



HAL
open science

Amplification paramétrique d'images de très faible niveau - Application à l'imagerie de temps de vie de fluorescence

Sophie Brustlein

► **To cite this version:**

Sophie Brustlein. Amplification paramétrique d'images de très faible niveau - Application à l'imagerie de temps de vie de fluorescence. Optique / photonique. Université de Franche-Comté, 2005. Français. NNT : 1129 . tel-00839501

HAL Id: tel-00839501

<https://theses.hal.science/tel-00839501>

Submitted on 28 Jun 2013

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.

THÈSE

Présentée à
L'UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTE

Pour obtenir le

**GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
DE FRANCHE COMTÉ**

Spécialité Sciences pour l'Ingénieur

**Amplification paramétrique d'images de
très faible niveau – Application à l'imagerie
de temps de vie de fluorescence**

Par

Sophie BRUSTLEIN

Soutenance le 15 décembre 2005 devant la commission d'examen :

Président	D. VAN LABEKE	Professeur à l'Université de Franche-Comté
Rapporteurs	A. MAITRE	Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)
	M.P. FONTAINE- AUPART	Directeur de Recherche au LPPM - Laboratoire de Photophysique Moléculaire (Paris Sud)
Examineurs	F. DEVAUX	Professeur à l'Université de Franche-Comté
	E. LANTZ	Professeur à l'Université de Franche-Comté
	A. SERGIENKO	Professeur à l'Université de Boston

Table des matières

Introduction générale	1
Bibliographie	4
I Amplification paramétrique d'images de faible niveau	7
1 Amplification paramétrique d'images issues de sources incohérentes	9
1.1 Introduction	9
1.2 Généralités sur l'amplification paramétrique	9
1.2.1 Interaction non linéaire dans les milieux quadratiques	9
1.2.2 Accord de phase non critique	15
1.2.3 Amplification d'images polychromatiques	18
1.3 Amplification paramétrique de signaux incohérents	21
1.3.1 Notions de sources cohérentes et incohérentes	21
1.3.2 Définition du nombre de modes spatio-temporels pour l'amplification paramétrique	25
1.3.3 Application de l'amplification paramétrique au calcul du nombre de photons par mode	28
1.4 Résultats expérimentaux	29
1.4.1 Dispositif expérimental	29
1.4.2 Images en champ lointain	31
1.4.3 Images en champ proche	32
1.5 Conclusion	33

Bibliographie	35
2 Limite d'amplification d'images de faibles niveaux	39
2.1 Introduction	39
2.2 Etude théorique	39
2.2.1 Sources de bruit dans les images amplifiées	39
2.2.2 Limite de détection d'images faibles par amplification paramétrique	44
2.3 Etude numérique	46
2.3.1 Cas d'images bruitées binaires et complexes	46
2.3.2 Statistiques sur les images bruitées	48
2.4 Résultats expérimentaux	49
2.4.1 Caractéristiques des lasers	50
2.4.2 Estimation "théorique" du facteur de dégénérescence spatial M_p	51
2.4.3 Fluctuations spatiales de la fluorescence paramétrique	52
2.4.4 Critère de reconnaissance du signal utile dans les images amplifiées	56
2.5 Conclusion	60
Bibliographie	61
II Application à l'imagerie de temps de vie de fluorescence	63
3 Imagerie de temps de vie de fluorescence - Etat de l'art	65
3.1 Introduction	65
3.2 Pourquoi l'imagerie de temps de vie?	66
3.3 Méthodes d'imagerie de temps de vie de fluorescence	68
3.3.1 Dans le domaine des fréquences (excitation modulée)	68
3.3.2 Dans le domaine temporel (excitation impulsionnelle)	71
3.4 Quelques exemples d'applications	77
3.4.1 Dans le domaine biomédical	77
3.4.2 Application FRET (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)	78
Bibliographie	79

4	Principe d'imagerie de temps de vie par amplification paramétrique d'images	85
4.1	Introduction	85
4.2	La fluorescence sous excitation à un photon	86
4.2.1	Mécanisme d'absorption et d'émission	86
4.2.2	Le rendement quantique	88
4.2.3	Le temps de vie de fluorescence	88
4.3	Imagerie ultra rapide - porte optique temporelle	90
4.3.1	Les portes à effet Kerr	91
4.3.2	La conversion de fréquences	91
4.3.3	L'amplification paramétrique d'images	92
4.4	Protocole d'exploitation des images	94
	Bibliographie	96
5	Résultats expérimentaux	99
5.1	Introduction	99
5.2	Présentation des fluorophores	99
5.2.1	Choix des colorants	99
5.2.2	Préparation des échantillons fluorescents	101
5.2.3	Spectres d'absorption et d'émission	103
5.3	Mesures de temps de vie	105
5.3.1	Mesures avec une caméra à balayage de fente	105
5.3.2	Mesures par amplification paramétrique optique (APO en champ lointain)	107
5.4	Imagerie de temps de vie par amplification paramétrique optique	108
5.4.1	Images de temps de vie de fluorescence	110
5.4.2	Résolution spatiale	113
5.4.3	Résolution temporelle	115
5.5	Conclusion	117
	Bibliographie	119
	Conclusion générale	121
	Publications	125

Introduction générale

L'optique non linéaire, d'un point de vue expérimental, est "née" avec les premières sources lasers. Les études concernant la physique quantique et plus particulièrement la nature quantique de la lumière ont permis de caractériser les interactions lumière-matière [1–3]. Ainsi, à partir des années 60, des phénomènes de génération de second harmonique [4] et d'amplification paramétrique dans la gamme des ondes optiques [5] ont pu être étudiés théoriquement et expérimentalement. Très rapidement, les conditions d'accord de phase ont focalisé l'attention [6–8]. Il a été démontré que l'accord de phase était conservé sur une plage angulaire maximale pour des directions de propagation suivant les axes cristallins. Une telle configuration, dite non critique en angle, permet d'accroître l'efficacité de l'interaction non linéaire. Parallèlement, des études concernant les cristaux non linéaire organiques et inorganiques ont été développées.

Ces travaux ont permis d'appliquer l'optique non linéaire à l'imagerie soit par conversion haute en fréquence d'images [9] soit par amplification paramétrique d'images [10, 11] ou encore dans des milieux photoréfractifs [12]. Toutefois, dans le cas des interactions par mélange à trois ondes, la résolution des images converties ou amplifiées était limitée par des configurations d'accord de phase peu ou pas optimisées d'un point de vue de l'imagerie. La démonstration de l'existence d'accord de phase non critique en angles et en longueurs d'onde pour deux des ondes en interaction [13] a permis la réalisation de dispositifs d'imagerie non linéaire où la résolution spatiale et spectrale de l'image traitée est suffisante dans la perspective d'un traitement tout optique de l'information [14].

Bien que l'optique non linéaire soit "née" avec la mise au point des sources lasers, l'implica-

tion de sources lumineuses autre que les lasers dans une interaction non linéaire est possible. Ainsi, dans le cas d'un processus de mélange à trois ondes, la conversion en fréquence de sources incohérentes (corps noir, fluorescence, luminescence) a été réalisée [15–17]. Toutefois dans le cas de l'amplification paramétrique optique, le bruit apporté par l'amplificateur restreint fortement le type de sources lumineuses pouvant être amplifiées [18].

Les interactions non linéaires en régime impulsionnel ont ouvert de nouveaux champs d'applications pour la résolution temporelle de phénomènes très brefs. Ainsi en alliant les propriétés spatiale, spectrale et temporelle des interactions non linéaires, des dispositifs d'imagerie ultra rapide et d'imagerie résolue dans le temps ont été proposés pour diverses applications [14, 19–23].

La première partie de ce manuscrit concerne l'étude de l'amplification paramétrique d'images de faible niveau. Le premier chapitre expose le principe de l'amplification paramétrique d'images issues de sources incohérentes émettant un niveau moyen de moins d'un photon par mode spatio-temporel. Une étude théorique et expérimentale concernant la résolution spatiale de la luminance de ces sources permet d'exprimer celle-ci directement en nombre de photons par mode.

Dans le deuxième chapitre, nous caractérisons par une étude des propriétés statistiques des fluctuations spatiales de la fluorescence paramétrique, le seuil de détection d'images de très faible niveau issues de sources incohérentes.

La deuxième partie est consacrée à l'application de la propriété de porte optique temporelle de l'interaction paramétrique à l'imagerie de temps de vie de fluorescence. Le troisième chapitre relate de manière non exhaustive différentes méthodes utilisées pour l'imagerie de temps de vie de fluorescence ainsi que les principaux domaines d'application de ces techniques. Ensuite, le quatrième chapitre présente le principe de l'application de l'amplification paramétrique d'images en régime impulsionnel à l'imagerie de temps de vie de fluorescence. Nous nous intéressons en particulier aux propriétés de porte optique temporelle de l'amplification paramétrique puis nous décrivons le protocole utilisé pour former des cartographies 2D de temps de vie.

Enfin, le dernier chapitre expose les résultats expérimentaux concernant l'imagerie de temps de vie de fluorescence par amplification paramétrique d'images. Après une description des fluorophores choisis, nous présentons les images expérimentales de temps de vie de fluorescence.

Bibliographie

- [1] C. Cohen-Tannoudji, J. Dupont-Roc et G. Grynberg, *Processus d'interaction entre photons et atomes*, EDP Sciences/Edition du CNRS, Paris (2001).
- [2] C. Cohen-Tannoudji, B. Diu et F. Laloë, *Mécanique Quantique Tome 1*, Hermann (1973).
- [3] C. Cohen-Tannoudji, J. Dupont-Roc et G. Grynberg, *Photons et atomes : Introduction à l'électrodynamique quantique*, EDP Sciences/Edition du CNRS, Paris (2001).
- [4] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters et G. Weinreich, "Generation of optical harmonics", *Phys. Rev. Lett.*, **7**, pp. 118 (1962).
- [5] S. A. Akhmanov, A. I. Kovrigin, A. S. Piskarskas, V. V. Fadeev et V. Khokhlov, "Observation of parametric amplification in optical range", *JETP Lett.*, **2**, pp. 191 (1965).
- [6] J. Armstrong, N. Bloembergen, J. Ducuing et P. Pershan, "Interactions between light waves in a non linear dielectric", *Phys. rev.*, **127**, pp. 1918 (1962).
- [7] J. Giordmaine, "Mixing of light beams in crystals", *Phys. Rev. Lett.*, **8**, pp. 19 (1962).
- [8] R. Miller, G. Boyd et A. Savage, "Nonlinear optical interactions in $LiNbO_3$ without double refraction", *Appl. Phys. Lett.*, **6**, pp. 77 (1965).
- [9] J. E. Midwinter, "Image conversion from 1.6 μm to the visible in lithium niobate", *Appl. Phys. Lett.*, **12**, pp. 68 (1968).
- [10] A. Gavrielides, P. Peterson et Cardimona, "Diffractive imaging in three-wave interactions", *J. Appl. Phys.*, **62**, pp. 2640 (1987).
- [11] P. Laferriere, C. Wetterer, L. Schelonka et M. Kramer, "Spatial-frequency selection using downconversion optical parametric amplification", *J. Appl. Phys.*, **65**, pp. 3347 (1989).
- [12] Y. Fainman, E. Klancnik et S. Lee, "Optimal coherent image amplification by two-wave coupling in photorefractive $BaTiO_3$ ", *Opt. Engineering*, **25**, pp. 228 (1986).
- [13] E. Lantz, L. Han, A. Lacourt et J. Zyss, "Simultaneous angle and wavelength one-beam noncritical phase matching in optical parametric amplification", *Opt. Commun.*, **97**, pp. 245 (1993).

- [14] F. Devaux, *Amplification paramétrique d'images*, Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté (1996).
- [15] A. Migdall, R. Datla, A. Sergienko, J. S. Orszak et Y. Shih, “Measuring absolute infrared spectral radiance with correlated visible photons : technique verification and measurement uncertainty”, *App.Opt.*, **37**, pp. 3455 (1998).
- [16] D. Hulin, A. Migus, A. Antonetti, I. Ledoux, J. Badan, J. Oudar et J. Zyss, “Parametric amplification sampling spectroscopy of luminescence at the subpicosecond time scale in the 1-1.6 μm spectral range”, *Appl. Phys. Lett.*, **49**, pp. 761 (1986).
- [17] L. Shulong, L. Bo, S. Baoquan, X. Zhongying et J. Desheng, “Absolute measurement of detector quantum efficiency using optical parametric down-conversion pumped by femtosecond laser pulses”, *Meas. Sci. Technol.*, **13**, pp. 186 (2002).
- [18] S. Prasad, “Implications of light amplification for astronomical imaging”, *J. Opt. Soc. Am. A*, **11**, pp. 2799 (1994).
- [19] L. Wang, P. P. Ho, X. Liang, H. Dai et R. R. Alfano, “Kerr-Fourier imaging of hidden object in thick turbid media”, *Opt. Lett.*, **18**, pp. 241 (1993).
- [20] R. Mahon, M. D. Ducan, L. L. Tankersley et J. Reintjes, “Time-gated imaging through dense scatterers with a Raman amplifier”, *Appl. Opt.*, **32**, pp. 7425 (1993).
- [21] K. M. Yoo, Q. Xing et R. R. Alfano, “Imaging objects hidden in highly scattering media using femtosecond second-harmonic-generation cross-correlation time gating”, *Opt. Lett.*, **16**, pp. 1019 (1991).
- [22] G. L. Tolguenec, *Imagerie à travers les milieux diffusants par amplification paramétrique d'images*, Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté (1998).
- [23] C. Doulé, *Amplification paramétrique optique en régime femtoseconde et tomographie optique cohérente : deux méthodes d'imagerie proche infrarouge dans des milieux diffusants*, Thèse de doctorat, Université de Paris-Sud (2000).

PREMIÈRE PARTIE

**Amplification paramétrique d'images
de faible niveau**

Amplification paramétrique d'images

issues de sources incohérentes

1.1 Introduction

Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement au processus d'amplification paramétrique d'images. Une étude détaillée ayant été déjà effectuée dans le travail de thèse de Fabrice Devaux [1], nous nous limiterons ici à un bref rappel concernant les bases théoriques de cette interaction non linéaire. Les notions d'accord de phase non critique et de fonction de transfert en fréquences (spatiales et temporelle) seront rappelées.

Nous verrons ensuite qu'il est possible d'amplifier des images de faible niveau issues de sources incohérentes. La définition du nombre de modes spatio-temporels ainsi qu'une application au calcul du nombre de photons par mode seront exposées. Enfin, nous terminerons ce chapitre en exposant les résultats expérimentaux obtenus pour l'amplification de signaux de fluorescence.

1.2 Généralités sur l'amplification paramétrique

1.2.1 Interaction non linéaire dans les milieux quadratiques

Lorsqu'un milieu diélectrique est traversé par une onde électromagnétique, sa réponse au champ électrique apparaît à faible puissance comme un champ de polarisation linéaire \vec{P} proportionnel au champ électrique de l'onde incidente. A plus forte puissance, les termes correspondant aux non linéarités d'ordre deux, trois, *etc...* ne sont plus négligeables et ap-

paraissent dans l'expression de la polarisation totale [2] :

$$\vec{P} = \varepsilon_0(\chi^{(1)}\vec{E} + \chi^{(2)}\vec{E}\vec{E} + \chi^{(3)}\vec{E}\vec{E}\vec{E} + \dots) \quad (1.1)$$

où ε_0 est la permittivité du vide, $\chi^{(1)}$ la susceptibilité linéaire du milieu, \vec{E} le champ électrique classique de l'onde électromagnétique et $\chi^{(n)}$ la susceptibilité non linéaire d'ordre n . Pour des milieux anisotropes, la susceptibilité non linéaire d'ordre deux est souvent prépondérante¹. Elle est caractérisée par un tenseur d'ordre trois, $\chi^{(2)}$, et est à l'origine des processus de mélange à trois ondes tels que la génération de second harmonique [3], l'amplification paramétrique [4], la conversion haute en fréquence [5] ou encore la rectification optique [6].

Réduction du tenseur $\chi^{(2)}$:

Plusieurs relations de symétrie entraînent d'importantes simplifications que l'on traduit souvent par une réduction des tenseurs de susceptibilité non linéaire [7]. Le tenseur de susceptibilité d'ordre 2 qui correspond au terme de polarisation quadratique (équation 1.2), comporte 27 éléments :

$$P_i^{(2)} = \varepsilon_0 \sum_{j,k=1,2,3} \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k \quad (1.2)$$

Comme l'ordre des deux composantes du champ \vec{E} n'a pas de signification physique, on a $\forall i, j, k$:

$$\chi_{ijk} = \chi_{ikj} \quad (1.3)$$

De plus, pour les milieux transparents, c'est à dire non absorbants pour les pulsations envisagées, la règle de *Kleinman* [8] permet de permuter les indices dans un ordre quelconque :

$$\chi_{ijk} = \chi_{ikj} = \chi_{kij} = \chi_{jki} = \chi_{kji} \quad (1.4)$$

Ces propriétés permettent de réduire le tenseur de 27 à 18 éléments distincts caractérisés par deux indices et notés d_{ij} , avec $i = x, y, z = 1, 2, 3$ et tels que :

$$\frac{\chi_{ixx}}{2} = d_{i1}, \quad \frac{\chi_{iyy}}{2} = d_{i2}, \quad \frac{\chi_{izz}}{2} = d_{i3}, \quad \frac{\chi_{iyz}}{2} = d_{i4}, \quad \frac{\chi_{izx}}{2} = d_{i5}, \quad \frac{\chi_{ixy}}{2} = d_{i6} \quad (1.5)$$

D'autres simplifications interviennent du fait des symétries propres aux différentes classes

¹ De tels milieux sont dits quadratiques.

de cristaux [7]. Par exemple, le cristal de LBO (LiB_3O_5 : triborate de lithium) [9], biaxe positif, appartient à la classe cristalline $mm2$ du système orthorhombique. Les propriétés de cette classe réduisent à cinq les éléments non nuls du tenseur d_{ij} :

$$\overline{d} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{24} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (1.6)$$

où $d_{31} = d_{15} = 1,05 \text{ pm.V}^{-1}$, $d_{32} = d_{24} = -0,98 \text{ pm.V}^{-1}$ et $d_{33} = 0,05 \text{ pm.V}^{-1}$ [10].

Amplification paramétrique optique :

Dans le cas de l'amplification paramétrique optique seule deux des trois ondes en interaction sont présentes à l'entrée du milieu non linéaire : une onde intense appelée "pompe" (p) de pulsation ω_p et une onde de faible intensité appelée "signal" (s) de pulsation $\omega_s < \omega_p$.

L'interaction entre ces deux ondes dans le milieu non linéaire quadratique induit alors une polarisation non linéaire à la fréquence $\omega_p - \omega_s$:

$$\vec{P}_{(\omega_p - \omega_s)}^{(2)} = \varepsilon_0 \overline{d} \vec{E}_p(\omega_p) \vec{E}_s^*(\omega_s) \quad (1.7)$$

Cette polarisation donnera lieu à une onde complémentaire appelée "idler" (i) de pulsation $\omega_i = \omega_p - \omega_s$.

Au cours de la propagation l'onde signal sera amplifiée si les trois ondes (pompe, signal et idler) vérifient d'une part :

- la conservation de l'énergie :

$$\omega_p = \omega_s + \omega_i \quad (1.8)$$

- et d'autre part la conservation de la quantité de mouvement :

$$\vec{k}_p = \vec{k}_s + \vec{k}_i \quad (1.9)$$

où \vec{k}_l représente le vecteur d'onde de l'onde l tel que $|\vec{k}_l| = \frac{n_l(\omega_l) \omega_l}{c}$, avec $n_l(\omega_l)$ l'indice vu par l'onde l et $l \in \{s, i, p\}$.

Notons que la relation 1.9 est plus généralement dénommée condition d'accord de phase.

Ainsi, les trois ondes échangent de l'énergie et on montre qu'il est possible de transférer de

l'énergie depuis la pompe jusque vers le signal et l'idler : c'est le principe de l'amplification paramétrique optique [11]. Comme il s'agit d'un effet non linéaire, son rendement est d'autant meilleur que les puissances considérées sont grandes. De plus, la valeur des coefficients non linéaire d_{ij} étant relativement faible dans les milieux quadratiques, la densité de puissance de l'onde pompe doit être suffisamment grande (quelques MW/cm^2) pour produire une amplification paramétrique significative.

La figure 1.1 illustre le processus d'amplification paramétrique optique en termes de photons. Un photon pompe d'énergie $\hbar\omega_p$ est absorbé par un dipole électronique du milieu amplificateur puis est converti en un photon signal d'énergie $\hbar\omega_s$ et un photon idler d'énergie $\hbar\omega_i$.

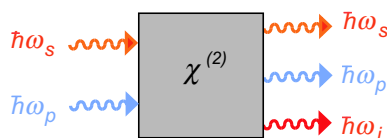


FIG. 1.1 – L'amplification paramétrique optique se traduit par la destruction de photons pompe et la création de photons signal et idler.

Equations couplées :

Pour des ondes pompe, signal et idler planes et se propageant colinéairement dans un milieu transparent selon un axe z , le champ électrique \vec{E}_l s'écrit :

$$\vec{E}_l(z, t) = \frac{1}{2}(E_l(z)e^{-j(\omega_l t - k_l z)} + c.c.) \quad (1.10)$$

avec $l \in \{s, i, p\}$, E_l l'amplitude du champ et k_l le module du vecteur d'onde de l'onde l à la pulsation ω_l tel que $k_l^2 = \mu_0 \varepsilon_l \omega_l^2$.

La description de la propagation du champ électrique dans un milieu non linéaire s'effectue au moyen d'un système d'équations couplées issues de l'équation de propagation $\nabla^2 E_l(z, t) = \frac{\partial^2 E_l}{\partial t^2} E_l(z, t)$ [12]. Ce système d'équations peut être réduit grâce à l'approximation des enveloppes lentement variables $\left(\frac{\partial^2 E_l}{\partial z^2} \ll 2k_l \frac{\partial E_l}{\partial z}\right)$ [6] et s'écrit pour un milieu sans

perte :

$$\frac{dE_s}{dz} = -j\omega_s \sqrt{\frac{\mu_0}{\varepsilon_s}} d_{eff} E_i^* E_p e^{-j\Delta kz} \quad (1.11a)$$

$$\frac{dE_i^*}{dz} = +j\omega_i \sqrt{\frac{\mu_0}{\varepsilon_i}} d_{eff} E_s E_p^* e^{j\Delta kz} \quad (1.11b)$$

$$\frac{dE_p}{dz} = -j\omega_p \sqrt{\frac{\mu_0}{\varepsilon_p}} d_{eff} E_s E_i e^{-j\Delta kz} \quad (1.11c)$$

où $\Delta k = k_p - k_s - k_i$ est le désaccord de phase entre les ondes pompe, signal et idler, et d_{eff} est la susceptibilité non linéaire effective qui dépend de l'état de polarisation des ondes en interaction et des éléments du tenseur de susceptibilité non linéaire \underline{d} [1].

En définissant les variables d'amplitude du champ telles que : $A_l = \sqrt{\frac{n_l}{\omega_l}} E_l$, le système d'équations précédent s'écrit plus simplement :

$$\frac{dA_s}{dz} = -j\kappa A_s^* A_p e^{-j\Delta kz} \quad (1.12a)$$

$$\frac{dA_i^*}{dz} = +j\kappa A_s A_p^* e^{j\Delta kz} \quad (1.12b)$$

$$\frac{dA_p}{dz} = -j\kappa A_s A_i e^{-j\Delta kz} \quad (1.12c)$$

avec $\kappa = d_{eff} \sqrt{\frac{\mu_0}{\varepsilon_0}} \sqrt{\frac{\omega_1 \omega_2 \omega_3}{n_1 n_2 n_3}}$.

Si l'on considère que la pompe est non déplétée, c'est à dire que $A_p(z)$ reste constant sur la longueur d'interaction ($\frac{dA_p}{dz} = 0$), et si l'on définit le gain par unité de longueur $g = \kappa A_p(z=0)$, on a :

$$\frac{dA_s}{dz} = -jg A_i^* e^{-j\Delta kz} \quad (1.13a)$$

$$\frac{dA_i^*}{dz} = +jg A_s e^{j\Delta kz} \quad (1.13b)$$

Ce système est équivalent à deux équations différentielles du second ordre et a pour solution générale :

$$A_s(z) = \left\{ A_s(0) \left[\cosh(bz) + \frac{j\Delta k}{2b} \sinh(bz) \right] - \frac{jg}{2b} A_i^*(0) \sinh(bz) \right\} e^{-j\Delta kz/2} \quad (1.14a)$$

$$A_i^*(z) = \left\{ A_i^*(0) \left[\cosh(bz) - \frac{j\Delta k}{2b} \sinh(bz) \right] + \frac{jg}{2b} A_s(0) \sinh(bz) \right\} e^{j\Delta kz/2} \quad (1.14b)$$

avec² : $b = \frac{1}{2}\sqrt{g^2 - \Delta k^2}$ si $|\Delta k| < g$.

Dans le cas simple où seules les ondes signal et pompe sont présentes à l'entrée du cristal ($A_i(0) = 0$) et si l'accord de phase est réalisé ($\Delta k = 0$), alors les amplitudes des ondes signal et idler sont telles que :

$$A_s(z) = A_s(0) \cosh\left(\frac{1}{2}gz\right) \quad (1.15a)$$

$$A_i^*(z) = jA_s(0) \sinh\left(\frac{1}{2}gz\right) \quad (1.15b)$$

Nous pouvons alors définir le gain en intensité pour le signal $G_s(z)$ sachant que l'intensité vaut $I_l = 2\varepsilon_0 c E_l^* E_l$ et que $A_l = \sqrt{\frac{\omega_l}{\omega_i}} E_l$, avec $l \in \{s, i, p\}$:

$$G_s(z) = \frac{I_s(z)}{I_s(0)} = \cosh^2\left(\frac{1}{2}gz\right) \quad (1.16)$$

Accord de phase

L'interaction paramétrique est efficace si l'on vérifie la condition d'accord de phase (équation 1.9). En définissant le désaccord de phase $\Delta k = k_p - (k_s + k_i)$, cette condition devient, pour une interaction colinéaire :

$$\Delta k = n_p(\omega_p) \omega_p - \left(n_s(\omega_s) \omega_s + n_i(\omega_i) \omega_i \right) = 0 \quad (1.17)$$

Une possibilité de réaliser cet accord de phase réside dans l'utilisation de cristaux biréfringents. En effet dans un milieu anisotrope, l'indice de réfraction vu par une onde dépend non seulement de la longueur d'onde mais également de la polarisation par rapport aux axes propres du cristal. Cet indice est déterminé en fonction de la température grâce à l'équation de Fresnel en connaissant les indices principaux de réfraction du cristal (n_X, n_Y, n_Z) [13]. Ainsi, pour deux ondes (pompe et signal) de polarisations différentes, on montre qu'il est possible de trouver une direction de propagation qui satisfasse la condition d'accord de phase [2]. La coupe du cristal va déterminer l'axe, la fréquence et la polarisation des ondes pouvant interagir efficacement.

On distingue alors deux types d'accord de phase (figure 1.2) [1] :

- L'accord de phase de type 1 : les ondes signal et idler ont la même direction de polarisation croisée avec celle de la pompe.

² Si $|\Delta k| > g$, alors b est imaginaire pur et $\cosh \rightarrow \cos$ et $\sinh \rightarrow \sin$.

- L'accord de phase de type 2 : Les ondes signal et idler ont des directions de polarisation croisées.

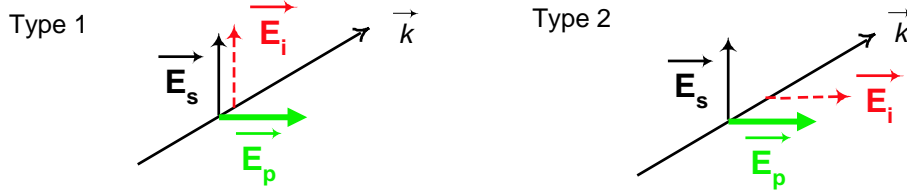


FIG. 1.2 – *Types d'accord de phase possible en amplification paramétrique. Représentation des polarisations des ondes pompe, signal et idler.*

1.2.2 Accord de phase non critique

Considérons une interaction entre une onde pompe intense et une onde signal se propageant dans le cristal dans des directions caractérisées par les angles (ϕ_p, θ_p) et (ϕ_s, θ_s) (figure 1.3).

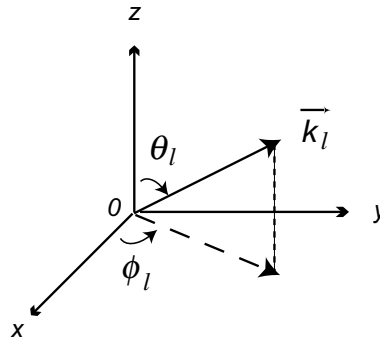


FIG. 1.3 – *Les ondes se propageant selon le vecteur d'onde \vec{k}_l forment un angle θ_l avec l'axe optique Oz. La projection de \vec{k}_l dans le plan xOy forme un angle ϕ_l par rapport à Ox (avec $l \in \{s, i, p\}$).*

L'interaction paramétrique est efficace lorsque les trois ondes interagissent de manière constructive sur toute la longueur de l'amplificateur. Supposons dans un premier temps que l'accord de phase est parfait. L'onde idler sera alors générée à la fréquence $\omega_i = \omega_p - \omega_s$ dans la direction (ϕ_i, θ_i) telle que $\vec{\Delta k} = \vec{k}_p - \vec{k}_s - \vec{k}_i = 0$ (figure 1.4.a).

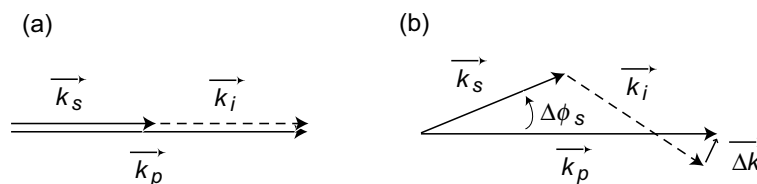


FIG. 1.4 – (a) : Représentation d'un accord de phase colinéaire. (b) Lorsque la direction de l'onde signal varie d'une quantité $\Delta\phi_s$, l'onde idler est générée dans la direction qui minimise le désaccord de phase $\vec{\Delta k}$ [14].

Dans la mesure où les indices de réfraction du milieu non linéaire vus par les ondes en interaction dépendent de la longueur d'onde, de la direction de propagation des ondes et de la température du cristal, toute variation de l'un des paramètres entraîne un désaccord de phase (figure 1.4.b). Toutefois si celui-ci reste faible il est possible de faire un développement limité au premier ordre du module du vecteur désaccord de phase tel que :

$$\left| \vec{\Delta k} \right| = \sum_j \frac{\partial \Delta k}{\partial \phi_j} d\phi_j + \sum_j \frac{\partial \Delta k}{\partial \theta_j} d\theta_j + \sum_j \frac{\partial \Delta k}{\partial \lambda_j} d\lambda_j + \frac{\partial \Delta k}{\partial T} dT + \dots \quad (j \in \{p, s\}) \quad (1.18)$$

A partir de l'expression du gain d'amplification vu précédemment, il est possible de définir des acceptances angulaires $(\Delta\phi_j, \Delta\theta_j)$, spectrales $\Delta\lambda_j$ et en température ΔT donnant les limites de variations de chacun des paramètres autour de leur valeur respective pour lequel l'accord de phase parfait est réalisé. Les différentes acceptances sont définies par rapport au désaccord de phase Δk_m pour lequel le gain d'amplification est divisé par deux. Tant que $|\Delta k| < \Delta k_m$ on parle de quasi-accord de phase [1].

Amplification paramétrique d'images

Pour l'amplification paramétrique d'images, on suppose que l'onde signal de pulsation ω_s est porteuse d'une information spatiale dans son plan transverse et que l'onde pompe de pulsation ω_p est une onde plane intense (figure 1.5).

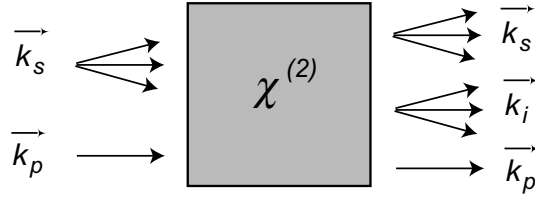


FIG. 1.5 – Si l'accord de phase est non critique en angle pour l'onde signal porteuse de l'image, la résolution de l'image amplifiée est optimale. D'autre part l'onde idler, qui est aussi une image, est la réplique du signal amplifié.

Une décomposition en spectre d'ondes planes associée à cette image se traduit par un ensemble de vecteurs d'ondes se propageant dans des directions différentes (ϕ_s, θ_s) réparties autour de la direction de propagation de l'onde plane associée à la fréquence spatiale nulle (ϕ_{0s}, θ_{0s}) . Ainsi à chaque vecteur d'onde est associé une fréquence spatiale de l'image :

$$\nu_s = \frac{\sin(\theta_s - \theta_{0s})}{\lambda_s}, \quad \mu_s = \frac{\sin(\phi_s - \phi_{0s})}{\lambda_s} \quad (1.19)$$

L'amplification paramétrique d'une image avec la meilleure résolution implique de trouver des configurations d'accord de phase présentant des acceptances angulaires $(\Delta\phi_s, \Delta\theta_s)$ maximales afin de préserver un maximum d'informations. En terme de fréquences spatiales, il s'agit de trouver la configuration d'accord de phase qui présente la bande passante la plus large.

A la dégénérescence $(\omega_p = 2\omega_s = 2\omega_i)$ et pour l'accord de phase colinéaire, lorsque la direction de propagation de l'onde signal s'écarte de la direction correspondant à un accord de phase parfait, on montre que $\vec{\Delta k}$ est nul au premier ordre, soit :

$$\left(\frac{\partial \vec{\Delta k}}{\partial \phi_s} \right)_{\phi_s = \phi_{0s}} = \vec{0}, \quad \left(\frac{\partial \vec{\Delta k}}{\partial \theta_s} \right)_{\theta_s = \theta_{0s}} = \vec{0} \quad (1.20)$$

Dans ce cas, les acceptances angulaires $\Delta\phi_s$ et $\Delta\theta_s$ sont maximales. Ce type d'accord de phase est dit non critique en angle pour le signal [14, 15].

De façon générale, pour les processus de mélanges à trois ondes, ce type d'accord de phase est simultanément non critique en angle pour deux des trois ondes en interaction et critique pour la troisième. D'un point de vue pratique cela implique que cette onde doit être idéalement plane. En amplification paramétrique d'images, nous aurons donc une image que constitue le signal mélangée avec une onde pompe plane et intense. L'onde idler générée sera alors une

réplique à la pulsation ω_i de l'onde signal amplifiée dans la limite des fréquences spatiales du signal amplifié (figure 1.5).

1.2.3 Amplification d'images polychromatiques

La configuration d'accord de phase de type 2 est très critique vis à vis de la longueur d'onde du signal. Ainsi, les ondes en interaction doivent être relativement monochromatiques étant donné la faible acceptation spectrale (de l'ordre de quelques nanomètres) [1, 15]. Cette propriété impose également une limitation sur la durée des impulsions lasers employées lors de ce processus de mélanges à trois ondes. En effet, plus les impulsions sont courtes d'un point de vue temporel, plus leur étendue spectrale est grande. Pour des impulsions de durée inférieure à la picoseconde, la dispersion du milieu non linéaire n'est plus négligeable et nécessite l'utilisation de cristaux très courts (quelques centaines de micromètres) [16].

Pour un accord de phase de type 1, les ondes signal et idler ont la même polarisation et voient le même indice de réfraction. Dans ce cas la variation de la dispersion liée à la variation de λ_s est compensée au premier ordre par la variation de la dispersion pour l'onde idler ($\frac{\partial n_s}{\partial \lambda_s} d\lambda_s = -\frac{\partial n_i}{\partial \lambda_i} d\lambda_i$). L'accord de phase colinéaire de type 1 est alors à la fois non critique en angle et en longueur d'onde pour le signal et l'idler [1, 15, 17] et permet ainsi l'amplification d'images avec la meilleure résolution sur une large bande spectrale (de plusieurs dizaines de nanomètres).

Fonction de transfert d'amplification

A partir de l'équation 1.14a et en considérant que seules les ondes pompe et signal sont présentes à l'entrée du cristal, *i.e.* $A_i(0) = 0$, on peut définir d'un point de vue des fréquences spatiales, le gain d'amplification comme une fonction de transfert d'amplification pour les fréquences spatiales (μ_s, ν_s) et temporelle (λ_s) de l'onde signal telle que :

$$G_s(\mu_s, \nu_s, \lambda_s) = \cosh^2(bz) + \frac{\Delta k^2}{4b^2} \sinh^2(bz) \quad (1.21)$$

Pour illustrer cette notion, nous allons détecter expérimentalement le spectre spatio-temporel de la fluorescence paramétrique. En effet, comme la fluorescence paramétrique est caractéristique de l'interaction pompe-cristal [18], son spectre spatio-temporel donne directement, dans le

cas des forts gains ($\sinh^2 \simeq \cosh^2$), une représentation de la fonction de transfert d'amplification $G_s(\mu_s, \nu_s, \lambda_s)$ [1]. Notons que la fluorescence paramétrique est la lumière émise en l'absence de signal à l'entrée par conversion spontanée des photons pompe en photons signal et idler. Elle est liée à l'amplification des fluctuations du vide (cet aspect sera abordé plus en détails ultérieurement).

Nous disposons d'une onde pompe de longueur d'onde $\lambda_p = 355 \text{ nm}$, un accord de phase de type 1 à la dégénérescence peut être obtenu dans un cristal de LBO [9]. Ce cristal présente certains avantages par rapport aux milieux quadratiques envisagés pour ce type d'interaction :

- Un fort coefficient non linéaire (2 à 3 fois celui du KDP),
- Un seuil de dommage élevé,
- De larges acceptances angulaires et spectrales,
- Un domaine de transparence variant de 0,16 à 2,6 μm ,
- Un faible angle de double réfraction (*walk-off* spatial),
- Une faible sensibilité à l'humidité.

La fonction de transfert d'amplification G_s normalisée en fonction de (ϕ_s, λ_s) pour un accord de phase colinéaire de type 1 ($\phi_p \simeq 42^\circ$) est représentée sur la figure 1.6.a. Cette image correspond au spectre spatio-temporel expérimental de la fluorescence paramétrique. On constate qu'autour de la dégénérescence ($\lambda_s = 2\lambda_p = 710 \text{ nm}$), les acceptances spectrale et angulaire sont maximales simultanément $\Delta\lambda_s = 50 \text{ nm}$ et $2\Delta\phi_s \simeq 2\Delta\theta_s = 20 \text{ mrad}$ pour un cristal de section $5 \times 5 \text{ mm}^2$ et de 10 mm de long. La résolution pour l'amplification d'images (*i.e.* la bande passante de la fonction de transfert d'amplification) est donnée par la relation 1.19 évoquée précédemment, soit avec l'approximation des petits angles :

$$\mu_s \simeq \nu_s \simeq \frac{\Delta\phi_s}{\lambda_s} \simeq \frac{\Delta\theta_s}{\lambda_s} \quad (1.22)$$

D'où $\nu_s \simeq \mu_s \simeq 14 \text{ mm}^{-1}$ pour $\lambda_s = 710 \text{ nm}$, ce qui correspond (compte tenu des dimensions du cristal) à une résolution pour les images amplifiées d'environ 70×70 points.

Les figures 1.6.a et 1.6.c représentent les fonctions de transfert $G_s = (\phi_s, \lambda_s)$ expérimentales obtenues pour deux directions de propagation différentes de l'onde pompe dans le plan xOy , respectivement $\phi_p = 41,7^\circ$ et $\phi_p = 42,1^\circ$. On montre qu'en modifiant cette valeur

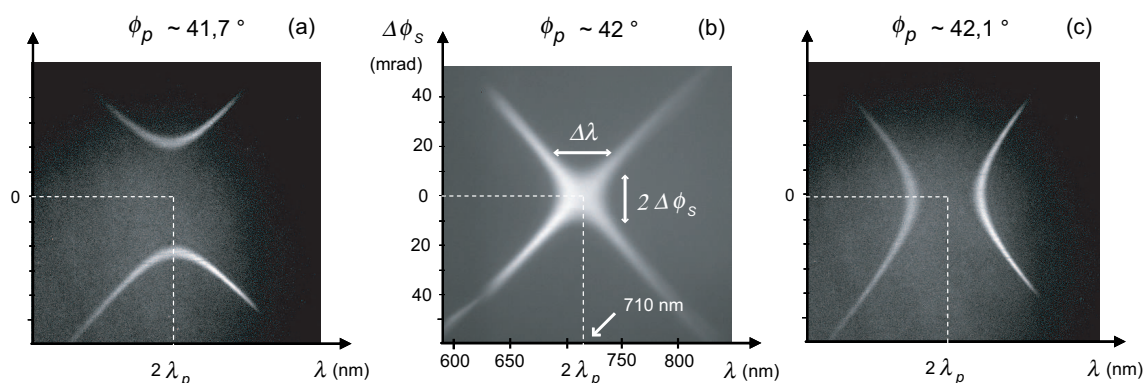


FIG. 1.6 – (b) Fonction de transfert de type passe-bas pour $\lambda = 710$ nm permettant d'optimiser simultanément la résolution de l'image amplifiée sur la plus large bande spectrale. (a,c) Fonction de transfert de type passe-bande : les configurations d'accord de phase varient suivant l'angle d'incidence de l'onde pompe sur le cristal (ϕ_p).

de l'angle ϕ_p par simple rotation du cristal autour de son axe Oz , la fonction de transfert d'amplification peut passer d'une fonction passe-bas (figure 1.7.b) à une fonction passe-bande (figure 1.7.c) [19].

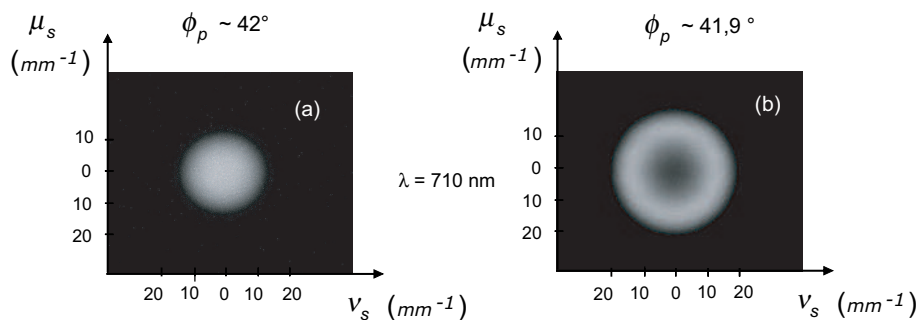


FIG. 1.7 – Représentation expérimentale des deux configurations d'accord de phase en fonction des fréquences spatiales (ν_s, μ_s). (a) : Fonction de transfert de type passe-bas optimisant la résolution de l'image amplifiée. (b) : Fonction de transfert de type passe-bande.

Autour de la dégénérescence l'accord de phase est non critique en angle et en longueur d'onde pour le signal. Cette propriété de l'accord de phase de type 1 permettant l'amplification paramétrique d'images polychromatiques est utilisée dans le cadre de cette thèse pour l'analyse spectrale, temporelle et spatiale des signaux de fluorescence.

1.3 Amplification paramétrique de signaux incohérents

1.3.1 Notions de sources cohérentes et incohérentes

La notion de cohérence d'une source lumineuse est décrite par l'ensemble des propriétés de corrélation existant entre les grandeurs du champ optique. Grâce à cette fonction de corrélation, on définit un degré de cohérence complexe $\gamma_{12}(\tau)$ qui permet de distinguer trois cas [20] :

$$\begin{aligned} |\gamma_{12}(\tau)| &\equiv 1 && \text{cohérence (totale),} \\ |\gamma_{12}(\tau)| &\leq 1 && \text{cohérence partielle,} \\ |\gamma_{12}(\tau)| &\equiv 0 && \text{incohérence (totale).} \end{aligned}$$

En réalité, les deux cas limites de cohérence et d'incohérence totales n'existent pas. Ainsi, toutes les sources sont partiellement cohérentes avec différents degrés de cohérence.

De manière générale, les sources lumineuses sont classées suivant deux catégories :

- les sources dites "cohérentes", monochromatiques et directionnelles telles que les lasers ou les rayonnements synchrotron,
- les sources dites "incohérentes", polychromatiques et multidirectionnelles telles que les étoiles, les lampes spectrales, à arc ou à filament, *etc...*

Les différences entre la lumière issue d'un laser et la lumière émise par les sources classiques s'expliquent en introduisant le concept de photon. La lumière est dite cohérente lorsque tous les photons ont la même fréquence et la même phase (cohérence temporelle). De plus, ces photons semblent provenir d'une source ponctuelle très éloignée et se propagent tous dans la même direction (cohérence spatiale). La source est alors qualifiée de "source monomode spatio-temporel". Cette source idéale n'existe pas mais le laser s'en approche le plus³.

Inversement, une source est dite incohérente lorsqu'elle émet dans des directions quelconques et à des instants quelconques, des photons dans une gamme de fréquence caractéristique de la source. On parle dans ce cas de "sources multimodes spatio-temporels". Le degré de cohérence de telles sources peut être amélioré par filtrage spatial ou spectral. Notons que la principale caractéristique des sources incohérentes classiques réside dans le faible nombre de photons

³ Une source ne sera jamais totalement monochromatique, même si son spectre présente des raies d'émission très étroites.

émis par mode spatio-temporel, le plus souvent très inférieur à un dans le visible.

Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples de sources dites incohérentes. Nous nous intéresserons en particulier aux deux sources lumineuses utilisées dans le cadre de cette thèse, à savoir l'émission de fluorescence sous excitation à un photon et la fluorescence paramétrique générée lors de l'interaction paramétrique.

Les sources spectrales :

Elles sont basées sur le principe de l'émission spontanée et tendent vers des spectres qui correspondent aux différentes transitions atomiques. L'excitation peut être provoquée par exemple par une décharge électrique dans un gaz (lampe au Mercure, lampe au Sodium). Prenons l'exemple d'une lampe à sodium⁴ (doublet jaune à 589 nm, de puissance 15 W et d'intensité lumineuse 40 Cd) pour calculer le nombre de photons émis par mode spatio-temporel (*i.e.* par volume de cohérence). La luminance L pour chaque raie d'émission de largeur spectrale $\Delta\nu = 1,69 \text{ GHz}$, vaut $L \simeq 389 \text{ W/Srd/m}^2$. Soit d'après l'équation suivante [21] :

$$\bar{n} = \frac{L\lambda^3}{hc\Delta\nu}, \quad (1.23)$$

un nombre moyen de photons émis par mode $\bar{n} \simeq 0,23$.

A titre de comparaison, un laser Hélium-Néon ($\lambda = 633 \text{ nm}$) de puissance 1 mW et de faisceau de section 1 mm², émet en moyenne 3.10⁹ photons par mode spatio-temporel.

Les sources thermiques :

Elles sont basées sur le principe de l'émission de type corps noir. Cette émission est à l'origine liée à la transition entre deux niveaux d'énergies (émission spontanée) mais l'agitation thermique va produire un spectre en fréquence qui obéit à des lois statistiques que l'on décrit par le modèle du Corps Noir (Cavité constitué de N oscillateurs harmoniques). Le spectre du corps noir est entièrement défini par la température T du corps noir [22, 23].

Le nombre moyen de photons par mode spatio-temporel est donné par la relation :

$$\bar{n} = \frac{1}{e^{\left(\frac{h\nu}{kT}\right)} - 1} \quad (1.24)$$

⁴ Catalogue Oriol.

Ainsi, en considérant un rayonnement de longueur d'onde $\lambda = 600 \text{ nm}$ à une température $T = 3000 \text{ K}$, on obtient 3.10^{-4} photon par mode.

Les signaux de fluorescence :

La fluorescence est la propriété d'une molécule ou d'un atome d'émettre spontanément un photon suite à l'absorption d'un autre photon. Le diagramme de Jablonski (figure 1.8) illustre un exemple d'absorption et d'émission de photons par une molécule fluorescente autrement appelée fluorophore [24].

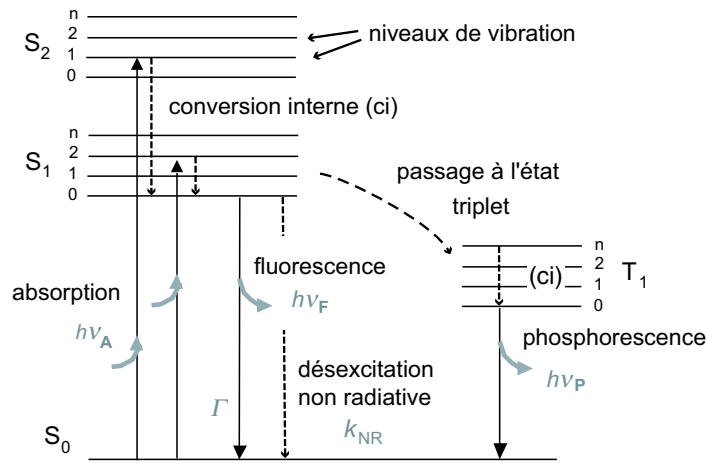


FIG. 1.8 – Diagramme de Jablonsky. S_0 désigne l'état fondamental, S_1 et S_2 correspondent aux états excités singulets de niveau 1 et 2. Les états excités vibrationnels sont représentés sur le diagramme par les niveaux d'énergie d'indices 0,1,2 ou n .

Selon le principe de Pauli, deux électrons au maximum peuvent parcourir la même orbitale dans l'état fondamental et sont alors de spins⁵ opposés. Ainsi, l'état fondamental est un état singlet (les spins sont antiparallèles). Après absorption d'un photon, il se produit un apport d'énergie $E = h\nu$ (avec h constante de Planck) que les électrons absorbent. Ils accèdent alors à un niveau d'énergie plus élevé et la molécule se trouve dans un état énergétique supérieur. Notons que l'activation de la molécule (absorption) se produit en un temps très court (10^{-16} s) durant lequel la molécule n'a pas le temps de changer de configuration (spins antiparallèles), elle est donc portée dans un état singlet excité S_i avec $i \in \{0, 1, 2, n\}$.

⁵ Mode de rotation de l'électron sur lui-même.

Il existe différentes voies de désactivation de l'état excité S_i . Dans un premier temps, les conversions internes permettent à la molécule de se retrouver à l'état excité S_1 au niveau de vibration 0. Ensuite, à partir de ce niveau d'énergie plusieurs évolutions sont possibles :

- la molécule passe de l'état excité singulet S_1 à l'état fondamental S_0 par une transition radiative notée Γ sans changer de spin électronique et émet un photon de fluorescence,
- la molécule passe à l'état triplet (spins parallèles) T_1 par une transition non radiative en changeant de spin électronique et émet un photon de phosphorescence,
- la molécule revient dans son état fondamental S_0 sans émission de photons par une désexcitation non radiative notée k_{NR} (figure 1.8).

Nous retiendrons que le phénomène de fluorescence correspond à l'émission radiative se produisant entre deux états singulets (excité et fondamental) et que le phénomène de phosphorescence correspond à l'émission radiative se produisant entre deux états de multiplicité différente (triplet - singulet fondamental).

Remarque : Un autre processus peut désactiver l'état excité, il s'agit des collisions entre molécules généralement appelé *quenching*⁶ [24].

Quantifier un signal de fluorescence en terme de nombre de photons émis par mode spatio-temporel n'est pas trivial car cela dépend fortement des conditions expérimentales dans lesquelles sont produites ce rayonnement. Toutefois, nous verrons dans ce chapitre qu'il est possible de déterminer ce nombre moyen de photons par mode grâce au processus d'amplification paramétrique.

Les différentes caractéristiques des signaux de fluorescence telles que les spectres d'absorption et d'émission, le rendement quantique et le temps de déclin seront abordées dans le chapitre 4. On retiendra ici que ces signaux correspondent à une émission spontanée de photons sur une large gamme de fréquences dans des directions quelconques et à des instants quelconques avec un nombre moyen de photons émis par mode inférieur à un.

⁶ Ce processus est très présent dans les milieux liquides où le nombre de molécules voisines est grand.

La fluorescence paramétrique :

L'illumination d'un cristal quadratique par une pompe de forte intensité provoque spontanément l'amplification des fluctuations du vide (ou bruit quantique) dans des directions et à des fréquences (mode spatio-temporel) correspondant à un accord de phase possible avec l'onde pompe [11, 25]. Ce phénomène est caractérisé par l'émission spontanée de lumière appelée fluorescence paramétrique⁷ dans des gammes de fréquences spatiales et temporelles définies par la condition d'accord de phase. Etant donné le caractère aléatoire des fluctuations du vide, la fluorescence paramétrique est assimilée à une source lumineuse incohérente dont le nombre de photon par mode spatio-temporel, égal au gain de l'amplificateur, peut être largement supérieur à un.

L'utilisation d'un capteur CCD pour estimer le nombre de photons par mode d'un rayonnement électromagnétique implique une intégration du flux de photons incidents sur le détecteur d'un point de vue temporel et sur un pixel d'un point de vue spatial. Aussi à partir du nombre de photo-électrons créés dans le détecteur, l'estimation de ce nombre moyen de photons par mode suppose de connaître d'une part le nombre de modes temporels intégrés par le détecteur pendant le temps d'acquisition et d'autre part la taille d'un mode spatial (ou cellule de cohérence) par rapport à la taille du pixel du capteur CCD. Dans les deux paragraphes qui suivent, nous allons donc détailler la méthode permettant cette estimation dans le cas de l'amplification paramétrique optique.

1.3.2 Définition du nombre de modes spatio-temporels pour l'amplification paramétrique

Le nombre de modes spatio-temporels M_{spt} susceptibles d'être amplifiés dans un cristal quadratique et détectés par un capteur CCD peut être décomposé en un produit du nombre de modes temporels M_t et spatiaux M_s tel que :

$$M_{spt} = M_s \times M_t \tag{1.25}$$

Notons que le nombre total de modes temporels détectés M_t correspond au produit du nombre de modes temporel détectés pour un tir laser M_t^0 par le nombre de tirs lasers N

⁷ Ou Spontaneous Parametric Down Conversion ↔ SPDC.

1.3. AMPLIFICATION PARAMÉTRIQUE DE SIGNAUX INCOHÉRENTS

cumulés ($M_t = N \times M_t^0$).

Nombre de modes spatiaux :

Dans le cas de l'interaction paramétrique, un mode spatial correspond à une cellule de résolution de l'amplificateur (cf §.1.2.3). Prenons l'exemple suivant : une onde pompe de longueur d'onde $\lambda_p = 355 \text{ nm}$, de durée $\delta t_p = 20 \text{ ps}$ et d'énergie $E_p \simeq 3 \text{ mJ}$ illumine un cristal de LBO de section $5 \times 5 \text{ mm}^2$ (figure 1.9).

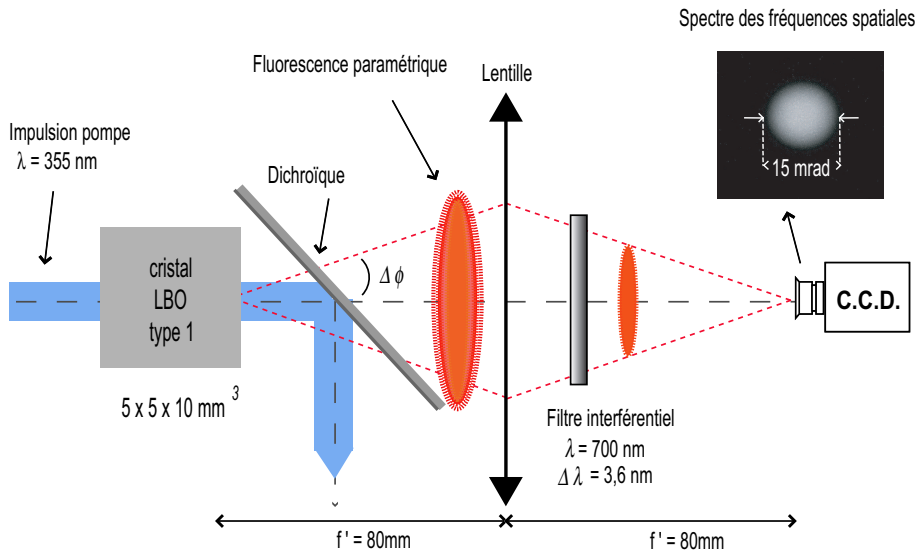


FIG. 1.9 – Montage expérimental permettant la détection du spectre des fréquences spatiales de la fluorescence paramétrique.

Le capteur CCD est placé dans le plan focal, ou plan de Fourier de la lentille ($f' = 80 \text{ mm}$) de manière à observer le spectre des fréquences spatiales produit par la fluorescence paramétrique. Le filtre interférentiel situé devant la caméra permet de sélectionner une longueur d'onde autour de la dégénérescence ($\lambda = 700 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{FWHM} = 3,6 \text{ nm}$). Le spectre observé a pour diamètre $2\Delta\phi \simeq 2\Delta\theta \simeq 15 \text{ mrad}$. De plus, toute la section S_{LBO} du cristal est éclairée par le faisceau pompe et est imagée en totalité sur la caméra.

Ainsi, le cristal peut être considéré comme une source émettant de la lumière dans un angle solide $\Delta\Omega_{SPDC} \simeq \pi\Delta\phi^2$ centrée sur $\lambda \pm \frac{\Delta\lambda}{2}$ [26]. L'angle solide associé à une aire de cohérence

(*i.e.* la taille d'un mode) pour la fluorescence paramétrique est alors donné par [21] :

$$\Omega_{SPDC} = \frac{\lambda^2}{S_{LBO}} \quad (1.26)$$

Le nombre total de modes spatiaux détectés correspond au rapport de l'angle solide du spectre des fréquences spatiales ($\Delta\Omega_{SPDC}$) sur la taille d'un mode spatial (Ω_{SPDC}), d'où :

$$M_s = \frac{\Delta\Omega_{SPDC}}{\Omega_{SPDC}} = \frac{\pi\Delta\phi^2}{\lambda^2} \times S_{LBO} \quad (1.27)$$

Dans l'exemple considéré, avec $\lambda = 700 \text{ nm}$ et $2\Delta\phi = 15 \text{ mrad}$, le nombre de modes spatiaux vaut $M_s \simeq 9000$, soit environ 95×95 cellules de résolution. Le rapport entre la taille d'un mode spatial et la taille d'un pixel dépendra alors du grandissement du système imageur entre le cristal et le capteur CCD.

On remarque que ce nombre de modes spatiaux est indépendant du nombre de tirs lasers cumulés N (*i.e.* du temps d'acquisition des images).

Nombre de modes temporels :

Le nombre de modes temporels détectés pour un tir laser noté M_t^0 , est défini comme le rapport entre la longueur de l'impulsion de fluorescence paramétrique $l_{SPDC} = c \delta t_{SPDC}$ et sa longueur de cohérence $\Delta l = \lambda^2 / \Delta\lambda$ détectée après le filtre interférentiel FI , soit :

$$M_t^0 \simeq \frac{c \Delta\lambda \delta t_{SPDC}}{\lambda^2} \quad (1.28)$$

avec $\Delta\lambda$, la largeur du filtre interférentiel placé devant la caméra et δt_{SPDC} , la durée de l'impulsion de fluorescence paramétrique. Cette durée a été mesurée expérimentalement au moyen d'une caméra à balayage de fente, la largeur à mi-hauteur pour l'impulsion de fluorescence paramétrique est d'environ $\delta t_{SPDC} \simeq 10 \text{ ps}$.

Ainsi, pour une longueur d'onde centrée sur $\lambda_{FI} = 700 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{FI} = 3,6 \text{ nm}$, on a environ 22 modes temporels par tir laser.

Le nombre total de modes temporels détectés s'exprime en fonction du nombre de tirs lasers cumulés :

$$M_t \simeq \frac{c \Delta\lambda \delta t_{SPDC}}{\lambda^2} \times N \quad (1.29)$$

Remarque : la taille d'un mode temporel ($\delta\lambda_{SPDC}$) est déterminée grâce à la relation suivante :

$$M_t^0 = \frac{\Delta\lambda_{FI}}{\delta\lambda_{SPDC}} \Leftrightarrow \delta\lambda_{SPDC} = \frac{\bar{\lambda}_{FI}^2}{c \delta t_{SPDC}} \quad (1.30)$$

1.3.3 Application de l'amplification paramétrique au calcul du nombre de photons par mode

L'amplification paramétrique d'un signal ou d'une image est toujours accompagnée de l'amplification du bruit quantique (ou fluctuations du vide) avec un niveau moyen équivalent à un photon par mode spatio-temporel à l'entrée du cristal. Plusieurs applications en radiométrie [27–29] et spectroscopie de fluorescence [30] ont montré qu'il était possible d'amplifier des signaux incohérents. En particulier, l'amplification d'un signal similaire à une radiation de type corps noir comportant moins d'un photon par mode a été réalisée expérimentalement par A. Sergienko *et al.* lors d'une étude concernant des mesures de luminescence spectrale [31, 32]. Nous allons voir pourquoi l'interaction paramétrique permet un calibrage absolu de sources lumineuses ou de détecteurs par simple comparaison du nombre de photons par mode émis dans le canal de l'onde idler avec et sans la présence d'un signal à l'entrée du milieu amplificateur.

Si l'on considère d'un point de vue quantique [33, 34] l'interaction paramétrique optique, la résolution des équations couplées sur les opérateurs quantiques, pour un mode spatio-temporel parfaitement accordé en phase, est telle que [35] :

$$\hat{a}_s^{out} = \hat{a}_s^{in} \cosh(gL) + j\hat{a}_i^{\dagger in} \sinh(gL) \quad (1.31a)$$

$$\hat{a}_i^{out} = \hat{a}_i^{in} \cosh(gL) + j\hat{a}_s^{\dagger in} \sinh(gL) \quad (1.31b)$$

où \hat{a}_l et \hat{a}_l^\dagger sont respectivement les opérateurs destruction et création de photons signal, pompe et idler ($l \in \{s, i, p\}$). Les notations *in* et *out* désignent l'entrée et la sortie de l'amplificateur.

Le nombre moyen de photons signal par mode à l'entrée du cristal est donné par la relation suivante :

$$\bar{n}_{signal}^{in} = \langle \hat{a}_s^{\dagger in} \hat{a}_s^{in} \rangle \quad (1.32)$$

Notons que ($\bar{n}_{idler}^{in} = \langle \hat{a}_i^{\dagger in} \hat{a}_i^{in} \rangle = 0$). Ainsi, le nombre de photons par mode sur les canaux signal et idler en sortie de l'amplificateur vaut :

$$\bar{n}_{signal}^{out} = \langle \hat{a}_s^{\dagger out} \hat{a}_s^{out} \rangle = \cosh^2(\bar{n}_{signal}^{in}) + \sinh^2(gL) = G \bar{n}_{signal}^{in} + (G - 1) \quad (1.33a)$$

$$\bar{n}_{idler}^{out} = \langle \hat{a}_i^{\dagger out} \hat{a}_i^{out} \rangle = \sinh^2(gL)(1 + \bar{n}_{signal}^{in}) = (G - 1)(1 + \bar{n}_{signal}^{in}) \quad (1.33b)$$

où G représente le gain d'amplification.

Le nombre moyen de photon par modes pour la fluorescence paramétrique (SPDC) à la sortie du cristal pour les canaux signal ou idler est alors donné par :

$$\bar{n}_{SPDC} = \sinh^2(gL) = G - 1 \quad (1.34)$$

D'après l'équation 1.33b, le nombre moyen de photons par mode spatio-temporel à l'entrée pour le signal peut alors s'écrire :

$$\bar{n}_{signal}^{in} = \frac{\bar{n}_{idler}^{out} - \bar{n}_{SPDC}}{\bar{n}_{SPDC}} \quad (1.35)$$

La mesure de \bar{n}_{signal}^{in} peut être faite directement par l'acquisition d'images formées par l'onde idler. En effet, les niveaux de gris des images obtenues avec et sans le signal à l'entrée du cristal sont respectivement proportionnels à \bar{n}_{idler}^{out} et \bar{n}_{SPDC} . Ainsi, le rapport donné par l'équation 1.35 est indépendant du gain d'amplification G , du nombre de modes détectés par le capteur CCD, du rendement quantique et du gain électronique de la caméra : la prise en compte de ces grandeurs revient en effet à multiplier le numérateur et le dénominateur de l'équation 1.35 par la même constante⁸. Cela conduit alors à une mesure absolue de la luminance du signal d'entrée directement exprimée en nombre de photons par mode spatio-temporel avec dans le cas de l'amplification paramétrique d'images une résolution spatiale directe de la luminance de la source.

1.4 Résultats expérimentaux

1.4.1 Dispositif expérimental

Le montage expérimental concernant l'amplification paramétrique d'images issues de sources incohérentes (signaux de fluorescence dans notre cas) est représenté sur la figure 1.10. Le laser utilisé est un Nd :YAG (*Quantel*[®]) *Q-switch* à modes bloqués en phase qui délivrent des impulsions infrarouge ($\lambda_{IR} = 1064 \text{ nm}$, $\delta t_{IR} = 55 \text{ ps}$) à la fréquence de 10 Hz. Le faisceau infrarouge est partiellement doublé dans un cristal de KDP ($\lambda_{vert} = 532 \text{ nm}$, $\delta t_{vert} = 38 \text{ ps}$) puis triplé ($\lambda_{UV} = 355 \text{ nm}$, $\delta t_{UV} = 20 \text{ ps}$).

⁸ Cette extension de la relation 1.35 au cas où plusieurs modes sont intégrés par le détecteur n'est cependant valable que si un filtrage spatio-temporel adéquat permet de ne détecter que les modes où le signal est présent.

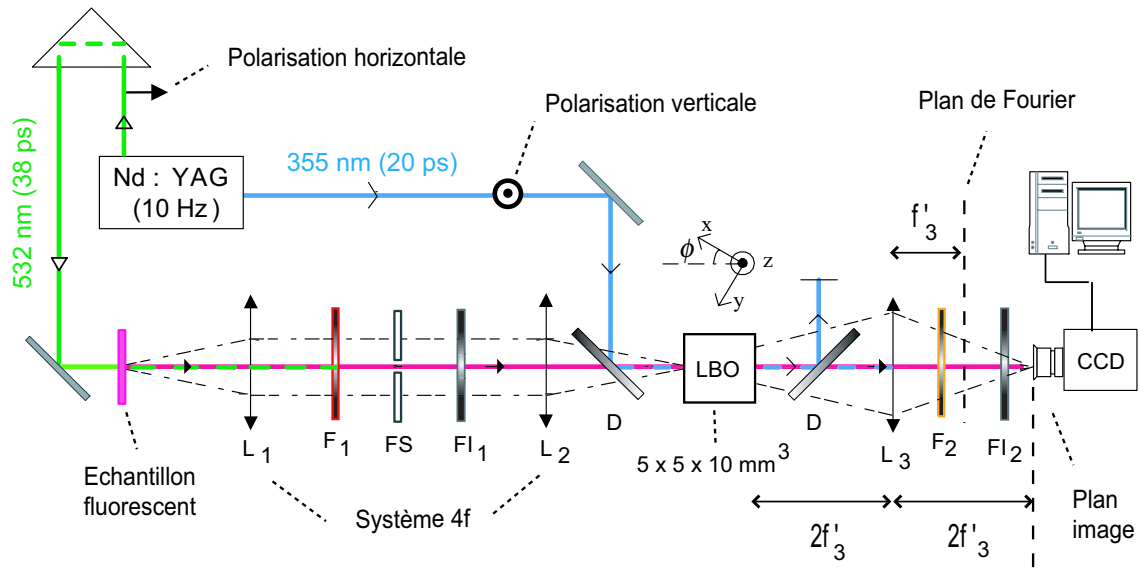


FIG. 1.10 – Montage expérimental relatif à l'amplification paramétrique d'images de signaux de fluorescence. $L_{1,2}$: lentilles convergentes ($f'_{1,2} = 100 \text{ mm}$), L_3 : lentille convergente ($f'_3 = 80 \text{ mm}$), FS : filtre spatial, $F_{1,2}$: filtres colorés qui absorbent respectivement le vert et l'UV, $FI_{1,2}$: filtres interférentiels, D : miroirs dichroïques ($T_{max} = 710 \text{ nm}$, $R_{max} = 355 \text{ nm}$).

A la sortie du laser, le faisceau vert est polarisé horizontalement et le faisceau ultraviolet, utilisé comme faisceau pompe, est polarisé verticalement. Le signal à amplifier correspond à l'émission spontanée de lumière issue d'un colorant en solution excité au moyen du faisceau vert. Le spectre d'émission du signal de fluorescence ainsi généré s'étend sur une centaine de nanomètres et est centré environ sur 710 nm , longueur d'onde correspondant à la dégénérescence puisque $\lambda_{UV} = \lambda_p = 355 \text{ nm}$. Le signal est filtré spatialement avec un trou de filtrage (FS) puis spectralement avec un premier filtre interférentiel centré sur $\lambda_s = \lambda_{FI_1} = 720 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{FI_1} = 5 \text{ nm}$.

L'image de l'échantillon est formée sur le cristal de LBO au moyen d'un montage $4f$ de grandissement 1 et est ensuite amplifiée dans ce cristal taillé pour un accord de phase collinéaire de type 1 dans le plan xy autour de la dégénérescence ($2\lambda_p$). La ligne à retard placée sur le trajet du faisceau vert permet la synchronisation entre l'onde pompe et l'onde signal. L'onde idler générée durant l'interaction est isolée du signal amplifié avec un second filtre interférentiel centré sur $\lambda_i = \lambda_{FI_2} = 700 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{FI_2} = 3,6 \text{ nm}$. Les images de la face d'entrée du cristal sont détectées soit en champ proche si la caméra est placée à $2f'_3$ de L_3 soit en

champ lointain si elle est placée à f'_3 . Le capteur CCD a pour dimension 512×512 *pixels*, la taille d'un pixel est $24 \times 24 \mu m^2$.

1.4.2 Images en champ lointain

Dans le paragraphe 1.3.3, nous avons montré qu'il était possible de mesurer directement le nombre de photons par mode spatio-temporel du signal incident. Cette mesure peut s'effectuer simplement en comparant les niveaux de gris des images enregistrées avec et sans signal. Toutefois, certaines précautions sont nécessaires pour une analyse correcte :

- Le signal doit être filtré spatialement (*FS*) autour de la direction d'accord de phase colinéaire dans un angle solide plus petit que l'acceptance angulaire de l'accord de phase, définissant ainsi une zone où le gain d'amplification est supposé constant.
- La section de l'onde pompe doit être inférieure à celle du signal afin que les mêmes modes spatiaux à l'entrée du cristal soient excités par le signal et la fluorescence paramétrique. Ainsi, les niveaux de gris des images avec et sans signal peuvent être comparés sans tenir compte du nombre de modes spatio-temporels détectés.

La figure 1.11 correspond aux images en champ lointain formées par l'onde idler sans signal incident (figure 1.11.a) et avec signal incident (figure 1.11.b). La caméra étant placée dans le plan de Fourier de la lentille L_3 , on observe sur ces images le spectre des fréquences spatiales de la fluorescence paramétrique (SPDC) et de l'idler.

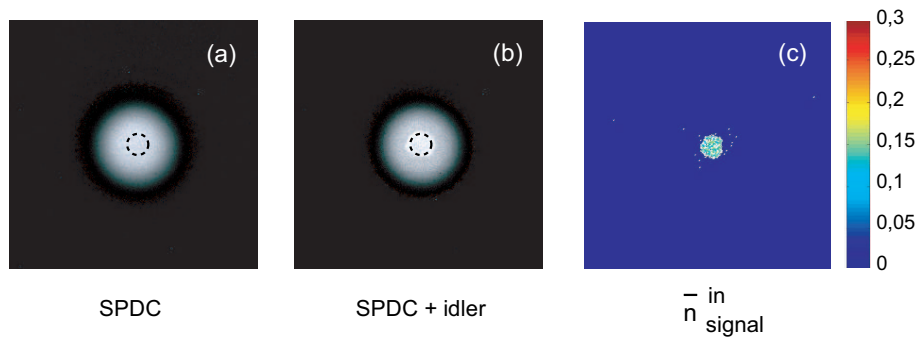


FIG. 1.11 – *Spectre des fréquences spatiales à 700 nm : de la fluorescence paramétrique seule (a) et de l'onde idler (en rouge) avec la fluorescence paramétrique (b). La moyenne des niveaux de gris dans ces deux images est effectuée dans la zone pointillée. (c) Cartographie 2D de la luminance du signal de fluorescence.*

La contribution des fréquences spatiales de l'onde idler délimitées par le filtre spatial est représentée sur la figure 1.11.a par le cercle en pointillé noir. Le temps d'acquisition est de 15 s, soit une accumulation de 150 tirs lasers sur la caméra. Le fluorophore utilisé pour cette expérience est la pyridine2 en solution dans l'éthanol. Une étude plus descriptive des fluorophores sera abordée dans le chapitre 5.

Si l'on se réfère à la relation 1.35, la simple comparaison des niveaux de gris moyens mesurés dans les zones pointillées donne un nombre de 0,11 photon par mode spatio-temporel. D'autre part, en appliquant cette même relation directement sur les images pixel par pixel, nous obtenons une cartographie 2D de la luminance du signal de fluorescence dans la direction et dans l'angle solide délimité par le filtre spatial (figure 1.11.c).

Ce résultat montre que des images issues de sources incohérentes comportant moins d'un photon par mode peuvent être amplifiées, et que la luminance de telles sources peut être mesurée directement avec une résolution spatiale 2D.

1.4.3 Images en champ proche

Pour l'expérience d'amplification paramétrique d'images en champ proche, nous plaçons la caméra dans le plan image du cristal avec un grandissement $|\gamma| \simeq 1$. Une mire de résolution est placée derrière la cuve contenant le mélange pyridine2-éthanol de manière à former l'image de deux rectangles ou d'un chiffre six (figure 1.12). Dans ce cas, l'ensemble des fréquences spatiales susceptibles d'être amplifiées dans la limite de la bande passante de l'amplificateur doivent être présentes à l'entrée du cristal. Aussi, le filtre spatial est ouvert au maximum pour que le spectre des fréquences spatiales du signal recouvre totalement celui de la fluorescence paramétrique (dans le cas d'un signal basse fréquence spatiale, le filtre spatial serait placé après le cristal).

Les images sans signal (figures 1.12.a et 1.12.e) et avec signal (figures 1.12.b et 1.12.f) à l'entrée du cristal ont été enregistrées sur la caméra avec une durée d'exposition de 60 s. L'image correspondant à la fluorescence paramétrique seule montre des inhomogénéités de gain dues à la mauvaise qualité du faisceau pompe. Une soustraction de cette image est donc nécessaire pour retrouver l'information spatiale portée par l'onde idler (figure 1.12.c et 1.12.g). Les niveaux de gris moyens sont calculés dans les zones rectangulaires blanches.

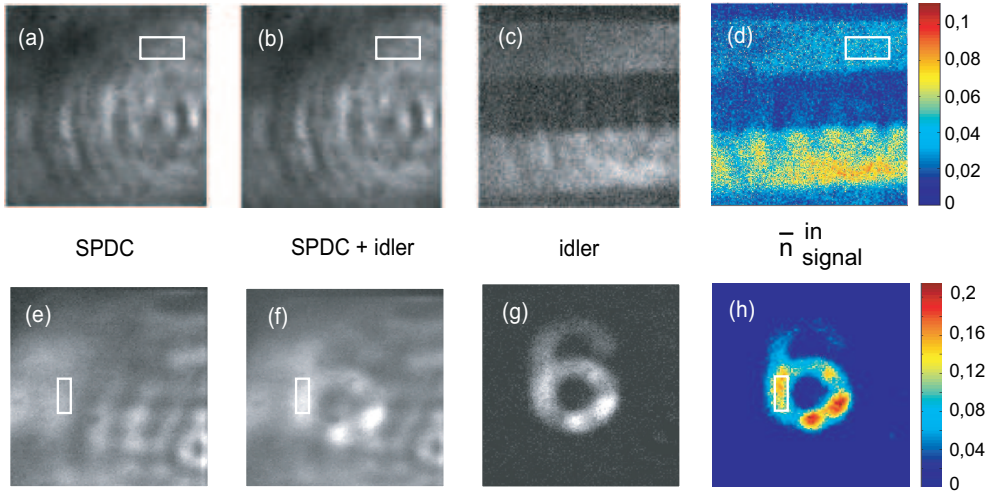


FIG. 1.12 – Images en champ proche à 700 nm : de la fluorescence paramétrique seule (a, e) et de l'onde idler avec la fluorescence paramétrique (b, f). La soustraction des images (b-a, f-e) permet de retrouver l'information spatiale relative au signal d'entrée (c, g). Cartographies 2D de la luminance du signal de fluorescence (d, h).

D'après la relation 1.35, on obtient un nombre moyen de photons par mode spatio-temporel pour le signal égal à 0,051 pour la première série d'images (traits horizontaux) et à 0,15 pour la deuxième série (chiffre 6). Les cartographies en deux dimensions de la luminance du signal de fluorescence à l'entrée du cristal sont représentées sur les figures 1.11.d et 1.11.h. Les variations du nombre moyen de photon signal dans ces images sont dues essentiellement à une excitation non uniforme du fluorophore par le faisceau vert.

1.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il était possible d'amplifier des images de sources de lumières incohérentes émettant en moyenne un nombre de photons par mode de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-2} et ce malgré la présence du bruit apporté par la fluorescence paramétrique correspondant à l'amplification paramétrique du bruit quantique équivalent à un photon par mode à l'entrée du milieu amplificateur.

D'autre part, nous avons montré que sous certaines conditions liées à l'excitation de tous

les modes spatio-temporels⁹ par le signal, il était possible par une simple comparaison des niveaux de gris dans les images formées par le canal idler avec ou sans signal, d'établir une cartographie 2D de la luminance d'une source incohérente et de l'exprimer de façon absolue directement en nombre de photons émis par mode.

Dans le chapitre suivant, nous verrons que la limite d'amplification et de détection d'images de très faible niveau est liée au nombre de modes temporels détectés.

⁹ Modes qui sont susceptibles d'être accordés en phase avec l'onde pompe.

Bibliographie

- [1] F. Devaux, *Amplification paramétrique d'images*, Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté (1996).
- [2] A. Yariv, *Introduction to non linear optics - Quantum electronics (pp. 378-406)*, John Wiley and sons, Ltd., Chichester, 3^e édition (1987).
- [3] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters et G. Weinreich, "Generation of optical harmonics", *Phys. Rev. Lett.*, **7**, pp. 118 (1962).
- [4] S. A. Akhmanov, A. I. Kovrigin, A. S. Piskarskas, V. V. Fadeev et V. Khokhlov, "Observation of parametric amplification in optical range", *JETP Lett.*, **2**, pp. 191 (1965).
- [5] J. E. Midwinter, "Image conversion from 1.6 μm to the visible in lithium niobate", *Appl. Phys. Lett.*, **12**, pp. 68 (1968).
- [6] G. Grynberg, A. Aspect et C. Fabre, *Introduction aux lasers et à l'optique quantique (pp. 318-326)*, Ellipses, Paris (1997).
- [7] R. Boyd, *Nonlinear Optics (pp. 33-47)*, Academic Press, Inc., San Diego (1992).
- [8] V. Dmitriev et L. Tarassov, *Optique non linéaire appliquée (pp. 13-17)*, Mir-Moscou (1987).
- [9] C. Chen, Y. Yu, A. Jiang, B. Wu, G. You, R. Li et S. Lin, "New nonlinear-optical crystal : LiB_3O_5 ", *J. Opt. Soc. Am. B*, **6**, pp. 616 (1989).
- [10] V. G. Dmitriev, G. G. Gurzadyan et D. N. Nikogosyan, *Handbook of Nonlinear Optical Crystals*, Springer-Verlag, Heidelberg, Allemagne, 3^e édition (1999).
- [11] A. Yariv, *Parametric amplification, oscillation and fluorescence - Quantum electronics (pp. 407-452)*, John Wiley and sons, Ltd., Chichester, 3^e édition (1987).
- [12] R. Boyd, *Nonlinear Optics (pp. 75-78)*, Academic Press, Inc., San Diego (1992).
- [13] M. Born et E. Wolf, *Principles of Optics (pp. 670-678)*, Cambridge University Press, New York, 6^e édition (1980).
- [14] E. Lantz et F. Devaux, "Phase-mismatch vector and resolution in image parametric amplification", *J. of Opt. A*, **2**, pp. 362 (2000).

- [15] E. Lantz, L. Han, A. Lacourt et J. Zyss, “Simultaneous angle and wavelength one-beam noncritical phase matching in optical parametric amplification”, *Opt. Comm.*, **97**, pp. 245 (1993).
- [16] C. Doulé, *Amplification paramétrique optique en régime femtoseconde et tomographie optique cohérente : deux méthodes d’imagerie proche infrarouge dans des milieux diffusants*, Thèse de doctorat, Université de Paris-Sud (2000).
- [17] F. Devaux et E. Lantz, “Parametric amplification of a polychromatic image”, *J. Opt. Soc. Am. B*, **12**, pp. 2245 (1995).
- [18] H. A. Bachor, *A guide to experiments in quantum optics*, Wiley-vch Weinheim, Allemagne (1998).
- [19] F. Devaux et E. Lantz, “Transfert function of spatial frequencies in parametric image amplification : experimental analysis and application to picosecond spatial filtering”, *Opt. Comm.*, **114**, pp. 295 (1995).
- [20] W. Lauterborn, T. Kurz et M. Wiesenfeldt, *Optique cohérente (pp. 31-48)*, Masson, Paris (1997).
- [21] L. Mandel et E. Wolf, *Optical coherence and quantum optics (pp. 150-159)*, Cambridge University Press, New York (1995).
- [22] J. Mathieu, *Optique quantique (pp. 236-244)*, tome 2, Société d’édition d’enseignement supérieur, Paris (1965).
- [23] E. Rosencher et B. Vinter, *Optoélectronique (pp. 60-63)*, Dunod, Paris, 2^e édition (2002).
- [24] J. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic, Plenum publishers, New York, 2^e édition (1999).
- [25] W. Louisell, A. Yariv et A. Siegman, “Quantum Fluctuations and Noise in Parametric Process I”, *Phys. Rev.*, **124**, pp. 1646 (1961).
- [26] F. Devaux et E. Lantz, “Spatial and temporal properties of parametric fluorescence around degeneracy in a type 1 LBO crystal”, *Eur. Phys. J. D*, **8**, pp. 117 (2000).
- [27] A. N. Penin et A. Sergienko, “Absolute standardless calibration of photodetectors based on quantum two-photon fields”, *Appl. Opt.*, **30**, pp. 3582 (1991).

- [28] L. Shulong, L. Bo, S. Baoquan, X. Zhongying et J. Desheng, “Absolute measurement of detector quantum efficiency using optical parametric down-conversion pumped by femtosecond laser pulses”, *Meas. Sci. Technol.*, **13**, pp. 186 (2002).
- [29] G. Brida, S. Castelletto, C. Novero et M. Rastello, “Measurement of the quantum efficiency of detectors by parametric fluorescence”, *Metrologia*, **35**, pp. 397 (1998).
- [30] D. Hulin, A. Migus, A. Antonetti, I. Ledoux, J. Badan, J. Oudar et J. Zyss, “Parametric amplification sampling spectroscopy of luminescence at the subpicosecond time scale in the 1-1.6 μm spectral range”, *Appl. Phys. Lett.*, **49**, pp. 761 (1986).
- [31] A. Migdall, R. Datla, A. Sergienko, J. S. Orszak et Y. Shih, “Measuring absolute infrared spectral radiance with correlated visible photons : technique verification and measurement uncertainty”, *App. Opt.*, **37**, pp. 3455 (1998).
- [32] E. Dauler, A. Migdall, N. Boeuf, R. Datla, A. Muller et A. Sergienko, “Measuring absolute infrared spectral radiance with correlated photons : new arrangements for improved uncertainty and extended IR range”, *Metrologia*, **35**, pp. 295 (1998).
- [33] C. Cohen-Tannoudji, J. Dupont-Roc et G. Grynberg, *Photons et atomes : Introduction à l'électrodynamique quantique*, EDP Sciences/Edition du CNRS, Paris (2001).
- [34] C. Cohen-Tannoudji, J. Dupont-Roc et G. Grynberg, *Processus d'interaction entre photons et atomes*, EDP Sciences/Edition du CNRS, Paris (2001).
- [35] S. Gigan, *Amplification paramétrique d'images en cavités : effets classiques et quantiques (chapitre 4)*, Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI (2004).

Limite d'amplification d'images de faibles niveaux

2.1 Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il était possible d'amplifier et de détecter des images de très faible niveau avec moins d'un photon par mode à l'entrée du milieu amplificateur, malgré la présence de bruit correspondant à l'amplification des fluctuations du vide.

Dans ce chapitre nous allons montrer par une étude des propriétés statistiques des fluctuations spatiales de la fluorescence paramétrique qu'il est possible de quantifier le seuil d'amplification et de détection d'images de très faible niveau issues de sources incohérentes.

2.2 Etude théorique

2.2.1 Sources de bruit dans les images amplifiées

Bruits liés à la détection avec un capteur CCD :

Un capteur CCD est une matrice de photodétecteurs (les pixels : pix) qui échantillonne d'un point de vue spatial un flux de photons (ph). Ceux-ci sont convertis en photo-électrons (pe^-) avec un taux de conversion donné par le rendement quantique du capteur (η). Les photo-électrons sont multipliés grâce au gain électronique (g_{e^-}) après le transfert des charges vers les registres de transfert. Ensuite, les photo-électrons enregistrés par les pixels sont retranscrits sous la forme d'une image en niveau de gris (gl) avec une dynamique dépendante du nombre

de bits sur lequel sont échantillonnés les photons-électrons.

Dans le cadre de ces travaux, la caméra CCD utilisée possède un rendement quantique $\eta = 85\%$ à 700 nm , un gain électronique $g_{e^-} = 4,7pe^-/gl$ et une dynamique de 65536 niveaux de gris (16 bits).

Les trois sources principales de bruit lors de la détection sur un capteur CCD sont les suivantes :

- Le **courant d'obscurité** (*dark current*) est lié à l'agitation thermique du silicium et dépend de la température du capteur. Pour notre capteur CCD, il vaut en moyenne $0,8 e^-/pix/s$ à -40°C . Soit pour une exposition de dix secondes, 8 électrons de bruit en moyenne avec un écart type de $1,8 e^-$ pour un gain de 4,7.
- Le **bruit de lecture** (*readout noise*) est lié à l'incertitude de la conversion analogique/digitale des photo-électrons en niveaux de gris. Ce bruit dépend de la vitesse de lecture du capteur. Pour une vitesse de lecture de 40 kHz , l'écart type du bruit de lecture est de $6,3 e^-$ (plus la vitesse de lecture est faible, moins le bruit est important).
- Le **bruit de photons** est lié à la double nature, ondulatoire et corpusculaire, de la lumière. Ce bruit de photon s'ajoute au bruit classique du signal lumineux incident sur le capteur CCD. La théorie quantique de la photodétection [1] permet de relier directement les fluctuations du nombre de photo-électrons produits à celles du flux de photons incidents [2]. Les relations entre les grandeurs statistiques des photons et des photo-électrons est telle que :

$$\bar{n}_{pe^-} = \eta \times \bar{n}_{ph} \quad (2.1)$$

$$\sigma_{n_{pe^-}}^2 = \eta^2 \times \left[\sigma_{n_{ph}}^2 - \bar{n}_{ph} \right] + \eta \times \bar{n}_{ph} \quad (2.2)$$

où \bar{n}_{pe^-} est le nombre moyen de photo-électrons, \bar{n}_{ph} est le nombre moyen de photons incidents et $\sigma_{n_{pe^-}}^2$, $\sigma_{n_{ph}}^2$ les variances associées. Dans l'équation 2.2 le terme multiplié par η^2 exprime les fluctuations classiques de l'intensité tandis que le terme multiplié par η traduit le bruit de photons. Avec notre caméra CCD dont le rendement quantique est proche de un, on peut considérer que la distribution statistique des photo-électrons est équivalente à celle des photons incidents, nous exprimerons désormais les grandeurs statistiques observées en photo-électrons, sachant que la correspondance entre

les niveaux de gris et les photo-électrons est la suivante :

$$\bar{n}_{pe^-} = g_{\acute{e}} \times \bar{n}_{gl} \quad (2.3)$$

$$\sigma_{n_{pe^-}}^2 = g_{\acute{e}}^2 \times \sigma_{n_{gl}}^2 \quad (2.4)$$

avec \bar{n}_{gl} , le nombre moyen de niveaux de gris et $g_{\acute{e}}$, le gain électronique de la caméra. Notons que par la suite, pour alléger les notations, nous ne mentionnerons plus l'indice pe^- .

Bruit lié à la fluorescence paramétrique :

En amplification paramétrique d'images de faibles niveaux, la fluorescence paramétrique est une source de bruit non négligeable comme nous l'avons vu au chapitre précédent. C'est une source lumineuse incohérente dont les fluctuations spatiales suivent une statistique de Bose-Einstein (ou statistique thermique). Dans ce cas, la variance des photo-électrons issus de la détection est donnée par [3] :

$$(\sigma_{\bar{n}})^2 = \bar{n} + \frac{(\bar{n})^2}{M} \quad (2.5)$$

avec $M = M_t \times M_p$ où M_t est le nombre de modes temporels détectés et M_p , le facteur de dégénérescence spatial qui dépend du rapport de la taille de la cellule de cohérence (mode spatial) sur la taille du photodétecteur (pixel) [4]. Il traduit le moyennage des fluctuations lumineuses se produisant sur un même pixel.

Le premier terme de l'équation 2.5 correspond à une distribution poissonnienne associée au bruit de photons et le second traduit les fluctuations d'intensité de la source thermique. Dans le cas des sources thermiques classiques pour lesquelles le nombre de photons par mode est très inférieur à un et pour la détection d'un grand nombre de modes temporels, la distribution thermique est indiscernable de la distribution poissonnienne. Seules les sources thermiques résultant de l'amplification du bruit quantique et possédant un grand nombre de photons par mode ($\bar{n} > 1$) permettent la mise en évidence d'une distribution de Bose-Einstein. Ainsi, la nature thermique des fluctuations spatiales d'intensité de l'émission spontanée amplifiée (ASE) [5] et de la fluorescence paramétrique a été démontrée expérimentalement [6].

Toutefois, la mise en évidence du caractère thermique des fluctuations spatiales de la fluorescence paramétrique est très sensible aux conditions expérimentales. En effet, dans l'équation

2.5, la contribution thermique est pondérée par le nombre de modes temporels détectés M_t et par un facteur de dégénérescence spatial M_p . Idéalement, la contribution du bruit thermique sera prédominante si $M \simeq 1$ ce qui est le cas dans la référence [6].

Dans le cadre de nos expériences, le nombre total de modes temporels détectés est donné par : $M_t = N \times M_t^0$, où N représente le nombre de tirs lasers cumulés et M_t^0 le nombre de modes temporels détectés pour un tir laser. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent (§ 1.2.2), ce nombre M_t^0 dépend de la largeur du filtre interférentiel placé devant la caméra CCD et de la durée de l'impulsion du laser de pompe. Le facteur de dégénérescence spatiale M_p est défini par ¹ [7] :

$$M_p = \left\{ \sqrt{\frac{S_c}{S_{pix}}} \operatorname{erf} \left(\sqrt{\frac{\pi S_{pix}}{S_c}} \right) - \left(\frac{S_c}{\pi S_{pix}} \right) \left[1 - \exp \left(-\frac{\pi S_{pix}}{S_c} \right) \right] \right\}^{-2} \quad (2.6)$$

où S_{pix} représente la surface du pixel et S_c , la surface d'une cellule de cohérence.

On remarquera que idéalement M_p tend vers un lorsque le pixel est infiniment petit devant la taille de la cellule de cohérence (figure 2.1).

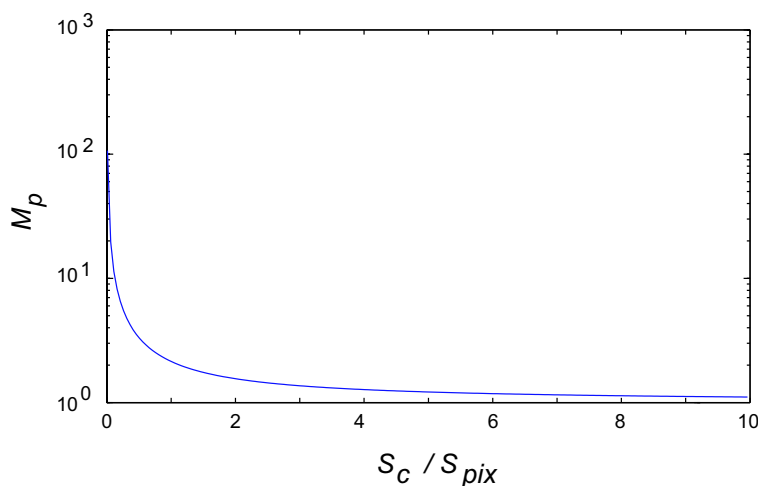


FIG. 2.1 – Variation de M_p en fonction du rapport des surfaces de la cellule et du pixel (S_c/S_{pix}).

L'influence de M_p peut être simulée numériquement dans le cas de la détection d'un seul

¹ Où *erf* représente la fonction d'erreur

mode temporel (figure 2.2). Dans ce cas, l'équation 2.5 devient :

$$\sigma_n^2 = \bar{n} + \frac{\bar{n}^2}{M_p} \quad (2.7)$$

où \bar{n} représente le nombre moyen de photo-électrons par pixel pour un mode temporel. Il s'agit alors d'observer l'évolution de la statistique des fluctuations spatiales en fonction du rapport S_c/S_{pix} à partir d'une image de speckle simulée numériquement avec un niveau moyen de $10 \text{ pe}^-/\text{pix}$, où la taille de la cellule de cohérence correspond à la taille moyenne du grain de speckle [7]. Initialement (figure 2.2.a), on a $S_c = 6,55 \times S_{pix}$ (*i.e.* $S_c > S_{pix}$ et $M_p \simeq 1$), dans ce cas l'histogramme révèle bien le caractère thermique des fluctuations spatiales. Par contre lorsque l'on regroupe les pixels afin que $S_c \simeq S_{pix}$ puis $S_c < S_{pix}$, on constate que la nature de la distribution tend progressivement vers une statistique de type poissonnienne (figure 2.2.f).

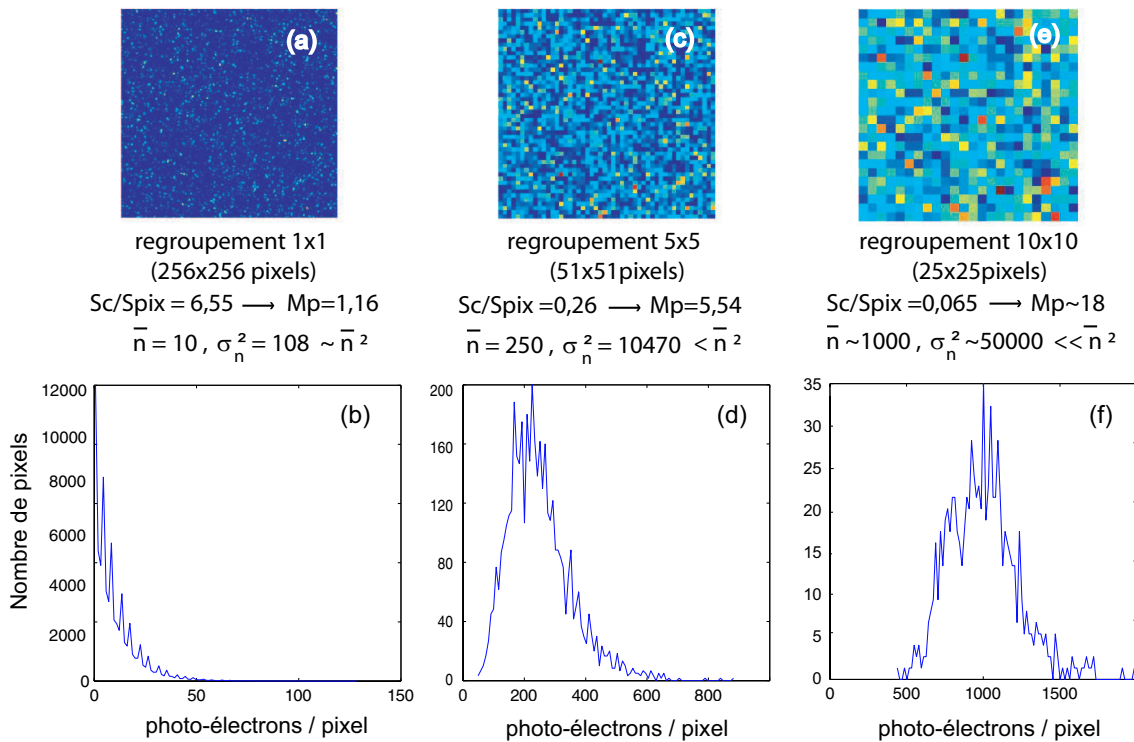


FIG. 2.2 – Etude numérique de l'influence du facteur M_p sur la distribution de photo-électrons. Les images (a), (c) et (e) représentent le même speckle pour différentes surfaces de pixel modélisées par un regroupement des pixels (respectivement 1×1), (5×5) et (10×10)). Les histogrammes de ces images sont représentés en (b), (d) et (f). L'abscisse exprime l'intensité en nombre de photo-électrons par pixel, l'ordonnée le nombre de pixels.

Pour finir, nous retiendrons que la fluorescence paramétrique est décrite par une distribution de Bose-Einstein pondérée par un facteur M qui dépend à la fois du nombre de modes temporels détectés M_t et du facteur de dégénérescence spatial M_p dépendant du rapport entre la surface de la cellule de cohérence et la surface du pixel. Suivant les valeurs de M , on passe d'une distribution de Bose-Einstein (cas où $M \simeq 1$ et $\bar{n} \gg 1$) à une distribution intermédiaire entre Poisson et Bose-Einstein.

Nous retiendrons également que la variance associée à la distribution spatiale des photo-électrons produits pour M_t modes temporels vaut :

$$(\sigma_n^{M_t})^2 = N M_t^0 \bar{n}^2 \left(\frac{1}{\bar{n}} + \frac{1}{M_p} \right) \quad (2.8)$$

Cette équation exprimée en fonction du nombre de tirs lasers cumulés N et du nombre de modes temporels contenus dans un tir laser M_t^0 est équivalente à l'équation 2.5, où \bar{n} représente cette fois le nombre moyen de photo-électrons par pixel pour un mode temporel. D'autre part, le gain d'amplification dans nos expériences étant significatif ($G > 1$) la fluorescence paramétrique constituera la principale source de bruit dans nos images et compte tenu des performances de la caméra, le bruit de lecture et le bruit lié au courant d'obscurité seront considérés comme négligeables.

2.2.2 Limite de détection d'images faibles par amplification paramétrique

Nous avons vu précédemment dans le cas des régimes à fort gain (*i.e.* $\bar{n} \gg 1$) et pour $M \simeq 1$ que les fluctuations spatiales de la fluorescence paramétrique obéissaient à une statistique de Bose-Einstein. Ainsi, l'écart type des fluctuations spatiales est égal au nombre moyen de photo-électrons par pixel ($\sigma_{SPDC} \simeq \bar{n}_{SPDC}$). Si l'on tient compte de la contribution poissonnienne (*cf* equation 2.7), l'écart type correspondant pour M_t modes temporels, est donné par la relation suivante :

$$\sigma_{SPDC}^{M_t} = \bar{n}_{SPDC} \sqrt{M_t} \sqrt{\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p}} \quad (2.9)$$

Dans le paragraphe 1.3.3, nous avons vu que le nombre de photons de fluorescence paramétrique émis par le cristal pour un mode spatio-temporel était égal à $G - 1$, où G est le gain d'amplification. En tenant compte du rapport entre la taille de la cellule de cohérence

et la taille du pixel, le nombre moyen de photo-électrons par mode temporel et par pixel pour la fluorescence paramétrique s'écrit alors :

$$\bar{n}_{SPDC} = \frac{S_{pix}}{S_c} (G - 1) \quad (2.10)$$

On considère (*cf* chapitre 1) que le gain d'amplification et le niveau moyen du signal \bar{n}_{signal}^{in} par cellule de cohérence à l'entrée du cristal sont constants dans la bande passante temporelle du système de détection ($\Delta\lambda_{FI_2}$). D'autre part, on suppose que tous les modes spatiaux du milieu amplificateur susceptibles d'être accordés en phase avec l'onde pompe sont excités par le signal. Ainsi, le nombre moyen de photo-électrons par pixel produits par le canal idler pour M_t modes temporels détectés s'écrit :

$$\bar{n}_{idler}^{M_t} = M_t \frac{S_{pix}}{S_c} (G - 1) (\bar{n}_{signal}^{in} + 1) = M_t \frac{S_{pix}}{S_c} (G - 1) \bar{n}_{signal}^{in} + M_t \bar{n}_{SPDC} \quad (2.11)$$

où :

$$\bar{n}_{image}^{M_t} = M_t \frac{S_{pix}}{S_c} (G - 1) \bar{n}_{signal}^{in} \quad (2.12)$$

est le nombre moyen de photo-électrons associés à l'information spatiale utile que l'on cherche à détecter

Pour que l'information spatiale contenue dans l'image formée par l'onde idler soit observable, on retiendra que le niveau moyen du signal utile doit être supérieur à l'écart type du bruit dû à la fluorescence paramétrique : $\bar{n}_{image}^{M_t} > \sigma_{SPDC}^{M_t}$ (*i.e.* rapport signal sur bruit $SNR > 1$).

En se référant aux équations 2.9 et 2.12, on obtient le critère suivant :

$$\bar{n}_{signal}^{in} > \frac{1}{\sqrt{M_t}} \sqrt{\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p}} = \frac{1}{\sqrt{M_t}} \sqrt{\frac{S_c}{S_{pix} (G - 1)} + \frac{1}{M_p}}. \quad (2.13)$$

Remarque : Dans le cas où la fluorescence paramétrique obéit à une statistique de Bose-Einstein, c'est à dire dans le cas des régimes à fort gain d'amplification, et lorsque la taille d'un pixel est petite devant la taille de la cellule de cohérence (*i.e.* $M_p \simeq 1$ et $\bar{n} \gg 1$), les équations 2.9 et 2.13 deviennent respectivement :

$$\sigma_{SPDC}^{M_t} = \bar{n}_{SPDC} \sqrt{M_t}, \quad (2.14)$$

$$\bar{n}_{signal}^{in} > \frac{1}{\sqrt{M_t}} \quad (2.15)$$

Ainsi, le critère 2.15 est indépendant du gain d'amplification. D'autre part, les équations 2.13 et 2.15 indiquent que plus le nombre de modes temporels détectés est grand, plus faible est le niveau des images pouvant être amplifiées et observées avec un bon rapport signal à bruit.

2.3 Etude numérique

2.3.1 Cas d'images bruitées binaires et complexes

La figure 2.3 montre le résultat d'une étude numérique de la limite de détection d'une image de faible niveau noyée dans du bruit. Cette étude est effectuée avec un bruit obéissant à une statistique de Bose-Einstein où le terme correctif $\sqrt{\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p}}$ lié au gain d'amplification et au facteur de dégénérescence spatiale est négligé.

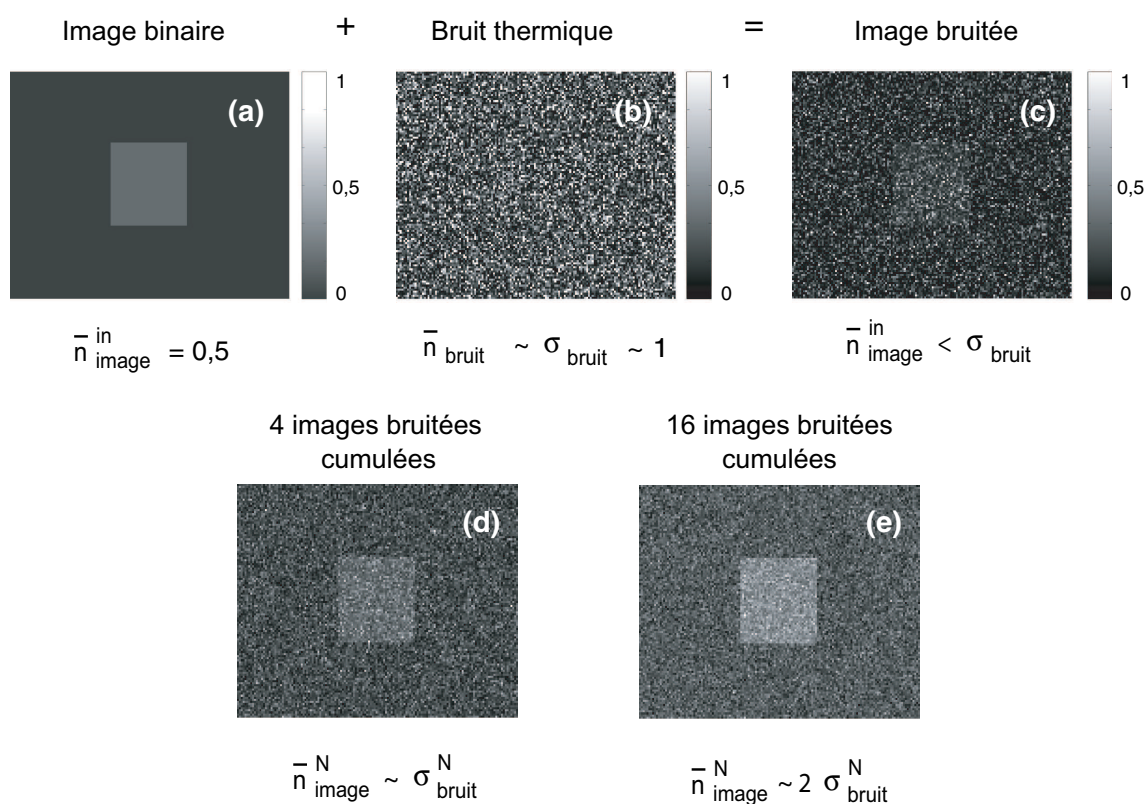


FIG. 2.3 – Etude numérique (image binaire). (a) Image binaire originale ($\bar{n}_{image}^{in} = 0,5$). (b) Bruit thermique ($\sigma_{bruit} \simeq \bar{n}_{bruit} = 1$). (c) Image binaire + bruit. (d) Cumul de quatre images bruitées ($\bar{n}_{image}^N \simeq \sigma_{bruit}^N$). (e) Cumul de seize images bruitées ($\bar{n}_{image}^N \simeq 2 \sigma_{bruit}^N$).

Dans un premier temps, nous considérons une image binaire avec un niveau moyen \bar{n}_{image}^{in} égal à 0,5 (figure 2.3.a). On ajoute à cette image un bruit thermique (speckle) ayant les caractéristiques suivantes : $\sigma_{bruit} \simeq \bar{n}_{bruit} = 1$ (figure 2.3.b). Ce bruit a les mêmes propriétés statistiques que la fluorescence paramétrique et comme le gain d'amplification G n'apparaît pas dans le critère 2.15, on considère dans cette simulation numérique uniquement le rapport

relatif entre le niveau moyen de l'image et l'écart type du bruit. Il n'est donc pas nécessaire de simuler le phénomène d'amplification. Lorsque l'on additionne ces deux images (figure 2.3.c), le niveau moyen \bar{n}_{image}^{in} du signal utile est inférieur à l'écart type du bruit. On constate qu'il est difficile de reconnaître l'image initiale. Toutefois le rapport signal à bruit peut être amélioré en cumulant N images bruitées puisque l'écart type du bruit augmente moins rapidement que le niveau moyen de l'image. Ainsi lorsque l'on atteint le critère $\bar{n}_{image}^N \simeq \sigma_{bruit}^N$, l'information spatiale de l'image initiale est reconnaissable. Plus on cumule d'images bruitées, plus le signal utile initial apparaît clairement. En effet, le niveau moyen de signal utile augmente et devient plus élevé que l'écart type du bruit à partir de quatre images bruitées cumulées.

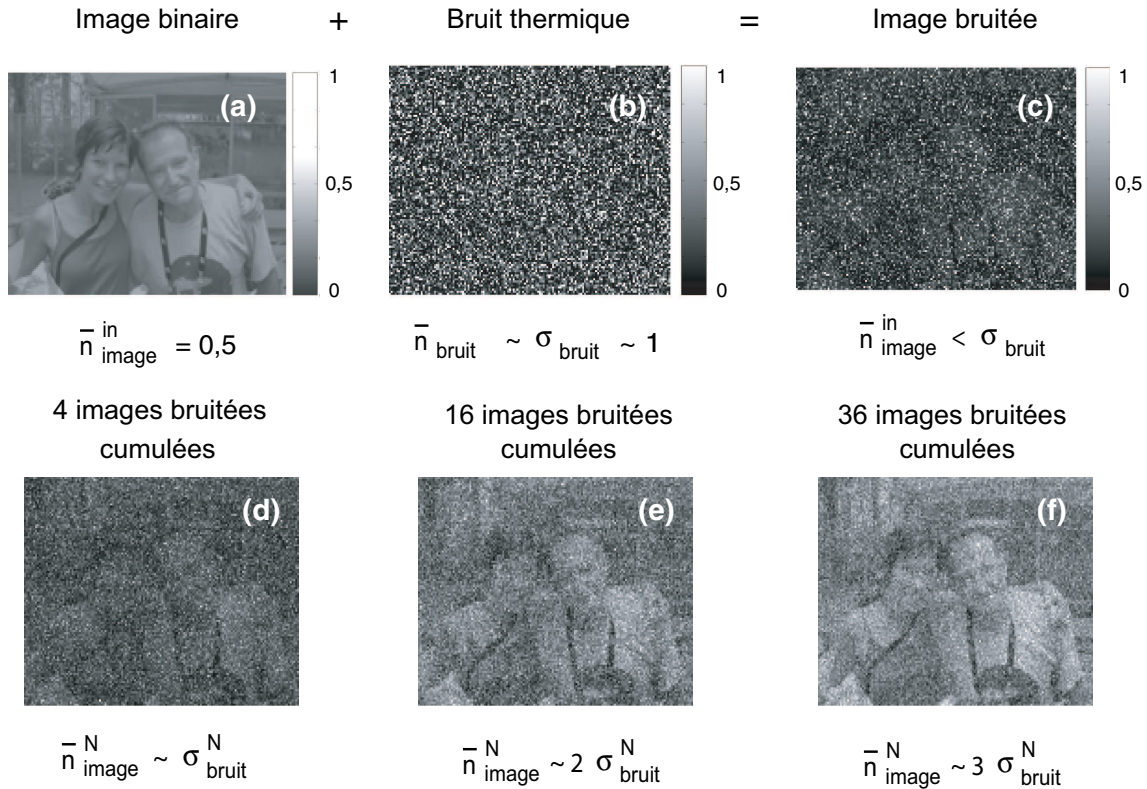


FIG. 2.4 – Étude numérique (image complexe). (a) Image complexe originale ($\bar{n}_{image}^{in} = 0,5$). (b) Bruit thermique ($\sigma_{bruit} \simeq \bar{n}_{bruit} = 1$). (c) Image complexe + bruit. (d) Cumul de quatre images bruitées ($\bar{n}_{image}^N \simeq \sigma_{bruit}^N$). (e) Cumul de seize images bruitées ($\bar{n}_{image}^N \simeq 2 \sigma_{bruit}^N$). (f) Cumul de trente six images bruitées ($\bar{n}_{image}^N \simeq 3 \sigma_{bruit}^N$).

Pour l'application à l'imagerie de temps de vie de fluorescence, les images observées sont

plus complexes (cellules, tissus, etc...) et le critère évoqué précédemment ne suffit plus pour une reconnaissance aisée du signal utile.

La simulation numérique représentée sur la figure 2.4 concerne une image initiale complexe ayant le même niveau moyen que l'image binaire précédente ($\bar{n}_{image}^{in} = 0,5$). En ajoutant à cette image le bruit thermique (figure 2.4.b), on remarque que l'on ne peut pas retrouver l'information spatiale relative à l'image d'origine même si l'on satisfait le précédent critère $\bar{n}_{image}^N \simeq \sigma_{bruit}^N$ (figure 2.4.d). On retiendra que pour des images complexes le niveau moyen de l'image originale doit être au moins trois fois supérieur à l'écart type du bruit : $\bar{n}_{image}^N \simeq 3 \sigma_{bruit}^N$ (figure 2.4.f).

2.3.2 Statistiques sur les images bruitées

L'étude numérique des mesures statistiques faites sur ces images permettent de constater que l'écart type du bruit croît proportionnellement à la racine du nombre d'images cumulées et que la moyenne du signal utile est supérieure à l'écart type du bruit pour un nombre N_0 d'images cumulées tel que $N_0 \simeq \frac{1}{(\bar{n}_{image}^{in})^2}$.

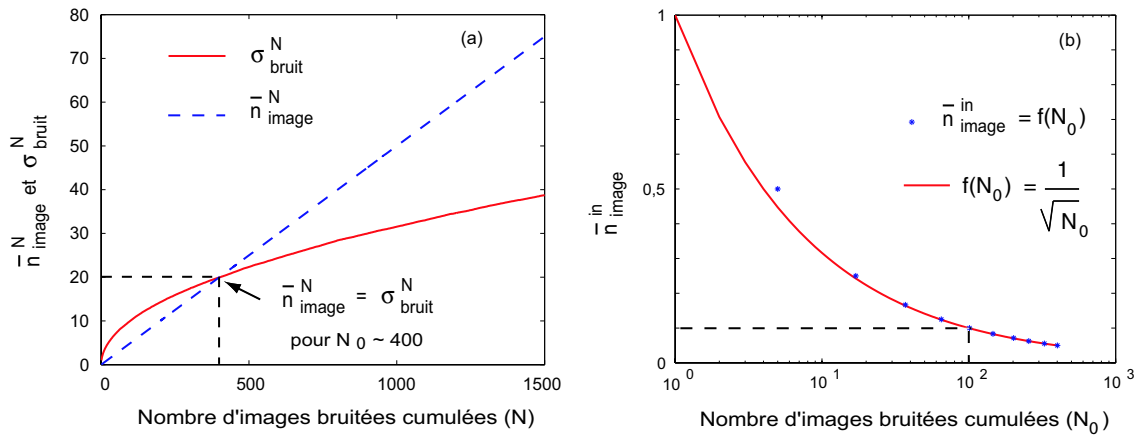


FIG. 2.5 – (a) Variation du niveau moyen dans les images et de l'écart type du bruit en fonction du nombre d'images cumulées. (b) Niveau moyen de l'image initiale en fonction du nombre de cumuls nécessaires pour satisfaire le critère $\bar{n}_{image}^{in} = \frac{1}{\sqrt{N_0}}$.

Dans l'exemple représenté par la figure 2.5.a où $\bar{n}_{image}^{in} = 0,05$, il est nécessaire de cumuler 400 images pour vérifier le critère 2.15. Dans la même perspective, la figure 2.5.b représente

le niveau moyen minimal de l'image en fonction du nombre d'images cumulées pour lequel le critère 2.15 est vérifié. Les mesures statistiques sont alors correctement décrites par la loi en $\frac{1}{\sqrt{N_0}}$. Ainsi, pour un niveau moyen de 0,1 dans l'image, il faut cumuler 100 images.

2.4 Résultats expérimentaux

Le montage utilisé pour l'amplification paramétrique d'images de faibles niveaux (figure 2.6) est décrit en détail dans le premier chapitre. Dans les expériences suivantes, nous détectons les images soit en champ lointain soit en champ proche en positionnant respectivement la caméra soit dans le plan de Fourier soit dans le plan image de la lentille L_3 . D'autre part deux sources laser ont été utilisées, un laser Nd :YAG et un laser Nd :verre (Twinkle, Light Conversion, Ltd[®]), avec pour principale différence la durée des impulsions pompes délivrées (20 ps pour le Nd :YAG et 800 fs pour le Nd :verre). La principale conséquence de cette différence de durée des impulsions réside dans le nombre de modes temporels détectés pour un tir laser pour une même largeur du filtre interférentiel FI_2 . Plus l'impulsion est courte, plus le nombre de modes temporels détectés est petit.

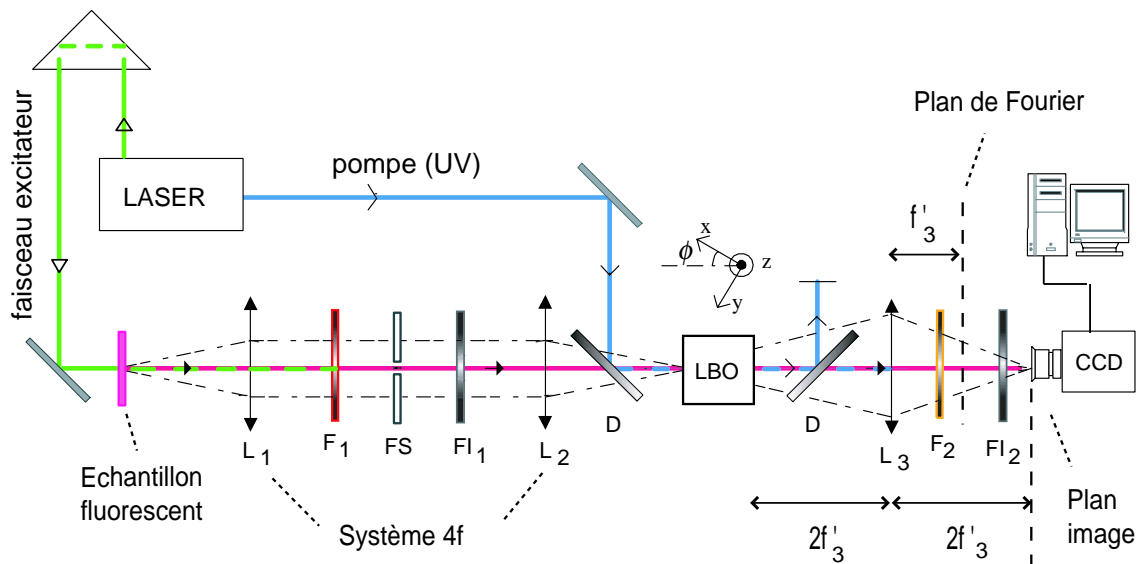


FIG. 2.6 – Montage expérimental général (cf chapitre 1). $L_{1,2,3}$: lentilles convergentes, FS : filtre spatial, $F_{1,2}$: filtres colorés qui absorbent respectivement le vert et l'UV, $FI_{1,2}$: filtres interférentiels, D : miroirs dichroïques.

2.4.1 Caractéristiques des lasers

Les caractéristiques expérimentales sont énumérées dans le tableau 2.1 pour les deux sources lasers. Nous avons défini au chapitre 1 (§ 1.3.2) le nombre de modes temporels détectés dans un tir par :

$$M_t^0 = \frac{c \Delta\lambda_{FI_2} \delta t_{SPDC}}{\lambda_{FI}^2} \quad (2.16)$$

Rappelons que $\Delta\lambda_{FI_2}$ correspond à la largeur du filtre interférentiel placé devant la caméra et que δt_{SPDC} correspond à la durée de l'impulsion de fluorescence paramétrique (*cf* tableau 2.1). Nous estimons que la durée de la fluorescence pour le laser ND :verre est d'environ 400 *fs*.

Lasers	Nd :YAG (Quantel®) - 10 Hz	Nd :verre (Twinkle®) - 33 Hz
Faisceau pompe	$\lambda_p = 355 \text{ nm}, \delta t_p = 20 \text{ ps}$	$\lambda_p = 351 \text{ nm}, \delta t_p = 0,8 \text{ ps}$
Faisceau excitateur	$\lambda_{vert} = 532 \text{ nm}, \delta t_{vert} = 38 \text{ ps}$	$\lambda_{vert} = 527 \text{ nm}, \delta t_{vert} = 1,04 \text{ ps}$
Signal (FI_1)	$\lambda_{FI_1} = 720 \text{ nm}, \Delta\lambda_{FI_1} = 5 \text{ nm}$	$\lambda_{FI_1} = 720 \text{ nm}, \Delta\lambda_{FI_1} = 5 \text{ nm}$
Idler (FI_2)	$\lambda_{FI_2} = 700 \text{ nm}, \Delta\lambda_{FI_2} = 3,6 \text{ nm}$	$\lambda_{FI_2} = 687 \text{ nm}, \Delta\lambda_{FI_2} = 4 \text{ nm}$
Cristal LBO	Type 1 (<i>xOy</i>); $5 \times 5 \times 10 \text{ mm}^3$	Type 1 (<i>xOy</i>); $7 \times 7 \times 4 \text{ mm}^3$
Système 4f (L_1L_2)	$f'_1 = f'_2 = 100 \text{ mm}$	$f'_1 = f'_2 = 100 \text{ mm}$
Lentille L_3	$f'_3 = 80 \text{ mm}$	$f'_3 = 150 \text{ mm}$
M_t^0	$22 \pm 4 \text{ modes / tir}$	$1,0 \pm 0,4 \text{ mode / tir}^2$

TAB. 2.1 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des montages expérimentaux suivant le type de laser utilisé.

² Dans le cas où l'équation 2.16 donne $M_t^0 < 1$ cela signifie que la bande passante du filtre interférentiel est plus étroite que la largeur du mode temporel. D'un point de vue statistique, il faudra alors considérer que $M_t^0 = 1$ car le fait de "tailler" dans un mode temporel ne modifie en rien les propriétés statistiques des fluctuations spatiales.

2.4.2 Estimation "théorique" du facteur de dégénérescence spatial

$$M_p$$

Le facteur de dégénérescence spatiale M_p donné par la relation 2.6 (§ 2.2.1) dépend à la fois de la surface du pixel (S_{pix}) et de la surface d'une cellule de cohérence (S_c). Lorsque le cristal est imagé sur la caméra CCD (*i.e.* observation en champ proche notée *cp*), la taille de la cellule de cohérence (*i.e.* cellule de résolution) dépend de la longueur d'onde λ_{FI_2} et de la largeur de la bande passante de l'amplificateur qui est définie par [8, 9] :

$$2\Delta\phi_s = 2\Delta\theta_s = \frac{D_{pix} \times d_{pix}}{f'_3} \quad (2.17)$$

avec D_{pix} , le diamètre en pixels du spectre des fréquences spatiales observé et d_{pix} , la dimension d'un pixel.

En terme de fréquences spatiales (μ_s, ν_s) , la résolution correspondante dans le cristal est :

$$\mu_s \simeq \nu_s \simeq \frac{\Delta\theta_s}{\lambda_{FI_2}} \quad (2.18)$$

Soit pour un cristal de dimension transverse d_{LBO} , un nombre de points résolus dans une image amplifiée de $(d_{LBO}\mu_s) \times (d_{LBO}\nu_s)$ et une taille de la cellule de cohérence S_c^{cp} , telle que :

$$S_c^{cp} = \frac{1}{\mu_s} \times \frac{1}{\nu_s} \simeq \frac{1}{\nu_s^2} \quad (2.19)$$

Le cristal étant imagé avec un grandissement de γ sur la caméra, on en déduit le rapport S_c/S_{pix} en champ proche :

$$\left(\frac{S_c}{S_{pix}}\right)^{cp} \simeq \left(\frac{\gamma}{\nu_s \times d_{pix}}\right)^2 \quad (2.20)$$

Lorsque l'on place la caméra CCD dans le plan de focal de la lentille L_3 (champ lointain noté *cl*) et que l'on observe le spectre des fréquences spatiales de l'image, la taille de la cellule de cohérence est inversement proportionnelle à la section transverse du faisceau de fluorescence paramétrique [10, 11]. Dans notre cas, le cristal est illuminé uniformément sur toute sa section par l'onde pompe, en conséquence la taille de la cellule de cohérence est donnée par :

$$S_c^{cl} = \left(\frac{\lambda_{FI_2} \times f'_3}{d_{LBO}}\right)^2 \quad (2.21)$$

Soit un rapport S_c/S_{pix} en champ lointain égal à :

$$\left(\frac{S_c}{S_{pix}}\right)^{cl} = \left(\frac{\lambda_{FI_2} \times f'_3}{d_{LBO} \times d_{pix}}\right)^2 \quad (2.22)$$

2.4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les résultats obtenus en 2.20 et 2.22 permettent alors de déterminer les facteurs "théoriques" de dégénérescence spatial en champ proche et en champ lointain noté respectivement $M_{p\ th}^{cp}$ et $M_{p\ th}^{cl}$ (d'après l'équation 2.6).

En fonction des caractéristiques des montages expérimentaux avec les lasers Nd :YAG et Nd :verre en champ proche et en champ lointain et sachant que $S_{pix} = 24 \times 24 \mu m^2$, on obtient les résultats suivant (tableau 2.2) :

Lasers	Nd :YAG	Nd :verre
$\Delta\theta_s$	$12\ mrad$	$16\ mrad$
ν_s	$17\ mm^{-1}$	$23\ mm^{-1}$
N_c	85×85	161×161
S_c^{cp}	$58 \times 58\ \mu m^2$	$43 \times 43\ \mu m^2$
$(S_c/S_{pix})^{cp}$	$8,51\ (\gamma = 1,2)$	$4,42\ (\gamma = 1,16)$
$M_{p\ th}^{cp}$	1,12	1,3
S_c^{cl}	$11 \times 11\ \mu m^2$	$15 \times 15\ \mu m^2$
$(S_c/S_{pix})^{cl}$	$0,22$	$0,38$
$M_{p\ th}^{cl}$	6,54	4,07

TAB. 2.2 – Tableau récapitulatif des tailles de cellules de cohérence et des facteurs de dégénérescence spatial en champ proche et champ lointain suivant le type de laser utilisé. Avec N_c , le nombre de cellules de résolution dans le cristal.

2.4.3 Fluctuations spatiales de la fluorescence paramétrique

L'étude expérimentale concernant la statistique des fluctuations spatiales de la fluorescence paramétrique consiste à vérifier que $\sigma_{SPDC}^{M_t}$ varie comme la racine carrée du nombre de tirs lasers cumulés N . En effet, d'après l'équation 2.8, l'écart type s'écrit :

$$\sigma_{SPDC}^{M_t} = \sqrt{N M_t^0 (\bar{n}_{SPDC})^2 \left(\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p} \right)} = \sqrt{\alpha N} \quad (2.23)$$

Dans un premier temps, nous allons déterminer les valeurs expérimentales de \bar{n}_{SPDC} et de M_p à partir des mesures statistiques de $\sigma_{SPDC}^{M_t}$ et de $\bar{n}_{SPDC}^{M_t}$ pour les quatre schémas expérimentaux suivant (figure 2.7) :

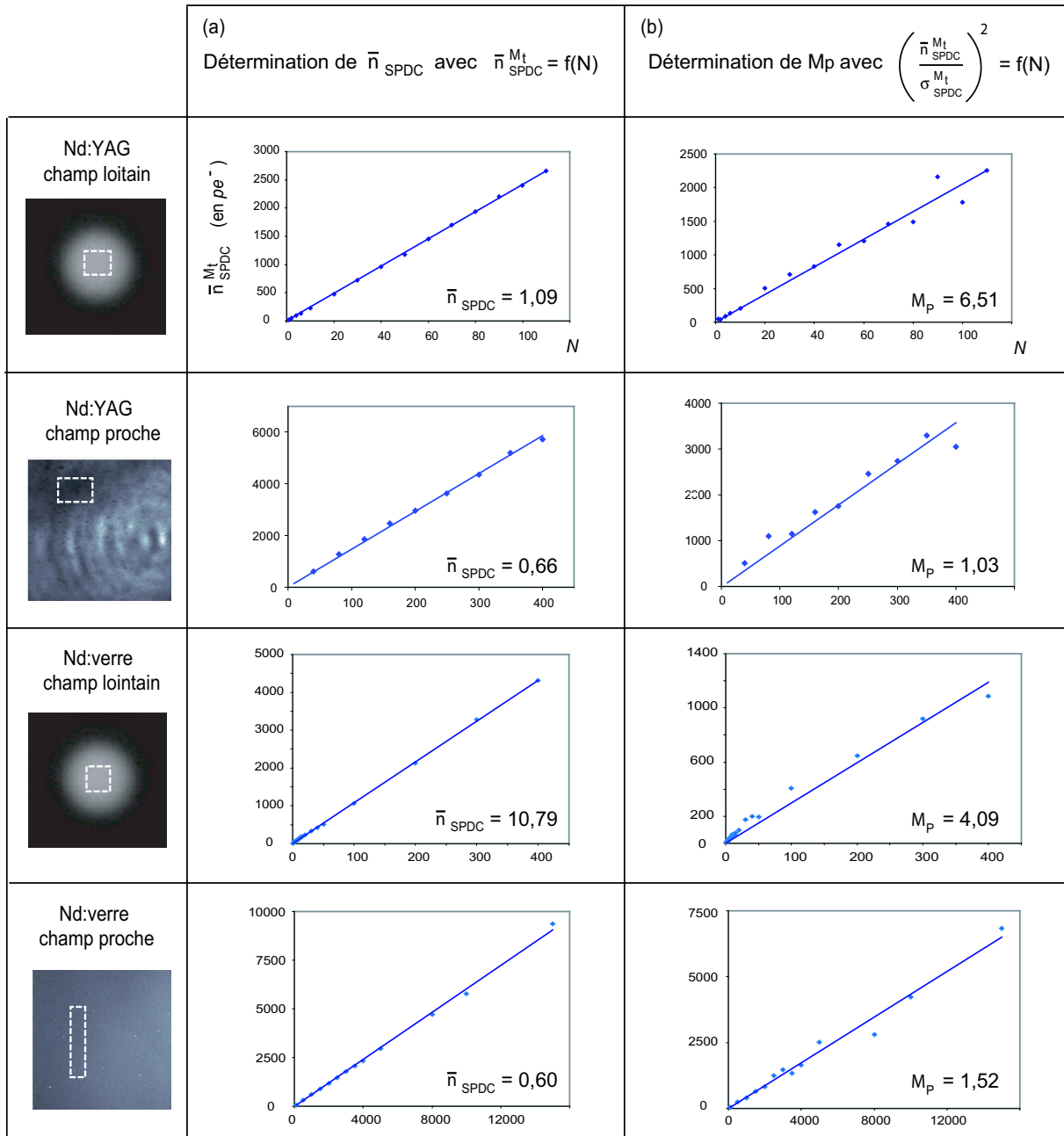


FIG. 2.7 – Détermination de \bar{n}_{SPDC} et de M_p à partir des mesures statistiques ($\sigma_{SPDC}^{M_t}$, $\bar{n}_{SPDC}^{M_t}$) effectuées dans les zones en pointillés blanc qui sont représentées sur les images de fluorescence paramétrique. Les droites de régression sont de type $y = ax$ (i.e. passant par $(0,0)$).

- détection en champ lointain avec le laser Nd :YAG,
- détection en champ proche avec le laser Nd :YAG,
- détection en champ lointain avec le laser Nd :verre,

– détection en champ proche avec le laser Nd :verre.

Ensuite, grâce aux résultats obtenus pour chaque expérience, nous déduisons les valeurs correspondantes du coefficient α défini dans l'équation 2.23 tel que :

$$\alpha = M_t^0 \times (\bar{n}_{SPDC})^2 \times \left(\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p} \right) \quad (2.24)$$

Enfin, sur un graphique représentant les variations de $\sigma_{SPDC}^{M_t}$ en fonction du nombre de tirs, nous vérifierons la relation 2.23 pour les quatres cas expérimentaux étudiés.

Le nombre moyen de photo-électrons de fluorescence paramétrique pour un mode temporel (\bar{n}_{SPDC}) est obtenu par régression linéaire sur ³ :

$$\bar{n}_{SPDC}^{M_t} = N \times M_t^0 \times \bar{n}_{SPDC} \quad (2.25)$$

Les courbes correspondant à chaque cas sont représentées sur la figure 2.7 colonne a.

Pour déterminer le facteur de dégénérescence spatial M_p , nous effectuons une régression linéaire sur $(\bar{n}_{SPDC}^{M_t}/\sigma_{SPDC}^{M_t})^2$ (figure 2.7, colonne b). D'après l'équation 2.8 :

$$\left(\frac{\bar{n}_{SPDC}^{M_t}}{\sigma_{SPDC}^{M_t}} \right)^2 = \frac{M_t^0}{\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p}} \times N \quad (2.26)$$

M_p est alors estimé en fonction de la valeur \bar{n}_{SPDC} calculé précédemment.

Les valeurs correspondantes de α calculées grâce à l'équation 2.24 sont reportées dans le tableau 2.3.

	\bar{n}_{SPDC}	G en dB	M_p	M_t^0	α	$M_p \text{ th}$
Nd :YAG - cl	1,09	0,9	6,51	22	28	6,54
Nd :YAG - cp	0,66	7,5	1,03	22	24	1,12
Nd :verre - cl	10,79	6,9	4,09	1	39	4,07
Nd :verre - cp	0,6	5,6	1,52	1	0,8	1,30

TAB. 2.3 – Tableau des valeurs de \bar{n}_{SPDC} et M_p calculées par régression linéaire (cf figure 2.7) et estimation du facteur α (G est calculé d'après l'équation 2.10). La dernière colonne du tableau rappelle les résultats obtenus au § 2.4.2.

³ Avec M_t^0 donné dans le tableau 2.1.

Remarque : Dans le cas des mesures statistiques faites pour le laser Nd :YAG en champ proche, l'image de la fluorescence paramétrique dans la section transverse du cristal présente de fortes inhomogénéités en intensité liées à la mauvaise qualité spatiale du faisceau pompe. Ces inhomogénéités conduisent à un excès de variance dans les mesures statistiques qui est lié au bruit déterministe apporté par le faisceau pompe, d'où une mauvaise estimation du facteur de dégénérescence spatiale M_p . C'est pourquoi il faut soigneusement choisir une zone de mesures la plus homogène possible.

La figure 2.8 montre les variations de $\sigma_{SPDC}^{M_t}$ en fonction du nombre de tirs lasers cumulés en champ lointain (a,c) et en champ proche (b,d) pour les deux types de lasers utilisés.

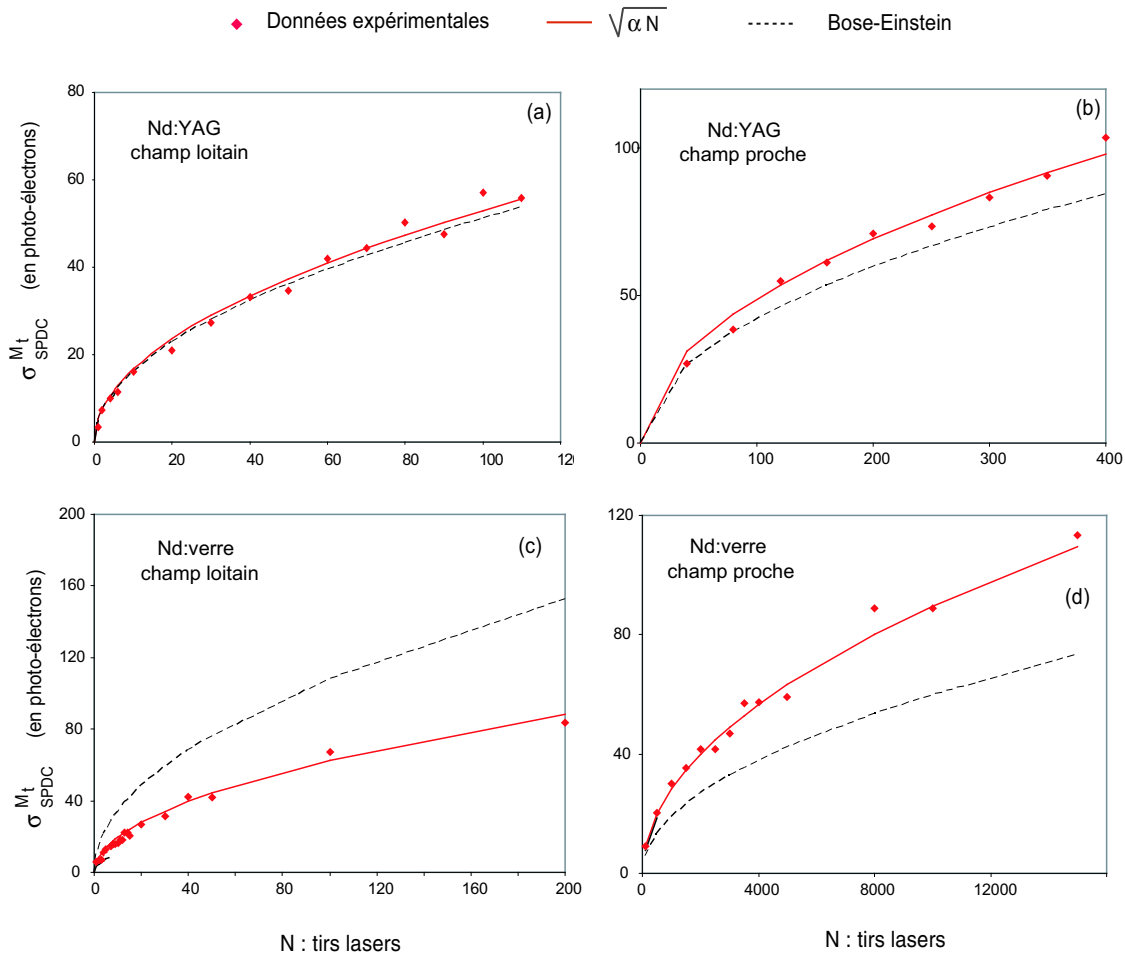


FIG. 2.8 – Variation de $\sigma_{SPDC}^{M_t}$ en fonction du nombre N de tirs lasers cumulés en champ lointain (a,c) et en champ proche (b,d) respectivement avec le Nd :YAG et le Nd :verre. La courbe en trait plein représente la courbe $y = f(\sqrt{\alpha N})$, la courbe en pointillés représente le cas d'une distribution de Bose-Einstein.

Dans chaque cas, les données expérimentales suivent la courbe représentée en trait plein qui correspond à $y = f(\sqrt{\alpha N})$. On vérifie ainsi que la fluorescence paramétrique obéit à une statistique thermique pondérée par un coefficient α qui dépend de M_p , de M_t et du gain d'amplification G . La courbe en pointillés représente le cas équivalent à une statistique de Bose-Einstein (*cf* équation 2.14).

2.4.4 Critère de reconnaissance du signal utile dans les images amplifiées

L'étude suivante consiste à vérifier expérimentalement la relation 2.13 établie dans le paragraphe 2.2.2, à savoir : $\bar{n}_{image}^{M_t} > \sigma_{SPDC}^{M_t} \Leftrightarrow \bar{n}_{signal}^{in} > \frac{1}{\sqrt{M_t}} \sqrt{\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p}}$. Lors de l'étude numérique effectuée dans le cas d'une distribution de Bose-Einstein (§ 3.3), nous n'avons pas tenu compte du facteur correctif lié au bruit poissonien. Cependant, nous avons vu précédemment que la distribution d'intensité de la fluorescence paramétrique pouvait être pondérée de manière non négligeable (figure 2.8). Nous allons donc caractériser l'évolution de ce critère en fonction du nombre de modes temporels détectés : M_t , du facteur de dégénérescence spatial : M_p et du nombre moyen de photo-électrons de fluorescence paramétrique par pixel et par mode temporel \bar{n}_{SPDC} .

L'étude statistique des variations du nombre moyen de photo-électrons de l'idler et de l'écart type de la fluorescence paramétrique en fonction du nombre de modes temporels (*i.e.* en fonction du nombre de tirs lasers cumulés) est effectuée de la manière suivante. Un faible signal de fluorescence avec \bar{n}_{signal}^{in} photons par mode, illumine le cristal de LBO et est amplifié grâce à l'onde pompe (figure 2.6). Rappelons que ce nombre de photons signal est mesuré suivant le protocole exprimé dans le chapitre 1 (§ 1.3.3) en utilisant la relation suivante [12] :

$$\bar{n}_{signal}^{in} = \frac{\bar{n}_{idler}^{M_t} - \bar{n}_{SPDC}^{M_t}}{\bar{n}_{SPDC}^{M_t}} \quad (2.27)$$

Les images de l'onde idler sont enregistrées sur la caméra CCD pour chacun des quatre schémas expérimentaux cités précédemment. Pour les images détectées en champ proche, une mire de résolution représentant deux traits est placée juste derrière la cuve contenant le fluorophore puis imagée sur la face avant du cristal. Notons que dans ce cas, le filtre spatial (*FS*) doit être ouvert au maximum pour que le spectre des fréquences spatiales du signal

recouvre totalement celui de la fluorescence paramétrique. Pour une observation en champ lointain, le cristal est uniformément illuminé par le signal de fluorescence issu du colorant et le filtre spatial est ajusté à une ouverture plus petite que la bande passante de la fonction de transfert d'amplification afin de délimiter une zone d'information spatiale relative au signal. La figure 2.9 représente les variations de $\bar{n}_{image}^{M_t}$ et de $\sigma_{SPDC}^{M_t}$ en fonction du nombre N de tirs lasers cumulés.

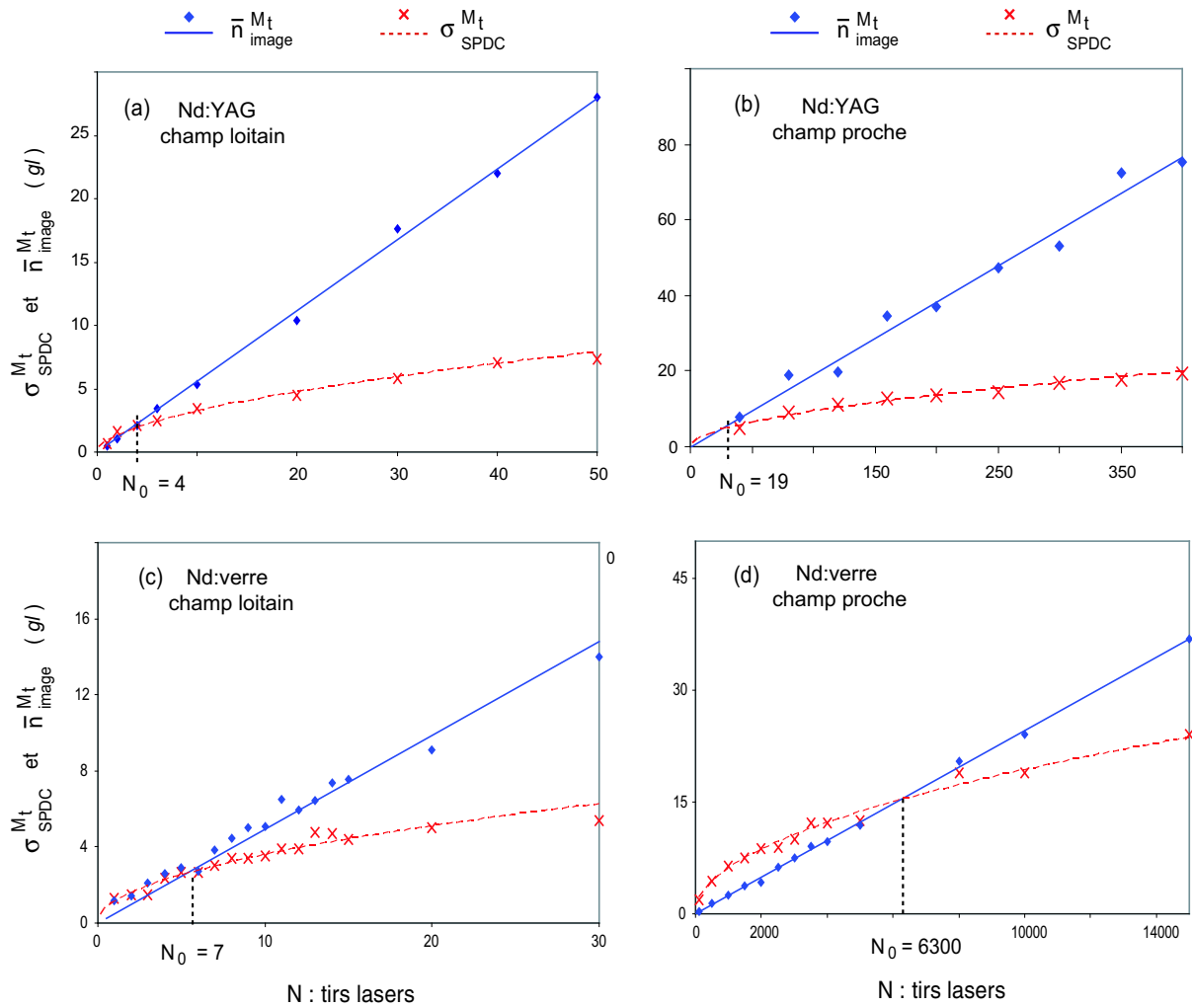


FIG. 2.9 – Variation de $\bar{n}_{image}^{M_t}$ et de $\sigma_{SPDC}^{M_t}$ en fonction du nombre N de tirs lasers cumulés en champ lointain (a,c) et en champ proche (b,d) respectivement avec le Nd :YAG et le Nd :verre.

Le point d'intersection des courbes d'abscisse N_0 correspond à l'égalité suivante $\bar{n}_{image}^{M_t} =$

2.4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

$\sigma_{SPDC}^{M_t}$, ce qui implique pour le critère 2.13 :

$$\bar{n}_{signal}^{in} = \frac{1}{\sqrt{N_0} M_t^0} \sqrt{\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p}} \quad (2.28)$$

Ainsi, en reprenant les valeurs expérimentales de M_p et \bar{n}_{SPDC} calculées précédemment (*cf* tableau 2.3), nous pouvons remonter au nombre moyen de photon signal incident. Les résultats obtenus d'après les équations 2.27 et 2.28 sont récapitulés dans le tableau suivant :

	$\bar{n}_{signal}^{in} = \frac{\bar{n}_{idler}^{M_t} - \bar{n}_{SPDC}^{M_t}}{\bar{n}_{SPDC}^{M_t}}$	$\bar{n}_{signal}^{in} = \frac{1}{\sqrt{N_0} M_t^0} \sqrt{\frac{1}{\bar{n}_{SPDC}} + \frac{1}{M_p}}$
Nd :YAG - champ lointain	$0,11 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,03$
Nd :YAG - champ proche	$0,051 \pm 0,004$	$0,07 \pm 0,02$
Nd :verre - champ lointain	$0,18 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,09$
Nd :verre - champ proche	$0,019 \pm 0,005$	$0,019 \pm 0,008$

TAB. 2.4 – Détermination de \bar{n}_{signal}^{in} par deux méthodes différentes.

On remarque que pour chaque cas expérimental, le nombre moyen de photons signal calculé suivant deux méthodes différentes est le même. Ceci confirme ainsi l'estimation des paramètres M_p , M_t et \bar{n}_{SPDC} faites au § 2.4.1.

La figure 2.10 représente, dans le cas d'amplification paramétrique avec les deux types de laser, les images détectées en champ lointain correspondant à $\bar{n}_{image}^{M_t} < \sigma_{SPDC}^{M_t}$, $\bar{n}_{image}^{M_t} \simeq \sigma_{SPDC}^{M_t}$, $\bar{n}_{image}^{M_t} \simeq 2\sigma_{SPDC}^{M_t}$ et $\bar{n}_{image}^{M_t} \simeq 3\sigma_{SPDC}^{M_t}$.

Comme le bruit de fond est homogène dans les images, il est possible de retrouver l'information spatiale relative au signal (voir le diaphragme au centre de l'image) sans soustraire l'image de fluorescence paramétrique. En effet, l'image du diaphragme (FS) devient visible lorsque le niveau moyen $\bar{n}_{image}^{M_t}$ devient supérieur à l'écart type du bruit ($\sigma_{SPDC}^{M_t}$), c'est à dire au delà de quatre impulsions lasers cumulées pour le laser Nd :YAG ou sept pour le laser Nd :verre.

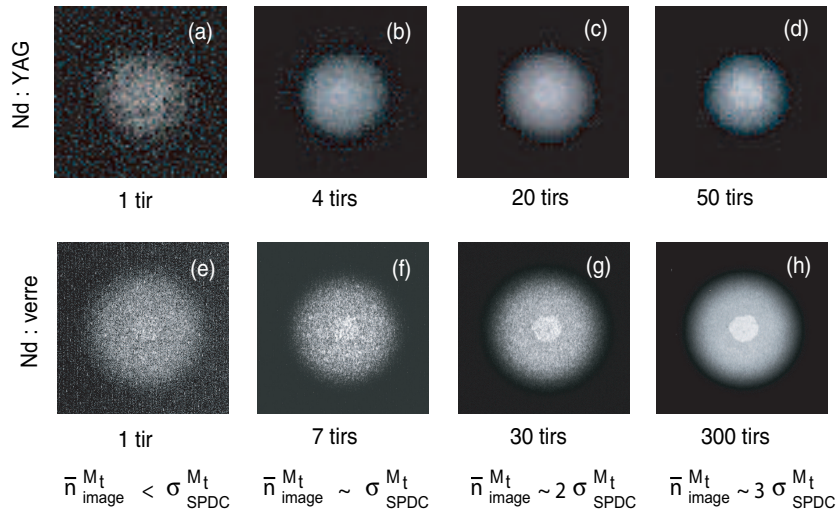


FIG. 2.10 – Images de l'onde idler détectées en champ lointain avec le laser Nd :YAG (a-d) et avec le laser Nd :verre (e-h). A partir de 4 tirs (Nd :YAG) et 7 tirs (Nd :verre) cumulés, le niveau moyen du signal utile devient supérieur à l'écart type du bruit dans l' image.

La détection en champ proche est représentée sur la figure 2.11. Pour chaque laser, les images illustrent les trois cas suivants $\bar{n}_{image}^{M_t} < \sigma_{SPDC}^{M_t}$, $\bar{n}_{image}^{M_t} \simeq \sigma_{SPDC}^{M_t}$ et $\bar{n}_{image}^{M_t} > \sigma_{SPDC}^{M_t}$.

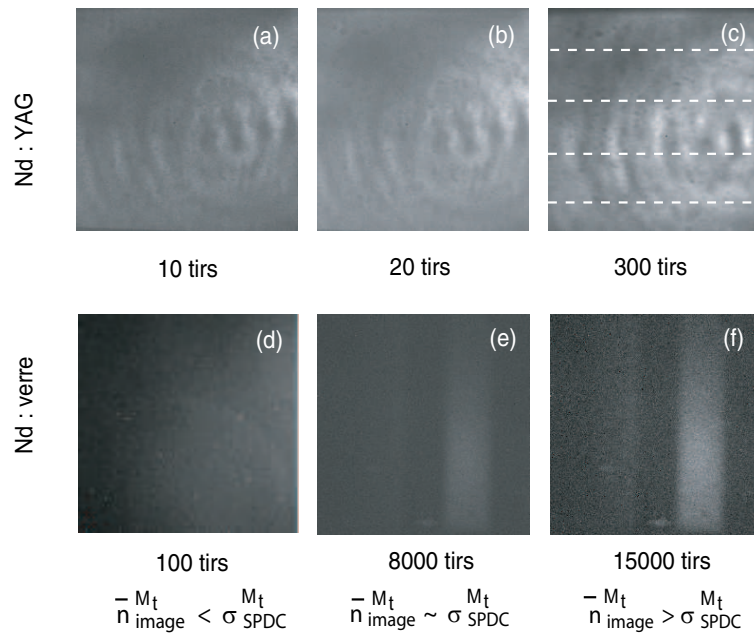


FIG. 2.11 – Images de l'onde idler et de la fluorescence paramétrique détectées en champ proche avec le laser Nd :YAG (a-c) et avec le laser Nd :verre (d-f).

L'information relative au signal n'apparaît pas sur les images détectées lors de l'expérience avec le laser Nd :YAG en raison des fortes fluctuations du bruit liées comme nous l'avons vu précédemment au faisceau pompe, même lorsque l'on satisfait le critère $\bar{n}_{image}^{M_t} > \sigma_{SPDC}^{M_t}$ (figure 2.11.c). Toutefois comme nous l'avons vu (*cf* figure 1.12, chapitre 1) la soustraction du bruit permet de retrouver l'image de la mire avec un bon rapport signal à bruit. Alors que dans le cas de l'amplification avec le laser Nd :verre, où le profil du faisceau pompe est beaucoup plus homogène, l'image des traits de la mire devient visible dès que $\bar{n}_{image}^{M_t} > \sigma_{SPDC}^{M_t}$.

2.5 Conclusion

Cette étude expérimentale réalisée avec deux lasers différents montre que la limite de l'amplification et de la détection d'images de très faible niveau issue de source incohérente dépend du nombre total de modes temporels cumulés lors de l'acquisition des images. En effet, plus le niveau de l'image est faible, plus le nombre de modes temporels cumulés doit être élevé de manière à retrouver l'information spatiale relative au signal d'entrée. La détection d'images de faible niveau est alors limitée par le niveau de bruit lié à la fluorescence paramétrique dans les images amplifiées. Nous avons vu que ce bruit obéissait à une statistique de Bose-Einstein pondérée par un facteur M qui dépend à la fois du nombre de modes temporels détectés M_t , du facteur de dégénérescence spatial M_p et du gain d'amplification G .

Dans le cas où le bruit lié à la fluorescence paramétrique est homogène (*i.e.* sans bruit déterministe supplémentaire), le critère de reconnaissance des images est vérifié. Ainsi, on montre que le seuil d'amplification et de détection des images est inversement proportionnel à la racine carrée du nombre de modes temporels.

Cette étude a fait l'objet d'une publication jointe en annexes [13].

Bibliographie

- [1] C. Cohen-Tannoudji, J. Dupont-Roc et G. Grynberg, *Processus d'interaction entre photons et atomes*, EDP Sciences/Edition du CNRS, Paris (2001).
- [2] L. Mandel et E. Wolf, *Optical coherence and quantum optics*, Cambridge University Press, New York (1995).
- [3] J. W. Goodman, *Statistical Optics*, Wiley Classics Library, New York (2000).
- [4] A. Mosset, *Etude expérimentale des fluctuations spatiales d'origine quantique en amplification paramétrique d'images*, Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté (2004).
- [5] S. P. Kravis et L. Allen, "Measurement of the statistics and spatial distribution of pulsed amplified spontaneous emission", *Opt. Commun.*, **23**, pp. 289 (1977).
- [6] A. Mosset, F. Devaux, G. Fanjoux et E. Lantz, "Direct experimental characterization of the Bose-Einstein distribution of spatial fluctuations of spontaneous parametric down-conversion", *Eur. Phys. J. D*, **28**, pp. 447 (2004).
- [7] J. W. Goodman, *Laser speckle and related phenomena*, Springer-Verlag, Heidelberg, Allemagne (1984).
- [8] F. Devaux, *Amplification paramétrique d'images*, Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté (1996).
- [9] F. Devaux et E. Lantz, "Transfert function of spatial frequencies in parametric image amplification : experimental analysis and application to picosecond spatial filtering", *Opt. Comm.*, **114**, pp. 295 (1995).
- [10] F. Devaux et E. Lantz, "Spatial and temporal properties of parametric fluorescence around degeneracy in a type 1 LBO crystal", *Eur. Phys. J. D*, **8**, pp. 117 (2000).
- [11] A. Berzanskis, W. Chinaglia, L. A. Lugiato, K.-H. Feller et P. D. Trapani, "Spatial structures in optical parametric amplification." *Phys. Rev. A*, **60**, pp. 1626 (1999).
- [12] A. Migdall, R. Datla, A. Sergienko, J. S. Orszak et Y. Shih, "Measuring absolute infrared spectral radiance with correlated visible photons : technique verification and measurement uncertainty", *App. Opt.*, **37**, pp. 3455 (1998).
- [13] S. Brustlein, F. Devaux et E. Lantz, "Limits of amplification of weak images", *J. of Modern Optics*, p. à paraître (2005).

DEUXIÈME PARTIE

Application à l'imagerie de temps de
vie de fluorescence

Imagerie de temps de vie de fluorescence - Etat de l'art

3.1 Introduction

L'imagerie optique dans le visible et le proche infrarouge est considérée comme une alternative aux techniques de diagnostic médical traditionnelles. Cependant, elle est limitée par le fait que la lumière est fortement diffusée par les tissus étudiés. L'utilisation de marqueurs fluorescents permet toutefois de distinguer différents types de tissus. En effet, ces fluorophores peuvent être fixés sur un type de tissu ou sur des cellules spécifiques (tissu cancéreux, protéines, *etc...*) et être discernés grâce à leur rendement quantique¹ ou par leur longueur d'onde d'émission [1–4]. Cette caractérisation nécessite donc une mesure précise des intensités émises et absorbées, difficilement réalisable pour les milieux diffusants épais [5–7].

Une autre approche consiste à étudier le temps de vie de fluorescence, ou temps de déclin [8, 9]. Après excitation avec une source pulsée, l'intensité des signaux de fluorescence subit une décroissance simple ou multi-exponentielle caractérisée par le temps de vie spécifique du fluorophore considéré et de son environnement. Ce temps de vie, défini comme le temps moyen pendant lequel le fluorophore reste à l'état excité avant de revenir à son état fondamental, peut alors être déterminé en mesurant les intensités relatives émises à différents instants. L'imagerie de temps de vie de fluorescence fournit une information spatiale en deux ou trois dimensions qui permet, par exemple, de détecter pixel par pixel la présence de cellules particulières et de déterminer leur environnement chimique, biologique, physique

¹ Rapport entre l'intensité émise et l'intensité absorbée.

ou structural. Ces dernières années, plusieurs techniques de mesures et d'imagerie ont été développées.

Dans ce chapitre, nous relaterons de manière non exhaustive différentes méthodes relatives à l'imagerie des durées de vie de fluorescence ainsi que les principaux domaines d'application de ces techniques.

3.2 Pourquoi l'imagerie de temps de vie ?

L'apparition des microscopes confocaux [10] et biphotoniques [11] dans les années 1990 a considérablement amélioré la qualité des images en microscopie de fluorescence. Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, de nombreuses techniques exploitent les caractéristiques spectrales d'émission de fluorescence pour distinguer différents types de fluorophores. Un autre paramètre, le temps de vie de fluorescence, permet d'identifier plus précisément des molécules fluorescentes difficilement différenciables par leurs spectres d'émission. Cette approche est particulièrement utilisée pour caractériser l'autofluorescence des tissus due à la présence de nombreux fluorophores intrinsèques tels que le collagène, l'élastine, les acides aminés, les flavines ou encore la NAD(P)H² [12].

L'intérêt de l'imagerie de temps de vie de fluorescence est lié au fait que ce paramètre n'est pas modifié par les artéfacts qui affectent la mesure des intensités en microscopie de fluorescence : variations de concentrations locales, efficacité de l'excitation ou de la détection, photoblanchiment [13]. En effet, le temps de vie de fluorescence spécifique d'un fluorophore est indépendant de sa concentration et de l'intensité d'excitation. Toutefois, la valeur du temps de vie peut être influencée par l'environnement de la molécule fluorescente ce qui permet par exemple de quantifier les variations de pH ou de concentration en oxygène [14–16]. L'imagerie de temps de vie de fluorescence est une technique complémentaire à l'imagerie d'intensité de fluorescence permettant d'obtenir des informations supplémentaires concernant les propriétés physico-chimiques d'un milieu.

² Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphaste.

Avant d'exposer les méthodes d'imagerie, rappelons brièvement le principe définissant le temps de vie de fluorescence qui sera étudié plus en détail dans le chapitre suivant. Lorsque des molécules fluorescentes sont excitées par une source impulsionnelle, l'intensité de fluorescence émise $I(t)$ au cours du temps peut être décrite dans le cas le plus simple par une décroissance mono-exponentielle (figure 3.1) telle que :

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.1)$$

où τ représente le temps de vie de fluorescence et I_0 , l'intensité de fluorescence maximum correspondant à $t = 0$.

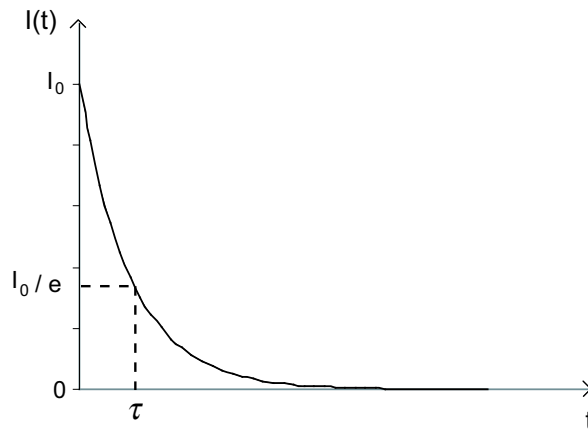


FIG. 3.1 – *Décroissance mono-exponentielle de la fluorescence au cours du temps $I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$. I_0 est l'intensité de fluorescence maximale à $t = 0$ et τ le temps de vie de fluorescence.*

Dans le cas d'une décroissance multi-exponentielle, l'intensité totale est définie comme la somme de chaque exponentielle décroissante associée aux n temps de vie :

$$I(t) = \sum_{i=1}^n I_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (3.2)$$

Dans cette expression, I_i représentent les intensités de fluorescence maximales à $t = 0$ associée aux temps de vie τ_i .

3.3 Méthodes d'imagerie de temps de vie de fluorescence

Les temps de vie de fluorescence des fluorophores rencontrés lors de l'imagerie cellulaire sont de l'ordre de quelques nanosecondes. Notons que la présence de molécules parasites ou d'agrégats de fluorophores peuvent réduire ces temps de vie à quelques picosecondes [17]. Ainsi, de nombreuses techniques d'imagerie de temps de vie de fluorescence se sont développées avec l'apparition de détecteurs ultra-rapides et sensibles tant dans le domaine des fréquences que dans le domaine temporel. Nous décrirons dans ce paragraphe les méthodes d'imagerie les plus utilisées.

3.3.1 Dans le domaine des fréquences (excitation modulée)

Lorsqu'un fluorophore est excité par une source lumineuse modulée à la fréquence f , la fluorescence émise est modulée à la même fréquence que la source excitatrice. Toutefois, il existe un déphasage ϕ et une démodulation m par rapport au signal d'excitation directement lié à la durée de vie des molécules fluorescentes.

Dans le cas d'une modulation sinusoïdale de pulsation ω telle que $\omega = 2\pi f$, l'intensité de la source excitatrice $I_e(t)$ s'écrit :

$$I_e(t) = a + b \cos(\omega t) \quad (3.3)$$

avec a l'intensité d'excitation moyenne et b l'amplitude de l'intensité d'excitation (figure 3.2).

En définissant le paramètre de modulation d'excitation $m_e = b/a$, l'équation 3.3 devient :

$$I_e(t) = a (1 + m_e \cos(\omega t)) \quad (3.4)$$

L'intensité de fluorescence émise $I_f(t)$, modulée à la même fréquence et déphasée de ϕ par rapport au signal d'excitation, est telle que :

$$I_f(t) = A + B \cos(\omega t - \phi) \quad (3.5)$$

où A et B représentent respectivement l'intensité moyenne et l'amplitude de l'intensité de fluorescence émise.

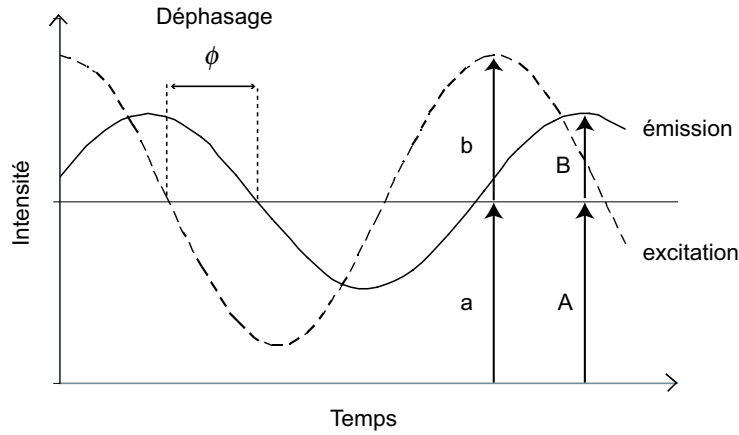


FIG. 3.2 – Déphasage et modulation de fluorescence (trait plein) en réponse à la source excitatrice modulée (trait pointillé).

En considérant le paramètre de modulation de fluorescence $m_f = B/A$, on a :

$$I_f(t) = A (1 + m_f \cos(\omega t + \phi)) \quad (3.6)$$

Le facteur de démodulation entre l'excitation et l'émission de fluorescence s'exprimant comme le rapport entre m_f et m_e permet d'accéder au temps de vie de fluorescence de la molécule excitée. En effet, dans le cas d'un déclin de fluorescence mono-exponentiel, on montre qu'il est égal à [18] :

$$m = \frac{m_f}{m_e} = \frac{B/A}{b/a} = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} \Leftrightarrow \tau = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{1}{m^2} - 1} \quad (3.7)$$

Le temps de vie de fluorescence peut également être déterminé via le déphasage ϕ entre l'onde émise et le signal d'excitation :

$$\tan \phi = \omega \tau \Leftrightarrow \tau = \frac{\tan \phi}{\omega} \quad (3.8)$$

D'après cette relation, l'erreur relative sur τ s'exprime en fonction de l'erreur sur la phase $\Delta\phi$ telle que :

$$\frac{\Delta\tau}{\tau} = \frac{1 + \tan^2 \phi}{\tan \phi} \Delta\phi \quad (3.9)$$

La figure 3.3.a représente les variations de cette erreur relative en fonction du déphasage pour une erreur de phase $\Delta\phi = 1^\circ$.

3.3. MÉTHODES D'IMAGERIE DE TEMPS DE VIE DE FLUORESCENCE

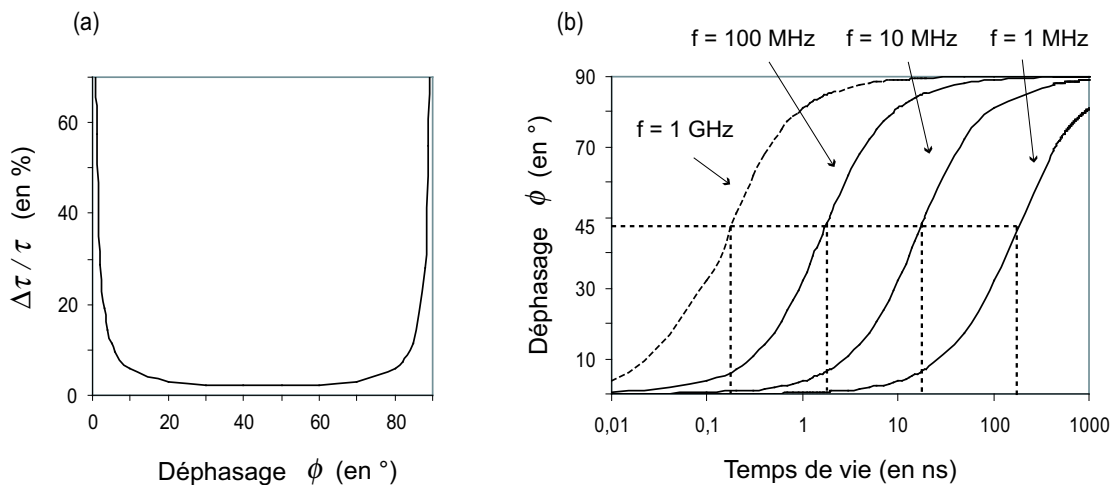


FIG. 3.3 – (a) Erreur relative sur le temps de vie en fonction du déphasage. (b) Déphasage en fonction du temps de vie pour différentes fréquences de modulation (échelle logarithmique).

L'erreur minimum correspond à un déphasage de 45° . Ainsi pour une mesure optimale du temps de vie, il est nécessaire d'adapter la fréquence de modulation en fonction du fluorophore étudié de manière à obtenir un déphasage de $\phi = 45^\circ$. En substituant cette valeur dans l'équation 3.8, on obtient :

$$\omega\tau = 1 \Leftrightarrow f = \frac{1}{2\pi\tau} \quad (3.10)$$

Par exemple, pour résoudre des temps de vie de l'ordre de 10 ns, la fréquence de modulation du signal d'excitation doit être égale à $\simeq 15$ MHz. La figure 3.3.b montre les variations du déphasage en fonction du temps de vie (échelle logarithmique) pour différentes fréquences de modulation.

Les images de temps de vie par détection de phase sont généralement obtenues en utilisant la microscopie de fluorescence par excitation à un photon [19–21]. Les sources lasers continues (diode laser, laser argon ionisé...) sont modulées en intensité grâce à des modulateurs acousto-optiques ou électro-optiques. Nous avons vu précédemment que la mesure des temps de vie faibles nécessitait une modulation à des fréquences élevées, la différence de phase entre les deux ondes ne peut donc pas être extraite directement. Des techniques de détection hétérodyne sont utilisées afin d'obtenir un signal de plus basse fréquence [22], elles consistent à moduler le gain du détecteur (photomultiplicateur) à une fréquence proche de la fréquence d'excitation.

L'avantage de la méthode d'imagerie de temps de vie par détection de phase réside dans l'acquisition rapide des images. Notons que des fréquences de l'ordre du gigahertz sont indispensables pour résoudre des temps de vie picosecondes (figure 3.3.b). D'autre part, la nécessité d'adapter la fréquence en fonction du temps de vie (équation 3.10) rend cette technique inadéquate à l'étude d'échantillons comportant plusieurs fluorophores dont l'ordre de grandeur des temps de vie est différent.

Remarque : Cette méthode a été exploitée par V. Bonnans dans le cadre de son travail de thèse au laboratoire d'Optique PM Duffieux [18]. Un capteur miniature fibré de 2 mm de diamètre permettant de détecter des images de temps de vie de fluorescence avec une résolution temporelle de 1 ns et une résolution spatiale de 2 μm a été développé. Cette sonde est actuellement utilisée pour l'étude in-vivo de la fluorescence de la peau.

3.3.2 Dans le domaine temporel (excitation impulsionnelle)

Il existe différents systèmes d'imagerie de temps de vie de fluorescence résolue dans le domaine temporel. Tous utilisent comme source des lasers à impulsion brève (de l'ordre de la pico ou de la femtoseconde) ou des diodes lasers pulsées. Nous décrivons ici les trois techniques d'imagerie les plus répandues, à savoir :

- les méthodes de comptage de photons,
- les caméras à balayage de fente,
- les méthodes d'échantillonnage du signal.

Le comptage de photons uniques corrélés dans le temps :

La technique de comptage de photon (TCSPC³) est basée sur la mesure du temps d'arrivée sur un détecteur de photons uniques émis par un signal de fluorescence. Cette méthode commercialisée par les sociétés *Becker&Hickl GmbH* [23] et *PicoQuant GmbH* [24] peut être implantable sur microscope confocal (*Leica* [25]).

³ Time Correlated Single Photon Counting.

3.3. MÉTHODES D'IMAGERIE DE TEMPS DE VIE DE FLUORESCENCE

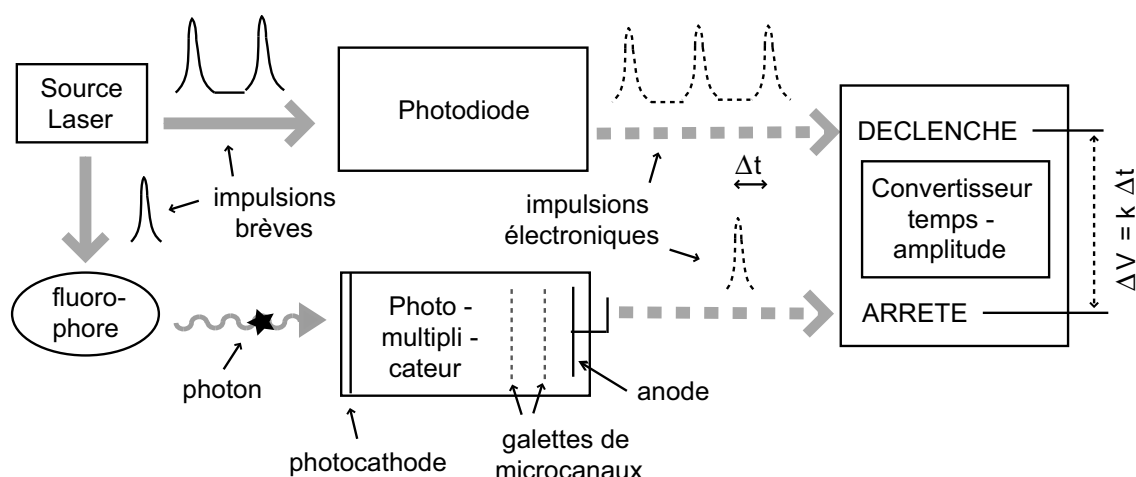


FIG. 3.4 – *Synoptique du dispositif relatif au comptage de photons uniques corrélés dans le temps.*

La figure 3.4 décrit le principe d'acquisition de temps de vie de fluorescence consistant à corrélérer temporellement les photons uniques détectés par rapport à l'excitation laser. Une photodiode ultra-rapide est utilisée comme détection de la référence temporelle de l'excitation. Les impulsions lasers émises à une cadence élevée ($\simeq 80 \text{ MHz}$) sont transformées par cette photodiode en impulsions électroniques qui vont déclencher un convertisseur temps-amplitude ou TAC (*Time-to-Amplitude Converter*). Ce convertisseur génère alors pour chaque impulsion reçue une rampe de tension continue linéaire en fonction du temps.

Simultanément, le faisceau laser excite un échantillon fluorescent émettant des photons uniques qui vont être détectés par un photomultiplicateur dont le principe est de transformer chaque photon incident en un électron par une photocathode. Le flux de photons arrivant sur la photocathode doit être suffisamment faible pour pouvoir discriminer chaque impulsion séparément. L'électron libéré par la photocathode est ensuite amplifié par deux galettes de microcanaux. La différence de potentiel appliquée aux extrémités d'un microcanal transporte l'électron incident à travers le canal. A chaque fois qu'il entre en collision avec la surface interne du canal, il arrache d'autres électrons jusqu'à former une avalanche d'électrons à la sortie du microcanal. L'avalanche d'électrons ainsi formée par les deux intensifications successives est recueillie par une anode. La charge associée devient alors une impulsion électronique.

L'arrivée sur le convertisseur temps-amplitude de cette impulsion correspondant à la détection d'un photon par le photomultiplicateur sert de signal d'arrêt. La tension ainsi détectée dont l'amplitude est linéaire par rapport à la différence de temps d'arrivée des deux impulsions ($\Delta V = k\Delta t$) est ensuite numérisée par un analyseur multicanaux ou MCA (*Multi Channel pulse height Analyser*). En répétant plusieurs fois cette opération, il est possible de reconstruire la distribution du temps entre le signal d'excitation et la détection de photons. A chaque pulse, le temps d'arrivée et la position en x,y sont notés en mémoire. Ainsi pour chaque pixel, il est possible de tracer un histogramme du nombre de photons détectés en fonction de leur temps d'arrivée Δt correspondant au temps de vie associé à ce pixel (figure 3.5). Notons qu'il est impératif de ne détecter qu'un seul photon pour chaque impulsion du laser émise sur l'échantillon pour ne pas distordre la distribution et ainsi fausser la statistique du temps de vie de fluorescence. L'intensité de l'excitation doit être atténuée de manière à limiter le taux de comptage (*i.e.* le nombre de photons détectés par seconde). Cette contrainte impose des temps de mesure relativement longs.

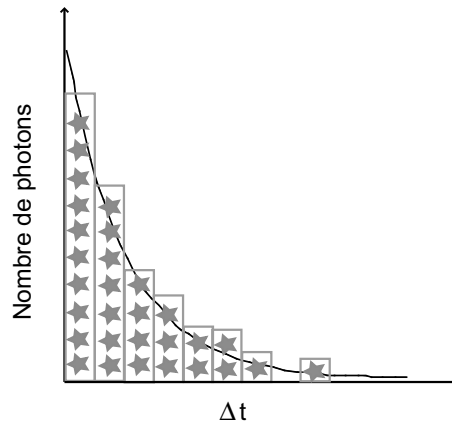


FIG. 3.5 – Histogramme des retards des photons uniques comptés correspondant au temps de vie de fluorescence.

D'autre part, il existe un temps mort entre l'arrivée de deux impulsions consécutives pendant lequel le convertisseur temps-amplitude se réinitialise. Ainsi, pour des sources impulsionnelles de cadence 80 MHz , les temps de vie résolus seront nécessairement inférieurs à $12,5 \text{ ns}$ (*i.e.* à la durée séparant deux impulsions). La résolution de temps plus long est réalisable grâce à l'utilisation de sélecteurs d'impulsion mais se fait au détriment de la durée totale d'acqui-

sition.

Cette technique de comptage de photons est très répandue car elle permet la détection de signaux de faible niveau et la résolution précise de décroissance de fluorescence multi-exponentielle [26, 27]. La réponse instrumentale des systèmes de comptage de photons uniques est caractérisée par une largeur temporelle d'environ 50 ps permettant ainsi de résoudre des temps de vie de quelques dizaines de picosecondes [28, 29].

Les caméras à balayage de fentes ou *streak camera* :

Le principe de fonctionnement d'une caméra à balayage de fente consiste à transformer une variation temporelle d'intensité d'un signal lumineux en une variation spatiale. La société Hamamatsu a récemment développé un système d'imagerie de temps de vie de fluorescence utilisant une caméra à balayage de fente. Les résolutions temporelles et spatiales sont respectivement de l'ordre de $\simeq 20 \text{ ps}$ et de $0,2 \mu\text{m}$ [30]. La figure 3.6 issue de la référence [30] représente le principe de fonctionnement d'une caméra à balayage de fente.

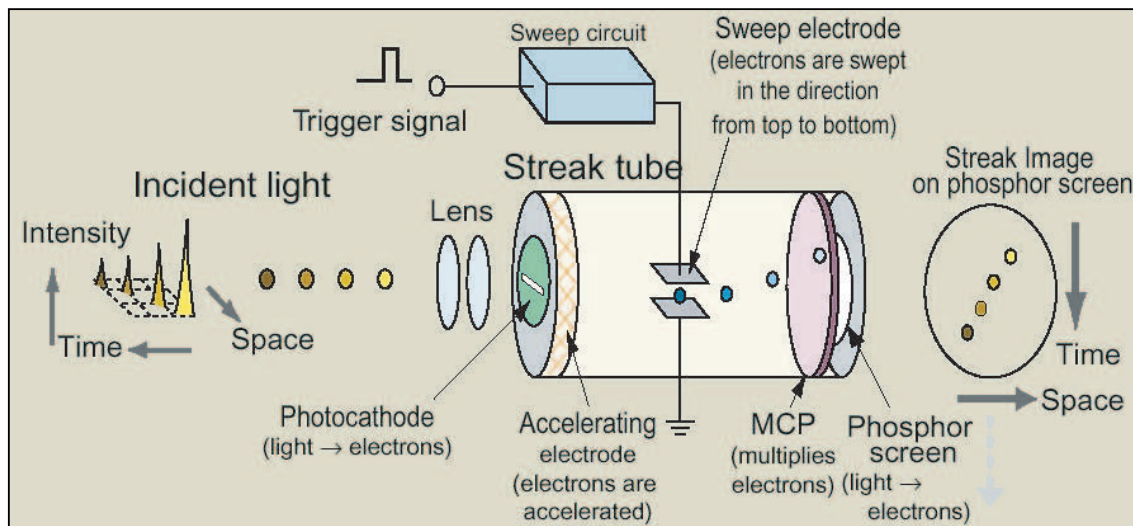


FIG. 3.6 – Principe de fonctionnement d'une caméra à balayage de fente.

Le signal de fluorescence à analyser est focalisé sur une fente réglable à l'entrée de la caméra. Cette fente est imagée sur une photocathode qui va convertir les photons détectés en électrons. Ces électrons sont ensuite accélérés et passent entre deux électrodes de déflexion

(*sweep electrode*). Une tension transversale synchronisée sur l'impulsion lumineuse incidente est appliquée entre ces deux électrodes de manière à dévier les électrons en fonction de leur temps d'arrivée. Avant d'être convertis en photons grâce à l'écran phosphorescent, les électrons sont amplifiés via l'intensificateur à galettes de micro-canaux MCP (*Multi Channel Plate*). Une image en deux dimensions (x, t) est ensuite capturée sur un écran CCD, un axe représente la dimension transverse de la fente d'entrée (x) et l'autre le temps d'arrivée des photons (t) . Un balayage en (y) de l'échantillon de reconstituer une image de temps de vie de fluorescence à partir des différentes images (x, t) enregistrées.

Les caméras à balayage de fente offre la possibilité de résoudre des images de temps de vie de fluorescence très court avec un temps d'acquisition des images de quelques secondes. Notons que certaines caméras peuvent atteindre une résolution temporelle de 200 fs [30]. Grâce à leur sensibilité de détection, de nombreuses applications sont envisageables en particulier dans le domaine biomédical [31–33]. L'inconvénient majeur reste le prix élevé de ce type de caméras.

L'échantillonnage temporel des signaux de fluorescence :

De nombreux travaux appliqués à l'imagerie de temps de vie de fluorescence utilisent le principe d'échantillonnage temporel des signaux de fluorescence. Cette technique est réalisée grâce à des détecteurs à portes temporelles ultra-rapides constitués de photomultiplicateur et de galettes de micro-canaux. Des cartographies 2-D de temps de vie fluorescence sont établies en alliant la microscopie en champ lointain et l'utilisation de caméras intensifiées [34, 35].

L'intensité de fluorescence émise suite à l'excitation d'un fluorophore par une source pulsée brève (laser pico ou femtoseconde, diode pulsée) est mesurée à différents instants dans des intervalles de temps très courts (figure 3.7.a). Les images ainsi enregistrées permettent d'établir une cartographie en deux dimensions où chaque pixel est associé à un temps de vie. Des cartes en 3-D du temps de déclin peuvent être obtenues en associant à cette méthode un microscope confocal [36, 37].

3.3. MÉTHODES D'IMAGERIE DE TEMPS DE VIE DE FLUORESCENCE

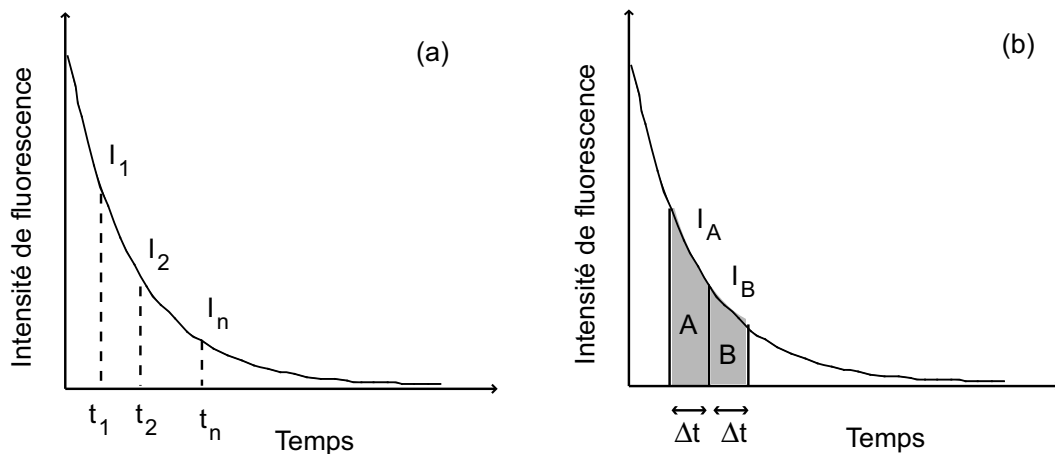


FIG. 3.7 – (a) Principe d'échantillonnage temporel du signal de temps de vie de fluorescence. (b) Principe de mesure du temps de vie par intégration : utilisation de deux portes temporelles de durée Δt .

L'avantage de cette technique d'échantillonnage du signal lumineux réside dans la rapidité d'acquisition des cartographies de temps de vie. La résolution temporelle est limitée par le temps d'ouverture des obturateurs électroniques, soit $\simeq 50 \text{ ps}$ [30]. Notons que cette méthode permet de distinguer différents temps de vie de façon précise. Ainsi, des temps de vie qui diffèrent d'une dizaine de picosecondes peuvent être discernés [35].

La figure 3.7.b illustre la méthode d'intégration du signal de fluorescence. Elle est basée sur le même principe que celui décrit précédemment, l'émission de fluorescence est détectée de façon séquentielle dans des fenêtres de temps plus grandes Δt . Une première intégration est déclenchée pendant un premier intervalle de temps A, on en déduit une intensité de fluorescence I_A . La deuxième intégration se fait pendant le même laps de temps Δt et permet de mesurer une intensité I_B inférieure à la précédente. Le temps de déclin pour une décroissance mono-exponentielle est alors donné par la relation suivante :

$$\tau = \frac{\Delta t}{\ln \frac{I_B}{I_A}} \quad (3.11)$$

Actuellement, la détection se fait grâce à des photomultiplicateurs dans quatre fenêtres de temps d'environ 2 ns , la durée Δt devant être inférieure à $2,5 \tau$ [38]. Cette méthode permet de réduire considérablement les durées d'acquisition des images de temps de vie de fluorescence ($\simeq 50 \text{ } \mu\text{s}$). Cependant, cette technique d'intégration du signal de fluorescence

reste limitée au temps de déclin long et de type mono-exponentiel.

La société Nikon propose un système d'imagerie de temps de vie de fluorescence en microscopie confocale à balayage basé sur ce principe (système *LIMO*) [39].

3.4 Quelques exemples d'applications

3.4.1 Dans le domaine biomédical

De nombreuses applications de l'imagerie de temps de vie de fluorescence se sont développées dans le domaine biomédical ces dernières années.

Une des applications consiste à étudier les variations des temps de vie de différents tissus (tumoraux et sains) qui émettent une fluorescence spécifique. Cette fluorescence peut être naturelle⁴ : la plupart des tissus recèlent en effet des molécules fluorescentes (des fluorophores endogènes, *cf* § 3.2). Ainsi, il est possible après une excitation lumineuse, de discriminer les temps de vie relatifs à tel ou tel tissu et de détecter des lésions cancéreuses et précancéreuses [18, 40–42].

Le phénomène de fluorescence peut également être engendré en administrant des substances artificielles : des fluorophores exogènes ayant une affinité spécifique pour le type de tissu ou cellule que l'on cherche à identifier. On peut aussi avoir recours à des marqueurs fluorescents (*GFP*, *YFP*, *DsRed*, *fluorescéine*...) qui traduisent un état physico-chimique de leur environnement ou qui témoignent de certaines activités métaboliques [43]. Ces " marqueurs du métabolisme " sont bien connus en microscopie de fluorescence pour la mesure du pH, du calcium ou du potassium d'une cellule [44–46].

D'autres applications d'imagerie de temps de vie de fluorescence se sont développées dans le domaine pharmacologique permettant par exemple d'étudier les interactions molécule-médicament [47–49].

⁴ On parle alors d'autofluorescence.

3.4.2 Application FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

Le FRET est un processus dans lequel l'énergie est transférée, de façon non radiative, d'un fluorophore se trouvant dans un état excité (le donneur) à un autre fluorophore se trouvant à l'état fondamental (l'accepteur). Le transfert d'énergie est observé lorsque ces deux molécules se trouvent à une distance inférieure à 100 \AA et que leurs dipôles de transition électronique ont une orientation respective appropriée. L'efficacité de transfert sera maximale lorsque les deux dipôles sont orientés dans le même sens. Notons que les spectres d'absorption de l'accepteur et d'émission du donneur doivent se chevaucher [14].

L'imagerie de temps de vie de fluorescence suite à un processus de transfert d'énergie permet par exemple de caractériser les interactions macromoléculaires (protéine-protéine...) ou de mesurer des distances intra ou intermoléculaires de quelques nanomètres [50–53].

Bibliographie

- [1] R. Alfano, D. Tata, J. Cordero, P. Tomashefsky, F. Longo et M. Alfano, "Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissues", *IEEE J. Quantum Electron.*, **20**, pp. 1507 (1984).
- [2] R. Alfano, G. Tang, A. Pradhan, W. Lam, D. Choy et E. Opher, "Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissues", *IEEE J. Quantum Electron.*, **23**, pp. 1806 (1987).
- [3] G. Tang, A. Pradhan, W. Sha, J. Chen, C. Liu, S. Wahl et R. Alfano, "Pulsed and CW laser fluorescence spectra from cancerous, normal, and chemically treated normal human breast and lung tissues", *Appl. Opt.*, **28**, pp. 2337 (1989).
- [4] R. Alfano, A. Pradhan, G.C.Tang et S. Wahl, "Optical spectroscopic diagnosis of cancer and normal breast tissues", *J. Opt. Soc. Am. B*, **6**, pp. 1015 (1989).
- [5] M. Keijzer, R. Kortum, S. Jacques et M. Feld, "Fluorescence spectroscopy of turbid media : Autofluorescence of the human aorta", *Appl. Opt.*, **28**, pp. 4286 (1989).
- [6] A. Durkin, S. Jaikumar, N. Ramanujam et R. Kortum, "Relation between fluorescence spectra of dilute and turbid samples", *Appl. Opt.*, **33**, pp. 414 (1994).
- [7] M. Muller, I. Gergakoudi, Q. Zhang, J. Wu et M. Feld, "Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media : disentangling effects of scattering and absorption", *Appl. Opt.*, **40**, pp. 4633 (2001).
- [8] S.Andersson-Engels, R.Berg, O.Jarlman et S.Svanberg, "Time-resolved transillumination for medical diagnostics", *J. Microsc.*, **15**, pp. 1179 (1990).
- [9] A.Pradhan, B. Das, C. Liu, R. Alfano, K. O'Brien, M. Stetz, J. Scott et L. Deckelbaum, "Time-resolved fluorescence of normal and atherosclerotic arteries", *Proc. SPIE*, **1425**, pp. 2 (1991).
- [10] W. Denk, J. Strickler et W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", *Science*, **24**, pp. 73 (1990).
- [11] J. White, W. Amos et M. Fordham, "An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy", *J. Cell. Biol.*, **105**, pp. 41 (1987).

- [12] K. König et I. Riemann, “High resolution optical tomography of human skin with sub-cellular resolution and picosecond time resolution”, *J. Biomed. Opt.*, **8**, pp. 432 (2003).
- [13] G. Patterson et D. Piston, “Photobleaching in two-photon excitation microscopy”, *Biophys. J.*, **78**, pp. 2159 (2000).
- [14] J. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic, Plenum publishers, New York, 2^e édition (1999).
- [15] H. Gerritsen, R. Sanders, A. Draaijer et Y. Levine, “Fluorescence lifetime imaging of oxygen in cells”, *J. Fluoresc.*, **7**, pp. 11 (1997).
- [16] A. Ryder, S. Power, T. Glynn et J. Morrison, “Time-domain measurement of fluorescence lifetime variation with pH”, *Proc. SPIE*, **4259**, pp. 102 (2001).
- [17] L. Kelbauskas et W. Dietel, “Internalization of aggregated photosensitizers by tumor cells : Subcellular time-resolved fluorescence spectroscopy on derivatives of pyropheophorbide-a ethers and chlorin e6 under femtosecond one- and two-photon excitation”, *Photochem. Photobiol.*, **76**, pp. 686 (2002).
- [18] V. Bonnans, *Elaboration d’une sonde optique fibrée à résolution micrométrique : application à l’autofluorescence des cellules de la peau*, Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté (2002).
- [19] A. Squire et P. Bastiaens, “Three dimensional image restoration in fluorescence lifetime imaging microscopy”, *J. Microsc.*, **193**, pp. 36 (1999).
- [20] A. Squire, P. Verveer et P. Bastiaens, “Multiple frequency fluorescence lifetime imaging microscopy”, *J. Microsc.*, **197**, pp. 136 (2000).
- [21] P. Verveer, A. Squire et P. Bastiaens, “Global analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy data”, *Biophys. J.*, **78**, pp. 2127 (2000).
- [22] E. Gratton, D. Jameson et R. Hall, “Multifrequency phase and modulation fluorometry”, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13**, pp. 105 (1984).
- [23] <http://www.becker-hickl.de> (2005).
- [24] <http://www.picoquant.com> (2005).
- [25] <http://www.leica-microsystems.com> (2005).

- [26] R. R. Duncan, A. Bergmann, M. A. Cousin, D. K. Apps et M. J. Shipston, "Multi-dimensional time-correlated single photon counting (TCSPC) fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to detect FRET in cells", *J. Microsc.*, **215**, pp. 1 (2004).
- [27] W. Becker, A. Bergmann, G. Biscotti et A. Rück, "Advanced time-correlated single photon counting technique for spectroscopy and imaging in biomedical systems", *Proc. SPIE*, **5340**, pp. 104 (2004).
- [28] W. Becker, A. Bergmann, C. Biskup, L. Kelbauskas, T. Zimmer, N. Klöcker et K. Bendorf, "High resolution TCSPC lifetime imaging", *Proc. SPIE*, **4693** (2003).
- [29] W. Becker, A. Bergmann, E. Haustein, Z. Petrasek, P. Schwille, C. Biskup, T. Anhut, I. Riemann et K. König, "Fluorescence lifetime images and correlation spectra obtained by multi-dimensional TCSPC", *Proc. SPIE*, **5700** (2005).
- [30] <http://www.hamamatsu.com> (2005).
- [31] R. V. Krishnan, H. Saitoh, H. Terada, V. Centonze et B. Herman, "Development of a multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy system using a streak camera", *Rev. of Sci. Ins.*, **74**, pp. 2714 (2003).
- [32] R. Krishnan, A. Masuda, V. Centonze et B. Herman, "Quantitative imaging of protein-protein interactions by multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy using a streak camera", *J. Biomed. Opt.*, **8**, pp. 362 (2003).
- [33] R. Krishnan, E. Biener, J. Zhang, R. Heckel et B. Herman, "Probing subtle fluorescence dynamics in cellular proteins by streak camera based fluorescence lifetime imaging microscopy", *Appl. Phys. Lett.*, **83**, pp. 4558 (2003).
- [34] K. Dowling, S. Hyde, J. Dainty, P. French et J. Hares, "2-D fluorescence lifetime imaging using a time-gated image intensifier", *Opt. Comm.*, **135**, pp. 27 (1997).
- [35] K. Dowling, M.J. Dayel, M. Lever, P. French, J. Hares et A. Dymoke-Bradshaw, "Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical application", *Opt. Lett.*, **23**, pp. 810 (1998).
- [36] M. Cole, J. Siegel, S. Webb, R. Jones, K. Dowling, P. French, M. Lever, L. Sucharov, M. Neil, R. Juskaitis et T. Wilson, "Whole-field optically sectioned fluorescence lifetime imaging", *Opt. Lett.*, **25**, pp. 1361 (2000).

- [37] J. Siegel, D. Elson, S. Webb, D. Parsons-Karavassilis, S. Lévêque-Fort, M. Cole, M. Lever, P. French, M. Neil, R. Juskaitis, L. Sucharov et T. Wilson, “Whole-field five dimensional fluorescence microscopy combining lifetime and spectral resolution with optical sectioning”, *Opt. Lett.*, **26**, pp. 1338 (2001).
- [38] H. Gerritsen, M. Asselbergs et A. A. and W.G. Van Sark, “Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes : acquisition speed, photon economy and lifetime resolution”, *J. Microsc.*, **206**, pp. 218 (2002).
- [39] <http://www.nikon-instruments.com> (2005).
- [40] P. Tadrous, J. Siegel, P. French, S. Shousha, E.-N. Lalani et G. Stamp, “Fluorescence lifetime imaging of unstained tissues : early results in human breast cancer”, *The Journal of Pathology*, **199**, pp. 309 (2003).
- [41] S. Andersson-Engels, C. Klinteberg, K. Svanberg et S. Svanberg, “In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics”, *Phys. Med. Biol.*, **42**, pp. 815 (1997).
- [42] R. Cubeddu, D. Comelli, C. D’Andrea, P. Taroni et G. Valentini, “Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine”, *J. Phys. D : Appl. Phys.*, **35**, pp. 61 (2002).
- [43] S. Jakobs, V. Subramaniam, A. Schönle, T. Jovin et S. Hell, “EGFP and DsRed expressing cultures of Escherichia coli imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy”, *FEBS Letters*, **479**, pp. 131 (2000).
- [44] J. Lakowicz, H. Szmazinski, K. Nowaczyk et M. Johnson, “Fluorescence lifetime imaging of Calcium using Quin-2”, *Cell Calcium*, **13**, pp. 131 (1992).
- [45] J. Lakowicz et H. Szmazinski, “Fluorescence lifetime based sensing of PH, Ca^{2+} , K^{+} and glucose”, *Sensors Actuators B*, **11**, pp. 133 (1992).
- [46] H. Szmazinski et J. Lakowicz, “Optical measurements of pH using fluorescence lifetimes and phase modulation fluorometry”, *Anal. Chem.*, **65**, pp. 1668 (1993).
- [47] E. Guiot, *Microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons : applications à des études de corrélations et de déclin de fluorescence en milieu biologique*, Thèse de doctorat, Université Paris XI - Orsay (2001).
- [48] S. Lévêque-Fort, K. Steenkeste, P. Lacroix, F. Tfibel et M. F. Aupart, “La photonique pour l’étude du milieu biologique : de la réactivité au diagnostic”, *L’actualité chimique*, p. 66 (2003).

- [49] K. Steenkeste, E. Guiot, F. Tfibel, P. Pernot, F. Mérola, P. Georges et M. P. Fontaine-Aupart, "Camptothecins-guanine interactions : mechanism of charge transfer reaction upon photoactivation", *Chemical Physics*, **275**, pp. 93 (2002).
- [50] V. Calleja, S. Ameer-Beg, B. Vojnovic, R. Woscholski et J. Downward, "Monitoring conformational changes of proteins in cells by fluorescence lifetime imaging microscopy", *Biochem. J.*, **33**, pp. 372 (2003).
- [51] S. Murata, P. Herman, H. Lin et J. Lakowicz, "Fluorescence lifetime imaging of nuclear DNA : effect of fluorescence esonance energy transfer", *Cytometry*, **41**, pp. 178 (2000).
- [52] G. Cox et A. Salih, "Fluorescence lifetime of symbionts and fluorescence proteins in reef corals", *Proc. SPIE*, **5700**, pp. 162 (2005).
- [53] L. van Geest et K. Stoop, "FLIM on a wide field fluorescence microscope", *Letters in peptide science*, **10**, pp. 501 (2003).

Principe d'imagerie de temps de vie par amplification paramétrique d'images

4.1 Introduction

Ce chapitre expose le principe de l'application de l'amplification paramétrique d'images en régime impulsionnel à l'imagerie de temps de vie de fluorescence. Il s'agit d'exploiter la propriété de porte optique ultra-rapide de l'interaction paramétrique afin d'échantillonner temporellement le signal de fluorescence. Cette méthode a déjà été appliquée à des signaux de fluorescence et a permis de calculer des temps de déclin de l'ordre de la picoseconde (sans résolution spatiale du signal) [1]. En réalisant l'amplification paramétrique d'images de signaux de fluorescence, nous proposons une méthode permettant l'obtention d'une cartographie 2-D du temps de déclin grâce à l'acquisition d'images formées par l'onde complémentaire (idler). La résolution temporelle sera alors déterminée par la durée de l'impulsion pompe.

Après quelques rappels concernant le phénomène de fluorescence sous excitation à un photon, nous nous intéresserons aux propriétés de porte optique temporelle de l'amplification paramétrique puis nous définirons le protocole utilisé pour former des cartographies 2D de temps de vie.

4.2 La fluorescence sous excitation à un photon

Les phénomènes de fluorescence, contrairement aux phénomènes de phosphorescence, sont observables uniquement pendant la durée de l'excitation. On parle de phénomènes instantanés ou quasi instantanés puisqu'ils persistent pendant un temps très court après la suppression de la source [2]. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre (§ 1.3.1), la fluorescence correspond à l'émission de lumière provenant d'un état singulet excité [3]. L'émission de photons s'effectue rapidement, et les temps de déclin sont de l'ordre de la nanoseconde et très souvent subnanoseconde¹. C'est pourquoi leur mesure nécessite des procédés optiques et électroniques performants.

4.2.1 Mécanisme d'absorption et d'émission

L'absorption : Différentes valeurs d'énergie sont susceptibles de promouvoir l'électron dans un état excité S_i . Ainsi, à chaque saut quantique faisant passer la molécule du niveau fondamental vers les différents niveaux vibrationnels de chaque état singulet S_i correspond une longueur d'onde d'absorption.

La loi de Beer-Lambert caractérise l'absorption de lumière. Elle énonce que l'absorbance, ou densité optique (DO), est directement proportionnelle à la concentration de l'échantillon étudié et s'écrit généralement :

$$DO = \log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon C d \quad (4.1)$$

où ϵ désigne le coefficient d'extinction molaire (en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$), C la concentration du fluorophore (en $mol.L^{-1}$), et d l'épaisseur de l'échantillon fluorescent (en cm). I_0 et I_t désignent respectivement les intensités lumineuses incidentes et transmises.

Notons que cette relation reste linéaire pour des densités optiques comprises entre 0,3 et 0,8 et que la concentration du fluorophore et l'épaisseur de la cuve affectent l'intensité lumineuse transmise, mais ne modifient pas la position du pic d'absorption.

L'émission : La figure 4.1 représente un diagramme de Jablonski simplifié.

¹ Les temps de vie sont liés à la taille de la molécule (*i.e.* à la distance entre le groupe donneur et le groupe accepteur) [3].

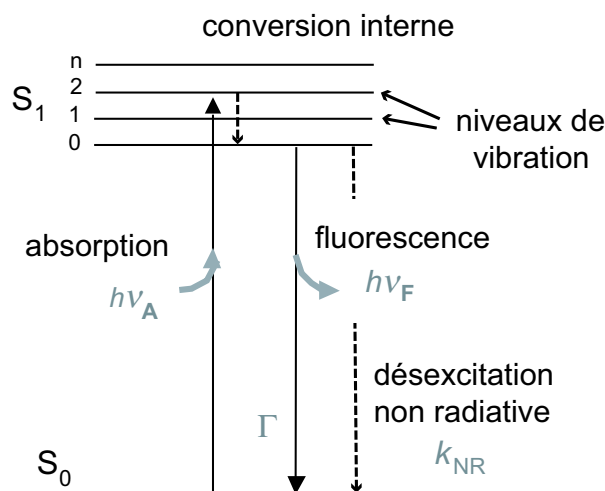


FIG. 4.1 – Diagramme de Jablonsky simplifié. S_0 désigne l'état fondamental, S_1 correspond à l'état excité singulet de niveau 1. Γ et k_{nr} correspondent respectivement aux taux de désexcitation radiative et non radiative.

Reprenons la molécule juste après l'absorption du photon : l'électron se trouve alors dans un niveau de vibration différent de celui de l'état fondamental. Après relaxation ou conversion interne (10^{-12} à 10^{-14} s), l'état excité perd rapidement l'énergie vibrationnelle excédentaire et la molécule se retrouve alors au niveau de vibration 0. D'après la règle de Kasha², c'est de ce niveau d'énergie que le photon sera émis [3].

Les conversions internes qui se produisent lors de la désexcitation de la molécule impliquent un déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées appelé déplacement de Stokes (figure 4.2).

Remarques :

- ◊ D'après la règle de Kasha, l'allure du spectre d'émission de fluorescence ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation.
- ◊ Si les spectres d'absorption et d'émission se recouvrent de façon non négligeable, une partie des photons émis peut être réabsorbée. Nous choisirons donc des fluorophores dont les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission diffèrent d'environ 100 nm (cf chapitre 5).

²L'émission d'un photon se produit toujours à partir de l'état de vibration 0 de l'état électronique singulet excité considéré.

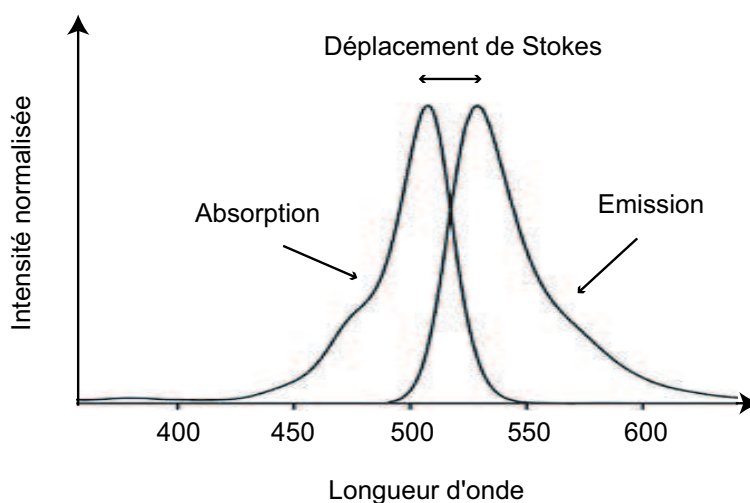


FIG. 4.2 – Spectres normalisés d'absorption et d'émission de fluorescence.

4.2.2 Le rendement quantique

Un fluorophore est principalement caractérisé par son rendement quantique. Ce dernier est défini comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Il s'exprime en fonction du taux d'émission radiatif Γ et du taux de désintégration non radiatif k_{nr} , qui sont tous deux responsables de la dépopulation du niveau excité (figure 4.1) [3].

Le rendement quantique Q rend compte de la compétition entre le phénomène de désexcitation radiatif et les différents phénomènes de désexcitation non radiatifs et s'écrit :

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (4.2)$$

Ainsi, les colorants les plus lumineux sont ceux qui possèdent un rendement quantique proche de l'unité, c'est à dire ceux qui possèdent un taux d'émission Γ nettement supérieur au taux de désintégration k_{nr} .

4.2.3 Le temps de vie de fluorescence

Le temps de vie est une valeur moyenne du temps passé dans l'état excité et est caractéristique de l'interaction du fluorophore avec le milieu extérieur.

Suite à une excitation lumineuse de type impulsionnelle, la fluorescence va décroître au cours du temps. On définit alors le temps moyen \bar{t} de décroissance de la population de molécules

excitées simultanément en fonction du nombre de molécules $n(t)$ encore excitées au temps t :

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} t n(t) dt}{\int_0^{\infty} n(t) dt} \quad (4.3)$$

La variation du nombre de molécules à l'état excité $n(t)$ vaut :

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr}) n(t) \quad (4.4)$$

Soit dans le cas d'une seule espèce moléculaire de population initiale excitée n_0 :

$$n(t) = n_0 e^{-(\Gamma+k_{nr})t} \quad (4.5)$$

En substituant cette relation dans l'équation 4.3, on obtient :

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} t e^{-(\Gamma+k_{nr})t} dt}{\int_0^{\infty} e^{-(\Gamma+k_{nr})t} dt} \quad (4.6)$$

Le temps moyen \bar{t} , ou temps de vie, τ est déterminé en intégrant par parties l'équation 4.6 :

$$\bar{t} = \tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (4.7)$$

Notons que le temps de vie défini ici correspond à une décroissance mono-exponentielle du signal de fluorescence au cours du temps.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, l'intensité $I(t)$ du signal de fluorescence s'exprime en fonction du temps de vie caractéristique du fluorophore. L'expression du rendement quantique permet de retrouver cette relation entre intensité lumineuse et temps de vie. En effet, le rendement quantique pour un intervalle de temps dt est tel que :

$$Q = -\frac{I(t) dt}{dn(t)} \quad (4.8)$$

A partir des équations 4.4, 4.5 et 4.7, l'intensité lumineuse s'écrit :

$$I(t) = \frac{Q n(t)}{\tau} = \frac{Q n_0 e^{-\frac{t}{\tau}}}{\tau} \quad (4.9)$$

Or d'après l'expression 4.2 on a $\frac{Q}{\tau} = \Gamma$, d'où l'expression finale de l'intensité lumineuse de fluorescence :

$$I(t) = \Gamma n_0 e^{-\frac{t}{\tau}} = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.10)$$

avec I_0 , l'intensité de fluorescence maximale à $t = 0$.

Dans l'exemple considéré ici, l'intensité lumineuse décroît de façon mono-exponentielle en fonction du temps³. Notons toutefois que le signal observé dépend du profil temporel de l'impulsion excitatrice puisque la réponse du fluorophore est une convolution de cette impulsion (en général de type gaussien pour un laser) et de la décroissance de fluorescence (figure 4.3) :

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \otimes L(t) \quad (4.11)$$

avec $L(t)$, le profil de l'impulsion excitatrice.

Ainsi pour des impulsions brèves (idéalement un pic de Dirac), le temps de vie ne sera pas affecté par cette convolution et vérifie alors l'équation 4.10.

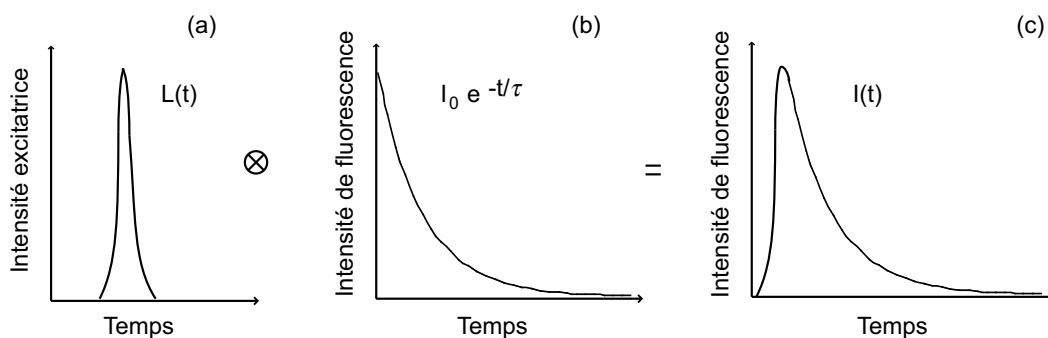


FIG. 4.3 – (a) Impulsion excitatrice (gaussienne), (b) décroissance mono-exponentielle, (c) profil temporel d'un signal de fluorescence généré par une impulsion excitatrice gaussienne : convolution de (a) et (b).

4.3 Imagerie ultra rapide - porte optique temporelle

Dans le chapitre précédent, nous avons cité les techniques d'imagerie de temps de vie de fluorescence les plus répandues. Aux échelles de temps picoseconde et femtoseconde, ces techniques (mises à part les caméras à balayage de fente) ont un temps de réponse trop long pour la résolution temporelle désirée. Il existe d'autres méthodes d'application de spectroscopie résolue en temps utilisant des portes optiques temporelles brèves dont le temps

³ L'équation correspondant à une décroissance multi-exponentielle est donnée dans le chapitre 3 (cf équation 3.2, § 3.2)

d'ouverture est donné par la durée de l'impulsion laser.

4.3.1 Les portes à effet Kerr

Cette technique repose sur l'utilisation d'un obturateur tout optique dont l'ouverture est commandée par une impulsion laser pico ou femtoseconde [4]. Par exemple, une cuve d'un liquide à fort coefficient de Kerr (par exemple le CS_2) est placée entre polariseur et analyseur croisés (notés P et A). Lorsqu'une impulsion laser intense est envoyée sur la cuve, elle induit une biréfringence dans le milieu liquide par effet Kerr optique rendant ainsi le milieu anisotrope dans lequel apparaîtront deux lignes neutres. En plaçant cette cuve entre polariseurs croisés à 45° des lignes neutres induites, une onde lumineuse incidente verra sa polarisation tourner de 90° et sera transmise par l'analyseur. En l'absence d'excitation (le milieu liquide est alors isotrope), le signal est bloqué après passage dans la cuve par l'analyseur (A).

Lorsque le temps de réponse du milieu est très rapide, l'anisotropie ne dure que pendant la durée de l'impulsion laser. En choisissant des cuves minces pour minimiser l'effet des différences de vitesse dans le milieu selon les longueurs d'onde utilisées, on obtient une porte optique temporelle ultra-rapide.

Les avantages de cette méthode sont sa bonne résolution temporelle et le fait que toutes les composantes spectrales du signal sont transmises simultanément. Ses inconvénients sont sa limitation au visible et proche infrarouge et la nécessité de disposer d'impulsions intenses pour induire un effet Kerr suffisant. Cette technique est utilisée par exemple pour l'imagerie à travers les milieux diffusants [5–7] ou pour la spectroscopie de fluorescence [8, 9].

4.3.2 La conversion de fréquences

Cette méthode utilise le processus d'interaction non linéaire de mélanges à trois ondes (somme de fréquences) [10]. Le signal à analyser (signal de fluorescence par exemple) et l'impulsion laser sont envoyés simultanément dans un milieu quadratique non centrosymétrique (cristal de KDP , BBO ...). En détectant à la sortie du cristal la fréquence somme des deux fréquences initiales, seule la partie du signal coïncidant avec l'impulsion laser est analysée. On définit alors une porte optique temporelle ayant la durée de l'impulsion laser [11, 12].

Les avantages de cette technique de conversion de fréquences sont sa bonne résolution temporelle et son utilisation facile pour des signaux infrarouges qui sont transformés en signaux dans le visible. Ses inconvénients sont un faible rendement de conversion et surtout le fait que les règles d'accord de phase imposent un angle différent du cristal pour chaque longueur d'onde à la différence de l'interaction paramétrique de type 1.

4.3.3 L'amplification paramétrique d'images

Le processus d'amplification paramétrique peut également être utilisé pour résoudre temporellement un signal au même titre que la somme de fréquences. Dans le chapitre 1, nous avons vu qu'il est possible d'amplifier des images avec un gain d'amplification significatif et avec la meilleure résolution spatiale [13, 14].

Outre le fait que l'image formée par l'onde idler contient uniquement les fréquences spatiales amplifiées de l'onde signal, elle est également générée uniquement pendant la durée de l'impulsion pompe. Ainsi, d'un point de vue temporel, l'idler est la réplique de la partie du signal synchrone avec la pompe. Les applications de cette propriété à la photographie ultra rapide [15] et à l'imagerie à travers les milieux diffusants [16, 17] ont été expérimentalement obtenues.

Le principe d'échantillonnage d'un signal de fluorescence par amplification paramétrique d'images est le suivant (figure 4.4) : le signal de fluorescence émis à une longueur d'onde λ_s est amplifié grâce à une impulsion pompe intense de longueur d'onde λ_p dans un cristal quadratique de type 1.

Dans les références [15–17], l'interaction non linéaire a été réalisée dans un cristal de type 2. Dans ce cas, les ondes signal et idler ont des polarisations croisées. La détection de l'onde idler seule et la réjection du signal se font alors au moyen d'un polariseur.

Dans le cas de l'échantillonnage de signaux de fluorescence nous avons plutôt privilégié le choix d'un accord de phase de type 1 pour bénéficier également de la non-criticité de l'accord de phase vis-à-vis de la longueur d'onde du signal (*cf* chapitre 1, § 1.2.3). Les ondes signal et idler ayant la même polarisation, la détection de l'onde idler seule et la réjection du signal

sont alors assurées par l'utilisation de deux filtres interférentiels.

D'après les lois de conservation d'énergie (cf équation 1.8, chapitre 1 § 1.2.1), l'onde idler est générée à la longueur d'onde λ_i donnée par :

$$\lambda_i = \frac{\lambda_s \lambda_p}{\lambda_s - \lambda_p} \quad (4.12)$$

Cette onde est la réplique de la partie du signal synchrone avec la pompe.

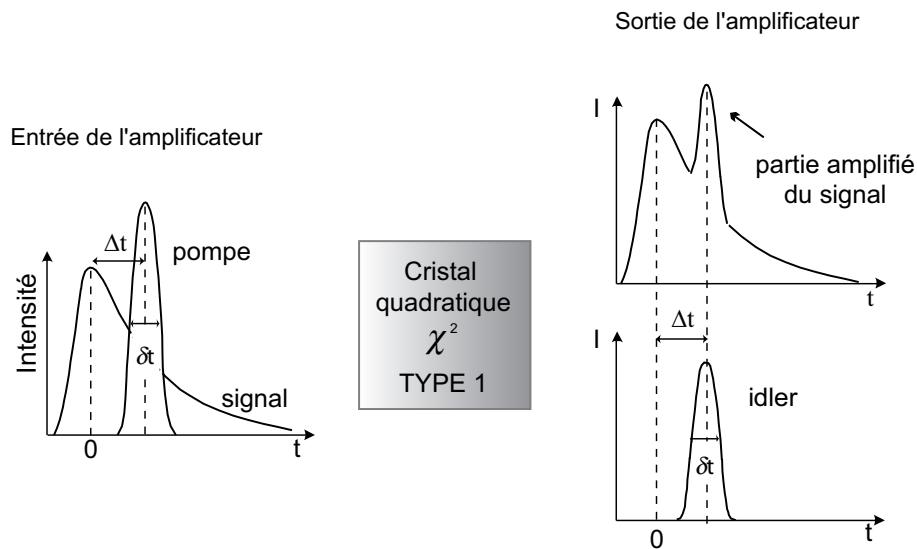


FIG. 4.4 – A l'entrée de l'amplificateur, l'impulsion pompe est synchronisée sur le signal de fluorescence avec un délai Δt . A la sortie, l'onde idler est la réplique de la partie amplifiée du signal et a la même largeur temporelle que l'impulsion pompe δt .

Puisque les signaux de fluorescence sont émis sur une centaine de nanomètres, il est possible de sélectionner, au moyen d'un filtre interférentiel, une longueur d'onde signal λ_s située à côté de la dégénérescence ($2\lambda_p$) telle que $\lambda_s = 2\lambda_p - \Delta\lambda$ (figure 4.5). La porte temporelle est alors obtenue en détectant l'onde idler au moyen d'un deuxième filtre interférentiel centré sur la longueur d'onde $\lambda_i \simeq 2\lambda_p + \Delta\lambda$ (équation 4.12).

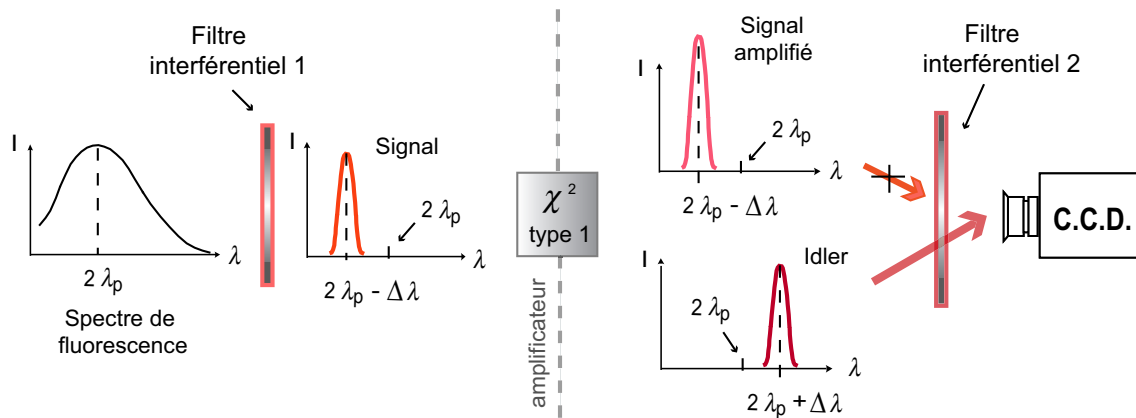


FIG. 4.5 – Pour un cristal de type 1, la détection de l'onde idler et la réjection du signal est obtenue grâce à deux filtres interférentiels. Le premier, centré par exemple sur $2\lambda_p - \Delta\lambda$, sélectionne une longueur d'onde signal et le second centré sur $\lambda_p + \Delta\lambda$ permet la détection de l'onde idler seule.

4.4 Protocole d'exploitation des images

L'échantillonnage temporel du signal de fluorescence est réalisé en modifiant le délai entre l'impulsion pompe et le signal de fluorescence (figure 4.6).

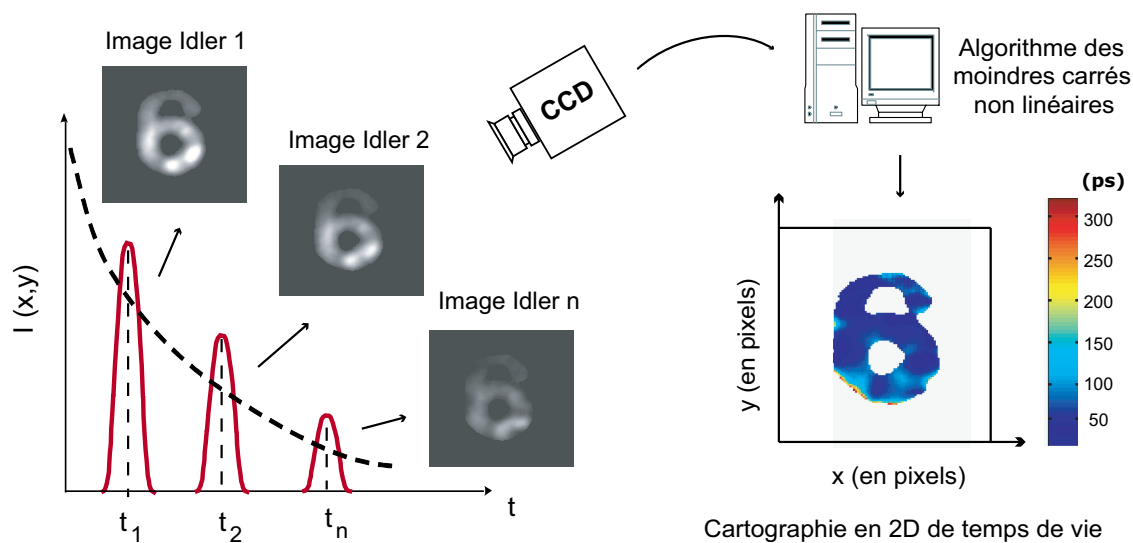


FIG. 4.6 – Principe d'obtention d'une cartographie 2D de temps de vie de fluorescence par amplification paramétriques d'images.

Ainsi, plusieurs images formées par l'onde idler d'intensité décroissante au cours du temps sont enregistrées sur la caméra CCD. La cartographie de temps de vie de fluorescence est obtenue en appliquant à chaque pixel d'une série d'image un algorithme des moindres carrés non linéaire.

Cette technique d'obtention de cartographie 2-D permet la mesure de temps de vie, d'un ou de plusieurs fluorophores, en chaque point de l'image.

Bibliographie

- [1] D. Hulin, A. Migus, A. Antonetti, I. Ledoux, J. Badan, J. Oudar et J. Zyss, "Parametric amplification sampling spectroscopy of luminescence at the subpicosecond time scale in the 1-1.6 μm spectral range", *Appl. Phys. Lett.*, **49**, pp. 761 (1986).
- [2] G. Bruhat, *Cours de physique générale - Optique (pp.827-840)*, Masson, Paris, 6^e édition (1965).
- [3] J. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic, Plenum publishers, New York, 2^e édition (1999).
- [4] G. Agrawal, *Non linear fiber optics (pp. 247-252)*, Academic Press, San Diego, 2^e édition ().
- [5] L. Wang, P. Ho et R. Alfano, "Time-resolved Fourier spectrum and imaging in highly scattering media", *Appl. Opt.*, **32**, pp. 5043 (1993).
- [6] C. Dunsby et P. French, "Techniques for depth-resolved imaging through turbid media including coherence-gated imaging", *J. Phys. D : Appl. Phys.*, **36**, pp. 207 (2003).
- [7] X. Liang, L. Wang, P. Ho et R. Alfano, "Two-dimensional Kerr-Fourier imaging of translucent phantoms in thick turbid media", *Appl. Opt.*, **34**, pp. 3463 (1995).
- [8] Y. Kanematsu, H. Ozawa, I. Tanaka et S. Kinoshita, "Femtosecond optical Kerr-gate measurement of fluorescence spectra of dye solutions", *J. Lumin.*, **87-89**, pp. 917 (2000).
- [9] J. Takeda, K. Nakajima, S. Kurita, S. Tomimoto, S. Saito et S. Suemoto, "Femtosecond optical Kerr-gate fluorescence spectroscopy for ultrafast relaxation processes", *J. Lumin.*, **87-89**, pp. 927 (2000).
- [10] R. Boyd, *Nonlinear Optics (pp. 62-75)*, Academic Press, Inc., San Diego (1992).
- [11] Y. Karni, S. Jordens, G. D. Belder, G. Schweitzer, J. Hofkens, T. Gensch, M. Maus, F. D. Schryver, A. Hermann et K. Müllen, "Intramolecular evolution from a locally excited state to an excimer-like state in a multichromophoric dendrimer evidenced by a femtosecond fluorescence upconversion study", *Chemical Physics Letters*, **310**, pp. 73 (1999).
- [12] T. Fujino, T. Fujima et T. Tahara, "Femtosecond fluorescence dynamics imaging using a fluorescence up-conversion microscope", *J. Phys. Chem. B*, **109**, pp. 15327 (2005).

- [13] E. Lantz et F. Devaux, “The phase-mismatch vector and resolution in image parametric amplification”, *J. Opt. A. Pure Appl. Opt.*, **2**, pp. 362 (2000).
- [14] F. Devaux et E. Lantz, “Transfert function of spatial frequencies in parametric image amplification : experimental analysis and application to picosecond spatial filtering”, *Opt. Comm.*, **114**, pp. 295 (1995).
- [15] F. Devaux et E. Lantz, “Ultrahigh-speed imaging by parametric image amplification”, *Opt. Comm.*, **118**, pp. 25 (1995).
- [16] G. L. Tolguenec, *Imagerie à travers les milieux diffusants par amplification paramétrique optique*, Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté (1998).
- [17] G. L. Tolguenec, F. Devaux et E. Lantz, “Two dimensional time-resolved direct imaging through thick biological tissues : a new step toward noninvasive medical imaging”, *Opt. Lett.*, **24**, pp. 1047 (1999).

Résultats expérimentaux

5.1 Introduction

Ce chapitre présente les résultats expérimentaux relatifs à l'imagerie de temps de vie de fluorescence par amplification paramétrique d'images.

Dans un premier temps, nous caractériserons les fluorophores choisis. Ensuite, nous proposerons deux méthodes expérimentales permettant de mesurer les temps de vie caractéristiques de chaque fluorophore utilisé. Enfin, les résultats expérimentaux de l'imagerie de temps de vie de fluorescence seront présentés.

5.2 Présentation des fluorophores

5.2.1 Choix des colorants

Les fluorophores ont été déterminés en fonction des sources lasers utilisées (*cf* tableau 2.1, chapitre 2, § 2.4.1) tels que :

- leurs spectres d'absorption soient centrés sur la longueur d'onde d'excitation (*i.e.* 532 *nm* ou 527 *nm*),
- leurs spectres d'émission soient centrés sur la longueur d'onde correspondant à la dégénérescence (*i.e.* $2\lambda_p = 710 \text{ nm}$ ou 702 *nm*),
- leurs temps de vie soient inférieurs à 100 *ps*.

Ainsi, nous avons retenu les quatres colorants suivants [1] :

- la pyridine 2 ($M = 378 \text{ g.mol}^{-1}$),
- le styryl 7 ($M = 484 \text{ g.mol}^{-1}$),
- le styryl 8 ($M = 472 \text{ g.mol}^{-1}$),
- et le LDS 720¹ ($M = 526 \text{ g.mol}^{-1}$).

La plupart des molécules fluorescentes ont une structure de type aromatique (figure 5.1). Toutefois, certains composés aliphatiques² et acycliques (tyrosine, phénylalanine), ainsi que des structures comportant de nombreuses doubles liaisons conjuguées sont fluorescentes (acide parinarique) [2].

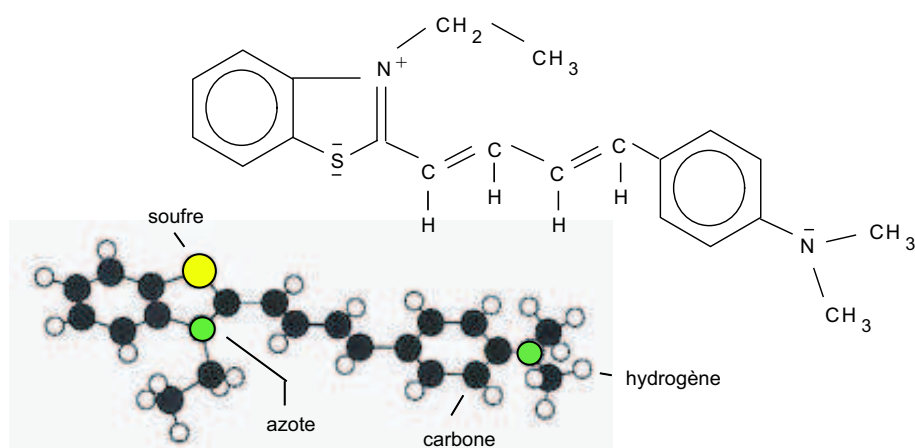


FIG. 5.1 – Structure d'une molécule fluorescente : le styryl 8.

En général, les fluorophores employés pour la spectroscopie résolue dans le temps sont des marqueurs qui peuvent fonctionnaliser des molécules biologiques et les rendre fluorescentes avec un temps de vie classiquement de l'ordre de la nanoseconde (par exemple la GFP ou *Green Fluorescent Protein* [3]). Notons que les fluorophores utilisés lors de nos expériences sont des colorants lasers dont les temps de vie sont de quelques dizaines de picosecondes.

¹ Nom donné par la société *Exciton*.

² Chaîne carbonée comprenant une fonction acide et amine et dépourvue d'hétéroatomes tels que le soufre ou l'azote.

5.2.2 Préparation des échantillons fluorescents

Fluorophores en solutions :

Les quatre colorants cités précédemment sont solubles dans le méthanol (CH_3) et l'éthanol (C_2H_5). Ainsi deux séries de solutions fluorescentes ont été réalisées : l'une avec le méthanol et l'autre avec l'éthanol dans une gamme de concentration variant de 10^{-4} à $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ suivant le fluorophore utilisé. Pour les expériences, les échantillons liquides ont été placés dans des cuves en verre d'épaisseur 2 mm (figure 5.2.a).

La concentration des solutions et l'épaisseur de la cuve affectent l'intensité transmise mais ne modifient ni le temps de vie, ni les spectres d'absorption et d'émission. La nature du solvant peut modifier ces paramètres si des réactions chimiques solvant-fluorophore se produisent.

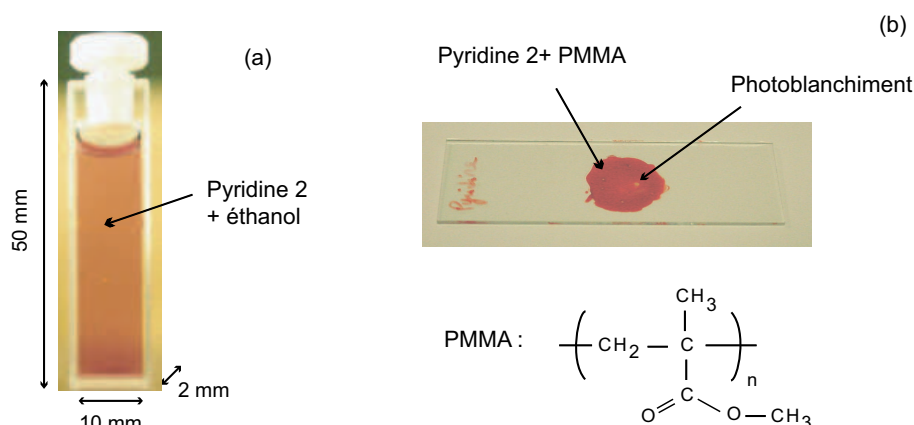


FIG. 5.2 – Echantillons fluorescents : (a) fluorophore en solution, (b) polymère dopé.

Polymères dopés :

Des échantillons solides ont été élaborés à partir d'un polymère (le PMMA³) ne présentant pas de fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation considérées. Les colorants sont dilués dans le PMMA afin d'obtenir quatre matrices PMMA-fluorophore contenant chacune 10 % de fluorophore. Les concentrations en fraction molaire ($\text{mol}\%$) sont calculées en fonction de la masse molaire du PMMA soit environ $0,003 \text{ mol}\%$ pour la pyridine 2 ; $0,004 \text{ mol}\%$ pour les styryl 7 et 8 ; et $0,005 \text{ mol}\%$ pour le LDS 720. Le solvant utilisé pour former ces matrices fluorescentes est le 1,2-dichloroéthane ($C_2H_4Cl_2$). Dans ce type de dilution, il n'y

³ Polyméthacrylate de méthyle.

a pas d'interaction entre le polymère et le fluorophore.

Nous allons voir dans quelle mesure le solvant réagit avec les molécules fluorescentes et modifie alors leurs propriétés d'émission, d'absorption et leurs temps de vie.

La figure 5.2.b montre le type d'échantillon utilisé pour la caractérisation des colorants : le polymère dopé est fixé sur une lamelle en verre par évaporation du solvant (séchage à l'étuve à 35° pendant 3h).

L'éclaircissement au centre de l'échantillon PMMA-pyridine 2 est lié au phénomène de photoblanchiment. Lorsque la molécule est à l'état excité, la probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques augmente, on parle alors de réactions photochimiques⁴ [2]. Le fluorophore perd alors ses propriétés de fluorescence. Autrement dit, quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une certaine proportion d'entre elles est détruite à chaque instant et par conséquent l'intensité de fluorescence décroît au cours du temps. Ce phénomène peut néanmoins être mis à profit pour mesurer la vitesse de diffusion moléculaire par la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (ou FRAP : *Fluorescence Recovery After Photobleaching*). En effet, si les molécules sont capables de se déplacer dans le milieu, la zone "blanchie" redevient progressivement fluorescente. La vitesse de déplacement des molécules dans le milieu est alors déterminée en analysant la cinétique de récupération de fluorescence.

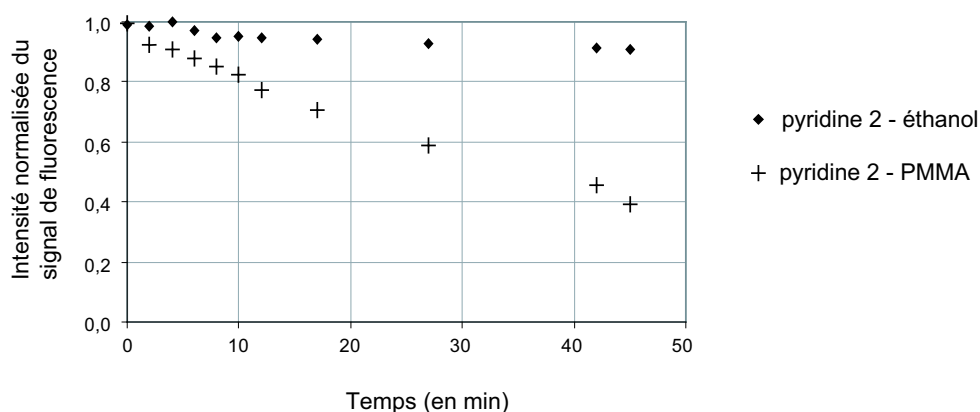


FIG. 5.3 – Mise en évidence du phénomène de photoblanchiment.

⁴ Oxydations sous forme de radicaux libres, dissociations, isomérisations...

La figure 5.3 montre l'effet d'une excitation prolongée sur les deux types d'échantillon réalisés (solution et polymère). Pour cette expérience, l'excitation est effectuée au moyen d'impulsions lasers délivrées à 532 nm avec une énergie d'environ 4 mJ (laser Nd :YAG). On remarque une dégradation rapide des molécules piégées dans l'échantillon solide.

5.2.3 Spectres d'absorption et d'émission

Spectres d'absorption

Les spectres d'absorption ont été réalisés au moyen d'une source de lumière blanche et d'un spectromètre piloté par un ordinateur (figure 5.4). Cette interface permet de choisir le pas du réseau (300 traits/mm⁻¹ ici), le balayage des longueurs d'onde, la vitesse de balayage et le nombre de mesures que l'appareil doit effectuer pour chaque longueur d'onde. Les longueurs d'onde maximales d'absorption ($\lambda_{max}^{absorption}$) et les largeurs des spectres mesurés ($\Delta\lambda_a$) pour chaque colorant dilué dans les différents solvants sont récapitulés dans le tableau 5.1.

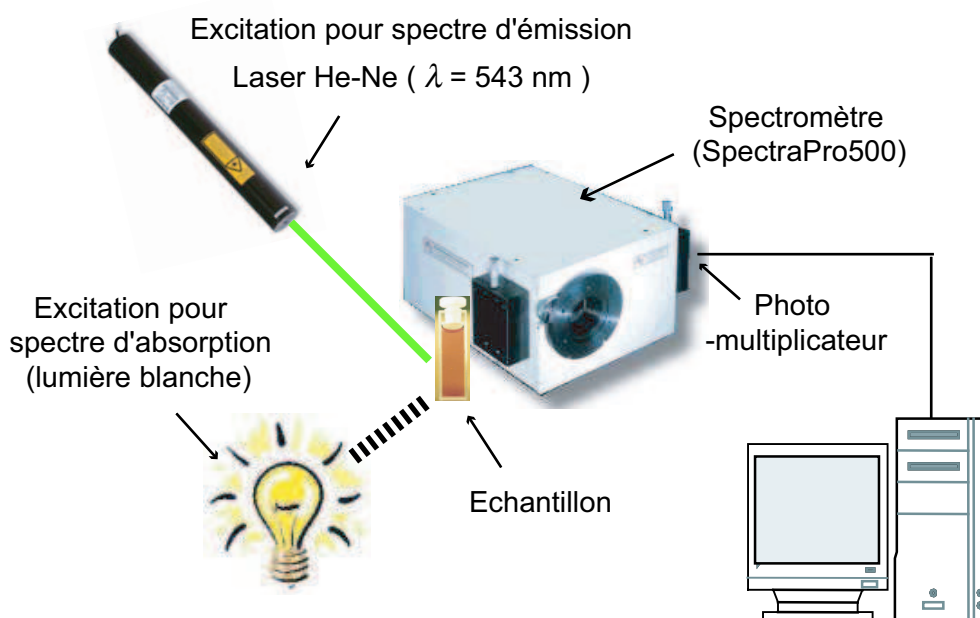


FIG. 5.4 – Montage expérimental relatif à l'acquisition des spectres d'absorption et d'émission.

Spectres d'émission

Les spectres d'émission étant indépendants de la longueur d'onde d'excitation, nous avons

5.2. PRÉSENTATION DES FLUOROPHORES

utilisé une source laser He-Ne continue ($\lambda = 543 \text{ nm}$) pour générer les signaux de fluorescence. Le spectromètre évoqué précédemment permet aussi d'acquérir les spectres d'émission. Les longueurs d'onde maximales d'émission ($\lambda_{max}^{emission}$) et les largeurs des spectres mesurés ($\Delta\lambda_e$) sont également récapitulés dans le tableau 5.1.

Echantillons	$\lambda_{max}^{absorption} \pm \Delta\lambda_a \text{ (nm)}$	$\lambda_{max}^{emission} \pm \Delta\lambda_e \text{ (nm)}$
Pyridine2-méthanol	505 \pm 50	690 \pm 40
Styryl7-méthanol	566 \pm 30	700 \pm 25
Styryl8-méthanol	504 \pm 50	705 \pm 35
LDS720-méthanol	527 \pm 45	685 \pm 35
Pyridine2-éthanol	503 \pm 50	700 \pm 40
Styryl7-éthanol	564 \pm 30	703 \pm 25
Styryl8-éthanol	505 \pm 50	708 \pm 35
LDS720-éthanol	530 \pm 45	692 \pm 35
Pyridine2-PMMA	500 \pm 25	735 \pm 25
Styryl7-PMMA	557 \pm 40	708 \pm 25
Styryl8-PMMA	512 \pm 50	714 \pm 20
LDS720-PMMA	540 \pm 40	700 \pm 30

TAB. 5.1 – *Tableau récapitulatif des longueurs d'onde maximales et des largeurs des spectres d'absorption et d'émission des colorants dilués dans les différents solvants.*

A titre d'exemple la figure 5.5 représente les spectres expérimentaux d'absorption et d'émission du mélange pyridine 2-méthanol ($2\Delta\lambda$ correspond à la largeur à mi-hauteur).

Remarque : ces résultats montrent que le solvant n'a pas ou peu d'effet sur la longueur d'onde d'absorption maximale mais modifie la longueur d'onde d'émission maximale. Plus les molécules du solvant sont volumineuses, plus les spectres sont décalés vers les longueurs d'onde élevées.

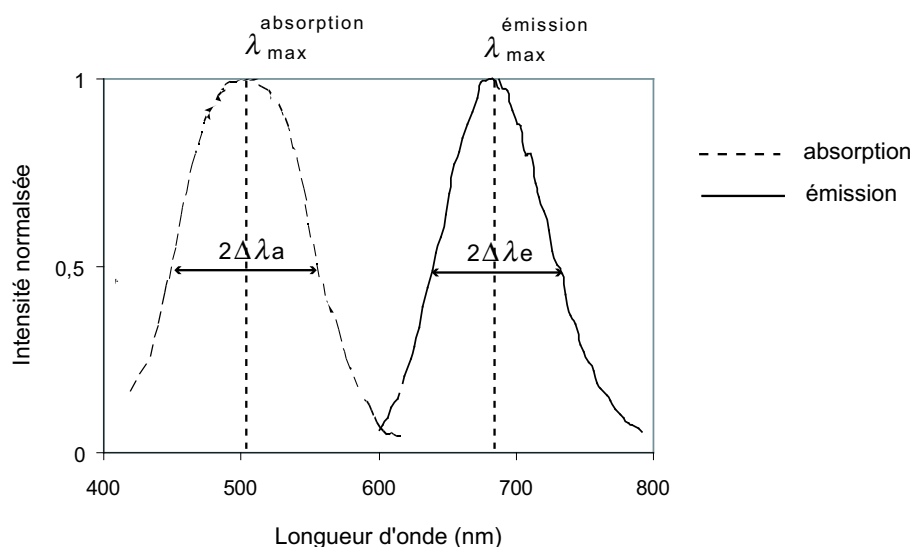


FIG. 5.5 – Spectre d'absorption et d'émission de la pyridine 2 en solution dans le méthanol.

5.3 Mesures de temps de vie

L'absence de référence bibliographique concernant les temps de vie des colorants sélectionnés pour les différents solvants utilisés a nécessité la mise en oeuvre d'une mesure des temps de déclin par une autre méthode afin de valider les mesures faites par amplification paramétrique optique. Compte tenu des temps de déclin brefs des colorants (< 100 ps), le choix d'une mesure avec une caméra à balayage de fente s'est imposé.

5.3.1 Mesures avec une caméra à balayage de fente

Dans un premier temps, les temps de vie des colorants sont mesurés avec une caméra à balayage de fente (ou *streak camera*). Le principe de ce type d'appareil a été exposé au chapitre 3 (§ 3.3.2). Le dispositif expérimental est schématisé sur la figure 5.6.

Le signal de fluorescence est généré à partir de la seconde harmonique du laser Nd :YAG ($\lambda = 532$ nm et $\delta t = 38$ ps). Le détecteur est composé de 384×512 photocathodes de surface 23×23 μm^2 et le signal vidéo est numérisé sur 12 bits. La vitesse de balayage sur l'écran varie de 50 à 2500 ps.mm⁻¹. En choisissant une vitesse d'écriture de 100 ps.mm⁻¹ la résolution temporelle est inférieure à 4 ps (un pixel correspond à un intervalle de temps de 1,09 ps pour le calibre 100 ps.mm⁻¹).

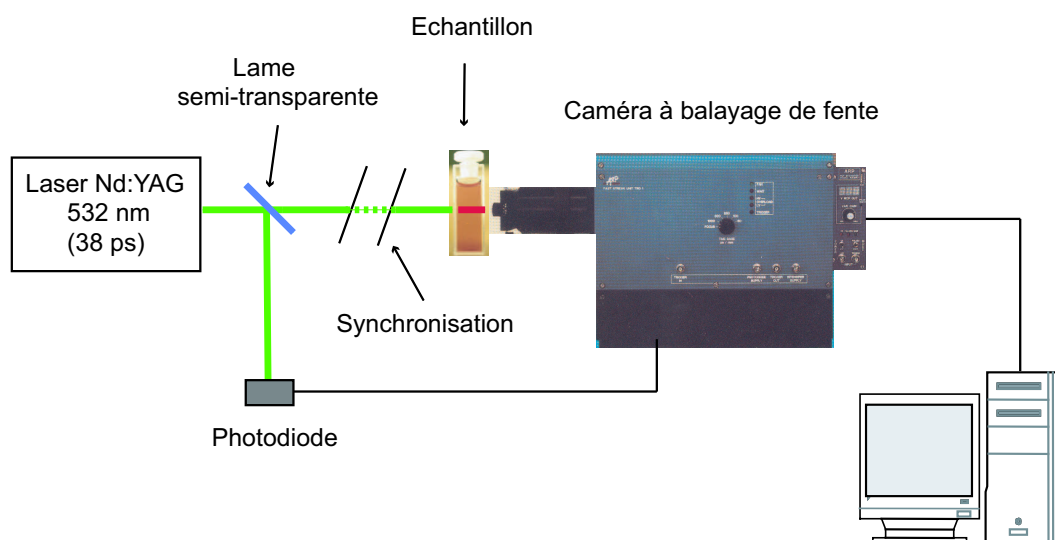


FIG. 5.6 – Mesures des temps de vie avec une caméra à balayage de fente.

La variation temporelle de l'intensité du signal lumineux est convertie en variation spatiale d'intensité (figure 5.7.a selon l'axe horizontal). La dimension verticale de la trace lumineuse est déterminée par la hauteur de la fente d'entrée de la caméra. Le profil temporel correspondant est représenté sur la figure 5.7.b. Les temps de vie de chaque fluorophore sont déterminés par régression linéaire et sont référencés dans le tableau 5.2 à la fin de ce paragraphe.

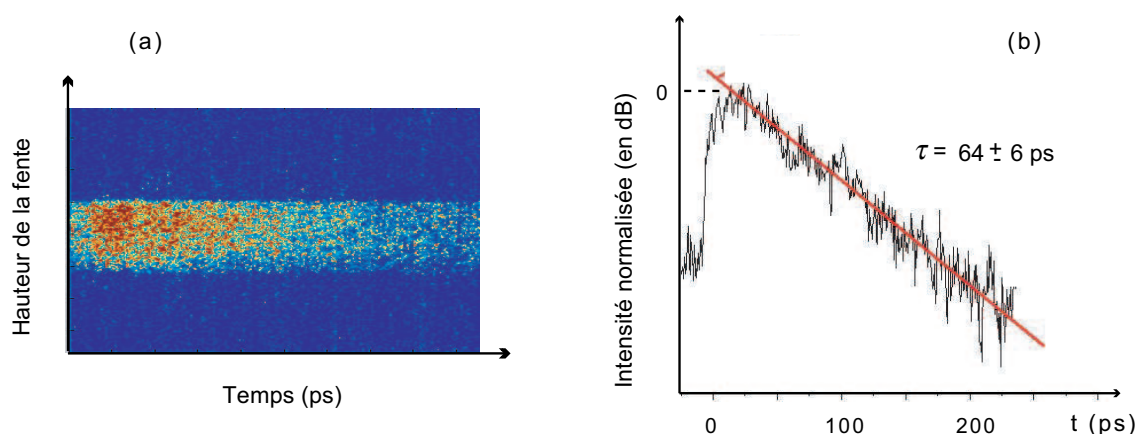


FIG. 5.7 – (a) Signal enregistré par la caméra à balayage de fente, (b) profil temporel permettant de déterminer le temps de vie par régression linéaire du styryl 7 dans le méthanol ($\lambda = 700 \text{ nm}$).

5.3.2 Mesures par amplification paramétrique optique (APO en champ lointain)

Cette deuxième méthode consiste à échantillonner les signaux de fluorescence au cours du temps grâce à l'amplification paramétrique optique. Le principe est décrit en détail dans le chapitre précédent. La résolution temporelle est donnée par la durée de l'impulsion pompe (20 ps à 355 nm pour le laser Nd :YAG). Rappelons que la longueur d'onde signal est sélectionnée au moyen d'un premier filtre interférentiel placé avant le cristal (*cf* montage expérimental, chapitre 2, figure 2.6) et que l'onde idler est détectée au moyen d'un deuxième filtre interférentiel adapté placé devant la caméra CCD. Ainsi, le temps de vie est calculé pour une longueur d'onde correspondant à λ_s (i.e. $700 \pm 3,6$ nm ou 720 ± 5 nm suivant l'ordre des filtres). Une ligne à retard est utilisée pour synchroniser les impulsions pompe et signal à l'entrée du cristal. Dans notre cas, l'ajustement de la ligne à retard s'effectue par translation d'un coin de cube.

Notons que cette ligne à retard est situé sur le trajet du faisceau excitateur pour éviter toute modification de la direction de propagation du faisceau pompe⁵ lors du déplacement relativement important du coin de cube (quelques centimètres). De plus, la forte puissance de l'onde pompe détériorerait le revêtement métallique des faces réfléchissantes des miroirs du coin de cube.

Une vingtaine d'images formées par l'onde idler et espacées de $\Delta t \simeq 13$ ps sont enregistrées sur la caméra avec une durée d'acquisition de 5 s pour chaque image⁶.

Pour cette expérience, la caméra est placée dans le plan focal de la dernière lentille (champ lointain) de manière à détecter le spectre des fréquences spatiales de la fluorescence paramétrique et de l'onde idler (*cf* chapitre 1, figure 1.11). Le nombre moyen de photons par mode spatio-temporel pour le signal incident (\bar{n}_{signal}^{in}) est calculé suivant le protocole exposé dans le chapitre 1 (équation 1.35). Les profils temporels sont alors obtenus à partir des valeurs \bar{n}_{signal}^{in} déterminées pour chaque colorant. Par exemple, la figure 5.8 représente les variations de \bar{n}_{signal}^{in} en fonction du délai induit par la ligne à retard pour le styryl 7 en solution dans le méthanol (à 700 nm). On remarque sur le graphique (a) que ce nombre moyen de photons

⁵ i.e. tout changement dans les conditions d'accord de phase.

⁶ Le temps d'acquisition des images doit être le même pour chaque position de la ligne à retard.

passé par un maximum correspondant à I_0 . Ce maximum doit être centré sur $t = 0$ (figure 5.8.b) afin de déterminer le temps de vie en appliquant un algorithme des moindres carrés non linéaires sur les valeurs expérimentales. Dans l'exemple considéré, le temps de vie vaut 60 ± 6 ps.

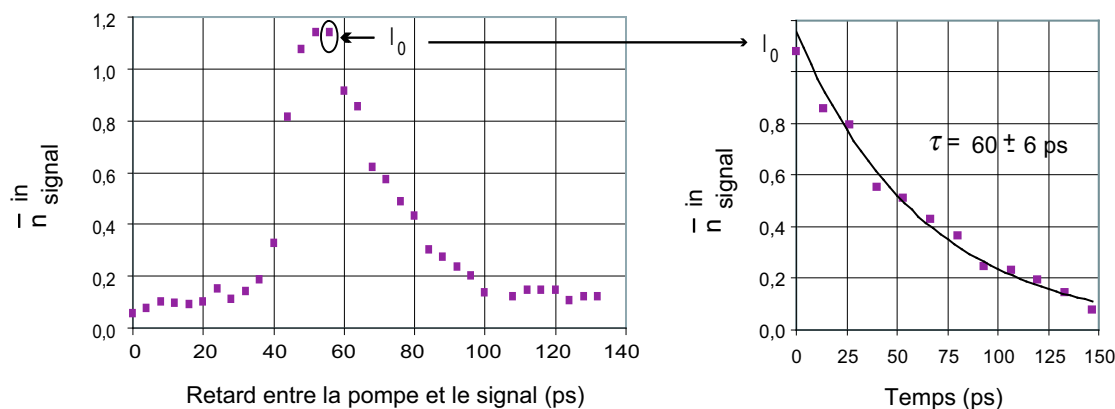


FIG. 5.8 – (a) Variation de \bar{n}_{signal}^{in} en fonction du retard entre l'onde pompe et le signal. (b) Estimation du temps de vie du styryl 7 dans le méthanol à 700 nm : $\tau = 60 \pm 6$ ps.

Les valeurs des temps de vie de chaque fluorophore en solution sont référencées dans le tableau 5.2. En raison du phénomène de photoblanchiment des échantillons de polymères dopés, les mesures de temps de vie n'ont pas pu être effectuées avec cette méthode.

Les résultats obtenus par les deux méthodes sont en bon accord. L'erreur relative sur ces mesures est d'environ 10 %.

Ces résultats montrent tout d'abord que les temps de vie augmentent avec la taille des molécules du solvant et que ces temps de vie dépendent de façon assez significative de la longueur d'onde considérée.

5.4 Imagerie de temps de vie par amplification paramétrique optique

Pour ces expériences d'imagerie de temps de vie de fluorescence, nous reprenons le dispositif expérimental décrit dans le chapitre 1 (§ 1.4.1) utilisé pour la mesure en champ proche

	<i>Streak camera</i> (ps)	<i>APO</i> (ps)
Pyridine2-méthanol à 700 nm	79	75
Styryl7-méthanol à 700 nm	64	60
Styryl8-méthanol à 700 nm	45	40
LDS720-méthanol à 700 nm	96	90
Pyridine2-méthanol à 720 nm	82	80
Styryl7-méthanol à 720 nm	66	65
Styryl8-méthanol à 720 nm	52	50
LDS720-méthanol à 720 nm	100	105
Pyridine2-éthanol à 720 nm	110	110
Styryl7-éthanol à 720 nm	68	70
Styryl8-éthanol à 720 nm	57	60
LDS720-éthanol à 720 nm	135	140
Pyridine2-PMMA à 720 nm	120	×
Styryl7-PMMA à 720 nm	110	×
Styryl8-PMMA à 720 nm	80	×
LDS720-PMMA à 720 nm	150	×

TAB. 5.2 – Tableau récapitulatif des temps de vie déterminés à partir d’une caméra à balayage de fente (colonne *Streak camera*) et de l’échantillonnage du signal de fluorescence par amplification paramétrique optique (colonne *APO*).

de luminance résolue spatialement.

Comme précédemment, il s’agit d’échantillonner temporellement le signal de fluorescence en faisant varier le retard entre la pompe et le signal et d’enregistrer sur une caméra CCD les images formées par l’onde idler correspondant à chaque retard.

Ensuite un algorithme de régression non linéaire (méthode de Gauss-Newton) est appliqué pixel par pixel pour chaque série d’images enregistrées permettant d’établir une image 2D du temps de vie de fluorescence de l’échantillon observé.

5.4.1 Images de temps de vie de fluorescence

Les expériences exposées ici ont été réalisées avec le laser Nd :YAG (durée de l'impulsion pompe : $\delta t_p \simeq 20 \text{ ps}$).

Images formées avec un seul colorant :

Pour cette expérience, une cuve contenant une solution de styryl 7 dans le méthanol (avec $\lambda_s = 700 \text{ nm}$ et $C = 2,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) éclaire une mire de résolution représentant un chiffre 6 (figure 5.9) [4]. Les énergies respectives du faisceau excitateur ($\lambda_s = 532 \text{ nm}$) et du faisceau pompe ($\lambda_s = 355 \text{ nm}$) sont de 4 mJ . Compte tenu du faible niveau du signal, les images sont enregistrées avec un temps d'acquisition de 5 s (*i.e.* 50 tirs lasers cumulés, *cf* chapitre 2).

Les images sont seuillées et masquées afin d'éviter les artéfacts de calcul et de délimiter les zones de l'image possédant un signal utile.

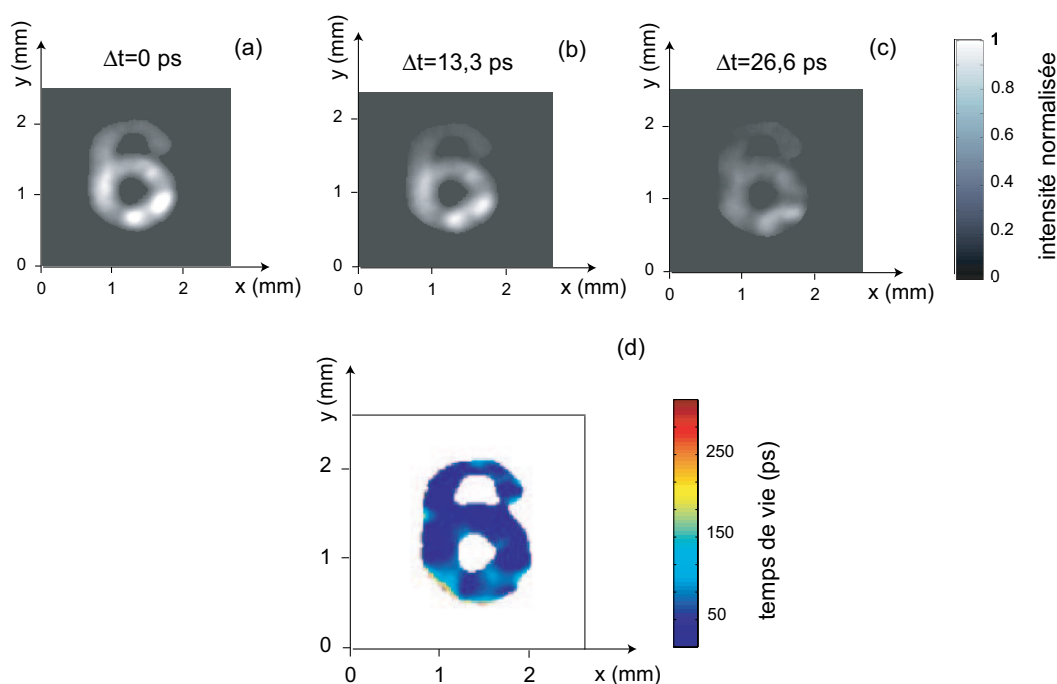


FIG. 5.9 – (a,b,c) Images formées par l'onde idler après soustraction de la fluorescence paramétrique respectivement à $\Delta t = 0, 13,3$ et $26,6 \text{ ps}$. (d) Cartographie du temps de vie du styryl 7 dans le méthanol à 700 nm : $\bar{\tau} = 71 \pm 33 \text{ ps}$.

La figure 5.9.a représente l'image de l'onde idler après soustraction de la fluorescence paramétrique correspondant au temps ($t = 0$). L'algorithme des moindres carrés non linéaires

a été appliqué pixel par pixel à 8 images enregistrées successivement avec une variation du retard par pas $\Delta t \simeq 13 \text{ ps}$. Le temps de vie moyen mesuré sur la cartographie 2D (figure 5.9.d) vaut $\bar{\tau} = 71 \pm 33 \text{ ps}$. La mauvaise précision sur cette mesure peut s'expliquer en partie par :

- les profils inhomogènes du faisceau laser excitateur et pompe induisant de fortes variations d'intensité dans les images enregistrées,
- les fluctuations d'intensité du laser d'un tir à l'autre,
- la limite de résolution temporelle liée à la durée de l'impulsion pompe (ici 20 ps).

Toutefois, le temps moyen calculé dans l'image est en bon accord avec les mesures données dans le tableau 5.2.

Images formées avec plusieurs colorants :

Nous avons réalisé une autre série d'expériences consistant à résoudre différents temps de vie sur la même image [5]. Dans un premier temps, deux capillaires de diamètre 1 mm remplis avec des solutions de styryl 7 et 8 dans de l'éthanol ($\lambda_s = 700 \text{ nm}$, $C = 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) sont placés horizontalement dans le plan focal du système afocal L_1l_2 . La figure 5.10.a représente la cartographie 2D de temps de vie de l'échantillon calculée à partir des images formées par l'onde idler ainsi que son profil vertical. Les temps de vie moyen sont respectivement 61 ps et 54 ps pour le styryl 7 et 8 avec un écart type de $\pm 5 \text{ ps}$.

La figure 5.10.b illustre la même expérience réalisée avec trois capillaires remplis de fluorophores en solution dans le méthanol ($\lambda_s = 720 \text{ nm}$, $C = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$). Le profil vertical de la cartographie de temps de vie permet de distinguer clairement les trois fluorophores. Les temps de vie moyens spécifiques de chacun des échantillons à 720 nm sont :

- $\bar{\tau} = 79 \pm 6 \text{ ps}$ pour la pyridine 2
- $\bar{\tau} = 41 \pm 4 \text{ ps}$ pour le styryl 8
- $\bar{\tau} = 97 \pm 8 \text{ ps}$ pour le LDS 720.

Afin de s'affranchir des inconvénients⁷ dus au rayon de courbure des capillaires contenant les fluorophores en solution, nous avons élaboré des échantillons constitués de plots contenant

⁷ Phénomène de photoblanchiment des solutions dû à la focalisation du faisceau excitateur à l'intérieur du capillaire.

5.4. IMAGERIE DE TEMPS DE VIE PAR AMPLIFICATION PARAMÉTRIQUE OPTIQUE

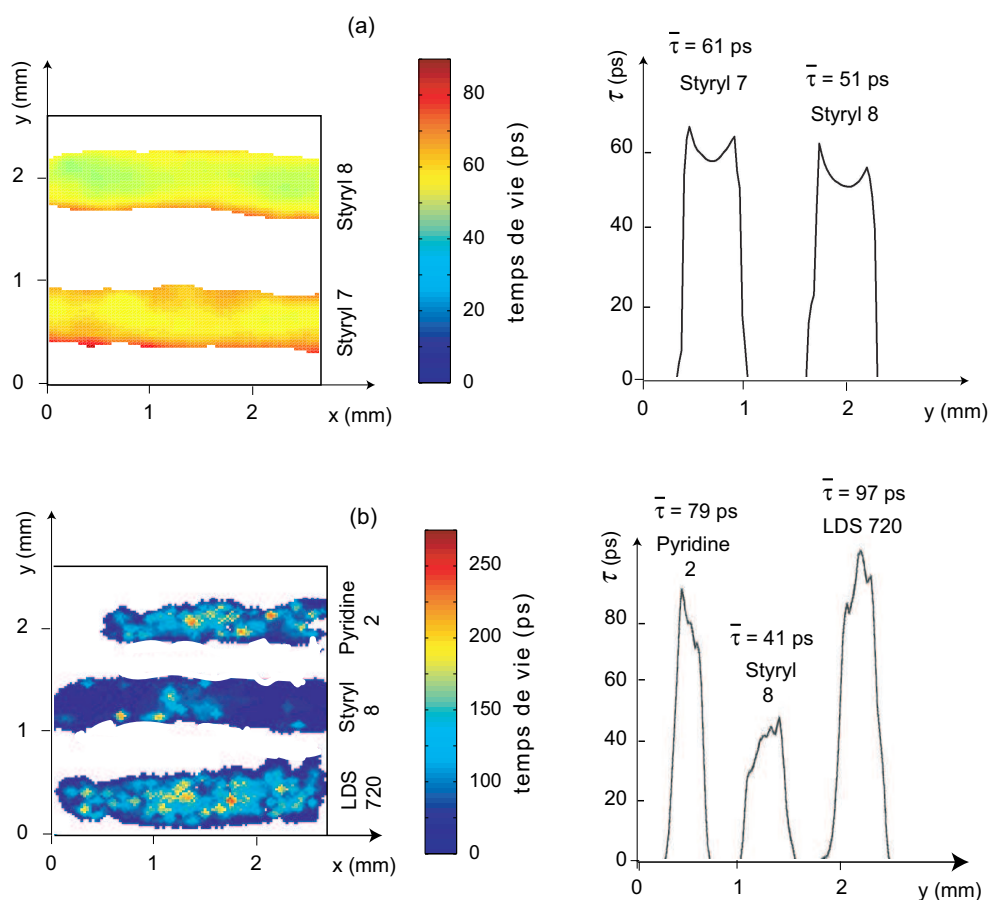


FIG. 5.10 – (a) Cartographie des temps de vie des styryl 7 et 8 dans l'éthanol à 720 nm. (b) Cartographie des temps de vie du styryl 8, du LDS 720 et de la pyridine 2 dans le méthanol à 720 nm.

chacun un colorant différent dilué dans une matrice de PMMA (figure 5.11) [5]⁸.

Les micro-ouvertures (plots) ont été réalisées dans un *wafer* silicium par photolithographie. Ce wafer a ensuite été collé par soudure anodique à une plaque de pyrex (figure 5.11.a). Il s'agit d'une soudure moléculaire verre(pyrex)/silicium permettant de coller le silicium sur un substrat en pyrex de 500 μm d'épaisseur. Le procédé consiste à mettre sous haute tension le silicium et le verre en chauffant l'ensemble à une température de 360°C. L'application d'une tension fortement négative à une extrémité du substrat en verre attire les ions Na^+ . A l'interface verre-silicium, apparaît alors une forte attraction électrostatique entre les ions Si^{4+} présents dans le silicium et les ions O^{2-} présents dans le verre. Ils se recombinent pour

⁸ Ces échantillons ont été élaborés au laboratoire avec l'aide de Bruno Wacogne.

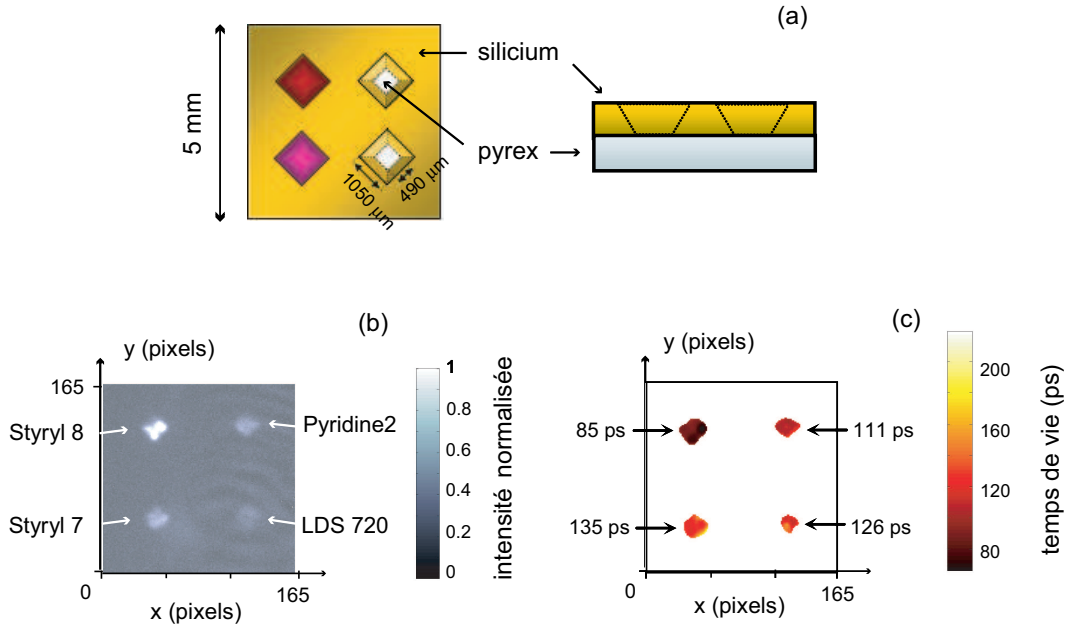


FIG. 5.11 – (a) *Echantillon fluorescent.* (b) *Image formée par l'onde idler.* (c) *Cartographie de temps de vie à 720 nm de différents polymères dopés.*

former de la silice SiO_2 assurant un lien permanent [6].

La figure 5.11.b correspond à une image formée par l'onde idler pour un temps d'acquisition de 2 s et un retard $\Delta t = 26,6$ ps. La cartographie de temps de vie à 720 nm est donnée par la figure 5.11.c, on obtient :

- $\bar{\tau} = 111 \pm 9$ ps pour la pyridine 2
- $\bar{\tau} = 85 \pm 8$ ps pour le styryl 8
- $\bar{\tau} = 135 \pm 18$ ps pour le styryl 7
- $\bar{\tau} = 126 \pm 12$ ps pour le LDS 720.

Remarque : tous les résultats présentés sont en accord avec les mesures faites dans le paragraphe § 5.3.

5.4.2 Résolution spatiale

Le but de cette expérience est d'imager sur le cristal un objet dont les dimensions sont de l'ordre de la limite de la résolution de l'amplification paramétrique optique. Nous avons vu dans le chapitre 2 (§ 2.4.2) que le nombre de points résolus dans une image amplifiée est

5.4. IMAGERIE DE TEMPS DE VIE PAR AMPLIFICATION PARAMÉTRIQUE OPTIQUE

déterminé par les conditions d'accord de phase, soit ici une résolution de $58 \times 58 \mu\text{m}^2$ avec le laser Nd :YAG (*cf* tableau 2.2, chapitre 2).

Ainsi, pour caractériser la résolution spatiale de cette méthode, nous utilisons un échantillon possédant des motifs de $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ imagé sur le cristal avec un grandissement de 1.

La figure 5.12.a représente l'échantillon réalisé par photolithographie sur une lame de saphir recouverte de chrome. Le mélange PMMA-Styryl 8 a été déposé par une technique de "spin-coating" sur la face chromée de l'échantillon.

L'image formée par l'onde idler (figure 5.12.b) étant résolue spatialement, la cartographie du temps de vie correspondant au polymère dopé ($\lambda_s = 720 \text{ nm}$) a pu être établie. Le temps de vie moyen sur cette image est de 40 ps avec un écart type de 18 ps . Cette cartographie n'est pas valable puisque le temps de vie associé au styryl 8 dans le PMMA vaut $\simeq 80 \text{ ps}$ (*cf* tableau 5.2). Là encore, cette différence peut s'expliquer par le phénomène de photoblanchiment.

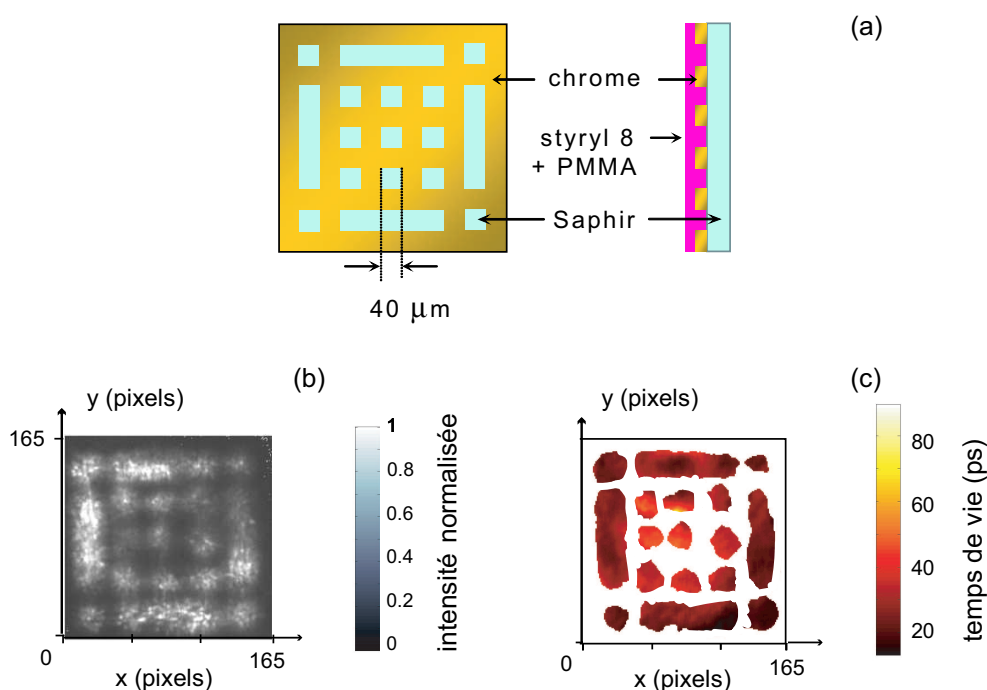


FIG. 5.12 – (a) Echantillon fluorescent. (b) Image formée par l'onde idler. (c) Cartographie de temps de vie du mélange PMMA-styryl 8 à 720 nm.

5.4.3 Résolution temporelle

Les expériences concernant la résolution temporelle ont été réalisées avec le laser Nd :verre pour lequel la durée de l'impulsion pompe est $\delta t_p \simeq 0,8 \text{ ps}$.

Afin d'évaluer les capacités de l'amplification paramétrique à résoudre des variations du temps de vie spécifique d'un fluorophore dans une gamme de temps de quelques dizaines de picosecondes, nous proposons de diluer des molécules de styryl 8 dans différents mélanges éthanol-méthanol⁹ et de mesurer la variation du temps de vie du colorant en fonction de la proportion d'éthanol (à $\lambda = 720 \text{ nm}$).

Les temps de vie sont calculés par échantillonnage en champ lointain (§ 5.3).

Les résultats représentés par la figure 5.13 correspondent à une estimation du temps de vie modélisé par une décroissance de type mono-exponentielle.

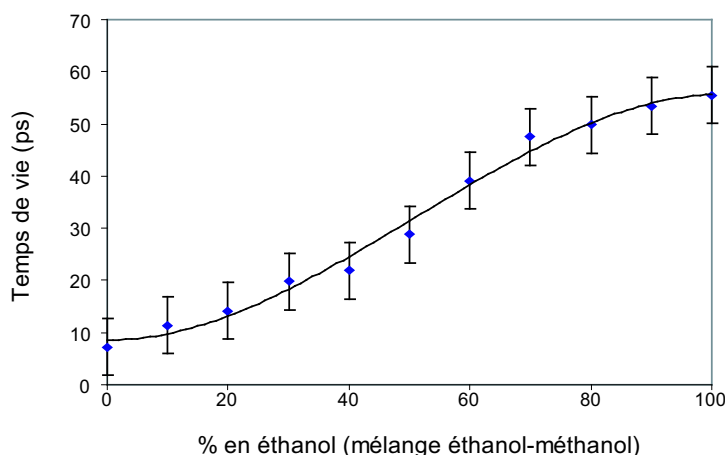


FIG. 5.13 – Variation du temps de vie du styryl 8 en fonction du pourcentage en éthanol (utilisation d'une solution éthanol-méthanol).

Cette méthode est valable dans le cas où le solvant est d'une seule espèce. En effet, dans le cas d'un mélange de deux solvants, les courbes expérimentales de variation de l'intensité en fonction du temps révèlent clairement un processus de désexcitation multi-exponentielle [2]. Ainsi pour un mélange 50% éthanol- 50% méthanol, la modélisation par une loi de type $I(t) = I_1(t)e^{-t/\tau_1} + I_2(t)e^{-t/\tau_2}$ donne :

$$I_1 = 0,06 \pm 0,02 \text{ et } \tau_1 = 16 \pm 5 \text{ ps}$$

⁹ Les proportions en éthanol varient de 0 à 100 %.

5.4. IMAGERIE DE TEMPS DE VIE PAR AMPLIFICATION PARAMÉTRIQUE OPTIQUE

$$I_2 = 0,05 \pm 0,02 \text{ et } \tau_2 = 52 \pm 2 \text{ ps}$$

où τ_1 et τ_2 correspondent bien aux temps de déclin respectifs du méthanol et de l'éthanol seul.

Toutefois, en considérant les résultats expérimentaux obtenus dans cette expérience, il est démontré que la limite de résolution temporelle des signaux de fluorescence est de l'ordre de grandeur de la durée de l'impulsion pompe et que cette méthode permet de mesurer avec une bonne précision des variations du temps de vie d'un fluorophore dans une gamme de temps de quelques dizaines de picosecondes.

Remarque : Le temps de vie mesuré pour le méthanol seul ($\simeq 7,5 \text{ ps}$) est beaucoup plus faible que celui mesuré précédemment avec le laser Nd :YAG (*i.e.* $\simeq 50 \text{ ps}$ cf tableau 5.2). Cela peut s'expliquer par le fait que l'intensité du signal de fluorescence résulte de la convolution par le profil temporel du faisceau exciteur (38 ps pour le Nd :YAG et 1 ps pour le Nd :verre). De plus, pour une mesure correcte du temps de vie, il est nécessaire que la durée de l'impulsion pompe soit brève (*i.e.* $\delta t_p < \tau$). La figure 5.14 montre la convolution de l'intensité d'un signal de fluorescence de durée de vie $\tau = 5 \text{ ps}$ avec le profil temporel du laser Nd :YAG (figure 5.14.a) et avec le profil du laser Nd :verre (figure 5.14.b).

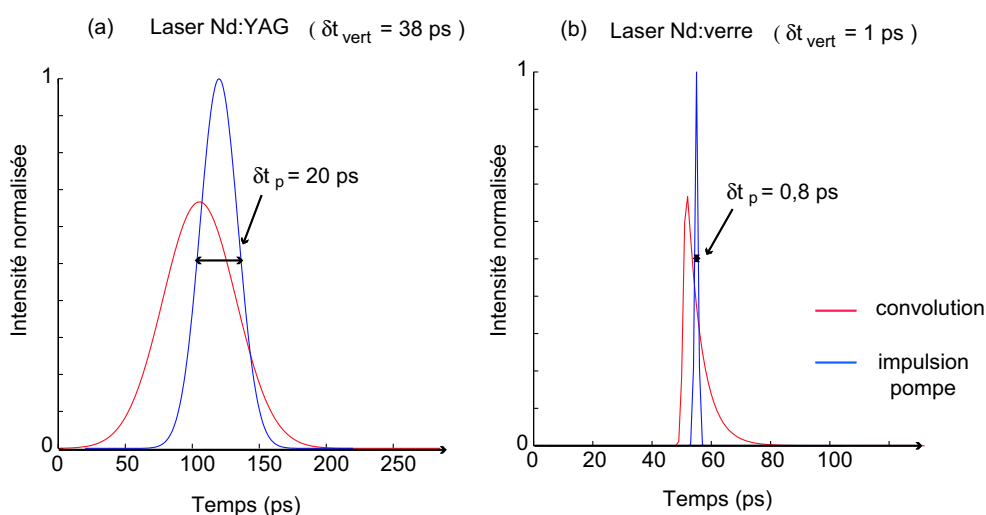


FIG. 5.14 – Comparaison des convolutions de l'intensité d'un signal de fluorescence de durée de vie $\tau = 5 \text{ ps}$ avec les profils temporels des lasers Nd :YAG (a) et Nd :verre (b) dont les durées des impulsions excitatrices sont respectivement 38 ps et 1 ps. La mesure du temps de vie est plus précise lorsque la durée de l'impulsion est brève (b).

Pour quantifier la résolution temporelle pour l'imagerie de temps de vie de fluorescence, nous reprenons l'expérience décrite en début de paragraphe 4.4.1 avec le laser Nd :verre et une cuve contenant du styryl 8 dans un mélange 20% éthanol- 80% méthanol. Cette cuve est placée devant les traits d'une mire de résolution.

La figure 5.15.a représente l'image formée par l'onde idler. D'après la cartographie de temps de vie (figure 5.15.b), les temps moyens calculés dans les zones délimitées par les traits de la mire sont respectivement : $\bar{\tau} = 11 \pm 2 \text{ ps}$, $\bar{\tau} = 14 \pm 4 \text{ ps}$ et $\bar{\tau} = 11 \pm 2 \text{ ps}$.

Ces valeurs sont en bon accord avec la valeur trouvée par la mesure en champ lointain, à savoir $\tau = 12 \pm 3 \text{ ps}$ (figure 5.13).

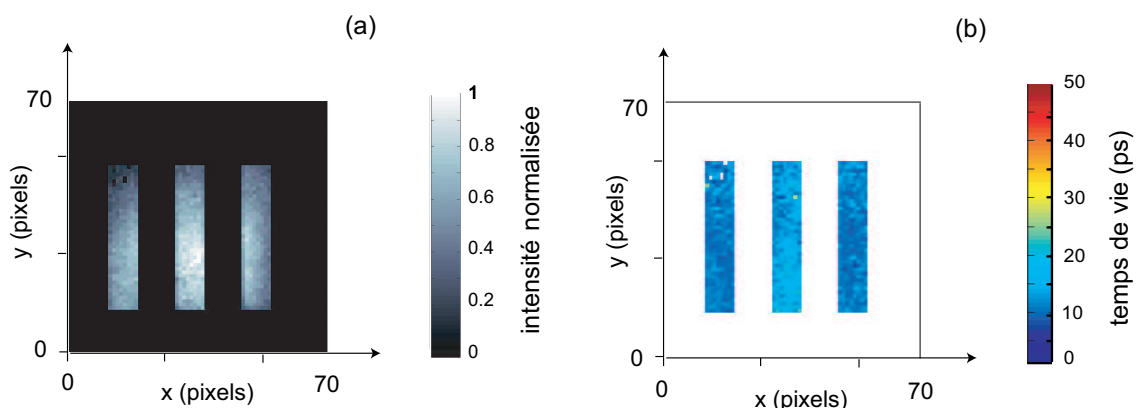


FIG. 5.15 – (a) Image formée par l'onde idler. (b) Cartographie du styryl 8 en solution dans un mélange 20 % éthanol-80 % méthanol à 720 nm.

Cette étude qualitative montre d'une part qu'il est possible de détecter de très faibles variations du temps de vie d'un fluorophore suite à une modification de son environnement avec une résolution temporelle de quelques picosecondes et d'autre part, elle montre qu'il est possible d'établir une cartographie du temps de déclin avec la même résolution temporelle. L'étape suivante, non réalisée ici faute de temps, sera de cartographier plusieurs temps de vie avec le laser Nd :verre (*i.e.* former une image avec plusieurs colorants (*cf* § 5.4.1)).

5.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré qu'il était possible d'obtenir des images de temps de vie de fluorescence en utilisant l'amplification paramétrique d'images.

Premièrement, nous avons présenté des résultats expérimentaux où plusieurs temps de vie inférieurs à 100 *ps* sont résolus sur une même image avec une résolution temporelle limite donnée par les durées des impulsions excitatrice et pompe (respectivement 38 *ps* et 20 *ps*). La limite de résolution spatiale définie par les conditions d'accord de phase a également été vérifiée expérimentalement.

Ensuite, nous avons amélioré la limite de résolution temporelle en utilisant un laser dont les durées des impulsions excitatrice et pompe sont d'environ 1 *ps*. Des mesures ainsi que des images de temps de vie variant dans une gamme temporelle d'une dizaine de picosecondes ont été réalisées.

Cette étude a fait l'objet de deux publications jointes en annexes [4, 5].

Bibliographie

- [1] <http://www.exciton.com> (1999).
- [2] J. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic, Plenum publishers, New York, 2^e édition (1999).
- [3] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward et D. Prasher, “Green fluorescent protein as a marker for gene expression”, *Science*, **263**, pp. 802 (1994).
- [4] S. Brustlein, F. Devaux et E. Lantz, “Picosecond fluorescence lifetime imaging by parametric image amplification”, *E.P.J. Appl. Phys.*, **29**, pp. 161 (2005).
- [5] S. Brustlein, F. Devaux, E. Lantz et B. Wacogne, “Fluorescence lifetime imaging on the picosecond timescale”, *Laser Physics*, **14**, pp. 238 (2004).
- [6] C. Chappaz, *Conception et réalisation de microsources lasers à semiconducteur à cavité externe utilisant des micro-actionneurs intégrés sur silicium*, Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté (2003).

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce mémoire regroupe l'étude théorique et expérimentale des limites de l'amplification paramétrique d'images de faible niveau et ses applications à l'imagerie de temps de vie de fluorescence.

Dans une première partie, nous avons montré qu'il était possible de détecter, avec un bon rapport signal à bruit, des images amplifiées issues d'une source incohérente avec un niveau moyen très inférieur à un photon par mode (10^{-2}) et ce malgré la présence de bruit dans les images détectées lié à l'amplification du bruit quantique. D'autre part, nous avons montré que ce bruit donnait accès à une calibration du gain d'amplification par mode spatio-temporel permettant d'obtenir une résolution spatiale de la luminance d'une source incohérente directement exprimée en nombre de photons par mode spatio-temporel.

Ensuite, la limite de détection de ces images de très faible niveau amplifiées a été étudiée. Nous avons montré par une étude statistique des fluctuations spatiales du bruit dans les images que le seuil de détection des images amplifiées dépendait du nombre de modes temporels cumulés lors de l'acquisition.

La deuxième partie de ce mémoire visait l'application de la propriété de porte optique temporelle de l'interaction paramétrique en régime impulsionnel à l'imagerie de temps de vie de fluorescence. En effet, il s'agit par cette méthode d'amplification paramétrique d'échantillonner dans le temps, au moyen d'une impulsion pompe très brève, un signal de fluorescence. La fonction de porte optique temporelle est dans ce cas assurée par la détection de l'onde idler seule qui est, d'un point de vue temporel, la réplique de la partie du signal synchrone avec la

pompe. Des cartographies 2D de temps de vie de signaux de fluorescence issus de différents types d'échantillons ont été réalisées à partir d'images formées par l'onde idler alliant à la fois une résolution spatiale définie par les conditions d'accord de phase et une résolution temporelle définie par la durée de l'impulsion pompe (dans le cas du laser Nd :verre, une résolution d'une picoseconde est obtenue).

Ainsi, différents temps de vie associés à différents fluorophores ont été résolus sur la même image dans une gamme de temps de quelques dizaines de picosecondes. De plus, nous avons montré qu'il était possible de détecter de très faibles variations (de l'ordre de la picoseconde) du temps de déclin d'un même fluorophore suivant son environnement chimique.

L'application de l'amplification paramétrique optique à l'imagerie de temps de vie de fluorescence présente l'avantage d'être sensible uniquement à une variation relative de l'intensité du signal au cours du temps. De plus, elle offre une bonne résolution temporelle (de l'ordre de la picoseconde suivant le type de laser) et une bonne sensibilité (détection d'images amplifiées avec moins d'un photon par mode à l'entrée du milieu amplificateur). Le principe de porte optique temporelle est réalisé en travaillant à la longueur d'onde idler, on s'affranchit ainsi du fond continu correspondant à l'intégration du signal non amplifié sur le détecteur.

L'inconvénient de cette méthode est que la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde de la pompe doivent être choisies en fonction des maxima d'absorption et d'émission des fluorophores (*i.e.* le laser est choisi en fonction du type de fluorophore à étudier). Le choix d'un cristal adapté aux longueurs d'onde considérées est alors fixé par les règles d'accord de phase. Toutefois, nous avons vu que l'utilisation d'un accord de phase de type 1 permettait l'analyse de signaux de fluorescence sur une large gamme de longueur d'onde centrée sur la dégénérescence. Ainsi, en choisissant un jeu de filtres interférentiels adapté, différentes longueurs d'ondes peuvent être étudiées pour un même échantillon fluorescent. D'autre part, le rapport signal à bruit des images détectées est altéré par le phénomène de fluorescence paramétrique. Notons que l'acquisition d'une image de cette fluorescence paramétrique seule permet ensuite par soustraction de ce bruit d'améliorer sensiblement le rapport signal à bruit des images formées par l'onde idler.

Les perspectives de ces travaux sont dans un premier temps l'observation de différents temps

CONCLUSION GÉNÉRALE

de vie de fluorescence dans une même image avec une résolution de l'ordre de la picoseconde (laser ND :verre).

Ensuite, nous proposons d'appliquer le processus de somme de fréquence à l'imagerie de temps de vie de fluorescence. En effet, cette méthode offre la même résolution temporelle que l'amplification paramétrique optique en s'affranchissant du bruit lié à la fluorescence paramétrique.

Publications

Fluorescence Lifetime Imaging on the Picosecond Timescale

S. Brustlein, F. Devaux, B. Wacogne, and E. Lantz

Laboratoire d'Optique PM Duffieux, UMR CNRS/Université de Franche-Comté 6603,
Besançon cedex, 25030 France

e-mail: sophie.brustlein@univ-fcomte.fr

Received September 18, 2003.

Abstract—Images of different fluorescence lifetimes have been obtained on the picosecond range using parametric image amplification. In this paper, we present results obtained with liquid and solid samples. For liquids, dye molecules are in solution, and for solids, dye molecules are embedded in a poly(methylmethacrylate) matrix (PMMA). The objective of this study is to resolve different short lifetimes without scanning the sample. The temporal resolution corresponds to the pump pulse duration (about 20 ps in our case). The spatial resolution issue is achieved with micromachined samples.

1. INTRODUCTION

Since fluorophores have many characteristics that vary with their local environment, they are frequently used in several domains, such as medicine or microbiology. Typically, measurement of the absorption or emission spectra, fluorescence lifetime, quantum yield, anisotropy, etc., can give information about the interaction processes between different molecules in tissues or cells [1].

In this paper, we focus on the investigation of an optical system concerning fluorescence lifetime imaging. Numerous techniques using gated or modulated image intensifiers can resolve images with lifetimes of about a few hundred picoseconds. Time correlated single photon counting (TCSPC) is frequently used and detects lifetimes down to a few tens of picoseconds. However, TCSPC imaging systems require a scanning device which may be unsuitable in the case of *in vivo* measurements. Therefore, we have developed a fluorescence lifetime imaging system which can resolve lifetimes down to 100 ps and which avoids the use of such awkward scanning apparatuses.

In Section 2, we explain the principle of time-gate imaging by parametric image amplification applied to lifetime imaging. In Section 3, the experimental setup is described and experimental results are presented.

2. PARAMETRIC IMAGE AMPLIFICATION

2.1. Amplification of the Fluorescence Signal

Several nonlinear processes have been applied to imaging, such as second-harmonic generation [2], up conversion [3], and the optical Kerr gate [4]. Parametric image amplification has been used already for imaging through thick biological tissues [5]. This three-wave mixing interaction is achieved when a strong pump pulse is phase matched with a weak input signal in a quadratic crystal [6]. Figure 1 shows the principle of parametric amplification of images of an object emitting fluorescence light. The first graph at the input of

the amplifier represents the intensity of the emitted fluorescence versus time. After reaching its maximal value at time $t = 0$, the intensity decreases exponentially following the equation $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$, where τ is the lifetime constant of the dye. If the pump pulse superimposes the signal in the crystal by respecting the phase matching conditions, only the part of the signal synchronized with the pump pulse is amplified [7]. According to the energy conservation, a third wave, called an idler wave, is generated only during the pump pulse. This wave can be considered as a replica of the amplified part of the signal. When only the idler wave is detected, parametric amplification acts as an optical temporal gate.

2.2. Construction of the Fluorescence Lifetime Map

Measurement of the lifetime τ is performed by sampling the fluorescence signal at different delays. Since the amplification gain remains constant, the intensity of the images formed by the idler wave are recorded on a CCD camera. Then, the fluorescence lifetime map is reconstructed by applying a nonlinear least mean-square algorithm to these images. In this way, each pixel of the two-dimensional map represents a lifetime. With this technique, the temporal resolution of this optical time-gated system is given by the pump pulse duration as the CCD images.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Experimental Setup

A frequency doubled and tripled Q-switch Nd:YAG laser delivering pulses at 532 and 355 nm (38 and 20 ps, respectively) at a repetition rate of 10 Hz is used (see Fig. 2). First, the green light crosses a delay line (to perform synchronization of the signal and the pump pulses in the crystal) and illuminates the sample in order to generate a fluorescence signal at around 710 nm. Then, the sample is imaged on the crystal by means of a telescope system L_1L_2 with a magnification of 0.75. Simul-

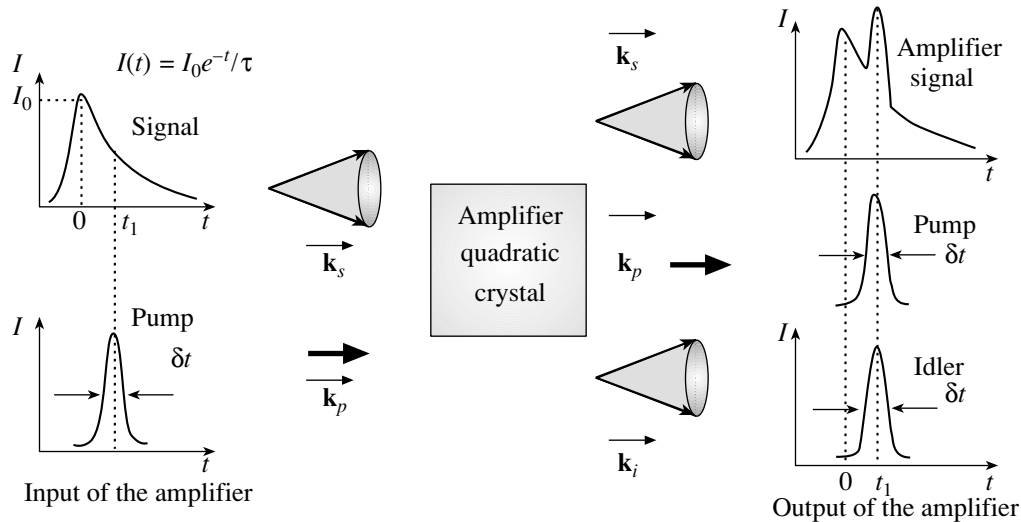


Fig. 1. Parametric amplification of the image of an object emitting fluorescence light. The pump pulse is synchronized with the fluorescence signal. \mathbf{k}_s and \mathbf{k}_p represent the wave vectors associated with the input image and pump plane wave, respectively. At the output, only the part synchronized with the signal is amplified. According to the energy conservation, a third wave, called an idler wave, is generated only during the pump pulse. This wave can be considered a replica of the amplified signal part.

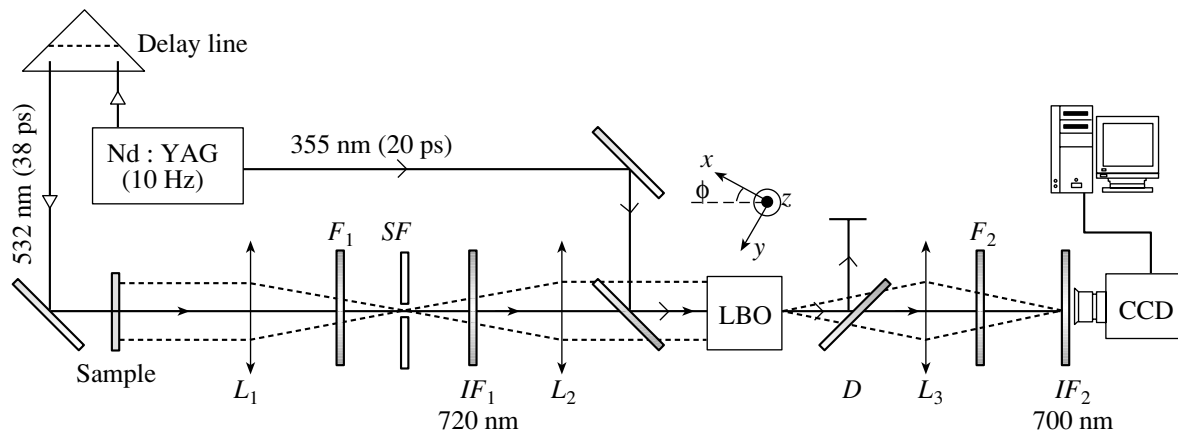


Fig. 2. Experimental setup: absorbing filters $F_{1,2}$, interferential filters $IF_{1,2}$, dichroic mirrors D , and spatial filter SF .

taneously, the UV pump beam illuminates the crystal in order to amplify the fluorescence signal and generate the idler wave. Images are recorded with a cooled CCD camera (512 × 512 pixels, pixel size 24 × 24 μm, quantum efficiency 85% at 700 nm, dark current 1.3 electrons/pixel/s at −40°C).

In our experiment, the quadratic crystal is a triborate lithium crystal (LiB_3O_5) designed for a type-1 colinear phase matching in the XY plane between a pump wave at $\lambda_p = 355$ nm and a signal wave at $\lambda_s = 710$ nm. Hence, we choose some dyes that absorb green light and that emit some fluorescence light around 710 nm. Upon degeneracy, type-1 amplifiers preserve phase matching over wide wavelength and angular ranges [8]. This leads to the amplification of polychromatic images with the best spatial resolution. In our case, fluorescence sig-

nal emitted over the 690–730 nm wavelength range can be amplified. As the signal and idler wave have the same polarization in type-1 configuration, two narrow-band interferential filters (IF_1 , IF_2) are used to separate them. The first selects a signal wavelength centered on $\lambda_s = 720$ nm ($\Delta\lambda_{\text{FWHM}} = 5$ nm), and the second isolates the idler wave at the corresponding wavelength defined by energy conservation $\lambda_i = (1/\lambda_p - 1/\lambda_s)^{-1} = 700$ nm ($\Delta\lambda_{\text{FWHM}} = 3$ nm). Finally, the residual green light and ultraviolet are absorbed by the colored filters F_1 and F_2 .

3.2. Experimental Results

The sample consists of two capillaries filled with two different kinds of styryl [9] in solution in ethanol ($c = 10^{-3}$ M). Figure 3a shows the image of the two cap-

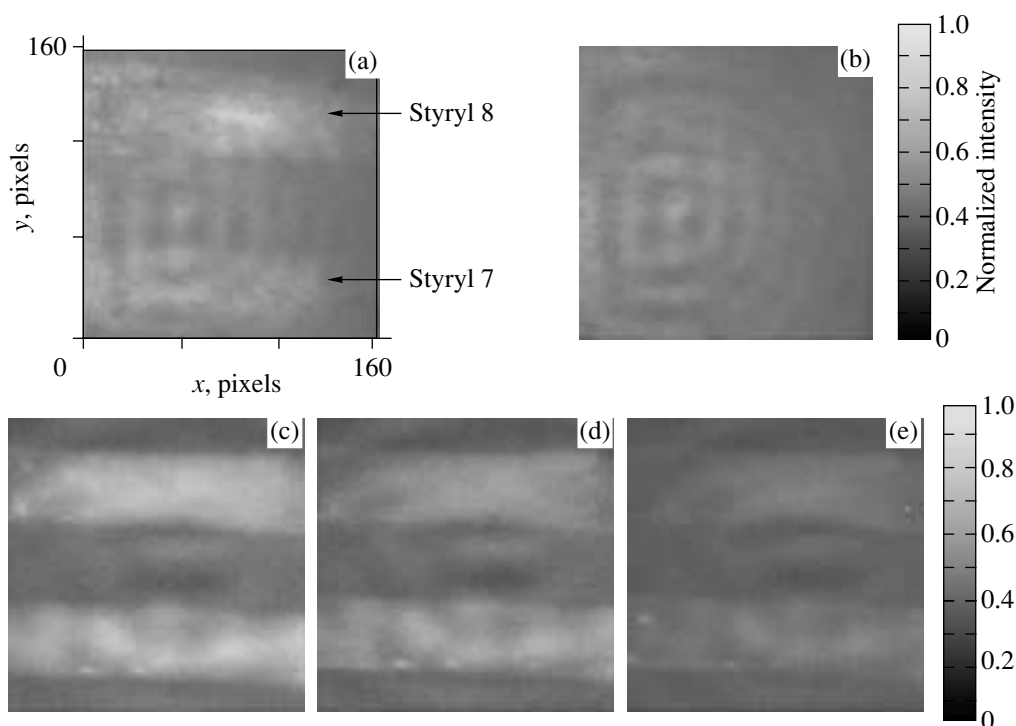


Fig. 3. Experimental results: (a) image formed by the idler with spontaneous parametric down conversion (SPDC), (b) image of SPDC, and (c, d, e) images formed by the idler wave after subtracting SPDC recorded at delay time $t = 0, 26.6,$ and 40 ps, respectively.

illaries formed by the idler wave. These microtubes containing the dyes are practically undetectable in this images because of the presence of spontaneous parametric down conversion (SPDC) corresponding to the amplification of quantum noise in the crystal [10]. This phenomenon is inherent to the parametric interaction and cannot be suppressed. Figure 3b shows an image of the SPDC with no input signal. Intensity fluctuations

observed in these images are due to diffraction patterns in the pump beam. However, the signal-to-noise ratio of the useful signal is improved by subtracting the SPDC image. Figures 3c, 3d, and 3e show images of capillaries formed by the idler wave where SPDC is subtracted and for the delay $t = 0, 26.6,$ and 40 ps, respectively. Then, the lifetime map is obtained by applying the least mean-square algorithm to these images (Fig. 4). The average lifetimes measured at 720 nm are 61 and 54 ps for styryl 7 and 8, respectively, with a standard deviation of 5 ps.

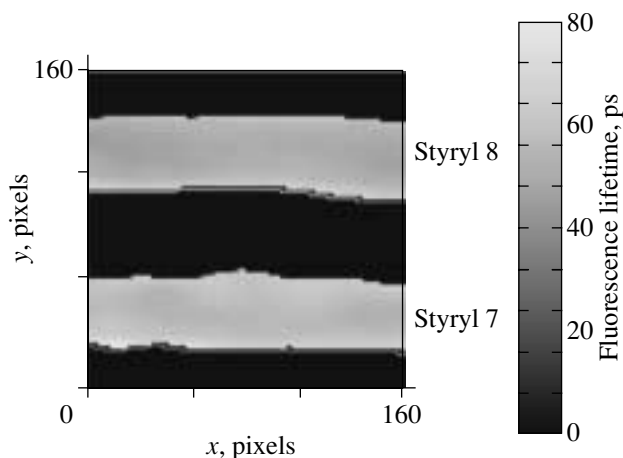


Fig. 4. Fluorescence lifetime map at 720 nm of styryl 7 and 8 in ethanol ($\tau_{\text{styryl 7}} = 61 \pm 5$ ps, $\tau_{\text{styryl 8}} = 54 \pm 5$ ps).

Figure 5a corresponds to the lifetime map of three capillaries filled with other kinds of dyes in solution in methanol ($c = 10^{-4}$ M). The distinction of each specific lifetime is clearer on the vertical profile (Fig. 5b). The average lifetimes (at 720 nm) are 79 ± 6 ps for pyridine 2, 41 ± 4 ps for styryl 8, and 97 ± 8 ps for LDS 720 [9]. This result also demonstrates that variation in the lifetime due to the use of different solvents can be resolved with this method (54 and 41 ps for styryl 8 in ethanol and methanol, respectively). Note that all the results presented in this paper are in good agreement with the lifetimes measured with a streak camera.

Since the image acquisition was perturbed by the curvature of the capillaries that were 1 mm in diameter, we fabricated micromachined samples (Fig. 6a). To achieve three-dimensional windows, microapertures are opened in silicon wafers by the photolithography process and are then anodic-bounded to a Pyrex plate.

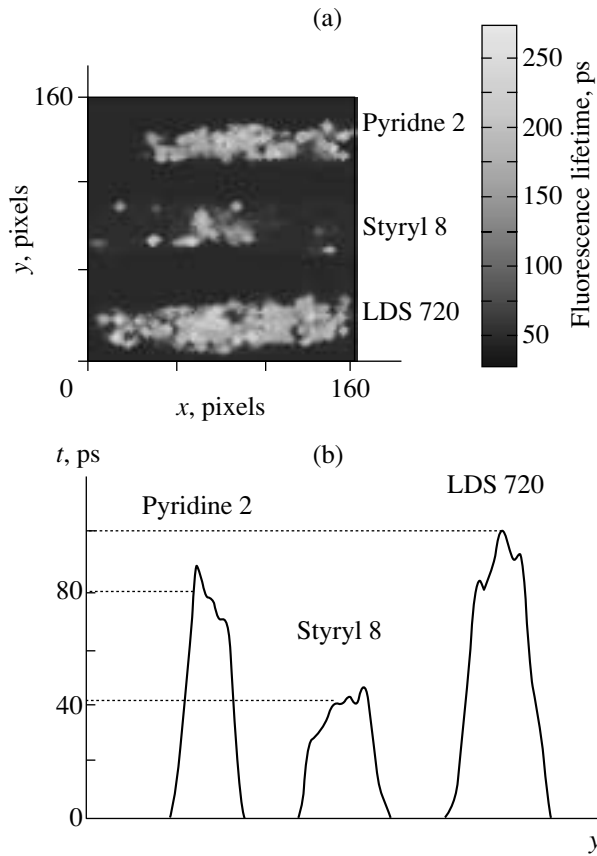


Fig. 5. (a) Fluorescence lifetime map at 720 nm of pyridine 2, styryl 8, and LDS 720 in methanol ($\tau_{\text{pyridine 2}} = 79 \pm 6$ ps, $\tau_{\text{styryl 8}} = 41 \pm 4$ ps, $\tau_{\text{styryl 8}} = 97 \pm 8$ ps). (b) Vertical profile of the previous lifetime map.

Fluorescent doped polymers are therefore necessary for this other experiment relative to the temporal resolution of different lifetimes in the same image. Several samples containing different kinds of dye embedded in PMMA were prepared in order to realize a rigid fluorescent system. The concentration of dye is calculated in mol % with respect to the molecular weight of the PMMA, and both dye and PMMA were dissolved in 1,2-dichloroethane (0.004 mol % styryl 8, 0.005 mol % LDS 720, 0.003 mol % pyridine 2, 0.004 mol % styryl 7).

Then, the 3D windows are filled with the doped polymers, which become rigid following the slow evaporation of the solvent. The image formed by the idler at $\lambda_i = 700$ nm (Fig. 6b) shows the disposition of the different dyes (styryl 8 and 7, pyridine 2, LDS 720). The corresponding lifetime map is given in Fig. 6c. Four different lifetimes are measured in this map: 85 ± 8 ps for styryl 8, 135 ± 18 ps for styryl 7, 111 ± 9 ps for pyridine 2, and 126 ± 12 ps for LDS 720 (these values are in good agreement with results obtain with the streak camera).

The last experiment described here concerns the issue of spatial resolution. A mix of Styryl 8 embedded

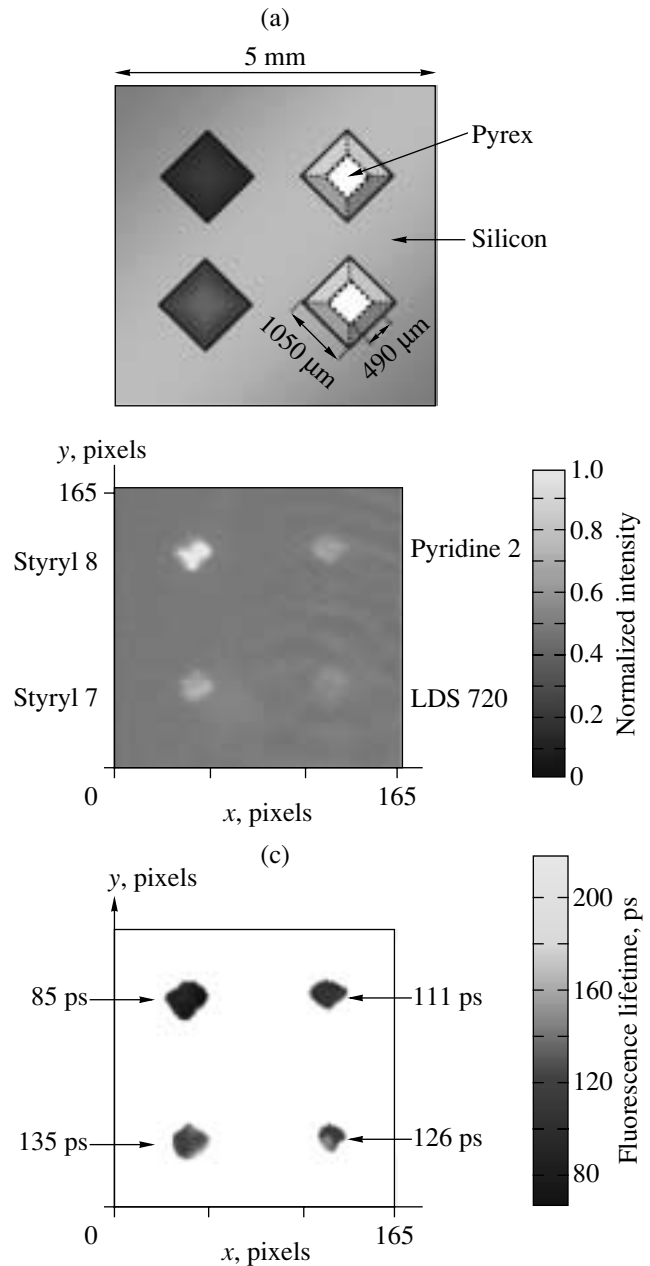


Fig. 6. (a) Micromachined sample containing four doped PMMA polymers: styryl 8, styryl 7, pyridine 2, and LDS 720. (b) Idler without SPDC recorded at 700 nm. (c) Corresponding lifetime map at 720 nm.

in PMMA is spin-coated on the chromium face of a micromachined sample with $40 \mu\text{m}$ square apertures (Fig. 7a). According to the phase matching condition, parametric amplification acts as a low pass filter and limits the resolution of the amplified image. With a 10-mm-long LBO crystal, the resolution is about 10 mm^{-1} on the crystal. Since the cross section of the crystal is 5×5 mm, it gives an amplified image of 50×50 points resolved in the crystal (this number is a constant). This means that amplified images of very

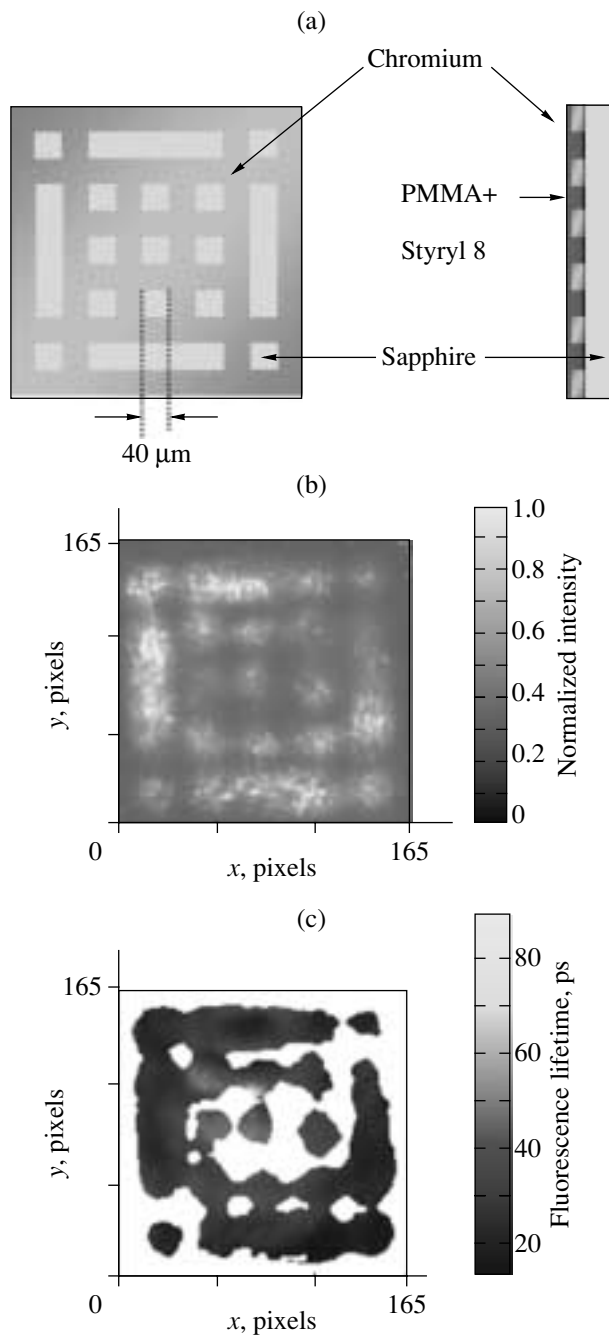


Fig. 7. (a) Micromachined sample spin-coating with styryl 8 embedded in PMMA. (b) Idler without SPDC recorded at 700 nm. (c) Corresponding lifetime map at 720 nm.

small objects are obtained to the detriment of the observed field. Figure 7b shows the image of the sample formed by the idler wave. Since the pattern is spatially resolved, the lifetime map calculated with the different images recorded at different time delay (Fig. 7c) gives a mean lifetime of 40 ps with a very bad accuracy.

Actually, the lifetime map is not available since previous measurement gives a lifetime constant of styryl 8 in PMMA around 85 ps. An explanation is given by the fact that the low efficiency is compensated by a longer acquisition time (10s equivalent to 100 laser shots) causing more photobleaching in the sample. Fluorescent molecules are destroyed after several absorption and emission cycles. The reasons for the photobleaching are not clear and could be multiphoton absorption, intersystem crossing, or reactions from the triplet state and excited-state absorption [1]. By the way, photobleaching is a real problem with solid fluorescent samples compared to the liquids. Measurements with spin-coated samples are therefore not available since the emitted fluorescence signal is modified with time. We are still working on the issue of spatial resolution using a fluorescent solution illuminating a resolution target.

4. CONCLUSIONS

We have achieved a real optical time-gated system using parametric image amplification. Owing to this system, several lifetimes down to 100 ps can be observed with a picosecond precision on the same image. Issues of both temporal and spatial resolution have been presented in this paper. We intend to perform the study of these aspects by using another laser source which delivers pulses of about 1 ps.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the support of the *Institut des Microtechniques de Franche-Comté*.

REFERENCES

1. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Plenum, New York, 1999).
2. R. Gauderon, P. B. Lukins, and C. J. R. Sheppard, *Micron* **32**, 691 (2001).
3. F. Devaux, A. Mosset, and E. Lantz, *Appl. Opt.* **40**, 4953 (2001).
4. L. L. Kalpaxis, L. M. Wang, P. Galland, *et al.*, *Opt. Lett.* **18**, 1961 (1993).
5. G. Le Tolguenec, E. Lantz, and F. Devaux, *Appl. Opt.* **36**, 8292 (1997).
6. A. Yariv, *Quantum Electronics* (Wiley, New York, 1989), Chap. 17, p. 407.
7. E. Lantz, L. Han, A. Lacourt, and J. Zyss, *Opt. Commun.* **97**, 245 (1993).
8. F. Devaux and E. Lantz, *J. Opt. Soc. Am. B* **12**, 2245 (1995).
9. Catalog Exciton.
10. F. Devaux and E. Lantz, *Eur. Phys. J. D* **8**, 117 (2000).

Picosecond fluorescence lifetime imaging by parametric image amplification

S. Brustlein, F. Devaux^a, and E. Lantz

Institut FEMTO-ST, Département d'Optique P.M. Duffieux, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6174, Université de Franche-Comté, 25030 Besançon Cedex, France

Received: 8 March 2004 / Received in final form: 3 August 2004 / Accepted: 27 August 2004
Published online: 23 November 2004 – © EDP Sciences

Abstract. We report a new method of fluorescence lifetime imaging that uses the ultra-fast optical temporal gating properties of parametric image amplification. Images with different lifetimes in the picosecond range are resolved with reliable and reproducible results.

PACS. 42.65.Yj Optical parametric oscillators and amplifiers – 78.47.+p Time-resolved optical spectroscopies and other ultrafast optical measurements in condensed matter – 42.62.Eh Metrological applications; optical frequency synthesizers for precision spectroscopy

1 Introduction

Fluorescence lifetime measurement techniques have been considerably developed for diagnostics of living biological systems. Fluorescence lifetime imaging provides non-invasive spatial information for cells detection and, as the lifetimes depend on the local fluorophores environment, they inform about their chemical and structural situations [1]. The measurement of fluorescence lifetime is achieved by either frequency-domain (FD) or time-domain (TD) techniques. FD imaging systems [2–4] require a pulsed or modulated excitation light source (arc lamp, laser, laser diode or LED) and a detector (photomultiplier tube, CCD camera or CCD camera coupled with an image intensifier) where the electronic gain (i.e. the sensitivity) is also modulated. The lifetime is determined by measuring the phase delay and the modulation depth of the fluorescence emission with respect to the modulation frequency. Most FD instruments are known to be limited to an upper modulation frequency near 200 MHz that limits this technique to the measurement of lifetimes greater than few hundred picoseconds. TD measurement [5] consists in illuminating the sample with a short pulse of light and then measuring the fluorescence decay with a rapid detection system. Streak cameras can resolve lifetimes of 200 fs [6] but acquire only 1-D images. Optical Kerr cells [7–10] can operate as very fast shutters (in the pico and femtosecond ranges) but this technique has not been yet used for lifetime imaging. The most frequently used technique of fluorescence lifetime determination is Time-Correlated-Single-Photon-Counting (TSCPC). This technique requires a pulsed light source (picosecond or

femtosecond laser pulses), a high-speed detector (photodiode, photomultiplier or microchannel plate photomultiplier) for triggering, a time-to-amplitude converter and a multichannel analyzer. In reference [11], picosecond fluorescent lifetimes were measured with a subpicosecond precision. Nevertheless, this process requires scanning to obtain images. Successful 2-D or 3-D fluorescence lifetime imaging have been achieved using confocal and multiphoton microscopes, time-gating being performed by optical intensifiers or intensified cameras [12–15]. The resolution is then limited by the time-gate width (about 50 ps).

To improve the temporal resolution, we propose an alternative solution that uses the ultra-fast optical temporal gating properties of parametric amplification where the temporal resolution is given by the duration of the pulsed light source. Hulin et al. [17] have already applied parametric amplification to time-resolved luminescence spectroscopy with subpicosecond resolution in the infrared domain. As the measured properties can be local, we have performed parametric image amplification of a fluorescence signal in order to spatially resolve different picosecond lifetimes with acquisition of pixels in parallel.

2 Principles of picosecond lifetime imaging by parametric image amplification

In previous works, we have shown [18] that type 1 parametric amplifiers are, at the degeneracy, non critical with respect to the angles (ϕ , θ) and to the wavelength for both signal and idler waves. This property ensures conservation of phase matching over a wide wavelength and angular range. This angular range corresponds to a large bandwidth of spatial frequencies of the image that can be

^a e-mail: fdevaux@univ-fcomte.fr

retrieved after amplification. According to this property, polychromatic images with good resolution were amplified [19]. Moreover, if the signal duration is longer than the pump pulse duration, parametric interaction acts as an optical temporal gate on the signal [20]. Indeed, only the part of the signal synchronized with the pump pulse is duplicated on the idler channel. Hence, the detection of the idler wave and the rejection of the signal allows gating of the signal with a time gate duration given by the pump pulse duration. This property, successfully used for imaging through thick biological tissues [21], has been applied here to resolve fluorescence signals in time. The time gate duration is 20 ps in the presented results, but can be reduced to 1 ps with an other laser source. This ultimate limit is related to the need of sufficiently monochromatic pump to conserve non critical phase matching properties in parametric image amplification [18].

Fluorescence occurs when light absorbed by a molecule is emitted after a very short period following light absorption. Owing to dissipation of energy during the excited state, the emitted light is always produced at a longer wavelength than the absorbed one (the Stokes shift). In the simplest case (such as for laser dyes), the intensity of the emitted light decreases exponentially with the time and verifies the following equation:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \otimes L(t), \quad (1)$$

where τ is the lifetime of the fluorophores and $L(t)$ the excitation pulse profile.

Since the duration of the excitation pulses is very short, we assume that the decay time of the fluorescence signal is not affected by the convolution and obey to equation (1). In our experiment, the fluorescence signal (at the wavelength λ_s) is amplified with a pump pulse (at the wavelength λ_p) by means of a three waves interaction in a type 1 quadratic crystal (Fig. 1). According to energy conservation, an idler wave is generated at the wavelength $\lambda_i = (\lambda_s \lambda_p) / (\lambda_s - \lambda_p)$ and corresponds to the part of the signal synchronized with the pump pulse. The wavelength λ_p is given by the fluorescence emission spectrum of the signal since $2\lambda_p$ is centered on the maximum of the emission spectrum.

In a type 1 interaction, signal and idler have the same polarizations and cannot be separated by two crossed polarizers like in a type 2 interaction [21]. Hence, two narrowband interferential filters are used to differentiate them (Fig. 2). The first (IF₁) selects a signal wavelength slightly shifted from degeneracy, for example at $\lambda_s = 2\lambda_p - \Delta\lambda$, and the second isolates the idler generated at the wavelength $\lambda_i \sim 2\lambda_p + \Delta\lambda$.

Temporal sampling of the fluorescence signal is achieved by tuning the delay between the pump pulse and the fluorescence signal. Then, several images formed by the idler wave (with decreasing intensity) are recorded on a CCD camera. The map of the fluorescence lifetime is obtained by applying on each pixel of this set of images a non-linear least-mean-square algorithm.

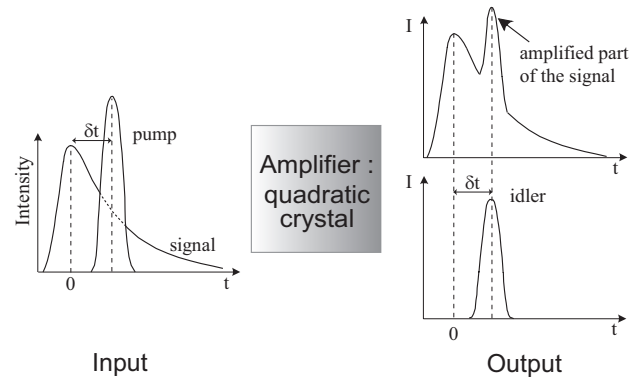


Fig. 1. At the input of the parametric amplifier, the fluorescence signal at the wavelength λ_s is delayed with respect to the pump pulse with a time δt . At the output, the idler wave generated at the wavelength $\lambda_i = (\lambda_s \lambda_p) / (\lambda_s - \lambda_p)$ is the replica of the amplified part of the signal synchronized with the pump pulse. Temporal gating is performed by detection of the idler and the rejection of the signal.

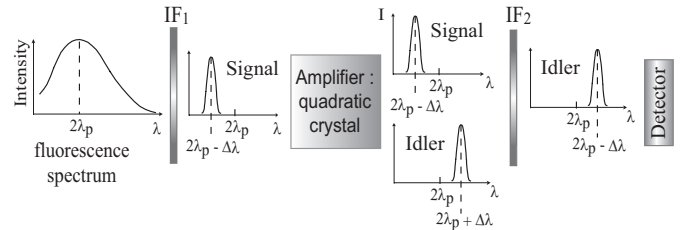


Fig. 2. With a type 1 crystal, detection of the idler and rejection of the signal is obtained with two narrowband interferential filters. The first (IF₁), centered for example on $\lambda_s = 2\lambda_p - \Delta\lambda$, selects the wavelength of the signal and the second (IF₂), centered on $\lambda_i = 2\lambda_p + \Delta\lambda$, permits the detection of the idler wave and the rejection of the signal.

3 Experiments

Figure 3 shows the experimental setup. Pulses at 532 nm and 355 nm, with a duration of respectively 38 and 20 ps, are delivered by a frequency doubled and tripled Nd:YAG laser at the repetition rate of 10 Hz. The green light illuminates the sample in order to generate a fluorescence signal around 710 nm. This signal, emitted in all directions and over a wide wavelength range, is spatially and spectrally filtered with respectively a pinhole (SF) and a narrowband interferential filter (IF₁) centered on 700 nm ($\Delta\lambda_{FWHM} = 3$ nm). The angle due to the non collinear beams arriving on this narrowband filter IF₁ (and further on IF₂) is insignificant concerning the spectral response because of the small numerical aperture. Note that the residual green light is absorbed by the colored filter F₁. The sample is imaged by a telescope system $L_1 L_2$ with a magnification of 0.75 on the input face of a $5 \times 5 \times 10$ mm³ lithium triborate crystal (LiB₃O₅) designed for type 1 phase matching in the XY plane around degeneracy. According to the non critical phase matching property previously mentioned [18,19], images can be amplified over the 650–770 nm wavelength range with a resolution of

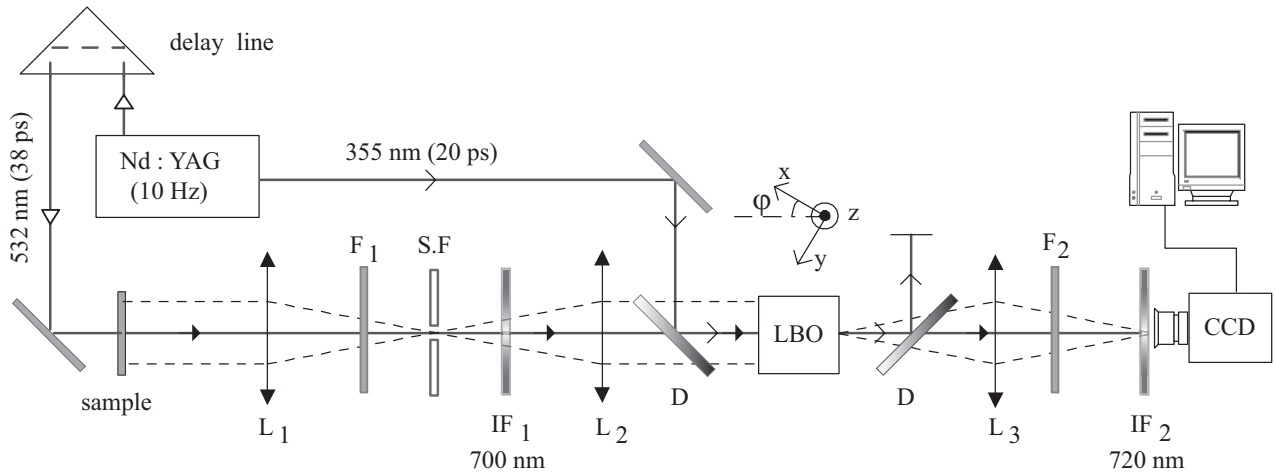


Fig. 3. Experimental setup: absorbing filters $F_{1,2}$, interferential filters $IF_{1,2}$, dichroic mirrors D , spatial filter SF .

10 lines/mm (that corresponds to an amplified image of 50×50 points in the crystal). The pump beam at 355 nm illuminates the crystal by means of a dichroic mirror D (R_{max} at 355 nm, T_{max} at 710 nm) and interacts with the fluorescence signal. The remaining pump beam is eliminated after the crystal with a second dichroic mirror D and an absorbing filter F_2 . The synchronisation between these two waves in the crystal is achieved with a delay line placed on the trajectory of the visible light. The idler wave generated during the interaction is separated from the amplified signal by a second narrowband interferential filter (IF_2) centered on 720 nm ($\Delta\lambda_{FWHM} = 5$ nm) and is imaged with a cooled CCD camera (512×512 pixels, pixel size $24 \times 24 \mu\text{m}^2$, quantum efficiency 85% at 700 nm, dark current 1.3 electrons/pixel/s at -40°C , readout noise ≤ 6 electrons RMS). Phase matching occurs only for the input signal field which is orthogonally polarized with respect to the pump field. Hence, only half of the unpolarized fluorescence light is amplified and converted on the idler channel.

4 Results and discussions

Figure 4 represents the results of the first experiment where the sample is a cell containing a solution of Styryl 7 in methanol ($2.2 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) placed behind a resolution chart representing a number six. Energies values of the second and third harmonics of the laser are both about 4 mJ. The weak intensity of the fluorescence signal requires an acquisition time of 5 seconds corresponding to the acquisition of 50 laser shots. The recorded image is presented in Figure 4a. This image is very noisy and the number six is difficult to recognize (in Fig. 4a the contrast is about 0.4). Actually, the noise is mainly due to the amplification of quantum noise in the crystal. This phenomena, called spontaneous parametric down conversion (SPDC), occurs even in the absence of an input image [22]. However, the contrast becomes close to unity when we subtract from the image 4a the image of the SPDC recorded without input signal (Fig. 4b).

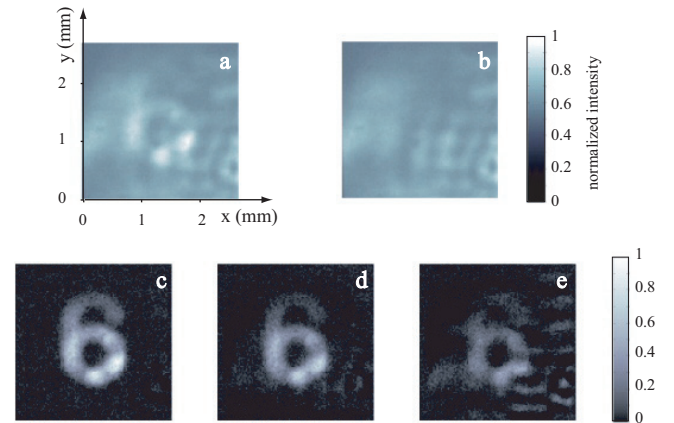


Fig. 4. Experimental results: (a) image of a number six formed by the idler wave with parametric fluorescence, (b) parametric fluorescence only, (c, d, e) images formed by the idler wave after subtraction of the parametric fluorescence for different delays.

The fluorescence signal is temporally sampled by shifting the delay line. Eight images were recorded every 13.3 ps. Figures 4c–e, show three of these eight images recorded respectively at the times $t = 0$ (corresponding to the maximum of intensity), 26.6 and 53.2 ps. Figure 5 represents, with a colour scale, the lifetime map of Styryl 7 obtained by applying, pixel by pixel, a non-linear least-mean-square algorithm to all the recorded images. The average lifetime measured on this map is 71 ps (at 700 nm), with a standard deviation of 33 ps. The low precision of the measure is due to the weak dynamic of the images and to the spatial inhomogeneities of the pump beam which are clearly exhibited by the image of the parametric fluorescence (Fig. 4b).

We have performed an other experiment to measure several picosecond lifetimes in the same image. The sample consists in two capillaries, containing respectively Styryl 8 and Styryl 7 in ethanol ($4 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), placed horizontally in the focal plan of the telescope system L_1L_2 .

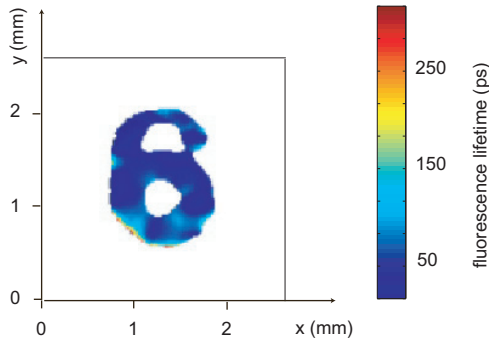


Fig. 5. Fluorescence lifetime map of Styryl 7 in methanol.

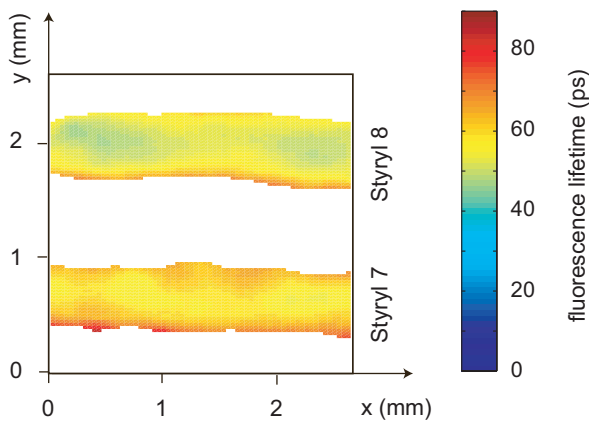


Fig. 6. Fluorescence lifetime map of Styryl 7 and Styryl 8 in ethanol.

As the emission spectra in ethanol are shifted in the direction of the higher wavelength, the fluorescence signal is now spectrally filtered with a narrowband interferential filter centered on 720 nm ($\Delta\lambda_{FWHM} = 5$ nm). Hence, the idler wave is separated from the amplified signal by a second narrowband interferential filter centered on 700 nm ($\Delta\lambda_{FWHM} = 3$ nm). Six images formed by the idler wave were recorded on the cooled CCD camera every 13.3 ps. The 2-D lifetime map of Styryl 7 and Styryl 8 (Fig. 6) is calculated from these images with the same non-linear least-mean-square algorithm. The average lifetimes are respectively 61 ps and 54 ps for Styryl 7 and 8, with a standard deviation of 5 ps. In this experiment the precision is improved since the signal to noise ratio of the amplified images is higher with respect to the previous experiment. In both experiments, results are in good agreement with the lifetimes measured with a streak camera.

To conclude this section we discuss the weak dynamic of the amplified images. SPDC corresponds to the amplification of quantum noise with a mean rate of half a photon per spatio-temporal mode at the input of the crystal. If we consider a perfectly phase-matched spatio-temporal mode, the mean number of SPDC photons at the output of the amplifier for this mode is [22]:

$$N_{\text{SPDC}}^{\text{out}} = \sinh^2(gL), \quad (2)$$

where L is the crystal length and g is a term related to the pump pulse energy.

In a parametric amplification process, when there is no input signal in the idler channel (like in our experiments), the mean output number of photons in the idler channel (always for a perfectly phase-matched spatio-temporal mode) is:

$$N_{\text{idler}}^{\text{out}} = N_{\text{signal}}^{\text{in}} \sinh^2(gL) + N_{\text{SPDC}}^{\text{out}}, \quad (3)$$

where $N_{\text{signal}}^{\text{in}}$ is the input number of photons on the signal channel in the corresponding mode.

Since the spontaneous emission of dyes is a broad and homogeneous emission in the spatial domain as well as in the temporal domain, the input number of photons per spatio-temporal mode in the signal channel ($N_{\text{signal}}^{\text{in}}$ in Eq. (3)) can be considered as a constant in the narrow spatial and temporal bandwidths of the system detection. Then, the ratio $(N_{\text{idler}}^{\text{out}} - N_{\text{SPDC}}^{\text{out}})/N_{\text{SPDC}}^{\text{out}}$ measured in the far field of the images formed by the idler wave gives directly the mean number of photons $N_{\text{signal}}^{\text{in}}$ in an amplified mode. In our experiments, this number is close to 0.15, 0.1 and 0.04 respectively in Figures 4c–e, i.e. significantly smaller than the half photon level corresponding to quantum noise. Hence, though spontaneous emission of dyes is an incoherent signal with less than half a photon per mode, parametric amplification of fluorescence images can be performed with a correct contrast after subtraction of the background noise due to the SPDC.

5 Conclusion

In this paper we have presented the experimental results of lifetime fluorescence imaging by parametric image amplification. First, we have demonstrated that this method can resolve several lifetimes lower than 100 ps in the same image with a temporal resolution limited by the 20 ps time duration of the pump pulse. In the future, we will improve the time resolution of this technique by using 1 ps pump pulses and we will consider applications to imaging of biological systems.

References

1. J.R. Lakowicz, Introduction to Fluorescence, in *Principles of fluorescence spectroscopy* (Plenum Press, New-York, 1999), pp. 1–21
2. J.R. Lakowicz, Frequency-Domain Lifetime Measurements, in *Principles of fluorescence spectroscopy* (Plenum Press, New-York, 1999), pp. 141–184
3. P. Herman, B.P. Maliwal, H.J. Lin, J.R. Lakowicz, *J. Microsc.* **203**, 176 (2001)
4. A.C. Mitchell, J.E. Wall, J.G. Murray, C.G. Morgan, *J. Microsc.* **206**, 225 (2002)
5. J.R. Lakowicz, Time-Domain Lifetime Measurements, in *Principles of fluorescence spectroscopy* (Plenum Press, New-York, 1999), pp. 95–140

6. M. Prokhorov, N. Vorobiev, V. Lozovoi, A. Smirnov, M. Schelev, *Quantum Electron.* **32**, 283 (2002)
7. X. Liang, L. Wang, P.P. Ho, R.R. Alfano, *Appl. Opt.* **34**, 3463 (1995)
8. H. Nakatsuka, Y. Katashima, K. Inouye, R. Yano, *Opt. Commun.* **69**, 169 (1998)
9. Y. Kanematsu, H. Ozawa, I. Tanaka, S. Kinoshita, *J. Lumin.* **87–89**, 917 (2000)
10. J. Takeda, K. Nakajima, S. Kurita, S. Tomimoto, S. Saito, T. Suemoto, *J. Lumin.* **87–89**, 927 (2000)
11. J. Karolczak, D. Komar, J. Kubicki, T. Wrózowa, K. Dobek, B. Ciesielska, A. Maciejewski, *Chem. Phys. Lett.* **344**, 154 (2001)
12. M. Straub, S.W. Hell, *Appl. Phys. Lett.* **73**, 1769 (1998)
13. S. Jakobs, V. Subramaniam, A. Schönle, T.M. Jovin, S.W. Hell, *FEBS Lett.* **479**, 131 (2000)
14. M.J. Cole, J. Siegel, S.E.D. Webb, R. Jones, K. Dowling, P.M.W. French, M.J. Lever, L.O.D. Sucharov, M.A.A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson, *Opt. Lett.* **25**, 1361 (2000)
15. D.S. Elson, J. Siegel, S.E.D. Webb, S. Leveque-Fort, M.J. Lever, P.M.W. French, K. Lauritsen, M. Wahl, R. Erdmann, *Opt. Lett.* **27**, 1409 (2002)
16. J. Siegel, D.S. Elson, S.E.D. Webb, D. Parsons-Karavassilis, S. Leveque-Fort, M. J. Cole, M.J. Lever, P.M.W. French, M.A.A. Neil, R. Juskaitis, L.O. Sucharov, T. Wilson, *Opt. Lett.* **26**, 1338 (2001)
17. D. Hulin, A. Migus, A. Antonetti, I. Ledoux, J. Badan, J.L. Oudar, J. Zyss, *Appl. Phys. Lett.* **49**, 761 (1986)
18. E. Lantz, L. Han, A. Lacourt, J. Zyss, *Opt. Commun.* **97**, 245 (1993)
19. F. Devaux, E. Lantz, *J. Opt. Soc. Am. B* **12**, 2245 (1995)
20. F. Devaux, E. Lantz, *Opt. Commun.* **118**, 25 (1995)
21. G. Le Tolguenec, F. Devaux, E. Lantz, *Opt. Lett.* **24**, 1047 (1999)
22. F. Devaux, E. Lantz, *Eur. Phys. J. D* **8**, 117 (2000)

Limits of amplification of weak images

SOPHIE BRUSTLEIN*, FABRICE DEVAUX and ERIC LANTZ

Institut FEMTO-ST, Département d'Optique P.M. Duffieux,
Université de Franche-Comté, 25030 Besançon Cedex, France

(Received 4 February 2005; in final form 14 June 2005)

Optical amplification of a signal or an image is always accompanied by amplification of quantum noise with a mean rate corresponding to, in the limit of high gain, the input noise of one photon per spatio-temporal mode. We show that an image of dye fluorescence can be retrieved with good contrast after parametric amplification, even if the level of the input image corresponds to significantly less than one photon per mode. Theoretical limits are assessed.

Keywords: Optical amplification; Weak images

1. Introduction

Successful applications of optical parametric down-conversion (PDC) in radiometry have been demonstrated, particularly for spectral radiance measurements and detector quantum efficiency measurements [1–4]. Although the amplification of a weak signal such as black-body radiation has been achieved [5], the limits of image amplification of incoherent light sources have not yet been reported.

In recent work [6, 7] we proposed a new method for fluorescence lifetime imaging using the time gate properties of PDC [8]. As the input fluorescence signal is very weak, amplified images are completely embedded in significant background noise due to the spontaneous parametric down-conversion process which corresponds to the amplification of quantum noise with a mean rate of one photon per spatio-temporal mode (ST mode) at the input of the amplifier [9]. We have shown that the spatial information carried by the amplified image can be retrieved with a good signal-to-noise ratio when the background noise is subtracted. Measurements clearly confirm that input images with less than one photon per mode can be amplified [6]. In this paper, we assess the minimum intensity level of the input image that leads, after amplification, to a recognizable image.

In section 2 we discuss the theory of the limits of weak image amplification, and in section 3 we present experimental results concerning both the direct measurement of the radiance of the input image in photons per spatio-temporal mode and limits for the image amplification of incoherent light sources.

*Corresponding author. Email: sophie.brustlein@univ-fcomte.fr

2. Limits of detection of a weak image: theory

For a single temporal mode acquisition in the high-gain regime, SPDC obeys, in the spatial domain, a Bose–Einstein statistic [10], with the standard deviation of the fluctuation of the photon number in the transverse plane equal to the mean number of photons per mode ($\sigma_{\text{SPDC}} = \bar{n}_{\text{SPDC}}$). Let us assume that the amplification gain G and the number of photons per temporal mode in the signal channel at the input $\bar{n}_{\text{signal}}^{\text{in}}$ are constant in the temporal bandwidth of the system detection. Since the M detected temporal modes are added incoherently by the CCD camera, the number of photons per mode in the idler channel and the standard deviation of SPDC become

$$\bar{n}_{\text{idler}}^{M \text{ modes}} = M \times \bar{n}_{\text{signal}} \times (G - 1), \quad (1)$$

$$\bar{n}_{\text{SPDC}}^{M \text{ modes}} = M \times (G - 1), \quad (2)$$

$$\sigma_{\text{SPDC}}^{M \text{ modes}} = \sqrt{M} \times (G - 1). \quad (3)$$

If we consider that the spatial information carried by a signal is suitable for good retrieval if the mean level of the signal is greater than the standard deviation of the noise, this leads, in our case, to

$$\bar{n}_{\text{idler}}^{M \text{ modes}} \geq \sigma_{\text{SPDC}}^{M \text{ modes}} \Leftrightarrow \bar{n}_{\text{signal}}^{\text{in}} \geq \frac{1}{\sqrt{M}}. \quad (4)$$

This means that if the number of temporal modes increases, images with a decreasing number of photons per mode can be amplified and retrieved with a good signal-to-noise ratio.

Figure 1 shows a numerical study of the limits of detection of a weak image embedded in noise. First, we consider an original binary image with the mean level \bar{n}_{image} equal to 0.5 (figure 1(a)). This image is embedded in a Gaussian statistical noise with $\sigma_{\text{noise}} = 1$. This Gaussian noise has the statistical properties of SPDC and, because the gain does not appear in equation (4), we consider in this figure only the relative ratio between the input signal and the equivalent input quantum noise. Note that the usual amplifier noise theory ($NF = 2$) [11] does not hold here because SPDC is stronger than the idler at the output. Of course, for a very small gain ($G \simeq 1$), the output signal remains stronger than SPDC, meaning that it is possible to observe, without amplification, images with much less than one photon per mode. However, the purpose of this paper is to assess situations where amplification is necessary (for example, for time gating applications) and consequently detection is performed on the idler image. In figures 1(b) and (f), where $\bar{n}_{\text{image}} < \sigma_{\text{noise}}$, the spatial information cannot be retrieved. However, the signal-to-noise ratio is improved by accumulating random noisy images. We can observe a useful signal when we meet the criterion $\bar{n}_{\text{image}} \simeq \sigma_{\text{noise}}$ (figure 1(c)). For complex images, this criterion is insufficient for a correct retrieval (figure 1(g)). A numerical study of complex images reveals that the mean level of the image should be greater than three times the standard deviation of the noise: $\bar{n}_{\text{image}} \simeq 3\sigma_{\text{noise}}$ (figure 1(e)).

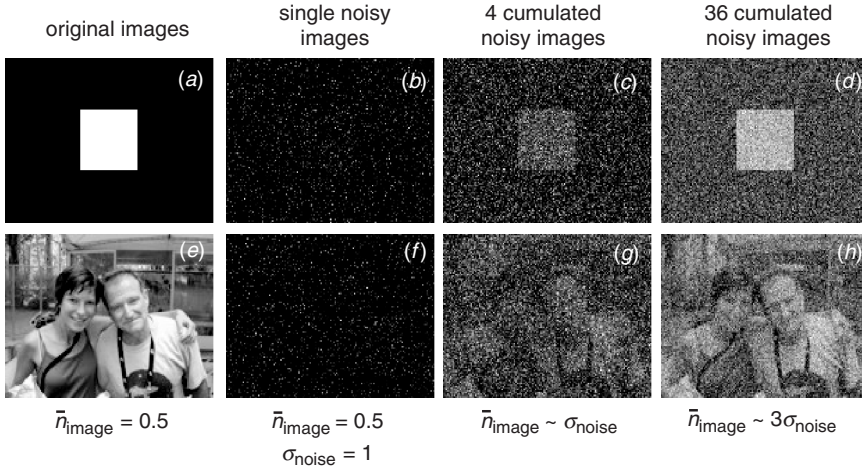


Figure 1. Numerical study. (a) Original binary image ($\bar{n}_{\text{image}} = 0.5$). (e) Original complex image representing the author with Robbin Williams ($\bar{n}_{\text{image}} = 0.5$). (b) and (f) Original images embedded in noise ($\sigma_{\text{noise}} > \bar{n}_{\text{image}}$). (c) and (g) Four accumulated noisy images ($\bar{n}_{\text{image}} \simeq \sigma_{\text{noise}}$). (d) and (h) Thirty-six accumulated noisy images ($\bar{n}_{\text{image}} \simeq 3\sigma_{\text{noise}}$).

3. Experiment

3.1 Measurement of the number of photons per spatio-temporal mode

In spontaneous parametric down-conversion (SPDC), the mean number of photons in a perfectly phase-matched spatio-temporal mode (ST mode) at the output of a nonlinear crystal is [9]

$$\bar{n}_{\text{SPDC}}^{\text{out}} = \sinh^2(gL) = G, \quad (5)$$

where L is the crystal length and g is a gain term related to the pump pulse energy. When only the input signal channel is seeded at a mean rate of $\bar{n}_{\text{signal}}^{\text{in}}$ photons per ST mode, the mean number of photons at the output in the corresponding phase-matched idler modes is

$$\bar{n}_{\text{idler}} = \bar{n}_{\text{signal}}^{\text{in}} \sinh^2(gL) + \bar{n}_{\text{SPDC}}. \quad (6)$$

Then the mean number of photons at the input is given by

$$\bar{n}_{\text{signal}}^{\text{in}} = \frac{\bar{n}_{\text{idler}} - \bar{n}_{\text{SPDC}}}{\bar{n}_{\text{SPDC}}}. \quad (7)$$

If we assume that $\bar{n}_{\text{signal}}^{\text{in}}$ is constant for all the modes included in the narrow spatial and temporal bandwidths of the detection system, the direct measurement of $\bar{n}_{\text{signal}}^{\text{in}}$ can be performed in the spatial domain, when only the idler channel is detected by the CCD camera. Indeed, the grey levels of the images obtained with and without signal at the input are respectively proportional to \bar{n}_{idler} and \bar{n}_{SPDC} in the image plane as well as in the Fourier plane of the crystal input. Then the ratio given by equation (7) depends neither on the quantum efficiency of the CCD

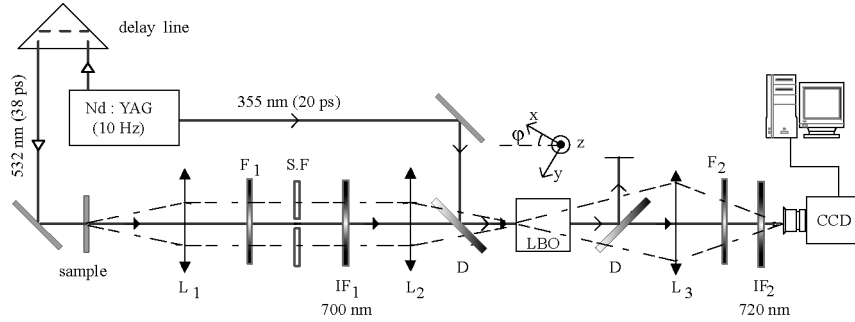


Figure 2. Experimental setup.

camera nor on the amplification gain. It provides an absolute measurement of the radiance of the signal, expressed in photons per spatio-temporal mode [5]. Moreover, all the temporal modes in the bandwidth of the system detection are added incoherently by the CCD camera. Hence the dynamic of the measurement can be improved by accumulating single-shot acquisitions, without any modification of equation (7).

Figure 2 shows the experimental setup. A doubled and tripled Nd:YAG laser delivers pulses at 532 nm and 355 nm at a repetition rate of 10 Hz. The signal corresponds to the spontaneous light emission of a dye solution sample, obtained by illuminating the sample with the second harmonic of the laser. The broadband spectrum emission of the signal is centred on 710 nm, which corresponds to the degenerated wavelength when the third harmonic of the laser is used as the pump beam: $\lambda_p = 355$ nm. First, the signal is spatially and spectrally filtered with, respectively, a pinhole (S.F.) and a narrow band interferential filter IF₁ centred on $\lambda_s = \lambda_{IF_1} = 720$ nm, $\Delta\lambda_{IF_1} = 5$ nm. Then, the signal is amplified in a $5 \times 5 \times 10$ mm³ triborate lithium crystal (LiBO₃:LBO) designed for type 1 collinear phase matching in the *XY* plane around degeneracy. A delay line provides the synchronization between the signal and the pump pulses. As type 1 phase matching is non-critical in the spatial and spectral domains around complete degeneracy [12], images can be amplified over broad spatial and temporal frequency bandwidths with a constant amplification gain. Figure 3 shows the spatio-temporal spectrum of the output light [13]. The amplified signal and the idler are centred on the SPDC spectrum, which corresponds to the spatio-temporal transfer function of an amplifier with a 20 mrad spatial bandwidth (corresponding to a resolution of 14 lines/mm in the amplified image) and a 50 nm spectral bandwidth. Finally, the idler wave generated during the interaction is separated from the amplified signal by a second interferential filter IF₂ centred on $\lambda_i = \lambda_{IF_2} = 700$ nm. $\Delta\lambda_{IF_2} = 4$ nm gives the temporal bandwidth of the system detection. The near field or far field of the crystal input is imaged on a cooled CCD camera (512 × 512 pixels; pixel size, 24 × 24 μm²; quantum efficiency, 85% at 700 nm; dark current, 1.3 e⁻ pixel⁻¹ s⁻¹ at -40°C; readout noise, 6 e⁻ rms).

The direct measurement of LBO of the number of photons per ST mode, performed in the far field by measurement of grey levels in images, requires some precautions.

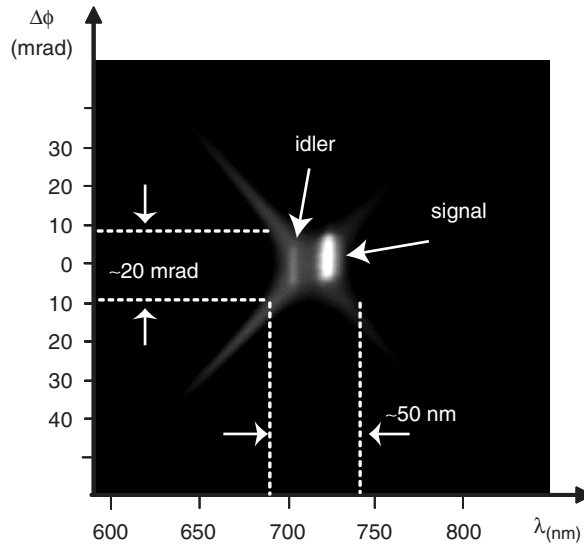


Figure 3. $\Delta\Phi$ corresponds to the angle of the wave vectors with respect to the direction of perfect phase matching. These wave vectors are related to spatial frequencies by the law of Fourier optics. The signal and the idler are centred around complete degeneracy.

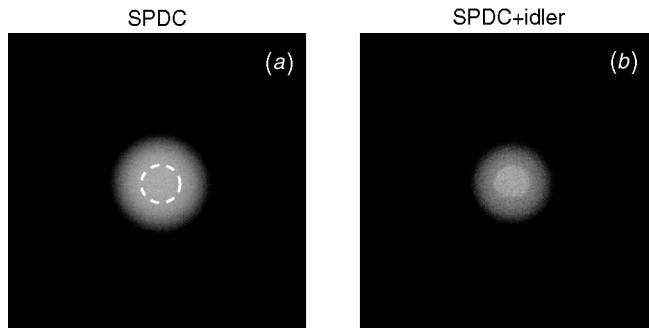


Figure 4. (a) Spatial frequency spectrum of the SPDC at 700 nm. (b) Spatial frequency spectrum of the idler with SPDC at 700 nm. The spatial frequency contribution of the idler delimited by the spatial filter is clearly shown. Grey levels in both images are measured in areas represented by the dotted circle in (a).

First, the signal is spatially filtered around the collinear phase-matching direction in an angular range smaller than the angular bandwidth of the amplifier in order to define an area with a constant amplification gain. Second, all the spatial modes experiencing amplification in the near field have to be seeded by the signal at the input of the crystal. Hence, the whole transverse section of the crystal must be illuminated by the signal and the pump beams. Figure 4 shows images in the far field of the idler channel with (figure 4(a)) and without (figure 4(b)) input signal. In this latter image, the spatial frequency contribution of the idler delimited by

the spatial filter is clearly shown. The time acquisition is 10 s (i.e. 100 laser shots). According to equation (7), a comparison of the grey levels of these images measured in areas represented by the dotted circle in figure 3(a) gives a mean number of 0.6 photons per ST mode. This result shows that images of incoherent light sources with less than one photon per ST mode such as black-body sources can be amplified, and the radiance of the sources can be directly measured with two-dimensional spatial resolution.

3.2 Limits for image amplification of incoherent light sources

In our experiment, the total number of temporal modes M is equal to the number M_0 of temporal modes detected during a single-shot acquisition times the number N of accumulated laser shots. M_0 is given by the ratio $\Delta\lambda_{\text{IF}_2}/\delta\lambda_{\text{SPDC}}$, where $\Delta\lambda_{\text{IF}_2}$ is the bandwidth of the interferential filter IF_2 and $\delta\lambda_{\text{SPDC}}$ is deduced from the time duration of the SPDC pulses τ_{SPDC} ($\delta\lambda_{\text{SPDC}}$ corresponds to the size of the temporal mode and we assume that $\tau_{\text{SPDC}}\delta\nu_{\text{SPDC}} \simeq 1$). Then, M_0 is given by

$$M_0 = \frac{c \times \Delta\lambda_{\text{IF}_2} \times \tau_{\text{SPDC}}}{\lambda_{\text{IF}_2}^2}. \quad (8)$$

With a time duration of the SPDC pulse of 10 ps, $M_0 \simeq 22$. Figure 5 shows the variation of the ratio $\bar{n}_{\text{SPDC}}/\sigma_{\text{SPDC}}$ with respect to the number N of accumulated laser shots. Statistics are performed in the area presented in figure 4(a). The good

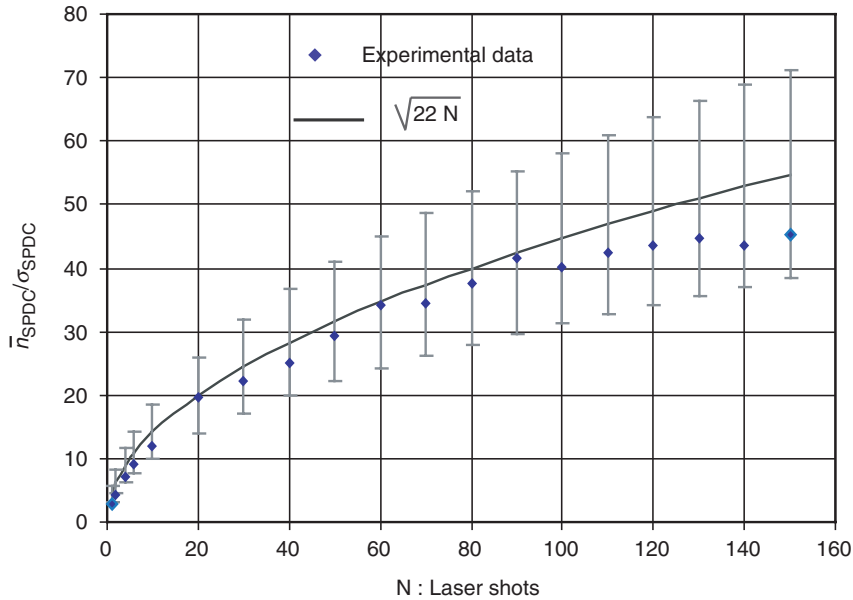


Figure 5. Ratio $\bar{n}_{\text{SPDC}}/\sigma_{\text{SPDC}}$ versus number N of accumulated laser shots. Solid curve: theoretical curve for $M_0 = 22$.

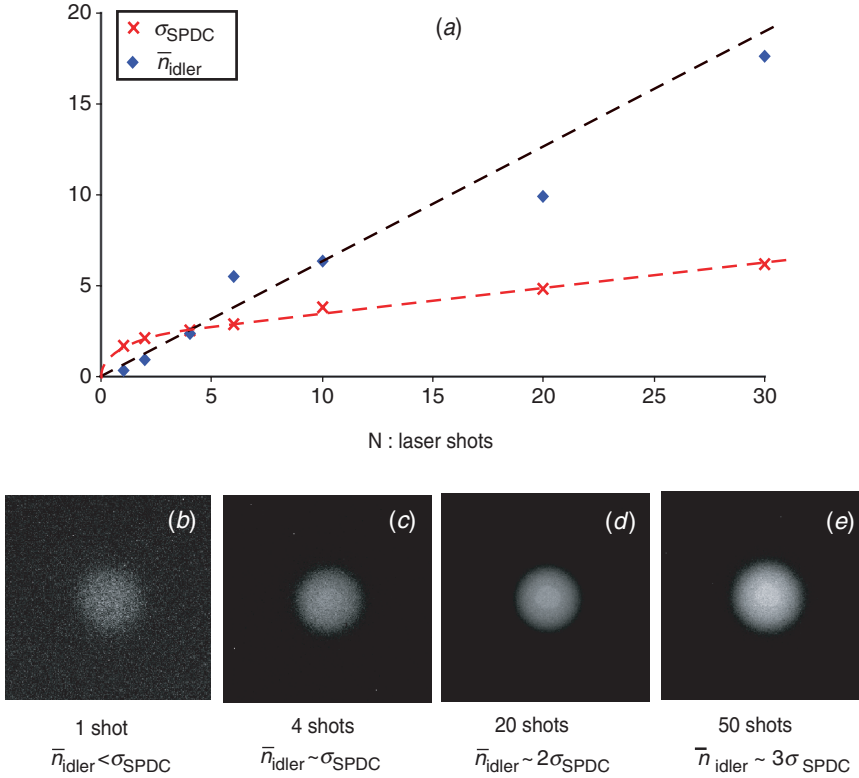


Figure 6. (a) Variation of \bar{n}_{idler} and σ_{SPDC} with respect to the number N of accumulated laser shots. (b)–(e) Images corresponding to $\bar{n}_{\text{idler}} < \sigma_{\text{SPDC}}$, $\bar{n}_{\text{idler}} \simeq \sigma_{\text{SPDC}}$, $\bar{n}_{\text{idler}} \simeq 2\sigma_{\text{SPDC}}$ and $\bar{n}_{\text{idler}} \simeq 3\sigma_{\text{SPDC}}$.

fit of the experimental data by the equation $y = (22N)^{1/2}$ clearly shows the thermal statistics of SPDC. Error bars are associated with the uncertainty on M_0 .

In order to verify the hypothesis given by equation (4), we performed the following experiment. A very weak signal with 0.11 ± 0.01 photons per mode was amplified and we observed images of the idler in the far field for increasing acquisition times. Figure 6(a) shows the variation of the mean level of the idler and of the standard deviation of the SPDC with respect to the number N of laser shots. Images corresponding to $\bar{n}_{\text{idler}} < \sigma_{\text{SPDC}}$, $\bar{n}_{\text{idler}} \simeq \sigma_{\text{SPDC}}$, $\bar{n}_{\text{idler}} \simeq 2\sigma_{\text{SPDC}}$ and $\bar{n}_{\text{idler}} \simeq 3\sigma_{\text{SPDC}}$ are observed (figure 5(b)–(e)). Since the background noise is uniform, spatial information in images can be retrieved without subtraction as soon as \bar{n}_{idler} becomes greater than σ_{SPDC} . This corresponds to four accumulated laser shots or ~ 88 accumulated temporal modes. This result is in good agreement with equation (4) $(1/(88))^{1/2} \simeq 0.11$.

The same experiment is now performed in the near field. Two lines of a resolution chart are illuminated by dye fluorescence. Then, the resolution chart is imaged on the input face of the crystal. In this case, all the spatial bandwidths given by the

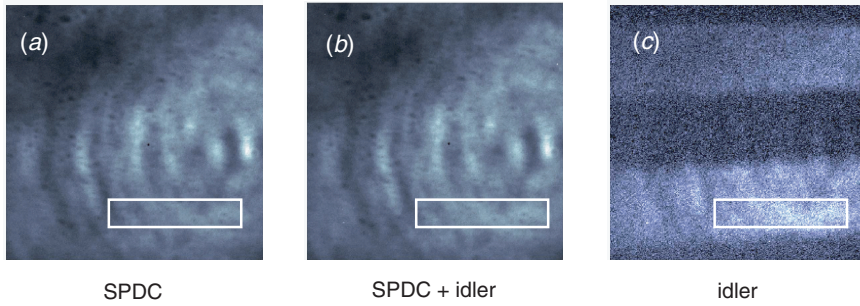


Figure 7. Near field images of the idler channel without signal (a) and with signal (b) at the crystal input. Spatial inhomogeneities of the pump beam require the subtraction of the background noise to retrieve spatial information (c).

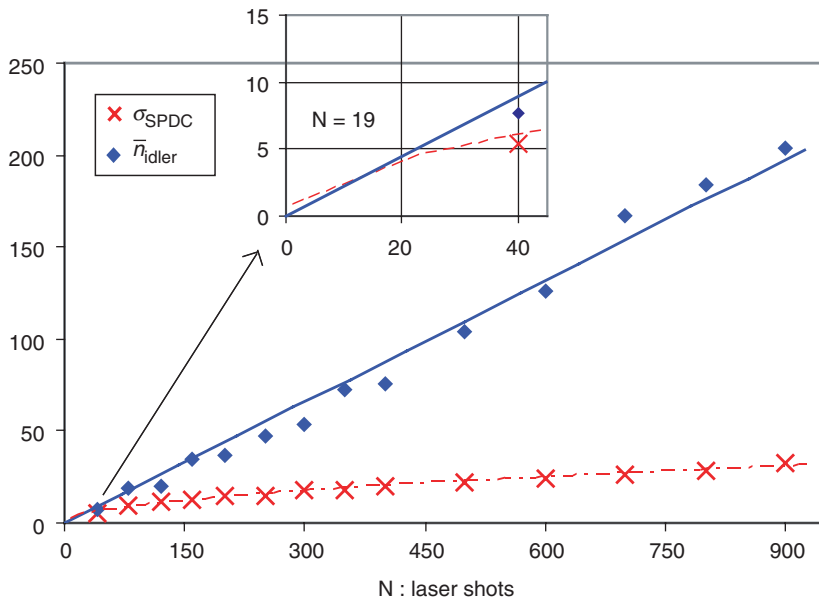


Figure 8. Variation of \bar{n}_{idler} and σ_{SPDC} measured in the rectangular area plotted in

phase-matching angular range must be seeded by the signal at the crystal input. Hence, the size of the spatial filter (SF) is fitted to the spatial bandwidth of the amplifier. Figure 7 shows images of the idler channel with (figure 7(a)) and without (figure 7(b)) signal for 600 accumulated laser shots. Images clearly exhibit intensity inhomogeneities due to the bad quality of the pump beam profile. Hence, subtraction of background noise is necessary to retrieve the spatial information carried by the idler (figure 7(c)). In this experiment, the mean number of photons per ST mode at the input is estimated to be 0.051 ± 0.004 using equation (6). The curves presented in figure 8 correspond to a statistical measurement performed

in the rectangular area plotted on images where the amplification gain is assumed constant. \bar{n}_{idler} becomes greater than σ_{SPDC} for 19 accumulated laser shots (i.e. ~ 418 temporal modes), which is in good agreement with equation (2) $(1/(418))^{1/2} \simeq 0.05$.

4. Conclusion

These results demonstrate that image amplification of an incoherent signal with less than one photon per spatio-temporal mode is achievable. This property has been successfully exploited in fluorescence lifetime imaging allowing us to resolve in the same image several lifetimes with picosecond resolution. Numerical and experimental work shows that the limit of amplification of a weak image is dependent on the total number of temporal modes detected in the bandwidth of the system detection.

Prasad [14] reported that an astronomical image could not be efficiently amplified, because of its low number of photons per mode. We do not believe that the work reported here is in contradiction with [14] because our method relies on the accumulation of temporal modes. If this accumulation is possible without restriction by increasing the detection time, it is doubtless that amplification will be useless. However, amplification is necessary to obtain time gating and, in this case, accumulating a great number of shots allows an incoherent image to be amplified.

Acknowledgements

This work was supported by the E.U. in the framework of the Quantim network (contract IST 2000-26019).

References

- [1] J.G. Rarity, K.D. Ridley and P. Tapster, *Appl. Optics* **26** 4616 (1987).
- [2] A.N. Penin and A. Sergienko, *Appl. Optics* **30** 3582 (1991).
- [3] E. Dauler, A. Migdall, N. Boeuf, *et al.*, *Metrologia* **35** 295 (1998).
- [4] L. Shulong, L. Bo, S. Baoquan, *et al.*, *Meas. Sci. Technol.* **13** 186 (2002).
- [5] A. Migdall, R.U. Datla, A. Sergienko, *et al.*, *Appl. Optics* **37** 3345 (1998).
- [6] S. Brustlein, F. Devaux, B. Wacogne, *et al.*, *Eur. Phys. J. AP* **29** 161 (2005).
- [7] S. Brustlein, F. Devaux and E. Lantz, *Laser Phys.* **14** 238 (2004).
- [8] F. Devaux and E. lantz, *Optics Commun.* **118** 25 (1995).
- [9] F. Devaux and E. lantz, *Eur. Phys. J. D* **8** 117 (2000).
- [10] A. Mosset, F. Devaux, G. Fanjoux, *et al.*, *Eur. Phys. J. D* **28** 447 (2004).
- [11] A. Mosset, F. Devaux and E. lantz, *Phys. Rev. Lett.* (to be published).
- [12] F. Devaux and E. lantz, *J. opt. Soc. Am. B* **12** 2245 (1995).
- [13] E. Lantz, L. Han, A. Lacourt, *et al.*, *Optics Commun.* **97** 245 (1993).
- [14] S. Prasad, *J. Opt. Soc. Am. A* **11** 2799 (1994).