

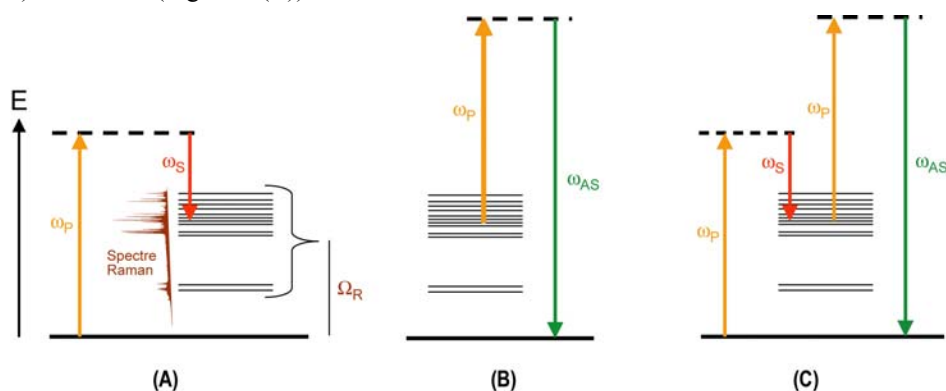
## Microscopie Raman stimulée CARS: développements récents et applications

Hervé Rigneault

Institut Fresnel, Mosaic group, CNRS UMR 6133, Univ. Paul Cézanne,  
Domaine Universitaire St Jérôme, 13397 Marseille Cedex, France

**Résumé** - Voir les molécules sans les marquer, voici l'objectif que s'est fixé la microscopie Raman stimulée. Plus connue sous le nom de microscopie CARS pour Coherent Antistokes Raman Scattering, cette approche consiste à faire interagir de manière sélective une liaison chimique avec des champs lasers incidents et focalisés sur l'échantillon. Dans cet exposé nous reviendrons sur l'origine du contraste CARS, sa mise en œuvre et nous donnerons des exemples d'application en biologie cellulaire et tissulaire.

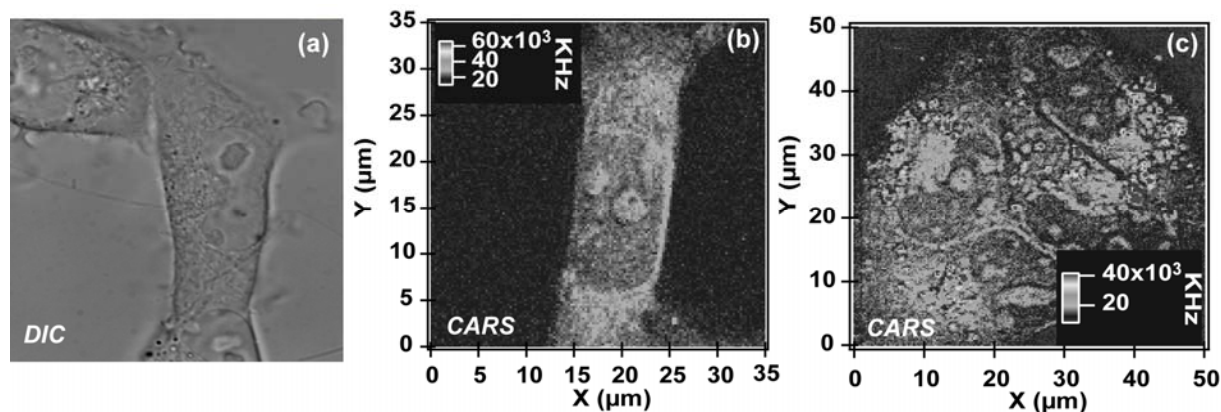
L'utilisation de la microscopie optique en biologie est motivée par le fait qu'elle est une des seules à pouvoir être mise en œuvre *in vivo*. La microscopie de fluorescence, à un ou deux photons, est l'une des techniques les plus utilisées de nos jours. Malgré sa simplicité d'utilisation, elle requiert le marquage des espèces chimiques d'intérêt par des molécules fluorescentes. Ces dernières peuvent être photoblanchies, altérer le comportement de la cellule vivante, voire se révéler phototoxiques vis-à-vis de celle-ci. Les techniques de microscopie non-linéaire (microscopie par génération de seconde ou de troisième harmonique par exemple) développées depuis les années 90 visent à s'affranchir de cette étape de marquage. Parmi ces approches, la microscopie CARS (Coherent Anti-stokes Raman Scattering) tient un rôle particulier<sup>1</sup>. En effet, le mécanisme de contraste des images se base sur la présence ou non de molécules possédant des modes vibrationnels ou rotationnels particuliers. Pour la première fois mise en œuvre par Duncan et al.<sup>2</sup>, cette technique a été proposée en configuration colinéaire par Zumbusch et al.<sup>3</sup>. Sa mise en œuvre nécessite deux sources lasers synchronisées (appelées « pompe » et « Stokes ») générant des impulsions ultracourtes de pulsations centrales respectives  $\omega_p$  et  $\omega_s$ . Ces impulsions sont spatialement superposées et focalisées par le biais d'un objectif de forte ouverture numérique dans l'échantillon d'intérêt. Un rayonnement cohérent est alors émis à la fréquence  $\omega_{as} = \omega_p - \omega_s$  par un processus de mélange à quatre ondes<sup>4</sup>. Lorsque la différence de fréquences  $\omega_p - \omega_s$  est égale la fréquence vibrationnelle  $\Omega$  d'une espèce moléculaire présente dans le milieu, cette émission à la pulsation  $\omega_{as}$  (appelée émission CARS) est exaltée (Figure 1 (C)).



**Figure 1** - (A) Processus Raman spontané Stokes utilisé dans la diffusion Raman, (B) Processus Raman spontané anti-Stokes, (C) Processus CARS

Ce phénomène est classiquement décrit par le tenseur non-linéaire du troisième ordre  $\chi^{(3)}$ . Celui-ci fait apparaître un terme résonant  $\chi^{(3)}_R$  d'origine vibrationnelle ainsi qu'un terme non-résonant  $\chi^{(3)}_{NR}$  d'origine électronique<sup>1</sup>. La nature cohérente de l'émission CARS induit une dépendance de son diagramme de rayonnement vis-à-vis de la taille et de la forme de l'objet imagé<sup>5, 6</sup>. Il est alors possible de mettre en place une détection du rayonnement CARS en avant (Forward-CARS) et en arrière (Epi-CARS) de l'échantillon observé<sup>7</sup>.

Au delà de sa sélectivité chimique, la microscopie CARS permet une imagerie tridimensionnelle sans trou confocal<sup>8</sup>. La figure 2 présente une imagerie standard DIC (Figure 2 (A)) et une imagerie CARS (Figure 2 (B) et (C)) de la liaison C-H aliphatique ( $2845\text{cm}^{-1}$ ).



**Figure 2** - Images de cellules COS-7 obtenues par microscopie DIC (A) et par microscopie CARS (B, C) (images F-CARS). Les deux faisceaux laser d'excitation de pulsations  $\omega_P$  à  $13\,699\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_P = 730\text{nm}$ ) et  $\omega_S$  à  $10\,854\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_S = 921\text{nm}$ ) produisent une onde Anti-stokes  $\omega_{AS}$  à  $16\,544\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{AS} = 604\text{nm}$ ) correspondant à la fréquence de vibration Raman de la liaison symétrique aliphatique C-H présente surtout dans les membranes lipidiques plasmique et intracellulaires. Les puissances des lasers pompe et Stokes sont de l'ordre de  $800\ \mu\text{W}$  pour une fréquence de répétition de 2 MHz.

L'emploi de lasers émettant dans le proche infrarouge prévient les phénomènes d'absorption préjudiciables aux objets biologiques. En outre, le caractère stimulé de l'émission CARS rend cette technique beaucoup plus sensible que la microscopie Raman spontanée.

## Références

1. A. Volkmer, "Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38**, R59-R81 (2005).
2. M. D. Ducan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, "Scanning coherent anti-stokes Raman microscope," *Opt Lett* **7**, 350-352 (1982).
3. A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, "Vibrational microscopy using coherent anti-Stokes Raman scattering," *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4014-4017 (1999).
4. Y. R. Shen, *The principles of non linear optics* (Wiley, New York, 1984).
5. A. Volkmer, J.-X. Cheng, and X. S. Xie, "Vibrational Imaging with High Sensitivity via Epidetected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy," *Phys. Rev. Lett.* **87**, 23901 (2001).
6. N. Djaker, D. Gachet, N. Sandeau, P. F. Lenne, and H. Rigneault, "Refractive effects in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *Applied Optics*. 20 Sept. 2006; 45(27): 7005-11 (2006).
7. N. Djaker, D. Marguet, and H. Rigneault, "Microscopie Raman stimulée (CARS) : principes et applications," *Médecine-Sciences* **22**, 853-858 (2006).
8. N. Djaker, P.-F. Lenne, D. Marguet, A. Colonna, C. Hadjur, and H. Rigneault, "Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy (CARS): Instrumentation and applications," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* **571**, 177-181 (2007).