Imagerie Raman cohérente

Hervé Rigneault et Julien Duboisset
Aix Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, Institut Fresnel, Marseille, France

1 Introduction

Obtenir des informations sur la matière à des échelles micrométriques, de manière non destructive et sans utiliser aucun marquage reste un défi méthodologique et technologique. Les techniques établies de microscopie de fluorescence ont permis de réelles avancées dans la compréhension des phénomènes biologiques mais le marquage utilisant des fluorophores limite considérablement cette technique, en particulier dans le domaine biomédical. Depuis une quinzaine d'année, la microscopie Raman cohérente a connu un important essor [1]. Basée sur les propriétés vibrationnelles des molécules, cette technique permet aujourd'hui une imagerie tridimensionnelle des liaisons chimiques à cadence vidéo [2]. De nombreux développements ont permis, à partir des concepts de la diffusion Raman et de l'optique non linéaire, d'élaborer des outils technologiques puissants permettant d'imager les échantillons biologiques en utilisant les contrastes de diffusion Raman anti-Stokes et de diffusion Raman stimulée. Dans ce chapitre, nous développons tout d'abord, grâce à des modèles simples, ces processus clés permettant d'appréhender la physique sous-jacente à l'imagerie Raman cohérente. Ensuite, nous illustrons ces techniques d'imagerie au travers de travaux menés récemment sur des échantillons biologiques et cristallins. Nous discutons enfin les perspectives actuelles concernant l'évolution des technologies et leurs domaines applicatifs.

2 Théorie

2.1 Raman spontané

Une molécule est le siège de nombreuses vibrations et rotations interatomiques. Chacun de ses modes possède une énergie propre et une symétrie particulière, qui dépendent de la masse des atomes, de la nature des liaisons chimiques et de l'environnement. Ces énergies correspondent au domaine de l'infrarouge et peuvent être sondées par spectroscopie d'absorption. Les modes rotationnels ont des énergies al-

lant de quelques cm^{-1} jusqu'à 400 cm^{-1} (correspondant à des longueurs d'ondes allant de λ=25 μm à λ=1000 μm). Les modes vibrationnels ont des énergies plus élevées allant de 400 cm^{-1} jusqu'à 4000 cm^{-1} (correspondant à des longueurs d'ondes allant de λ=2,5 μm à λ=25 μm) ce qui correspond à l'infrarouge moyen.

Le comportement vibrationnel d'une molécule peut être décrit de manière classique par le modèle de l'oscillateur harmonique. Les forces électrostatiques de Van Der Waals induisent l'attraction des atomes entre eux tandis que le principe d'exclusion de Pauli agit comme une force répulsive. Ces deux forces se compensent lorsque les atomes se trouvent à leur position d'équilibre. Les variations de positions de ces atomes autour de leur position d'équilibre peuvent être décrites par un simple modèle d'oscillateur harmonique. Dans ce cadre, tout se passe comme si les atomes étaient reliés par des ressorts au sein de la molécule.

Lorsque une molécule est illuminée par une lumière monochromatique, la plupart des photons sont diffusés élastiquement, c'est-à-dire qu'ils gardent la même énergie. On parle alors de diffusion Rayleigh ou de diffusion élastique. Cependant, une petite fraction des photons incidents interagit avec la molécule en échangeant de l'énergie avec celle-ci.

On considère alors que la polarisabilité α de la molécule n'est pas constante mais dépend de la distance entre atomes, cette dernière n'étant pas fixe mais sujette à des oscillations $r(t) = r\cos(\Omega_R t)$, ou r représente l'amplitude des oscillations et Ω_R sa pulsation. Pour de petits déplacements des atomes autour de leurs positions d'équilibre, il est possible d'écrire la polarisabilité selon un développement de Taylor :

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right)_0 r(t) + \dots \quad (1)$$

Le champ électromagnétique incident $E(t) = E_p \cos(\omega_p t)$ induit alors un moment dipolaire au sein de la molécule selon la relation constitutive :

$$p(t) = \varepsilon_0 \alpha(t) E(t) \quad (2)$$

En introduisant l'expression de la polarisabilité dans l'expression précédente, on obtient :

$$p(t) = \varepsilon_0 \left[\alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right)_0 r\cos(\Omega_R t)\right] E_p \cos(\omega_p t) \quad (3)$$

$$\begin{aligned} p(t) &= \varepsilon_0 \alpha_0 E_p \cos(\omega_p t) \\ &+ \varepsilon_0 \left(\tfrac{\partial \alpha}{\partial r}\right)_0 r E_p \cos[(\Omega_R - \omega_p) t] \\ &+ \varepsilon_0 \left(\tfrac{\partial \alpha}{\partial r}\right)_0 r E_p \cos[(\Omega_R + \omega_p) t] \end{aligned} \quad (4)$$

Le terme en $\cos(\omega_p t)$ rend compte de la diffusion Rayleigh. Le second terme en $\cos(\Omega_R - \omega_p)$ rend compte de la diffusion Raman Stokes décalée vers les plus basses

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

énergies. Dans ce cas la molécule, en passant de son niveau fondamental à un niveau vibrationnel excité, capte de l'énergie au champ incident. Le dernier terme en $\cos(\Omega_R + \omega_p)$ rend compte de la diffusion Raman anti-Stokes décalée vers les plus hautes énergies. La molécule passe alors de son niveau excité à son niveau fondamental en donnant de l'énergie au champ incident. Pour que le processus de diffusion Raman ait lieu, il doit y avoir un changement de polarisabilité lorsque la molécule vibre, autrement dit le terme $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right)_0 \neq 0$.

2.2 Raman cohérent

Le Raman cohérent est un processus d'optique non linéaire basé sur un mélange à 4 ondes. De tel processus résultent de la non-linéarité de la réponse du milieu vis-à-vis de l'action d'un fort champ électromagnétique. Les phénomènes apparaissent lorsque l'amplitude des champs devient forte devant les champs interatomiques (de l'ordre de 10^{11} V/m). Les premiers phénomènes d'optiques non linéaires furent ainsi observés après l'invention du laser en 1960. Alors que la plupart des phénomènes non linéaires offrent des efficacités moindres que les processus linéaires, la diffusion Raman cohérente est extrêmement intéressante car elle offre un gain de l'ordre de 10^7 par rapport au processus de Raman spontané. Cette efficacité est due aux caractères cohérent et résonnant.

Dans le processus Raman cohérent deux ondes électromagnétiques, dénoté pompe et Stokes, de pulsation ω_p et ω_S, d'amplitude A_p et A_S et de vecteur d'onde k_p et k_S, vont interagir avec le milieu. Le champ total s'écrit alors :

$$E\left(z,t\right) = A_p e^{i(k_p z - \omega_p t)} + A_S e^{i(k_S z - \omega_S t)} + c.c, \quad (5)$$

où $c.c$ représente les complexes conjugués. La somme cohérente de ces deux ondes crée un terme de battement dans l'intensité totale à la pulsation $\Omega{=}\omega_p - \omega_S$ selon :

$$\left\langle E^2\left(z,t\right)\right\rangle = A_p A_S^* e^{i(Kz - \Omega t)} + c.c, \quad (6)$$

où $\langle\ \rangle$ représente la moyenne temporelle, $k = k_p - k_S$ et $\Omega = \omega_p - \omega_S$.

Dans le cadre du modèle de l'oscillateur harmonique, les deux champs pompe et Stokes vont forcer la vibration et peupler de manière cohérente le niveau vibrationnel dont l'énergie correspond à la fréquence de battement [3]. L'énergie nécessaire pour établir le moment dipolaire est :

$$W = \frac{1}{2}\left\langle p\left(z,t\right) E(z,t)\right\rangle = \frac{1}{2}\varepsilon_0 \alpha \left\langle E^2(z,t)\right\rangle. \quad (7)$$

De cette énergie dérive une force associée selon :

$$F\left(t\right) = \frac{\partial W}{\partial r} = \frac{1}{2}\left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right)\varepsilon_0 \left[A_p A_S^* e^{i(Kz - \Omega t)} + c.c\right]. \quad (8)$$

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

La distance inter-atomique va donc suivre un régime forcé suivant :

$$\frac{d^2r}{dt^2} + \frac{1}{\tau}\frac{dr}{dt} + \Omega_{\mathrm{R}}^2 = \frac{\mathrm{F(t)}}{\mathrm{m}}, \quad (9)$$

avec τ le temps caractéristique d'amortissement des oscillations et m la masse réduite du système. La solution de l'équation différentielle précédente prend la forme :

$$r\left(z,t\right) = r\left(\Omega\right) e^{i(Kz-\Omega t)} + c.c, \quad (10)$$

avec

$$r\left(\Omega\right) = \frac{-\varepsilon_0}{2m\Omega_{\mathrm{R}}} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right) \frac{A_p A_S^*}{(\Omega - \Omega_{\mathrm{R}}) + \frac{i}{\tau}} \quad (11)$$

Si le battement entre les deux lasers est accordé autour de la pulsation de résonance de la vibration moléculaire (c'est-à-dire $\Omega = \Omega_R$) alors l'oscillateur moléculaire est excité à résonance et son amplitude est maximale.

2.3 Dipôles non linéaires

La réponse du milieu sondé correspond à la réponse de chaque molécule p et de la densité moléculaire N :

$$P\left(t\right) = Np\left(t\right) = N\varepsilon_0 \left[\alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right)_0 r(z,t)\right] E(z,t) \quad (12)$$

Les champs pompe et Stokes, équation (5), vont venir sonder la variation de polarisabilité stimulée par ces mêmes champs pompe et Stokes, voir équation (11). En ne considérant que le terme non linéaire de l'équation (12) le dipôle non linéaire devient :

$$\begin{aligned} P\left(t\right) &= Np\left(t\right) \\ &= N\varepsilon_0 \left(\tfrac{\partial\alpha}{\partial r}\right)_0 \left[r\left(\Omega\right) e^{i(Kz-\Omega t)} + c.c\right] \left[A_p e^{i(k_p z - \omega_p t)} + A_S e^{i(k_S z - \omega_S t)} + c.c\right] \end{aligned} \quad (13)$$

En développant cette expression, il apparaît quatre termes différents :

$$P\left(\omega_{as}\right) = N\varepsilon_0 \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right)_0^2 \frac{-\varepsilon_0}{2m\Omega_{\mathrm{R}}} \frac{A_p A_p A_S^*}{(\Omega - \Omega_{\mathrm{R}}) + \frac{i}{\tau}} e^{i(2k_p - k_S)z} e^{-i\omega_{as}t} \quad (14)$$

$$P\left(\omega_{cs}\right) = N\varepsilon_0 \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right)_0^2 \frac{-\varepsilon_0}{2m\Omega_{\mathrm{R}}} \frac{A_p^* A_S A_S}{(\Omega - \Omega_{\mathrm{R}}) - \frac{i}{\tau}} e^{i(2k_S - k_p)z} e^{-i\omega_{cs}t} \quad (15)$$

$$P\left(\omega_{p}\right) = N\varepsilon_0 \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right)_0^2 \frac{-\varepsilon_0}{2m\Omega_{\mathrm{R}}} \frac{A_p A_S A_S^*}{(\Omega - \Omega_{\mathrm{R}}) + \frac{i}{\tau}} e^{ik_p z} e^{-i\omega_{p}t} \quad (16)$$

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

$$P(\omega_S) = N\varepsilon_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right)_0^2 \frac{-\varepsilon_0}{2m\Omega_{\mathrm{R}}} \frac{A_p A_p^* A_S}{(\Omega - \Omega_{\mathrm{R}}) - \frac{i}{\tau}} e^{ik_S z} e^{-i\omega_S t} \quad (17)$$

Ces quatre dipôles non linéaires ont des pulsations de vibrations différentes (voir figure 1).

- $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$, et $P(\omega_{as})$ est responsable de l'effet CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*)
- $\omega_{cs} = 2\omega_s - \omega_p$, et $P(\omega_{cs})$ est responsable de l'effet CSRS (*Coherent Stokes Raman Scattering*)
- ω_p, et $P(\omega_p)$ est responsable de l'effet SRL (*Stimulated Raman Loss*)
- ω_S, et $P(\omega_S)$ est responsable de l'effet SRL (*Stimulated Raman Gain*)

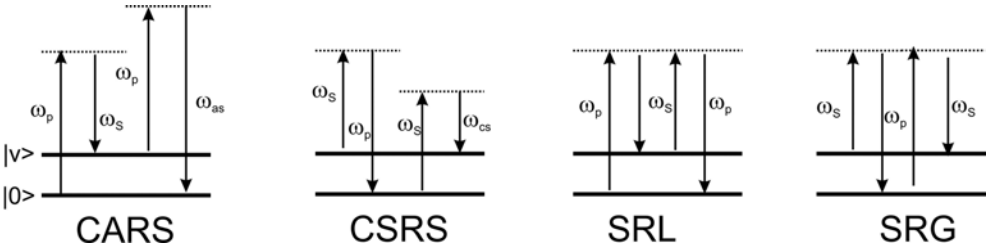


FIGURE 1 – Processus CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering), CSRS (coherent Stokes Raman scattering), SRL (Stimulated Raman loss) and SRG (Stimulated Raman gain).

Le processus CARS est intéressant d'un point de vue applicatif car les photons émis à la pulsation ω_{as} sont décalés vers le bleu par rapport aux champs incidents pompe et Stokes, et ainsi non pollués par une éventuelle auto-fluorescence parasite de l'échantillon. Le processus CSRS génère des photons très décalés vers le rouge par rapport aux champs incidents pompe et Stokes. Souvent difficile à détecter, car apparaissant dans le domaine IR, il est généralement peu utilisé. Les processus SRL et SRG génèrent des photons aux mêmes fréquences que les photons incidents pompe et Stokes, ils font partie du processus SRS (*Stimulated Raman Scattering*). Nous allons étudier maintenant plus en détail les processus CARS et SRS qui sont utilisés en pratique.

2.4 Diffusion Raman cohérente anti-Stokes – CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*)

Le processus CARS fut pour la première fois observé en 1965 par Maker et Terhune [4]. Ce processus génère des photons à la pulsation $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_S$. La polarisabilité non linéaire telle qu'écrite dans l'équation (14) peut s'exprimer par :

$$P(\omega_{as}) = \varepsilon_0 \chi^{(3)}(\omega_{as}) E_p E_p E_S^* \quad (18)$$

Où $\chi^{(3)}(\omega_{as})$ est la susceptibilité non linéaire d'ordre 3.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

$$\chi^{(3)} = \frac{a}{(\Omega - \Omega_R) + \frac{i}{\tau}} \quad (19)$$

Avec $a = -N\left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right)_0^2 \frac{\varepsilon_0}{2m\Omega_R}$.

Cependant, la contribution CARS n'est pas la seule à générer des photons à la pulsation ω_{as}. En effet, il existe une autre contribution de mélange à 4 ondes qui génère également des photons à la même pulsation. Ce processus provient de la réponse électronique instantanée de la matière et n'a pas de dépendance spectrale, il est dit « non résonnant ». La contribution non résonnante est décrite par la susceptibilité $\chi_{NR}^{(3)}$. Cette susceptibilité est réelle et constante lorsque les fréquences des lasers sont éloignées des résonances électroniques.

La susceptibilité de l'échantillon à la pulsation ω_{as} est alors la somme de deux contributions :

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)}. \quad (20)$$

La contribution non résonnante va avoir des conséquences importantes sur l'intensité collectée. L'intensité est proportionnelle au module carré de la susceptibilité :

$$\begin{aligned} I_{\omega_{as}} &\propto \left|\chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)}\right|^2 \\ &\propto \left|\chi_R^{(3)}\right|^2 + \left|\chi_{NR}^{(3)}\right|^2 + 2\mathcal{R}\left[\chi_R^{(3)}.{\chi_{NR}^{(3)}}^*\right] \\ &\propto \left|\chi_R^{(3)}\right|^2 + \left|\chi_{NR}^{(3)}\right|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)}.\mathcal{R}\left[\chi_R^{(3)}\right] \end{aligned} \quad (21)$$

L'intensité CARS est alors la somme de trois termes de différentes natures. Le terme résonnant $\left|\chi_R^{(3)}\right|^2$ qui contient l'information spectrale de la résonance vibrationnelle, similaire à l'information spectrale du Raman spontané. Le terme non-résonnant $\left|\chi_{NR}^{(3)}\right|^2$ qui est constant. Enfin, le terme croisé $2\chi_{NR}^{(3)}.\mathcal{R}\left[\chi_R^{(3)}\right]$, proportionnel à la partie réelle du terme résonnant.

La somme de ces trois termes va profondément modifier le comportement spectral de l'intensité anti-Stokes (figure 2). A cause du terme croisé, le spectre se trouve distordu. Le maximum d'intensité CARS se trouve décalé vers les petits nombres d'ondes et un minimum d'intensité apparait à droite du pic, vers les grands nombres d'ondes. La forme du spectre suit un profil de type Fano, qui résulte du couplage entre un système contenant des niveaux d'énergie discrets, ici les résonances vibrationnelles, et un système contenant un continuum d'énergie, ici la réponse électronique non résonnante.

Malgré la présence de ce fond non résonnant qui altère l'information spectrale, le processus CARS est un puissant outil spectroscopique. Son caractère cohérent et résonnant lui confère une très grande efficacité. Le décalage vers le bleu du photon

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

anti-Stokes permet une détection efficace et pratique des signaux avec une très grande sensibilité [5].

Aujourd'hui le processus CARS est largement utilisé pour l'imagerie spécifique sans marquage des échantillons biologiques.

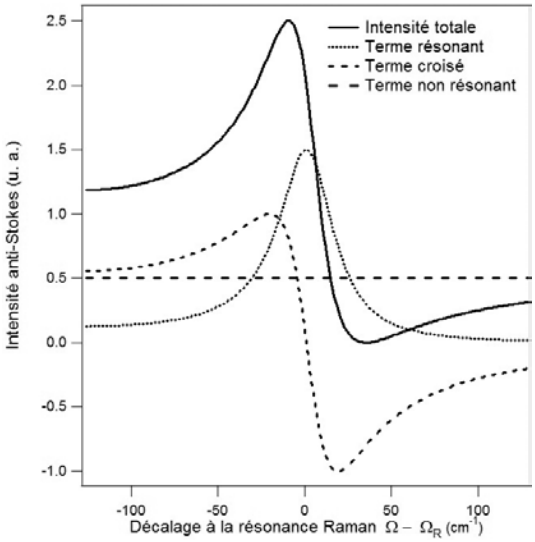


FIGURE 2 – Dépendance spectrale du signal anti-Stokes détecté dans le processus CARS. Contribution des termes résonnant, non résonnant et croisé.

2.5 Diffusion Raman stimulée – SRS (*Stimulated Raman Scattering*)

Dans l'expression des différentes polarisations deux polarisations non linéaires sont créées aux fréquences des lasers pompe et Stokes (équations [16] et [17]). Les dipôles non linéaires rayonnent alors aux mêmes fréquences que les lasers pompe et Stokes. En introduisant la susceptibilité non linéaire d'ordre 3, l'expression des dipôles devient :

$$P\left(\omega_p\right) = \varepsilon_0 \chi^{(3)}\left(\omega_p\right) A_p A_S A_S^* e^{ik_p z} \quad (22)$$

$$P\left(\omega_S\right) = \varepsilon_0 \chi^{(3)}\left(\omega_S\right) A_S A_p A_p^* e^{ik_s z} \quad (23)$$

Lors de l'interaction avec un milieu de longueur L, les champs incidents pompe et Stokes vont alors interférer avec les champs émis par les dipôles aux fréquences ω_P et ω_S (équations [22] et [23]). Dans l'approximation de l'enveloppe lentement variable [6] la propagation des champs pompe et Stokes s'écrit :

$$\begin{cases} \frac{\partial A_p}{\partial z} = \frac{i\omega_p}{2n_p\varepsilon_0 c} P(\omega_p) e^{-ik_p z} \\ \frac{\partial A_S}{\partial z} = \frac{i\omega_S}{2n_S\varepsilon_0 c} P(\omega_S) e^{-ik_S z} \end{cases} \quad (24)$$

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

En utilisant l'expression des polarisabilités non linéaires, il vient :

$$\begin{cases} \frac{\partial A_p}{\partial z} = \frac{i\omega_p}{2n_p c}\chi^{(3)}(\omega_p)\, A_p A_S A_S^* e^{i\Delta \mathrm{k}.z} \\ \\ \frac{\partial A_S}{\partial z} = \frac{i\omega_S}{2n_S c}\chi^{(3)}(\omega_S)\, A_S A_p A_p^* e^{i\Delta \mathrm{k}.z} \end{cases} \tag{25}$$

Avec $\Delta k = 0$. Ainsi l'accord de phase est toujours respecté en SRS et le champ non linéaire généré en z est toujours en phase avec les champs générés en d'autres points. En négligeant la déplétion des amplitudes incidentes il est possible d'écrire :

$$\begin{cases} A_p(L) = A_p(0) exp\left\{ \frac{i\omega_p}{2n_p c}\chi^{(3)}(\omega_p)\, |A_S(0)|^2 L \right\} \\ \\ A_S(L) = A_S(0) exp\left\{ \frac{i\omega_S}{2n_S c}\chi^{(3)}\,(\omega_S)\, |A_p(0)|^2 L \right\} \end{cases} \tag{26}$$

D'après les équations (16) et (17) il apparait que $\chi^{(3)}\,(\omega_p) = \chi^{(3)}\,(\omega_S)^*$. En introduisant l'intensité pompe $I_p = 2n_p\varepsilon_0 c|A_p|^2$ et l'intensité Stokes $I_S = 2n_S\varepsilon_0 c|A_S|^2$ et en séparant les parties réelle et imaginaire de la susceptibilité non linéaire on peut écrire l'intensité en fonction de la longueur L comme :

$$\begin{cases} I_p(L) = I_p(0) exp\left\{ -\frac{\omega_p L}{4n_p n_S \varepsilon_0 c^2} \mathrm{Im}\left[\, \chi^{(3)} \right] I_S(0) \right\} \\ \\ I_S(L) = I_S(0) exp\left\{ +\frac{\omega_S L}{4n_p n_S \varepsilon_0 c^2} \mathrm{Im}\left[\, \chi^{(3)} \right] I_p(0) \right\} \end{cases} \tag{27}$$

L'intensité des faisceaux pompe et Stokes dépend exponentiellement de la longueur L du matériau ainsi que de la partie imaginaire de la susceptibilité non linéaire. En microscopie où les faisceaux sont focalisés, la longueur L est généralement petite et de l'ordre de quelques longueurs d'onde. Dans ce cas il est possible de développer les expressions (27) à l'ordre 1 :

$$\begin{cases} I_p(L) \approx I_p(0) - \frac{\omega_p L}{4n_p n_S \varepsilon_0 c^2} \mathrm{Im}\left[\, \chi^{(3)} \right] I_S(0) I_p(0) \\ \\ I_S(L) \approx I_S(0) + \frac{\omega_S L}{4n_p n_S \varepsilon_0 c^2} \mathrm{Im}\left[\, \chi^{(3)} \right] I_p(0) I_S(0) \end{cases} \tag{28}$$

On constate alors que l'intensité du faisceau pompe va diminuer lors de la propagation dans un milieu comportant une résonance Raman, alors que le faisceau Stokes va lui bénéficier d'une amplification. Il s'opère alors un transfert d'énergie du faisceau pompe vers le faisceau Stokes. On parle dans le cas du faisceau pompe de « *Stimulated Raman Loss* (SRL) » et dans le cas du faisceau Stokes de « *Stimulated Raman Gain* (SRG) ». L'énorme avantage de ce processus est qu'il n'est pas pollué par un fond non résonnant comme peut l'être le signal CARS avec la réponse électronique du milieu. L'information spectrale du SRG ou SRL est rigoureusement la même que celle du Raman spontané, et par conséquent cela en fait un puissant outil spectroscopique.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

Aujourd'hui, la microscopie SRS permet d'acquérir des images hyper spectrales à la cadence vidéo sur des échantillons biologiques ı[2].

Épilogue. Il peut être intéressant de revenir sur la diffusion Raman spontanée à partir de l'équation (28). Dans le cas de la diffusion Raman spontanée, il n'existe que le faisceau pompe pour éclairer l'échantillon. Cependant, en espace libre, le vide fourni un large spectre de fluctuations continues qui vont jouer le rôle de faisceaux Stokes δI_S. Dans ce cas, il est possible d'écrire la diffusion Raman comme une émission stimulée par les photons du vide :

$$\begin{aligned} I_S(L) &\approx \delta I_S(0) + \tfrac{\omega_S L}{4 n_p n_S \varepsilon_0 c^2} \mathrm{Im}\left[\, \chi^{(3)} \right] I_p(0) \delta I_S(0) \\ &\approx \tfrac{\omega_S L}{4 n_p n_S \varepsilon_0 c^2} \mathrm{Im}\left[\, \chi^{(3)} \right] I_p(0) \delta I_S(0) \end{aligned} \tag{29}$$

Le rayonnement δI_S étant un rayonnement isotrope et l'accord de phase étant toujours respecté, le diagramme de rayonnement de la diffusion Raman est également isotrope. Le spectre Raman spontané est alors proportionnel à la partie imaginaire du tenseur de susceptibilité d'ordre 3. Il devient alors clair que le contraste SRS, comme le processus Raman spontané, sonde la partie imaginaire de $\chi^{(3)}$.

3 Mise en œuvre expérimentale

La mise en œuvre d'une expérience de Raman cohérent nécessite d'avoir à disposition deux lasers à impulsion de pulsations ω_P et ω_S et présentant un taux de répétition précisément identique, ceci afin de pouvoir assurer un recouvrement temporel des impulsions (à ω_P et ω_S) au niveau de l'échantillon. Ce recouvrement est nécessaire pour activer les mélanges d'ondes générant les signaux CARS et SRS. Si $\omega_S = \omega_P - \Omega_R$, c'est-à-dire $\omega_P - \omega_S = \Omega_R$, le mélange d'onde entre les impulsions pompe et Stokes est résonnant avec un mode vibratoire moléculaire Ω_R et les processus CARS et SRS présentent une sélectivité chimique. Si $\omega_P - \omega_S \neq \Omega_R$ alors les processus CARS et SRS sont faibles ou nuls car non résonnants avec les modes vibratoires, ils ne présentent alors pas de sélectivité chimique. Idéalement l'un au moins des lasers doit être accordable en longueur d'onde pour pouvoir faire varier la différence de fréquence $\omega_P - \omega_S$ et ainsi pouvoir adresser un mode vibratoire moléculaire quelconque. On note dans la littérature plusieurs types de mises en œuvres de la microscopie Raman cohérente dont la plus courante est celle indiquée sur la figure 3 [7]. Le montage utilise des oscillateurs paramétriques optiques (OPO) qui ont la propriété d'être accordables en fréquence (et donc en pulsation ω). Quand ces OPO sont pompés par un laser vert à 532 nm, ils peuvent émettre sur une gamme spectrale située entre $\lambda = 690$ nm et $\lambda = 990$ nm. Dans la pratique un des OPO garde une longueur d'onde fixe (OPO1) et on fait varier la longueur d'onde de OPO2 de telle sorte que $\omega_P - \omega_S = \Omega_R$, (où $\omega = \frac{2\pi c}{\lambda}$). On exprime alors en [cm^{-1}] l'écart en fréquence des deux impulsions pompe et Stokes et le système peut ainsi balayer tout le spectre vibrationnel des liaisons chimiques existantes situées entre 400 cm^{-1} et 4000 cm^{-1}. Dans la pratique on préfère utiliser des impulsions dont la durée est de l'ordre de quelques ps (10^{-12} s), ceci afin d'assurer une résolution spectrale de quelques 10 cm^{-1} dans la différence $\omega_P - \omega_S$.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

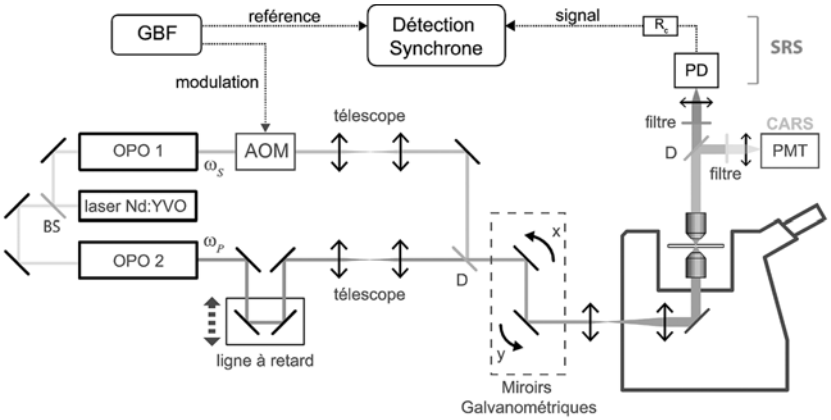


FIGURE 3 – Un microscope Raman cohérent utilise des oscillateurs paramétriques optiques (OPO) qui délivrent des trains d'impulsions de fréquence précisément identique. Les impulsions pompe et Stokes, synchronisées temporellement, sont focalisées sur l'échantillon où elles activent les contrastes CARS et SRS. Le signal CARS est détecté à l'aide d'un photomultiplicateur (PMT) alors que le signal SRS utilise une photodiode (PD) et un amplificateur à détection synchrone. (GBF : générateur basse fréquence ; Rc : résistance de charge ; AOM : modulateur acousto-optique ; D : miroir dichroïque de recombinaison.)

Cette résolution spectrale est nécessaire pour adresser les modes vibratoires les plus fins des liaisons chimiques. A l'aide d'une ligne à retard, les trains d'impulsions sont synchronisés temporellement et recombinés sur un miroir D puis envoyés dans des scanners galvanométriques qui vont permettre de balayer les deux impulsions focalisées sur l'échantillon, à l'aide d'un objectif de microscope. Au point de focalisation, et avec des puissances de quelques dizaines de mW (pour des impulsions de 5 ps avec une fréquence de répétition de 80 MHz) les puissances lasers crêtes sont suffisantes pour activer les mélanges de fréquences du Raman cohérent. On détecte alors le signal CARS à la pulsation $\omega_P + \Omega_R = 2\omega_P - \omega_S$ à l'aide d'un objectif de collection et d'un détecteur sensible du type photomultiplicateur. Le signal SRS nécessite une instrumentation plus lourde, il s'agit de moduler un des faisceaux et d'observer le transfert de modulation lié à l'effet SRS sur l'autre faisceau (cas de OPO2 ω_P sur la fig. 3).

La figure 4 illustre de façon plus détaillée le processus SRL correspondant à une modulation d'amplitude du faisceau Stokes ω_S à la fréquence f_m. Comme nous l'avons indiqué précédemment, le processus Raman cohérent crée des pertes pour le faisceau pompe (SRL – *Stimulated Raman Loss*), ces pertes ΔI_{SRL} sont minimes, de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6}, et doivent être détectées à l'aide d'un amplificateur à détection synchrone dont la fréquence de référence f_m est celle utilisée pour moduler le faisceau Stokes. Ainsi signaux CARS et SRL (ou SRG) peuvent être acquis conjointement en transmission (cas des figures 3 et 4) mais aussi en réflexion dans le cas où les échantillons sont trop épais pour être traversés par la lumière.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

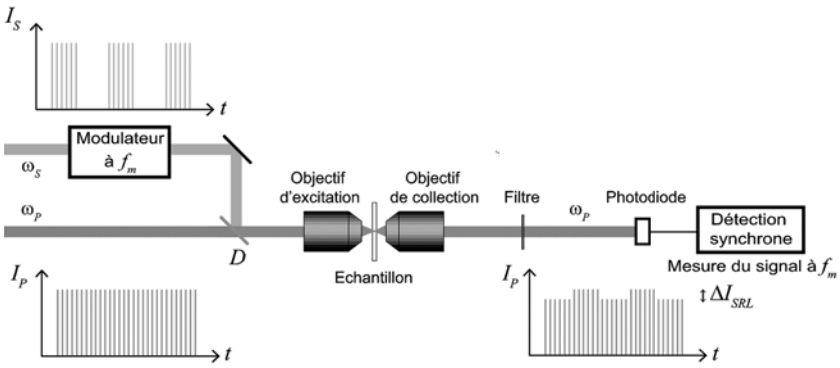


Figure 4 – Principe de la détection SRS

Ces chaines laser à base d'OPO sont très performantes car elles délivrent des puissances pouvant aller jusqu'à des centaines de mW au niveau de l'échantillon et génèrent, en principe, un bruit de détection limité par le bruit de grenaille (*shot noise*) ; il s'agit donc des systèmes optimaux pour effectuer des recherches. Par contre leur prix est très élevé (plusieurs centaines de milliers d'euros) et leur encombrement important (plusieurs m^2) ce qui grève leur utilisation dans un environnement industriel ou hospitalier. Pour combler cette lacune et apporter la technologie du Raman cohérent au plus près des applications, la communauté scientifique et les industriels travaillent activement aux développements de solutions lasers fibrées permettant de délivrer des trains d'impulsions pompes et Stokes synchronisés [8, 9]. Des premiers systèmes commerciaux sont d'ores et déjà disponibles en Europe et aux États-Unis, délivrant plus de 500 mW aux longueurs d'ondes de 780 nm et 1050 nm, ce qui permet d'adresser les liaisons C-H situées autour de 2900 cm^{-1}. Par ailleurs ce type de source laser tient dans une boite de 30 cm × 40 cm × 10 cm et offre ainsi la possibilité de s'intégrer dans des systèmes compacts de microscopie (figure 5).

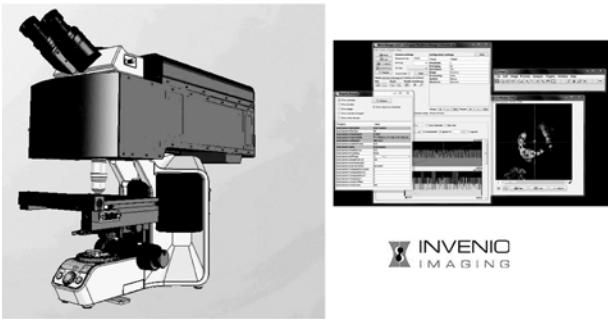


Figure 5 – Le microscope SRS de la startup californienne Invenio Imaging intègre des sources fibrées qui délivrent des impulsions de 2 ps synchronisées aux longueurs d'ondes de 790 nm et 1030 nm. Équipé d'un logiciel dédié, il s'agit du système d'imagerie Raman cohérent le plus compact au monde.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

4 Quelques applications de l'imagerie Raman cohérente

La microscopie Raman cohérente permet d'imager les modes vibratoires moléculaires sans avoir à préparer l'échantillon d'aucune façon. Activés seulement au point de focalisation d'un objectif de microscope que l'on balaye dans l'échantillon, les contrastes CARS et SRS produisent des images tridimensionnelles avec une résolution en dessous du micromètre. Les liaisons carbone/hydrogène CH_2 et CH_3 donnent d'importants signaux en Raman cohérent à cause de la relativement forte section efficace Raman de ces modes vibratoires mais aussi parce que ces liaisons sont présentes en grand nombre dans les protéines et les lipides. Ces éléments sont souvent concentrés spatialement dans les cellules et les tissus ce qui permet de tirer le meilleur parti des effets spatiaux de mise en phase entre les modes vibratoires induits par les processus CARS et SRS. Lorsqu'on se concentre sur la liaison CH_2 à 2845 cm^{-1} les lipides apparaissent très contrastés sur les images CARS. La figure 6a présente des images prises à 30 µm sous la surface d'une oreille de souris avec les contrastes d'auto-fluorescence à deux photons (TPEF – vert), de CARS (rouge) et de génération du second harmonique (SHG – bleu). Le TPEF est généré principalement par des protéines auto-fluorescentes que l'on trouve dans les cellules et tissus comme les flavines et les coenzymes NADPH, le SHG est quant à lui généré dans le collagène, une fibre extracellulaire constitutive des tissus. Tous ces contrastes TPEF, CARS et SHG résultent uniquement de l'interaction d'impulsions laser courtes (ici ps) avec la matière biologique et ne nécessitent aucun marquage ni préparation. Sur la figure 6a on peut apprécier les informations morphologiques apportées lorsque ces contrastes sont superposés. On peut distinguer la couche superficielle de la peau (le *stratum corneum*) riche en lipide (CARS – rouge) ainsi que l'entrée d'un canal pileux qui se termine dans une glande sébacée elle aussi très riche en lipide. Le collagène (bleu) et l'élastine (vert) s'agencent eux aussi autour des zones lipidiques pour former des structures organisées.

L'organisation des couches lipidiques joue également un rôle très important dans le caractère fonctionnel de la myéline. Cette substance grasse est trouvée dans certaines cellules du système nerveux ainsi que dans le système nerveux périphérique (les nerfs). La myéline entoure les fibres nerveuses et sert à les isoler et à les protéger, comme le fait le plastique autour des fils électriques. Dans le cas de certaines maladies comme la sclérose en plaque, les gaines de myéline subissent des affections majeures qui conduisent à leurs déstructurations. La figure 6b montre des images CARS des gaines de myélines (en rouge) au cours de la progression d'une sclérose en plaque chez un modèle murin (encéphalomyélite allergique expérimentale – EAE). Dans le cas de souris saines, on observe comment la gaine de myéline entoure tout l'axone (ici marqué avec la protéine fluorescente CFP), lors de l'évolution de la maladie, la myéline se déstructure en amas globulaires qui finissent par envahir tout l'espace inter-axone, produisant alors des déficiences moteurs majeures chez les individus atteints.

Les liaisons carbone / hydrogène ne sont pas les seules qui peuvent être imagées à l'aide du Raman cohérent. En principe toutes les liaisons chimiques qui signent en Raman peuvent être suivies et imagées. Dans la pratique cette spécificité moléculaire est cependant limitée car les cellules et tissus sont constitués eux aussi de protéines et de lipides dont les signatures Raman sont présentes ; le monde du vivant est construit

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

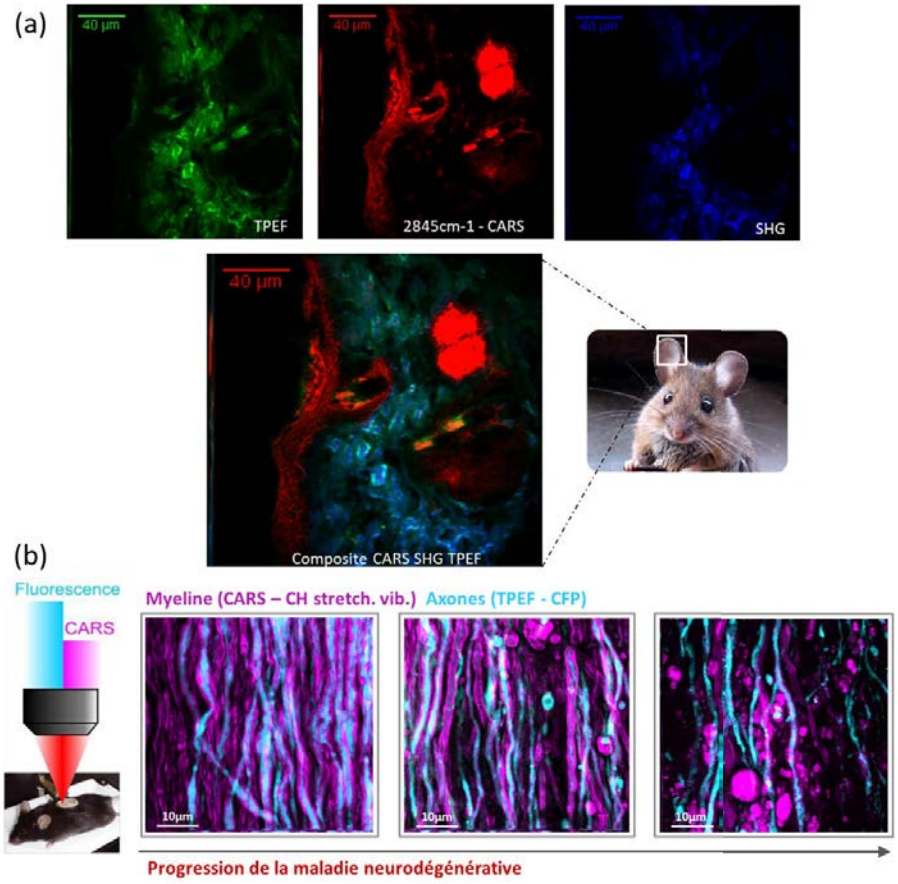


FIGURE 6 – Imagerie sans marquage chez le petit animal. (a) image à 30 µm sous la surface d'une oreille de souris avec les contrastes d'auto-fluorescence à deux photons (TPEF – vert – principalement l'élastine), de CARS (rouge – lipides) et de génération du second harmonique (SHG – bleu – collagène) ; (b) images CARS (rouge) des gaines de myéline chez la souris lors de l'évolution d'un modèle de sclérose en plaque (collaboration entre l'Institut Fresnel et l'Institut des Neurosciences de la Timone à Marseille).

avec les mêmes liaisons chimiques ! Afin de retrouver une spécificité moléculaire il est intéressant d'utiliser un marqueur isotopique comme par exemple le deutérium. Cet isotope de l'hydrogène est le plus petit marqueur auquel on puisse penser car il n'altère pas la structure et la fonctionnalité des biomolécules. La liaison carbone / deutérium est particulièrement intéressante car elle présente une signature Raman à 2100 cm^{-1}, un domaine spectral quasiment vierge de modes vibratoires pour les molécules endogènes que l'on trouve dans les systèmes vivants. Par ailleurs, remplacer les liaisons C-H par des liaisons C-D est une opération chimique tout à fait réalisable sur la plupart des composés chimiques synthétisés en laboratoire. Nous avons utilisé récemment cette stratégie pour imager des composés moléculaires actifs en pharmacologie et en cosmétique pénétrant dans la peau humaine [10]. La figure 7a présente des

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

échantillons de peau abdominale humaine qui sont utilisés et mis en contact avec les molécules actives dont on veut suivre leur pénétration transcutanée. En utilisant la signature C-D, il est alors possible d'imager la répartition de composés actifs (figure 6b – cas de la molécule LR2412 utilisée dans la crème anti-âge « Visionnaire » commercialisée par Lancôme) dans l'épiderme. La figure 7c précise le mode de pénétration de cette molécule active (en rouge) qui se localise entre les cornéocytes (cellules de la surface de la peau) imagés ici par leur signal d'auto-fluorescence à deux photons (en vert). En se plaçant sur une zone ou la molécule active est présente on peut se persuader de la pertinence de l'analyse en réalisant un spectre des modes vibratoires (en faisant varier $\omega_P - \omega_S$ où l'on retrouve la signature de la liaison C-D (figure 7d).

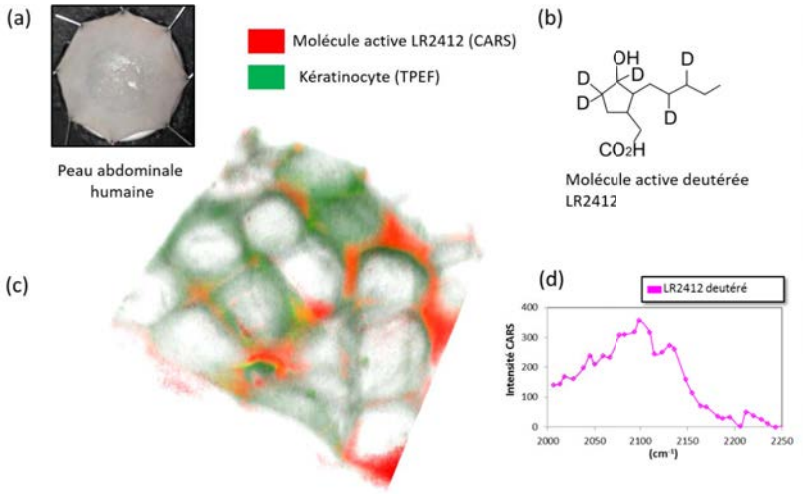


Figure 7 – Étude de la pénétration d'actifs moléculaires dans la peau par microscopie Raman cohérente. (a) échantillon de peau humaine abdominale mis au contact (b) d'une molécule deutérée active en cosmétique. (c) Répartition de l'actif (CARS – rouge) au sein de l'épiderme (auto-fluorescence à deux photons – vert). (d) Spectre des modes vibratoires d'une zone ou l'actif est présent, on retrouve bien le spectre caractéristique de la liaison C-D.

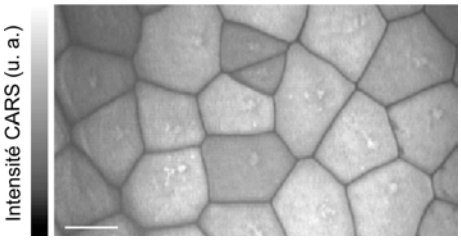


Figure 8 – Image CARS à 1090 cm^{-1} de la liaison carbone-oxygène de l'ion carbonate CO_3^- présent chez l'huitre perlière *pinctada margaretifera*. Échelle 10 µm.

Finalement la figure 8 présente un exemple d'imagerie CARS dans le domaine de la croissance des cristaux chez les animaux marins. Il s'agit ici de l'imagerie de la

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

liaison carbone / oxygène de l'ion carbonate CO_3^- à 1090 cm^{-1} chez l'huitre perlière *pinctada margaretifera*. La coquille est composée de structures prismatiques dont la distribution spatiale en calcite (CO_3^- + Ca^+) n'est pas homogène. Cette information chimique microscopique renseigne directement sur les différents scénarii mis en œuvre par l'animal pour construire une structure cristalline.

5 Perspectives

Déjà largement utilisé pour étendre le champ des connaissances en biologie aussi bien au niveau cellulaire que tissulaire (le lecteur pourra trouver une revue récente dans [11]) de nouvelles perspectives s'ouvrent aujourd'hui qui devraient amener le Raman cohérent au niveau d'un outil d'imagerie incontournable. C'est tout d'abord l'utilisation des marquages alkyne (carbone triple liaison hydrogène, -C≡C-) qui permet de suivre les synthèses d'ADN et d'ARN ainsi que le métabolisme de molécules médicamenteuses directement dans les cellules. Le marquage par des groupes alkynes a cette propriété d'être « bio-orthogonal », c'est-à-dire de ne pas interférer avec le métabolisme [12], il est alors possible de suivre comment une structure moléculaire est métabolisée par la machinerie cellulaire.

Nous avons vu (figure 6a) que la combinaison des images Raman cohérentes (CARS et/ou SRS) avec les contrastes TPEF et SHG produisait des images riches en informations morphologiques. Nous avons récemment utilisé cette approche pour imager des tissus frais humains en provenance des blocs opératoires hospitaliers. La figure 8 présente des images combinant les contrastes de TPEF, SHG et CARS (2850 cm^{-1}) d'organes constitutifs du système digestif (fundus, colon, pancréas), où l'on peut apprécier la finesse des structures révélées et dont la qualité approche celle des images histologiques. Obtenir des images histologiques nécessite classiquement une préparation longue (24h et plus) associée à une découpe en tranche fine des échantillons et à leur coloration. A contrario, les images présentées sur la figure 8 sont obtenues en quelques minutes, directement sur des tissus frais et sans aucune préparation. Allant encore plus loin, des études récentes rapportent la possibilité d'utiliser les images SRS acquises sur les bandes CH_2 (2850 cm^{-1}) et CH_3 (2950 cm^{-1}) pour détecter la progression de tumeurs dans le cerveau [13].

Des perspectives s'ouvrent également du côté instrumental où des efforts sont menés pour réaliser une imagerie Raman cohérente en endoscopie. Pour cela de nouvelles fibres optiques comportant un cœur creux sont réalisées ; elles ont la propriété de transporter des impulsions ultra-courtes sans distorsions spectrales et temporelles nécessaires à l'activation des contrastes CARS et SRS [14].

Depuis sa première mise en œuvre en 1982, l'imagerie Raman cohérente n'a cessé de puiser sa force dans les avancées technologiques en optoélectronique et dans l'ingénierie moléculaire, tout cela devrait continuer, et il y a fort à parier que ces développements vont mener les processus CARS et SRS vers les laboratoires de biologie, l'hôpital et les applications industrielles.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

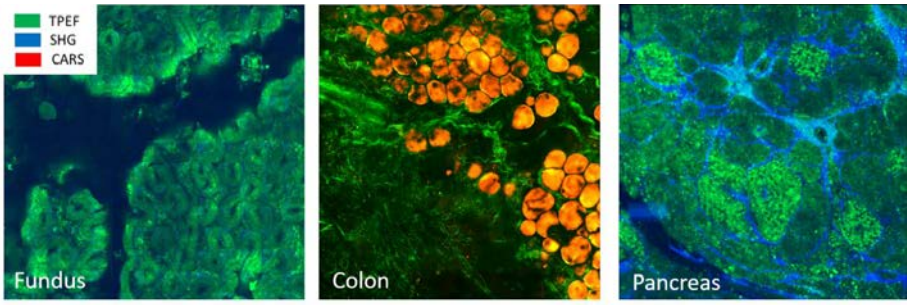


FIGURE 9 – Imagerie non linéaire multimodale des tissus humains. En combinant les contrastes d'auto-fluorescence à deux photons, de génération d'harmonique et de Raman cohérent il est possible de générer des images contrastées dont la qualité approche celle des images histologiques (collaboration entre l'Institut Fresnel et l'Institut Paoli-Calmette à Marseille).

Bibliographie

[1] W. Min, C. W. Freudiger, S. Lu, and X. S. Xie, « Coherent nonlinear optical imaging : beyond fluorescence microscopy », Annu Rev Phys Chem **62**, 507-530 (2011).

[2] B. G. Saar, C. W. Freudiger, J. Reichman, C. M. Stanley, G. R. Holtom, and X. S. Xie, « Video-rate molecular imaging in vivo with stimulated Raman scattering », Science **330**, 1368-1370 (2010).

[3] 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) », Appl. Spectrosc. **31**, 253-271 (1977).

[4] 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 **137**, A801-A818 (1965).

[5] A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, « Vibrationnal microscopy using coherent anti-Stokes Raman scattering », Phys. Rev. Lett. **82**, 4014-4017 (1999).

[6] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics* (Academic Press, 1992).

[7] S. Brustlein, P. Ferrand, N. Walther, S. Brasselet, C. Billaudeau, D. Marguet, and H. Rigneault, "Optical parametric oscillator-based light source for coherent Raman scattering microscopy : practical overview," J Biomed Opt **16**, 021106 (2011).

[8] C. W. Freudiger, W. Yang, G. R. Holtom, N. Peyghambarian, X. S. Xie, and K. Q. Kieu, « Stimulated Raman scattering microscopy with a robust fibre laser source », Nat Photon **8**, 153-159 (2014).

[9] C. Xu, and F. W. Wise, « Recent advances in fibre lasers for nonlinear microscopy », Nat Photon **7**, 875-882 (2013).

[10] X. Chen, S. Grégoire, F. Formanek, J.-B. Galey, and H. Rigneault, « Quantitative 3D molecular cutaneous absorption in human skin using label free nonlinear microscopy », Journal of Controlled Release **200**, 78-86 (2015).

[11] J. X. Cheng, and X. S. Xie, « Vibrational spectroscopic imaging of living systems : An emerging platform for biology and medicine », Science **350**, 1054-+ (2015).

[12] L. Wei, F. Hu, Y. Shen, Z. Chen, Y. Yu, C.-C. Lin, M. C. Wang, and W. Min, « Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering », Nat Meth **11**, 410-412 (2014).

[13] M. Ji, S. Lewis, S. Camelo-Piragua, S. H. Ramkissoon, M. Snuderl, S. Venneti, A. Fisher-Hubbard, M. Garrard, D. Fu, A. C. Wang, J. A. Heth, C. O. Maher, N. Sanai, T. D. Johnson, C. W. Freudiger, O. Sagher, X. S. Xie, and D. A. Orringer, « Detection of human brain tumor infiltration with quantitative stimulated Raman scattering microscopy », Science translational medicine **7**, 309ra163-309ra163 (2015).

[14] S. Brustlein, P. Berto, R. Hostein, P. Ferrand, C. Billaudeau, D. Marguet, A. Muir, J. Knight, and H. Rigneault, « Double-clad hollow core photonic crystal fiber for coherent Raman endoscope », Opt Express **19**, 12562-12568 (2011).

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556