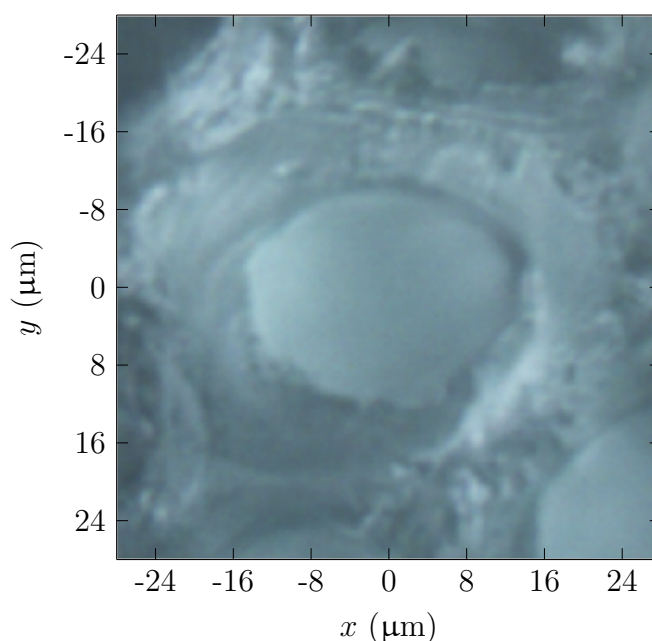
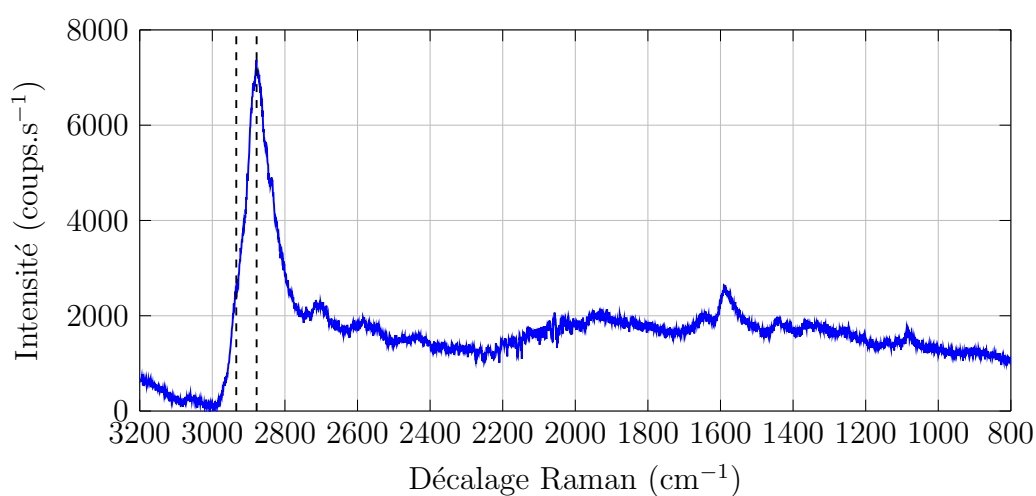


FIGURE 2.13 – Image d'une trachéide de sapin de douglas observée en lumière blanche par transmission (Olympus, UPlanSApo 60x O.N. = 1,2 immersion dans l'eau).

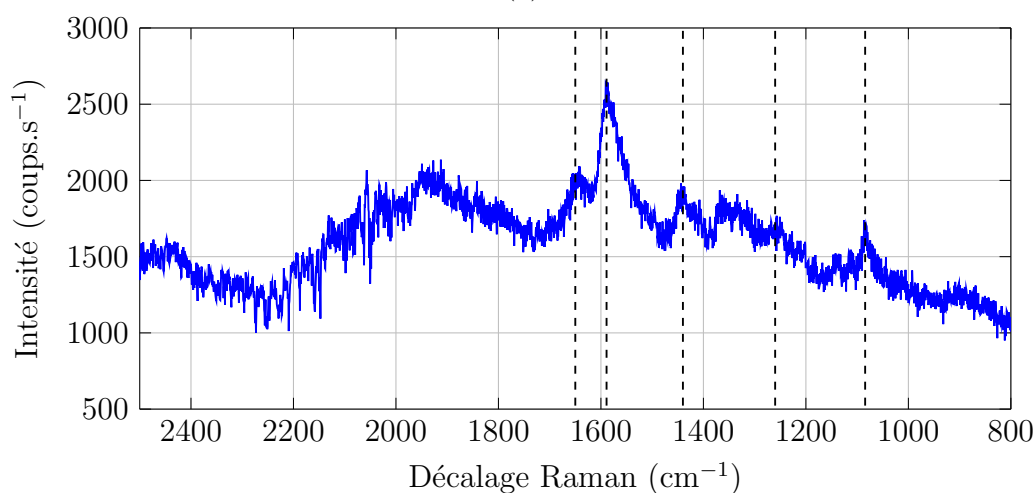
Au centre de l'image on distingue clairement une zone homogène qui correspond à une cavité auparavant occupée par une cellule de sapin de douglas. La seule trace de son existence est la paroi cellulaire rigide qu'elle a formée et que nous pouvons observer autour du trou. Dans le cas des Gymnospermes, division du douglas, ces cellules mortes nommées trachéides, représentent près de 90% de l'arbre dont elles permettent le maintien [13]. Une étude non destructive des composants des trachéides permettrait de déterminer leur influence sur les propriétés mécaniques de ce bois afin d'améliorer sa sélection dans le cadre d'une utilisation industrielle [14]. Une mesure en spectroscopie Raman spontanée d'un tel objet est difficile à réaliser parce qu'il requière de longs temps d'exposition (plusieurs dizaines de minutes par spectre), et surtout parce que la contribution de la fluorescence peut noyer les bandes Raman. Or mon dispositif M-CARS me permet d'éviter de tels désagréments.

Un premier spectre d'une paroi cellulaire de sapin de douglas fut mesuré à l'aide de la source PM et de la fibre PCF 2.

- temps d'acquisition de la CCD : 500 ms
- accumulations : 10
- τ : 1 ns
- f_r : 20 kHz
- \bar{P}_p : 112,5 mW ; P_p : 5,625 kW
- \bar{P}_S : 8,37 mW ; P_S : 0,419 kW.



(a)

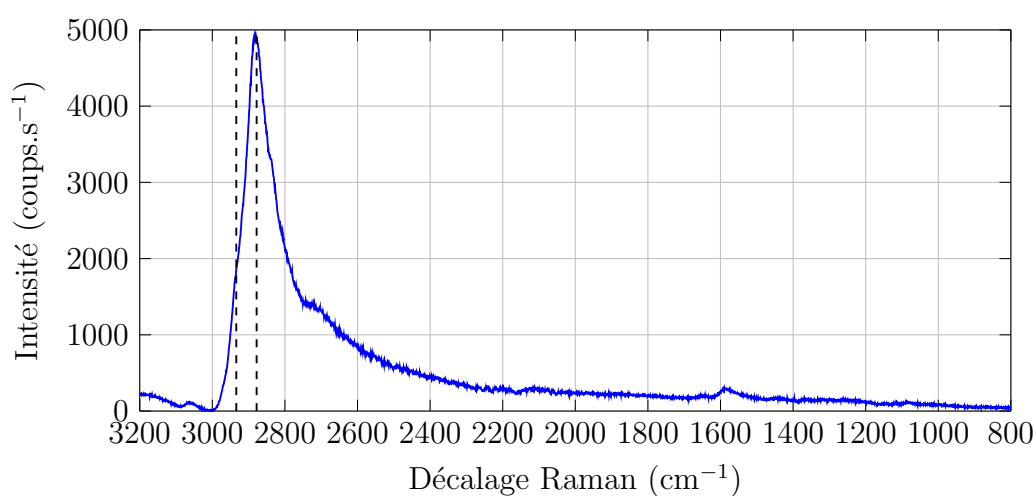


(b)

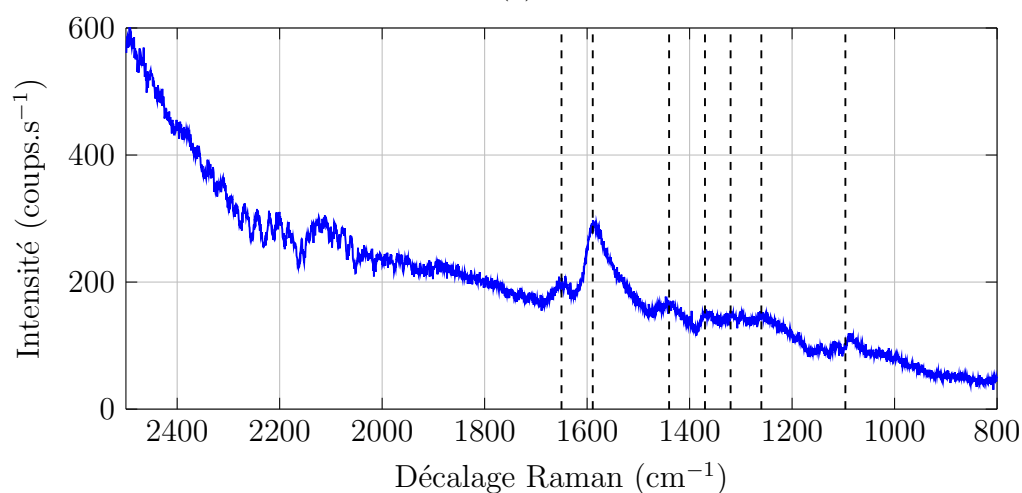
FIGURE 2.14 – Spectre CARS d'une trachéide de sapin de douglas (a) et agrandissement de la zone entre 2500 cm^{-1} et 800 cm^{-1} (b) obtenus avec la source PM.

Le second spectre d'une paroi cellulaire de sapin de douglas a été obtenu grâce à la source MS et la fibre PCF 2.

- temps d'acquisition de la CCD : 500 ms
- accumulations : 10
- τ : 60 ps
- f_r : 120 kHz
- \bar{P}_p : 22,5 mW ; P_p : 3,125 kW
- \bar{P}_S : 8,52 mW ; P_S : 1,183 kW.



(a)



(b)

FIGURE 2.15 – Spectre CARS d'une trachéide de sapin de douglas (a) et agrandissement de la zone entre 2500 cm^{-1} et 800 cm^{-1} (b) obtenu avec la source MS.

Je me suis servi de l'étude du spectre Raman de cellule de bois de peuplier afin de déterminer à quelles vibrations, et à partir de là, à quels composants correspondaient les pics CARS du spectre des trachéides de douglas [15]. Il en est ressorti quatre contributions, celles de la cellulose (C), de la lignine (L) du glucomannane (G) et du xylane (voir tableau 2.4). La cellulose compose 40 à 50% de la partie "morte" de l'arbre, contre 25 à 35% pour la lignine et 25% pour les hémicelluloses dont font parti le glucomannane et le xylane [16].

Pics Raman (cm^{-1})	Pics CARS (cm^{-1})	Vibrations	Composants
2945	2938-2931	ν asym. CH	C, L et G
2897	2878	ν CH et CH_2	C
1660	1650	ν C=C	L
1601	1589	ν sym. cycle aryle	L
1462	1440	δ HCH et HOC	C et L
1376	1370	δ HCC, HCO et HOC	C
1333	\approx 1320	δ HCC et HCO	C
1274	\approx 1260	OH, O- CH_3 et C=O	L
1096	1096	ν CC et CO	C, G et xylane

Tableau 2.4 – Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman et CARS des trachéides de douglas.

Une nouvelle fois nous constatons que les pics CARS se trouvent déplacés vers les bas décalages Raman. Malgré cela, nous avons vérifié la capacité du dispositif M-CARS à distinguer certains constituants des trachéides de douglas. J'ai pu mettre en avant les avantages du CARS : la suppression du signal de fluorescence et des durées d'acquisition réduites.

À partir de ces informations, en utilisant la source PM allié à la fibre PCF 2, j'ai pu réaliser des cartographies spectrales de $60 \mu\text{m}$ par $60 \mu\text{m}$ avec un pas de $1 \mu\text{m}$ et une résolution latérale de moins de $1 \mu\text{m}$. Chaque pixel a requis un temps d'exposition de 250 ms et deux accumulations. Sur la figure 2.16 sont présentées les distributions de l'intensité des pics CARS à 1650 cm^{-1} et à 2878 cm^{-1} qui illustrent, respectivement, la présence de lignine et de cellulose. La combinaison de ces distributions est également donnée figure 2.16c.

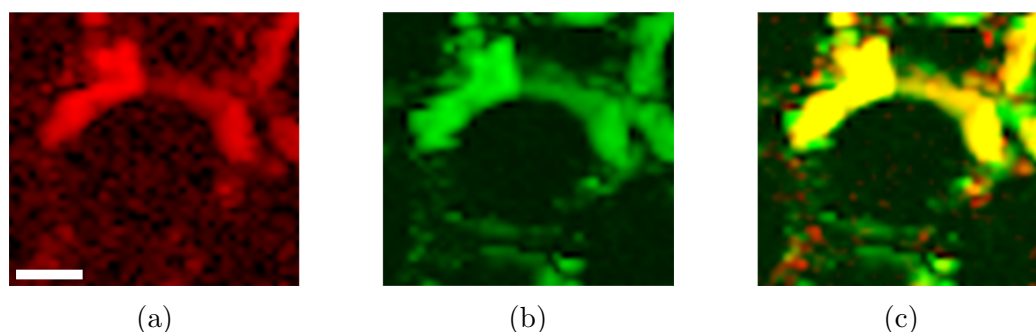


FIGURE 2.16 – Cartographies de l’intensité de deux pics CARS d’une trachéide de sapin de douglas (a) à 1650 cm^{-1} signant pour la lignine ; (b) à 2878 cm^{-1} signant pour la cellulose ; et (c) combinaison de ces cartographies (la couleur jaune indiquant un recouvrement). Barre d’échelle : $10\text{ }\mu\text{m}$.

Nous constatons que la microspectroscopie M-CARS permet de discerner les distributions de la lignine et la cellulose d’une trachéide. Pour différentes zones d’une coupe de sapin de douglas, le rapport des intensités de ces composés permettrait d’obtenir un élément d’information sur les propriétés mécaniques de l’arbre. En étendant cette mesure à d’autres types de composants et en la mettant en relation avec une étude génomique nous pourrions alors caractériser un type d’arbre adapté aux demandes industrielles.

Il faut bien noter que durant cette étude j’ai utilisé deux coupes de sapin de douglas différentes. Par ailleurs, la concentration des éléments des trachéïdes pouvant varier considérablement d’un endroit à un autre de la coupe, il m’a paru difficile de comparer rigoureusement l’efficacité de génération du CARS pour les deux sources lasers.

Le travail sur ce type d’échantillons est néanmoins amené à se prolonger afin, par exemple, qu’une mesure relative de l’intensité des pics CARS comparée à une analyse génomique permette de déterminer le lien entre l’abondance relative des différents composants des trachéïdes et les propriétés mécaniques du bois de douglas.

2.2.2.3 Échantillon animal

De la même manière que pour les cellules végétales, j'ai initié une collaboration avec l'équipe de Jean-Michel Petit (Unité de Génétique Moléculaire Animale, UGMA, Limoges). Elle fait partie, avec notre groupe, d'un projet collaboratif multidisciplinaire portant sur l'identification de nouvelles voies de détection de cellules cancéreuses par des méthodes spectrales, et notamment le CARS. Ce projet, qui s'établit sur une analyse statistique requérant une base de données importante, comportera donc des mesures CARS que j'ai effectuées sur différents types de souches cellulaires animales.

Je propose d'exposer ici l'exemple de spectres CARS mesurés sur deux types cellulaires différents : les cellules C2C12, des myoblastes murins (cellules souches se différenciant en cellules musculaires) ; et les HCT, des cellules épithéliales de cancer du côlon humain. Ces deux genres de cellules peuvent être observés figure 2.17.

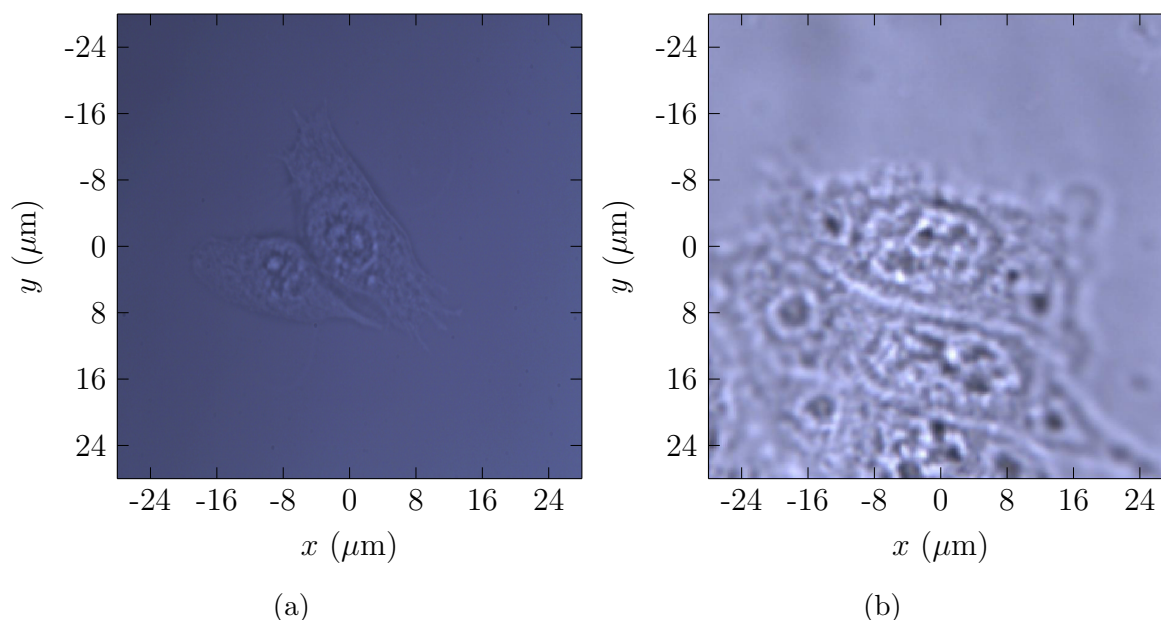
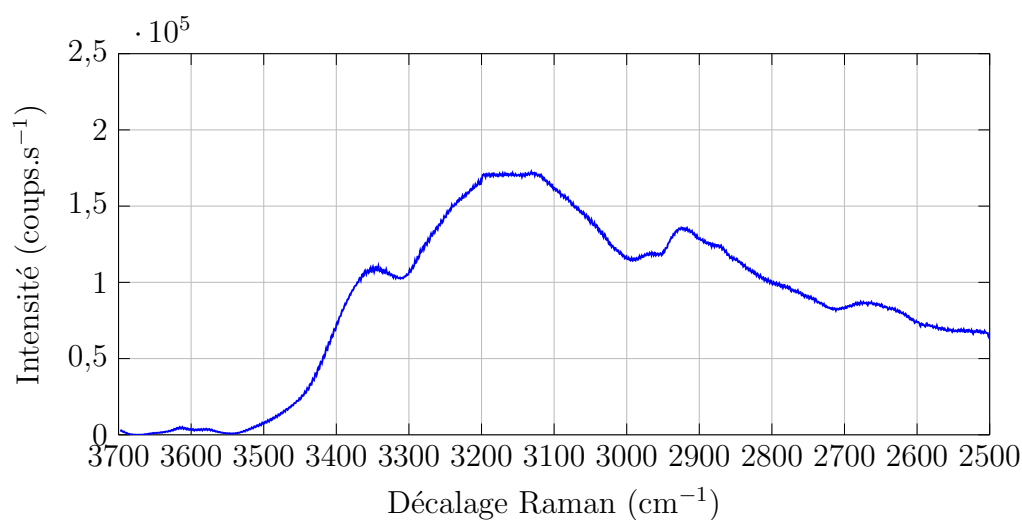


FIGURE 2.17 – Image de cellules (a) C2C12 et (b) HCT observées en lumière blanche par transmission (Olympus, UPlanSApo 60x O.N. = 1,2 Water).

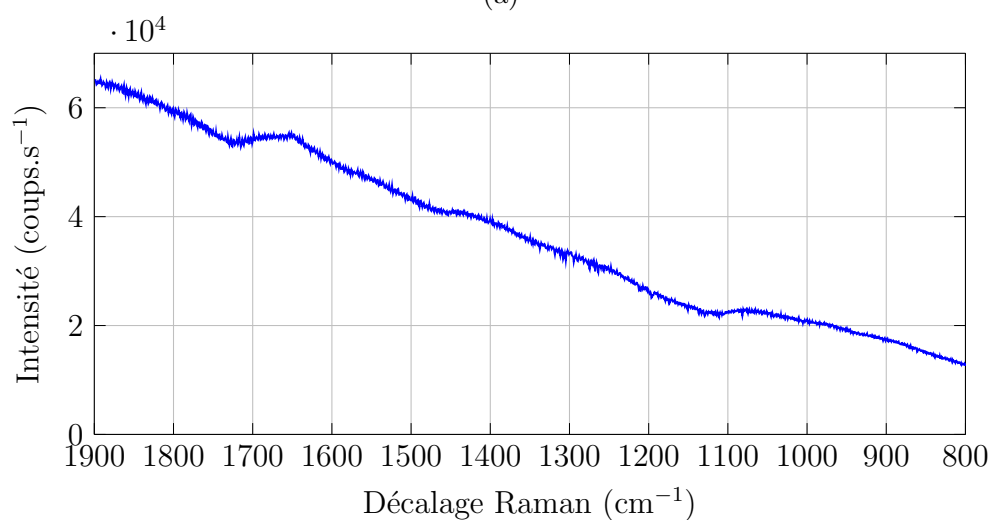
On notera que la zone spectrale comprise entre 2500 cm^{-1} et 1900 cm^{-1} , aussi appelée zone blanche du fait de l'absence d'information spectrale, n'a pas été acquise lors des mesures CARS.

Un premier spectre d'une cellule C2C12 a été mesuré à l'aide de la source PM et la fibre PCF 1.

- temps d'acquisition de la CCD : 50 ms
- accumulations : 20
- τ : 1 ns
- f_r : 20 kHz
- \bar{P}_p : 51,47 mW ; P_p : 2,57 kW
- \bar{P}_S : 16,15 mW ; P_S : 0,81 kW.



(a)

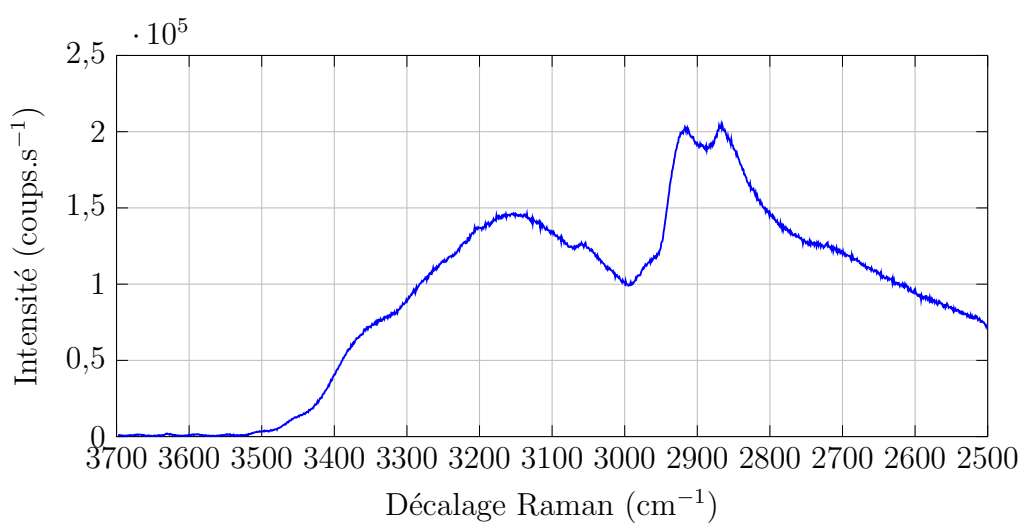


(b)

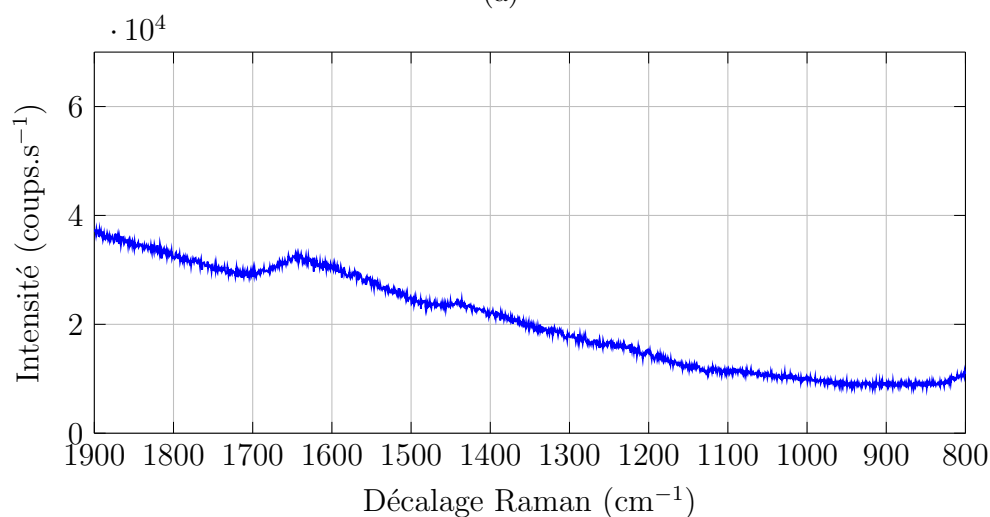
FIGURE 2.18 – Spectres CARS d'une cellule C2C12 (a) dans la zone C-H (b) et la zone d'empreintes digitales obtenus avec la source PM.

Un second spectre d'une cellule HCT a été obtenu grâce à la source MS et la fibre PCF 2.

- temps d'acquisitions de la CCD : 100 ms
- accumulation : 5
- τ : 60 ps
- f_r : 120 kHz
- \bar{P}_p : 22,5 mW ; P_p : 3,125 kW
- \bar{P}_S : 8,52 mW ; P_S : 1,183 kW.



(a)



(b)

FIGURE 2.19 – Spectres CARS d'une cellule HCT (a) dans la zone C-H (b) et la zone d'empreintes digitales obtenus avec la source MS.

À l'aide d'articles référencant les pics Raman de C2C12 [17] et de HCT [18] j'ai pu évaluer les pics CARS et donc les composants auxquels nous pourrions avoir à faire. Ils sont présentés sur les tableaux 2.5 et 2.6.

Pics Raman (cm^{-1})	Vibrations	Composants
2930	ν CH ₃	lipide
2852	ν CH ₂	lipide
1655	δ CH ₂	amide I
1450	δ CH ₂	lipide et protéine

Tableau 2.5 – Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman des cellules de type C2C12.

Pics Raman (cm^{-1})	Vibrations	Composants
1655	δ CH ₂	amide I
1441	δ CH ₂	lipide et protéine

Tableau 2.6 – Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman des cellules de type HCT.

Ces cellules sont observées dans un milieu de culture aqueux. L'expression des signaux issus des cellules est donc fortement masquée par le signal CARS de l'eau dont les vibrations sont indiquées dans le tableau 2.7 [19].

Pics Raman (cm^{-1})	Vibrations
3393	ν OH
3233	ν OH
1641	δ OH
1581	δ OH

Tableau 2.7 – Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman de l'eau.

Nous constatons alors que des réponses CARS venant des cellules peuvent être confondues avec celles de l'eau : respectivement le pic provenant de l'amide I à 1655 cm^{-1} , et le pic de déformation de la vibration OH à 1641 cm^{-1} .

À ce point, le solvant rend difficile, voire impossible la mesure CARS de l'échantillon dont le signal est noyé. Une première approche afin de repousser cette limite fut le recours à des analyses numériques.

2.3 Analyses numériques

Afin d'extraire les informations liées à l'échantillon étudié tout en rejetant celles introduites par le solvant, je me suis inspiré d'une méthode numérique qui était originellement appliquée à la spectroscopie proche-infrarouge : la méthode de correction multiplicative de signal (*Multiplicative Signal Correction* ou MSC). J'ai aussi appliqué une technique spécifique au processus CARS dans le but d'extraire la partie imaginaire de la susceptibilité résonante : la méthode d'entropie maximum, ou MEM.

2.3.1 Correction multiplicative de signal (MSC)

Cette première approche est inspirée des usages de la spectroscopie Raman, eux mêmes issus de la spectroscopie proche-infrarouge qui a depuis longtemps développé des méthodes analytiques permettant de distinguer les contributions spectrales de différents constituants d'un mélange de solutions. Par exemple, la technique MSC sur laquelle je me suis basé permet de distinguer les spectres infrarouges et Raman d'éléments dissouts dans un solvant [20].

La MSC est fondée sur le principe de Beer-Lambert-Bouguer qui exprime le spectre d'absorption d'un échantillon. Il se résume par cette équation :

$$A(\bar{\omega}) = k(\bar{\omega}) \cdot c \cdot b \quad (2.13)$$

avec $A(\bar{\omega})$ le spectre d'absorbance (sans unité), $k(\bar{\omega})$ le coefficient d'absorption molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), c la concentration de l'élément (mol.L^{-1}) et b la longueur du chemin optique (cm). Pour des échantillons présentant de nombreuses contributions, nous devons réécrire cette relation telle que :

$$A(\bar{\omega}) = \sum_j k_j(\bar{\omega}) \cdot c_j \cdot b \quad (2.14)$$

avec j l'indice des éléments présents dans l'échantillon. Il est ici supposé que les chemins optiques des signaux issus des éléments j sont sensiblement égaux, ainsi b peut être mis en facteur. $k_j(\bar{\omega})$ peut alors être reconnu comme le spectre de l'élément j auquel il faudra ajouter les facteurs multiplicatifs de concentration et du chemin optique.

Le spectre d'un échantillon biologique est composé des contributions de plusieurs biomolécules. Nous pouvons considérer que le spectre d'une biomolécule distincte est proche de la moyenne des spectres de tous les composants présents, et nous pouvons alors écrire :

$$k_j(\bar{\omega}) = \bar{x}(\bar{\omega}) + \Delta k_j(\bar{\omega}) \quad (2.15)$$

avec $\bar{x}(\bar{\omega})$ le spectre moyen de tous les composés et $\Delta k_j(\bar{\omega})$ l'écart spécifique du composé j par rapport à la moyenne. En considérant que la somme des concentrations est égale à 1, l'absorbance totale devient :

$$A(\bar{\omega}) = \left(\bar{x}(\bar{\omega}) + \sum_j \Delta k_j(\bar{\omega}) \cdot c_j \right) b. \quad (2.16)$$

La partie droite de l'équation peut s'exprimer sous la forme d'un résidu $e(\bar{\omega})$ tel que :

$$e(\bar{\omega}) = \sum_j \Delta k_j(\bar{\omega}) \cdot c_j \cdot b \quad (2.17)$$

et la relation de Beer-Lambert-Bouguer devient :

$$A(\bar{\omega}) = \bar{x}(\bar{\omega}) \cdot b + e(\bar{\omega}). \quad (2.18)$$

Dans le cas de la spectroscopie Raman on doit tenir compte d'effets multiplicatifs tels que des variations du volume de l'échantillon, de l'intensité du laser ou de la position de l'échantillon par rapport au volume de focalisation [21]. Ces effets vont venir s'ajouter au spectre théorique décrit dans l'équation 2.18 sous la forme d'une ligne de base pouvant être ajustée par un polynôme d'ordre bas.

Dans le cas de la spectroscopie CARS, le caractère dispersif des pics ne nous permet plus de faire correspondre un polynôme à la ligne de base formée par le bruit de fond non résonant. Nous avons donc choisi de ne pas utiliser l'approche polynomiale mais simplement d'user d'une constante a , comme c'est le cas pour la spectroscopie proche-infrarouge. À partir de l'équation 2.18 j'ai pu définir le spectre CARS théorique d'un échantillon $I(\bar{\omega})$ tel que :

$$I(\bar{\omega}) = \bar{x}(\bar{\omega}) \cdot b + e(\bar{\omega}) + a. \quad (2.19)$$

Si l'on considère que $\bar{x}(\bar{\omega})$ est le spectre référence de l'échantillon, le but de la MSC est de retrouver les variables a et b afin de corriger le spectre mesuré $I(\bar{\omega})$. Originellement cela servait à comparer les spectres d'un même type d'échantillon mais mesurés dans des conditions différentes. Ici, je m'en suis servi afin de corriger la contribution du solvant dans le cas d'étude de cellules animales.

J'ai d'abord mesurer le spectre du solvant sans cellule afin d'obtenir notre spectre de référence $\bar{x}(\bar{\omega})$. Puis j'ai mesuré le spectre de l'échantillon dans le solvant : $I(\bar{\omega})$. J'ai alors supposer que le résidu, $e(\bar{\omega})$, était une bonne estimation du spectre de la cellule. Comme cela est prévu par la MSC, pour avoir ce résidu j'ai déduit la valeur de a et b par la méthode des moindres carrés. Si l'on considère les spectre $\bar{x}(\bar{\omega})$, $I(\bar{\omega})$ et $e(\bar{\omega})$ comme des vecteurs colonnes de même longueur, a et b comme des valeurs scalaires, la résolution par

la méthode des moindres carrés donne [22] :

$$[a, b] = \left([\bar{x}(\bar{\omega})\vec{1}]' [\bar{x}(\bar{\omega})\vec{1}] \right)^{-1} [\bar{x}(\bar{\omega})\vec{1}]' I(\bar{\omega}) \quad (2.20)$$

avec $\vec{1}$ un vecteur ligne de même longueur que les vecteurs colonnes et dont chaque composant vaut 1. Une fois les valeurs a et b connues, je peux obtenir une estimation de $e(\bar{\omega})$ telle que :

$$e(\bar{\omega}) = \frac{I(\bar{\omega}) - a}{b} - \bar{x}(\bar{\omega}). \quad (2.21)$$

J'ai appliqué cette méthode aux spectres M-CARS présentée partie 2.2.2.3 et j'ai comparé les pics des résidus à ceux des spectres Raman trouvés dans la littérature. Nous pouvons voir figures 2.20 et 2.21 l'application de la MSC sur les spectres précédents.

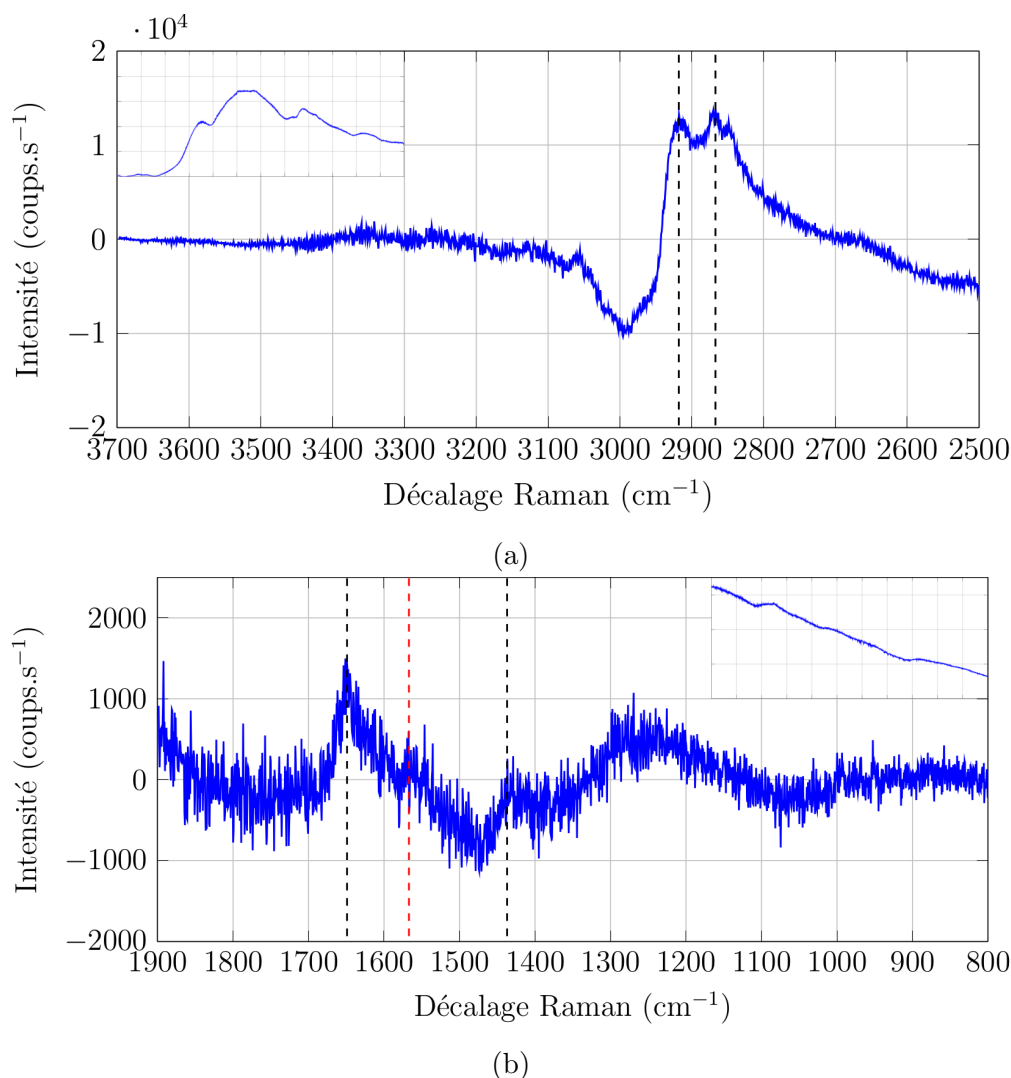


FIGURE 2.20 – Spectres d'une cellule C2C12 (a) dans la zone C-H (b) et la zone d'empreintes digitales obtenus avec la source PM et la méthode MSC. En cartouche : spectres bruts correspondant.

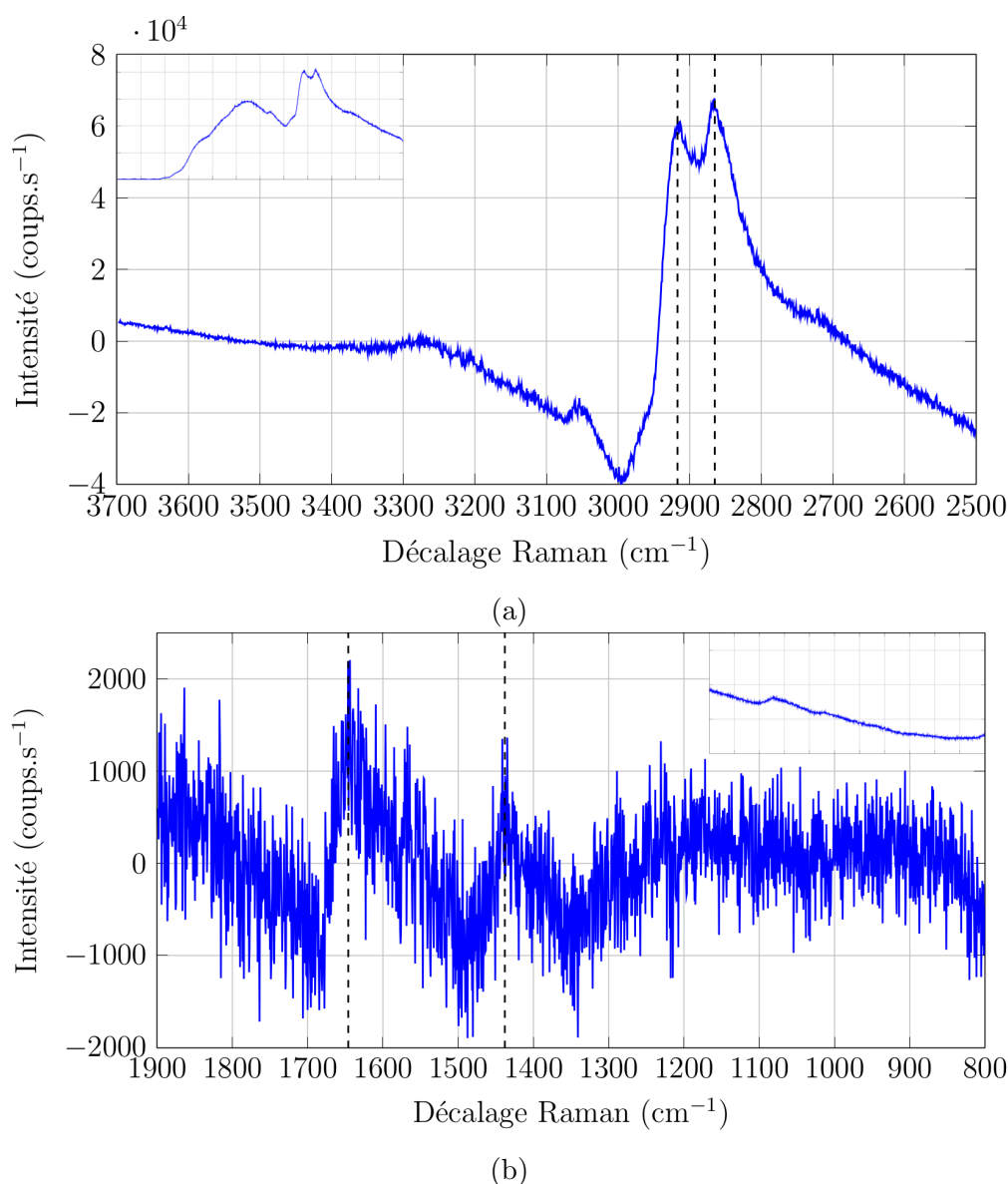


FIGURE 2.21 – Spectres d’une cellule HCT (a) dans la zone C-H (b) et la zone d’empreintes digitales obtenus avec la source MS et méthode MSC. En cartouche : spectres bruts correspondant.

Nous constatons que j’ai effectivement supprimé une grande part de la contribution spectrale venant du solvant dans lequel se trouvaient les cellules. Les spectres des cellules C2C12 présentent quatre pics qui peuvent être assurément attribué aux pics Raman présentés tableau 2.5 : 2918 cm^{-1} , 2867 cm^{-1} , 1649 cm^{-1} et 1437 cm^{-1} et sont donc spécifiques aux lipides, amides I et protéines. Une zone spectrale entre 1300 cm^{-1} et 1100 cm^{-1} pourrait également contenir des informations vibrationnelles mais ma méthode n’a pu les extraire du bruit de mesure. Quant au pic à 1567 cm^{-1} , repéré par la ligne pointillée rouge sur la figure 2.20b, j’estime qu’il représente la vibration $\delta\text{ OH}$ de l’eau et serait donc un reliquat du spectre du solvant.

Pour les cellules HCT, quatre pics se distinguent également : 2917 cm^{-1} , 2865 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} et 1438 cm^{-1} . À l'instar des cellules C2C12 ces pics illustrent la présence de lipides, d'amides I et de protéines.

La source MS a prouvé, ici, qu'elle permettait d'acquérir des spectres CARS dotés d'un signal plus important que la source PM alliée à la fibre PCF 1. De plus, pour ce faire, elle présente une puissance moyenne au niveau de l'échantillon deux fois moins élevée (30 mW contre 60 mW pour la source PM avec la fibre PCF 1, et 120 mW pour la source PM avec la fibre PCF 2) ce qui permet d'éviter l'altération de l'échantillon. Elle montre aussi une efficacité de génération plus importante, comme nous l'avons vu dans le cas de l'échantillon végétale. C'est pourquoi j'ai sélectionné cette source pour l'étude de matériaux biologiques comme cela sera montré chapitre 4. Dans la suite de cette section dédiée à l'analyse numérique, j'ai ainsi décidé de présenter seulement les traitements effectués sur les spectres issus de cette source MS.

La méthode d'analyse MSC permet de discriminer efficacement un signal biologique parmi la contribution prépondérante du solvant. On peut la perfectionner en tenant compte de l'aspect dispersif des pics CARS, avec, par exemple, le recours à un ajustement des moindres carrés pondéré. Néanmoins elle peut déjà s'appliquer telle quelle ou en pré-traitement de la méthode d'analyse suivante.

2.3.2 Méthode d'entropie maximum (MEM)

La technique d'analyse que je vais introduire est entièrement basée sur les travaux de E. M. Vartiainen *et al.* visant à extraire l'information vibrationnelle résonante contenue dans un signal CARS [23]. J'ai pu adapter cette méthode pour mes traitements grâce à une forte collaboration avec l'équipe du professeur Hideaki Kano du département de Physique appliquée de l'université de Tsukuba (Japon) qui a prouvé le potentiel de cette technique dans plusieurs articles [24, 25].

Pour expliquer cette méthode il nous faut revenir à la norme au carré de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre $\chi_{lmno}^{(3)}$ qui intervient de manière proportionnelle dans l'intensité de l'onde anti-Stokes que je mesure dans mes expériences de CARS multiplex. Afin de simplifier les calculs, je vais introduire le signal anti-Stokes $S(\omega_{aS})$, avec $\omega_{aS} = 2\omega - \omega_S$ le décalage Raman du signal anti-Stokes, tel que :

$$S(\omega_{aS}) = \left| \chi_{lmno}^{(3)}(\omega_{aS}) \right|^2. \quad (2.22)$$

La susceptibilité $\chi_{lmno}^{(3)}$ étant imaginaire, je peux la réécrire afin de faire apparaître une

norme $\sqrt{S(\omega_{aS})}$ et une phase $\theta(\omega_{aS})$:

$$\chi_{lmno}^{(3)}(\omega_{aS}) = \sqrt{S(\omega_{aS})} e^{i\theta(\omega_{aS})}. \quad (2.23)$$

Selon l'équation 1.56a :

$$\chi_{NR}^{(3)} + \chi_R^{(3)} = \sqrt{S(\omega_{aS})} e^{i\theta(\omega_{aS})} \quad (2.24)$$

et donc si :

$$\Im \left\{ \chi_{NR}^{(3)} + \chi_R^{(3)} \right\} = \Im \left\{ \sqrt{S(\omega_{aS})} e^{i\theta(\omega_{aS})} \right\} \quad (2.25)$$

comme $\chi_{NR}^{(3)}$ est réelle il vient que :

$$\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\} = \sqrt{S(\omega_{aS})} \sin \theta(\omega_{aS}). \quad (2.26)$$

Ainsi la connaissance de la norme $\sqrt{S(\omega_{aS})}$ et de la phase $\theta(\omega_{aS})$ du signal CARS nous permet de remonter à la valeur de la partie imaginaire de la susceptibilité résonante qui, nous l'avons vu section 1.2.1, porte l'information vibrationnelle et est comparable à la susceptibilité de premier ordre impliquée dans le processus de diffusion Raman spontanée. C'est l'ajustement du signal CARS obtenu par le modèle d'entropie maximum qui va nous permettre de déterminer cette norme et cette phase.

Le modèle d'entropie maximum ajuste au signal CARS la fonction suivante [26] :

$$S^{ME}(\omega_{aS}) = \left| \frac{\beta}{1 + \sum_{k=1}^M a_k e^{i2\pi k \omega_{aS}}} \right|^2 \quad (2.27a)$$

$$= \left| \frac{\beta}{A_M(\omega_{aS})} \right|^2 \quad (2.27b)$$

avec $A_M(\omega_{aS})$ un polynôme de degré M , a_k et $|\beta|$ les coefficients du modèle d'entropie maximum. Pour trouver ces coefficients il faut résoudre l'équation suivante qui fait intervenir une matrice de Toeplitz :

$$\begin{pmatrix} C_0 & C_1^* & \cdots & C_M^* \\ C_1 & C_0 & \cdots & C_{M-1}^* \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ C_M & C_{M-1} & \cdots & C_0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ a_1 \\ \vdots \\ a_M \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} |\beta|^2 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.28)$$

avec les coefficients C_m obtenus par la transformée de Fourier discrète du signal $S(\omega_{aS})$ mesuré telle que :

$$C_m = L^{-1} \sum_{L-1}^{j=0} S(\omega_{aSj}) e^{i2\pi \omega_{aSj}} \quad (2.29)$$

avec L le nombre de décalages Raman ω_{aS_j} choisi pour la discrétisation.

La résolution de l'équation avec matrice de Toeplitz 2.28 étant connue par ailleurs, on peut obtenir les coefficients a_k et $|\beta|$. On réécrit alors $A_M(\omega_{aS})$ afin d'introduire sa phase $\psi(\omega_{aS})$:

$$A_M(\omega_{aS}) = \left| A_M(\omega_{aS}) \right| e^{i\psi(\omega_{aS})}. \quad (2.30)$$

On peut alors développer l'équation 2.24 et remplacer l'expression du signal CARS mesuré $S(\omega_{aS})$ par celle du signal ajustée $S^{ME}(\omega_{aS})$ qui est donnée par l'équation 2.27 :

$$\chi_{NR}^{(3)} + \chi_R^{(3)} = \sqrt{S^{ME}(\omega_{aS})} e^{i\theta(\omega_{aS})} \quad (2.31a)$$

$$= \left| \frac{\beta}{A_M(\omega_{aS})} \right| e^{i\theta(\omega_{aS})} \quad (2.31b)$$

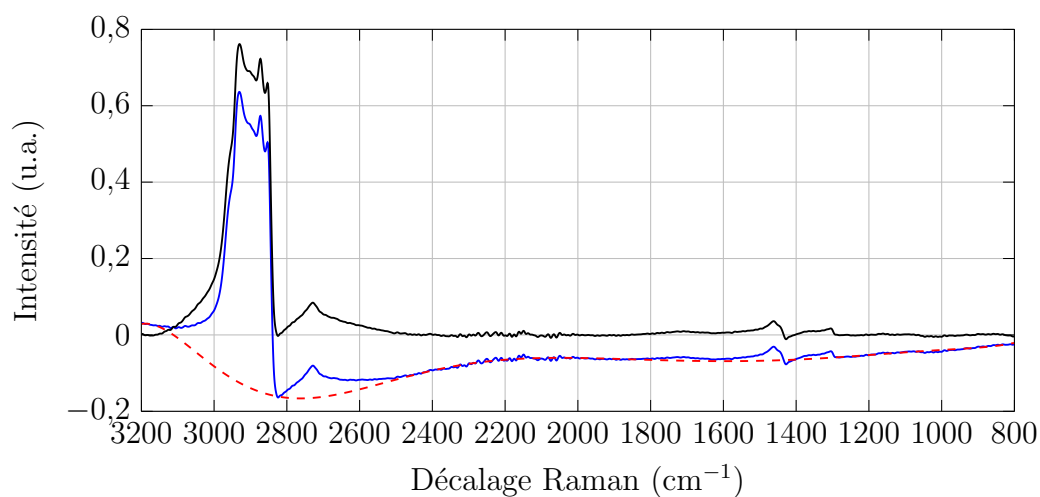
$$= \frac{|\beta|}{A_M^*(\omega_{aS})} e^{i(\theta(\omega_{aS}) - \psi(\omega_{aS}))}. \quad (2.31c)$$

Le but du modèle d'entropie maximum est d'estimer la phase réelle $\theta(\omega_{aS})$ à partir de $\psi(\omega_{aS})$ car on considère que ces termes contiennent les mêmes caractéristiques spectrales, et que la différence de phase $\phi(\omega_{aS}) = \theta(\omega_{aS}) - \psi(\omega_{aS})$, appelée aussi erreur de phase, n'est qu'un signal de fond variant très lentement [27]. Ainsi si la modélisation du signal par la méthode d'entropie permet d'obtenir $\psi(\omega_{aS})$, il correspond à $\theta(\omega_{aS})$ auquel s'ajoute un signal de base que l'on peut aisément corriger. En s'inspirant de l'équation 2.26 on peut ainsi obtenir une estimation de la partie imaginaire de la susceptibilité résonante auquel s'ajoute la ligne de base, soit :

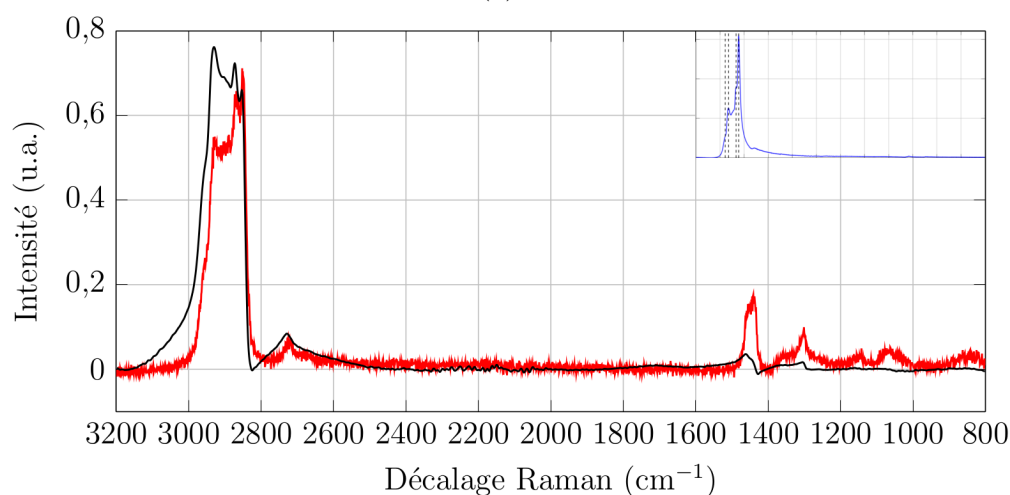
$$\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\} - f(\omega_{aS}) \approx \sqrt{S^{ME}(\omega_{aS})} \sin \psi(\omega_{aS}) \quad (2.32)$$

avec $f(\omega_{aS})$ une fonction d'ajustement de la ligne de base utilisée après traitement par la méthode MEM.

En adaptant le code écrit par E. M. Vartiainen, j'ai traité les spectres M-CARS présentés précédemment avec un script que j'ai développé sous le logiciel MATLAB[®] (Mathworks, Natick, Massachusetts). Le spectre CARS de la paraffine liquide obtenu avec la source MS, traité par MEM et corrigé d'une ligne de base $f(\omega_{aS})$, est présenté figure 2.22a. Une comparaison de ce spectre avec un spectre de diffusion Raman spontanée de la paraffine liquide est présentée figure 2.22b.



(a)



(b)

FIGURE 2.22 – (a) Spectre CARS normalisé de la paraffine liquide obtenu avec la source MS et traité par MEM (courbe bleue), ligne de base estimée $f(\omega_{aS})$ (courbe rouge pointillé) et différence des deux (courbe noire), (b) comparaison entre un spectre CARS traité par MEM (courbe noire) et un spectre Raman normalisé de la paraffine liquide (courbe rouge, temps d'exposition de 5 s pour 2 accumulations). En cartouche : spectre M-CARS brut de la paraffine liquide.

De la même manière, les figures 2.23a et 2.24a montrent les résultats de la méthode MEM sur les spectres des cellules HCT obtenus avec la source MS après traitement par la méthode MSC, dans la zone C-H et la zone d'empreinte digitale respectivement, déjà présentés figures 2.21a et 2.21b. Ils sont respectivement comparés figures 2.23b et 2.24b aux spectres de diffusion Raman spontanée d'une cellule de C2C12 dans la zone C-H et la zone s'empreinte digitale. Les cellules C2C12 présentent des signatures vibrationnelles similaires aux cellules HCT comme nous l'avons vu section 2.2.2.3.

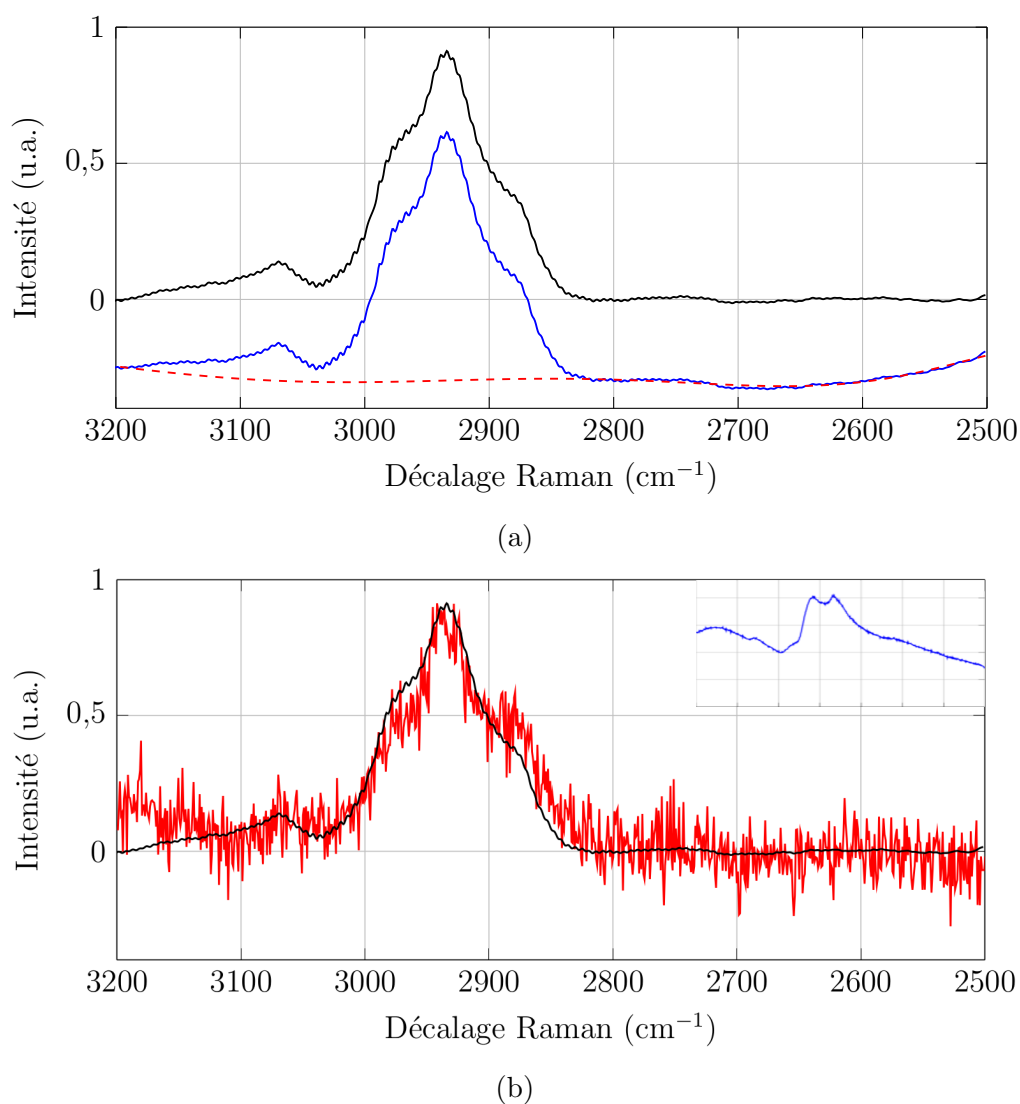


FIGURE 2.23 – (a) Spectre CARS normalisé de la zone C-H d’une cellule HCT obtenu avec la source MS et traité par MSC et MEM (courbe bleue), ligne de base estimée $f(\omega_{aS})$ (courbe rouge pointillé) et différence des deux (courbe noire); (b) comparaison entre un spectre CARS traité par MSC et MEM d’une cellule HCT (courbe noire) et un spectre Raman normalisé d’une cellule C2C12 (courbe rouge, temps d’exposition de 12 s pour 100 accumulations) dans la zone C-H. En cartouche : spectre M-CARS brut correspondant.

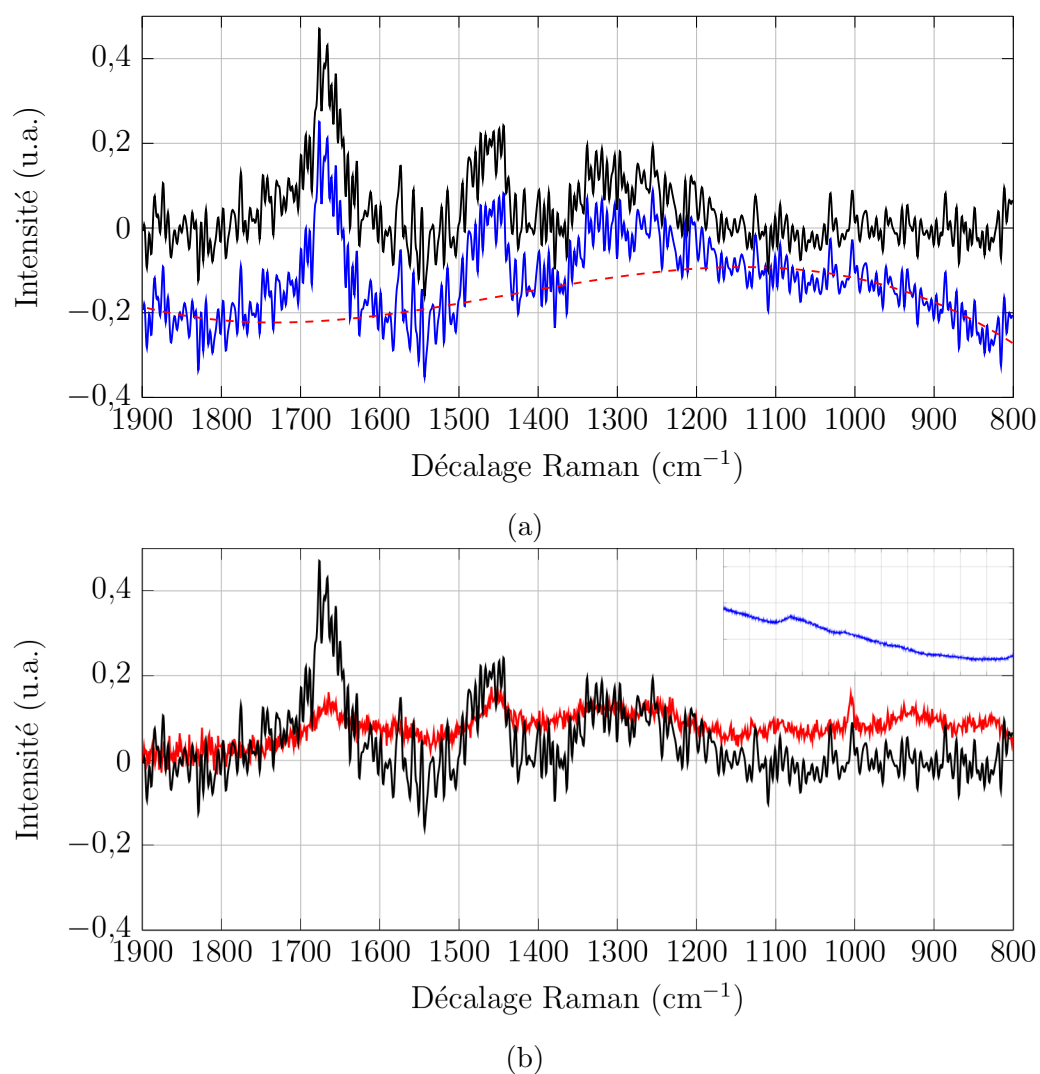


FIGURE 2.24 – (a) Spectre CARS normalisé de la zone d’empreinte digitale d’une cellule HCT obtenu avec la source MS et traité par MSC et MEM (courbe bleue), ligne de base estimée $f(\omega_{aS})$ (courbe rouge pointillé) et différence des deux (courbe noire); (b) comparaison entre un spectre CARS traité par MSC et MEM d’une cellule HCT (courbe noire) et un spectre Raman normalisé d’une cellule C2C12 (courbe rouge, temps d’exposition de 12 s pour 100 accumulations) dans d’empreinte digitale. En cartouche : spectre M-CARS brut correspondant.

Nous constatons que les spectres CARS traités par MEM et soustraits de leur ligne de base que nous avons évaluée sont comparables à leur spectre Raman respectif. Ils ont perdu une grande part de leur caractère dispersif, mais en garde encore quelques traces comme le démontre le spectre corrigé de la paraffine figure 2.22a avec une pente abrupte entre le maxima à 2873 cm^{-1} et le minima à 2824 cm^{-1} ; ou le profil des pics à 1462 cm^{-1} et 1305 cm^{-1} . De plus les pics CARS à 1142 cm^{-1} et 1046 cm^{-1} que nous devinions tableau 2.2 n'ont pas survécu à l'analyse numérique. La sensibilité de la MEM serait donc limitée pour extraire des pics avec des intensités aussi faibles. Dans ces conditions je vais chercher, par la suite, à trouver un moyen pour essayer d'augmenter, par un procédé nouveau, l'efficacité de mon système CARS.

D'autre part, dans le cas du spectre CARS de cellules HCT corrigé par la méthode MSC (figure 2.21b), le recours à la méthode MEM a permis de révéler la présence d'un amas de pics dont le principal se trouve à 1338 cm^{-1} et qui témoigne de la présence d'acides aminées et de protéines [28]. Enfin, nous observons tableau 2.8 que la technique MEM produits des spectres dont les pics significatifs se situent à des décalages Raman proches ou identiques à ceux des spectres Raman. Cela prouve bien la capacité de la méthode d'analyse à estimer la partie imaginaire de la susceptibilité résonante de signaux CARS.

Paraffine liquide		Cellules HCT	
Pics Raman (cm^{-1})	Pics CARS (cm^{-1})	Pics Raman (cm^{-1})	Pics CARS (cm^{-1})
2959	2960-2950	2930	2934
2931	2930	2852	≈ 2880
2890	2873	1655	1676
2850	2853	1441	1444
1460-1440	1462		
1300	1305		
1130	absent		
1060	absent		

Tableau 2.8 – Tableau des attributions vibrationnelles des pics Raman et CARS corrigés par MEM de la paraffine liquide et de cellules HCT.

Conclusion

Ce chapitre a permis de montrer mon aptitude à générer un supercontinuum au travers de différentes PCF à l'aide de deux sources lasers distinctes. Grâce à cela j'ai pu mettre en place diverses mesures de microspectroscopie CARS multiplexée, et cela aussi bien

sur des échantillons de type minéral, végétal ou animal. J'ai pu comparer l'efficacité de génération du processus CARS à partir de deux sources lasers dotées de caractéristiques différentes. J'ai alors pu sélectionner la source qui s'adaptait le mieux à l'étude d'objets biologiques. J'ai décrit comment j'ai pu contourner le problème posé par la contribution anti-Stokes du solvant dans lequel se trouvaient des cellules animales. J'ai puisé dans les outils de la spectroscopie proche-infrarouge et ai développé une technique d'analyse numérique inspirée de la MSC permettant de supprimer la contribution du solvant. J'ai également cherché à éliminer le bruit de fond non résonnant (NRB) qui est l'une des plus grandes limitations à l'utilisation de la microscopie CARS multiplex. Pour cela j'ai repris la méthode MEM permettant d'extraire la part imaginaire de la susceptibilité résonnante et donc l'information vibrationnelle contenue dans le spectre M-CARS brut d'un échantillon minéral et le spectre M-CARS préalablement corrigé par MSC pour un échantillon animal.

Les résultats que j'ai présentés dans ce chapitre témoignent de ma capacité à mener une étude de microspectroscopie M-CARS. Ce système a été implanté sur un microscope commercial (Nikon, microscope inversé, Eclipse Ti-U) qui permettait de réaliser une étude spectroscopique en Raman spontané. Ce double système alliant une mesure de diffusions Raman incohérente et cohérente est maintenant un outil qui fonctionne en routine dans le laboratoire optique d'Xlim. Néanmoins, le critère déterminant l'état-de-l'art actuel est le temps d'acquisition du spectre anti-Stokes d'une cellule biologique. Les dispositifs M-CARS développés au cours de ma thèse et que j'ai décrits dans ce chapitre ne nous permettent pas d'atteindre l'ordre de grandeur des durées minimales de l'état-de-l'art. Pourtant nous sommes convaincus que nos procédés expérimentaux présentent des avantages spécifiques que nous pouvons mettre à profit au sein de nouvelles méthodes de spectroscopie M-CARS. Ce sont ces méthodes inédites que je vais exposer dans les chapitres suivants.

Bibliographie

- [1] M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H.-O. Hamaguchi, “Ultrabroadband multiplex CARS microspectroscopy and imaging using a subnanosecond supercontinuum light source in the deep near infrared.” *Optics Letters*, vol. 33, no. 9, pp. 923–925, 2008.
- [2] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich, “Generation of optical harmonics,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 7, pp. 118–119, Aug 1961.
- [3] R. R. Alfano and S. L. Shapiro, “Emission in the Region 4000 to 7000 Å Via Four-Photon Coupling in Glass,” *Physical Review Letters*, vol. 24, no. 11, pp. 584–587, mar 1970.
- [4] ———, “Observation of Self-Phase Modulation and Small-Scale Filaments in Crystals and Glasses,” *Physical Review Letters*, vol. 24, no. 11, pp. 592–594, mar 1970.
- [5] J. I. Gersten, R. R. Alfano, and M. Belic, “Combined stimulated Raman scattering and continuum self-phase modulations,” *Physical Review A*, vol. 21, no. 4, pp. 1222–1224, 1980.
- [6] J. C. Knight, T. A. Birks, P. St. J. Russell, and D. M. Atkin, “All-silica single-mode optical fiber with photonic crystal cladding,” *Optics Letters*, vol. 21, no. 19, p. 1547, oct 1996.
- [7] S. P. Singh and N. Singh, “Nonlinear Effects in Optical Fibers: Origin, Management and Applications,” *Progress In Electromagnetics Research, PIER*, vol. 73, pp. 249–275, 2007. [Online]. Available: <http://www.jpier.org/PIER/pier73/13.07040201.Singh.S.pdf>
- [8] G. Agrawal, *Nonlinear Fiber Optics*, ser. Optics and Photonics. Elsevier Science, 2001, pp. 136–137.
- [9] V. Zakharov and L. Ostrovsky, “Modulation instability: The beginning,” *Physica D: Nonlinear Phenomena*, vol. 238, no. 5, pp. 540 – 548, 2009.
- [10] F. M. Mitschke and L. F. Mollenauer, “Discovery of the soliton self-frequency shift,” *Opt. Lett.*, vol. 11, no. 10, pp. 659–661, Oct 1986.
- [11] H. Kano, “Live Cell Imaging by Multiplex CARS Microspectroscopy,” in *Coherent Raman Scattering Microscopy*, ser. Series in Cellular and Clinical Imaging, J.-X. Cheng and X. S. Xie, Eds. CRC Press, 2012, ch. 22, p. 481.
- [12] M. Zheng and W. Du, “Phase behavior, conformations, thermodynamic properties, and molecular motion of multicomponent paraffin waxes: A Raman spectroscopy study,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 40, no. 2, pp. 219–224, mar 2006.

- [13] A. Déjardin, F. Laurans, D. Arnaud, C. Breton, G. Pilate, and J.-C. Leplé, “Wood formation in Angiosperms,” *Comptes Rendus Biologies*, vol. 333, no. 4, pp. 325–334, apr 2010.
- [14] I. Plazanet, E. Capitaine, D. Moine, E. Poli, S. Lhernould, and G. Costa, “Le bois de douglas en images...” in *4ème journées scientifiques du GDR 3544 Sciences du Bois*, Centre des Cézeaux, Clermont-Ferrand, France, nov 04-06 2015. [Online]. Available: https://www6.inra.fr/gdr-sciences-du-bois/content/download/5194/49206/version/1/file/GDR-bois-2015_Resumes_version02Nov.pdf
- [15] N. Gierlinger, “Chemical Imaging of Poplar Wood Cell Walls by Confocal Raman Microscopy,” *Plant Physiology*, vol. 140, no. 4, pp. 1246–1254, apr 2006. [Online]. Available: <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/140/4/1246.full.pdf>
- [16] C. Plomion, G. Leprovost, and A. Stokes, “Wood Formation in Trees Wood Formation in Trees,” *Plant physiology*, vol. 127, no. 4, pp. 1513–1523, dec 2001. [Online]. Available: <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/127/4/1513.full.pdf>
- [17] T. Ichimura, L.-d. Chiu, K. Fujita, H. Machiyama, S. Kawata, T. M. Watanabe, and H. Fujita, “Visualizing the appearance and disappearance of the attractor of differentiation using Raman spectral imaging,” *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, p. 11358, sep 2015. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/srep11358.pdf>
- [18] V. Ranc, J. Srovnal, L. Kvítek, and M. Hajduch, “Discrimination of circulating tumor cells of breast cancer and colorectal cancer from normal human mononuclear cells using Raman spectroscopy,” *The Analyst*, vol. 138, no. 20, p. 5983, 2013.
- [19] D. M. Carey and G. M. Korenowski, “Measurement of the Raman spectrum of liquid water,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 108, no. 7, pp. 2669–2675, 1998.
- [20] H. Martens, S. Jensen, and P. Geladi, “Multivariate linearity transformation for near-infrared reflectance spectrometry,” in *Proceedings of the Nordic symposium on applied statistics*. Stokkand Forlag Publishers Stavanger, Norway, 1983, pp. 205–234.
- [21] N. K. Afseth and A. Kohler, “Extended multiplicative signal correction in vibrational spectroscopy, a tutorial,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 117, pp. 92–99, aug 2012.
- [22] H. Martens and E. Stark, “Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: New preprocessing methods for near infrared spectroscopy,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 9, no. 8, pp. 625–635, 1991.
- [23] E. M. Vartiainen, H. A. Rinia, M. Müller, and M. Bonn, “Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra,” *Optics Express*, vol. 14, no. 8, p. 3622, 2006.

- [24] K. Bito, M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H.-o. Hamaguchi, “Three-pulse multiplex coherent anti-Stokes/Stokes Raman scattering (CARS/CSRS) microspectroscopy using a white-light laser source,” *Chemical Physics*, vol. 419, pp. 156–162, jun 2013.
- [25] H. Segawa, M. Okuno, P. Leproux, V. Couderc, T. Ozawa, and H. Kano, “Multimodal Imaging of Living Cells with Multiplex Coherent Anti-stokes Raman Scattering (CARS), Third-order Sum Frequency Generation (TSFG) and Two-photon Excitation Fluorescence (TPEF) Using a Nanosecond White-light Laser Source,” *Analytical Sciences*, vol. 31, no. 4, pp. 299–305, 2015. [Online]. Available: https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/31/4/31_299/_pdf
- [26] E. M. Vartiainen, “Phase retrieval approach for coherent anti-Stokes Raman scattering spectrum analysis,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 9, no. 8, p. 1209, aug 1992.
- [27] E. M. Vartiainen, K.-E. Peiponen, and T. Asakura, “Phase Retrieval in Optical Spectroscopy: Resolving Optical Constants from Power Spectra,” *Applied Spectroscopy*, vol. 50, no. 10, pp. 1283–1289, oct 1996.
- [28] P. Heraud, K. M. Marzec, Q. Zhang, W. S. Yuen, J. Carroll, and B. R. Wood, “Label-free in vivo Raman microspectroscopic imaging of the macromolecular architecture of oocytes,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 8945, dec 2017. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5566217/pdf/41598_2017_Article_8973.pdf

Chapitre 3 :

Électro-CARS

La mise en place d'un système de microspectroscopie M-CARS a marqué la première étape de ma thèse. Ainsi motivé par les résultats conventionnels qui en résultaient, j'ai tenté de relever les défis auxquels se confronte la communauté des spectroscopistes travaillant dans le domaine du CARS. Le principal est évidemment le NRB, car même si la méthode MEM, introduite dans le chapitre précédent, permet d'extraire l'information vibrationnelle du signal, elle reste un outil de post-traitement qui requiert du temps (environ une seconde par spectre). Il m'a donc fallu, en utilisant les avantages du dispositif CARS actuel, développer un procédé innovant visant la réduction, voir la suppression du NRB. Toutes les techniques que j'ai décrites dans la section 1.3 utilisent des propriétés permettant de discriminer la part résonnante de la part non résonante du signal CARS. De manière similaire, j'ai, dans mon cas, joué sur la différence de comportement entre l'information vibrationnelle et le NRB lors de l'application d'un champ électrique continu (continu par rapport à la durée des impulsions lasers). J'ai dénommé ce système l'électro-CARS et il sera au cœur de ce chapitre éponyme. J'y décrirai les effets connus d'un champ électrique lors d'une mesure CARS et j'emmétrai des hypothèses sur d'autres processus que je pense provoquer. J'exposerai ensuite mon dispositif expérimental et les résultats obtenus avec l'échantillon choisi comme référence : une solution de n-alcane. Je confronterai alors les hypothèses que j'ai proposées plus tôt aux données expérimentales recueillies. Finalement je décrirai une méthode d'analyse numérique inspirée de la spectroscopie Raman permettant de différencier l'information vibrationnel du NRB. Elle sera appliquée à des spectres CARS mesurés pour différentes amplitudes du champ électriques.

3.1 Effets du champ électrique sur le CARS

L'usage conjoint d'un champ électrique continu et de la spectroscopie CARS a déjà été employé. Il est au centre de deux principaux domaines de recherche : la caractérisation de champs électriques produits lors de la création de plasmas à pression atmosphérique et la mesure du degré d'orientation de cristaux liquides. Je me baserai sur les conclusions de ces études afin de déterminer les effets auxquels on doit s'attendre lors de l'application d'un champ électrique continu sur une solution de n-alcane, des molécules non polaires, et j'extrapolerai les conséquences respectives sur l'information vibrationnelle et sur le bruit de fond non résonant.

3.1.1 Caractérisation de champs électriques par effet CARS

La connaissance des propriétés d'un plasma à pression atmosphérique a un grand intérêt pour des applications telles que le contrôle de la combustion dans un moteur ou la

plasmathérapie. L'emploi de la spectroscopie CARS a permis d'apporter des réponses aux interrogations que l'on se posait sur les différentes étapes de la création d'un plasma [1,2], la valeur de l'amplitude des champ électriques impliqués [3] ainsi que leur direction [4].

Il faut bien noter que les études qui ont été menées ne se basent pas uniquement sur les réponses anti-Stokes des gaz dans lesquels vont se former les plasmas. En effet, le champ électrique continu E_{DC} , avec une fréquence angulaire proche de zéro, peut agir comme la troisième onde, la sonde, lors d'un mélange à quatre ondes comme le montre la figure 3.1.

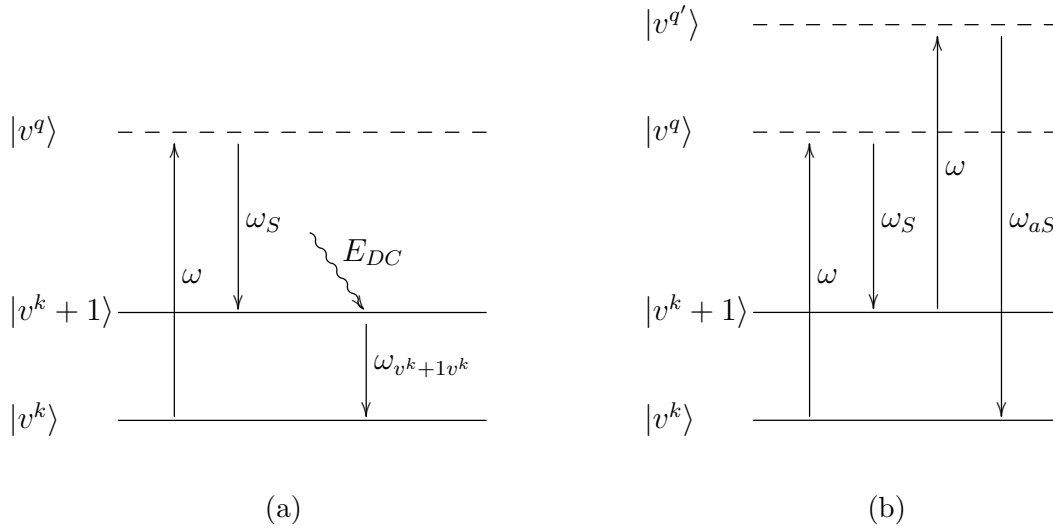


FIGURE 3.1 – Diagrammes énergétiques de deux processus de diffusions cohérentes et résonnantes (CRS) : (a) diffusion à la fréquence vibrationnelle $\omega_{v^{k+1}v^k}$ et (b) diffusion anti-Stokes ω_{aS} ou CARS.

De la même manière que pour le CARS, nous avons affaire à un processus de diffusion Raman cohérent (CRS) qui va ici produire des ondes infrarouges à la fréquence $\omega_{v^{k+1}v^k}$ correspondant exactement à celle du mode de vibration du gaz étudié.

La détection de ces ondes, et le rapport de leur intensité avec celle de l'onde anti-Stokes permet de définir la valeur de l'amplitude du champ électrique selon cette relation [5] :

$$E_{DC}^2 = C \frac{I(\omega_p)S(\omega_{v^{k+1}v^k})}{S(\omega_{aS})} \quad (3.1)$$

avec C une constante liée à la configuration du dispositif expérimental, $I(\omega_p)$ l'intensité de l'onde pompe, et $S(\omega_{v^{k+1}v^k})$ et $S(\omega_{aS})$ les intensités respectives des signaux à la fréquence de la vibration et à la fréquence anti-Stokes correspondante. C s'obtient en calibrant la mesure par une valeur de champ électrique préalablement connue.

Lorsque la direction des vecteurs polarisation de l'onde pompe et Stokes ont la même orientation, et que la direction du champ électrique est inconnue nous pouvons retrouver

cette dernière en mesurant la direction de polarisation de l'onde à la fréquence $\omega_{v^k+1v^k}$. En plaçant un polariseur sur son chemin, on mesure les valeurs de l'intensité de son signal lorsque la direction du polariseur est colinéaire puis orthogonale aux vecteurs polarisation de la pompe et du Stokes, soit respectivement une mesure de $S^{\parallel}(\omega_{v^k+1v^k})$ et $S^{\perp}(\omega_{v^k+1v^k})$. Ces signaux sont liés à la valeur des projections de l'amplitude du champ électrique le long des directions colinéaire et orthogonale des vecteurs polarisation de la pompe et du Stokes, respectivement E_{DC}^{\parallel} et E_{DC}^{\perp} , par ces équations [6] :

$$\sqrt{S^{\parallel}(\omega_{v^k+1v^k})} = C^{\parallel} E_{DC}^{\parallel} I(\omega_p) I(\omega_S) \quad (3.2a)$$

$$\sqrt{S^{\perp}(\omega_{v^k+1v^k})} = C^{\perp} E_{DC}^{\perp} I(\omega_p) I(\omega_S) \quad (3.2b)$$

avec C_{\parallel} et C_{\perp} deux nouvelles constantes liées à la configuration du dispositif lorsque le polariseur est respectivement orienté colinéairement et orthogonalement aux vecteurs polarisation de la pompe et du Stokes, et $I(\omega_S)$ l'intensité de l'onde Stokes. En effectuant une mesure de calibration avec un champ dont la direction est connue on peut estimer les constantes et reconstruire le vecteur champ électrique \vec{E}_{DC} tel que :

$$\vec{E}_{DC} = E_{DC}^{\parallel} \vec{e}_{\parallel} + E_{DC}^{\perp} \vec{e}_{\perp} \quad (3.3)$$

avec \vec{e}_{\parallel} et \vec{e}_{\perp} les vecteurs unitaires orientés selon les directions collinéaire et perpendiculaire aux vecteurs polarisation pompe et Stokes.

Les propriétés d'un champ électrique peuvent donc se retrouver grâce à l'utilisation du CARS. Néanmoins j'ai exposé ici le cas de plasmas produits dans un gaz à pression atmosphérique, or si l'on s'intéresse à des objets biologiques et que l'on veut acquérir des informations de manière non destructive, la création d'un plasma est à éviter. C'est pourquoi je me suis également intéressé à d'autres méthodes pouvant déterminer la direction d'un champ électrique continue, mais cette fois de manière indirecte.

3.1.2 Application aux cristaux liquides

L'oxymore que constitue le terme cristal liquide provient des propriétés ambiguës de ce type de matériel. Contrairement aux liquides isotropes qui ne possèdent qu'une phase ordonnée à courte portée, les cristaux liquides (CL) montre une orientation à longue distance. Néanmoins ils conservent dans au moins une direction de l'espace un état désordonné. Nous parlerons ici des CL thermotropes dont l'ordre va dépendre de la température. Les molécules de CL les plus communes dans cette famille sont les molécules en forme de bâtonnet. La direction d'orientation moyenne de ces molécules est appelée le directeur, noté \vec{n} . Du fait de leur degré d'orientation, les molécules de CL

possèdent des propriétés électriques anisotropes. Ce sont donc des molécules polaires qui sous l'action d'un champ électrique peuvent s'orienter. Un changement de phase apparaît alors : c'est l'effet Frederiks [7]. Dans le cas des technologie d'affichage, le suivi dans les trois dimensions de cet effet très employé s'avère crucial.

L'effet, ou transition Frederiks a pu être observée à l'aide de la spectroscopie CARS dans le mélange de cristaux liquides E7 afin de déterminer la direction de leur réorientation sous l'action d'un champ électrique sinusoïdal de fréquence 1 kHz [8]. Les molécules du mélange E7 ont la particularité de contenir une liaison terminale C-N. Leur anisotropie électrique est due à la plus forte électronégativité de l'atome d'azote par rapport au carbone [9]. Le moment dipolaire de la molécule est donc porté par la liaison C-N qui est susceptible de s'aligner dans un champ électrique et donc de provoquer la transition Frederiks. Comme le montre la figure 3.2, cette liaison est orientée selon le directeur des molécules de E7.

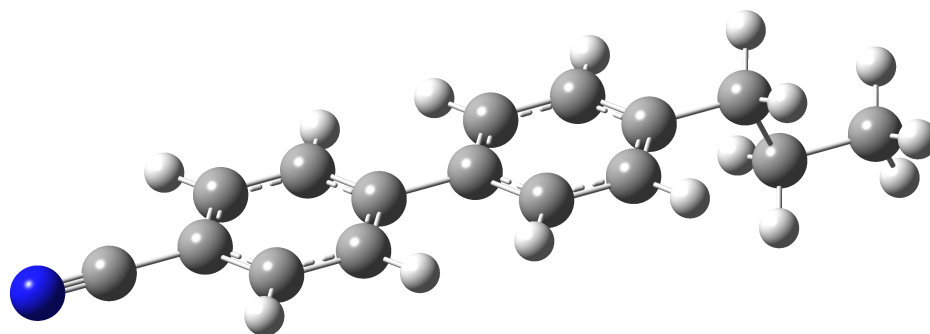


FIGURE 3.2 – Schéma d'une molécule du mélange de cristaux liquides E7. L'atome d'azote est illustré en bleu, les atomes de carbone en gris et les atomes d'hydrogène en blanc.

Une méthode sensible à l'orientation des liaisons peut donc permettre de déterminer la direction du champ électrique. L'utilisation de la méthode CARS fut donc logique. Comme nous l'avons vu équation 1.85b et 1.86b, l'intensité du signal CARS d'une liaison va dépendre de l'angle θ entre les vecteurs polarisation des faisceaux et celle de la liaison, telle que :

$$S(\omega_{aS}) \propto I^2(\omega_p)I(\omega_S) \sin^6 \theta. \quad (3.4)$$

En alignant les vecteurs polarisation des faisceaux incidents et en plaçant les CL entre deux électrodes auxquelles on applique une différence de potentiel afin de générer un champ électrique, on peut, en fonction de l'intensité de signal $S(\omega_{aS})$ du mode de vibration de la liaison C-N, déterminer la direction de cette liaison, donc de \vec{n} et du champ électrique.

Néanmoins, lors de telles mesures il faut prendre garde à ce que l'effet Frederiks ne soit pas généré, non pas par un champ électrique E_{DC} mais par les champs des faisceaux lasers impliqués, et notamment celui du faisceau pompe qui est généralement le plus puissant dans ce genre d'expérience [10]. Des mesures de calibration doivent donc être

effectuées afin de s'assurer de la faible incidence, voir l'absence d'effet des faisceaux sur la réorientation des CL.

Dans les deux cas de caractérisation que je viens de présenter, les études CARS s'effectuent sur des éléments hautement sensibles au champ électrique, les plasmas et les cristaux liquides. Cela en fait de parfaits outils de mesure. Mais peut-on inverser le problème en se servant de champs électriques pour caractériser des liaisons vibrationnelles? De plus, est ce qu'on peut étendre cette application à des molécules qui ne sont pas aussi sensibles aux champs électriques? C'est ce que j'ai tenté de faire en appliquant un champ électrique de forte amplitude à des molécules non polaires, c'est à dire, à des molécules qui ne devraient pas être susceptible de s'orienter lors de l'application d'un champ électrique.

En m'inspirant des constatations faites par les études de caractérisation de champs électriques, j'ai développé une hypothèse qui décrit les effets qu'un champ électrique continu pourrait avoir sur le signal CARS d'une vibration. Elle prévoit que le champ électrique peut orienter de manière plus ou moins faible une liaison moléculaire et/ou déplacer les charges électroniques de cette liaison, modifiant alors son moment dipolaire. Cela causerait un changement de la susceptibilité électronique de troisième ordre résonante mais également non résonante. Si l'on exprime la polarisation de troisième ordre engendrée par l'interaction entre un faisceau pompe et un faisceau Stokes avec des vecteurs polarisation orientés selon l'axe j , et une liaison moléculaire orientée selon l'axe k , d'après l'équation 1.89 on obtient :

$$P_k^{(3)}(\omega_{aS}) = 3\epsilon_0 (\chi_{kjjj}^{NR} + \chi_{kjjj}^R) E_j^2(\omega_p) E_j^*(\omega_S) \quad (3.5)$$

D'après l'équation 1.57b le signal anti-Stokes correspondant est alors proportionnel à la norme au carré de la susceptibilité de troisième ordre, soit :

$$S(\omega_{aS}) \propto \chi_{kjjj}^{NR^2} + 2\chi_{kjjj}^{NR} \Re \{ \chi_{kjjj}^R \} + B \cdot \Im \{ \chi_{kjjj}^R \} \quad (3.6)$$

avec B une constante dépendant de l'amplitude et de la largeur de la résonance de la vibration.

Sous l'action d'un champ électrique, si l'on suppose que la direction de la liaison change ou que la répartition des charges électroniques impliquées est modifiée, il en résulte une variation des susceptibilités électriques résonante et non résonante, soit une variation du signal anti-Stokes tel que :

$$S'(\omega_{aS}) \propto \chi_{k'jjj}^{NR^2} + 2\chi_{k'jjj}^{NR} \Re \{ \chi_{k'jjj}^R \} + B \cdot \Im \{ \chi_{k'jjj}^R \}. \quad (3.7)$$

Une étude de la variation de $S'(\omega_{aS})$ en fonction de l'amplitude du champ électrique

appliqué permettrait de distinguer les contributions résonante et non résonante du fait de leur ratios de dépolarisation différents, principe sur lequel est basée la méthode P-CARS décrite 1.3.2. Dans le cas de mon expérience la discrimination de ces parts du signal ne se ferait pas directement mais suite à plusieurs prises de mesure du signal anti-Stokes pour différentes amplitudes de champ électrique. Contrairement au P-CARS, le post-traitement des données et la mise en place d'électrodes permettant l'application d'un champ peuvent paraître plus contraignant, néanmoins on se dispense de l'utilisation d'un polariseur et de la recherche de la direction du vecteur polarisation du champ anti-Stokes dépourvu de part non résonante qui est, la plupart du temps trop atténué pour pouvoir être détecté. C'est cette recherche de la discrimination entre contributions résonante et non résonante par l'étude de la variation du signal anti-Stokes en fonction de l'amplitude du champ électrique que je vais présenter.

Je ne pouvais pas débiter la description de cette étude sans mentionner les travaux de Farid El Bassri. Il a appartenu au même axe de recherche que moi au laboratoire Xlim et m'a précédé dans l'étude des variations de signaux CARS d'une solution de n-alcane soumise à un champ électrique continu [11]. Au cours de sa thèse il a aboutit à des conclusions partielles qui n'ont malheureusement pu être publiées. Néanmoins je me suis servi de ces dernières afin d'étoffer la discussion autour de mes résultats.

3.2 Expérience électro-CARS

Dans le but de confirmer mon hypothèse j'ai sélectionné un échantillon répondant aux critères qu'imposait une telle mesure. Afin d'appliquer cette méthode au plus grand nombre de cas, des composants polaires à non polaires, il me fallait choisir une molécule qui ne s'orientait pas ou très peu dans un champ électrique. De plus, elle devait posséder des liaisons moléculaires similaires à celles de cellules biologiques pour que ma méthode soit transposable à la microspectroscopie. C'est la solution de n-alcane présentée 2.2.2.1 que j'ai finalement sélectionnée. Les molécules de n-alcane présentent un très faible moment dipolaire et cela quelque soit leur nombre d'atomes de carbone : $D \approx 0.21 \times 10^{-30} \text{ C.m}^{-1}$ [12]. Cela m'a permis d'utiliser différentes amplitudes de champ électrique, dont certaines avec de très hautes valeurs.

3.2.1 Dispositif expérimental

Pour cette étude j'ai utilisé le dispositif M-CARS *forward* de l'équipe de Hideaki Kano au département de Physique appliquée de l'université de Tsukuba (Japon). Il est basé sur le même principe que le dispositif M-CARS présenté section 2.2.1 mais utilise des éléments différents comme on peut le constater figure 3.3.

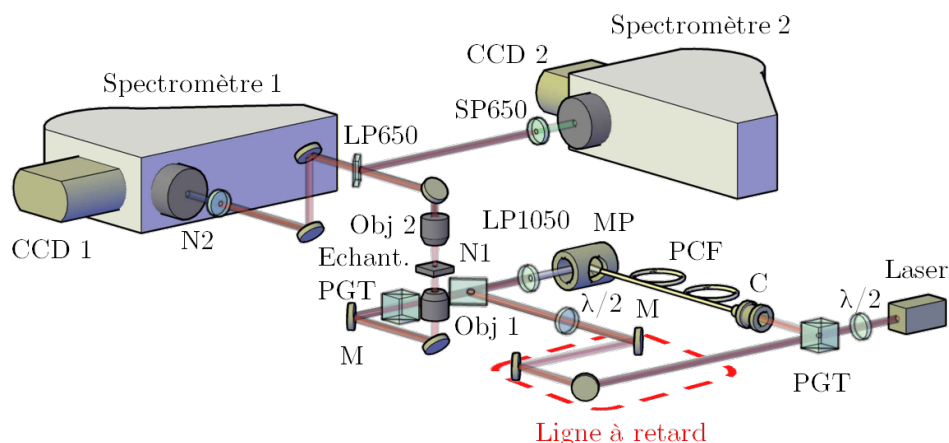


FIGURE 3.3 – Schéma du dispositif expérimental de mesure Électro-CARS *forward*. Légende : C, collimateur ; Echant., échantillon ; LP650, miroir dichroïque passe-haut 650 nm ; LP1050, filtre passe-haut 1050 nm, M, miroir ; N1, miroir dichroïque *notch* ; N2, filtre *notch* ; Obj 1, objectif Nikon x60 ; Obj 2, objectif Nikon x60 ; PGT, polariseur Glan-Taylor ; SP650, filtre passe-bas 650 nm ; $\lambda/2$, lame demi-onde.

La source utilisée est un microlaser Nd:YAG (Hamamatsu L11435, 1064 nm, 400 ps, 25 kHz) dont l'onde est polarisée linéairement et est dotée d'une puissance moyenne de 500 mW. La moitié de cette puissance a été prélevée à l'aide d'une lame demi-onde et d'un polariseur et injectée dans une PCF (fibre PCF 1) pour générer un supercontinuum. Le spectromètre mesurant le signal anti-Stokes était un Lucir Z3208i-HK alliée à une caméra CCD Andor iVac 316. Les objectifs de focalisation et de collimation employés étaient respectivement un Nikon x60, à immersion dans l'eau, O.N. = 1,2 ; et Nikon x60, O.N. = 0,60.

À l'aide d'une seconde lame demi-onde j'ai pu contrôler l'orientation du vecteur polarisation du faisceau pompe. Le vecteur de polarisation de l'onde Stokes étant elliptique en sortie de la PCF, l'utilisation d'un polariseur permet de le rendre colinéaire à celui du faisceau pompe ce qui simplifie l'étude de la variation du signal CARS. J'ai également ajouté une deuxième voie de détection permettant la mesure du signal de second harmonique du faisceau pompe à 1064 nm. Pour cela j'ai utilisé un miroir dichroïque passe-haut avec une longueur d'onde de coupure à 650 nm (Thorlabs, DMLP650) qui a été placé sur le chemin du faisceau collimaté par l'objectif de collection. Le signal réfléchi passait au travers d'un filtre passe-bas à 650 nm (Thorlabs, FES0650) afin d'enlever le résidu de pompe à 1064 nm pouvant créer des artefacts de mesure lors de l'acquisition par le spectromètre (Princeton Instruments LS785) et la caméra CCD (Princeton Instruments PIXIS 100 BRDD) en aval. Lors de mesures j'utilisais un temps d'exposition de 50 ms et 300 accumulations, soit un temps effective de 1,5 s.

La résolution de la mesure, donnée par la largeur du volume de focalisation des

impulsions lasers, était d'approximativement de 700 nm. Au niveau de l'échantillon la puissance moyenne des impulsions pompe et Stokes variait en fonction de l'orientation de leur vecteur polarisation. Cela est dû aux différents coefficients de réflexion des optiques en amont de l'échantillon. Lorsque les vecteurs polarisation étaient selon l'axe x les puissances moyennes pompe et Stokes étaient de 22 mW et 8 mW respectivement. Lorsqu'ils étaient selon l'axe y les puissances moyennes étaient de 37 mW et de 5 mW respectivement.

Pour générer le champ électrique au niveau de l'échantillon, j'ai relié un générateur de tension pouvant aller de 0 à 3000 V à deux électrodes constituées de bandes de ruban adhésif argenté taillées en forme de flèche afin d'augmenter l'amplitude du champ électrique par effet de pointe. Les électrodes étaient alors amenées entre une lame porte-objet et une lamelle couvre-objet qui emprisonnaient la solution de n-alcane. En prenant une image en lumière blanche des électrodes, montrée figure 3.4a, j'ai établi précisément leurs dimensions et j'ai pu simuler à l'aide du logiciel COMSOL Multiphysics (version 4.5) la répartition du champ électrique ainsi que son amplitude pour une tension de 2400 V, c'est cette simulation de cartographie du champ qui est présentée figure 3.4b.

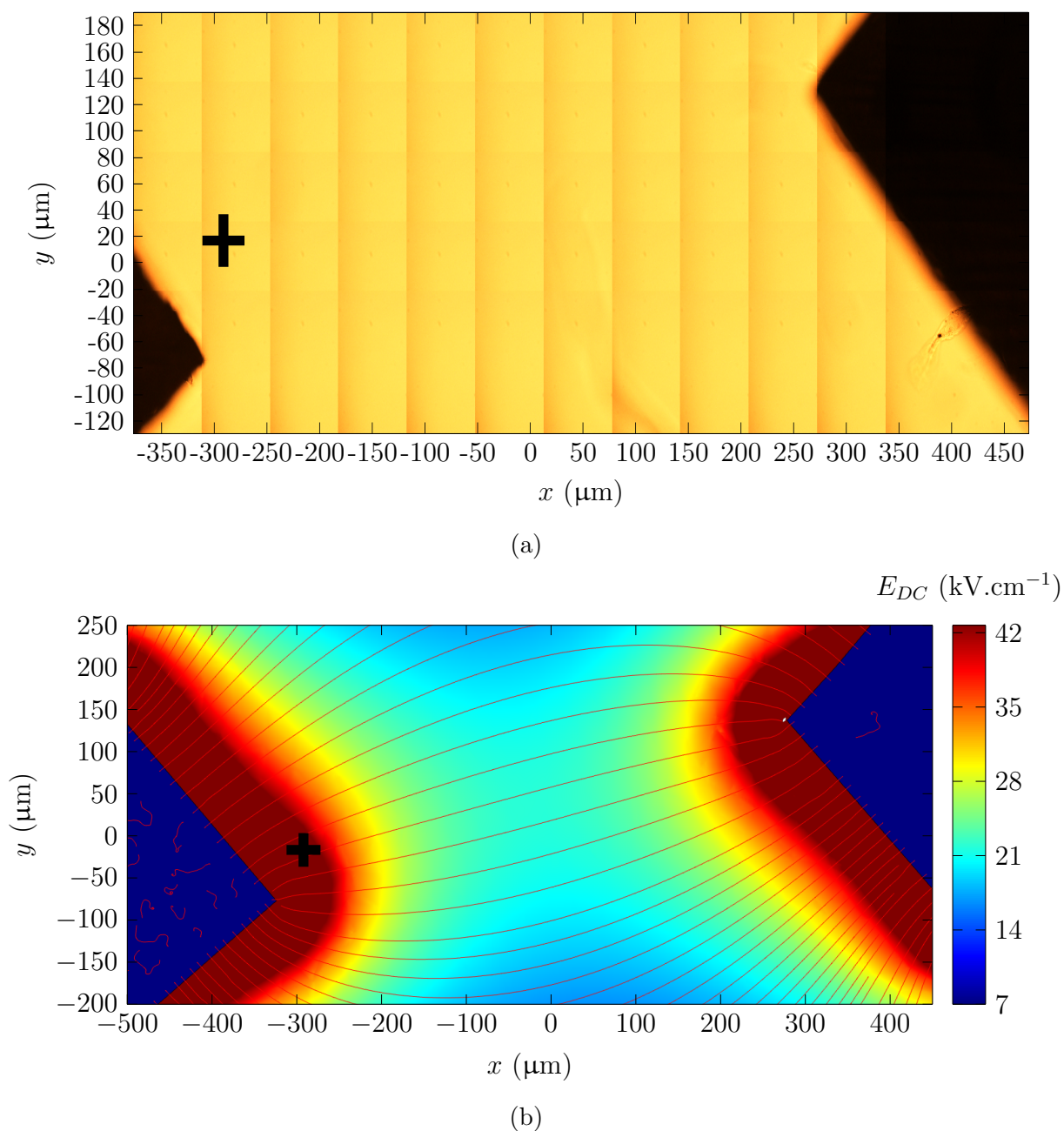


FIGURE 3.4 – (a) Mosaïques d’images en lumière blanche par transmission de la zone couverte par le champ électrique ; (b) simulation numérique de la répartition du champ électrique lorsqu’une différence de tension de 2400 V est appliquée entre les électrodes. Les croix noires repèrent les points de mesures M-CARS et SHG.

3.2.2 Mesures M-CARS

Un spectre de solution de n-alcane a d'abord été mesuré en absence de champ électrique continue. Il est exposé figure 3.5.

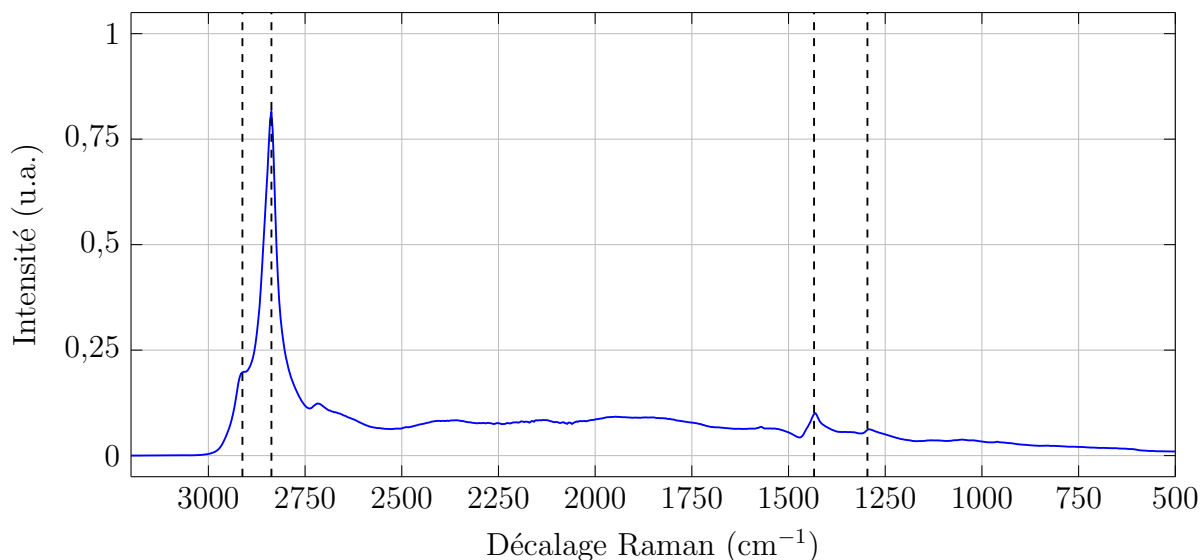


FIGURE 3.5 – Spectre CARS de solution de n-alcane mesuré avec les vecteurs de polarisation des ondes pompe et Stokes orientés selon x en absence de champ électrique continue.

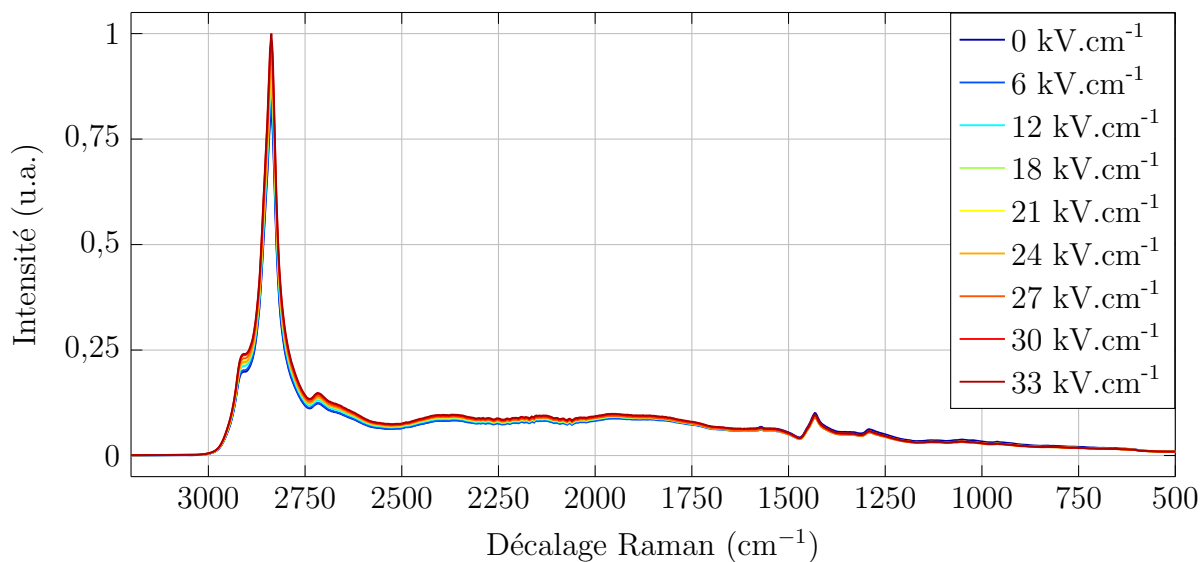
Dans la suite des mesures je me suis intéressé aux comportements de quatre modes de vibrations : les élongations symétriques de la liaison CH_3 et CH_2 correspondant aux pics à 2929 cm^{-1} et 2845 cm^{-1} ; la déformation du CH_2 à 1434 cm^{-1} et la déformation en torsion du CH_2 à 1296 cm^{-1} . Ces modes sont listés dans le tableau 3.1.

Pics CARS (cm^{-1})	Vibrations
2929	ν sym. CH_3
2845	ν sym. CH_2
1434	δ CH_2
1296	δ twist. CH_2

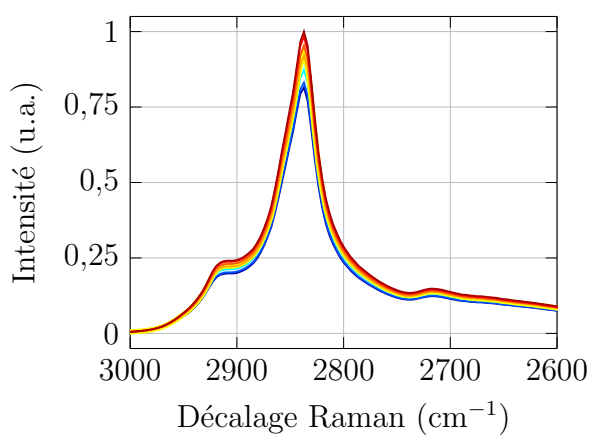
Tableau 3.1 – Tableau des attributions vibrationnelles de pics CARS de la solution de n-alcanes.

J'ai ensuite mesuré le spectre M-CARS de la solution de n-alcane soumise à un champ électrique en un point repéré par les croix noires figure 3.4 ($x = -292,1 \text{ }\mu\text{m}$ et $y = -16,7 \text{ }\mu\text{m}$) pour deux orientations des vecteurs polarisations pompe et Stokes : selon l'axe x et l'axe y . J'ai alors étudié les variations de l'intensité du spectre M-CARS en fonction de l'amplitude du champ électrique appliqué. D'après mes simulations et selon les tensions appliquées aux bornes des électrodes, les différentes amplitudes du champ

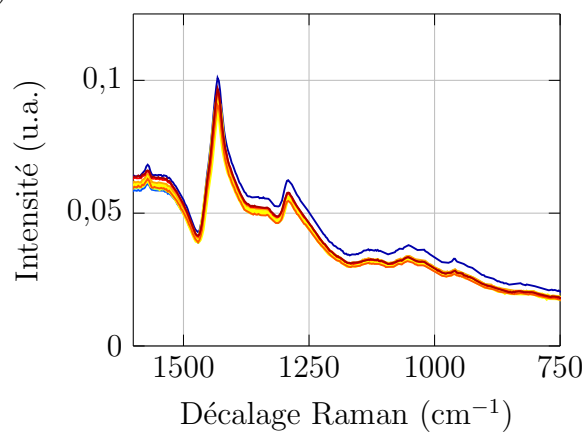
appliqué en ce point étaient 6, 12, 18, 21, 24, 27, 30 et 33 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$, et l'angle entre la ligne de champ et l'axe des x était de $23,68^\circ$. Les spectres CARS de n-alcane soumis à ces champs selon les deux directions x et y , sont respectivement exposés figures 3.6 et 3.7.



(a)

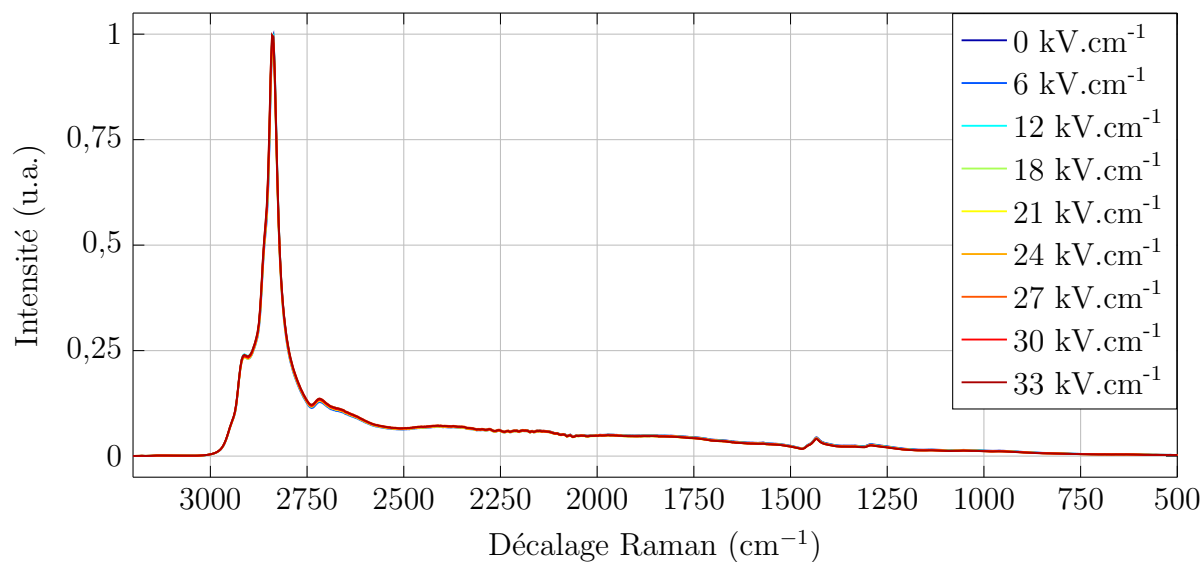


(b)

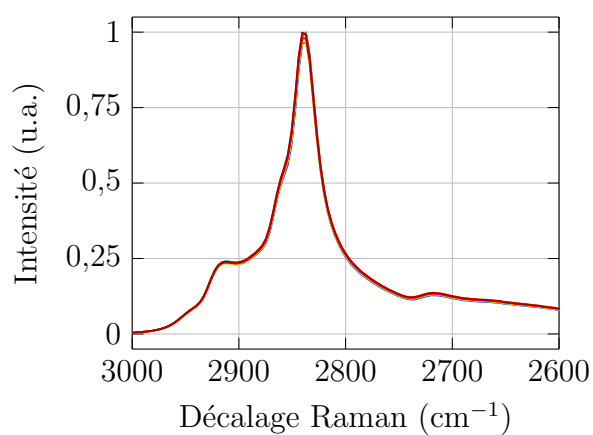


(c)

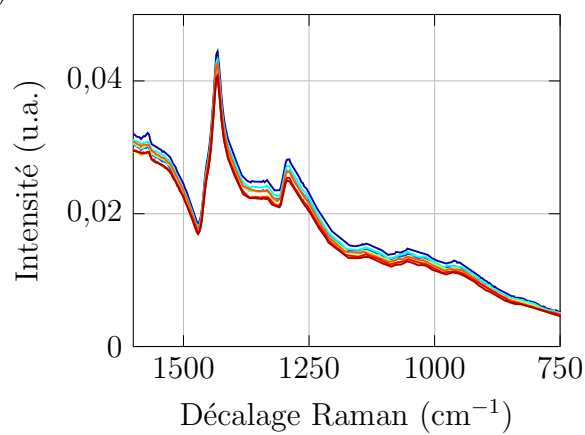
FIGURE 3.6 – (a) Spectres M-CARS d'une solution de n-alcane soumise à différentes amplitudes de E_{DC} pour des vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l'axe x . Agrandissements de (b) la zone C-H et (c) de la zone d'empreinte digitale.



(a)



(b)



(c)

FIGURE 3.7 – (a) Spectres M-CARS d’une solution de n-alcane soumise à différentes amplitudes de E_{DC} pour des vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l’axe y . Agrandissements de (b) la zone C-H et (c) de la zone d’empreinte digitale.

Les variations des intensités des pics CARS à 2929 cm^{-1} , 2845 cm^{-1} , 1434 cm^{-1} et 1296 cm^{-1} en fonction de l'amplitude du champ électrique lorsque les vecteurs polarisation des ondes pompe et Stokes sont orientées selon x ont été tracé figure 3.8.

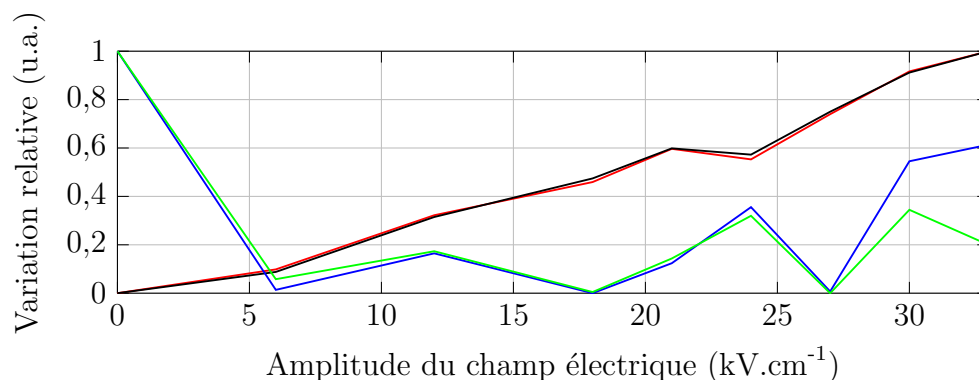


FIGURE 3.8 – Variations de l'intensité des pics CARS à 2929 cm^{-1} (courbe rouge), 2845 cm^{-1} (courbe noire), 1434 cm^{-1} (courbe bleue) et 1296 cm^{-1} (courbe verte) en fonction de l'amplitude du champ électrique lorsque les vecteurs polarisation des ondes pompe et Stokes sont orientées selon x .

Nous constatons que l'intensité du signal pour les pics à 2929 cm^{-1} et à 2845 cm^{-1} augmente avec l'amplitude du champ. Inversement, dans la zone d'empreinte digitale, nous observons d'abord une diminution du signal des pics à 1434 cm^{-1} et à 1296 cm^{-1} puis une variation non monotone lorsque le champ électrique augmente.

Sur la figure 3.9 j'ai également tracé les variations des intensités des pics CARS à 2929 cm^{-1} , 2845 cm^{-1} , 1434 cm^{-1} et 1296 cm^{-1} en fonction de l'amplitude du champ électrique lorsque les vecteurs polarisation des ondes pompe et Stokes sont orientées selon y .

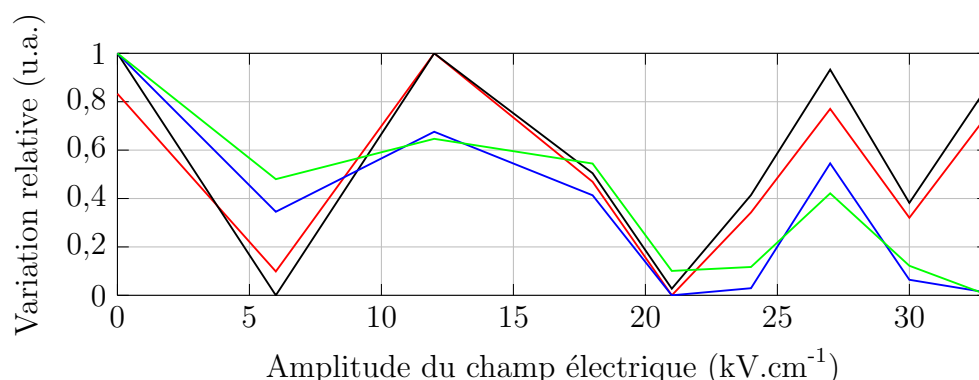


FIGURE 3.9 – Variations de l'intensité des pics CARS à 2929 cm^{-1} (courbe rouge), 2845 cm^{-1} (courbe noire), 1434 cm^{-1} (courbe bleue) et 1296 cm^{-1} (courbe verte) en fonction de l'amplitude du champ électrique lorsque les vecteurs polarisation des ondes pompe et Stokes sont orientées selon y .

Nous observons que les intensités des pics à 2929 cm^{-1} et à 2845 cm^{-1} ainsi que les

pics à 1434 cm^{-1} et à 1296 cm^{-1} varient de manière non monotone quand l'amplitude du champ est changée.

Afin de faire ressortir plus clairement la différence de comportement du signal M-CARS en fonction de la direction des vecteurs polarisation, j'ai tracé les rapports entre les intensités des spectres de l'échantillon soumis à différentes amplitudes de champ et l'intensité de l'échantillon non affecté par ce dernier. Les résultats de ce calcul dans le cas des vecteurs polarisation colinéaires à x sont donnés figure 3.10.

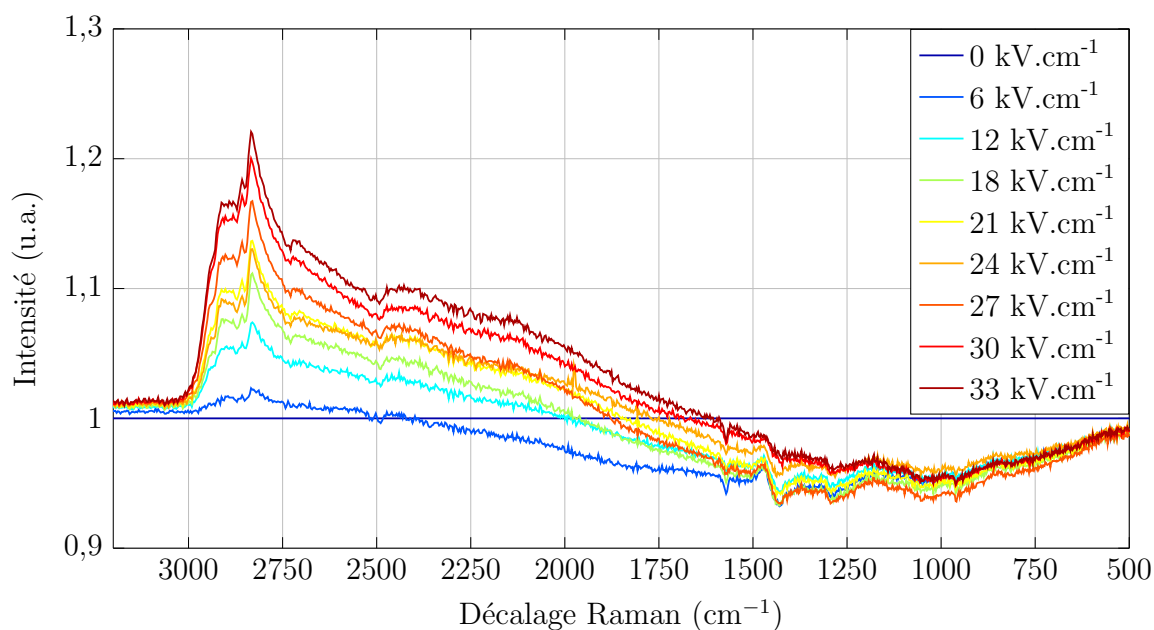


FIGURE 3.10 – Rapports entre les spectres M-CARS d'une solution de n-alcane soumise à différentes amplitudes de E_{DC} pour des vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l'axe x et le spectre M-CARS d'un échantillon non soumis à E_{DC} .

Dans le cas des vecteurs polarisation colinéaires à x nous observons clairement une augmentation de l'intensité du signal de la zone C-H, avec un accroissement de 17% et 22% des pics à 2929 cm^{-1} et 2845 cm^{-1} correspondant respectivement aux élongations symétriques CH_2 et CH_3 . Cette variation pourrait être due à l'orientation des molécules de n-alcane sous l'effet du champ électrique permettant alors une augmentation de la signature de la liaison CH_3 . Cette hypothèse sera par la suite confirmée par une analyse de l'évolution de l'équilibre électrique de cette molécule.

Dans la zone d'empreinte digitale, nous observons une diminution des signaux par rapport à un spectre non soumis à un champ électrique. En effet la forme dispersive induite par la vibration à 1434 cm^{-1} voit son amplitude clairement diminuer pour une exposition entre 0 et 30 kV. Cette évolution peut, elle aussi, être expliquée par une orientation de la molécule minimisant alors son excitation par les champs optiques.

Dans la zone blanche, entre 2500 cm^{-1} et 1700 cm^{-1} , ne contenant pas d'information

vibrationnelle et correspondant donc à une réponse purement non résonante, on constate d'abord une diminution du signal en présence d'un champ électrique jusqu'à 6 kV.cm^{-1} . Puis, dans un second temps, on peut voir une augmentation progressive du signal dans toute la zone blanche lorsque le champ électrique augmente jusqu'à 33 kV . Cette augmentation progressive de la réponse non résonante entre 2500 cm^{-1} et 1700 cm^{-1} pourrait être due à l'influence de la zone C-H. L'orientation des élongations CH_3 et CH_2 dans la direction du champ provoque une augmentation du signal. Ce signal inclut les parts réelle et imaginaire de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre résonante $\chi_R^{(3)}$. Or nous savons qu'une part de la non-résonance est uniquement due à la susceptibilité non linéaire du troisième ordre non résonante $\chi_{NR}^{(3)}$, mais qu'une autre part est aussi due au facteur croisé entre cette dernière et la partie réelle de $\chi_R^{(3)}$.

Afin de nous en assurer, selon les équations 1.57, j'ai simulé les variations du spectre CARS d'un pic à 2845 cm^{-1} en gardant la demi-largeur de raie Raman Γ à 20 cm^{-1} et la valeur de $\chi_{NR}^{(3)}$ à $0,1 \text{ V}^{-2}.\text{m}^2$ constantes, mais en augmentant l'amplitude du pic, A , de 1 à 2 par pas de 0,2 (u.a.), afin de simuler l'augmentation du signal par augmentation du nombre de liaisons orientées selon les vecteurs polarisation des ondes pompe et Stokes. J'ai alors tracé figure 3.11 les rapports entre les spectres avec différentes amplitudes et le spectre avec une amplitude égale à 1.

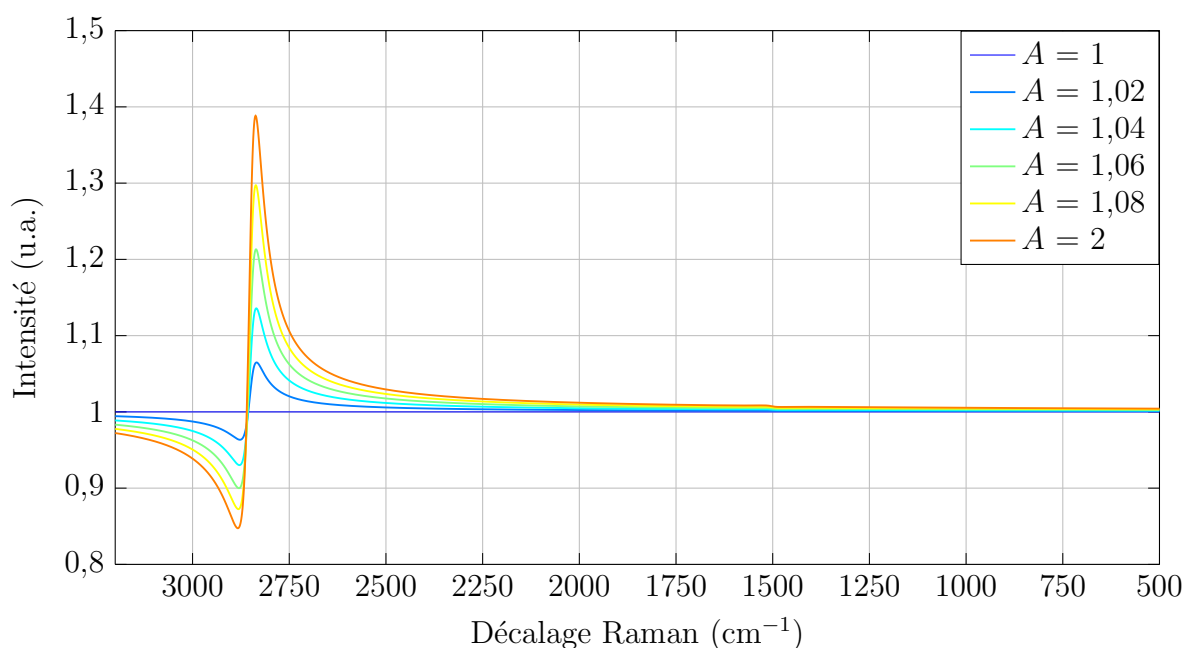


FIGURE 3.11 – Rapports des spectres M-CARS simulés d'une vibration à 2845 cm^{-1} , de demi-largeur de raie Raman Γ de 20 cm^{-1} , entre une amplitude A de 1 et des amplitudes de 1 à 2 par pas de 0,2 (u.a.).

Nous apercevons, que pour une valeur de $\chi_{NR}^{(3)}$ constante, une augmentation de l'amplitude du pic peut également impacter le signal de 2500 cm^{-1} à 1700 cm^{-1} :

plus l'amplitude est grande et plus ce signal est fort. Nous pouvons donc conclure que l'augmentation de la signature CARS liées aux élongations symétriques, a un impact sur le signal non résonant de la zone blanche.

J'ai également tracé, figure 3.12, les rapports entre les intensités des spectres de l'échantillon soumis à différentes amplitudes de champ et l'intensité de l'échantillon non affecté par ce dernier dans le cas de vecteurs polarisation colinéaires à y .

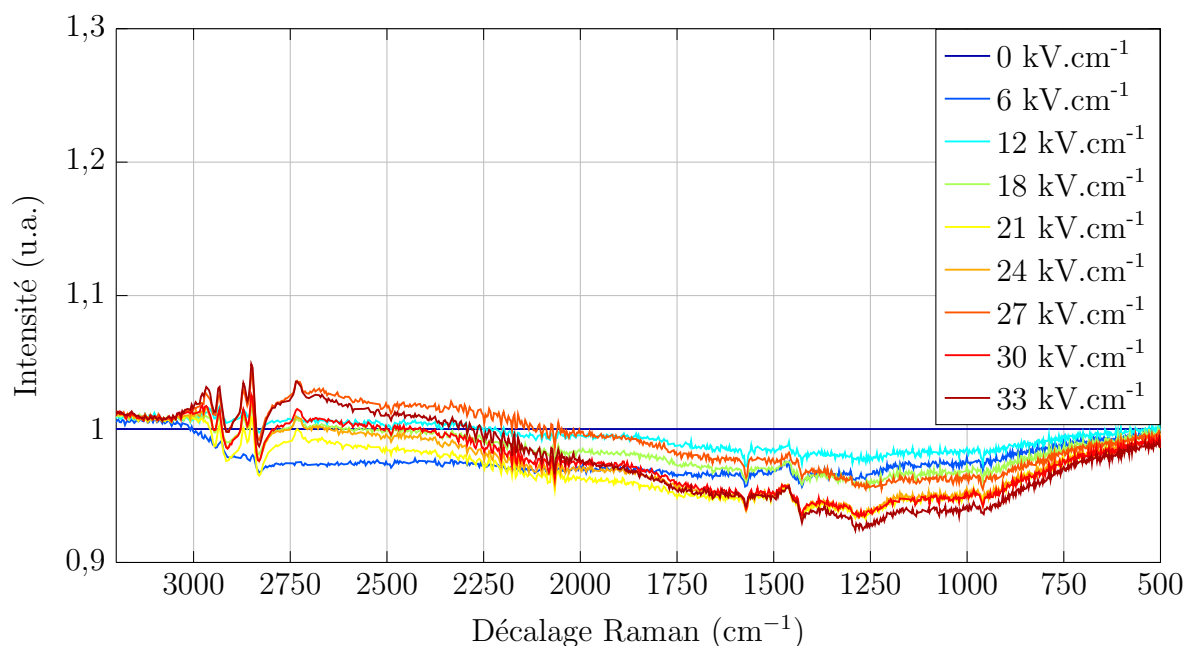


FIGURE 3.12 – Rapports entre les spectres M-CARS d'une solution de n-alcane soumise à différentes amplitudes de E_{DC} pour des vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l'axe y et le spectre M-CARS d'un échantillon non soumis à E_{DC} .

Dans ces conditions, nous observons que l'amplitude et la position des signaux correspondant aux pics à 2929 cm^{-1} et 2845 cm^{-1} tendent à diminuer sous l'influence du champ électrique. Si les élongation vibrationnelles semblent s'orienter dans le sens du champ électrique lorsque celui-ci est colinéaire aux vecteurs polarisation des ondes optiques, une explication au fait que le signal CARS ne diminue pas clairement en fonction du champ électrique lorsqu'il est perpendiculaire, pourrait être due à l'influence des champs lasers sur l'orientation des molécules [10]. En effet, en configuration perpendiculaire, les champs associés aux impulsions optiques sont de l'ordre de 490 kV.cm^{-2} (pompe) et 180 kV.cm^{-2} (Stokes) et sont à comparer avec celui appliqué électriquement qui est largement plus faible (33 KV/cm^2). Malgré une différence notable du régime d'exposition (pulsé pour les ondes optiques et continu pour l'onde électrique) une compétition entre ces deux excitations pourrait conduire à l'inefficacité de l'orientation par champ électrique. Cette hypothèse est appuyée par des mesures réalisées dans les mêmes conditions expérimentales mais avec des champs optiques 400 à 500 fois plus

faibles que dans mes expériences [11].

En ce qui concerne la zone blanche et la zone d’empreinte digitale, quand les vecteurs polarisation sont selon y , la baisse du signal est progressive et atteint les 8%. La cause de cette baisse est encore une fois liée à la baisse de signal des élongations vibrationnelles dans la zone C-H. En s’écartant de la direction des vecteurs polarisation sous l’influence du champ électrique, cela provoque également la baisse de la partie réelle de $\chi_R^{(3)}$ qui vient influencer tous les décalages Raman inférieures : la zone blanche de 2500 cm^{-1} à 1700 cm^{-1} et la zone d’empreinte digitale de 1700 cm^{-1} à 500 cm^{-1} .

En conclusion, dans les deux cas de configuration : colinéaire et perpendiculaire, la variation du signal entre 3200 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} est très faible (1,5%). Or nous savons qu’il n’y a pas de vibration moléculaire pouvant être détectée dans cette zone spectrale et que la partie réelle de $\chi_R^{(3)}$ n’est pas impliquée car le spectre CARS de la solution de n-alcane ne s’y illustre pas sous un aspect dispersif. Nous pouvons donc estimer que le signal que nous y acquerrons est lié uniquement à $\chi_{NR}^{(3)}$. Nous constatons alors que ce dernier varie peu ou pas du tout en fonction du champ électrique. Nous pouvons déduire de ces observations que les parts résonantes du signal, imaginaire et réelle, sont celles qui sont les plus affectées par la variation de champ électrique.

Afin de comparer plus précisément le cas des polarisations parallèles et perpendiculaires entre les ondes optiques et l’onde électrique, j’ai tracé sur la figure 3.13 la différence de comportement entre le spectre d’une solution de n-alcane soumise à un champ électrique d’une amplitude de 33 kV.cm^{-1} et un spectre de solution non soumis, et cela pour les deux directions des vecteurs polarisation.

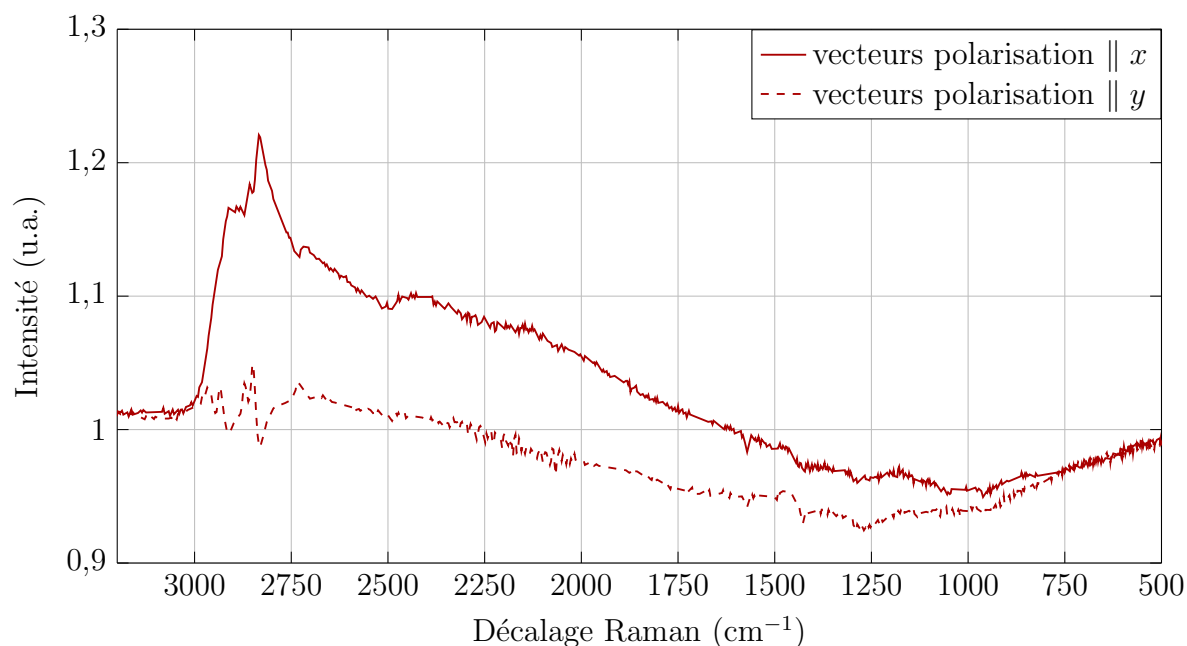


FIGURE 3.13 – Comparaison des rapports entre les spectres M-CARS d’une solution de n-alcane soumise à une amplitude de E_{DC} de 33 kV.cm^{-1} et le spectre M-CARS d’un échantillon non soumis à E_{DC} dans le cas de vecteurs polarisation des faisceaux pompe et Stokes colinéaires à l’axe x (courbe continue) et à l’axe y (courbe discontinue).

Nous observons qu’il y a une claire opposition dans la variation d’intensité de signal en fonction de l’orientation des vecteurs polarisation pour les pics à 2929 cm^{-1} et 2845 cm^{-1} . De plus, cette différence semble également affectée les elongations asymétriques CH_3 et CH_2 , respectivement à 2957 cm^{-1} et à 2845 cm^{-1} . Cela prouverait bien qu’il y a réorientation des elongations symétriques et antisymétriques CH_3 et CH_2 dans la direction du champ électrique, et cela malgré l’influence des champs des impulsions lasers dans la configuration perpendiculaire.

Il faut noter que Farid El Bassri avait montré, au cours de sa thèse, que le signal M-CARS de la zone C-H d’une solution de n-alcane voyait son signal baissé lorsqu’un champ électrique perpendiculaire aux vecteurs polarisation des ondes excitatrices était appliqué, et réciproquement, le voyait augmentait lorsqu’un champ électrique colinéaire à ces vecteurs était appliqué. Néanmoins, l’amplitude des champs associés aux ondes pompe et Stokes étaient de $0,16 \text{ kV.cm}^{-1}$ et de $0,10 \text{ kV.cm}^{-1}$, et celle du champ électrique continu pouvait aller jusqu’à 80 kV.cm^{-1} . Le fait que je ne trouve pas les mêmes résultats que lui pourrait donc bien être dû à la forte amplitude des champs des impulsions lasers que j’ai utilisées. Ces derniers viendraient donc jouer sur la réorientation des molécules.

Dans la suite de ce chapitre je vais m’assurer que les variations de signaux CARS sont bien dues à la réorientation des liaisons chimiques des molécules de n-alcane à l’aide d’une étude de génération de second harmonique (*Second Harmonic Generation* ou SHG).

Puis, grâce à une méthode de post-traitement, j'essaierai d'extraire la part résonante du spectre CARS de la solution de n-alcane et d'étudier ses variations par rapport à un champ électrique continu.

3.2.3 Mesures EFISHG

La génération de second harmonique (SHG) est le résultat d'un phénomène optique non linéaire au cours duquel deux champs oscillant à la même fréquence interagissent afin de produire un troisième champ avec une fréquence deux fois plus grande. Ce doublage de fréquence ne peut avoir lieu que dans un matériau doté d'une susceptibilité non linéaire de second ordre non nulle, soit généralement un matériau non centrosymétrique. Cependant la SHG peut être provoquée à l'aide d'un champ électrique qui va modifier les propriétés locales de la matière afin de faire apparaître une susceptibilité équivalente d'ordre deux. Le mélange des deux champs incidents de même fréquence et de ce champ de fréquence nulle fait intervenir la susceptibilité électrique de troisième ordre, non nulle quelque soit les propriétés de symétrie du matériau. C'est ce que l'on appelle la génération de second harmonique induite par champ électrique (*Electric Field Induced Second Harmonic Generation* ou EFISHG) [13]. Le moment dipolaire induit $\langle D_k^{(3)} \rangle$ peut se mettre sous la forme :

$$\langle D_k^{(3)} \rangle = \gamma_{kkkk} E^2(\omega) E_{DC} \langle \cos \theta \rangle^2 \quad (3.8)$$

avec k la direction du champ électrique E_{DC} , γ_{kkkk} la polarisabilité de troisième ordre (ou hyperpolarisabilité de second ordre), $E(\omega)$ le champ optique fondamental et θ l'angle entre le vecteur polarisation de $E(\omega)$ et la direction de la liaison moléculaire. Dans le cas d'un champ électrique statique γ_{kkkk} se décompose en trois contributions :

$$\gamma_{kkkk} = \gamma^e + \gamma^v + \gamma^r \quad (3.9)$$

respectivement, γ^e la contribution électronique moyenne, γ^v la contribution vibrationnelle moyenne et γ^r la contribution rotationnelle moyenne. Cette dernière est fonction du moment dipolaire permanent \vec{D} de telle manière que :

$$\gamma^r = \frac{\vec{\beta} \cdot \vec{D}}{5k_B T} \quad (3.10)$$

avec $\vec{\beta}$ la partie vectorielle du tenseur de polarisabilité de second ordre (ou hyperpolarisabilité d'ordre un).

Selon 1.37 la polarisation du troisième ordre engendrée par l'ensemble des moments

dipolaires des molécules induits par le mélange d'ondes sera :

$$P^{(3)}(2\omega) = \frac{N}{V} f_0 f_\omega^2 f_{2\omega} \langle D_k^{(3)} \rangle \quad (3.11)$$

avec N le nombre de molécules dans le volume V , f_0 , f_ω et $f_{2\omega}$ les facteurs des champs locaux dus à E_{DC} , au champ optique $E(\omega)$ et à son second harmonique de fréquence 2ω respectivement.

Si on admet que $\vec{\beta}$ est colinéaire au vecteur polarisation du champ optique fondamental, alors :

$$\vec{\beta} \cdot \vec{D} = \beta D \cos \theta. \quad (3.12)$$

Puisque l'intensité du second harmonique $I(2\omega)$ est proportionnelle à la norme au carré de $P^{(3)}(2\omega)$, d'après 3.8 et 3.11 il vient que :

$$I(2\omega) \propto \left| E^2(\omega) E_{DC} \langle \cos \theta \rangle^2 \left[(\gamma^e + \gamma^\nu) + \frac{\beta D}{5k_B T} \langle \cos \theta \rangle \right] \right|^2. \quad (3.13)$$

En me basant sur cette relation j'ai réalisé une mesure de EFISHG sur la solution de n-alcane au point de mesure de l'étude M-CARS et cela pour les mêmes amplitudes de champs électriques utilisées précédemment. J'ai attribué le rôle d'onde fondamentale au faisceau pompe et j'ai fait varier la direction de son vecteur polarisation avec un pas de 10° autour de l'axe x pris comme origine. La longueur d'onde de l'harmonique étant ainsi de 532 nm et j'ai utilisé la deuxième voie de détection présentée figure 3.2.1 pour mesurer le signal de second harmonique. Les coefficients de réflexion et transmission des optiques étant différents selon l'orientation du vecteur polarisation, j'ai dû tenir compte des variations de puissances moyennes du faisceau au niveau de l'échantillon afin de normaliser l'intensité du signal EFISHG par le carré de cette puissance. Les intensités normalisées du signal EFISHG en fonction de l'angle entre le vecteur polarisation et l'axe x pour les différentes valeurs de champ électrique sont présentées figure 3.14.

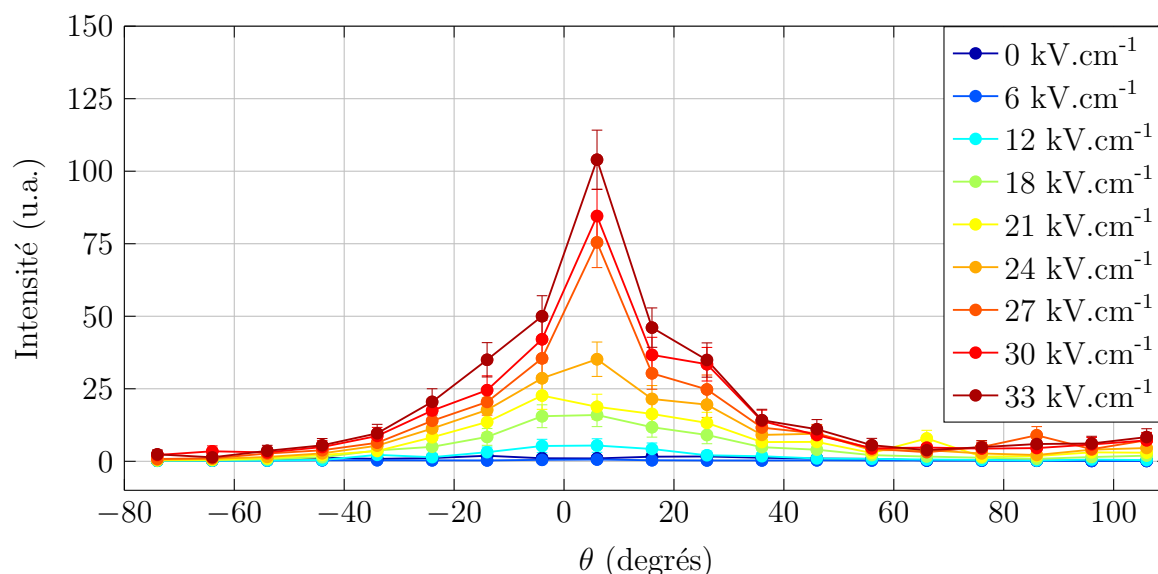


FIGURE 3.14 – Intensité du signal EFISHG en fonction de θ , l'angle entre le vecteur polarisation de l'onde fondamentale et l'axe x pour différentes amplitudes de E_{DC} .

Nous constatons que lorsque la solution n'est pas soumise à un champ électrique, le signal SHG n'est pas détecté. Un signal à 532 nm apparaît et augmente significativement pour des niveaux de champs supérieures à 12 kV.cm^{-1} . De plus, nous observons que l'intensité de ce signal varie en fonction de l'angle θ dont le maximum correspond à la valeur optimale $\theta_{opt} = 5^\circ$.

Pourtant il semblerait que, pour certains valeurs d'amplitude du champ électrique, l'évolution du signal s'éloigne de ce que l'équation 3.11 nous laissait attendre. Si j'essaye, par exemple, d'ajuster les intensités du signal SHG pour des amplitudes de champ électrique continu de 24 kV.cm^{-1} et 30 kV.cm^{-1} par la fonction $f(\theta)$ découlant de l'équation 3.11 telle que :

$$f(\theta) = (a \cos^2 \theta + b \cos^3 \theta)^2 \quad (3.14)$$

j'obtiens les résultats présentés figure 3.15.

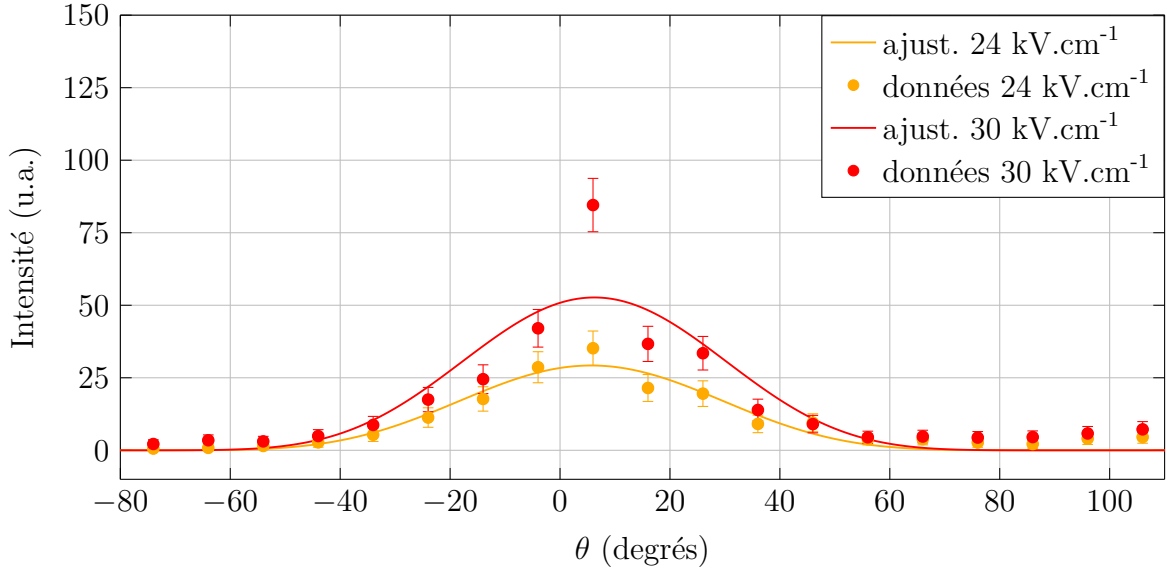


FIGURE 3.15 – Ajustement par la fonction $f(\theta)$ des intensités du signal EFISHG pour des amplitudes de E_{DC} égales à 24 kV.cm^{-1} et 30 kV.cm^{-1} .

Pour un champ électrique allant de 12 à 24 kV.cm^{-1} l'évolution du signal au second harmonique suit une fonction sinusoïdale et peut être approchée par la fonction $f(\theta)$, issue de l'équation 3.11, décrivant l'intensité du second harmonique selon des constantes qui sont γ_e , γ_ν , β et D .

Pour des amplitudes de champ électrique supérieures à 24 kV.cm^{-1} la fonction $f(\theta)$ ne permet plus d'ajuster les variations des intensités EFISHG. Ceci est illustré sur la figure précédente. Cette fois nous observons un écart important entre le point de mesure $\theta = 5^\circ$ et le reste des points qui rend impossible l'ajustement par la fonction $f(\theta)$. Ce phénomène est aussi présent dans le cas des variations à 27 kV.cm^{-1} , 30 kV.cm^{-1} et 33 kV.cm^{-1} .

L'hypothèse que je fais à partir de ces constatations est qu'un champ électrique suffisamment intense peut modifier la répartition des charges dans le nuage électronique des liaisons moléculaires de la solution de n-alcane. Il en résulte une forte augmentation et une modification du moment dipolaire permanent de la molécule, D .

Nous notons également que la direction de polarisation permettant d'optimiser l'EFISHG est différente de celle de la ligne de champ électrique prédite par notre simulation en ce point. Nous obtenons respectivement les angles $\theta_{opt} = 5^\circ$ et $\theta_{simul} = 23,68^\circ$ par rapport à x . Cette différence est trop importante pour pouvoir être expliquée par un écart de la simulation. Il nous faut nous rappeler que la génération de second harmonique doit respecter les conditions d'accord de phase. Dans une solution de n-octane, les indices de réfraction de l'onde pompe à 1064 nm et de son harmonique à 532 nm sont respectivement $1,3926$ et $1,4011$ [14]. Le désaccord de phase $\Delta\vec{k} = \vec{k}_{SHG} - 2\vec{k}_p$ est donc de $1,0026 \times 10^5 \text{ rad.m}^{-1}$. Un moyen pour réduire ce désaccord est la création d'une biréfringence dans la solution afin que l'indice de réfraction au second harmonique

se rapproche, voir égalise l'indice de l'onde pompe qui se propage dans une autre direction. Cette biréfringence peut être créée par la modification du nuage électronique de la molécule sous l'effet du champ et cela pour un grand nombre d'éléments qui s'alignent les uns avec les autres sous l'effet de ce même champ extérieur.

3.2.3.1 Déstabilisation électronique de la molécule de n-alcane

Nous avons déduit de l'étude M-CARS que les liaisons CH_3 et CH_2 subissaient une réorientation dans la direction du champ et dans le plan $x - y$. Cela se traduit par une augmentation du signal CARS des elongations de ces liaisons du fait de leur alignement avec les vecteurs polarisations des ondes excitatrices colinéaires au champ électrique continu. Suite à l'expérience de EFISHG j'émetts l'idée que le champ électrique, à partir d'une certaine amplitude, modifie la répartition des charges dans le nuages électronique de la molécule et induit alors un moment dipolaire \vec{D}_{ind} qui est colinéaire au liaison CH_3 et CH_2 , comme cela est illustré figure 3.16.

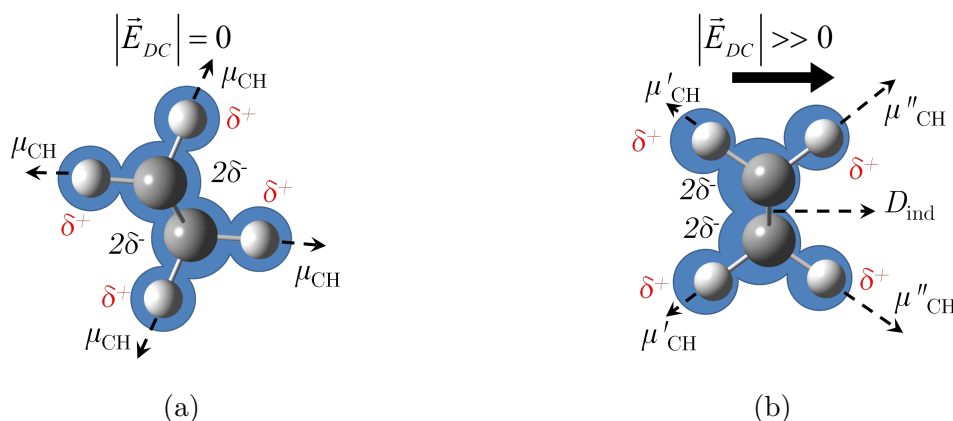


FIGURE 3.16 – Schéma de la répartition des charges électroniques de deux liaisons C-H d'une molécule de n-alcane (a) non affectée et (b) affectée par un champ électrique continu \vec{E}_{DC} . Les moments dipolaires, μ , des liaisons C-H et le moment dipolaire induit de la molécule, D_{ind} , sont représentés par des flèches noires hachurés. Les électronégativités de l'atome de carbone et d'hydrogène sont respectivement représentés par $2\delta^-$ et δ^+ .

Les atomes de carbones étant plus électronégatifs que les atomes d'hydrogène, le champ électrique intense déplace les charges électroniques autour des carbones dans le sens opposé à la direction du champ. Cela modifie les moments dipolaire μ des liaisons C-H et provoque l'apparition d'un moment dipolaire totale, D_{ind} induit par le champ électrique.

Ces réorientations provoquent donc la variation de l'indice de réfraction de la solution de n-alcane dans la direction du champ électrique continu, ce qui compense le désaccord de phase entre l'onde pompe et son second harmonique. Cela explique comment l'intensité du signal EFISHG se voit fortement augmenter pour des directions différentes du vecteur polarisation de l'onde pompe et du champ électrique au delà d'une certaine amplitude.

Ainsi cette expérience de EFISHG m'a permis de mettre en évidence la capacité d'un champ électrique continu à polariser une solution de molécules non polaires. L'ensemble des molécules peut alors être orienté suivant la direction du champ électrique externe que j'applique créant, au sein du matériau, une biréfringence artificielle. Celle-ci provoque ainsi la diminution du désaccord de phase entre l'onde pompe et son harmonique, ce qui explique l'augmentation drastique du signal EFISHG à partir d'une certaine valeur d'amplitude du champ électrique. La variation d'indice de réfraction serait due à la réorientation des liaisons C-H. Cette réorientation se retrouve dans ma mesure d'électro-CARS et pourrait donc bien faire apparaître une différence de comportement entre la part résonante et non résonante du signal. Néanmoins pour pouvoir établir quel est l'effet précis du champ sur la part résonante du signal M-CARS de la molécule de n-alcane nous pouvons recourir à une nouvelle technique d'analyse numérique.

3.3 Analyse numérique

Je me suis directement inspiré des méthodes d'extraction de la chimioétrie appliquée aux mesures de spectroscopie Raman spontanée. Afin de discriminer deux types d'individus dans un lot de données, il est souvent utile d'établir leur dérivée, voire leur dérivée seconde, par rapport au décalage Raman. Le bruit de fond dû à la fluorescence ou les différences d'intensité dues aux effets multiplicatifs varient très lentement en fonction du décalage Raman en comparaison avec des signatures vibrationnelles. La dérivée réduit, voir supprime, les variations lentes en fonction de la fréquence, d'extraire les signatures accordées en phase qui possèdent des évolutions rapides. Je me suis donc servi de cette méthode afin d'extraire les variations caractéristiques des pics CARS par rapport aux décalages Raman, mais aussi leurs variations par rapport aux différentes amplitudes des champs électriques appliqués. Je me suis basé sur l'hypothèse qu'une étude croisée permettrait de déterminer le pouvoir discriminant du champ électrique continu sur les parts résonante et non résonante du signal CARS.

Afin de pouvoir calculer les dérivées des spectres CARS de la solution de n-alcane, j'ai utilisé l'algorithme de Savitzky-Golay qui permet d'ajuster un polynôme sur une fenêtre de points. Le degré du polynôme et la taille de la fenêtre sont choisis afin de faire correspondre au mieux le spectre initial et le spectre lissé. C'est alors les dérivées de toutes ces séries de polynômes le long du spectre qui sont obtenues.

En guise d'illustration de l'efficacité de cet outil qu'est la dérivée je l'ai appliquée au spectre CARS théorique présenté figure 1.6. Sur la figure 3.17 sont comparés le pic anti-Stokes d'une vibration avec une demi-largeur de raie Raman $\Gamma = 10 \text{ cm}^{-1}$, sa dérivée $\partial S(\omega_{aS})/\partial \omega_{aS}$ par rapport au décalage Raman, et la partie imaginaire de la susceptibilité électrique de troisième ordre résonante $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$.

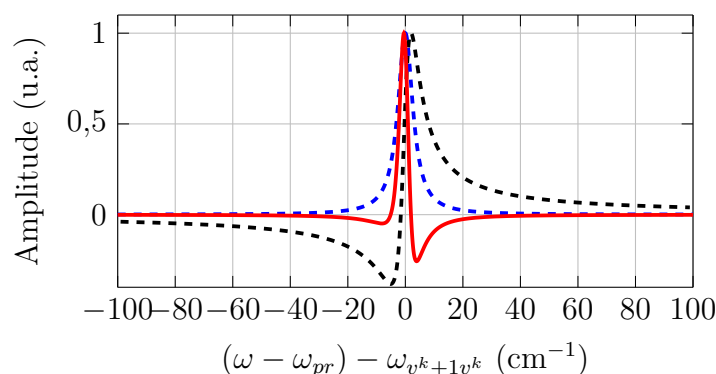


FIGURE 3.17 – Variations de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ (courbe bleue hachurée), de $\left| \chi_{lmno}^{(3)} \right|^2$ (courbe noire hachurée) et de $\partial S(\omega_{aS})/\partial \omega_{aS}$ (courbe rouge) normalisées par rapport à l’amplitude de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$.

Nous constatons que la dérivée conserve le caractère dispersif du pic CARS, néanmoins la position du maximum de la dérivée se rapproche de la position du maximum de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$. J’ai alors calculé $\Delta\omega$, la différence de position entre le maximum de la dérivée et le maximum de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ et la différence de position entre le maximum du pic anti-Stokes et le maximum de $\Im \left\{ \chi_R^{(3)} \right\}$ en fonction de la demi-largeur de raie Raman Γ . Ce sont ces deux courbes qui sont présentées figure 3.18.

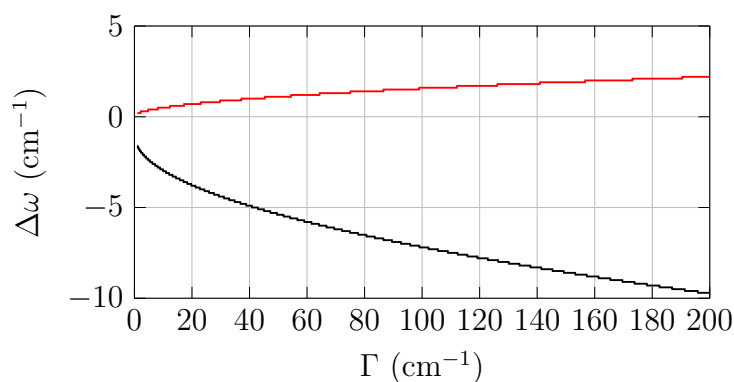


FIGURE 3.18 – Différences de décalage Raman $\Delta\omega$ entre la position du pic de la dérivée d’un pic CARS $\partial S(\omega_{aS})/\partial \omega_{aS}$ et celle du pic Raman spontanée comparable à $\left| \chi_{lmno}^{(3)} \right|^2$ en fonction de la demi-largeur de raie Raman Γ (courbe rouge); différences de décalage Raman $\Delta\omega$ entre la position d’un pic CARS $S(\omega_{aS})$ et celle du pic Raman spontanée comparable à $\left| \chi_{lmno}^{(3)} \right|^2$ en fonction de la demi-largeur de raie Raman Γ (courbe noire).

À partir de ce calcul je peux affirmer que la dérivée du signal CARS par rapport au décalage Raman permet de retrouver la position des pics Raman idéaux à moins de 2 cm^{-1} près et cela pour des demi-largeurs de raie Raman allant jusqu’à $\Gamma = 157 \text{ cm}^{-1}$.

Fort de cette constatation, j'ai appliqué cette première dérivée, $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$, aux spectres CARS présentés section 3.2.2. J'ai alors agencé ces données en trois dimension : selon les décalages Raman, l'intensité du signal et l'amplitude du champ électrique, comme cela est schématisé figure 3.19.

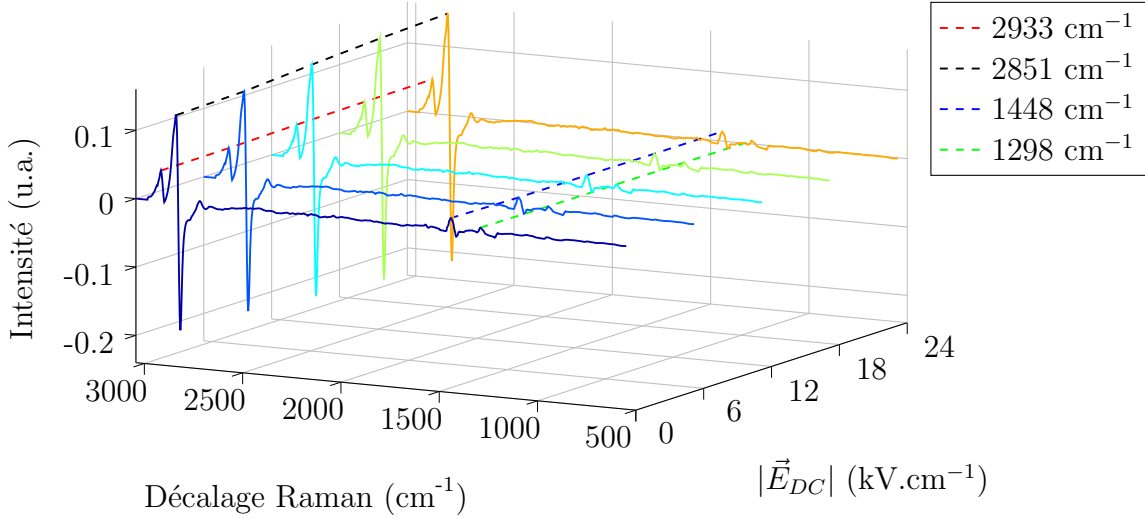


FIGURE 3.19 – Représentation en trois dimensions de l'évolution des dérivées par rapport au décalage Raman des spectres M-CARS, $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$, d'une solution de n-alcanes soumis à différentes amplitudes de champ électrique continu, $|\vec{E}_{DC}|$, colinéaire aux vecteurs polarisation des ondes excitatrices. Les droites noires illustrent l'évolution de certaines intensités de $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$ par rapport à $|\vec{E}_{DC}|$.

J'ai alors pu dérivé de nouveau les spectres, mais cette fois selon la troisième dimension, c'est-à-dire selon l'amplitude du champ électrique. J'ai alors obtenu la dérivée seconde $\partial S^2(\omega_{as})/\partial E_{DC}\partial\omega_{as}$. Sur les figures 3.20 et 3.21, j'ai comparé le spectre Raman de la solution de n-alcane aux moyennes du spectre M-CARS brut, de $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$ et de $\partial S^2(\omega_{as})/\partial E_{DC}\partial\omega_{as}$ sur toutes les valeurs $|\vec{E}_{DC}|$ pour des polarisations des ondes optiques selon x et y .

Les moyennes des spectres M-CARS bruts et de $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$ ne servent que d'illustration, car les courbes ont sensiblement la même allure et apportent la même information. Dans le cas des dérivées secondes, $\partial S^2(\omega_{as})/\partial E_{DC}\partial\omega_{as}$, la deuxième dérivée selon l'amplitude du champ se fait à partir de sept points (les amplitudes limites de 0 kV.cm⁻¹ et 33 kV.cm⁻¹ étant exclus du calcul). Nous avons ainsi sept valeurs de variation de $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$ pour chaque décalage Raman. Ces valeurs n'étant pas assez nombreuses pour qu'on leurs ajuste une fonction décrivant le comportement de $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$ par rapport au champ, j'ai considéré qu'elles pouvaient être prises comme des variations instantanées. Je peux ainsi les considérer comme des pentes, et leur moyenne permet alors d'illustrer clairement le comportement de $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$, soit le comportement d'un spectre où le bruit de fond a été réduit, vis-à-vis des amplitudes de \vec{E}_{DC} .

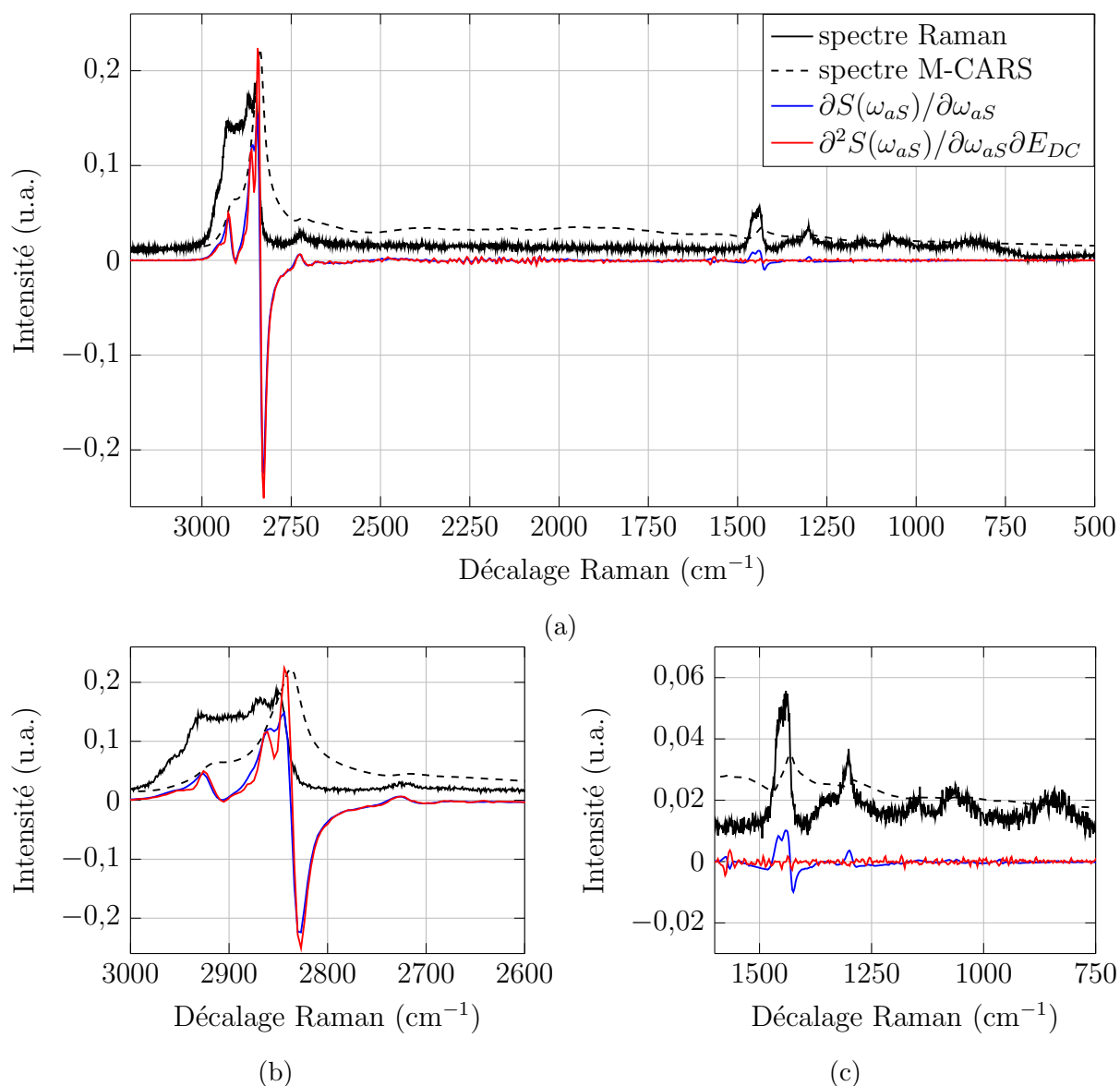


FIGURE 3.20 – Moyenne des spectres M-CARS (courbe noire hachurée), moyenne des dérivées $\partial S(\omega_{aS})/\partial\omega_{aS}$ pour différentes amplitudes de E_{DC} (courbe bleue) et dérivée croisée $\partial^2 S(\omega_{aS})/\partial E_{DC}\partial\omega_{aS}$ de la solution de n-alcane pour des vecteurs polarisation pompe et Stokes colinéaire à x comparée au spectre Raman de la solution de n-alcane (courbe noire).

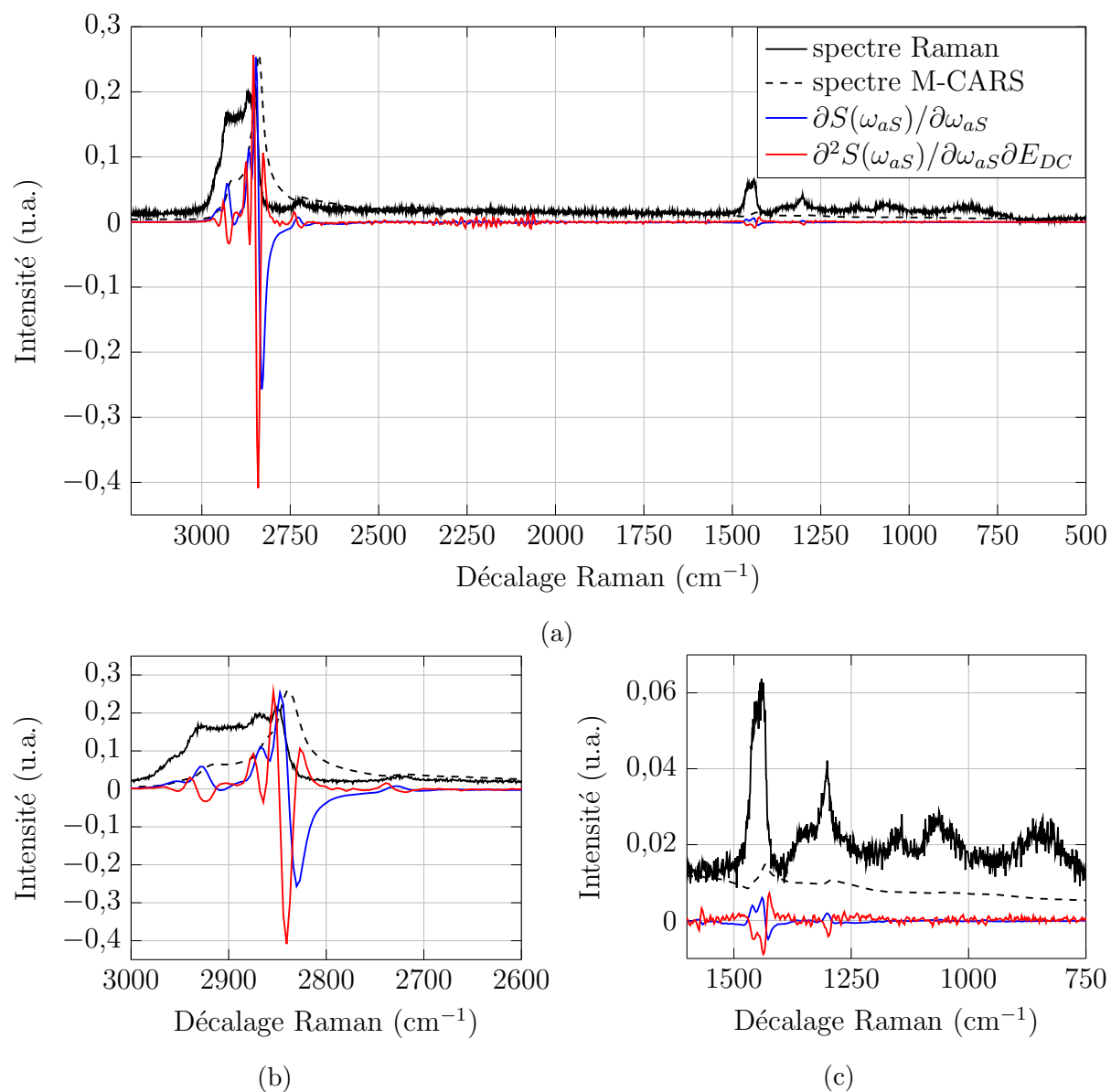


FIGURE 3.21 – Moyenne des spectres M-CARS (courbe noire hachurée), moyenne des dérivées $\partial S(\omega_{aS})/\partial\omega_{aS}$ pour différentes amplitudes de E_{DC} (courbe bleue) et dérivée croisée $\partial^2 S(\omega_{aS})/\partial E_{DC}\partial\omega_{aS}$ de la solution de n-alcane pour des vecteurs polarisations pompe et Stokes colinéaire à y comparée au spectre Raman de la solution de n-alcane (courbe noire).

Il apparait que grâce à $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$ j'ai retrouvé la position des pics Raman de la solution de n-alcane dans la zone C-H et la zone d'empreinte digitale avec une précision inférieure à 3 cm^{-1} . Ces décalages Raman corrigés sont bien entendu conservés par $\partial S^2(\omega_{as})/\partial E_{DC}\partial\omega_{as}$.

Nous pouvons tirer de cette dérivée croisée des informations importantes. En effet, dans le cas des vecteurs polarisation orientées selon x (cas parallèle), les maxima et minima correspondent aux positions des pics Raman. On peut alors en conclure que nous avons une augmentation de la signature vibrationnelle avec l'amplitude du champ électrique, et donc que les liaisons C-H s'orientent dans la direction du champ électrique, proche de l'axe x .

Néanmoins nous constatons également que les pics anti-Stokes de la zone d'empreinte digitale disparaissent après la dérivée seconde. Deux hypothèses peuvent expliquer cela : soit les déformations vibrationnelles ne sont pas influencées par le champ électrique, soit les opérations numériques appliquées ont mené à une réduction puis une perte de l'information de ces décalages Raman.

Dans le cas de vecteurs polarisation selon y nous observons un comportement contraire à celui de la configuration précédente. Dans la zone C-H et la zone d'empreinte digitale, les maxima et minima de $\partial S^2(\omega_{as})/\partial E_{DC}\partial\omega_{as}$ se trouvent en opposition des minima et maxima des pics de $\partial S(\omega_{as})/\partial\omega_{as}$, mettant en évidence la baisse de signal avec l'augmentation de l'amplitude du champ électrique, et donc prouvant que les liaisons s'orienteraient dans un sens presque perpendiculaire à l'axe y , soit selon la direction de \vec{E}_{DC} .

Nous constatons, ici, que les pics anti-Stokes de l'empreinte digitale ont été conservés, et donc que les déformations vibrationnelles correspondantes sont bien affectées par le champ électrique. Je peux ainsi supposer que dans le cas précédent, ce sont les opérations numériques qui sont responsables de la perte d'information et donc de l'absence de ces pics.

Ainsi dans cette étude, j'ai prouvé que l'emploi de l'outil mathématique simple que représente la dérivée par rapport au décalage Raman, permet de discriminer les variations brutales des pics CARS contenant l'information vibrationnel, et les variations plus lentes du bruit de fond non résonant. Cette méthode dépend donc étroitement de la largeur du spectre à étudier, c'est pourquoi le dispositif M-CARS est l'instrument qui s'y prête le mieux.

De plus, la suppression de ce fond non résonant a permis à l'hypothèse de la réorientation moléculaire, supposée dans les sections précédentes de ce chapitre, d'être confirmée. En dérivant de nouveau ce spectre dépourvu de la contribution non résonante, mais cette fois selon l'amplitude du champ électrique, j'ai pu restreindre l'étude aux seules variations des signaux vibrationnels. L'évolution de cette dérivée seconde a montré que

le signal M-CARS de vibrations moléculaires de n-alcane augmentait ou diminuait en fonction de l'orientation du champ électrique. L'influence des champs des ondes optiques étant constante, je peux affirmer que les variations, extraites par la dérivée seconde, ne sont dues qu'à l'action du champ électrique continu.

Conclusion

Dans ce chapitre j'ai exposé le travail expérimental et numérique que j'ai réalisé sur une nouvelle méthode de discrimination du fond non résonnant dans une expérience CARS multiplex. J'ai mis en place une méthode nommée électro-CARS multiplex basée sur une triple excitation incluant deux ondes optiques, dont l'une large bande, et une excitation électrique statique. J'ai alors pu prouver que l'utilisation d'un champ électrique pouvait entraîner des variations significatives du signal anti-Stokes, et cela même dans le cas de molécules dites non polaires. Une mesure du signal EFISHG et le recours à une méthode d'analyse numérique utilisant la dérivée du spectre, ont confirmé que le processus d'évolution de l'onde CARS été basé sur une réorientation des molécules non polaires sous l'effet d'un champ électrique externe. Il est à noter que le fond non résonnant qui se superpose aux signatures vibrationnelles est très peu affecté par l'onde électrique ce qui permet d'extraire plus facilement les signatures moléculaires. Suite à ce travail, je poursuis une collaboration avec l'équipe de Ludovic Duponchel, spécialisée en techniques de chimométrie au Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR, Villeneuve d'Ascq). Il me reste également à prouver que l'électro-CARS peut s'appliquer à des échantillons biologiques. Je privilégie pour cela la voie optique : la génération d'un champ électrique statique par rectification optique, ou mélange de fréquence entre une onde fondamentale et son harmonique.

En parallèle de cette nouvelle méthode de différenciation du NRB, promise à des développements théoriques et expérimentaux, et toujours dans le but de réduire le bruit de fond d'un signal CARS, j'ai monté un dispositif épi-CARS pour la première fois applicable à des échantillons biologiques. Ce système est présenté dans le chapitre suivant.

Bibliographie

- [1] T. Ito, K. Kobayashi, U. Czarnetzki, and S. Hamaguchi, “Rapid formation of electric field profiles in repetitively pulsed high-voltage high-pressure nanosecond discharges,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 43, no. 6, p. 062001, feb 2010. [Online]. Available: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/43/6/062001/pdf>
- [2] T. Ito, T. Kanazawa, and S. Hamaguchi, “Rapid breakdown mechanisms of open air nanosecond dielectric barrier discharges,” *Physical Review Letters*, vol. 107, no. 6, p. 065002, aug 2011.
- [3] O. A. Evsin, E. B. Kupryanova, V. N. Ochkin, S. Y. Savinov, and S. N. Tskhai, “Determination of the intensities of electric fields in gases and plasmas by the CARS method,” *Quantum Electronics*, vol. 25, no. 3, pp. 278–282, mar 1995.
- [4] S. Yatom, S. Tskhai, and Y. E. Krasik, “Electric field in a plasma channel in a high-pressure nanosecond discharge in hydrogen: A coherent anti-stokes Raman scattering study,” *Physical Review Letters*, vol. 111, no. 25, pp. 1–5, 2013.
- [5] A. M. Zheltikov, N. I. Koroteev, A. N. Naumov, V. N. Ochkin, S. Y. Savinov, and S. N. Tskhai, “Measurement of electric fields in a plasma with the aid of the coherent four-wave mixing polarisation technique,” *Quantum Electronics*, vol. 29, no. 1, pp. 73–76, jan 1999.
- [6] S. N. Tskhai, D. A. Akimov, S. V. Mitko, V. N. Ochkin, A. Y. Serdyuchenko, D. A. Sidorov-Biryukov, D. V. Sinyaev, and A. M. Zheltikov, “Time-resolved polarization-sensitive measurements of the electric field in a sliding discharge by means of dc field-induced coherent raman scattering,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 32, no. 3, pp. 177–181, 2001.
- [7] H.-S. Park and O. D. Lavrentovich, “CARS Microscopy Study of Liquid Crystals,” in *Coherent Raman Scattering Microscopy*, ser. Series in Cellular and Clinical Imaging, J.-X. Cheng and X. S. Xie, Eds. CRC Press, 2012, ch. 22, p. 463.
- [8] B. G. Saar, H.-S. Park, X. S. Xie, and O. D. Lavrentovich, “Three-dimensional imaging of chemical bond orientation in liquid crystals by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Optics Express*, vol. 15, no. 21, p. 13585, 2007.
- [9] A. Griffin, *Liquid Crystals and Ordered Fluids*. Springer US, 2012, no. vol. 4, p. 91.
- [10] A. V. Kachynski, A. N. Kuzmin, P. N. Prasad, and I. I. Smalyukh, “Realignment-enhanced coherent anti-Stokes Raman scattering and three-dimensional imaging in anisotropic fluids,” *Optics Express*, vol. 16, no. 14, p. 10617, jul 2008.
- [11] F. El Bassri, “Sources lasers déclenchées nanosecondes : applications à la spectroscopie raman cohérente sous champ électrique,” Ph.D. dissertation, Université de Limoges, 2014.

- [12] U. Stumper, *Molecular Motions in Liquids: Proceedings of the 24th Annual Meeting of the Société de Chimie Physique Paris-Orsay, 2–6 July 1972*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1974, ch. Dielectric Absorption of Non-Polar Liquids in the Microwave and Far Infrared Region, pp. 655–660.
- [13] G. He and S. Liu, “Physics of Nonlinear Optics.” World Scientific, 1999, ch. 7, p. 86.
- [14] K. Kerl and H. Varchmin, “Refractive index dispersion (RID) of some liquids in the UV/VIS between 20°C and 60°C,” *Journal of Molecular Structure*, vol. 349, no. Supplement C, pp. 257 – 260, 1995.

Chapitre 4 :

Épi-CARS multiplex

Qu'elle soit dénommée *broadband* [1], *hyperspectral* [2] ou *ultrabroadband multiplex* [3] la microspectroscopie CARS basée sur l'utilisation d'un faisceau pompe (ou Stokes) monochromatique et d'une onde à spectre large a depuis longtemps démontré sa capacité à détecter, imager et quantifier des composants biologiques. Néanmoins cela s'est toujours fait dans le cadre d'une configuration expérimentale favorisant la détection d'ondes en régime copropagatif, nommée également *forward*. C'est en effet dans ces conditions de propagation que le signal anti-Stokes est le plus intense. Il est par ailleurs important de noter que ces conditions d'émission du signal CARS sont autant valables pour la réponse de l'objet d'intérêt que pour celle du solvant dans lequel il peut se trouver. Comme l'intensité du signal varie selon le carré du nombre de molécules mises en jeu, il apparaît que le solvant, par définition majoritairement représenté, participe au processus CARS de façon dominante.

Comme nous l'avons vu section 1.3.1 de cet ouvrage, la génération de signaux CARS contra propagatifs est entachée d'un désaccord de phase plus important. Ces derniers provoquent des interférences destructrices. C'est pourquoi les signaux épi-CARS sont émis par des volumes restreints. L'épi-détection permet ainsi une discrimination spatiale plus importante que la collecte de signaux CARS copropagatifs. On s'exonère ainsi de la contribution du solvant qui peut entacher les mesures CARS *forward*. Les solvants utilisés en biologie sont le plus souvent composés d'eau, aussi nous pouvons estimer que le signal CARS de la vibration de H₂O à 3215 cm⁻¹, obtenu à partir d'une onde pompe à 1064 nm et d'une onde Stokes à 1617 nm, présente une longueur de cohérence de 0,3 μm en configuration contra propagative, et de 509 μm en configuration copropagative. Ces valeurs permettent d'estimer l'ordre de grandeur d'un objet pouvant être épi-déecté.

L'épi-détection n'a été appliquée qu'une seule fois dans le cadre d'une étude de microspectroscopie M-CARS et uniquement sur un échantillon minéral : des comprimés d'indométacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien [4]. Ce que je vais présenter dans ce chapitre est la mise au point d'un système de microspectroscopie M-CARS à épi-détection applicable à un échantillon biologique. Ce dispositif réunit les avantages de l'épi-détection et de la détection d'un spectre anti-Stokes large et permet d'utiliser les méthodes d'analyse que j'ai développées dans le cas copropagatif.

Dans un premier temps je reviendrai sur l'état-de-l'art de la microspectroscopie en épi-détection. Je présenterai alors le dispositif épi M-CARS et les résultats qu'il m'a permis d'obtenir. Une comparaison des traitements numériques basés sur la méthode d'entropie maximum et la dérivation des spectres par rapport au décalage Raman sera également proposée.

4.1 État-de-l'art de la microspectroscopie épi-CARS

Dans la littérature on peut distinguer trois familles de dispositifs en fonction du type de spectre Stokes généré. Je vais les passer en revue, établir quel est leur jeu de paramètres et les avantages et les défauts qu'ils entraînent. Mais pour ce faire il faut tout d'abord faire un point sur les trois critères principaux qui influencent le choix de ces paramètres : la résolution spectrale, le rapport signal résonant sur NRB et le photodommage.

4.1.1 Résolution spectrale

Elle est fonction de la durée des impulsions laser mises en jeu lors du mélange à quatre ondes. Si l'on considère des impulsions avec une distribution gaussienne limitées par transformée de Fourier, on peut obtenir leur largeur spectrale selon cette équation [5] :

$$\tau \cdot \Delta\bar{\omega} = 0,44 \quad (4.1)$$

avec τ la durée et $\Delta\bar{\omega}$ la largeur spectrale de l'impulsion. Dans le cas idéal d'une vibration infiniment fine spectralement, la résolution spectrale de la mesure CARS sera donnée par la largeur spectrale de l'onde sonde [6], qui, dans le cas présent, est également l'onde pompe. Je noterai cette résolution $\Delta\bar{\omega}$.

À cause des propriétés de la transformée de Fourier il vient que la résolution spectrale d'un processus sera d'autant meilleure que les impulsions, limitées par transformée de Fourier, seront larges dans le domaine temporel. La demi-largeur des raies Raman et CARS, notée Γ , étant généralement de l'ordre de 10 à 20 cm^{-1} [7], il faut donc que la résolution spectrale idéale du processus CARS soit inférieure à au moins 20 cm^{-1} . La figure 4.1 donne la résolution spectrale en fonction de la durée de l'impulsion du faisceau sonde.

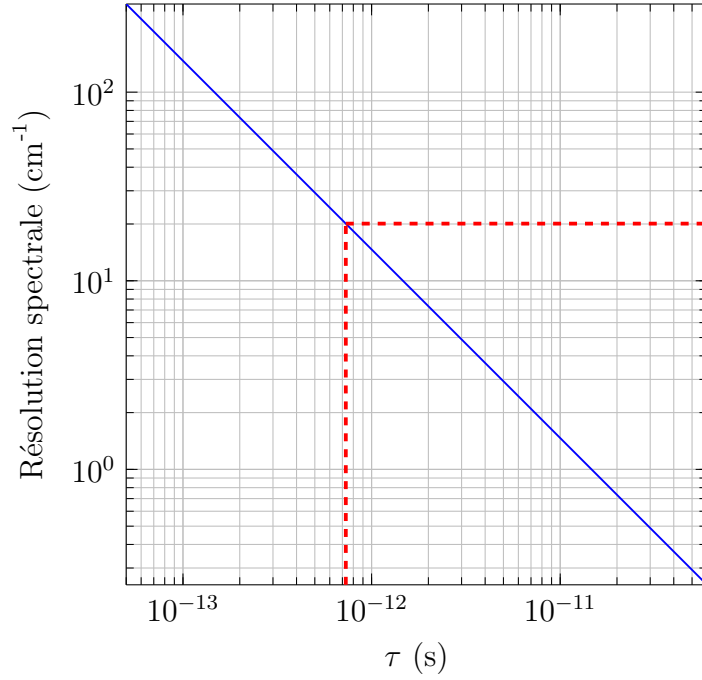


FIGURE 4.1 – Résolution spectrale de la mesure CARS en fonction de la durée de l’impulsion sonde limitée par transformée de Fourier (bleu) et mise en évidence de la durée minimale permettant de résoudre une demi-largeur de raie Raman de 20 cm^{-1} (rouge).

Nous pouvons en déduire que la durée minimale d’une impulsion limitée par transformée de Fourier permettant de résoudre des modes vibrationnels est de 0,7 ps. En deçà de cette valeur le processus perdra de sa sélectivité spectrale : la capacité à résoudre deux raies Raman proches.

4.1.2 Rapport d’intensité des signaux résonant et non résonant

La largeur spectrale des impulsions ne joue pas seulement sur la sélectivité du processus, elle influence grandement le rapport entre les signaux CARS résonant et non résonant, donc le SNR. Afin de le démontrer il nous faut revenir à l’expression de la polarisation de troisième ordre donnée équation 1.47 :

$$P^{(3)}(\omega_{aS}) = 6\varepsilon_0 \int_{-\infty}^{\infty} d\omega_{p'} \int_{-\infty}^{\infty} d\omega_S \int_{-\infty}^{\infty} d\omega_p \chi^{(3)}(\omega_{aS}; \omega_{p'}, \omega_S, \omega_p) \times E(\omega_{p'})E(\omega_S)E(\omega_p)\delta(\omega_{p'} - \omega_S + \omega_p - \omega_{aS}). \quad (4.2)$$

L’intensité du signal anti-Stokes va être liée à $P^{(3)}$ de telle manière :

$$I(\omega_{aS}) \propto \int_{-\infty}^{\infty} \left| P^{(3)}(\omega_{aS}) \right|^2 d\omega_{aS}. \quad (4.3)$$

Dans cette équation l'impact de la largeur spectrale des impulsions va intervenir dans l'expression gaussienne des champs E tels que, par exemple, pour le champ pompe :

$$E(\omega_p) = \frac{1}{\sqrt{\Delta\bar{\omega}_p}} \exp\left(\frac{-2(\omega_{p0} - \omega_p)^2 \ln 2}{\Delta\bar{\omega}_p^2}\right) \quad (4.4)$$

avec ω_{p0} la fréquence angulaire centrale et ω_p la fréquence angulaire selon laquelle devra se faire l'une des intégrations de l'équation 4.2.

Finalement en admettant que les intensités des signaux résonant et non résonant, $I_R(\omega_{aS})$ et $I_{NR}(\omega_{aS})$, sont obtenues en remplaçant dans l'équation 4.3 $\chi^{(3)}$ par $\chi_R^{(3)}$ et $\chi_{NR}^{(3)}$ respectivement, il nous suffit d'exprimer ces deux susceptibilités pour avoir les équations qui nous serviront à trouver le rapport $I_R(\omega_{aS})/I_{NR}(\omega_{aS})$. Pour ce faire on peut utiliser l'expression de $\chi_R^{(3)}$ de l'équation 1.56b, soit :

$$\chi_R^{(3)} = \frac{A}{(\omega_p - \omega_S) - \Omega + i\Gamma} \quad (4.5)$$

avec Ω le décalage Raman de la vibration sondée. Quant à $\chi_{NR}^{(3)}$, j'ai expliqué section 1.2.1 que cette susceptibilité était, en première approximation, indépendante des fréquences angulaires des ondes excitatrices. Afin d'effectuer une simulation numérique du rapport $I_R(\omega_{aS})/I_{NR}(\omega_{aS})$ il me faut donner des valeurs aux différentes grandeurs impliquées. Considérons ici le cas de la vibration moléculaire du polystyrène à $\Omega = 1601 \text{ cm}^{-1}$, $\Gamma = 4,6 \text{ cm}^{-1}$ et $|A/\chi_{NR}^{(3)}| = 4 \text{ cm}^{-1}$ [5]. Afin d'atteindre cette vibration, si le faisceau pompe a pour longueur d'onde 1064 nm (soit un nombre d'onde ω_p de $9398,5 \text{ cm}^{-1}$), la longueur d'onde du faisceau Stokes est de 1283 nm (soit un nombre d'onde ω_S de $7797,5 \text{ cm}^{-1}$). À partir de ces données j'ai pu calculer numériquement le rapport $I_R(\omega_{aS})/I_{NR}(\omega_{aS})$ en fonction de la durée de l'impulsion τ et de la résolution spectrale du processus CARS $\Delta\bar{\omega}$. Les résultats de ces calculs sont présentés figure 4.2.

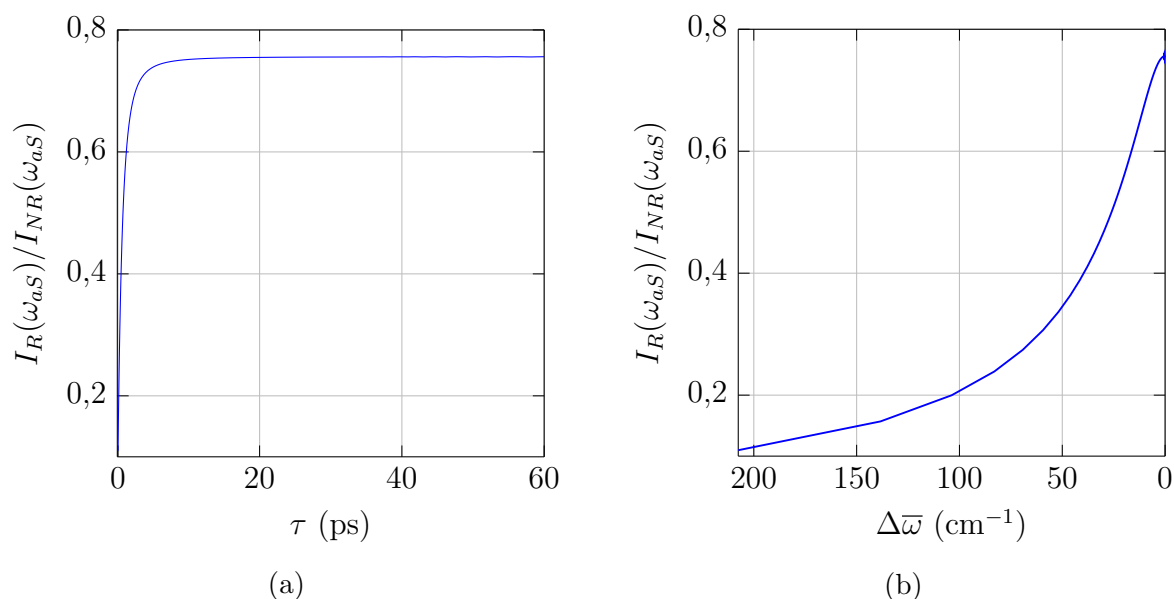


FIGURE 4.2 – Variation du rapport entre les intensités du signal résonant et non résonant $I_R(\omega_{as})/I_{NR}(\omega_{as})$ en fonction (a) de la durée de l’impulsion sonde limitée par transformée de Fourier τ et (b) de la résolution spectrale idéale du processus CARS $\Delta\bar{\omega}$.

Nous nous apercevons que l’évolution de la courbe de la figure 4.2a est monotone en fonction de la durée de l’impulsion et qu’elle tend vers une valeur maximale de $I_R(\omega_{as})/I_{NR}(\omega_{as})$ de 0,7561. Si nous fixons la limite acceptable du rapport entre intensités résonante et non résonante à 99 % de cette valeur, nous obtenons un nouveau minimum de la durée de l’impulsion pour $\tau = 7,65$ ps. En comparaison, la durée minimale de $\tau = 0,7$ ps mentionnée précédemment correspondait à un rapport de 0,4693, soit 62 % de la valeur maximale. Cette nouvelle limite temporelle de 7,65 ps nous permet ainsi de fixer l’un des paramètres de la source laser. La sensibilité de la mesure est ainsi assurée : le signal résonant se distingue plus facilement du bruit non résonant pour des impulsions plus longues que cette valeur seuil.

4.1.3 Photodommage

Le photodommage regroupe l’ensemble des phénomènes qui peuvent altérer, voire détruire, un échantillon biologique sous l’effet d’un champ optique. Afin de les minimiser, on utilise, en microscopie, des longueurs d’onde pour lesquelles les milieux biologiques sont transparents, ce qui permet, en outre, de pénétrer plus profondément dans l’échantillon [8]. Cette fenêtre optique se situe dans le proche infrarouge, de 700 à 1100 nm : entre les bandes d’absorption de la plupart des chromophores biologiques situées dans le visible et l’absorption de l’eau qui augmente avec la longueur d’onde [9, 10] comme on peut le voir sur la figure 4.3.

Hélas, même après avoir sélectionné les longueurs d’onde adéquates, le photodommage

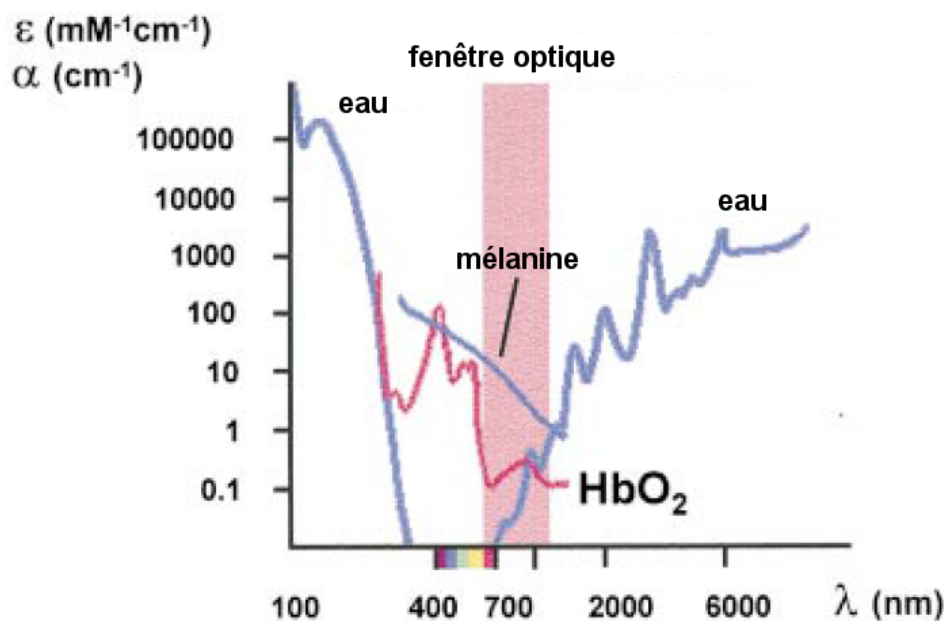


FIGURE 4.3 – Spectres d’absorption des principaux absorbants intracellulaires. Les coefficients d’extinction moléculaire, ε , de l’hémoglobine oxygénée (HbO_2) et de la mélanine, et le coefficient d’absorption de l’eau, α , sont montrés. Image tirée de l’article de K. König [10].

peut toujours se produire. On le mesure grâce au taux de photodommage R défini comme l’inverse de la durée d’exposition conduisant à un dommage au niveau de l’échantillon. Ce dernier varie fortement selon le type de matériel biologique mis en jeu [11]. Néanmoins nous pouvons établir certaines règles générales quant à leur comportement.

Il existe trois grands types de mécanismes à la base du photodommage [12]. Le premier est un processus linéaire résultant de l’absorption d’un seul photon infrarouge par l’eau. La température de l’échantillon peut ainsi augmenter et provoquer sa détérioration [13]. Il a été observé une relation linéaire entre la puissance moyenne du champ appliqué et le taux de photodommage dû à ce type de mécanisme [9]. De là il en résulte une loi inverse entre le seuil de photodommage et la durée des impulsions pour une puissance moyenne et une fréquence de répétition données.

Le deuxième processus menant au photodommage a pour origine l’absorption multiphotonique. Selon la longueur d’onde des faisceaux incidents, une excitation à deux photons peut être similaire à l’excitation produite par une radiation ultraviolette. Dans le cas d’une cellule vivante, cela provoque la photoactivation de chromophores qui produisent alors des dérivés réactifs de l’oxygène (ROS pour *Radical Oxygen Species*), qui vont eux-mêmes engendrer des dommages biochimiques en cascade dans la cellule [14]. Dans le cas de la microscopie par fluorescence à deux photons, il est prouvé que la non-linéarité de ce phénomène est de 2,5 et que le paramètre le conditionnant est la puissance crête des impulsions laser [15].

Le dernier mécanisme est le claquage diélectrique qui peut apparaître à la faveur d'un effet multiphotonique d'ordre 4 ou d'ordre supérieur, donc lorsqu'une forte puissance crête laser est utilisée [10]. Sous l'action du champ, le matériel de nature diélectrique se ionise, devenant ainsi conducteur et faisant apparaître un plasma. L'absorption du milieu augmente alors, amplifiant le phénomène jusqu'à détérioration complète de l'objet étudié [14].

Pour résumer, nous pouvons éviter les phénomènes de dommage thermique en ayant recours à des sources laser impulsives afin de réduire la puissance moyenne impliquée, tout en produisant une puissance crête exploitable lors de processus multiphotoniques tels que le CARS. Néanmoins cette puissance crête peut être utilisée par les processus d'absorption multiphotonique menant à la production de ROS ou à un claquage optique. De plus, dans le cas particulier du CARS il vient s'ajouter un deuxième type d'absorption : l'absorption induite par vibration Raman. Après avoir été excitées par les impulsions laser, les vibrations moléculaires fournissent de l'énergie qui assiste l'excitation électronique due aux absorptions multiphotoniques et augmente ainsi les photodommages [16].

Chen *et* Lim ont montré que si la non-linéarité du phénomène menant au photodommage était plus faible que celle du processus d'imagerie, pour la même puissance moyenne il était préférable d'utiliser une fréquence de répétition plus basse et une puissance crête plus importante [17]. Ainsi pour le CARS, qui est un processus d'ordre trois, le deuxième type de mécanisme menant au photodommage, l'absorption multiphotonique d'ordre 2,5 provoquant des dommages biochimiques, pourrait être évitée en choisissant une source laser avec une fréquence de répétition faible. Il a été prouvé par ailleurs, toujours dans le cas du CARS, que pour un signal constant, les taux de photodommages linéaire et non linéaire augmentaient avec le taux de répétition [11].

Il a été démontré que le taux de photodommage R augmentait plus vite que l'intensité du signal issu du processus d'imagerie lorsque la durée de l'impulsion était réduite [15].

De toutes ces considérations nous pouvons tirer quelques conclusions. En supposant que la puissance moyenne \bar{P} nous permettant d'éviter le photodommage linéaire est caractérisée, nous pouvons déterminer la puissance crête P idéale à partir de la durée d'impulsion τ et de la fréquence de répétition f_r telle que :

$$P = \frac{\bar{P}}{\tau f_r}. \quad (4.6)$$

Nous avons vu que cette puissance crête ne doit pas être trop élevée à cause du claquage optique. Pour la réduire nous pouvons donc choisir des paramètres τ ou f_r plus importants. Ayant vu que le taux de photodommage non linéaire augmentait plus vite que le signal d'imagerie lorsque τ était réduit, le choix évident est donc de sélectionner une durée d'impulsion τ plus longue afin d'éviter les photodommages. Quant à f_r , il est prouvé que

sa diminution éloigne également le risque de dommage. Le taux de répétition minimum sera alors donné par le minimum d'intensité du signal CARS $I(\omega_{aS})$ voulu tel que :

$$I(\omega_{aS}) \propto P_p^2 P_S \tau f_r \quad (4.7)$$

avec P_p et P_S les puissances crêtes respectives des ondes pompe et Stokes.

Nous savons désormais dans quel sens actionner les leviers que sont la durée d'impulsion et le taux de répétition de la source laser que nous allons utiliser pour générer un signal CARS. Il nous reste à fixer les limites maximales des puissances crête et moyenne. Comme nous l'avons dit, cela va dépendre du type d'échantillon mais nous pouvons nous en faire une idée en étudiant la littérature concernant la microspectroscopie CARS. Par exemple lors d'une étude de tissu de foie de souris, une puissance crête de l'ordre de 130 kW ($\tau_P = 3,4$ fs et $\tau_S = 16$ fs pour $\bar{P}_p = 16$ mW et $\bar{P}_S = 9,5$ mW respectivement, et $f_r = 40$ MHz) a été utilisée afin de générer des signaux M-CARS en régime copropagatif [18]. Dans une étude épi-CARS mono-fréquence de dent humaine il a été utilisé des puissances moyennes jusqu'à 20 mW et 120 mW pour les ondes pompe et Stokes respectivement [19]. Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif afin d'illustrer la diversité des choix qui s'offrent à nous lorsque l'on veut sélectionner un jeu de paramètres pour la construction d'un microspectromètre CARS. L'utilisation d'une source paramétrable en termes de puissance moyenne, puissance crête et taux de répétition devrait nous permettre d'optimiser les conditions d'excitation d'un échantillon tout en évitant le seuil de dommage par effet plasma.

4.1.4 Comparaison des dispositifs épi-CARS

Je présente trois catégories de dispositifs CARS qui ont été implémentés en configuration contrapropagative.

Le premier dispositif utilise deux sources laser dont les longueurs d'onde sont variables. On utilise typiquement des lasers à base de saphir dopé titane qui permettent, grâce à la large bande de gain des ions titane Ti^{3+} , de sélectionner une vaste gamme de longueurs d'onde. En sélectionnant deux longueurs d'onde en fonction de la fréquence de la vibration à étudier on peut alors générer le signal anti-Stokes correspondant. Les impulsions étant de durée identique, on assure ainsi l'efficacité de la génération de signaux CARS. Le désavantage est que ce genre de dispositif doit s'accompagner d'un système de synchronisation des lasers afin d'assurer le recouvrement temporel des impulsions.

Le deuxième système repose, lui, sur un seul laser. L'impulsion va être scindée en deux, puis, l'une des deux sera conduite vers un oscillateur paramétrique optique (OPO) qui va décaler sa longueur d'onde. En utilisant une ligne à retard sur le chemin de l'autre impulsion on peut alors synchroniser facilement les deux ondes.

Ces deux méthodes présentent l'avantage de concentrer la puissance des impulsions sur une seule signature vibrationnelle, ce qui permet d'obtenir des signaux CARS intenses et donc de réduire le temps d'acquisition. Ce temps peut être encore minimisé si on utilise des capteurs sensibles tels que des photomultiplicateurs. Malheureusement cette restriction à l'étude d'une unique transition vibrationnelle représente une limitation forte du système d'analyse. La résolution spectrale dépend alors du type de filtre utilisé, ce qui peut, dans certains cas, fortement la limiter. Dans le cas où l'on veuille obtenir un spectre complet de la zone C-H à la zone d'empreinte digitale, on perd alors le temps gagné par augmentation de l'efficacité de génération de signaux CARS. Pour résoudre ce problème il faut recourir à un signal Stokes avec un très large spectre.

C'est ce qui est utilisé dans la troisième et dernière technique de mesure CARS dont nous avons déjà parlé chapitre 2 : le CARS multiplex. De la même manière que la deuxième méthode, on utilise un seul faisceau laser et l'on divise l'impulsion femtoseconde en deux voies. La première est dirigée vers une fibre optique où un continuum de lumière allant de 790 nm à 1100 nm est généré, soit une réponse CARS allant de 81 cm^{-1} à 3648 cm^{-1} pour une onde pompe à 785 nm. La seconde voie est suivie par l'impulsion pompe qui doit parcourir une ligne à retard afin de compenser le délai pris par l'impulsion dans la première voie. L'avantage de ce dispositif réside dans le fait qu'une multitude de signatures vibrationnelles peuvent être sondées. Néanmoins, l'utilisation d'impulsions femtosecondes ne permet pas d'obtenir la synchronisation simultanée de toutes les impulsions à chaque longueur d'onde. Un balayage temporel du spectre est alors de nouveau nécessaire ce qui augmente fortement le temps d'acquisition total. L'énergie par longueur d'onde est également réduite et ne peut être augmentée du fait de la section réduite du cœur de la fibre optique. L'augmentation du temps d'exposition est alors nécessaire afin d'obtenir une signature globale significative. Enfin, l'utilisation d'une onde Stokes large bande nécessite l'emploi d'un spectromètre et d'une caméra CCD dont l'efficacité quantique est d'ordinaire inférieure à celle d'un photomultiplicateur. Il apparaît donc que le temps d'acquisition de cette méthode est plus long que ceux des autres dispositifs, même si l'obtention d'un spectre CARS large et spectralement résolu permet une analyse plus systématique de l'ensemble des transitions vibrationnelles Raman.

À titre d'exemple, les paramètres de l'état-de-l'art de ces trois types de systèmes de microspectroscopie épi-CARS sont donnés dans le tableau 4.1.

Publications	[20]	[21]	[4]
Type de sources	titane:saphir $\times 2$	titane:saphir + OPO	M-CARS
τ pompe et Stokes	5 ps	5 ps et 7 ps	70 fs
f_r	80 MHz	80 MHz	80 MHz
\bar{P} pompe et Stokes	40 mW et 20 mW	100 mW et 50 mW	18 mW
P pompe et Stokes	100 W et 50 W	250 W et 89 W	3,2 kW
Type d'échantillon	cellules d'endothélium et de muscle	cellules épithéliales colorectales	anti-inflammatoire non stéroïdien
Temps d'acquisition	< 2 ms/pixel	1,2 μ s/pixel	100 ms à 1 s
Résolution spectrale	4,2 cm^{-1}	3,6 cm^{-1}	8 cm^{-1}

Tableau 4.1 – État-de-l'art des dispositifs de microspectroscopie épi-CARS.

Nous connaissons désormais les conséquences qu'implique le choix du dispositif de microspectroscopie épi-CARS. En fonction de la durée des impulsions laser nous pouvons influencer la sélectivité et la sensibilité de la mesure. Les puissances moyennes et crêtes investies peuvent générer des photodommages et empêcher l'étude d'objets biologiques.

Nous avons finalement déterminé les paramètres qui nous permettraient d'avoir la meilleure résolution spectrale, le rapport signal résonant sur NRB le plus haut, et le signal anti-Stokes multiplex le plus intense sans implication de photodommages. C'est ce que je vais présenter dans la partie suivante.

4.2 Expériences M-CARS et SHG épi-détectées

Sur les bases du microspectromètre M-CARS *forward* présenté section 2.2 j'ai développé un système d'imagerie par épi-détection de signaux M-CARS et de second harmonique (SH). Afin de prouver que ce procédé bi-modal est adapté à l'imagerie biologique j'ai étudié un fragment d'os pariétal de souris. J'ai ensuite comparé les images obtenues par ce procédé avec celles issues de mesures de fluorescence à deux-photon afin d'assurer la validité de notre dispositif. Avant d'exposer ces résultats, et de les comparer à l'état-de-l'art dans le domaine de l'épi-CARS, je vais décrire l'arrangement expérimental qui m'a permis de les obtenir. Après cela je pourrai confronter les deux méthodes de traitement numérique des données que nous avons déjà rencontrées 2.3.2 et 3.3 : respectivement la MEM et la dérivée des spectres M-CARS.

4.2.1 Dispositif expérimental

Afin de répondre aux exigences de résolution spectrale et de SNR listée plus haut, j'ai sélectionné une source commerciale modifiée issue de la compagnie Spark Laser.

Elle peut délivrer des impulsions à 1064 nm d'une durée de 60 ps avec un état de polarisation linéaire. Grâce à cette durée d'impulsion on atteint une résolution spectrale idéale théorique de $0,35 \text{ cm}^{-1}$ et on limite également l'impact de la dispersion temporelle de la fibre optique lors de la génération du supercontinuum. Dans ces conditions, toutes les longueurs d'onde infrarouges engendrées entre 1000 nm et 1700 nm se recouvrent temporellement ce qui permet une détection large bande rapide du signal anti-Stokes. L'autre atout de cet appareil est sa fréquence de répétition variable entre 20 kHz et 2 MHz. Grâce à cela j'ai pu déterminer un régime de fonctionnement idéal à 110 kHz permettant d'éclairer l'échantillon avec une forte puissance crête tout en restant en deçà du seuil d'apparition de l'absorption multiphotonique et *a fortiori* du processus de claquage optique au niveau de l'échantillon. J'ai également utilisé une puissance moyenne qui m'exonère du soucis d'échauffement thermique au niveau de l'échantillon (66 mW pour la pompe et 4 mW pour le Stokes).

Cette source est donc à la base du système d'épi-détection M-CARS et SHG illustré figure 4.4.

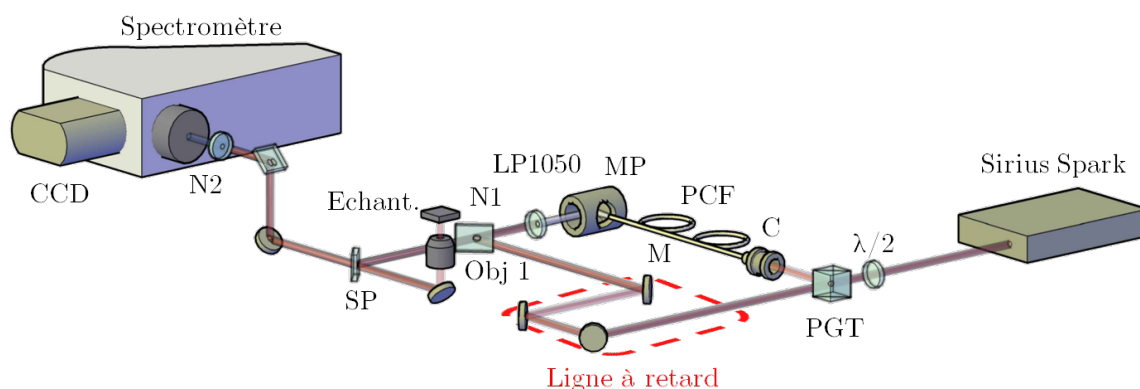


FIGURE 4.4 – Schéma du dispositif expérimental de mesure M-CARS et SHG épi-déteectée. Légende : C, collimateur; Echant., échantillon; LP, filtre passe-haut; M, miroir; MP, miroir parabolique; N1, miroir dichroïque *notch*; N2, filtre *notch*; Obj 1, objectif Olympus x60; PGT, polariseur de Glan-Taylor; SP, miroir dichroïque passe-bas; $\lambda/2$, lame demi-onde.

En utilisant un lame demi-onde et un polariseur de Glan-Taylor (PGT), une partie de l'impulsion laser est dirigée vers une fibre à cristal photonique PCF 2 afin de générer une onde supercontinuum entre 600 nm et 1650 nm. L'autre partie de l'impulsion qui est désignée comme onde pompe, se propage vers une ligne-à-retard dans le but de compenser la différence de chemin optique avec l'onde Stokes, permettant ainsi d'assurer leur synchronisation temporelle. Un filtre optique passe-haut à 1050 nm (Thorlabs, FEL1050) est placé sur le parcours du supercontinuum pour supprimer les longueurs d'onde pouvant être confondues avec le signal anti-Stokes : sa densité de puissance spectrale au niveau de

l'échantillon est représentée sur la figure 4.5.

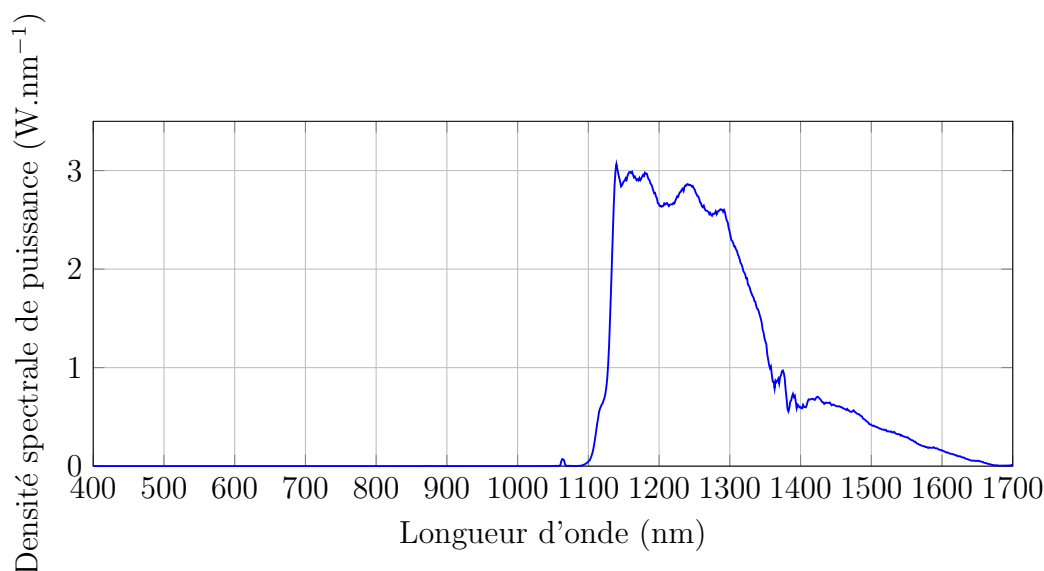


FIGURE 4.5 – Densité spectrale de puissance du supercontinuum obtenue avec la source MS ($f_r = 110$ kHz) et la fibre PCF 2 au niveau de l'échantillon ($\overline{P}_{Stokes} = 4$ mW).

Nous constatons que la densité spectrale est maximale dans la zone allant de 1150 nm à 1300 nm, c'est-à-dire plus de 2 W.nm^{-1} pour générer un signal anti-Stokes allant de 700 cm^{-1} à 1700 cm^{-1} , correspondant à la majeure partie de la zone d'empreinte digitale. Pour les longueurs d'onde de 1400 nm à 1600 nm qui correspondent à un signal CARS allant de 2555 cm^{-1} à 3150 cm^{-1} , la densité spectrale est proche de $0,5 \text{ W.nm}^{-1}$. Cette configuration permet ainsi de maximiser les réponses anti-Stokes dans la zone d'empreinte digitale au détriment de la zone C-H (de 2700 cm^{-1} à 3000 cm^{-1}), dont les réponses anti-Stokes sont naturellement importantes.

Les deux faisceaux sont ensuite spatialement combinés grâce à un miroir dichroïque *notch* (Semrock, NFD01-1064-25x36) qui réfléchit la pompe dans la direction de propagation du Stokes. Puis, les faisceaux voyagent ensemble vers un miroir dichroïque passe-bas à 1000 nm (Thorlabs, DMSP1000R) qui les réfléchit vers un objectif de microscope (Olympus, UPlanSApo 60x O.N. = 1,2 immersion dans l'eau) afin de les focaliser dans l'échantillon. Le signal contra propagatif anti-Stokes, collimaté par le même objectif, du fait de ses longueurs d'onde plus basses, est le seul à être transmis par le miroir dichroïque passe-bas dans la direction du spectromètre (Horiba, LabRam Evolution). Néanmoins, un filtre *notch* à 1064 nm (Thorlabs, NF1064-44) est tout de même inséré avant l'entrée dans le spectromètre afin de s'assurer qu'aucun reliquat de signal de pompe ne vienne provoquer des artefacts au niveau de la détection. Les différentes longueurs d'onde anti-Stokes sont ensuite diffractées par un réseau (Horiba, 520 29, 600 sillon.mm⁻¹) et réparties sur la caméra CCD (Horiba, Synapse). Le filtre *notch* à 1064 nm pouvant

rejeter les longueurs d'onde jusqu'à 1086 nm, les spectres anti-Stokes que je peux mesurer s'étendent de 190 cm^{-1} à 3340 cm^{-1} .

Afin de pouvoir manipuler des échantillons biologiques provenant de souris de laboratoire nous avons reçu l'aval du comité de protection et d'éthique animal local (numéro d'enregistrement 15-2015-15, MoNaPulse et CRAMPON). Toutes les protections et procédures expérimentales ont été conduites conformément à la législation française, décret n° 2013-118 du 1^{er} février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques en accord avec les directives de la communauté européenne (directive 2010/63/UE pour la protection et l'utilisation d'animaux de laboratoire). Différents types de souris âgées de douze semaines ont été disséqués immédiatement après euthanasie : un premier type sauvage sans marquage ; le second type était représenté par une souris SwissTg(CAC-EGFP)1Osb génétiquement modifiée afin que n'importe quelle cellule puisse générer le fluorophore GFP (*Green Fluorescent Protein*) ; et enfin le dernier type fut la souris B6.CgTg(Col1a1*2.3GFP)1Rowe/J, génétiquement modifiée afin que seules les cellules dans la lignée ostéogénique (comprenant les quatre types de cellules du tissu osseux) produisent de la GFP. À l'aide d'une fraise de dentiste, les fragments d'os crânien des souris ont été prélevés sur la région pariétale, schématisée figure 4.6.

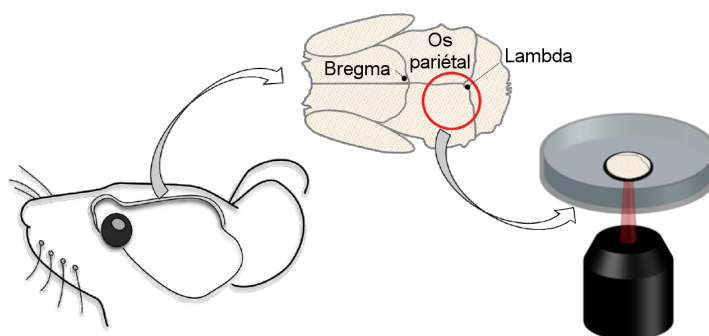


FIGURE 4.6 – Schéma du fragment d'os pariétal de souris étudié.

Les images à deux-photons ont été obtenues par Sylvia M. Bardet Coste à l'aide d'un microscope (Olympus, BX61WI/FV1200MPE) couplé à un laser femtoseconde (Coherent, Chameleon Ultra II).

Un fragment d'os d'une souris de type sauvage a subi une contre-coloration par immersion de dix minutes dans un colorant fluorescent ciblant n'importe quel type de cellules : la Rhodamine B (R6626, Sigma-Aldrich, lem 627 nm).

4.2.2 Résultats

Grâce à ce dispositif d'épi-détection M-CARS et SHG j'ai cartographié une surface de $260\text{ }\mu\text{m}$ par $260\text{ }\mu\text{m}$ avec un pas de $1\text{ }\mu\text{m}$ (soit 68121 points) du fragment d'os pariétal de

souris de type sauvage. Pour palier les limitations de mon système d'analyse j'ai réalisé trois acquisitions différentes : de 700 cm^{-1} à 1200 cm^{-1} avec un temps d'exposition de 5 ms/pixel ; de 2500 cm^{-1} à 3200 cm^{-1} avec un temps d'exposition de 5 ms/pixel ; et de 510 nm à 550 nm avec un temps d'exposition de 1 ms/pixel . Pour chaque pixel j'ai réalisé deux accumulations afin de détecter et corriger les pics aléatoires qui auraient pu polluer le spectre. Les spectres épi-CARS bruts de ces zones spectrales avec les coordonnées des points où ils ont été acquis sont donnés figure 4.7.

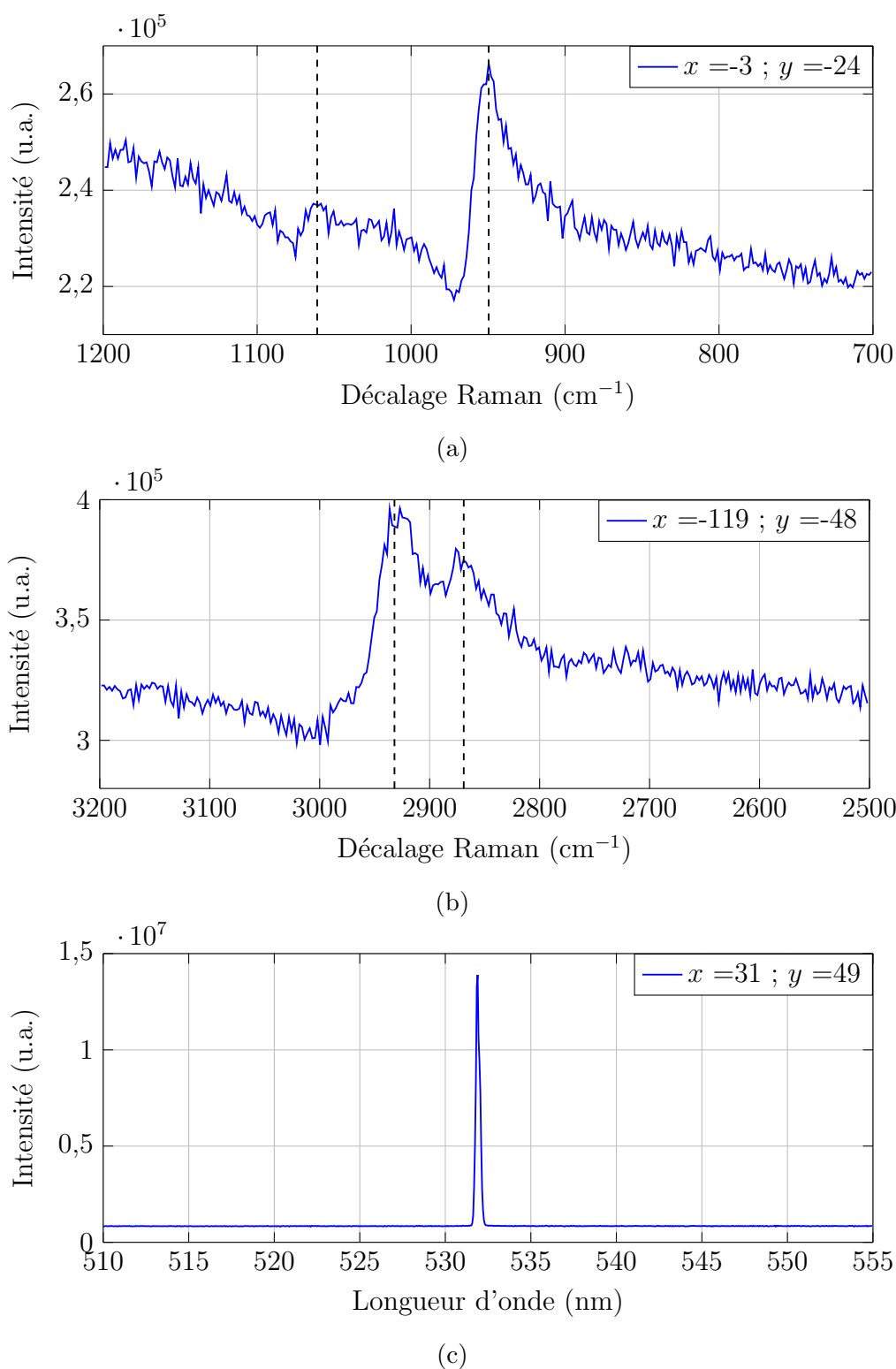


FIGURE 4.7 – Spectres M-CARS bruts épi-déTECTÉS du fragment d'os pariétal de souris cartographié de (a) la zone CH, (b) la zone d'empreinte digitale et (c) la réponse de second harmonique épi-déTECTÉE. Les coordonnées des points où ont été acquis les spectres sont données en μm dans les cartouches.

Dans la zone d’empreinte digitale de 700 cm^{-1} à 1200 cm^{-1} nous observons deux profils dispersifs à 950 cm^{-1} et 1061 cm^{-1} indiqués par les lignes en pointillées sur la figure 4.7a. Ils mettent en évidence la présence de vibrations : respectivement, l’elongation symétrique du PO_4^{3-} et l’elongation du CO dans le plan du CO_3^{2-} . Ces liaisons chimiques sont caractéristiques de cristaux d’hydroxyapatite [22]. Dans la région des liaisons CH sur la figure 4.7b, deux autres pics d’apparence dispersive à 2869 cm^{-1} et 2932 cm^{-1} traduisent la réponse de vibrations : respectivement, les elongations symétrique et asymétrique du CH_3 . Ces dernières sont toutes deux les preuves de la présence de protéines [23]. Enfin, nous constatons figure 4.7c une intense réponse au second harmonique de la pompe à 532 nm qui provient d’un matériel non centrosymétrique typique : du collagène fibreux [23].

J’ai traité les spectres CARS de chacun des points des cartographie avec les deux méthodes de traitement numérique que j’ai déjà présentées précédemment : la MEM et la dérivée de spectre par rapport au décalage Raman. La première méthode me permet d’extraire la partie imaginaire de la susceptibilité d’ordre trois $\chi^{(3)}$, alors que la deuxième permet d’amoinrir la contribution du bruit non résonant du fait de sa faible variation selon la fréquence, contrairement au signal résonant. Si mon algorithme de MEM a directement utilisé les spectres CARS bruts, j’ai, pour l’algorithme de dérivation, dû passer par un lissage des spectres via un filtre de Savitzky-Golay. Néanmoins je me suis assuré que la fenêtre de filtrage n’était pas trop grande afin de ne pas perdre d’information durant le processus d’analyse.

Les résultats des deux traitements sur les spectres bruts de la figure 4.7 sont présentés figure 4.8.

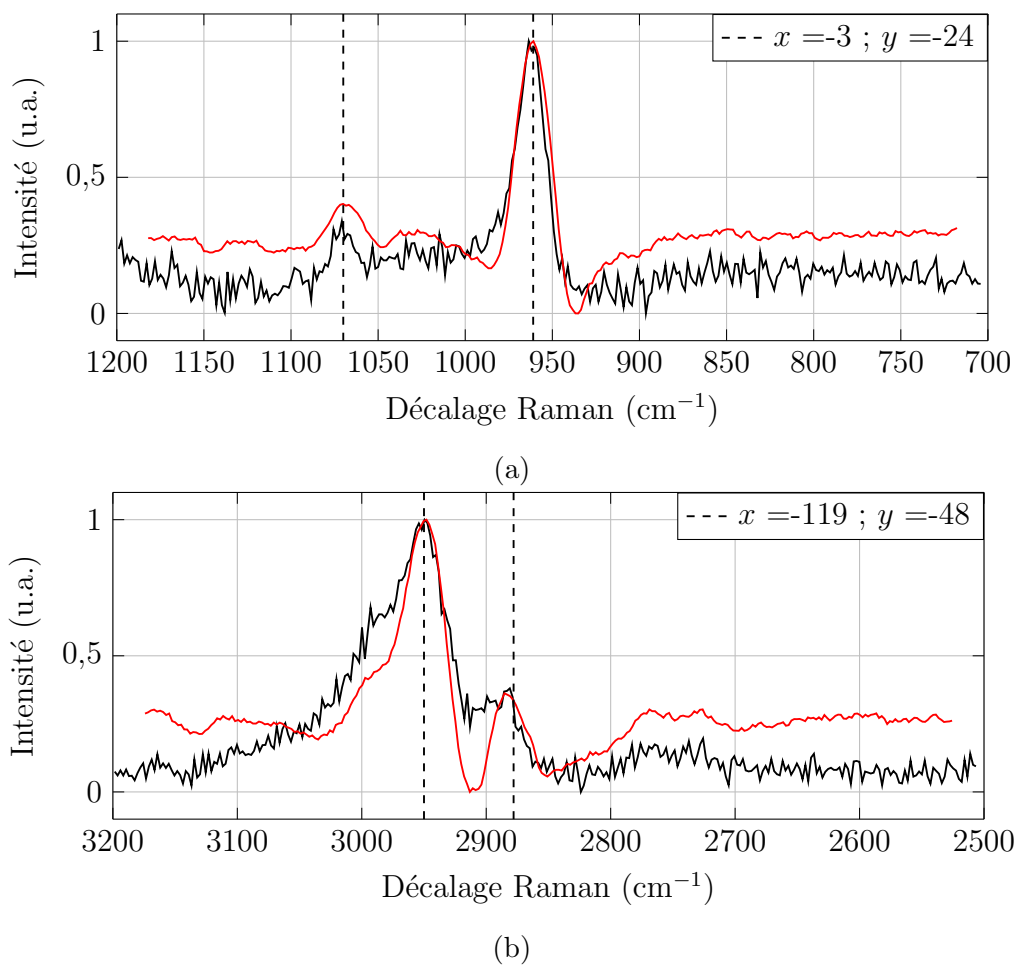


FIGURE 4.8 – Parties imaginaires de $\chi^{(3)}$ normalisées et corrigées de la ligne de base (courbes noires) et dérivées des spectre CARS par rapport au décalage Raman (courbes rouges) de (a) la zone CH, (b) la zone d’empreinte digitale.

Nous observons, pour les deux méthodes, que le caractère dispersif des pics CARS a disparu, ce qui atteste du fait que l'impact du NRB a bien été corrigé. Les caractéristiques spectrales des vibrations ont été conservées mais correspondent désormais aux positions des raies Raman spontanées. Les pics sont désormais à des positions qui correspondraient d'avantage à celles de spectres de diffusion Raman spontanée. Pour chacun des traitements les décalages Raman des maxima sont désormais à 961 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 2878 cm^{-1} et 2950 cm^{-1} pour les elongations symétriques de PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , CH_3 et asymétrique de CH_3 respectivement. Si les résultats entre les deux algorithmes sont comparables en terme d'information fournie, je dois noter que le temps de traitement de la dérivée est quatre fois plus court que celui de la MEM : $0,25\text{ s/spectre}$ contre 1 s/spectre .

À chacun des points de la cartographie, j'ai intégré le signal sur une bande de 20 cm^{-1} autour des quatre pics témoignant de la présence de vibrations pour les trois types de spectres CARS : brut, corrigé par la MEM et dérivé par rapport au décalage Raman. Les douze distributions normalisées obtenues sont présentées figure 4.9.

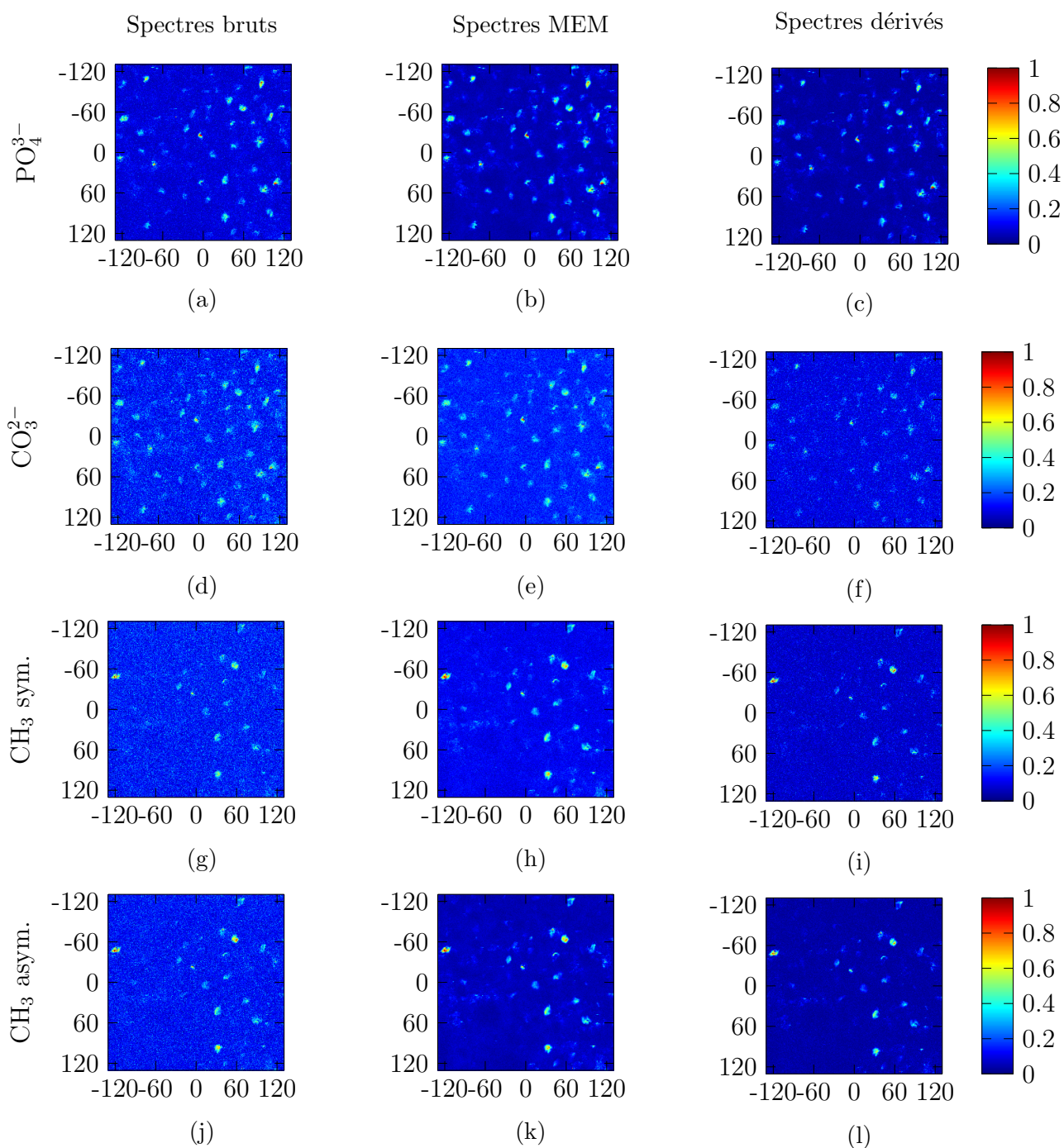


FIGURE 4.9 – Distributions normalisées de l'intégration des signaux CARS provenant des vibrations symétriques (a-c) PO_4^{3-} , (d-f) CO_3^{2-} , (g-i) CH_3 et (j-l) asymétrique CH_3 . Chaque colonne représente un type de traitement numérique différent, de gauche à droite : spectres CARS bruts, corrigés par la MEM et dérivés par rapport au décalage Raman.

Nous observons que les répartitions des signaux CARS des vibrations PO_4^{3-} et CO_3^{2-} sont similaires. La réponse du PO_4^{3-} est cependant plus nette, comme cela était illustré sur les spectres CARS. De la même manière la répartition de l'intensité des signaux anti-Stokes des elongations symétrique et asymétrique du CH_3 est semblable, avec une réponse plus

marquée de l'élongation asymétrique. Nous notons que ces vibrations CH_3 font apparaître moins d'objets que les vibrations PO_4^{3-} et CO_3^{2-} même si des colocalisations sembleraient exister. Cela attesterait d'une origine commune partielle de ces quatre vibrations.

Un signal parasite sur l'ensemble des cartographies issues de spectres bruts, et absents des cartographies construites sur la base des spectres corrigés par la MEM ou dérivés, nous prouve que ces deux méthodes permettent de réduire le bruit des signaux CARS. Nous constatons également que les cartographies basées sur la dérivée apparaissent plus foncées que celles exploitant des spectres corrigés par la MEM. Cela pourrait témoigner du fait que la dérivée discrimine plus sévèrement les faibles signaux CARS des réponses intenses.

Afin de comparer les résultats de la MEM et de la dérivée, les histogrammes des pixels, avec une intensité allant de 0 à 0,30 pour les quatre vibrations, sont présentés figure 4.10. Les moyennes et les écarts-types de tous les pixels sont, eux, donnés dans le tableau 4.2.

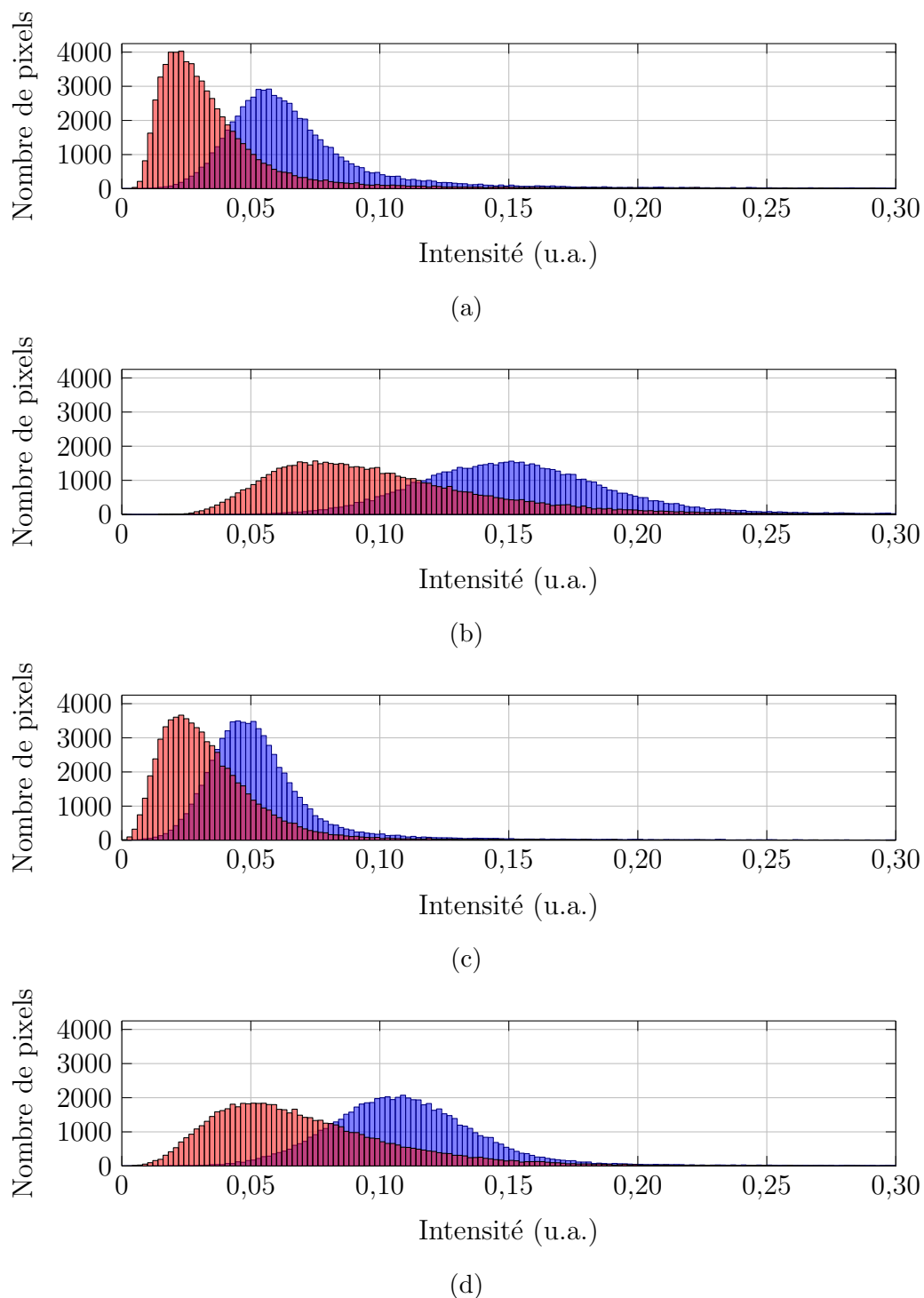


FIGURE 4.10 – Répartitions des pixels des quatre cartographies provenant des vibrations symétriques (a) PO_4^{3-} , (b) CO_3^{2-} , (c) CH_3 et (d) asymétrique CH_3 selon les traitements par la MEM (barres bleues) et la dérivée (barres rouges).

Cartographie	MEM		Dérivée	
	Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type
ν sym. PO_4^{3-}	0,062	0,057	0,041	0,048
ν sym. CO_3^{2-}	0,157	0,049	0,103	0,049
ν sym. CH_3	0,114	0,046	0,074	0,047
ν asym. CH_3	0,059	0,047	0,038	0,039

Tableau 4.2 – Tableau des moyennes et des écart-types des intensités des pixels des quatre cartographies selon les traitements MEM et dérivée.

Les pixels avec des intensités allant de 0 à 0,30 représentent le bruit de la mesure. La largeur des histogrammes donne une indication sur le contraste de la mesure. Nous constatons que les largeurs des histogrammes recensant les pixels issus de la MEM sont légèrement supérieures à ceux issus des spectres dérivés. Une autre grandeur qui témoigne également de cette capacité de distinction des signaux est l'écart-type. J'ai ainsi calculé les écarts-types des histogrammes des deux méthodes pour chaque vibration. Nous constatons que ceux de la MEM sont tous supérieurs ou égaux à ceux de la dérivée, excepté dans le cas de la vibration CH_3 , où l'écart-type est légèrement inférieur. Les largeurs des histogrammes et les écarts-types mettent ainsi en évidence le fait que la MEM et la dérivée ont une même capacité de contraste des signaux, même s'il faut noter que celle de la méthode d'entropie maximum est légèrement supérieure.

D'autre part, nous observons, dans le cas des pixels issus des spectres MEM, que le centre des histogrammes est toujours positionnée sur des valeurs d'intensité supérieures à celles des histogrammes traitant les pixels issus des dérivés. Cela signifie que le signal moyen des pixels du bruit des spectres MEM est plus élevé que celui des pixels du bruit des spectres dérivés. Cela est corroboré par la valeur des moyennes des histogrammes de chaque vibrations dans le tableau 4.2. Dans le cas de la MEM, les moyennes des pixels des quatre vibration sont supérieurs à celles de la méthode utilisant la dérivée. Cela nous laisserait penser que la méthode d'entropie maximum donnerait plus de poids à ses pixels de bruit.

À partir de ces analyses, j'ai choisi d'utiliser les distributions obtenues grâce à la méthode de la dérivée pour la suite de l'exploitation des résultats. Car même si le contraste qu'elle offre est un peu plus faible que celui de la MEM, j'obtiens des images moins bruitées et cela avec un temps de traitement quatre fois plus court. Afin d'illustrer cela, j'ai comparé, sur la figure 4.11, les intensités relatives des signaux traités par la dérivée entre les vibrations symétriques PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , CH_3 et la vibration asymétrique CH_3 . En parallèle de ces cartographies la distribution du signal SHG nous permet d'obtenir un autre élément d'information concernant l'échantillon. C'est pour cela que je l'ai incluse figure 4.11e.

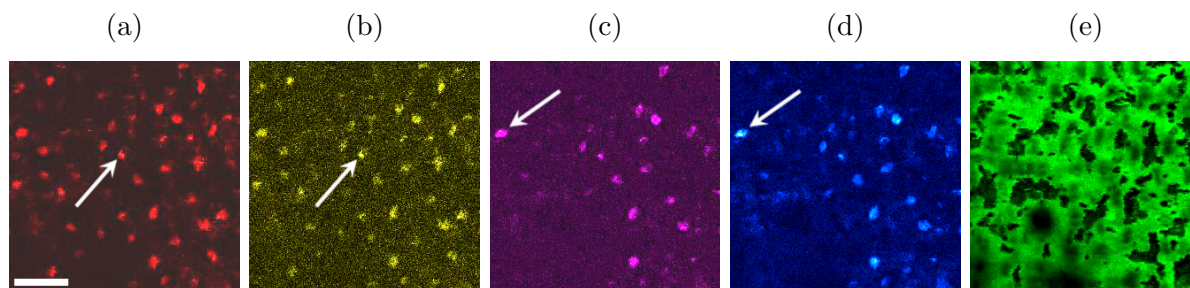


FIGURE 4.11 – Cartographies de l'intensité relative des pics de la dérivée des spectres M-CARS correspondant aux liaisons moléculaires (a) PO_4^{3-} , (b) CO_3^{2-} , (c-d) CH_3 (intégrée de 20 cm^{-1} autour des pics à 961 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 2878 cm^{-1} and 2950 cm^{-1} respectivement) et (e) la cartographie SHG correspondante. Barre d'échelle : $50 \mu\text{m}$. Les flèches en (a-b) et en (c-d) indiquent, respectivement, la position où ont été acquis les spectres présentés Fig. 4.7a et 4.7b.

J'ai alors tracé une cartographie à trois couleurs basée sur la distribution des vibrations à 961 cm^{-1} et 2950 cm^{-1} correspondant au PO_4^{3-} de l'hydroxyapatite et au CH_3 des protéines, et à la SHG signant pour le collagène fibreux. La comparaison avec des cartographies d'os pariétal de souris réalisées à partir de microscopie de fluorescence à deux-photons fournies par Sylvia M. Bardet Coste est présentée figure 4.12.

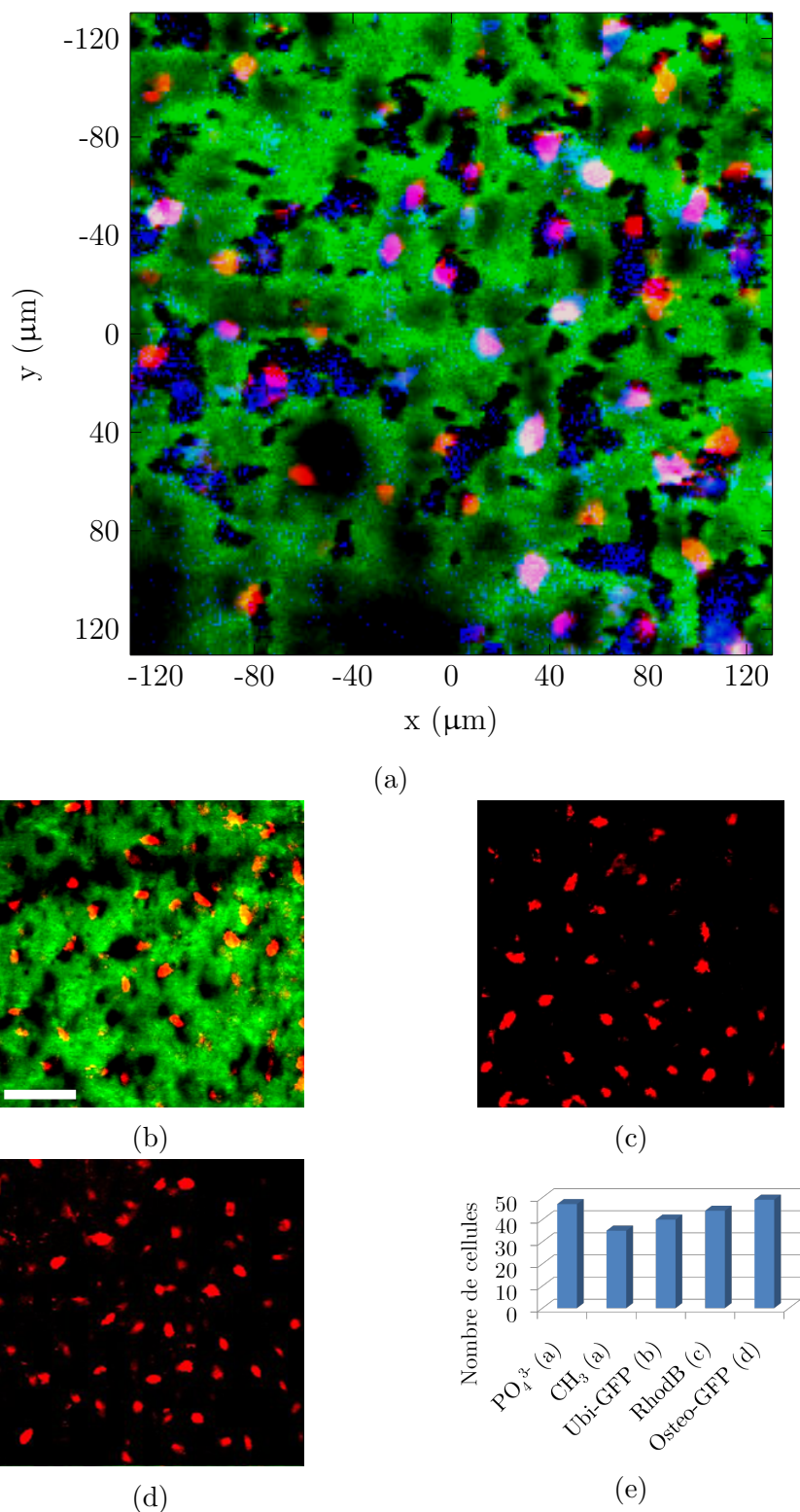


FIGURE 4.12 – Comparaison des cartographies de fragment d’os pariétal de souris. (a) Dérivées des spectres M-CARS de PO_4^{3-} (rouge) et CH_3 (bleu); fluorescence à deux-photon provenant de (b) cellules marquées par GFP (rouge), (c) cellules marquées par Rhodamine B (rouge) et cellules ostéogéniques marquées par GFP (rouge). Le signal SHG est montré en vert sur les images 4.12a à 4.12c. Barre d’échelle : $50 \mu\text{m}$. (e) Histogramme des populations de cellules selon le type de cartographie.

Nous constatons que le nombre, la forme et la taille des amas d'hydroxyapatite et de protéines correspondent aux cellules qui sont détectées par fluorescence à deux-photons. Mon dispositif CARS utilisant une détection en configuration contrapropagative permet donc d'identifier et d'imager des cellules ostéogéniques.

La spécificité vibrationnelle de cette méthode pourrait mener à une discrimination entre cellules différenciées, qui présentent des cristaux d'hydroxyapatite et celles qui ne le sont pas encore et qui n'en présentent pas. Ce diagnostic est primordial pour l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative afin d'éviter l'implant de cellules souches non différenciées pouvant se transformer en tumeur.

Le caractère contra propagatif du signal impose à mon système une configuration épi-détectée, ce qui rend alors possible l'étude d'échantillons biologiques épais et *in vivo*, contrairement aux méthodes copropagatives. Cela fait de ce dispositif, en plus de son caractère non invasif, un outil parfaitement adapté au diagnostic médical.

Conclusion

En conclusion, d'après l'étude théorique de la résolution spectrale et du rapport signal résonant sur non résonant, j'ai démontré que mon appareil de microspectroscopie basé sur l'épi-détection de signaux multiplex CARS et SHG pouvait imager des objets biologiques avec une sélectivité importante et une haute sensibilité. Il dispose d'une résolution spectrale théorique supérieure à l'état-de-l'art ($0,25 \text{ cm}^{-1}$) et propose le temps d'acquisition par pixel le plus court en ce qui concerne les systèmes d'épi-détection M-CARS (5 ms). J'ai également établi le régime de puissances moyenne et crête permettant d'éviter les photodommages au niveau de l'échantillon. Finalement, une étude comparative de post-traitements des spectres M-CARS par méthode d'entropie maximum et par dérivée en fonction du décalage Raman, a été menée. J'ai constaté dans les deux cas que l'on pouvait corriger l'impact du bruit non résonant afin de retrouver les positions des pics correspondant à un spectre Raman spontanée, et améliorer de manière similaire le contraste des images. La méthode dérivative présente deux avantages supplémentaires : une diminution du niveaux de bruit et un temps de traitement par spectre plus court que celui de la MEM (0,25 ms contre 1 s).

Perspectives

Les résultats précédents, même s'ils m'ont semblé assez intéressants pour figurer dans un manuscrit de thèse, peuvent encore être améliorés. D'une part par l'optimisation de

la densité de puissance de l'onde Stokes afin d'équilibrer la différence d'intensité anti-Stokes entre la zone C-H (forte) et la zone d'empreinte digitale (faible). D'autre part, par l'utilisation d'un réseau et d'une caméra CCD avec, respectivement, un coefficient de réflexion et une efficacité quantique supérieurs.

Ces optimisations peuvent être menées en parallèle à d'autres expériences de microspectrométrie multiplex CARS. À partir de l'épi-détection je peux développer un système interférentiel similaire à celui exposé section 1.3.4. À l'aide d'un miroir semi-réfléchissant je pourrais transmettre le signal épi-détekté et réfléchir le signal *forward* vers le spectromètre comme cela est présenté figure 4.13.

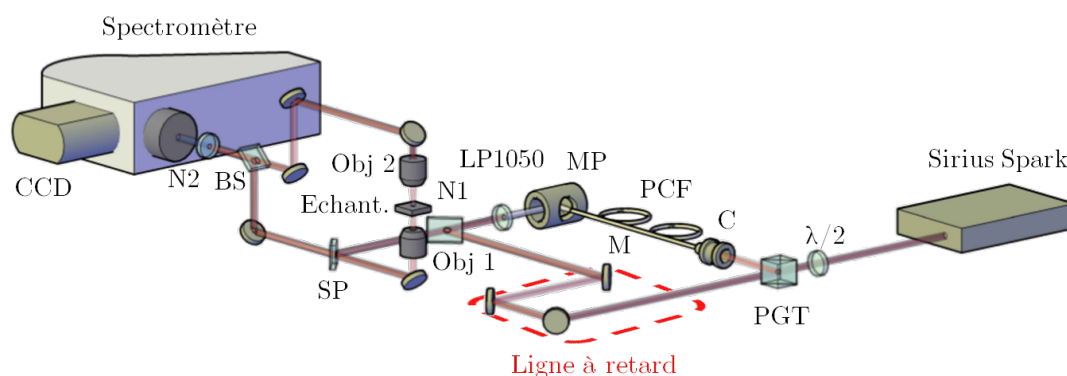


FIGURE 4.13 – Schéma du dispositif expérimental de mesure M-CARS interférentielle. Légende : BS, séparatrice 90% réflexion/10% transmission ; C, collimateur ; Echant., échantillon ; LP, filtre passe-haut ; M, miroir ; MP, miroir parabolique ; N1, miroir dichroïque *notch* ; N2, filtre *notch* ; Obj 1, objectif Olympus x60 ; Obj 2, objectif Nikon x60 ; PGT, polariseur Glan-Taylor ; SP, miroir dichroïque passe-bas ; $\lambda/2$, lame demi-onde.

La différence de phase entre les deux ondes anti-Stokes due à la différence des chemins optiques s'obtiendrait à l'aide d'un échantillon de référence, comme une lamelle couvre-objet. À la suite de quoi je pourrais déduire la phase d'un objet biologique.

Un objectif encore plus lointain serait la conversion de la méthode électro-CARS présentée section 3.2 en un système tout-optique. Un champ électrique continu à l'échelle de l'impulsion laser pourrait être obtenu par le procédé de rectification optique : un exemple est la génération d'un champ à fréquence "nulle" par mélange d'une harmonique avec deux ondes fondamentales. Néanmoins il me faut étudier l'efficacité de ce phénomène afin d'estimer quelle est l'amplitude qu'un tel champ pourrait atteindre dans un milieu biologique.

Bibliographie

- [1] Y. J. Lee, S. L. Vega, P. J. Patel, K. A. Aamer, P. V. Moghe, and M. T. Cicerone, “Quantitative, Label-Free Characterization of Stem Cell Differentiation at the Single-Cell Level by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy,” *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 20, no. 7, pp. 562–569, jul 2014.
- [2] M. Shiozawa, M. Shirai, J. Izumisawa, M. Tanabe, and K. Watanabe, “Coherent anti-Stokes Raman scattering hyperspectral imaging of cartilage aiming for state discrimination of cell,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 21, no. 7, p. 076004, 2016.
- [3] H. Segawa, M. Okuno, P. Leproux, V. Couderc, T. Ozawa, and H. Kano, “Multimodal Imaging of Living Cells with Multiplex Coherent Anti-stokes Raman Scattering (CARS), Third-order Sum Frequency Generation (TSFG) and Two-photon Excitation Fluorescence (TPEF) Using a Nanosecond White-light Laser Source,” *Analytical Sciences*, vol. 31, no. 4, pp. 299–305, 2015. [Online]. Available: https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/31/4/31-299/_pdf
- [4] C. M. Hartshorn, Y. J. Lee, C. H. Camp, Z. Liu, J. Heddleston, N. Canfield, T. A. Rhodes, A. R. Hight Walker, P. J. Marsac, and M. T. Cicerone, “Multicomponent chemical imaging of pharmaceutical solid dosage forms with broadband CARS microscopy,” *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 17, pp. 8102–8111, 2013.
- [5] J.-x. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie, “An Epi-Detected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (E-CARS) Microscope with High Spectral Resolution and High Sensitivity,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, no. 7, pp. 1277–1280, feb 2001.
- [6] D. Pestov, R. K. Murawski, G. O. Ariunbold, X. Wang, M. Zhi, A. V. Sokolov, V. A. Sautenkov, Y. V. Rostovtsev, A. Dogariu, Y. Huang, and M. O. Scully, “Optimizing the laser-pulse configuration for coherent raman spectroscopy,” *Science*, vol. 316, no. 5822, pp. 265–268, 2007.
- [7] C. L. Evans and X. S. Xie, “Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine,” *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 1, no. 1, pp. 883–909, 2008.
- [8] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb *et al.*, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy,” *Science*, vol. 248, no. 4951, pp. 73–76, 1990. [Online]. Available: <http://www.cnbc.cmu.edu/~samondjm/papers/Denketal1990.pdf>

- [9] K. C. Neuman, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, and S. M. Block, “Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps.” *Biophysical journal*, vol. 77, no. 5, pp. 2856–63, 1999. [Online]. Available: http://ac.els-cdn.com/S0006349599771171/1-s2.0-S0006349599771171-main.pdf?_tid=b6261aac-8d81-11e7-873a-00000aab0f01&acdnat=1504097570_f8a10888bbf51b36c70544c9ca4f34a0
- [10] K. König, “Multiphoton microscopy in life sciences.” *Journal of microscopy*, vol. 200, no. Pt 2, pp. 83–104, 2000. [Online]. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2818.2000.00738.x/epdf>
- [11] Y. Fu, H. Wang, R. Shi, and J.-X. Cheng, “Characterization of photodamage in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy.” *Optics express*, vol. 14, no. 9, pp. 3942–3951, 2006.
- [12] B. R. Master, P. T. C. So, C. Buehler, N. Barry, J. D. Sutin, W. W. Mantulin, and E. Gratton, “Mitigating thermal mechanical damage potential during two-photon dermal imaging,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 9, pp. 9 – 9 – 6, 2004.
- [13] Y. Liu, D. K. Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, and B. J. Tromberg, “Microfluorometric technique for the determination of localized heating in organic particles,” *Applied Physics Letters*, vol. 65, no. 7, pp. 919–921, 1994.
- [14] K. König, P. T. C. So, W. W. Mantulin, B. J. Tromberg, and E. Gratton, “Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress,” *Journal of Microscopy*, vol. 183, no. 3, pp. 197–204, 1996.
- [15] A. Hopt and E. Neher, “Highly Nonlinear Photodamage in Two-Photon Fluorescence Microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 80, no. 4, pp. 2029–2036, 2001. [Online]. Available: http://ac.els-cdn.com/S0006349501761735/1-s2.0-S0006349501761735-main.pdf?_tid=db1dbd2e-8d81-11e7-b7b0-00000aab0f02&acdnat=1504097632_bde9035390f5e85b0bdba595c3089bc1
- [16] H. Wang, Y. Fu, and J.-x. Cheng, “Experimental observation and theoretical analysis of Raman resonance-enhanced photodamage in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 24, no. 3, p. 544, mar 2007.
- [17] S.-H. Lim, “Interferometric Multiplex CARS,” in *Coherent Raman Scattering Microscopy*, ser. Series in Cellular and Clinical Imaging, J.-X. Cheng and X. S. Xie, Eds. CRC Press, 2012, ch. 14, p. 326.

- [18] C. H. Camp Jr., Y. J. Lee, J. M. Heddleston, C. M. Hartshorn, A. R. Hight Walker, J. N. Rich, J. D. Lathia, and M. T. Cicerone, “High-Speed Coherent Raman Fingerprint Imaging of Biological Tissues,” *Nat Photonics*, vol. 8, no. 8, pp. 627–634, 2014.
- [19] Z. Wang, W. Zheng, C.-Y. Stephen Hsu, and Z. Huang, “Epi-detected quadruple-modal nonlinear optical microscopy for label-free imaging of the tooth,” *Applied Physics Letters*, vol. 106, no. 3, p. 033701, jan 2015.
- [20] H. W. Wang, T. T. Le, and J. X. Cheng, “Label-free imaging of arterial cells and extracellular matrix using a multimodal CARS microscope,” *Optics Communications*, vol. 281, no. 7, pp. 1813–1822, apr 2008.
- [21] J. Saarinen, E. Sözeri, S. J. Fraser-Miller, L. Peltonen, H. A. Santos, A. Isomäki, and C. J. Strachan, “Insights into caco-2 cell culture structure using coherent anti-stokes raman scattering (cars) microscopy,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 523, no. 1, pp. 270 – 280, 2017.
- [22] H. K. Chiang, F.-Y. Peng, S.-C. Hung, and Y.-C. Feng, “In situ Raman spectroscopic monitoring of hydroxyapatite as human mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 40, no. 5, pp. 546–549, may 2009.
- [23] H. Segawa, Y. Kaji, P. Leproux, V. Couderc, T. Ozawa, T. Oshika, and H. Kano, “Multimodal and multiplex spectral imaging of rat cornea ex vivo using a white-light laser source,” *Journal of Biophotonics*, vol. 8, no. 9, pp. 705–713, sep 2015. [Online]. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbio.201400059/epdf>

Conclusion générale

Ma thèse avait pour but d'élaborer de nouveaux procédés de microspectroscopie Raman cohérente à bande ultra large. J'ai débuté logiquement cette entreprise en étudiant la diffusion Raman spontanée. J'ai déterminé les différentes grandeurs physiques qui caractérisent ce phénomène. Le calcul de la susceptibilité électrique d'ordre un m'a permis de comprendre de quelle manière le signal vibrationnel est exprimé par un spectre. J'en ai également déduit l'expression de l'intensité des diffusions Raman Stokes et anti-Stokes spontanées.

La prise en main d'un spectromètre Raman et l'étude de différents composés, minéraux ou biologiques m'a permis d'acquérir un savoir faire dans la mesure et l'analyse des spectres Raman spontanées. J'ai été amené à utiliser différentes méthodes de traitement de données afin d'extraire les signaux de composés dilués dans un solvant. J'ai pu développer mon propre algorithme en m'inspirant des techniques de la spectroscopie infrarouge. C'est de cette façon que je me suis intéressé à la chimométrie. De nombreuses discussions avec Ludovic Duponchel, du Laboratoire de Spectroscopie Infrarouge et Raman (LASIR, Villeneuve d'Ascq), m'ont permis d'étendre grandement mes connaissances dans ce domaine de recherche.

Dans un second temps, j'ai débuté l'étude des diffusions Raman cohérentes, et plus particulièrement la diffusion Raman cohérente anti-Stokes (CARS). J'ai constaté que ce processus mettait en jeu une nouvelle grandeur physique : la susceptibilité non-linéaire d'ordre trois. Son calcul m'a permis d'identifier le désavantage majeur de ce type de processus : la présence d'un bruit de fond non-résonant. Malgré cela, j'ai aussi constaté, du fait de la cohérence et de la résonance du processus CARS, que ce dernier est beaucoup plus efficace que la diffusion spontanée. Il permet également de s'exonérer de la fluorescence parasite qui peut venir noyer le signal Raman d'échantillons biologiques. Étant un effet non linéaire, plus exactement un mélange à quatre ondes, il possède une meilleure résolution spatiale que son homologue : la microspectroscopie Raman. Le seul frein à un emploi plus large du CARS reste la présence du bruit de fond non-résonant.

J'ai vérifié ces notions théoriques en construisant un montage CARS sur la base du microscope et du spectromètre utilisés pour les mesures de diffusion Raman spontanée (Horiba, LabRam Evolution). L'utilisation de sources subnanosecondes et de fibres à cristaux photoniques (PCF) m'a permis d'obtenir des supercontinua servant d'onde Stokes ultra large et donc d'effectuer des mesures CARS multiplex (M-CARS). J'ai pu ainsi établir les spectres M-CARS de nombreux échantillons. Des collaborations avec Guy Costa, du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges (LCSN, Limoges), et Jean-Michel Petit, de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale (UGMA, Limoges) me permirent de mettre mon expérience au service d'autres secteurs de la recherche. Les mesures M-CARS sont désormais des opérations de routine disponibles

sur une plateforme de services du laboratoire Xlim.

Ma thèse n'était pas seulement motivée par l'installation d'un dispositif M-CARS. J'ai développé, sur la base d'anciennes expériences menées par Farid El Bassri, un processus M-CARS utilisant un champ électrique continu afin de discriminer le signal résonant du bruit de fond non-résonant : l'électro-CARS. Pour se faire, j'ai profité de mon séjour à l'université de Tsukuba (Japon) et du matériel de Hideaki Kano pour développer cette technique et étudié ses potentialités. J'ai démontré son efficacité sur des molécules non polaires de type n-alcane. Les résultats que j'ai obtenu avec l'électro-CARS ont aboutit à une publication dans un journal internationale et ont été exposés lors d'une convention internationale.

Ma collaboration avec Hideaki Kano m'a permis d'accroître mes connaissances pratiques quant à la mise en place d'un système CARS et au développement d'un système de traitement des spectres CARS utilisant la méthode d'entropie maximum (MEM). Ce procédé algorithmique permet d'extraire du signal CARS la partie imaginaire de la susceptibilité non-linéaire d'ordre trois. J'ai ainsi étudié cet outil et je l'ai adapté à la méthode MEM aux logiciels utilisés pour notre système M-CARS.

J'ai poursuivi mes efforts de diminution du bruit de fond non résonant en mettant au point une seconde expérience inédite basée sur le CARS multiplex. J'ai construit un système bimodal de mesure SHG et M-CARS en épi-détection. Dans ce but, j'ai entrepris une étude d'optimisation du régime d'une source laser à fréquence de répétition variable. Elle s'est conclue par l'établissement de puissances moyenne et crête adaptées aux matériels biologiques et permettant une génération optimale de signaux anti-Stokes. En utilisant un fragment de crâne de souris, j'ai démontré que notre système M-CARS contra propagatif possédait un temps d'exposition par pixel inférieur et une largeur spectrale supérieure à l'état-de-l'art des systèmes M-CARS copropagatif subnanoseconde. À ma connaissance ce procédé est la première mise en application d'un système M-CARS contra propagatif sur un échantillon biologique. L'absence de marquage, l'efficacité de génération des signaux et le faible temps d'exposition de ce processus en font un outils parfaitement adapté à l'imagerie biologique. De plus, sa configuration en épi-détection rend possible l'étude d'échantillons biologiques *in vivo* et épais. Les résultats obtenus avec ce système ont été acceptés pour publication dans le journal *Biomedical Optics Express*.

Enfin, mon travail à également permis de démontrer que la spectroscopie CARS multiplex pouvait permettre de déterminer la partie réel de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois d'un échantillon de céramique à structure hélicoïdale et d'obtenir par

comparaison avec la silice la valeur exacte de son indice de réfraction non linéaire sur une plage de longueur d'onde de plus de 500 nm (travail en cours de publication - thèse de Lova Rajaofara). J'ai également contribué à faire naître au laboratoire une nouvelle voie de recherche sur l'optoporation cellulaire par effet de *poling optique*.

Publications

Articles dans une revue

E. Capitaine, C. Louot, N. Ould Moussa, C. Lefort, J. F. Kaneyasu, H. Kano, D. Pagnoux, V. Couderc, and P. Leproux, “M-CARS and EFISHG study of the influence of a static electric field on a non-polar molecule,” *Proc. SPIE*, vol. 9712, p. 5, 2016.

C. Louot, **E. Capitaine**, B. M. Shalaby, K. Krupa, A. Tonello, D. Pagnoux, C. Lefort, P. Leproux, and V. Couderc, “All-normal dispersion supercontinuum generation in the near-infrared by Raman conversion in standard optical fiber,” *Proc. SPIE*, vol. 9731, p. 7, 2016.

F. El Bassri, C. Lefort, **E. Capitaine**, C. Louot, D. Pagnoux, V. Couderc, and P. Leproux, “Nanosecond coherent anti-Stokes Raman scattering for particle size characterization,” *Proc. SPIE*, vol. 9703, p. 6, 2016.

C. Louot, B. M. Shalaby, **E. Capitaine**, S. Hilaire, P. Leproux, and V. Couderc, “Supercontinuum Generation in an Ytterbium-Doped Photonic Crystal Fiber for CARS Spectroscopy,” *IEEE Photonics Technology Letters*, vol. 28, no. 19, pp. 2011 - 2014, oct 2016.

B. M. Shalaby, C. Louot, **E. Capitaine**, K. Krupa, A. Labryuère, A. Tonello, D. Pagnoux, P. Leproux, and V. Couderc, “Spectro-temporal shaping of supercontinuum for subnanosecond time-coded M-CARS spectroscopy,” *Optics Letters*, vol. 41, no. 21, pp. 5007-5010, nov 2016.

E. Capitaine, N. Ould Moussa, C. Louot, C. Lefort, D. Pagnoux, J.-R. Duclère, J. F. Kaneyasu, H. Kano, L. Duponchel, V. Couderc, and P. Leproux, “Coherent anti-Stokes Raman scattering under electric field stimulation,” *Physical Review B*, vol. 94, no. 24, p. 245136, dec 2016.

E. Capitaine, N. Ould Moussa, C. Louot, S. M. Bardet, H. Kano, L. Duponchel, P. Lévêque, V. Couderc, and P. Leproux, “Fast epi-detected broadband multiplex CARS and SHG imaging of mouse skull cells,” *Biomedical Optics Express*, vol. 9, no. 1, p. 245-253, jan 2018.

Communications dans un congrès

C. Louot, **E. Capitaine**, F. El Bassri, D. Pagnoux, P. Leproux, H. Kano, and V. Couderc, “Refroidissement moléculaire induit par champ électrique; mise en évidence par spectroscopie non linéaire CARS” in *COLOQ 2014*, Rennes, France, jul 2015.

C. Louot, B. M. Shalaby, **E. Capitaine**, S. Hilaire, D. Pagnoux, and V. Couderc, “Génération d’un spectre infrarouge à forte densité spectrale de puissance dédié à la spectroscopie CARS polychromatique ” in *Journées Nationales d’Optique Guidée (JNOG)*, Rennes, France, jul 2015.

C. Louot, **E. Capitaine**, D. Pagnoux, P. Leproux, C. Lefort, A. De Angelis, V. Couderc, F. El Bassri, and H. Kano, “Conversion de fréquence dans les fibres optiques : application à la microscopie non linéaire sous influence électrique” in *ENOVA, 4ème congrès des applications des Fibres Optiques*, Paris, France, sep 2015.

I. Plazanet, **E. Capitaine**, D. Moine, E. Poli, S. Lhernould, and G. Costa, “Le bois de douglas en images...” in *4ème journées scientifiques du GDR 3544 Sciences du Bois*, Centre des Cézeaux, Clermont-Ferrand, France, nov 04-06 2015.

E. Capitaine, C. Louot, C. Lefort, D. Pagnoux, V. Couderc, and P. Leproux, “Electric Field Mapping and Dosimetry by means of Spontaneous and Coherent Raman Microspectroscopy” in *Proceeding of SPIE “Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVI”*, San Francisco, United States, feb 2016.

C. Louot, **E. Capitaine**, B. M. Shalaby, K. Krupa, A. Tonello, D. Pagnoux, C. Lefort, P. Leproux, and V. Couderc, “All-normal dispersion supercontinuum generation in the near-infrared by Raman conversion in standard optical fiber” in *Proceeding of SPIE “Nonlinear Frequency Generation and Conversion: Materials, Devices, and Applications XV”*, San Francisco, United States, feb 2016.

F. El Bassri, C. Lefort, **E. Capitaine**, C. Louot, D. Pagnoux, V. Couderc, and P. Leproux, “Nanosecond Coherent Anti-Stokes Raman Scattering for Particle Size Characterization” in *Proceeding of SPIE “Optical biopsy XIV: toward real-time spectroscopic imaging and diagnosis”*, San Francisco, United States, feb 2016.

P. Leproux, V. Couderc, **E. Capitaine**, N. Ould Moussa, C. Louot, C. Lefort, and D. Pagnoux, “Multimodal imaging under supercontinuum illumination and electric field

stimulation” in *4ème symposium du LAPHIA*, Bordeaux, France, sep 2016.

E. Capitaine, I. Plazanet, N. Ould Moussa, C. Louot, G. Costa, V. Couderc, and P. Leproux, “Microspectroscopie Epi-CARS Multiplex Ultrabroadband” in *Journées Nationales d’Optique Guidée (JNOG)*, Limoges, France, jul 2017.

C. Louot, **E. Capitaine**, B. M. Shalaby, K. Krupa, P. Leproux, A. Tonello, D. Pagnoux, and V. Couderc, “Génération de supercontinuum dans une fibre optique monomode standard en régime de dispersion normale par cascade Raman” in *Journées Nationales d’Optique Guidée (JNOG)*, Limoges, France, jul 2017.

Récompenses

Meilleure présentation orale au 6ème workshop des doctorants du laboratoire Xlim, Limoges, France, oct 2016.

Meilleure communication orale présentée par un doctorant aux 37ème Journées Nationales d’Optique Guidée (JNOG), Limoges, France, jul 2017.

Appendices

Annexe A :

**Expression de l'énergie d'un
oscillateur harmonique selon la
mécanique quantique**

L'expression de l'énergie d'un oscillateur harmonique issue de la description classique de la section 1.1.1.1 vont nous servir à démarrer notre description quantique. Il faut pour cela nous débarrasser des concepts de trajectoire et de position que nous pouvions rattacher aux électrons et aux noyaux des atomes formant la molécule. Nous parlerons désormais d'état variable dans le temps qui sera caractérisé par une fonction d'onde $\psi(\vec{r}, t)$. Cette fonction d'onde correspond à l'amplitude de probabilité de trouver une particule à la position \vec{r} et au temps t . Le carré de la norme de cette dernière $|\psi(\vec{r}, t)|^2$ se trouve être alors la densité de probabilité de cet état. Le caractère probabiliste de la fonction d'onde requière qu'elle soit de carré sommable, ainsi elle appartient à l'espace vectoriel L^2 se comportant comme un espace de Hilbert. Du fait d'autres propriétés de la fonction d'onde, comme sa régularité, sa continuité et le fait que l'on puisse la définir sur un espace borné, nous pouvons réduire son appartenance à un sous-espace de L^2 , le sous-espace vectoriel \mathcal{F} .

Dans ce sous-espace, $\psi(\vec{r}, t)$ peut se représenter selon différentes bases et avoir différentes composantes. Ces composantes sont analogues à des coordonnées d'un point dans l'espace à trois dimensions R^3 , ils changent en fonction du référentiel choisi. Afin de palier cela on utilise le concept de vecteur qui permet de généraliser la description de ce point. De la même façon dans \mathcal{F} on va favoriser le concept de vecteur d'état plutôt que d'état afin de généraliser la description de la fonction d'onde à toutes ces bases. Le vecteur d'état d'une particule sera alors décrit dans un espace abstrait appelé espace des états \mathcal{E} . On utilise dans cet espace la notation de Dirac afin de représenter les vecteurs de l'espace \mathcal{E} , qui sont alors appelés ket vecteurs et sont, pour la fonction d'onde associée $\psi_1(\vec{r}, t)$, notés ainsi : $|\psi_1\rangle$.

Chaque vecteur ket, ou ket, peut être associé à un nombre complexe sous l'action d'une fonctionnelle linéaire. Ces fonctionnelles associées aux ket forment un espace vectoriel \mathcal{E}^* appelé espace dual de \mathcal{E} , ils sont nommés vecteurs bra ou bra, et sont, pour la fonction d'onde associée $\psi_2(\vec{r}, t)$, notés ainsi : $\langle\psi_2|$. L'action de ce bra sur le ket introduit plus haut peut alors s'écrire de la sorte : $\langle\psi_2|\psi_1\rangle$, et est en fait le produit scalaire de $|\psi_1\rangle$ par $|\psi_2\rangle$.

Un autre outils peut être introduit : l'opérateur linéaire. L'action de ce dernier permet d'associer à un ket, un autre ket. Par exemple, l'opérateur A qui associe au ket $|\psi_1\rangle$ le ket $|\psi_2\rangle$ tel que $|\psi_2\rangle = A|\psi_1\rangle$.

Il existe deux bases particulières de \mathcal{F} dans lesquels il est utile d'exprimer les vecteurs bra et ket. C'est deux bases sont la représentation $\{\vec{r}\}$ et la représentation $\{\vec{p}\}$. Dans la représentation $\{\vec{r}\}$ le vecteur d'état sera exprimé sous forme d'une fonction d'onde dans l'espace des positions $\psi(\vec{r}, t)$; dans la représentation $\{\vec{p}\}$ le vecteur d'état sera exprimé sous forme d'une fonction d'onde dans l'espace des impulsions $\bar{\psi}(\vec{p}, t)$.

Dans ces représentations nous obtenons les composantes des ket qui peuvent se mettre sous forme de matrice à une colonne. Puisque l'action d'un bra sur un ket donne un nombre

complexe, dans ces représentations les composantes des bra peuvent se mettre sous forme de matrice à une ligne. De manière similaire, puisque l'action d'un opérateur sur un ket produit un autre ket, l'opérateur peut se mettre sous forme de matrice carrée. De cette manière on peut introduire la notion d'adjoint d'un opérateur : lorsque l'opérateur est sous forme de matrice carrée, on peut définir son adjoint comme la transposée de cette matrice après conjugaison complexe de ces composantes. Lorsque la transposée conjuguée d'un opérateur est égale à ce même opérateur ce dernier est dit hermitien.

On peut associer à un opérateur hermitien A un vecteur ket ou bra particulier, tel que, par exemple pour un ket

$$A|\psi\rangle = \lambda|\psi\rangle \quad (\text{A.1})$$

avec λ un nombre réel. Ce vecteur ket ou bra est appelé vecteur propre de A , et λ est appelé valeur propre de A associée à ce vecteur propre. L'ensemble des valeurs propres de A forme son spectre. Lorsque les vecteurs propres d'un opérateur hermitien forme une base orthonormée dans l'espace des états, cet opérateur devient une observable. Un des postulats de la physique quantique est qu'à chaque grandeur physique peut être associée une observable.

Il est à noter que dans la représentation $\{\vec{r}\}$, les opérateurs X et P_x lorsqu'ils s'appliquent sur une fonction d'onde $\psi(\vec{r}, t)$ donnent

$$X\psi(\vec{r}, t) = x\psi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.2a})$$

$$P_x\psi(\vec{r}, t) = \frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial x} \psi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.2b})$$

avec \hbar la constante de Planck réduite (J.s.rad⁻¹). Ce qui entraîne, si l'on s'intéresse à leur commutateur $[X, P_x]$, que

$$[X, P_x] \psi(\vec{r}, t) = (XP_x - P_xX) \psi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.3a})$$

$$= x \frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial x} \psi(\vec{r}, t) - \frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial x} (x\psi(\vec{r}, t)) \quad (\text{A.3b})$$

$$= \frac{\hbar}{i} x \frac{\partial}{\partial x} \psi(\vec{r}, t) - \frac{\hbar}{i} \psi(\vec{r}, t) - \frac{\hbar}{i} x \frac{\partial}{\partial x} \psi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.3c})$$

$$= i\hbar\psi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.3d})$$

et donc

$$[X, P_x] = i\hbar. \quad (\text{A.4})$$

Nous pouvons alors réécrire l'équation 1.8b en assignant la position d'équilibre x_0 à 0 et en remplaçant les grandeurs physiques classiques x et p_x par leur opérateur correspondant,

soit

$$\mathcal{E} = V(x_0) + \frac{1}{2}\mu\omega_k^2 X^2 + \frac{P_x^2}{2\mu} \quad (\text{A.5a})$$

$$\mathcal{E} = V(x_0) + \frac{1}{2}\mu\omega_k^2 x^2 - \frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\partial^2}{\partial x^2}. \quad (\text{A.5b})$$

Il faut bien noter que nous avons pu ici, associer l'opérateur impulsion P_x à la quantité de mouvement de la particule p_x , car elle n'était pas soumise à l'action d'un champ magnétique, autrement il nous aurait fallu tenir compte du potentiel vecteur \vec{A} associé, et cela aurait donc empêché la mise en parallèle de P_x et p_x . Cette parenthèse refermée, on peut appliquer cette équation à $\psi(\vec{r}, t)$ qui sera désormais la fonction d'onde de notre particule virtuelle. Ce qui nous donne

$$\mathcal{E}\psi(\vec{r}, t) = \left(V(x_0) + \frac{1}{2}\mu\omega_k^2 x^2 - \frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right) \psi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.6})$$

Comme nous l'avons vu plus haut, l'énergie potentielle de notre particule ne dépend pas du temps, ainsi nous pouvons utiliser l'équation de Schrödinger décrivant l'évolution temporelle de sa fonction d'onde

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(\vec{r}, t) = \left(V(x) - \frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right) \psi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.7})$$

et d'après 1.8

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(\vec{r}, t) = \left(V(x_0) + \frac{1}{2}\mu\omega_k^2 x^2 - \frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right) \psi(\vec{r}, t). \quad (\text{A.8})$$

Nous pouvons tester les solutions de la fonction d'onde de la forme

$$\psi(\vec{r}, t) = \varphi(\vec{r})g(t). \quad (\text{A.9})$$

Ainsi

$$i\hbar \varphi(\vec{r}) \frac{\partial}{\partial t} g(t) = \left(V(x_0) + \frac{1}{2}\mu\omega_k^2 x^2 \right) \varphi(\vec{r})g(t) - \frac{\hbar^2}{2\mu} g(t) \frac{\partial^2}{\partial x^2} \varphi(\vec{r}) \quad (\text{A.10})$$

et si nous divisons des deux côtés par $\varphi(\vec{r})g(t)$ nous obtenons

$$i \frac{\hbar}{g(t)} \frac{\partial}{\partial t} g(t) = V(x_0) + \frac{1}{2}\mu\omega_k^2 x^2 - \frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{1}{\varphi(\vec{r})} \frac{\partial^2}{\partial x^2} \varphi(\vec{r}). \quad (\text{A.11})$$

Ayant séparé les dépendances temporelle et spatiale des deux côtés de l'équation, cette égalité n'est possible que si le côté gauche et droit équivalent à une constante. Cette constante nous la trouvons dans l'équation A.6, c'est en fait \mathcal{E} . Nous pouvons alors décrire

la composante temporelle

$$i\frac{\hbar}{g(t)}\frac{\partial}{\partial t}g(t) = \mathcal{E} \quad (\text{A.12})$$

soit

$$g(t) = Ke^{-i\mathcal{E}t/\hbar} \quad (\text{A.13})$$

avec K une constante arbitraire que nous pouvons incorporer dans $\varphi(\vec{r})$. Nous obtenons alors une solution de l'équation de Schrödinger pour la fonction d'onde de notre particule virtuelle telle que

$$\psi(\vec{r}, t) = \varphi(\vec{r})e^{-i\mathcal{E}t/\hbar} \quad (\text{A.14})$$

si $\varphi(\vec{r})$ respecte la relation

$$\left(V(x_0) + \frac{1}{2}\mu\omega_k^2x^2 - \frac{\hbar^2}{2\mu}\frac{\partial^2}{\partial x^2} \right) \varphi(\vec{r}) = \mathcal{E}\varphi(\vec{r}). \quad (\text{A.15})$$

Le terme entre parenthèses, s'appliquant sur la composante spatiale de la fonction d'onde de la particule virtuelle, représente une observable dont les valeurs propres sont les énergies autorisées \mathcal{E} de cette particule. Cette observable particulière du système se nomme l'hamiltonien et se note H . Si l'on réécrit l'équation A.15

$$H\varphi(\vec{r}) = \mathcal{E}\varphi(\vec{r}) \quad (\text{A.16})$$

on voit alors que trouver les valeurs propres de cette observable revient à trouver les énergies du système. De plus, en réécrivant l'équation de Schrödinger en (A.8)

$$i\hbar\frac{\partial}{\partial t}\psi(\vec{r}, t) = H\psi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.17})$$

nous obtenons un des postulats de la physique quantique dont l'équation A.7 est en fait tirée : l'évolution temporelle d'une fonction d'onde est gouvernée par l'équation de Schrödinger où l'observable H est associée à l'énergie totale du système.

Dans le cas de la particule virtuelle dans un potentiel harmonique, l'hamiltonien est égale à

$$H = V(x_0) + \frac{1}{2}\mu\omega_k^2X^2 + \frac{P_x^2}{2\mu}. \quad (\text{A.18})$$

Si nous avons réintroduit les opérateurs X et P_x c'est que ces derniers vont nous permettre d'obtenir les valeurs propres de l'hamiltonien du système et donc les différentes énergies que la particule peut prendre. Commençons par adimensionner X , P_x et H en introduisant

de nouveaux opérateurs

$$\hat{X} = \sqrt{\frac{\mu\omega_k}{\hbar}} X \quad (\text{A.19a})$$

$$\hat{P}_x = \sqrt{\frac{1}{\mu\hbar\omega_k}} P_x \quad (\text{A.19b})$$

$$\hat{H} = \frac{1}{\hbar\omega_k} (H - V(x_0)) \quad (\text{A.19c})$$

ainsi

$$\hat{H} = \frac{1}{2} (\hat{X}^2 + \hat{P}_x^2). \quad (\text{A.20})$$

Nous l'avons vu plus haut, le commutateur de X et de P_x est non-nul, on dit que ces opérateurs ne commutent pas. Il en découle que le commutateur de \hat{X} et de \hat{P}_x est aussi non-nul et vaut i . Il nous est donc impossible de transformer la somme $\hat{X}^2 + \hat{P}_x^2$ en produit linéaire $(\hat{X} - i\hat{P}_x)(\hat{X} + i\hat{P}_x)$ car dans ce cas

$$(\hat{X} - i\hat{P}_x)(\hat{X} + i\hat{P}_x) = \hat{X}^2 + \hat{P}_x^2 + i\hat{X}\hat{P}_x - i\hat{P}_x\hat{X} \quad (\text{A.21a})$$

$$= \hat{X}^2 + \hat{P}_x^2 + i[\hat{X}, \hat{P}_x] \quad (\text{A.21b})$$

$$= \hat{X}^2 + \hat{P}_x^2 - 1 \quad (\text{A.21c})$$

et il faut alors réécrire l'équation A.20 afin d'obtenir

$$\hat{H} = \frac{1}{2} \left\{ (\hat{X} - i\hat{P}_x)(\hat{X} + i\hat{P}_x) + 1 \right\}. \quad (\text{A.22})$$

C'est ainsi que l'introduction de nouveaux opérateurs proportionnels à $(\hat{X} - i\hat{P}_x)$ et $(\hat{X} + i\hat{P}_x)$ va nous permettre de simplifier la recherche des valeurs propres de \hat{H} . Ces derniers sont

$$a = \frac{1}{\sqrt{2}} (\hat{X} + i\hat{P}_x) \quad (\text{A.23a})$$

$$a^\dagger = \frac{1}{\sqrt{2}} (\hat{X} - i\hat{P}_x) \quad (\text{A.23b})$$

ce qui donne

$$\hat{H} = a^\dagger a + \frac{1}{2}. \quad (\text{A.24})$$

En introduisant un dernier opérateur N tel que $N = a^\dagger a$ on obtient

$$\hat{H} = N + \frac{1}{2}. \quad (\text{A.25})$$

Les vecteurs propres de \hat{H} , et donc de H , seront également les vecteurs propres de N , et ainsi d'après l'équation A.19c, les différentes valeurs propres de N , que l'on notera p pourront être liées aux différentes valeurs propres de H telles que

$$\mathcal{E} = \hbar\omega_k \left(p + \frac{1}{2} \right) + V(x_0). \quad (\text{A.26})$$

Des différentes propriétés des opérateurs a , a^\dagger et N découlent le fait que les valeurs propres de N , autrement dit, son spectre, ne peut prendre que des valeurs entières positives¹. Nous pouvons donc en conclure que selon la physique quantique, un oscillateur harmonique voit son énergie quantifiée et son minimum est différent de $V(x_0)$. On peut réécrire l'équation A.26 afin d'exprimer toutes les énergies atteignable par la particule virtuelle, soient

$$\mathcal{E}_k^p = \hbar\omega_k \left(p + \frac{1}{2} \right) + V(x_0) \quad (\text{A.27})$$

avec p l'entier positif indiquant les différents harmoniques p du mode de vibration k .

1. C. Cohen-Tannoudji, B. Diu and F. Laloe, *Quantum Mechanics*. Wiley, 2007, vol. 1, pp. 298,299,494.

Annexe B :

**Calcul de la polarisabilité de premier
ordre α par description
semi-quantique**

La description classique de l'onde électromagnétique incidente avec un vecteur polarisation orienté selon l'axe x est

$$E_x(t) = \frac{1}{2} \left(\tilde{E}_x e^{-i\omega t} + \tilde{E}_x^* e^{i\omega t} \right) \quad (\text{B.1})$$

avec \tilde{E}_x l'amplitude du champ ; \tilde{E}_x^* son complexe conjugué ; et ω la fréquence angulaire de l'onde. Nous avons choisi de ne pas incorporer la propagation de l'onde selon kr car cela n'impactera pas les calculs et permettra d'alléger les formules. Cette onde, va par la suite, se voir traiter comme une perturbation affectant les états énergétiques vibrationnels de la molécule.

Il faut bien noter que dans cet ouvrage nous ne traiterons pas des ondes électriques capables de faire atteindre à la molécule les niveaux énergétiques électroniques supérieurs au niveau fondamental. En d'autres termes nous n'étudierons que la diffusion Raman classique et lorsque nous emploierons le terme de niveau ou d'état énergétique, nous ferons allusion aux énergies vibrationnels, dans le cas contraire la distinction sera clairement exprimée.

Comme nous l'avons vu annexe A, nous pouvons représenter les états énergétiques quelconques r de la molécule non-perturbée par l'onde électromagnétique par une fonction d'onde telle que

$$\Psi_r^{(0)}(t) = \psi_r e^{-i(\omega_r - i\Gamma_r)t} \quad (\text{B.2})$$

avec ω_r la fréquence angulaire correspondant au niveau énergétique \mathcal{E}_r , et $2\Gamma_r$ (rad.s⁻¹) lié à la largeur énergétique du niveau r par $\Delta\mathcal{E}_r = 2\hbar\Gamma_r$.

L'onde électromagnétique, ou perturbation, vient affecter la molécule à un instant t . Avant cela la molécule est dans un état énergétique initial i . Après un certain temps, la perturbation aura produit son effet et la molécule sera donc dans un état final f . Devant la durée de la perturbation, les temps de vie des états i et f sont très longs, et donc nous pouvons les considérer infinis dans notre calcul. Leur fonction d'onde non-perturbée peut alors s'écrire telle que

$$\Psi_i^{(0)}(t) = \psi_i e^{-i\omega_i t} \quad (\text{B.3})$$

$$\Psi_f^{(0)}(t) = \psi_f e^{-i\omega_f t} \quad (\text{B.4})$$

Dans toute l'annexe A nous nous étions implicitement mis dans la représentation de Schrödinger, qui implique que la dépendance temporelle soit portée par les fonctions d'ondes ou fonctions d'états et non par les opérateurs. C'est ce que décrit l'équation de Schrödinger (A.17).

Dans le cas de la théorie des perturbations dépendantes du temps il est plus commode de faire appelle à la représentation d'interaction ou représentation de Dirac, où les

opérateurs ne sont plus indépendants du temps

$$H(t) = H_0 + H_p(t) \quad (\text{B.5})$$

avec H_0 l'hamiltonien du système non perturbé et $H_p(t)$ l'hamiltonien de perturbation due à l'onde électromagnétique incidente portant la dépendance temporelle de l'hamiltonien total. Il peut être défini tel que

$$H_p(t) = -D_x E_x \quad (\text{B.6})$$

avec D_x l'opérateur du moment dipolaire électrique orienté dans la direction du vecteur polarisation de l'onde incidente.

Dans cette représentation la fonction d'onde perturbée est donnée par

$$|\Psi'_r(t)\rangle = e^{iH_0 t/\hbar} |\Psi_r^{(0)}(t)\rangle \quad (\text{B.7})$$

avec la condition initiale

$$|\Psi'_r(t_0)\rangle = |\Psi_r^{(0)}(t_0)\rangle. \quad (\text{B.8})$$

L'équation de Schrödinger (A.17), toujours valable dans cette représentation, nous donne

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\Psi'_r(t)\rangle = e^{iH_0 t/\hbar} (i\hbar \frac{\partial}{\partial t} - H_0) |\Psi_r^{(0)}(t)\rangle \quad (\text{B.9a})$$

$$= e^{iH_0 t/\hbar} (H(t) - H_0) |\Psi_r^{(0)}(t)\rangle \quad (\text{B.9b})$$

$$= e^{iH_0 t/\hbar} H_p(t) |\Psi_r^{(0)}(t)\rangle \quad (\text{B.9c})$$

$$= e^{iH_0 t/\hbar} H_p(t) e^{-iH_0 t/\hbar} |\Psi'_r(t)\rangle \quad (\text{B.9d})$$

et si on définit l'hamiltonien de perturbation modifié $H'_p(t)$ de telle sorte que

$$H'_p(t) = e^{iH_0 t/\hbar} H_p(t) e^{-iH_0 t/\hbar} \quad (\text{B.10})$$

on obtient

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\Psi'_r(t)\rangle = H'_p(t) |\Psi'_r(t)\rangle. \quad (\text{B.11})$$

Le but de la théorie des perturbations dépendantes du temps est de trouver une relation entre les fonctions d'onde perturbées de la molécule avec les états non-perturbés. Pour cela on part du principe que l'on peut développer la fonction d'onde perturbée en une combinaison linéaire de fonctions propres des états q non-perturbés de la molécule

$$|\Psi'_r(t)\rangle = \sum_q a_{rq}(t) |\Psi_q^{(0)}(t)\rangle \quad (\text{B.12})$$

avec

$$H_0|\Psi_q^{(0)}(t)\rangle = \mathcal{E}_q \quad (\text{B.13})$$

et $a_{rq}(t)$ les coefficients des fonctions propres pouvant se développer en série correspondant à l'ordre de la perturbation

$$a_{rq}(t) = a_{rq}^{(0)}(t) + a_{rq}^{(1)}(t) + a_{rq}^{(2)}(t) + \dots \quad (\text{B.14})$$

C'est par la recherche de ces coefficients que nous pourrions donc estimer l'état perturbé de notre système à partir des états non-perturbés.

Nous commençons cette recherche par l'introduction d'un opérateur permettant de lier la fonction de perturbation initiale $\Psi'_r(t_0)$ à la fonction de perturbation $\Psi'_r(t)$ défini à un instant ultérieur t : l'opérateur d'évolution $U(t, t_0)$, qui intervient de telle sorte que

$$|\Psi'_r(t)\rangle = U(t, t_0)|\Psi'_r(t_0)\rangle. \quad (\text{B.15})$$

Afin de définir cette opérateur nous allons introduire cette dernière équation dans l'équation B.11. Nous obtenons

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\Psi'_r(t)\rangle = H'_p(t)U(t, t_0)|\Psi'_r(t_0)\rangle \quad (\text{B.16})$$

soit

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} U(t, t_0)|\Psi'_r(t_0)\rangle = H'_p(t)U(t, t_0)|\Psi'_r(t_0)\rangle \quad (\text{B.17})$$

comme cela est vrai pour toute fonction d'onde de perturbation initiale $\Psi'_r(t_0)$ on a

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} U(t, t_0) = H'_p(t)U(t, t_0) \quad (\text{B.18})$$

avec la condition à la limite

$$U(t_0, t_0) = 1. \quad (\text{B.19})$$

Si l'on intègre alors l'équation B.18 de t_0 à t on obtient

$$i\hbar \int_{t_0}^t \frac{\partial}{\partial t'} U(t', t_0) dt' = \int_{t_0}^t H'_p(t')U(t', t_0) dt' \quad (\text{B.20a})$$

$$i\hbar (U(t, t_0) - 1) = \int_{t_0}^t H'_p(t')U(t', t_0) dt' \quad (\text{B.20b})$$

qui permet alors de définir $U(t, t_0)$ par une équation auto-consistante

$$U(t, t_0) = 1 - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t H'_p(t')U(t', t_0) dt' \quad (\text{B.21})$$

que l'on peut continuer à développer

$$U(t, t_0) = 1 - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t H'_p(t') \left(1 - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^{t'} H'_p(t'') U(t'', t_0) dt'' \right) dt' \quad (\text{B.22a})$$

$$= 1 - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t H'_p(t') dt' + \left(-\frac{i}{\hbar} \right)^2 \int_{t_0}^t H'_p(t') dt' \int_{t_0}^{t'} H'_p(t'') U(t'', t_0) dt'' \quad (\text{B.22b})$$

jusqu'à une série telle que

$$U(t, t_0) = \sum_{n=0}^{\infty} \left(-\frac{i}{\hbar} \right)^n \int_{t_0}^t dt_1 \dots \int_{t_0}^{t_{n-1}} H'_p(t_1) H'_p(t_2) \dots H'_p(t_n) dt_n \quad (\text{B.23})$$

avec le premier terme à $n = 0$ valant 1.

Ainsi l'évolution de la fonction d'onde dans un état r perturbée au temps initial t_0 jusqu'à un temps t ultérieur est obtenue grâce à la définition de l'opérateur évolution. On peut alors commencer la recherche des coefficients en introduisant la relation d'identité $\sum_q |\Psi_q^{(0)}(t_0)\rangle \langle \Psi_q^{(0)}(t_0)| = 1$ dans l'équation B.15

$$|\Psi'_r(t)\rangle = U(t, t_0) |\Psi'_r(t_0)\rangle = \sum_q |\Psi_q^{(0)}(t_0)\rangle \langle \Psi_q^{(0)}(t_0)| U(t, t_0) |\Psi'_r(t_0)\rangle \quad (\text{B.24})$$

ce qui nous permet d'identifier le terme de droite au coefficient $a_{rq}(t)$ de l'équation B.12

$$a_{rq}(t) = \langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | U(t, t_0) | \Psi'_r(t_0) \rangle \quad (\text{B.25})$$

qui selon la condition initiale de l'équation B.8 donne

$$a_{rq}(t) = \langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | U(t, t_0) | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle. \quad (\text{B.26})$$

En remplaçant l'opérateur d'évolution par la série de l'équation B.23

$$\begin{aligned} a_{rq}(t) &= \delta_{rq} - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t \langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | H'_p(t') | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle dt' \\ &\quad + \left(-\frac{i}{\hbar} \right)^2 \int_{t_0}^t dt' \int_{t_0}^{t'} \langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | H'_p(t') H'_p(t'') | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle dt'' + \dots \end{aligned} \quad (\text{B.27a})$$

$$\begin{aligned}
 a_{rq}(t) &= \delta_{rq} - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t \langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | H'_p(t') | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle dt' \\
 &+ \left(-\frac{i}{\hbar} \right)^2 \int_{t_0}^t dt' \sum_s \int_{t_0}^{t'} \langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | H'_p(t') | \Psi_s^{(0)}(t_0) \rangle \langle \Psi_s^{(0)}(t_0) | H'_p(t'') | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle dt'' + \dots
 \end{aligned} \tag{B.27b}$$

On peut utiliser l'expression de l'hamiltonien modifié $H'_p(t)$ donné par l'équation B.10 pour développer les termes dans les intégrales de l'équation B.27b

$$\langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | H'_p(t) | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle = \langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | e^{iH_0 t/\hbar} H_p(t) e^{-iH_0 t/\hbar} | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle \tag{B.28}$$

et avec

$$\langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | e^{iH_0 t/\hbar} = \langle \psi_q | e^{i(\mathcal{E}_q - i\frac{1}{2}\mathcal{E}_q)(t-t_0)/\hbar} \tag{B.29a}$$

$$e^{-iH_0 t/\hbar} | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle = | \psi_r \rangle e^{-i(\mathcal{E}_r - i\frac{1}{2}\mathcal{E}_r)(t-t_0)/\hbar} \tag{B.29b}$$

on obtient

$$\langle \Psi_q^{(0)}(t_0) | H'_p(t) | \Psi_r^{(0)}(t_0) \rangle = \langle \psi_q | H_p(t) | \psi_r \rangle e^{i(\mathcal{E}_q - \mathcal{E}_r - i\frac{1}{2}(\mathcal{E}_q - \mathcal{E}_r))(t-t_0)/\hbar} \tag{B.30a}$$

$$= \langle \psi_q | H_p(t) | \psi_r \rangle e^{i(\omega_{qr} - i\Gamma_q + i\Gamma_r)(t-t_0)} \tag{B.30b}$$

avec ω_{qr} la différence de pulsation $\omega_q - \omega_r$.

Nous pouvons finalement écrire les coefficients d'ordre 1 et 2 nous permettant de décrire la modification au premier et au deuxième ordre de la fonction d'onde perturbée, respectivement $\Psi_r^{(1)}(t)$ et $\Psi_r^{(2)}(t)$, en fonction des états non-perturbés de la molécule.

$$a_{rq}^{(1)}(t) = -\frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t \langle \psi_q | H_p(t) | \psi_r \rangle e^{i(\omega_{qr} - i\Gamma_q + i\Gamma_r)(t'-t_0)} dt' \tag{B.31}$$

$$\begin{aligned}
 a_{rq}^{(2)}(t) &= \left(-\frac{i}{\hbar} \right)^2 \sum_s \int_{t_0}^t dt' \int_{t_0}^{t'} \langle \psi_q | H_p(t) | \psi_s \rangle \langle \psi_s | H_p(t) | \psi_r \rangle \\
 &\quad \times e^{i(\omega_{qs} - i\Gamma_q + i\Gamma_s)(t'-t_0)} e^{i(\omega_{sr} - i\Gamma_s + i\Gamma_r)(t''-t_0)} dt''
 \end{aligned} \tag{B.32}$$

et donc

$$|\Psi_r^{(1)}(t)\rangle = \sum_q a_{rq}^{(1)}(t) |\Psi_q^{(0)}(t)\rangle \tag{B.33}$$

$$|\Psi_r^{(2)}(t)\rangle = \sum_q a_{rq}^{(2)}(t) |\Psi_q^{(0)}(t)\rangle. \quad (\text{B.34})$$

La fonction d'onde perturbée est ainsi définie, et l'on peut l'utiliser pour décrire l'effet du champ électromagnétique sur la molécule. Ce dernier va provoquer dans la molécule l'apparition d'un moment dipolaire électrique induit réel $(D)_{fi}$ associé à la transition de l'état i à l'état f . On peut définir sa projection sur un axe y quelconque telle que

$$(D_y)_{fi} = (\tilde{D}_y)_{fi} + (\tilde{D}_y)_{fi}^* \quad (\text{B.35})$$

et $(\tilde{D}_y)_{fi}$ la projection du moment dipolaire électrique induit complexe définit tel que

$$(\tilde{D}_y)_{fi} = \langle \Psi_f'(t) | D_y | \Psi_i'(t) \rangle \quad (\text{B.36})$$

avec D_y la composante de l'opérateur du moment dipolaire électrique. Cette composante peut également se développer en une série de différents ordres liés aux ordres de la perturbation :

$$(D_y)_{fi} = (D_y^{(0)})_{fi} + (D_y^{(1)})_{fi} + (D_y^{(2)})_{fi} + \dots \quad (\text{B.37})$$

En incorporant l'équation B.36 dans l'équation B.35 nous obtenons alors des termes que l'on peut faire correspondre, grâce à leur ordre, à ceux de l'équation B.37 :

$$(D_y^{(0)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(0)}(t) | D_y | \Psi_i^{(0)}(t) \rangle + \text{complexe conjugué (c.c.)} \quad (\text{B.38a})$$

$$(D_y^{(1)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(1)}(t) | D_y | \Psi_i^{(0)}(t) \rangle + \langle \Psi_f^{(0)}(t) | D_y | \Psi_i^{(1)}(t) \rangle + \text{c.c.} \quad (\text{B.38b})$$

$$(D_y^{(2)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(2)}(t) | D_y | \Psi_i^{(0)}(t) \rangle + \langle \Psi_f^{(1)}(t) | D_y | \Psi_i^{(1)}(t) \rangle + \langle \Psi_f^{(0)}(t) | D_y | \Psi_i^{(2)}(t) \rangle + \text{c.c.} \quad (\text{B.38c})$$

La composante du moment dipolaire électrique d'ordre 0, $(D_y^{(0)})_{fi}$, fait intervenir uniquement des fonctions d'onde non-perturbées, l'onde électromagnétique E_x n'est donc pas impliquée. Cette transition d'un état i non-perturbé à un état f non-perturbé se fait donc spontanément et n'est pas liée à de la diffusion.

La composante du moment dipolaire électrique d'ordre 1, $(D_y^{(1)})_{fi}$, quant à elle, fait intervenir deux termes impliquant une fonction d'onde perturbée au premier ordre : $\Psi_i^{(1)}(t)$ ou $\Psi_f^{(1)}(t)$. Comme nous l'avons vu plus haut, ces fonctions vont être liées aux coefficients de premier ordre $a_{iq}^{(1)}(t)$ et $a_{fq}^{(1)}(t)$ respectivement. L'expression de ces coefficients, donnée à l'équation B.31, fait intervenir l'hamiltonien de perturbation $H_p(t)$ qui est lié de manière linéaire à l'onde incidente E_x selon l'équation B.6. Cette onde n'interviendrait donc qu'une seule fois pour provoquer la transition de l'état i à f .

De la même manière, la composante de la transition du moment dipolaire d'ordre 2, $(D_y^{(2)})_{fi}$, fait soit intervenir deux termes impliquant une fonction d'onde perturbée au

deuxième ordre : $\Psi_i^{(2)}(t)$ ou $\Psi_f^{(2)}(t)$, soit un terme croisé avec deux fonctions perturbées au premier ordre. En suivant la même démarche que précédemment on peut en déduire que cette composante du moment dépend du carré de l'onde incidente E_x . Dans ce cas, cette dernière interviendrait deux fois afin de provoquer la transition de l'état i à f .

Dans le cas de la spectroscopie Raman, l'onde électromagnétique incidente n'intervient qu'une seule fois. Cela nous pousse à nous intéresser uniquement à la composante du moment dipolaire électrique d'ordre 1 qui, on l'a vu, est linéaire avec l'onde incidente E_x . Dans la suite de cette annexe l'ordre 1 des coefficients a_{iq} et a_{fq} sera donc induit.

En développant les fonctions d'onde perturbées de la composante du moment dipolaire il vient

$$(D_y^{(1)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(1)}(t) | D_y | \Psi_i^{(0)}(t) \rangle + \langle \Psi_f^{(0)}(t) | D_y | \Psi_i^{(1)}(t) \rangle + \text{c.c.} \quad (\text{B.39a})$$

$$(D_y^{(1)})_{fi} = \sum_q a_{fq}^* \langle \Psi_q^{(0)}(t) | D_y | \Psi_i^{(0)}(t) \rangle + \sum_q a_{iq} \langle \Psi_f^{(0)}(t) | D_y | \Psi_q^{(0)}(t) \rangle + \text{c.c.} \quad (\text{B.39b})$$

$$(D_y^{(1)})_{fi} = \frac{i}{\hbar} \sum_q \int_{t_0}^t \langle \psi_f | H_p(t') | \psi_q \rangle \langle \Psi_q^{(0)}(t) | D_y | \Psi_i^{(0)}(t) \rangle e^{-i(\omega_{qf} - i\Gamma_q)(t' - t_0)} dt' \\ - \frac{i}{\hbar} \sum_q \int_{t_0}^t \langle \Psi_f^{(0)}(t) | D_y | \Psi_q^{(0)}(t) \rangle \langle \psi_q | H_p(t') | \psi_i \rangle e^{i(\omega_{qi} - i\Gamma_q)(t' - t_0)} dt' + \text{c.c.} \quad (\text{B.40})$$

$$(D_y^{(1)})_{fi} = -\frac{i}{2\hbar} \sum_q \langle \Psi_q^{(0)}(t) | D_y | \Psi_i^{(0)}(t) \rangle \left\{ \int_{t_0}^t \langle \psi_f | D_x | \psi_q \rangle \tilde{E}_x e^{-i\omega t'} e^{-i(\omega_{qf} - i\Gamma_q)(t' - t_0)} dt' \right. \\ \left. + \int_{t_0}^t \langle \psi_f | D_x | \psi_q \rangle \tilde{E}_x^* e^{i\omega t'} e^{-i(\omega_{qf} - i\Gamma_q)(t' - t_0)} dt' \right\} \\ + \frac{i}{2\hbar} \sum_q \langle \Psi_f^{(0)}(t) | D_y | \Psi_q^{(0)}(t) \rangle \left\{ \int_{t_0}^t \langle \psi_q | D_x | \psi_i \rangle \tilde{E}_x e^{-i\omega t'} e^{i(\omega_{qi} - i\Gamma_q)(t' - t_0)} dt' \right. \\ \left. + \int_{t_0}^t \langle \psi_q | D_x | \psi_i \rangle \tilde{E}_x^* e^{i\omega t'} e^{i(\omega_{qi} - i\Gamma_q)(t' - t_0)} dt' \right\} + \text{c.c.} \quad (\text{B.41})$$

Si on définit alors t_0 tel que $t_0 = 0$ on a alors

$$\begin{aligned}
 (D_y^{(1)})_{fi} = & -\frac{i}{2\hbar} \sum_q \langle \psi_f | D_x | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_y | \psi_i \rangle e^{i(\omega_q - \omega_i - i\Gamma_q)t} \left\{ \tilde{E}_x \frac{e^{-i\omega t} e^{-i(\omega_{qf} - i\Gamma_q)t}}{-i(\omega_{qf} + \omega - i\Gamma_q)} \right. \\
 & \left. + \tilde{E}_x^* \frac{e^{i\omega t} e^{-i(\omega_{qf} - i\Gamma_q)t}}{-i(\omega_{qf} - \omega - i\Gamma_q)} \right\} \\
 & + \frac{i}{2\hbar} \sum_q \langle \psi_f | D_y | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_x | \psi_i \rangle e^{i(\omega_f - \omega_q + i\Gamma_q)t} \left\{ \tilde{E}_x \frac{e^{-i\omega t} e^{i(\omega_{qi} - i\Gamma_q)t}}{i(\omega_{qi} - \omega - i\Gamma_q)} \right. \\
 & \left. + \tilde{E}_x^* \frac{e^{i\omega t} e^{i(\omega_{qi} - i\Gamma_q)t}}{i(\omega_{qi} + \omega - i\Gamma_q)} \right\} + \text{c.c.}
 \end{aligned} \tag{B.42}$$

$$\begin{aligned}
 (D_y^{(1)})_{fi} = & \frac{1}{2\hbar} \sum_q \left\{ \frac{\langle \psi_f | D_x | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_y | \psi_i \rangle}{\omega_{qf} + \omega - i\Gamma_q} \tilde{E}_x e^{-i(\omega - \omega_{fi})t} + \frac{\langle \psi_f | D_x | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_y | \psi_i \rangle}{\omega_{qf} - \omega - i\Gamma_q} \tilde{E}_x^* e^{i(\omega + \omega_{fi})t} \right\} \\
 & + \frac{1}{2\hbar} \sum_q \left\{ \frac{\langle \psi_f | D_y | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_x | \psi_i \rangle}{\omega_{qi} - \omega - i\Gamma_q} \tilde{E}_x e^{-i(\omega - \omega_{fi})t} \right. \\
 & \left. + \frac{\langle \psi_f | D_y | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_x | \psi_i \rangle}{\omega_{qi} + \omega - i\Gamma_q} \tilde{E}_x^* e^{i(\omega + \omega_{fi})t} \right\} + \text{c.c.} \tag{B.43}
 \end{aligned}$$

avec ω_{fi} la différence de pulsation $\omega_f - \omega_i$.

En s'intéressant aux quatre termes de l'équation B.43 on peut constater deux dépendances différentes : une en $\omega - \omega_{fi}$ et une autre en $\omega + \omega_{fi}$. Ces pulsations vont déterminer la fréquence des ondes électromagnétiques produites par la polarisation du matériel selon la composante du moment dipolaire électrique $(D_y^{(1)})_{fi}$. Selon Placzek¹ les termes en $\omega + \omega_{fi}$ traduiraient l'émission de deux quanta d'énergie : un à $\hbar\omega$ et l'autre à $\hbar\omega_{fi}$, à la condition que l'état final f soit moins énergétique que l'état initial i . Les autres termes dépendant de $\omega - \omega_{fi}$ seraient eux à l'origine de la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman, à la condition que $\omega > \omega_{fi}$. Ce sont donc eux que nous allons traiter en détail.

Dans le cas où le niveau énergétique final est aussi le niveau initial, la condition $\omega > \omega_{fi} = 0$ est toujours vérifiée et ce phénomène correspond à la diffusion Rayleigh : diffusion d'un photon possédant la même énergie que le photon incident.

Dans le cas où l'état f est moins énergétique que l'état i , la condition $\omega > \omega_{fi}$ est également toujours vérifiée et ce phénomène correspond à de la diffusion Raman anti-Stokes : émission d'un photon plus énergétique que le photon incident.

Dans le cas où l'état f est plus énergétique que l'état i , nous sommes en présence de diffusion Raman Stokes : émission d'un photon moins énergétique que le photon incident.

1. G. Placzek, *Rayleigh-streuung und Raman-effekt*. Akad. Verlag-Ges., 1934, vol. 2.

Mais il faut alors étudier la condition $\omega > \omega_{fi}$. Dans la partie 1.1.1.2 nous avons exposé la gamme énergétique des vibrations moléculaires qui allait de 200 à 3600 cm^{-1} , soit des énergies allant de 0.02 à 0.45 eV, ou encore des longueurs d'onde de 50 à 2.8 μm . En spectroscopie Raman, l'emploi de rayonnements dans la région visible à ultraviolet du spectre lumineux (de 700 à 200 nm), soit des énergies de 1.8 à 6 eV, est donc justifié car dans ce cas la condition $\omega > \omega_{fi}$ est également toujours respectée. Néanmoins, durant cette thèse, seules des longueurs d'onde visibles ont été utilisées afin d'éviter d'approcher les niveaux électroniques supérieurs (pour exemple, une énergie de 10.2 eV est nécessaire pour passer du niveau électronique fondamentale au niveau électronique supérieur dans le cas de l'atome d'hydrogène²).

Ainsi nous pouvons réécrire l'équation B.43 en supprimant les termes n'étant pas en lien avec la diffusion Rayleigh ou Raman nous obtenons

$$(D_y^{(1)})_{fi} = \frac{1}{2\hbar} \sum_q \left\{ \frac{\langle \psi_f | D_x | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_y | \psi_i \rangle}{\omega_{qf} + \omega - i\Gamma_q} + \frac{\langle \psi_f | D_y | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_x | \psi_i \rangle}{\omega_{qi} - \omega - i\Gamma_q} \right\} \tilde{E}_x e^{-i(\omega - \omega_{fi})t} + \text{c.c.} \quad (\text{B.44})$$

Nous pouvons alors identifier le terme de gauche à la grandeur physique faisant le lien entre le moment dipolaire électrique de la molécule en fonction du champ électromagnétique incident, c'est à dire le tenseur de polarisabilité α_{fi} lié à la transition de i à f , et plus exactement sa composante $(\alpha_{yx})_{fi}$ en $\text{C.V}^{-1}.\text{m}^2$ telle que

$$(D_y^{(1)})_{fi} = (\alpha_{yx})_{fi} \tilde{E}_x \cos((\omega - \omega_{fi})t) \quad (\text{B.45})$$

avec l'amplitude du champ électrique incident \tilde{E}_x réel et

$$(\alpha_{yx})_{fi} = \frac{1}{\hbar} \sum_q \left\{ \frac{\langle \psi_f | D_x | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_y | \psi_i \rangle}{\omega_{qf} + \omega - i\Gamma_q} + \frac{\langle \psi_f | D_y | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_x | \psi_i \rangle}{\omega_{qi} - \omega - i\Gamma_q} \right\}. \quad (\text{B.46})$$

En reprenant l'équation B.46, nous pouvons supposer que la partie droite du terme entre parenthèse jouera un rôle prépondérant quant à la valeur de α_{yx} : au dénominateur, $\omega_{qi} - \omega$ sera toujours moins important que $\omega_{qf} + \omega$. Cette approximation faite nous obtenons

$$(\alpha_{yx})_{fi} = \frac{1}{\hbar} \sum_q \frac{\langle \psi_f | D_y | \psi_q \rangle \langle \psi_q | D_x | \psi_i \rangle}{\omega_{qi} - \omega - i\Gamma_q}. \quad (\text{B.47})$$

Nous pouvons réécrire $(\alpha_{yx})_{fi}$ sous un terme d'opérateur

$$(\alpha_{yx})_{fi} = \langle \psi_f | \alpha_{yx} | \psi_i \rangle \quad (\text{B.48})$$

2. R.A. Serway, C.J. Moses and C.A. Moyer, *Modern Physics*. Cengage Learning, 2004, p. 137.

avec

$$\alpha_{yx} = \frac{1}{\hbar} \sum_q \frac{D_y |\psi_q\rangle \langle \psi_q| D_x}{\omega_{qi} - \omega - i\Gamma_q}. \quad (\text{B.49})$$

Cet opérateur complexe peut se simplifier si nous faisons appel à certaines approximations. La première, nous l'avons déjà utilisé section 1.1.1.1, c'est l'approximation adiabatique : la description de l'état de la molécule fournie par la fonction d'onde, peut se diviser en une part électronique et nucléaire. Cette part nucléaire comprend les états vibrationnels et rotationnels de la molécule. Il vient :

$$|\psi_q\rangle = |e^q\rangle |v^q\rangle |R^q\rangle \quad (\text{B.50})$$

$$\omega_q = \omega_{e^q} + \omega_{v^q} + \omega_{R^q} \quad (\text{B.51})$$

avec v indiquant les états vibrationnels comme cela a été introduit équation A.27, et e et R les états électroniques et rotationnels. Si nous faisons l'hypothèse que le niveau électronique fondamental de la molécule (*ground state* noté e^g) est non-dégénéré, nous pouvons transformer l'équation B.48 qui devient

$$(\alpha_{yx})_{v^f R^f, v^i R^i} = \langle R^f | \langle v^f | \langle e^g | \alpha_{yx} | e^g \rangle | v^i \rangle | R^i \rangle \quad (\text{B.52})$$

et si nous changeons de référentiel afin de nous placer dans celui de la molécule, tels que x et y deviennent x' et y' nous obtenons

$$(\alpha_{yx})_{v^f R^f, v^i R^i} = \langle R^f | l_{yy'} l_{xx'} | R^i \rangle \langle v^f | \langle e^g | \alpha_{y'x'} | e^g \rangle | v^i \rangle \quad (\text{B.53})$$

avec $l_{yy'}$ et $l_{xx'}$ les opérateurs cosinus directeurs affectant seulement les transitions rotationnelles : les transitions électroniques et vibrationnelles ne dépendent que des coordonnées moléculaires. Dans le cas qui nous intéresse, la diffusion Raman purement vibrationnelle, le terme gauche de l'équation B.53 est égal à 1 et on ne peut pas discerner les opérateurs α_{yx} et $\alpha_{y'x'}$ donc

$$(\alpha_{yx})_{v^f, v^i} = \langle v^f | \langle e^g | \alpha_{yx} | e^g \rangle | v^i \rangle \quad (\text{B.54})$$

avec l'opérateur α_{yx} qui vaut donc

$$\alpha_{yx} = \frac{1}{\hbar} \sum_q \frac{D_y |e^g\rangle |v^q\rangle \langle v^q| \langle e^g| D_x}{\omega_{e^g g} + \omega_{v^q i} - \omega - i\Gamma_{e^g g v^q i}} \quad (\text{B.55a})$$

$$= \frac{1}{\hbar} \sum_q \frac{D_y |e^g\rangle |v^q\rangle \langle v^q| \langle e^g| D_x}{\omega_{v^q i} - \omega - i\Gamma_{v^q i}}. \quad (\text{B.55b})$$

Si les transitions électroniques et moléculaires dépendent des coordonnées moléculaires c'est parce que l'opérateur de moment dipolaire électrique D dépend des coordonnées moléculaires. Selon l'approximation adiabatique on peut diviser les dépendances des coordonnées électroniques, que l'on notera ξ , et les coordonnées nucléaires, qui seront notées Q , telles que

$$D_x = D_x(\xi, Q) \quad (\text{B.56a})$$

$$D_y = D_y(\xi, Q). \quad (\text{B.56b})$$

Comme il été déjà dit, l'hypothèse adiabatique considère que devant le mouvement des électrons, les coordonnées nucléaires sont fixes. On peut donc intégrer sur la partie de la fonction d'onde décrivant les états électroniques, soit sur les coordonnées électroniques. Il vient donc

$$D_x(Q) = \langle e^g | D_x(\xi, Q) | e^g \rangle \quad (\text{B.57a})$$

$$D_y(Q) = \langle e^g | D_y(\xi, Q) | e^g \rangle \quad (\text{B.57b})$$

avec $D_x(Q)$ et $D_y(Q)$ les composantes du moment dipolaire électrique adiabatique. Ces composantes, nous pouvons les introduire dans les équations B.52 et B.55b afin d'obtenir l'expression de la polarisabilité pour une transition purement vibrationnelle

$$(\alpha_{yx})_{v^f, v^i} = \frac{1}{\hbar} \sum_q \frac{\langle v^f | D_y(Q) | v^q \rangle \langle v^q | D_x(Q) | v^i \rangle}{\omega_{v^q i} - \omega - i\Gamma_{v^q i}} \quad (\text{B.58})$$

ou

$$(\alpha_{yx})_{v^f, v^i} = \langle v^f | \alpha_{yx}(Q) | v^i \rangle \quad (\text{B.59})$$

avec $\alpha_{yx}(Q)$ la composante de l'opérateur de polarisabilité adiabatique.

Annexe C :

**Champ électromagnétique produit
par un dipôle oscillant**

Afin de connaître le champ électromagnétique et l'intensité du champ électrique émis par un électron oscillant sous l'action d'un autre champ électrique, il nous faut retourner au point de vue ondulatoire classique. Considérons comme dans la section 1.1.1.1 nos deux noyaux atomiques comme des sphères dans le vide le long d'un axe x , séparés par une charge q oscillant entre elles : cette charge représente le nuage électronique. Au barycentre des sphères, qu'on place à l'origine de notre repère, la charge peut s'écrire

$$q = q_0 \cos(\omega t) \quad (\text{C.1})$$

avec q_0 la charge lorsque les deux sphères sont à l'équilibre et ω la fréquence angulaire d'oscillation de la charge. Afin de simplifier les calculs nous allons développer l'expression de la charge oscillante sous forme complexe :

$$q = \frac{q_0}{2} (e^{i\omega t} + e^{-i\omega t}). \quad (\text{C.2})$$

Le moment dipolaire électrique \vec{D} produit par l'oscillation de l'électron s'écrit

$$\vec{D} = \frac{q_0 l}{2} (e^{i\omega t} + e^{-i\omega t}) \vec{e}_x \quad (\text{C.3})$$

avec l la distance entre les deux sphères et \vec{e}_x le vecteur unité de l'axe x . On introduit $D_0 = q_0 l$ (C.m) la norme du moment dipolaire à l'équilibre. Le courant électrique \mathcal{I} (A ou C.s⁻¹) circulant le long du dipôle est

$$\mathcal{I}(t) = \frac{dq}{dt} = \frac{i\omega q_0}{2} (e^{i\omega t} - e^{-i\omega t}). \quad (\text{C.4})$$

Dans la jauge de Lorentz le potentiel vecteur dépendant du temps $\vec{A}(\vec{r}, t)$ (avec sa norme en T.m ou V.s.m⁻¹) pris à un point P de l'espace, respecte l'équation d'onde

$$\nabla^2 \vec{A}(\vec{r}, t) - \frac{1}{c^2} \ddot{\vec{A}}(\vec{r}, t) = -\mu_0 \vec{J}(\vec{r}, t) \quad (\text{C.5})$$

avec \vec{r} définissant la position du point P par rapport à l'origine, c la vitesse de la lumière (m.s⁻¹), μ_0 la perméabilité du vide (T.m.A⁻¹), \vec{J} la densité de courant (A.m⁻³) et en utilisant la notation de Newton pour marquer la dérivée temporelle seconde. Il a pour solution

$$\vec{A}(\vec{r}, t) = \frac{\mu_0}{4\pi} \int_V \frac{\vec{J}(\vec{r}', t')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} dV'. \quad (\text{C.6})$$

avec r la norme de \vec{r} , r' la norme de \vec{r}' définissant la position du volume infinitésimale V' contenu dans le volume V de la source du courant. Le retard entre t et t' est fonction de

la distance entre la source et P

$$t = t' + \frac{|\vec{r} - \vec{r}'|}{c}. \quad (\text{C.7})$$

On peut aussi établir une relation entre la densité de courant et le courant électrique telle que

$$\int \frac{\vec{J}(\vec{r}', t')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} dV' = \frac{\mathcal{I}(t')l}{r} \vec{e}_x \quad (\text{C.8})$$

et obtenir une définition du potentiel vecteur en fonction du moment dipolaire

$$\vec{A}(\vec{r}, t) = \frac{\mu_0}{4\pi} i\omega D_0 \frac{e^{i\omega t'} - e^{-i\omega t'}}{2r} \vec{e}_x. \quad (\text{C.9})$$

On voit alors que le potentiel vecteur est orienté selon le moment dipolaire et possède, comme lui, une symétrie de révolution autour de l'axe x . On peut alors se placer en coordonnées sphériques

$$A_r = A \cos \theta \quad (\text{C.10a})$$

$$A_\theta = -A \sin \theta \quad (\text{C.10b})$$

$$A_\psi = 0 \quad (\text{C.10c})$$

où

$$A = \frac{\mu_0}{4\pi} i\omega D_0 \frac{e^{i(\omega t - kr)} - e^{-i(\omega t - kr)}}{2r} \quad (\text{C.11})$$

avec k (rad.m^{-1}) le nombre d'onde tel que $k = \omega/c$ et en ayant considéré P loin de la source placée à l'origine tel que $|\vec{r} - \vec{r}'| = r$.

Nous pouvons alors obtenir l'induction magnétique \vec{B} (T) générée par le dipôle tel que

$$\vec{B} = \vec{\nabla} \times \vec{A}. \quad (\text{C.12})$$

Il vient

$$B_r = 0 \quad (\text{C.13a})$$

$$B_\theta = 0 \quad (\text{C.13b})$$

$$B_\psi = -\frac{\mu_0}{4\pi} D_0 \frac{k^2 c}{2r} \sin \theta \left\{ \left(1 - \frac{i}{kr}\right) e^{i(\omega t - kr)} + \left(1 + \frac{i}{kr}\right) e^{-i(\omega t - kr)} \right\}. \quad (\text{C.13c})$$

Or, nous connaissons la relation qui lie le champ magnétique \vec{H} (A.m^{-1}), la densité de courant \vec{J} et l'induction électrique \vec{D} (C.m^{-2}) par le théorème d'Ampère modifiée ou équation de Maxwell-Ampère

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \vec{J} + \dot{\vec{D}} \quad (\text{C.14})$$

avec dans le vide

$$\vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu_0} \quad (\text{C.15a})$$

$$\vec{J} = 0 \quad (\text{C.15b})$$

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} \quad (\text{C.15c})$$

où \vec{E} représente le champ électrique (V.m^{-1}) et ε_0 la permittivité du vide ($\text{A.s}^2.\text{T}^{-1}.\text{m}^{-3}$). La dérivée temporelle de ce dernier peut alors s'obtenir à partir de C.14 et C.15

$$\dot{\vec{E}} = \frac{1}{\varepsilon_0 \mu_0} (\vec{\nabla} \times \vec{B}) \quad (\text{C.16})$$

donc d'après les équations C.13

$$\dot{E}_r = -\frac{1}{4\pi\varepsilon_0} 2D_0 \frac{k^2 c}{2r^2} \cos \theta \left\{ \left(1 - \frac{i}{kr}\right) e^{i(\omega t - kr)} + \left(1 + \frac{i}{kr}\right) e^{-i(\omega t - kr)} \right\} \quad (\text{C.17a})$$

$$\dot{E}_\theta = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} D_0 \frac{k^2 c}{2r} \sin \theta \left\{ \left(-ik + \frac{i}{kr^2} - \frac{1}{r}\right) e^{i(\omega t - kr)} + \left(ik - \frac{i}{kr^2} - \frac{1}{r}\right) e^{-i(\omega t - kr)} \right\} \quad (\text{C.17b})$$

$$\dot{E}_\psi = 0 \quad (\text{C.17c})$$

et en intégrant par rapport à t nous obtenons

$$E_r = \frac{i}{4\pi\varepsilon_0} 2D_0 \frac{k}{2r^2} \cos \theta \left\{ \left(1 - \frac{i}{kr}\right) e^{i(\omega t - kr)} - \left(1 + \frac{i}{kr}\right) e^{-i(\omega t - kr)} \right\} \quad (\text{C.18a})$$

$$E_\theta = -\frac{1}{4\pi\varepsilon_0} D_0 \frac{k^2}{2r} \sin \theta \left\{ \left(1 - \frac{i}{kr} - \frac{1}{k^2 r^2}\right) e^{i(\omega t - kr)} + \left(1 + \frac{i}{kr} - \frac{1}{k^2 r^2}\right) e^{-i(\omega t - kr)} \right\} \quad (\text{C.18b})$$

$$E_\psi = 0 \quad (\text{C.18c})$$

ce qui, en se plaçant dans la condition du champ lointain : $kr \gg 1$, donne

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = -\frac{1}{4\pi\varepsilon_0} D_0 \frac{k^2}{r} \sin \theta \frac{e^{i(\omega t - kr)} + e^{-i(\omega t - kr)}}{2} \vec{e}_\theta \quad (\text{C.19})$$

ou

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = -\frac{1}{4\pi\varepsilon_0 c^2} D_0 \frac{\omega^2}{r} \sin \theta \cos(\omega t - kr) \vec{e}_\theta. \quad (\text{C.20})$$

L'intensité $I(\vec{r})$ (W.m^{-2}) de cette onde électrique peut alors être calculée

$$I(\vec{r}) = n(\omega) \varepsilon_0 c \overline{|\vec{E}|^2}(\vec{r}, t) \quad (\text{C.21})$$

avec $n(\omega)$ l'indice de réfraction du milieu correspondant à la fréquence angulaire du champ \vec{E} et $|\vec{E}|^2$ le carré de la norme du champ électrique intégré sur un temps long devant plusieurs périodes d'oscillation du dipôle, soit

$$I(\vec{r}) = \frac{D_0^2 n(\omega) \omega^4 \sin^2 \theta}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3 r^2}. \quad (\text{C.22})$$

Cette relation nous permet donc d'estimer l'intensité du champ électrique émis par un électron oscillant sous l'action d'un autre champ électrique. Cette excitation, mise en mouvement, ou polarisation de l'électron, va varier en fonction du milieu.

Annexe D :

**Courbes de transmission et réflexion
de différents éléments optiques**

Les courbes de transmission et de réflexion données figure D.1 à D.6 ont été mesurées à l'aide d'un analyseur de spectre (Ando, AQ-6315A). Les courbes d'efficacité relative du réseau de diffraction et d'efficacité quantique de la caméra présentées figure D.7 et D.8 sont issues des données fournies par le constructeur.

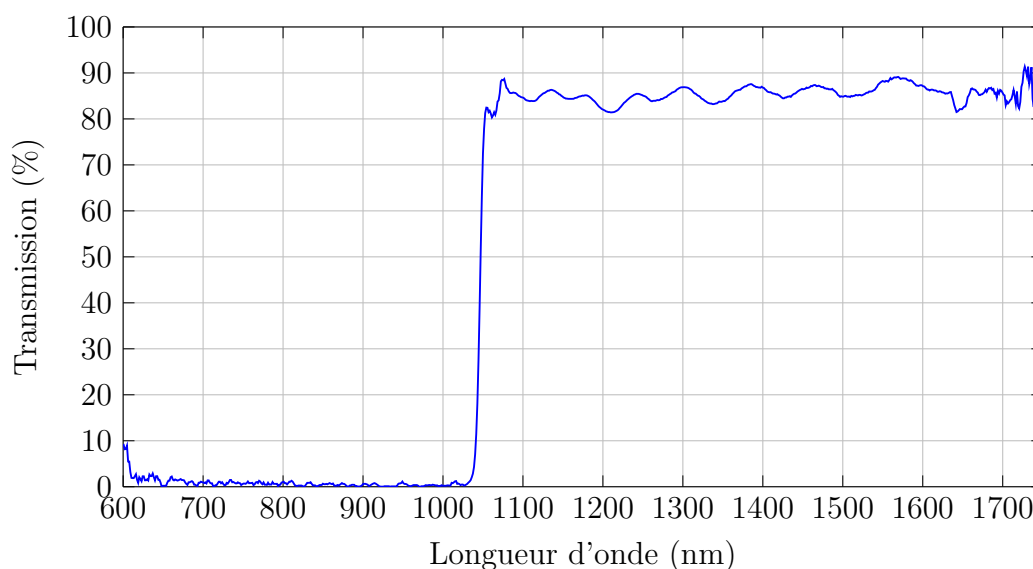


FIGURE D.1 – Courbe de transmission du filtre passe-haut à 1050 nm Thorlabs, FEL1050.

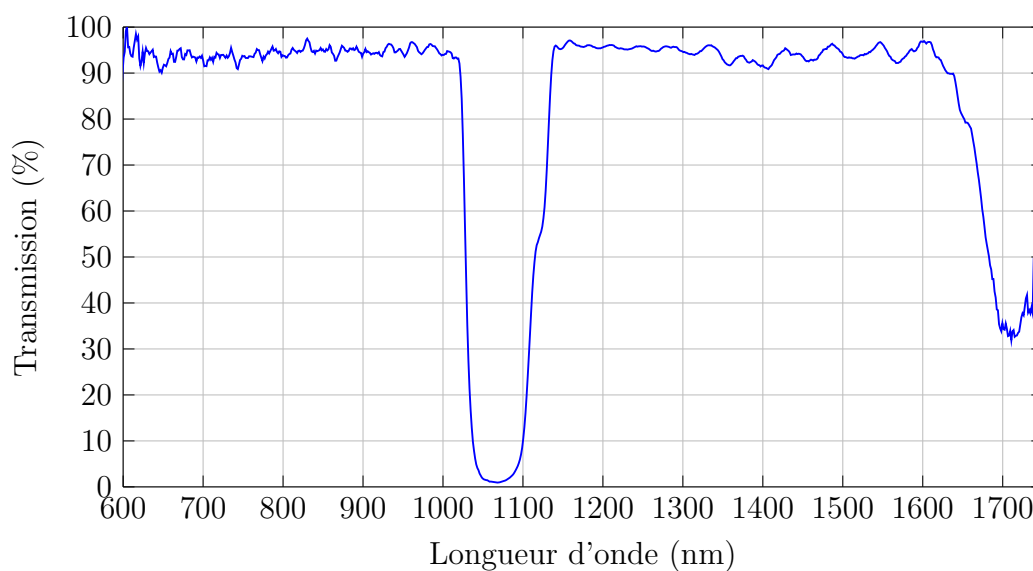


FIGURE D.2 – Courbe de transmission du miroir dichroïque coupe-bande à 1064 nm Semrock, NFD01-1064-25x36.

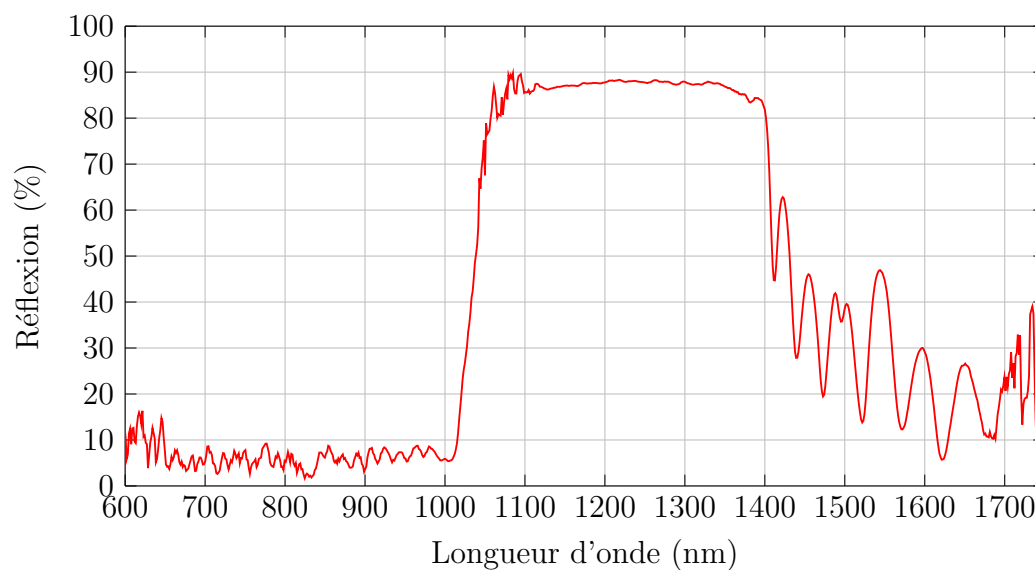


FIGURE D.3 – Courbe de réflexion du miroir dichroïque passe-bas à 1050 nm Edmund Optics, 25.2 x 35.6mm, numéro de stock #86-696.

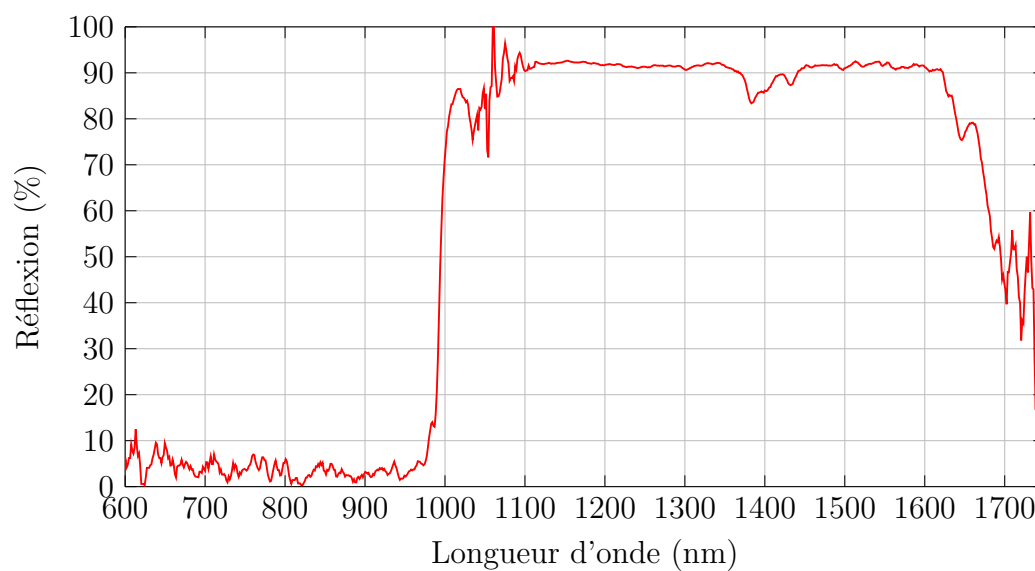


FIGURE D.4 – Courbe de réflexion du miroir dichroïque passe-bas à 1000 nm Thorlabs, DMSP1000R.

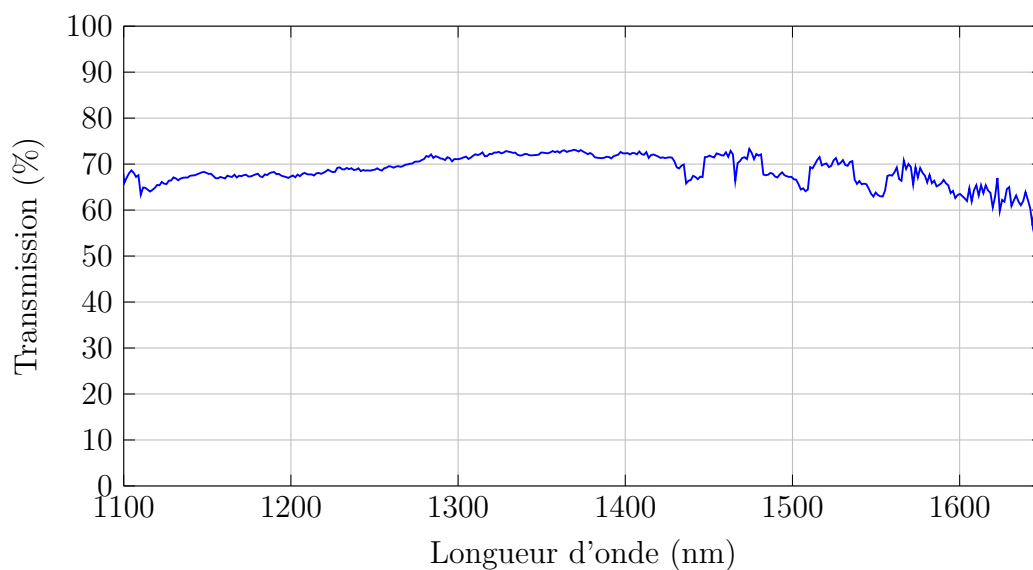


FIGURE D.5 – Courbe de transmission de l'objectif Olympus, UPlanSApo 60x, O.N. = 1,2 immersion dans l'eau.

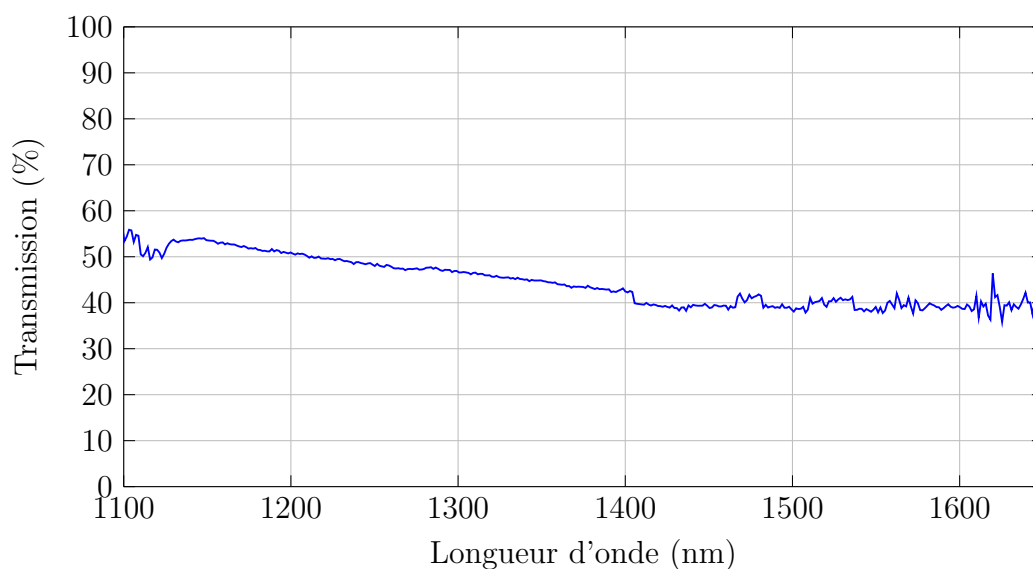


FIGURE D.6 – Courbe de transmission de l'objectif Nikon x60, S Plan Fluor ELWD 60x, O.N. = 0,7.

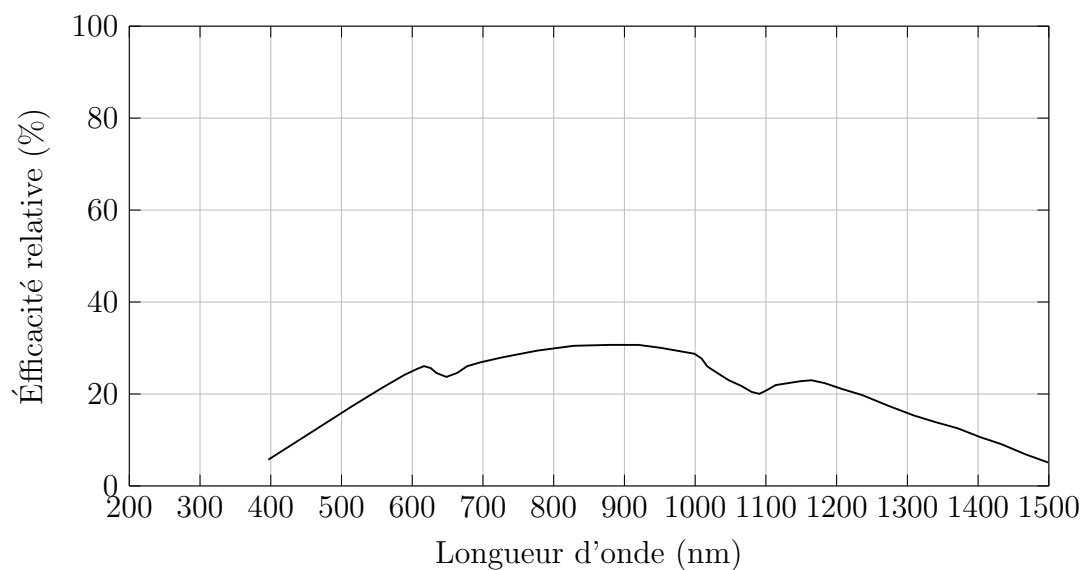


FIGURE D.7 – Courbe de l'efficacité relative du réseau de diffraction Horiba, 520 29, 600 sillons.mm⁻¹.

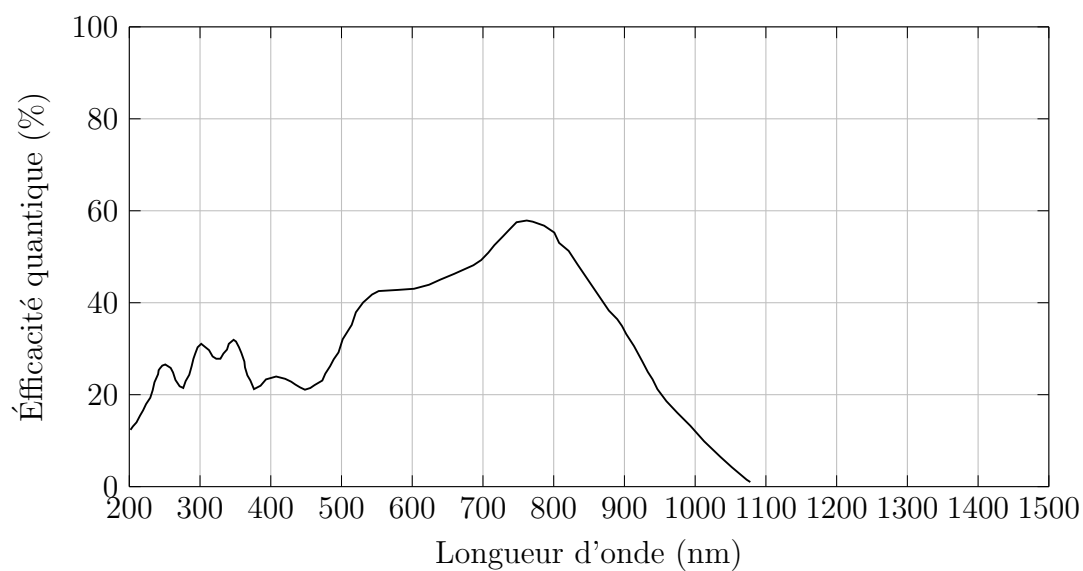
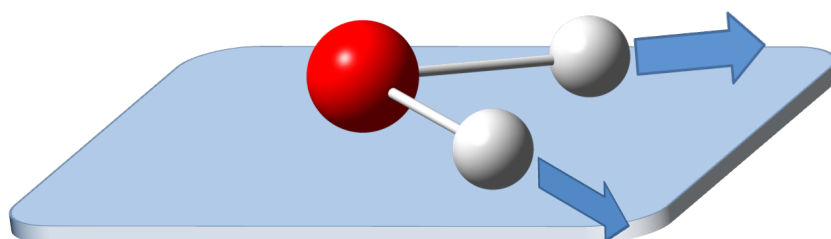


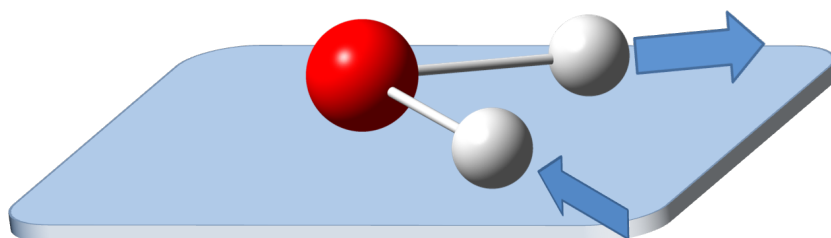
FIGURE D.8 – Courbe de l'efficacité quantique de la caméra CCD Horiba, Synapse.

Annexe E :
Modes de vibration des liaisons
moléculaires

Les six modes vibrationnels des molécules sont regroupés en trois groupe : les élongations, les déformations dans le plan et les déformations hors du plan de la molécule. Ils sont ici schématisés dans le cas de la molécule d'eau.

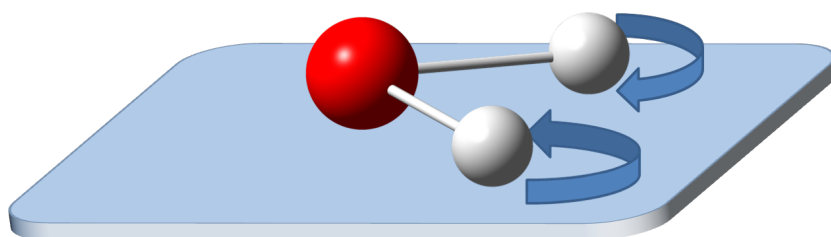


(a) Élongation symétrique.

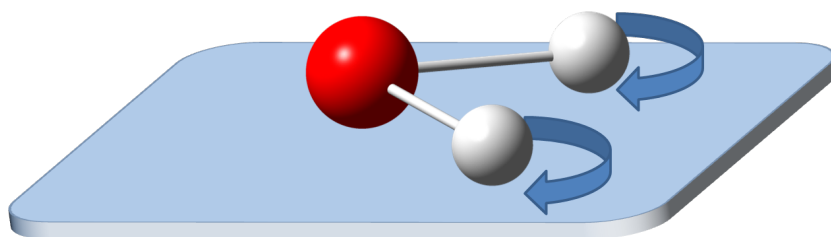


(b) Élongation asymétrique.

FIGURE E.1 – Schéma des deux modes vibrationnels d'élongation (a) symétrique et (b) asymétrique.

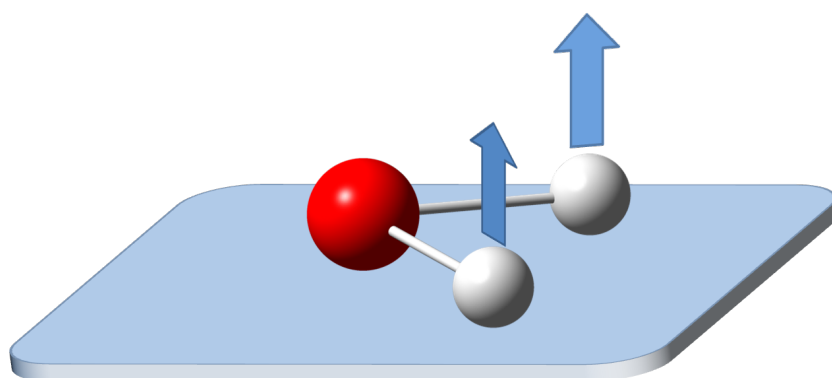


(a) Schéma de cisaillement.

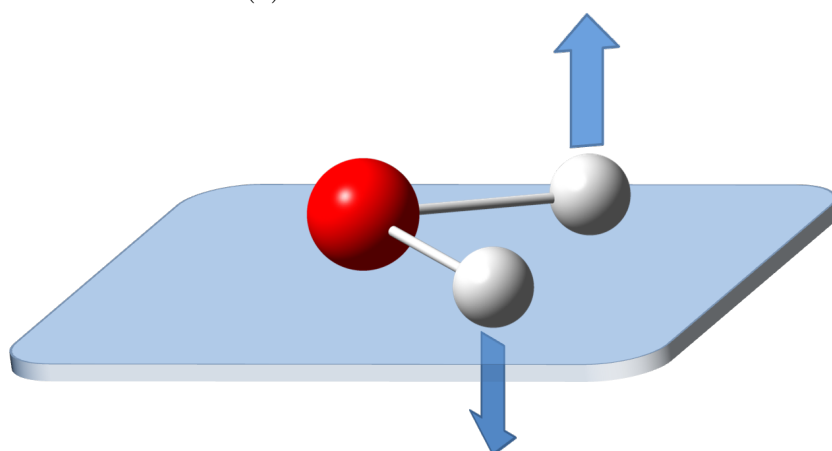


(b) Schéma de rotation.

FIGURE E.2 – Schéma des deux modes vibrationnels de déformation angulaire dans le plan (a) symétrique et (b) asymétrique.



(a) Schéma de balancement.



(b) Schéma de torsion.

FIGURE E.3 – Schéma des deux modes vibrationnels de déformation angulaire hors du plan (a) symétrique et (b) asymétrique.

Nouveaux procédés de microspectroscopie Raman cohérente à bande ultralarge

Résumé : La technique de spectroscopie basée sur la diffusion Raman Stokes spontanée est un procédé standard employé dans de nombreux domaines allant de la thermodynamique à la médecine, en passant par la science des matériaux. À la faveur d'un échange d'énergie inélastique, elle permet de déterminer les fréquences des vibrations moléculaires présentes dans un objet. On peut ainsi remonter à l'identification des molécules et ainsi caractériser l'objet d'étude sans utiliser de marqueur spécifique. Cette méthode est néanmoins affligée de défauts. Outre la présence d'un signal de fluorescence qui peut submerger la réponse Raman, le désavantage majeur est le long temps d'exposition que requière cette technique. Dans le cas d'étude d'échantillon biologique, cela proscrit son usage pour des mesures de microspectroscopie : la cartographie spectrale d'objet microscopique.

Afin de pallier ce problème, de nouvelles techniques ont été développées. C'est le cas de la spectroscopie employant la diffusion Raman anti-Stokes cohérente (ou CARS pour *coherent anti-Stokes Raman scattering*). Du fait de sa cohérence le signal anti-Stokes affiche une intensité 10^5 à 10^6 fois plus importante que dans le cas de la diffusion Raman spontanée, ce qui permet alors d'abaisser le temps d'exposition à un niveau tolérable pour les objets biologiques lors d'une mesure de microspectroscopie. De plus, le caractère anti-Stokes du signal l'épargne de la contribution de la fluorescence. Pourtant, un défaut majeur limite encore l'utilisation de cette technique : le bruit de fond non résonant. Ce phénomène peut diminuer, voire noyer la contribution résonante qui porte l'information.

Cette thèse a permis le développement de techniques CARS autorisant une réduction du bruit de fond non résonant. Pour ce faire un dispositif de spectroscopie CARS multiplex (M-CARS) en configuration copropagative a été construit. Ses capacités sont illustrées par des mesures spectrales d'échantillons minéral, végétal et biologique. À partir de ce système, il a été établi une méthode innovante permettant de discriminer le signal résonant du bruit non résonant en utilisant un champ électrique continu. Il est aussi démontré la mise en place d'un procédé qui a permis de mener la première mesure de microspectroscopie M-CARS en configuration contrapropagative sur un échantillon biologique. Cette configuration limite la collecte du signal à l'objet d'étude, empêchant ainsi l'acquisition du signal résonant et non résonant issu du solvant, principal responsable du bruit de fond non résonant lors d'une mesure CARS en configuration copropagative.

Mots clés : spectroscopie Raman, microspectroscopie CARS multiplex, microscopie non linéaire, imagerie biomédicale.

Novel methods of ultrabroadband coherent Raman microspectroscopy

Abstract: The spectroscopy technique based on spontaneous Raman Stokes scattering is a standard process used in many fields spanning from thermodynamic and medicine, to materials sciences. An inelastic energy exchange permits to determinate the frequency of the molecular vibrations in an object. One can identify the molecules and thus, can characterize the object of study in a label-free way. Nevertheless, this method is afflicted with faults. Beside the presence of fluorescence that can drown the Raman answer, the main drawback is the long exposition time required. In the case of biological sample, this can prohibit the use of spontaneous Raman scattering for microspectroscopy measures: the spectral mapping of microscopic objects.

To avoid this problem, new techniques have been developed. It is the case of the coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) spectroscopy. Due to its coherence, the anti-Stokes signal has an intensity 10^5 to 10^6 times greater than the spontaneous Raman scattering one. The exposition time is then reduced to a tolerable level for biological objects during microspectroscopy measures. Moreover, the anti-Stokes characteristic of the signal prevents the fluorescence contribution. However, a major fault still limits the use of this technique: the nonresonant background. This phenomenon can diminish, even overwhelm the resonant contribution carrying the information.

This thesis permitted the development of CARS approaches that allow the reduction of the nonresonant background. To do so, a multiplex CARS (M-CARS) spectroscopy apparatus in a forward configuration has been built. Its abilities are illustrated with spectral measures of mineral, vegetal and biological samples. Based on this system, it has been established an innovative method that can discriminate the resonant signal from the nonresonant one thanks to a static electric field. It has also been demonstrated the development of a process that has allowed the first M-CARS microspectroscopy measure of a biological sample in a contrapropagative configuration. This setup limits the collect of the signal to the object of study, avoiding the acquisition of the resonant and nonresonant signals coming from the solvent, responsible for the major part of the non resonant background during a CARS measure in a forward configuration..

Keywords: Raman spectroscopy, multiplex CARS microspectroscopy, nonlinear microscopy, biomedical imaging.

Xlim - UMR CNRS n° 7252
123, avenue Albert Thomas - 87060 LIMOGES