

sance instantanée sur la section du faisceau) de l'ordre du térawatt (10^{12} watts) par centimètre carré.

En imagerie biologique avec des intensités plus faibles, cette concentration d'énergie peut servir à reconstruire une image en volume d'un tissu épais (constitué de plusieurs couches de cellules, tels les os ou les muscles) et à en distinguer les différents constituants.

La technique de microscopie multiphotonique, développée dans les années 1980, utilise des lasers femtosecondes. Elle est fondée sur le phénomène d'absorption à deux photons, qui repose sur la réponse non linéaire des tissus biologiques (voir l'encadré page ci-contre). Les impulsions laser sont focalisées dans un petit volume. La résolution en profondeur est obtenue en apportant une énergie importante, qui entraîne une réponse non linéaire (émission d'une lumière de fréquence différente) du volume de tissu observé. Il ne reste plus alors qu'à balayer ce point focal pour reconstruire l'image de l'objet.

Depuis peu, les biologistes combinent le façonnage d'impulsions à la technique de microscopie multiphotonique. En effet, le façonnage maximise la réponse non linéaire d'un type de molécule plutôt qu'un autre, ce qui accroît la sélectivité et la spécificité des signaux observés, et rend les images plus riches en informations. Ainsi, Manuel Joffre et Emmanuel Beaurepaire, du Laboratoire Optique et biosciences à Palaiseau, ont visualisé simultanément deux protéines différentes dans un embryon de mouche, à l'aide d'impulsions laser façonnées (voir la figure 2). En superposant les deux images obtenues, ils ont reconstruit une image unique contenant les deux marquages différenciés.

Naissance de l'attophysique

Si la microscopie multiphotonique s'appuie sur des effets non linéaires d'ordre 2 ou 3, les lasers femtosecondes ont aussi permis d'atteindre le régime des harmoniques élevées, d'ordre n . Suivant l'approche corpusculaire de la lumière, un milieu absorbant n photons à la fréquence ν émet de la lumière à la fréquence $n\nu$.

Ainsi, en 1988, Anne l'Huillier et ses collègues, au CEA de Saclay, ont excité des atomes de gaz inertes tels que le néon et l'argon à l'aide d'impulsions femtosecon-

des. Ils ont observé l'émission de lumière à des fréquences dites harmoniques, multiples de la fréquence laser initiale.

L'utilisation du façonnage a participé au contrôle de l'émission des harmoniques. Aujourd'hui, les chercheurs sont capables d'engendrer un grand nombre d'harmoniques en même temps, ce qui crée une impulsion laser avec un spectre extrêmement large. Cela a permis d'envisager l'obtention d'impulsions attosecondes.

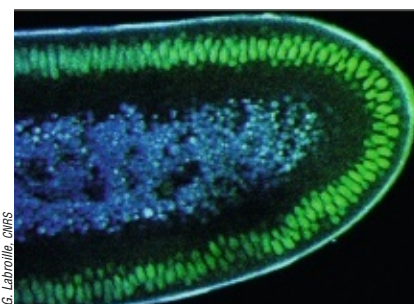
Une décennie de travaux a été nécessaire pour contrôler ces processus et mettre au point des dispositifs permettant de mesurer la durée d'impulsions aussi courtes. Aujourd'hui, des impulsions qui durent moins d'une centaine d'attosecondes ont par exemple permis de suivre en temps réel l'évolution d'un électron dans un atome ou une molécule.

En une trentaine d'années, les lasers femtosecondes ont conquis de nombreux laboratoires, permettant à la fois d'observer des phénomènes de plus en plus brefs et d'atteindre des densités de puissance élevées.

Le façonnage des impulsions laser, maintenant bien maîtrisé, permet de produire des impulsions très brèves et très intenses, de contrôler des réactions chimiques, d'observer des effets fondamentaux de l'interaction lumière-matière fondés sur des interférences quantiques, mais aussi d'améliorer grandement la sélectivité et la spécificité de l'imagerie biologique. Enfin, l'association du contrôle des impulsions courtes et des processus hautement non linéaires a donné naissance à l'« attophysique », la science des impulsions attosecondes.

D'autres applications se développent dans le domaine du codage de l'information. Des séquences d'impulsions façonnées ont été utilisées pour « imprimer » une information sur des atomes. En parallèle du façonnage dans le domaine fréquentiel, de nombreux travaux ont été faits dans le domaine spatial.

Combiné avec le contrôle spatial des impulsions, il permet de focaliser des impulsions dans des milieux très diffusants (voir l'article Voir à travers le brouillard dans ce numéro), ou d'atteindre des puissances laser inégalées. Enfin, avec le développement de la nanoplasmonique et des techniques d'imagerie électronique, il ouvre la voie au contrôle de la matière à l'échelle nanométrique. Le façonnage d'impulsions a encore un bel avenir. ■

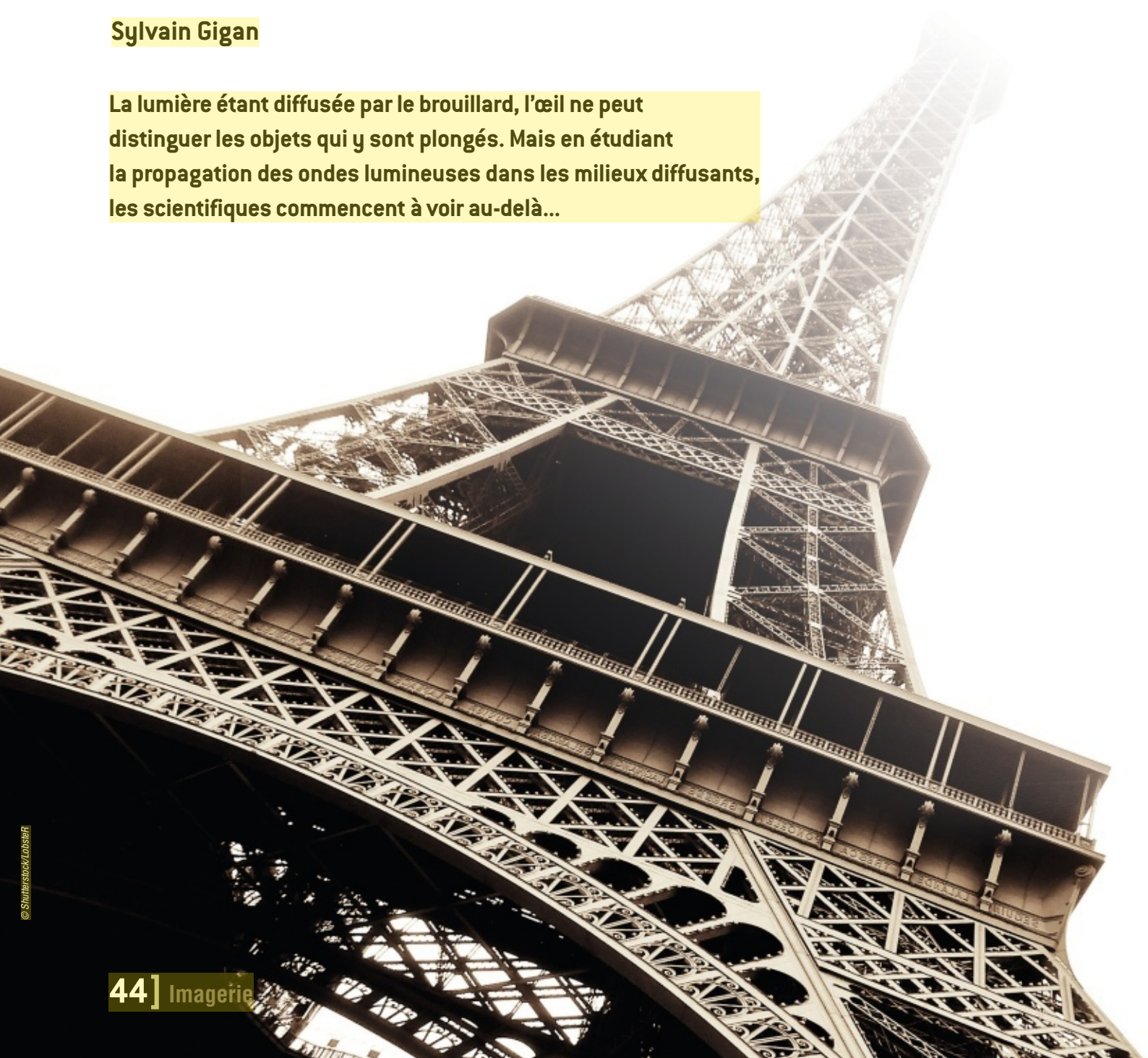


2. EMBRYON DE DROSOPHILE en cours de développement observé en microscopie biphotonique avec des impulsions façonnées. L'embryon est marqué avec la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) qui repère les noyaux cellulaires, mais présente aussi une fluorescence naturelle bleue dans les réserves vitellines internes. Des impulsions façonnées de façon à exciter sélectivement par absorption à deux photons soit les fluorophores bleus, soit les fluorophores verts, sont dirigées vers l'embryon. Deux images, enregistrées simultanément avec les deux formes d'impulsions, puis combinées, révèlent la distribution de la fluorescence naturelle des réserves vitellines en bleu et de celle de la GFP dans les noyaux en vert.

Voir à travers le brouillard

Sylvain Gigan

La lumière étant diffusée par le brouillard, l'œil ne peut distinguer les objets qui y sont plongés. Mais en étudiant la propagation des ondes lumineuses dans les milieux diffusants, les scientifiques commencent à voir au-delà...



Quand le brouillard se forme, les objets échappent peu à peu au regard et sont d'autant plus noyés dans une blancheur ambiante qu'ils y sont enfouis. La diffusion de la lumière est responsable de ce phénomène.

Le brouillard est une suspension de gouttelettes d'eau dans l'air. Ces gouttelettes dévient la lumière : on dit qu'elles la diffusent. La lumière venant des objets proches a peu de chances de rencontrer une gouttelette sur son trajet, de sorte que l'on peut voir distinctement ces objets. Cette partie de la lumière qui n'est pas déviée, même dans un milieu très « diffusant », est la lumière balistique. Pour les objets éloignés, la probabilité que la lumière ne soit pas déviée diminue jusqu'à devenir quasi nulle ; la lumière est alors diffusée de nombreuses fois, formant une lueur blanche (voir la figure 1). L'œil ou n'importe quel appareil d'imagerie classique, tel un appareil photographique, sont incapables de voir l'objet ou de localiser la source de lumière.

La diffusion de la lumière est omniprésente

La diffusion de la lumière est omniprésente dans la nature ; le brouillard, mais aussi la neige, le papier, le lait ou une couche de peinture blanche sont des exemples de milieux diffusants. Ces matériaux sont blancs, car ils dévient la lumière, mais ne l'absorbent pas.

Les tissus biologiques, par exemple la peau, sont aussi diffusants, car ils ont une structure hétérogène à toutes les échelles. Chacun peut s'en rendre compte en plaçant une lampe de poche derrière ses doigts : la lumière n'est pas complètement bloquée et une mince couche de tissu laisse passer une lueur. C'est de la lumière diffusée. Cette lumière est de couleur rouge, car le sang absorbe les longueurs d'onde proches du bleu, laissant passer les composantes rouges de la lumière. Les tissus biologiques représentent un défi pour l'imagerie et fascinent les scientifiques ; ces derniers mettent tout en œuvre pour « voir » à travers et au sein de ces milieux très diffusants.

Si la compréhension des mécanismes de diffusion est récente, les peintres traduisent le phénomène intuitivement depuis longtemps, à l'instar de Léonard de Vinci dans ses paysages embrumés, de Rubens dans son rendu des teintes de chair ou encore

de Georges de La Tour dans sa façon de représenter la bougie à travers une main d'enfant. Non seulement ils reproduisent parfaitement les effets de diffusion de la lumière, mais ils les mettent aussi à profit, jouant sur l'épaisseur et l'empilement des couches de peinture pour moduler cette diffusion et obtenir l'effet artistique voulu.

Cependant, la diffusion de la lumière rend l'imagerie classique, avec un microscope optique par exemple, inutilisable. Certaines techniques sélectionnent la partie balistique de la lumière et récupèrent ainsi des images en profondeur. C'est le cas des méthodes de microscopie confocale et non linéaires, ou de tomographie par cohérence optique. Mais la part de lumière balistique diminue de façon exponentielle lorsqu'on s'enfonce dans le milieu : on ne détecte rapidement que de la lumière qui a été diffusée de nombreuses fois et ces techniques sont limitées aux faibles profondeurs.

Les milieux diffusants en volume sont dits opaques (mais non absorbants) ou translucides. Ils laissent passer la lumière, mais pas les images. Nous allons voir qu'aujourd'hui deux techniques permettent aux scientifiques de focaliser la lumière à travers ces milieux opaques. Elles ouvrent de nouvelles perspectives pour la recherche et l'imagerie des tissus biologiques.

Le calcul exact de la propagation de la lumière dans un milieu opaque est impossible en pratique : il nécessiterait de connaître parfaitement la taille et la position des diffuseurs (par exemple, la forme et la position de toutes les gouttelettes d'eau composant le brouillard). De même, on ne peut pas connaître exactement la position et la vitesse de chaque molécule d'un gaz. Toutefois, dans les gaz, la thermodynamique nous permet d'extraire des grandeurs pertinentes telles que la température et la pression. En optique, on peut également comprendre macroscopiquement le transport de la lumière dans les milieux opaques. Ce phénomène de transport, qui a le même comportement et les mêmes équations que le transport de la chaleur, nous permet de prédire un certain nombre de paramètres, telle la transmission globale de lumière, mais l'information sur le comportement microscopique est perdue.

Néanmoins, la lumière, même multi-diffusée, reste utilisable en imagerie pour deux raisons que nous allons détailler : elle se propage de façon déterministe et peut être « temporellement » retournée. Le contrôle de la lumière est lié au fait qu'il

L'ESSENTIEL

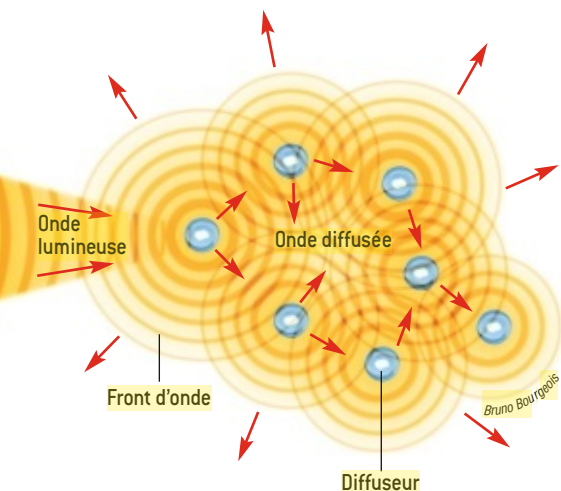
- ✓ La lumière est déviée de multiples fois à travers un milieu opaque. On ne peut donc pas voir l'objet l'ayant émise ou transmise.
- ✓ La propagation de la lumière diffusée est déterministe et peut être inversée temporellement.
- ✓ Les miroirs à conjugaison de phase renvoient une onde lumineuse à l'identique, mais renversée dans le temps ; ils permettent de reconstruire l'image d'un objet après diffusion.
- ✓ Avec les techniques de contrôle actif du front d'onde, les scientifiques réussissent à focaliser la lumière diffusée et espèrent ainsi voir à travers un tissu biologique, et même à l'intérieur de ce dernier.

1. DANS LE BROUILLARD, la lumière renvoyée par la tour Eiffel est diffusée par les gouttelettes d'eau en suspension. Dans la partie haute de la tour, on ne voit qu'une lueur blanche, car toute la lumière a été diffusée de très nombreuses fois.

À proximité de la base de l'édifice, une partie de la lumière, dite balistique, est peu déviée, car elle traverse une épaisseur de brouillard moindre : les pieds du monument sont donc visibles.

La diffusion de la lumière

✓ Une onde lumineuse monochromatique, dont l'énergie est portée par les photons, présente une période spatiale déterminée, la longueur d'onde λ , la distance séparant deux maximums successifs de l'onde. Quand une source émet de la lumière, la surface où tous les points de l'onde ont la même phase est le front d'onde, la « ligne de crête » de l'onde. Une onde lumineuse qui rencontre un obstacle, un « diffuseur » tel qu'une goutte d'eau, se voit réémise dans toutes les directions. Cette onde secondaire se propage jusqu'à rencontrer un autre diffuseur, et ainsi de suite. C'est la diffusion multiple.



L'AUTEUR



Sylvain GIGAN est maître de conférences à l'École supérieure de physique et de chimie industrielles de la ville de Paris (ESPCI ParisTech), et effectue ses recherches au Laboratoire d'optique de l'Institut Langevin *Ondes et images*.

s'agit d'une onde électromagnétique, portée par des photons et présentant une double périodicité, temporelle (la période T) et spatiale (la longueur d'onde λ).

La propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu opaque non absorbant, aussi complexe soit-elle, n'est pas aléatoire, mais déterministe : un même faisceau (une onde de lumière monochromatique, de longueur d'onde unique) envoyé sur le même milieu donne exactement la même figure de diffusion, jusqu'aux détails microscopiques des interférences. Ensuite, les équations de propagation d'une onde dans un milieu diffusant (en l'absence d'absorption) ne changent pas par renversement du temps (changement de t en $-t$ dans les équations). On ne sait pas renverser le sens du temps, mais on dispose d'outils pour réémettre une onde « à l'envers ». La lumière revient alors sur ses pas, et comme la propagation est déterministe, le processus de diffusion est inversé. Ce sont ces concepts qui permettent de guider la lumière à travers les milieux opaques. Voyons donc comment retourner une onde et illustrons ces idées par quelques exemples.

En acoustique, en micro-ondes ou en hyperfréquence, on dispose de sources et de capteurs émettant et détectant un signal temporel quelconque ; c'est dans ces domaines que les concepts de renversement du temps et de contrôle de la propagation dans les milieux complexes ont d'abord été démontrés (voir l'article La complexité : un atout pour le retournement temporel des ondes dans ce numéro). En optique, les fréquences des ondes électromagnétiques (de l'ordre de 10^{15} hertz, soit un million de gigahertz) sont bien supérieures aux vitesses des détecteurs, même les plus rapides : la mesure directe du champ électromagnétique est impossible et l'on n'a accès qu'à l'intensité lumineuse moyenne.

Par ailleurs, les sources lumineuses – les lasers – ne sont pas modulables aisément ; on ne peut pas, comme en acoustique, choisir le signal à envoyer. En revanche, l'optique permet, dans le visible, d'observer les détails de la matière à l'échelle de la centaine de nanomètres de résolution (voir l'article Lumière sur l'infiniment petit dans ce numéro). Deux outils ont récemment permis d'étendre à l'optique les concepts de renversement du temps et d'imagerie en milieu diffusant développés en acoustique : les miroirs à conjugaison de phase et le contrôle de front d'onde.

Les miroirs à conjugaison de phase sont des dispositifs qui ne réfléchissent pas seulement une onde, comme le fait un miroir classique, mais la renvoient en changeant le signe de sa phase. Pour une onde monochromatique, ce changement correspond à un renversement temporel. Une onde divergente se réfléchissant sur un tel miroir devient convergente et « reconverge » sur sa source. En optique géométrique (l'approximation de l'optique qui s'appuie sur la notion de rayon lumineux, objet théorique représentant la direction de propagation de l'énergie d'une onde), un rayon lumineux incident sur un miroir à conjugaison de phase revient sur lui-même quel que soit son angle d'incidence (voir l'encadré page ci-contre).

Retour direct à l'envoyeur

Pour l'optique, c'est Juris Upatnieks, de l'Université du Michigan, qui a montré ce principe de conjugaison de phase en 1966 ; il a réussi à reformer une image à travers une surface de verre rugueuse par conjugaison de phase, grâce à un hologramme enregistré sur une plaque photographique (nous y revenons ci-après). Mais aucun dispositif passif, ni aucune géométrie simple de surface ne réalisent un tel effet.

En 1976, Amnon Yariv, à l'Institut californien de technologie, proposa le premier miroir à conjugaison de phase fondé sur un effet non linéaire, dit « à mélange de trois ondes ». Il montra comment un cristal illuminé par un laser peut, dans certaines conditions, se comporter comme un miroir à conjugaison de phase. Il lança ainsi l'utilisation de ces miroirs avec les lasers pour corriger les aberrations (le fait que les ondes issues d'une même source lumineuse ponctuelle ne convergent pas toutes en un même point après avoir traversé un milieu) et pour améliorer la qualité des images.

Cependant, l'application de ces miroirs aux milieux diffusants biologiques n'est intervenue que récemment. En 2008, l'équipe de Changhuey Yang, à l'Institut californien de technologie, a montré qu'un miroir à conjugaison de phase peut reformer une image à travers un milieu biologique, du blanc de poulet de moins d'un millimètre d'épaisseur. Elle a utilisé un processus de conjugaison de phase fondé sur des cristaux non linéaires particuliers, dits photoréfractifs.

Dans la première étape de cette expérience, un faisceau de lumière laser est