

> Les avancées récentes en physique des lasers ont permis de mettre en œuvre une technique de microscopie permettant d'observer les liaisons chimiques des molécules présentes dans un échantillon biologique. Cette technique utilise l'effet Raman stimulé comme origine de contraste et permet de générer des images en trois dimensions à partir d'échantillons non marqués et ne nécessitant aucune préparation. Connue sous le nom de CARS (*coherent anti-stokes raman scattering*), cette nouvelle microscopie optique nécessite, pour l'instant, un appareillage complexe mais des avancées récentes laissent envisager sa commercialisation dans les années à venir. Quels types d'images peut-on obtenir en microscopie CARS ? Quelles sont les limites et les espoirs d'une telle approche en imagerie cellulaire et tissulaire ? A quoi ressemble et ressemblera un microscope CARS ? Même si les réponses à ces questions sont encore en pleine évolution, elles permettent de mieux cerner les enjeux d'une technique qui s'approche du but ultime de la microscopie : voir une molécule ou un assemblage moléculaire évoluer et interagir dans l'échantillon sans avoir recours à aucun marquage. <

### Le contraste Raman

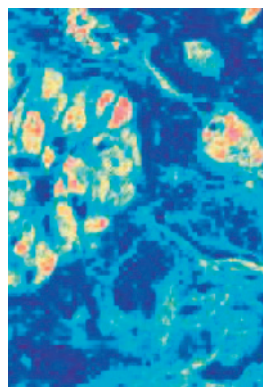
Toutes les liaisons chimiques possèdent des fréquences de vibration qui leur sont propres. On appelle techniques optiques vibrationnelles des méthodes qui visent à utiliser l'interaction lumière/matière pour obtenir des informations sur ces vibrations moléculaires. La plus connue de ces techniques est la spectroscopie infrarouge (IR) qui observe les raies d'absorption spécifiques des liaisons chimiques présentes dans un échantillon. Découverte en 1928, la diffusion Raman [1] (du nom

Article reçu le 2 février 2006, accepté le 2 juin 2006.

## Microscopie Raman stimulée (CARS)

### Principes et applications

Nadia Djaker, Didier Marguet, Hervé Rigneault



N. Djaker, H. Rigneault :  
 Institut Fresnel, Équipe Mosaic,  
 UMR CNRS 6133,  
 Université Paul Cézanne  
 Aix-Marseille III,  
 Domaine Universitaire  
 de Saint-Jérôme  
 13397 Marseille Cedex 20, France.

D. Marguet :  
 Centre d'Immunologie  
 de Marseille Luminy, Inserm U631,  
 UMR CNRS 6102,  
 Parc Scientifique de Luminy,  
 case 906,  
 13288 Marseille Cedex 9, France.

[herve.rigneault@fresnel.fr](mailto:herve.rigneault@fresnel.fr)

du physicien Chandrasekhara Venkata Raman qui découvrit l'effet) permet d'utiliser la lumière visible pour accéder au spectre vibrationnel des molécules qui interagissent avec un faisceau lumineux. Dans un processus de diffusion Raman, une onde pompe de pulsation  $\omega_p$  incidente sur une molécule est diffusée inélastiquement en une onde dite Stokes de pulsation  $\omega_s$  et une onde dite Anti-Stokes de pulsation  $\omega_{AS}$ . L'écart en fréquence entre les ondes générées et l'onde pompe dépend de la pulsation vibrationnelle moléculaire (de pulsation  $\Omega_R$ ) de telle sorte que  $\omega_p - \omega_s = \omega_{AS} - \omega_p = \Omega_R$ . Dans une vision photonique du processus, les ondes Stokes et Anti-Stokes correspondent à une absorption à partir respectivement du niveau vibrationnel fondamental ou excité (Figure 1 A-B).

Le processus engendrant l'onde Anti-Stokes, partant du niveau vibrationnel excité (B), est beaucoup moins probable que le processus créant l'onde Stokes qui est le seul observé dans la pratique en Raman spontané. Une étude fine de la répartition spectrale des ondes Stokes renseigne sur les densités de liaisons chimiques présentes dans l'échantillon. Mise en œuvre sur des tissus, la diffusion Raman spontanée peut apporter de précieuses informations dans la détection d'amas cancéreux [2]. Ce processus spontané de diffusion inélastique est très peu efficace comparé à la fluorescence et ne peut pas être mis en œuvre à un niveau subcellulaire (les sections



efficaces Raman sont de l'ordre de  $10^{-30} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}$ , à comparer avec la section efficace d'absorption à un photon d'un fluorophore qui atteint  $10^{-16} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}$ ).

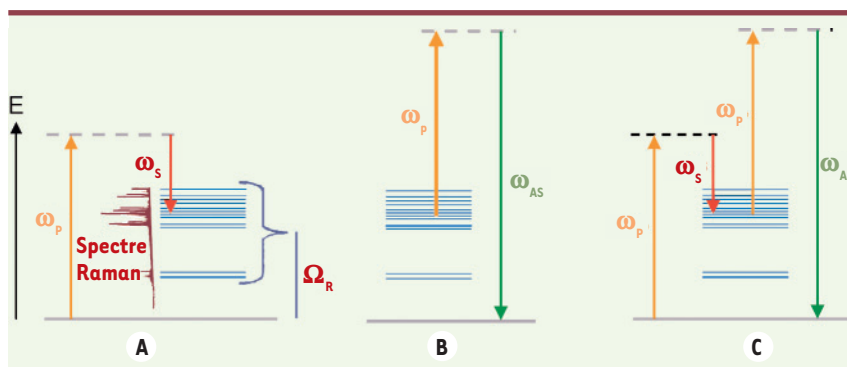
## CARS

Il existe cependant une technique qui consiste à forcer l'excitation d'une liaison chimique spécifique par différence de fréquence. Ce processus d'optique non linéaire, dénommé CARS (*coherent anti-Stokes raman scattering*), est possible au point focal d'un objectif de microscope si les ondes pompe et Stokes vérifient  $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$  et se recouvrent spatialement et temporellement [3]. Il se produit alors un mélange à quatre ondes qui conduit à l'émission d'une onde Anti-Stokes de pulsation  $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s$  (Figure 1C).

CARS est beaucoup plus efficace (ce gain se situe autour de  $10^6$ ) que le processus de diffusion Raman spontanée Stokes (Figure 1A) car la vibration moléculaire est spécifiquement forcée par différence de fréquence. Il est d'autre part sélectif car, contrairement au cas spontané, il est possible de cibler la liaison chimique d'intérêt en ajustant la différence de fréquence  $\omega_p - \omega_s$ .

Comme l'absorption à deux photons, CARS est un processus multiphotonique (il utilise deux photons pompes à  $\omega_p$  et un photon Stokes à  $\omega_s$ ) qui est d'autant plus probable que les champs optiques sont forts. CARS requiert donc l'utilisation de lasers impulsifs et, comme en fluorescence à deux photons, ne se produit qu'au foyer d'un l'objectif de microscope qui sert à focaliser les champs pompe et Stokes dans l'échantillon ; ce point de focalisation définit intrinsèquement un « volume de collection » qui permet d'obtenir par balayage des images tridimensionnelles.

En spectroscopie Raman, les pulsations et leur différences sont exprimées en  $\text{cm}^{-1}$  ; ainsi, si la longueur d'onde du laser pompe est égale à  $\lambda_p = 2\pi c/\omega_p = 730 \text{ nm}$  et celle du laser Stokes  $\lambda_s = 922 \text{ nm}$ , la différence de pulsations  $\omega_p - \omega_s$  permet de sonder le niveau vibrationnel  $1/\lambda_p - 1/\lambda_s = 13699 - 10854 = 2845 \text{ cm}^{-1}$  (fréquence de résonance de la liaison C-H symétrique aliphatique dans ce cas) (voir Figure 3).



**Figure 1. Raman spontané.** Lors de l'interaction de l'onde pompe de pulsation  $\omega_p$  avec le niveau vibrationnel moléculaire de pulsation  $\Omega_R$ , il y a production de (A) l'onde Stokes  $\omega_s$  et (B) de l'onde Anti-Stokes  $\omega_{AS}$  ; ces ondes décalées en pulsation de  $\Omega_R$  par rapport à l'onde pompe permettent d'identifier la présence de la liaison chimique vibrant à  $\Omega_R$ . **Raman stimulé CARS.** Le processus de mélange à quatre ondes crée l'onde Anti-Stokes (C).

## Microscopie CARS : mise en œuvre

La Figure 2 présente un exemple de mise en œuvre d'une expérience de microscopie CARS en configuration colinéaire, c'est-à-dire lorsque les faisceaux pompe et Stokes sont co-propagatifs et focalisés par le même objectif de microscope de forte ouverture numérique (NA). Dans la pratique, une solution efficace consiste à utiliser deux oscillateurs laser accordables (Saphir : Titane), l'un générant le faisceau pompe tandis que l'autre délivre le faisceau Stokes. Pour obtenir l'effet CARS, ces oscillateurs doivent délivrer des impulsions lumineuses (pour maximiser les champs optiques) dont la durée se situe au voisinage de quelques picosecondes (les impulsions ont ainsi une largeur spectrale comparable à celles des niveaux vibrationnels visés). La difficulté réside principalement dans l'utilisation d'un système de synchronisation permettant d'assurer le recouvrement temporel des faisceaux pompe et Stokes au foyer de l'objectif de microscope. La solution souvent retenue utilise une synchronisation électronique active jouant sur les oscillateurs lasers pour assurer la synchronisation temporelle alors que la superposition spatiale repose sur la précision du système optique utilisé (et sur la dextérité de l'expérimentateur !). Le signal anti-Stokes à  $\omega_{AS}$  (appelé signal CARS) est collecté par des détecteurs sensibles (photodiodes à avalanche ou photomultiplicateurs) à la fois vers l'avant (signal F-CARS) et vers l'arrière (signal E-CARS), à l'aide respectivement d'un objectif de collection (faible NA - permettant une grande distance de travail) et de l'objectif de focalisation (forte NA) [4]. Comme dans un microscope confocal, le point de focalisation des faisceaux pompe et Stokes, lieu de génération du signal CARS, est déplacé dans l'échantillon afin d'obtenir une image point par point. Pour cela, on utilise soit des miroirs galvanométriques, soit un système de nano-positionnement XYZ (cadre piézoélectrique). Des cartes d'acquisition assurent une construction simultanée des images F-CARS et E-CARS.

## Imagerie cellulaire CARS

Une des applications clé de la microscopie CARS est l'imagerie cellulaire non invasive utilisant des liaisons moléculaires naturellement présentes dans la cellule. L'utilisation de lasers infrarouges ayant des puissances d'excitations

modérées (quelques centaines de  $\mu\text{W}$ ) diminue l'endommagement des cellules [5] et permet de réaliser des images avec une bonne résolution spatiale ( $\sim\mu\text{m}$ ) sans avoir recours au marquage. Le contraste de l'image CARS se construit à partir de l'émission cohérente des liaisons moléculaires excitées; ces émissions interférant de manière constructive vers l'avant pour donner l'image F-CARS.

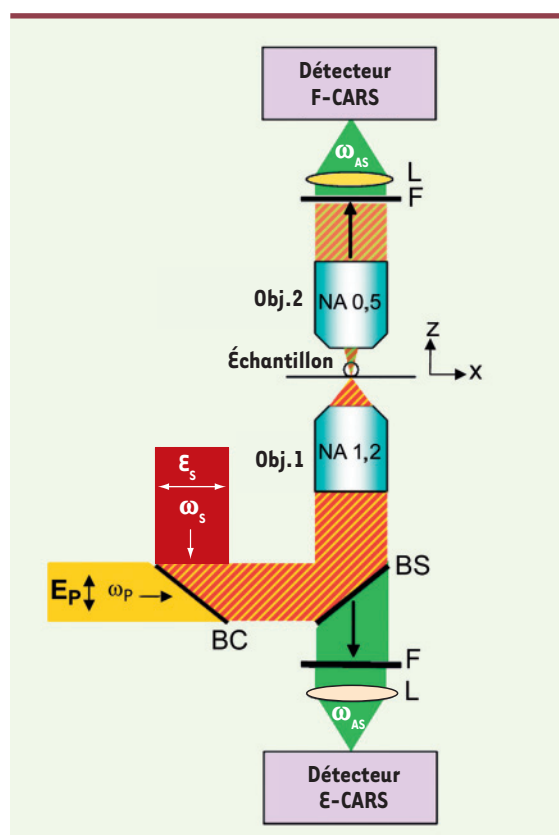
La Figure 3 présente une comparaison d'images de systèmes cellulaires obtenues par microscopie DIC (à contraste interférentiel différentiel) (Figure 3A) et par microscopie CARS (Figure 3B et 3C - images F-CARS). Le contraste CARS est obtenu, dans ce cas, par la liaison symétrique aliphatique C-H qui est présente surtout dans les membranes lipi-

diques plasmique et intracellulaires; les organelles intracellulaires telles que l'appareil de Golgi (autour du noyau) et les petites vésicules sont bien claires en imagerie CARS (alors qu'elle sont non visibles par microscopie DIC). Les deux faisceaux laser pompe et Stokes de fréquence  $\omega_p$  à  $13513\text{ cm}^{-1}$  et  $\omega_s$  à  $10668\text{ cm}^{-1}$  produisent une onde Anti-stokes  $\omega_{AS}$  à  $16358\text{ cm}^{-1}$  correspondant à la fréquence de résonance de la liaison C-H ( $2845\text{ cm}^{-1}$ ). Les images E-CARS sont similaires aux Figures 3A et 3B et font ressortir les vésicules dont le diamètre est plus petit que la longueur d'onde [4].

À cause de sa spécificité spectrale, l'imagerie CARS offre un important avantage par rapport aux autres techniques de microscopie optique; cette spécificité a permis de sonder différentes liaisons moléculaires dans différents systèmes cellulaires. À titre d'exemple, la liaison C-H a été imagée dans les membranes lipidiques et nucléiques [5-7]; de même, la liaison P-O ( $1090\text{ cm}^{-1}$ ) s'est révélée détectable dans les chromosomes [5]. Il est également possible d'imager le milieu environnant la cellule comme cela a été fait pour la liaison O-H [8-10]. La technique de microscopie CARS a été également utilisée pour l'imagerie de membranes lipidiques artificielles [11-13] et, plus récemment, pour de l'imagerie *in vivo* dans des tissus [14].

### Imagerie CARS de membranes modèles : le marquage deutérium

Le signal CARS provenant de la liaison chimique ciblée (dit signal résonant) est toujours accompagné par un signal CARS généré par les autres liaisons présentes dans l'échantillon (signal dit non résonant). Ce signal non résonant n'a pas de spécificité spectrale et, dans certaines conditions, peut être supérieur au signal résonant. Une telle situation diminue considérablement le contraste de l'image CARS. Une première solution permettant de maximiser le signal résonant consiste à utiliser des impulsions lasers picosecondes (2 à 5 ps) pour optimiser le recouvrement entre la largeur de la bande Raman (10 à  $20\text{ cm}^{-1}$ ) et celui des impulsions laser pompe et Stokes incidentes. Cependant, cette stratégie peut s'avérer insuffisante pour les études dans des domaines spectraux vibrationnels très denses (cas de la région du *fingerprint* en dessous de  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) ou pour des constituants fortement représentés dans la cellule. C'est, par exemple, le cas des lipides qui comportent de nombreuses liaisons CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> dont les fréquences de résonance Raman des divers modes de vibrations s'étendent de  $2800\text{ cm}^{-1}$  à  $3500\text{ cm}^{-1}$  [15]. Il est ainsi difficile de différencier certains lipides car leurs fréquences de vibrations se recouvrent et/ou sont assez similaires. Pour remédier à ce problème en microscopie CARS, on utilise un marquage très peu invasif qui consiste à remplacer les groupes de liaisons CH<sub>2</sub> par des liaisons de CD<sub>2</sub>; cela ne perturbe pas le milieu cellulaire car on remplace l'hydrogène par un atome qui lui est très proche « le deutérium ». Les liaisons aliphatiques ou aromatiques (CD<sub>2</sub>) ont une résonance Raman à  $2105\text{ cm}^{-1}$ , située dans une région spectrale entre  $2100$  et  $2300\text{ cm}^{-1}$ , que l'on décrit comme « région silencieuse » de la cellule car très peu encombrée par les signatures Raman des autres liaisons endogènes présentes dans la cellule [16]. Ce marquage deutérium a été utilisé pour l'imagerie des cellules vivantes [17] ainsi que pour étudier les ségrégations de phases dans les membranes lipidiques modèles [18-19].



**Figure 2. Microscopie CARS.** Deux faisceaux laser de pulsations  $\omega_p$  (pompe-orange) et  $\omega_s$  (Stokes-rouge) sont combinés et focalisés par un objectif de microscope de forte ouverture numérique (NA 1,2) pour assurer le processus de mélange d'onde CARS. Le signal CARS généré à  $\omega_{AS}$  est détecté vers l'avant (F-CARS) à l'aide d'un deuxième objectif (NA 0,5) et vers l'arrière (E-CARS) par l'objectif de focalisation. Les états de polarisation des faisceaux pompe et Stokes sont indiqués par les flèches sous les champs électriques  $E_s$  et  $E_p$ . Obj : objectif; BS : lame séparatrice; BC : lame 50/50; F : filtre; NA : ouverture numérique; L : lentille.

La *Figure 4* représente des images F-CARS que nous avons obtenues pour des membranes marquées au deutérium de vésicules unilamellaires géantes (GUV) produites par électroformation [20] à partir d'une solution de lipides deutérés (D54-DMPC). Lorsque la différence de fréquence entre l'onde pompe et Stokes atteint la fréquence de résonance de la liaison C-D ( $2105\text{ cm}^{-1}$  *Figure 4 gauche*), l'intensité de l'onde anti-Stokes engendrée augmente considérablement; en revanche, lorsque cette différence de fréquence s'éloigne de la fréquence de résonance de la liaison C-D ( $2140\text{ cm}^{-1}$  - *Figure 4 droite*), l'intensité de l'onde anti-Stokes décroît et le contraste de l'image devient quasiment nul.

Outre la spécificité spectrale, la microscopie CARS présente un autre point fort dans l'imagerie, lié à la propriété de cohérence de son rayonnement. Cette cohérence permet de différencier les signaux CARS engendrés par les diverses orientations des liaisons chimiques présentes dans l'échantillon. Le signal CARS est en effet maximum si la liaison chimique est orientée suivant la direction de polarisation des faisceaux pompe et Stokes. Sur la partie gauche de la *Figure 4*, on constate que l'intensité du signal CARS est forte au pôle sud lorsque les liaisons C-D sont parallèles à la polarisation des champs incidents (suivant x dans ce cas - indiquée par le vecteur P).

### Micro-spectroscopie CARS

Nous avons vu que la microscopie CARS permet de réaliser des images de liaisons chimiques spécifiques. Il est également possible de l'utiliser comme un outil de spectroscopie en faisant varier l'écart fréquentiel  $\omega_p - \omega_s$  entre les lasers pompe et Stokes. On obtient alors un spectre comme en spectroscopie Raman, mais présentant une bien meilleure sensibilité ( $\sim 10^6$ ). Cette approche de spectroscopie CARS a été utilisée pour caractériser spectralement certains lipides [21-22] et remonter à leurs caractéristiques thermodynamiques [23].

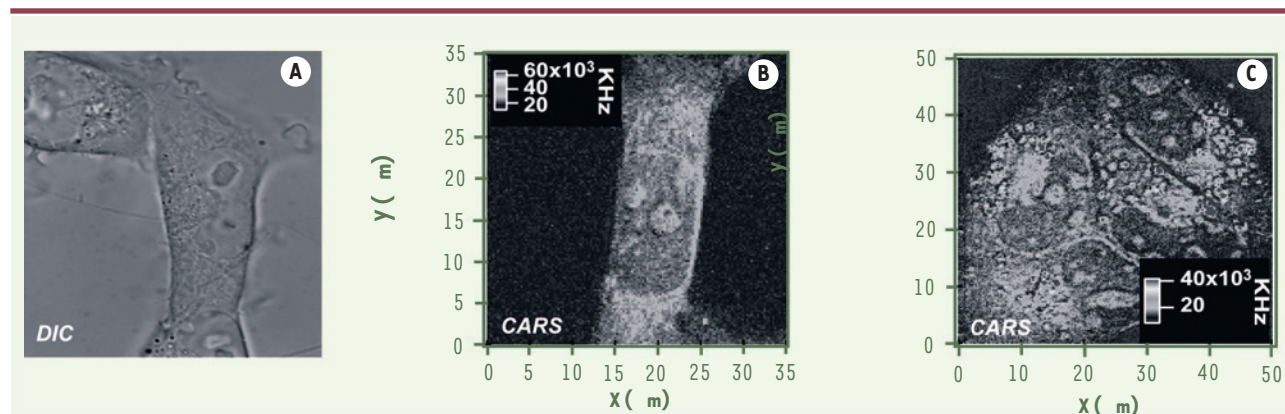
La *Figure 5* représente le spectre CARS d'un mélange lipidique de DOPC et D70-DSPC pour différentes concentrations de D70-DSPC. Le D70-DSPC est un lipide deutéré et le spectre CARS de la *Figure 5* est présenté autour de

la fréquence vibrationnelle de la liaison  $\text{CD}_2$  à  $2105\text{ cm}^{-1}$ . L'intensité du signal CARS résonant de C-D dépend du nombre de liaisons présentes dans l'échantillon. La concentration minimale de liaisons présentes dans le volume d'excitation, à partir de la quelle on peut détecter un signal CARS est de l'ordre de 20 % (*voir Figure 5*).

Des études sur la sensibilité de la microscopie CARS au marquage peu invasif au deutérium ont été faites sur des bicouches lipidiques et sur des membranes modèles de vésicules géantes (GUV). Ces études ont permis de détecter les différentes phases lipidiques et d'étudier l'implication du cholestérol dans l'organisation des membranes [19].

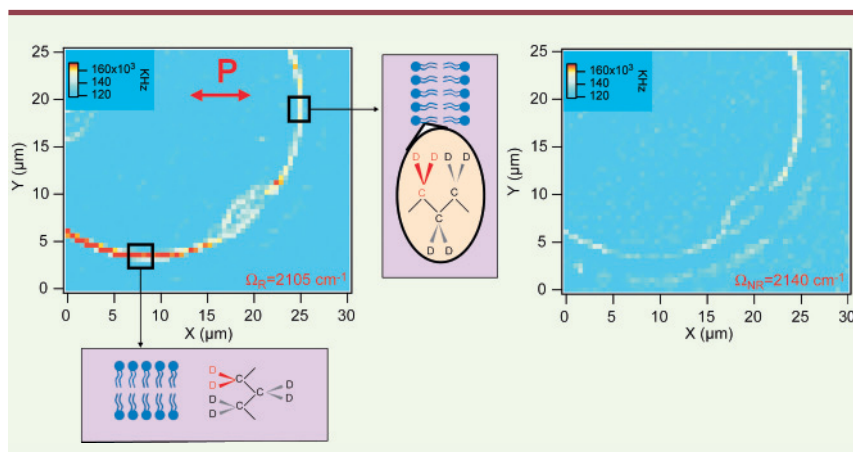
### Conclusions

La microscopie CARS est encore une technique en plein développement, cependant les avancées récentes laissent envisager sa très prochaine utilisation dans les laboratoires de biologie pour des études cellulaires ou tissulaires [5, 14]. Par rapport aux autres techniques de microscopie, son intérêt majeur réside, d'une part, dans l'absence de marquage et, d'autre part, dans son pouvoir de combiner information spectrale et imagerie et cela à partir de liaisons chimiques endogènes à l'échantillon. Pour l'instant, les lipides ont été très largement imagés et même si les résultats sont encourageants, il faudra encore faire la preuve de la versatilité de la technique pour son utilisation sur des liaisons moins représentées dans les cellules et tissus. Si l'imagerie en l'absence de marquage reste une caractéristique unique de l'imagerie CARS, il se peut que le recours à des marquages peu invasifs (du type deutérium) soit nécessaire pour retrouver une spécificité dans un univers spectral vibrationnel très encombré. Du point de vue du système instrumental, il reste encore complexe et des solutions plus compactes et moins onéreuses

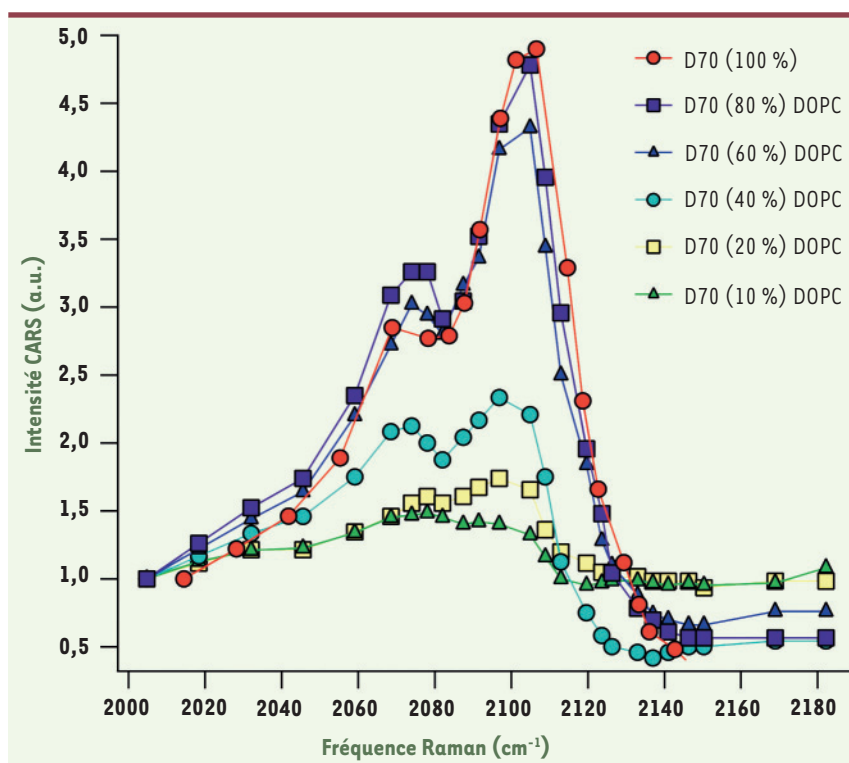


**Figure 3. Images de cellules COS-7 obtenues par microscopie DIC (A) et par microscopie CARS (B, C) (images F-CARS).** Les deux faisceaux laser d'excitation de pulsations  $\omega_p$  à  $13699\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_p = 730\text{nm}$ ) et  $\omega_s$  à  $10854\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_s = 921\text{nm}$ ) produisent une onde Anti-stokes  $\omega_{AS}$  à  $16544\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{AS} = 604\text{nm}$ ) 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  $800\text{ }\mu\text{W}$  pour une fréquence de répétition de  $2\text{ MHz}$ .





**Figure 4. Images F-CARS d'une vésicule unilamellaire géante (GUV).** La vésicule est obtenue par électroformation utilisant une solution de lipides deutérés (D54-DMPC). À gauche, l'image enregistrée à la fréquence de résonance de la vibration Raman de la liaison CD à  $2105\text{ cm}^{-1}$ . L'intensité du signal CARS est forte au pôle sud lorsque les liaisons C-D sont parallèles à la polarisation des champs incidents (suivant x dans ce cas - indiquée par le vecteur P). À droite, la même image enregistrée à une fréquence de non-résonance à  $2140\text{ cm}^{-1}$ .



**Figure 5. Intensité du signal F-CARS en fonction de la concentration du lipide deutéré D70-DSPC dans une mixture lipidique D70-DSPC/DOPC.** Intensité du signal F-CARS obtenue utilisant différentes mixtures de lipides deutérés (D70-DSPC) et non-deutérés (DOPC), enregistrés sur une plage de fréquence allant de 2000 à  $2180\text{ cm}^{-1}$ . La concentration minimale de liaisons D70-DSPC détectable par la microscopie CARS est de l'ordre de 20 %.

ses sont actuellement à l'essai utilisant, en particulier, des oscillateurs paramétriques optiques. Le but est d'amener cette technique dans les microscopes commerciaux confocaux et de la proposer à l'utilisateur au même titre que la fluorescence à deux photons. Les microscopes sont d'ores et déjà prêts à recevoir la technique CARS, le seul obstacle étant encore le système laser, mais, comme c'est généralement le cas, cet état de fait ne saurait durer et des systèmes commerciaux CARS devraient rapidement voir le jour. Plus qu'une finalité, c'est surtout dans la combinaison de cette technique avec les autres approches plus conventionnelles qu'il faut voir un réel intérêt de CARS. Peut être que voir une molécule unique se déplacer dans l'espace cellulaire ou tissulaire sans la marquer restera encore un rêve, en tout cas, il s'agit bien d'un but ambitieux que poursuivent les équipes de biologistes et physiciens qui développent et valident ces nouvelles techniques de microscopie. ♦

## SUMMARY

### Stimulated Raman microscopy (CARS) : from principles to applications

A new technique in microscopy is now available which permits to image specific molecular bonds of chemical species present in cells and tissues. The so called Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) approach aims at maximizing the light matter interaction between two laser pulses and an intrinsic molecular vibrational level. This is possible through a non linear process which gives rise to a coherent radiation that is greatly enhanced when the frequency difference between the two laser pulses equals the Raman frequency of the aimed molecular bond. Similar to confocal microscopy, the technique permits to build an image of a molecular density within the sample but doesn't require any labelling or staining since the contrast uses the intrinsic vibrational levels present in the sample. Images of lipides in membranes and tissues have been reported together with their spectral analysis. In the case of very congested media, it is also possible to

use a non invasive labelling such as deuterium which shifts the molecular vibration of the C-H bond down to the C-D bond range which falls in a silent region of the cell and tissue vibrational spectra. Such an approach has been used to study lipid phase in artificial membranes. Although the technique is still under development, CARS has now reach a maturity which will permit to bring the technology at a commercial stage in the near futur. The last remaining bottleneck is the laser system which needs to be simplified but solutions are now under evaluation. When combined with others more conventionnel techniques, CARS should give its full potential in imaging unstained samples and like two photons techniques has the potential of performing deep tissues imaging. ♦

## GLOSSAIRE

**Absorption à deux photons :** processus où un fluorophore est excité en absorbant deux photons infrarouges simultanément.

**Diffusion inélastique :** une diffusion est dite inélastique lorsque la lumière diffusée par l'échantillon à une pulsation différente de celle de l'onde pompe. *A contrario*, lors d'une diffusion élastique, la lumière diffusée à la même pulsation que l'onde pompe.

**Émission cohérente :** émission de lumière où la phase est bien définie et donnant lieu à des phénomènes d'interférences.

**Fingerprint (région du) :** région du spectre vibrationnel moléculaire se situant en dessous de  $1500\text{ cm}^{-1}$  et commun à de nombreuses liaisons chimiques.

**Mélange à quatre ondes :** il s'agit d'un processus d'échange d'énergie entre quatre ondes optiques de pulsations différentes (ici  $\omega_b$ ,  $\omega_s$ ,  $\omega_p$  et  $\omega_{AS}$ ). Cet échange d'énergie est possible si les champs optiques sont suffisamment forts pour induire une réponse non linéaire de la matière (impulsions courtes dans le cas de CARS).

**Niveau vibrationnel :** une liaison chimique ne peut vibrer que sur certaines fréquence  $\Omega_R$ ; dans une vision quantique de ce phénomène, chacun des état vibratoire est associé à une énergie  $\Omega_R$  définissant un niveau énergétique vibrationnel est égal à la constante de Planck  $h$  divisée par  $2\pi$ .

**Onde pompe :** il s'agit de l'onde lumineuse qui éclaire l'échantillon biologique et dont l'interaction va révéler des informations sur la nature moléculaire de l'échantillon.

**Oscillateur laser accordable :** laser dont on peut régler la longueur d'onde de fonctionnement (ici entre 700nm et 1000nm avec les oscillateurs lasers Saphir : Titane).

**Oscillateurs paramétriques optiques :** dispositif émettant une lumière cohérente s'apparentant à un laser mais dont le processus de gain utilise des mélanges d'ondes.

**Polarisation (des faisceaux) :** direction suivant laquelle vibre le champ électrique associé à une onde lumineuse.

**Pulsation :** elle est définie comme  $\omega = 2\pi\nu = 2\pi c/\lambda$  ou  $\nu$  est la fréquence de l'onde lumineuse et  $\lambda$  sa longueur d'onde.

**Pulsation vibrationnelle :** pulsation associée à une vibration moléculaire.

**Section efficace Raman :** elle est reliée au taux de conversion d'un photon pompe en photon Stokes.

**Synchronisation électronique active (cas d'un système CARS) :** dispositif de contre réaction électronique actif permettant d'assurer le même taux de répétition (en jouant sur la longueur de cavité des oscillateurs lasers) entre les lasers pompe et Stokes.

## RÉFÉRENCES

1. Raman CV, Krishnan KS. A new radiation. *Indian J Phys* 1928 ; 2 : 387.
2. Choo-Smith LP, Edwards HG, Endtz HP, *et al.* Medical applications of Raman spectroscopy : from proof of principle to clinical implementation. *Biopolymers* 2002 ; 67 : 1-9.
3. Zumbusch A, Holtom G, Xie XS. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering. *Phys Rev Lett* 1999 ; 82 : 4142-5.
4. Volkmer A, Cheng JX, Xie XS. Vibrational imaging with high sensitivity via epideTECTED coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Phys Rev Lett* 2001 ; 87 : 23901-4.
5. Cheng JX, Jia YK, Zheng GF, Xie XS. Laser-scanning coherent anti-stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology. *Biophysical J* 2002 ; 83 : 502-9.
6. Cheng JX, Volkmer A, Book LD, Xie XS. An epi-detected coherent anti-stokes raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity. *J Phys Chem B* 2001 ; 105 : 1277-80.
7. Nan X, Cheng JX, Xie XS. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J Lipid Res* 2003 ; 44 : 2202-8.
8. Potma EO, Boeij WP, Haastert PJM, Wiersma DA. Real-time visualization of intracellular hydrodynamics in single living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 1577-82.
9. Pautot S, Frisken BJ, Cheng JX, *et al.* Spontaneous formation of lipid structures at oil/water/lipid interfaces. *Langmuir* 2003 ; 19 : 10281-7.
10. Cheng JX, Pautot S, Weitz DA, Xie XS. Ordering of water molecules between phospholipid bilayers visualized by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 9826-30.
11. Cheng JX, Volkmer A, Book LD, Xie XS. Multiplex coherent anti-stokes Raman scattering microspectroscopy and study of lipid vesicles. *J Phys Chem B* 2002 ; 106 : 8493-8.
12. Muller M, Schins JM. Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy. *J Phys Chem B* 2002 ; 106 : 3715-23.
13. Potma EO, Xie XS. Detection of single lipid bilayers with coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *J Raman Spectroscopy* 2003 ; 34 : 642-50.
14. Wang H, Fu Y, Zickmund P, *et al.* Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues. *Biophys J* 2005 ; 89 : 581-91.
15. Nan X, Yang WY, Xie XS. CARS Microscopy light up lipids in living cells. *Biophotonics Int* 2004 ; 11 : 44-7.
16. Potma EO, Xie XS. Direct visualization of lipid phase segregation in single lipid bilayers with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Chem Phys Chem* 2005 ; 6 : 77-9.
17. Holtom GR, Thrall BD, Chin BY, *et al.* Achieving molecular selectivity in imaging using multiphoton Raman spectroscopy techniques. *Traffic* 2001 ; 2 : 781-8.
18. Potma EO, Xie XS. Direct visualization of lipid phase segregation in single lipid bilayers with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Chem Phys Chem* 2005 ; 6 : 77-9.
19. Li L, Wang HF, Cheng JX. Quantitative coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipid distribution in coexisting domains. *Biophysical J* 2005 ; 89 : 3480-90.
20. Dimitrov DS, Angelova MI. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric-field. *Bioelectrochem Bioenergetics* 1988 ; 19 : 323-36.
21. Muller M, Schins JM, Nastase N, *et al.* Imaging the chemical composition and thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy. *Biophysical J* 2002 ; 82 : 175A.
22. Wurpel GWH, Schins JM, Müller M. Direct measurement of chain order in single phospholipids mono- and bilayers with multiplex CARS. *J Phys Chem* 2004 ; 108 : 3400-3.
23. Muller M, Schins JM. Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy. *J Phys Chem* 2002 ; 106 : 3715-23.

TIRÉS À PART  
H. Rigneault