

Chapitre 1

Moteur flagellaire, ablation laser et stabilisation laser

Comme mentionné en introduction, plusieurs types de bactéries peuvent se déplacer dans leur milieu de différentes façons. Cette thèse s'intéresse plus particulièrement à la motilité bactérienne à l'aide d'un ou plusieurs flagelles consistant essentiellement en une partie statique et une partie rotative. Le flagelle consiste essentiellement en un long filament relativement rigide qui est ancré dans la membrane par un moteur rotatif. Les bactéries, qui sont des organismes unicellulaires, produisent les protéines nécessaires à l'assemblage du moteur dans le cytoplasme de la bactéries, c'est-à-dire à l'intérieur de celles-ci. Ce chapitre débutera donc avec une courte révision de la structure et l'assemblage du moteur ainsi qu'une revue plus en profondeur de l'assemblage du filament. Ensuite, les principes derrière l'ablation laser à l'aide d'impulsions ultra-courtes seront discutés.

Comme les expériences décrites dans cette thèse concernent l'étude d'une structure biologique à l'aide d'un faisceau laser, une section est consacrée aux protéines ainsi que leur interaction avec les champs électriques provoqués par des impulsions laser. Finalement, le montage expérimental sera détaillé ainsi que les techniques utilisées pour stabiliser la position du faisceau de même que sa puissance.

1.1 Structure et assemblage du moteur flagellaire

La membrane cellulaire de bactéries Gram-négatives (voir figure 1.1) se divise en deux parties : la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire. La première est constituée d'une double couche de phospholipides possédant une perméabilité sélective. Elle permet de séparer le milieu cytoplasmique habituellement très riche du milieu ambiant qui, en général, est plus pauvre en nutriments. Par contre, elle permet le passage de l'eau ainsi que certaines molécules spécifiques à l'aide de canaux ioniques prenant place dans la membrane. La membrane cytoplasmique est

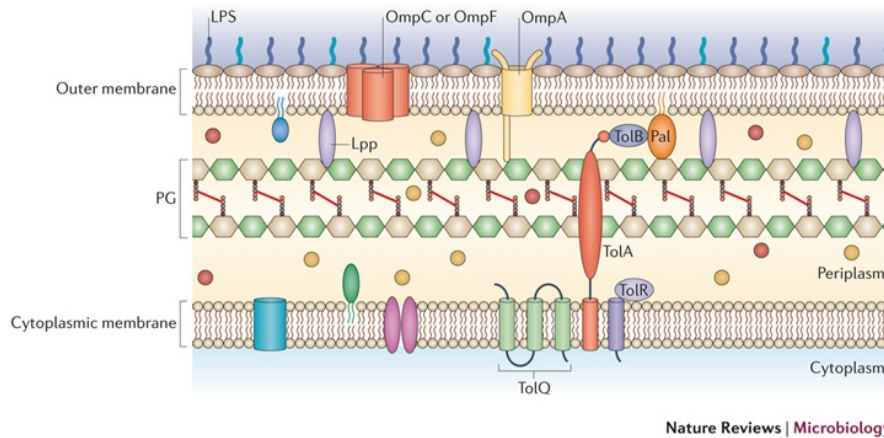


FIGURE 1.1 – Vue en coupe de la membrane cellulaire de bactéries Gram-négatives. Figure tirée de [10]

commune aux bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

La paroi cellulaire sert de protection et donne sa forme à la bactérie en plus de protéger le milieu intra-cellulaire. Chez les bactéries Gram-négatives, elle est composée d'une couche de polymère appelée peptidoglycane ainsi que d'une couche constituée de phospholipides et de lipopolysaccharides nommée membrane externe. La pathogénicité de certaines bactéries est expliquée par la présence des lipopolysaccharides sur la membrane externe [1].

La membrane cellulaire étant le rempart entre le milieu ambiant et l'intérieur de la bactérie, certains organelles de motion se retrouvent ancrés dans celle-ci. Le moteur flagellaire bactérien est constitué d'un stator, d'un rotor ainsi que d'un mécanisme de roulement et se situe directement dans la membrane cellulaire. La figure 1.2 montre un schéma des principales composantes du moteur flagellaire. La partie statique est composée de deux protéines, MotA (4 copies) et MotB (2 copies) ainsi que des anneaux L et P. Le complexe MotA/MotB est nommé unité génératrice de couple et son interaction avec le rotor génère le couple nécessaire au moteur. Ce complexe agit aussi comme un canal laissant passer les protons (ions H^+) et utilise leur énergie potentiel comme source d'énergie pour initier la rotation du moteur. Le moteur est constitué de plusieurs unités génératrices de couple de (10-16, valeur qui peut changer avec l'espèce et même pour chaque moteur [11]) qui peuvent se déplacer dans la membrane. Le couple est ensuite transféré au rotor qui est composé des anneaux C et MS et de la tige. Les anneaux L et P servent aussi de mécanisme de roulement [12].

La structure des filaments est bien connue. Elle consiste en une suite de 11 protofilaments hélicoïdaux formés de flagelline (FliC). Ces protofilaments ont une forme courte et une forme longue distribués en alternance pour donner sa forme de spirale au filament [12]. Une fois complétés, ils mesurent de 10 à 20 μm de long (plusieurs fois la longueur de la bactérie qui est de 2 μm) et ont un diamètre de 20 nm. Le filament est relié au moteur par un joint universel

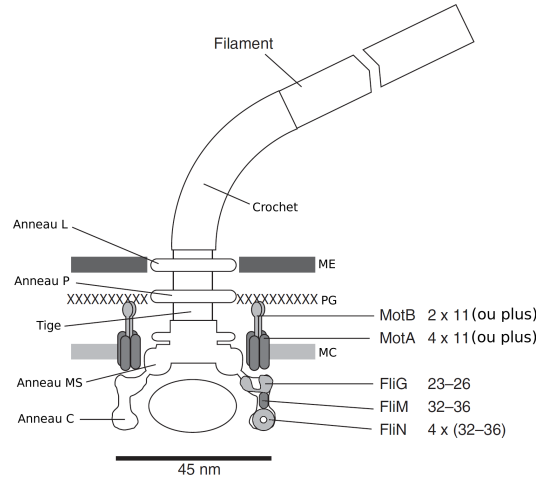


FIGURE 1.2 – Structure interne du moteur flagellaire [12]

souple nommé crochet. Ce dernier mesure 55 nm de long et est composé de la protéine FlgE. Le fait que le crochet soit souple permet à l’axe de rotation du filament d’être différent de celui du moteur [12]. Une description plus complète de l’assemblage du moteur et des gènes impliqués se retrouve à la section 2.4.

1.2 Assemblage du filament

1.2.1 Crochet

Le corps du moteur flagellaire comprend une machine exportatrice de protéines spécifiques au filament [13]. Ce système de sécrétion, que les biologistes désignent comme “système de sécrétion de type III”, exporte la plupart des composantes extra-cellulaires requises pour la construction du crochet et le filament à l’aide de la force proton motive (*proton motive force*, PMF) [14, 15].

Une fois que le corps du moteur ainsi que la partie rotative du moteur (appelée *rod*) sont construits, le système de sécrétion ajoute les sous-unités formant le crochet, soit des protéines FlgE. Le crochet se développe ensuite jusqu’à une longueur de 55 nm. Deux protéines sont impliquées dans la mesure très précise de la longueur du crochet : FliK et FlhB [16]¹. L’absence de FliK provoque la formation de longs *polyhooks* sans filaments (crochets pouvant aller jusqu’à 1 μm [17]) tandis que l’absence de FlhB forme un complexe *polyhook*-filament. Ceci indique que le changement du type de substrat exprimé marquant le début de l’assemblage du filament peut se faire sans FlhB mais avec une synchronisation déficiente [16]. FliK agit comme une règle moléculaire mesurant directement dans le temps la longueur du crochet.

1. Plusieurs chercheurs se sont penchés sur le sujet pour tenter de comprendre comment cette mesure si précise est contrôlée par la bactéries. 2 modèles ont longtemps été en compétition au sein de la communauté scientifique : le *measuring cup* ainsi que le *molecular ruler*. Ce dernier modèle est aujourd’hui accepté

L'interaction entre FliK et FlhB une fois la longueur voulue atteinte catalyse la réaction nécessaire au changement de sécrétion de substrats de type filament [17]. Ce changement de substrat provoque le début de l'assemblage du filament.

1.2.2 Protéines associées au crochet (*hook-associated proteins*, HAP)

La sécrétion de ces protéines régulatrices ainsi que l'achèvement de la construction du crochet provoque un changement dans la spécificité du système de sécrétion de type III. En effet, lorsque le complexe crochet-corps est complété, la sécrétion de substrats de type filament est engagée. Une fois ce changement activé, la protéine FlgM est sécrétée libérant ainsi σ^{28} pour activer la transcription du promoteur de Classe 3. Les gènes entraînant la production du reste du filament ainsi que du système de chimiotaxie sont alors activés [18].

Cependant, avant de pouvoir faire grandir le filament, trois types de protéines doivent être sécrétées. Ces protéines associées au crochet (HAP) sont nécessaires pour que la construction du filament se produise. En premier lieu, La protéine FlgK vient se lier au crochet pour former la première partie d'un adaptateur entre le crochet et le filament. La protéine FlgL est ensuite exportée permettant finalement à la protéine FliD, aussi appelée *cap*, de prendre place [19]. Cette structure est composée de 5 copies de FliD et est essentielle à la croissance du filament étant nécessaire pour la polymérisation des unités de FliC du filament [20, 21]. Lors de l'assemblage du filament, le *cap* se trouve donc au bout de celui-ci.

1.2.3 Construction du filament

Le filament flagellaire est formé de plusieurs milliers de sous-unités de flagelline (FliC) et il peut atteindre entre 10 et 15 μm . Pour ce faire, les sous-unités sont produites dans la cellule et sont exportées dépliées hors de la cellule par un mince canal à l'intérieur du filament. Une fois arrivée au bout, le *cap* polymérise et met en place les sous-unités [22, 23].

1.2.4 Bris d'un filament

La présence des trois HAPs étant nécessaire à l'assemblage du filament, un filament cassé doit donc former un nouveau *cap* pour que la croissance puisse se poursuivre. L'absence du *cap* inhibe l'assemblage du filament [20, 21]. Cependant, pour qu'il puisse se former, il doit pouvoir se lier aux protéines FlgL lors de l'assemblage du filament. Comme FlgL n'est pas présente dans le filament [19], un *cap* doit pouvoir se former sans la présence de FlgL lors d'un bris. Ces trois protéines sont cependant constamment sécrétées durant l'assemblage du filament et rejetées à l'extérieur par le *cap* sans être intégrées au filament [24], ce qui pourrait potentiellement permettre la reprise de la croissance. Les expériences du chapitre 2 utilisent l'ablation laser pour briser des filaments et observer si les ceux-ci continuent de s'assembler ou non.

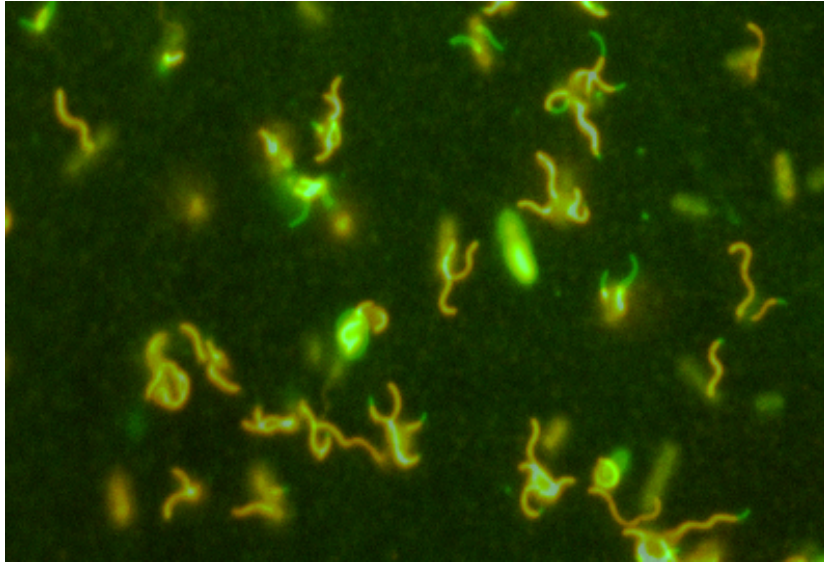


FIGURE 1.3 – Exemple de marquage fluorescent. On peut voir 2 marquages différents, un orange et un vert. Le premier (orange, 546 nm) est un marquage réalisé sur la culture au complet. Une fois que les bactéries sont fixées sur la lamelle de microscope, une deuxième période de croissance d'une durée d'une heure a été réalisée ainsi qu'un deuxième marquage (vert, 488 nm). Certains corps de bactéries peuvent être partiellement marqués. Les corps les plus lumineux sont des bactéries mortes la majorité du temps.

1.3 Visualisation du filament

Le filament bactérien n'est pas visible à l'aide de la microscopie optique traditionnelle, nous devons utiliser d'autres façons pour le visualiser. La façon la plus simple pour visualiser le filament en entier de bactéries *in vivo* est par fluorescence. Pour éviter de marquer la membrane de la cellule, ce qui noierait le faible signal produit par les filaments, un marquage spécifique de ceux-ci est nécessaire.

La méthode utilisée pour obtenir un marquage ciblé requiert la modification de la protéine FliC. Celle-ci est modifiée pour remplacer un acide aminé de la chaîne par une cystéine dans la protéine (Voir sections 2.7.1 et le tableau 2.2 pour plus de détails sur les différentes souches utilisées durant les expériences de fluorescence). L'acide aminé spécifique qui est remplacé par une cystéine est choisi pour que celui-ci soit accessible du milieu ambiant lorsque la protéine est polymérisée. Il existe plusieurs endroit sur la chaîne d'acides aminés donnant de bons résultats, mais pour ces expériences, nous avons utilisé des souches où la tyrosine 237 a été remplacée par une cystéine(FliC^{T237C}).

Les fluorophores utilisées (Alexa-Fluor C₅-maléimide, Invitrogen) ont un groupe maléimide qui réagit avec le groupe thiol de la cystéine. Ceci nous permet d'obtenir un marquage très ciblé des filaments avec des bactéries toujours vivantes. Ils sont de plus disponibles dans un grand éventail de longueurs d'onde.

Les expériences décrites au chapitre 3 ont pour but de mesurer le taux de croissance du filament bactérien. Pour ce faire, les bactéries sont soumises à différentes périodes de croissance de durées précises. En alternant les longueurs d’onde des fluorophores utilisés pour marquer les filaments durant ces multiples périodes de croissance, nous obtenons des filaments marqués de 1, 2 ou 3 couleurs permettant d’obtenir un taux de croissance du filament en fonction de sa longueur initiale. Un exemple de double marquage est montré à la figure 1.3.

1.4 Ablation laser

Les lasers sont des sources cohérentes de rayonnement optique pouvant générer beaucoup de lumière et pouvant être manipulées et fortement focalisées dans l’espace. En concentrant un faisceau dans un petit volume, il est possible d’obtenir une grande quantité d’énergie en un point précis. Les lasers sont donc utilisés dans de nombreuses applications pour modifier des matériaux et tissus (chirurgie oculaire, soudure, écriture de guide d’onde, etc.). L’utilisation de ces outils permet une flexibilité et un contrôle incroyable considérant la facilité avec laquelle on peut manipuler les faisceaux. Le dommage créé par un faisceau laser résulte généralement d’une élévation locale de la température du matériau.

Lorsque des tissus biologiques sont utilisés, l’utilisation de laser est très utile car le faisceau peut facilement être concentré en un point sous le micromètre lorsqu’un objectif à haute ouverture numérique est utilisé. Cependant, comme les structures biologiques sont petites et souvent très denses, les chercheurs ont dû développer des outils résultant en un dommage localisé amenant le minimum de dommages collatéraux. Par exemple, une façon d’étudier la fonction d’une cellule dans l’organisme *C. elegans* est de tuer cette cellule et d’observer le développement de l’organisme. L’élimination d’une neurone nous informe donc sur sa fonction dans l’organisme, soit la mobilité, se nourrir ou la sensibilité à son environnement [25]. Une technologie récente est utilisée pour obtenir ces résultats, le laser à impulsions ultra-brèves. La nature du dommage est intimement relié à la durée des impulsions ainsi qu’au taux de répétition. La durée des impulsions du laser utilisé pour les expériences de cette thèse est quelques dizaines de femtosecondes. Ce type de laser donne un dommage très local et produit très peu de chaleur, deux raisons importantes justifiant son utilisation. Les principes physiques à l’origine de la création de ce dommage est abordée dans cette section.

1.4.1 Mécanismes physiques provoquant des dommages

Le domaine de l’ablation laser à impulsions ultra-brèves est un sujet riche et très vaste [26, 27, 28, 29]. Cette section sera donc un bref résumé sur la façon dont le dommage est créé.

Formation d'un plasma

Pour obtenir du dommage reproductible et localisé, un seuil d'éclairement énergétique (SEE) doit être atteint pour qu'un claquage optique² soit obtenu. Le SEE des tissus biologiques est très similaire à l'eau [27] et cette approximation sera utilisée ici. La figure 1.4 montre le processus de photo-ionisation multi-photonique qui débute la formation du plasma. Ce processus produit des électrons quasi-libres (qu'on appellera électrons libres par la suite). L'ionisation d'un électron dépend du milieu où se fait l'ablation (ici l'eau) et la longueur d'onde utilisée [27]. Le modèle accepté dicte que la photo-ionisation est proportionnelle à

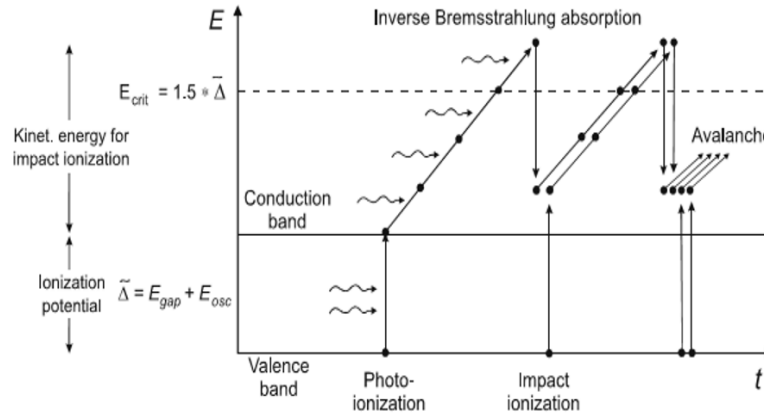


FIGURE 1.4 – Processus d'ionisation multi-photonique entraînant une avalanche d'électrons. Lorsqu'un électron est excité jusqu'au potentiel d'ionisation, il absorbe l'énergie d'autres photons jusqu'au seuil représenté par la ligne pointillée (absorption par *bremstrahlung* inverse) ; celui-ci obtient alors l'énergie nécessaire pour en exciter un autre. Ce processus se répète pour créer l'avalanche d'électrons libres. Figure tirée de [27]

I^k , où I est l'irradiance [W/cm^2] et k le nombre de photons nécessaire pour franchir la bande interdite de l'eau [27, 28]. Comme la largeur de bande interdite de l'eau est de 6.5 eV, équivalent à 5 fois l'énergie d'un photon de 800 nm, k vaut 5 pour notre montage [30]. Une fois ionisés, les électrons absorbent par processus de *Bremstrahlung* inverse l'énergie d'autres photons jusqu'à un seuil leur permettant d'exciter d'autres électrons. L'accumulation de ces étapes provoque une avalanche d'électrons libres tout au long de l'impulsion laser créant ainsi un plasma.

Claquage optique

Lorsqu'une densité critique d'électrons libres est atteinte, un plasma est créé. On parle ici du phénomène de claquage optique. Selon Vogel et *al* [27], le SEE provoquant un claquage optique mène à la création d'une densité d'électrons libres $\rho_{\text{critique}} = 10^{21} \text{ cm}^{-3}$. La figure 1.5

2. État où un élément isolant est soumis à un champs électrique trop intense et devient conducteur. [27]

illustre les valeurs de SEE (*irradiance threshold*, $[\text{W}/\text{cm}^2]$) et d'exposition énergétique (*radiant exposure threshold*, $[\text{J}/\text{cm}^2]$) en fonction de la longueur des impulsions laser pour quelques longueurs d'onde. On remarque sur les 2 graphiques que la dépendance avec la longueur d'onde s'efface avec les durées d'impulsion plus courtes devenant même négligeable pour des impulsions femtosecondes [31]. De plus, malgré le fait que le SEE augmente avec des impulsions plus courtes, l'exposition énergétique déposée dans le milieu diminue [32]. Finalement, le SEE dépend très peu du coefficient d'absorption linéaire de l'eau (ou du matériau dans lequel s'effectue l'ablation) [33, 32].

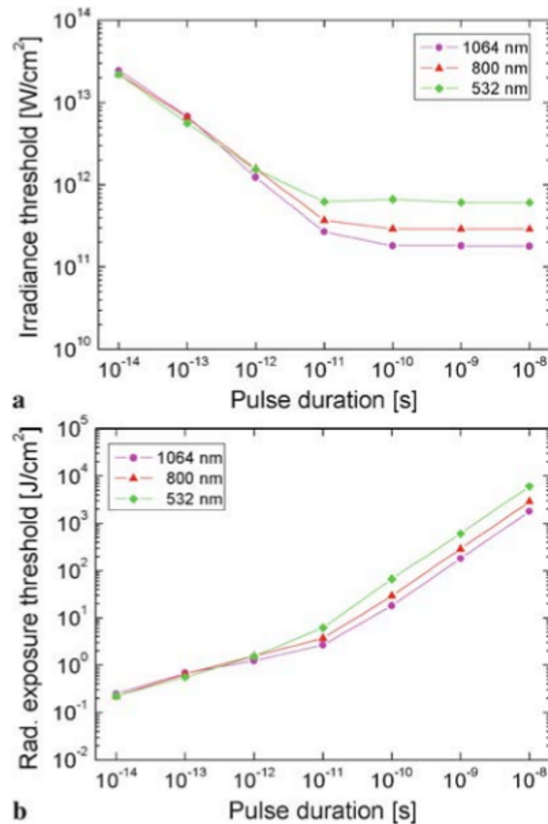


FIGURE 1.5 – SEE et exposition énergétique requis en fonction de la durée d'impulsion pour atteindre un claquage optique. Figure tirée de [27]

Ablation, cavitation et effets thermiques

Les longueurs d'onde choisies sont d'environ 700-1100 nm (proche infra-rouge), car la plupart des tissus biologiques sont transparents à ces longueurs d'onde [34] (Voir figure 1.6). De cette façon, il n'y a pas d'accumulation d'énergie due à l'absorption. Le plasma vaporise très localement le matériau visé et, lorsque la bulle³ se referme sur elle-même, une onde de choc

3. La bulle formée par le phénomène de cavitation est de moins de 50 nm si on considère que l'énergie de l'impulsion est complètement absorbée [32]

est créée. En utilisant des impulsions de l'ordre de 100 fs, les dommages collatéraux créés par le phénomène de cavitation provoqué à la suite de la formation du plasma sont négligeables [32, 25].

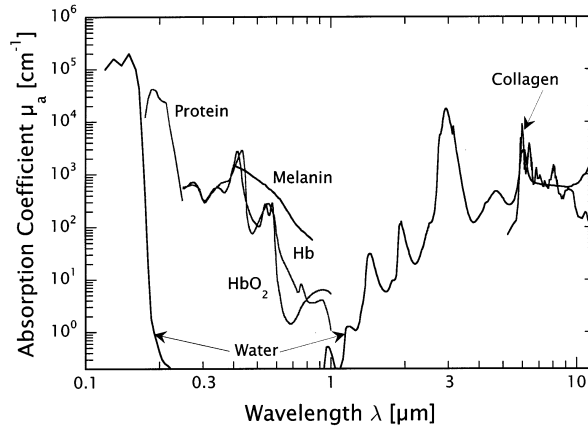


FIGURE 1.6 – Coefficient d'absorption de différents composés biologiques en fonction de la longueur d'onde utilisée. Figure tirée de [27]

Le taux de répétition typique des lasers femtosecondes (80 MHz) atténue grandement l'accumulation de chaleur. En effet, comme le temps entre 2 impulsions est plus grand que le temps de diffusion de la chaleur, il n'y a pas de dommages thermiques liés aux impulsions laser, et ce même lorsque celui-ci est couplé à un objectif à forte ouverture numérique ($NA \geq 0.9$) [34, 27]. On peut voir sur la figure 1.7 l'accumulation de chaleur en fonction du taux de répétition du laser ainsi que du NA utilisé. La ligne pointillée représente la diffusion de la chaleur pour une seule impulsion. On peut voir qu'à un taux de répétition de 250 kHz (4 μm entre chaque impulsion) et un NA de 1.3, l'élévation locale de la température produite entre chaque impulsion est entre 0.01 et 0.001 K, ce qui est négligeable dans notre cas. Il est même possible avec notre montage expérimental de travailler à un taux de répétition de 1 kHz, ce qui diminue davantage l'élévation de température ainsi que les dommages collatéraux [25].

1.5 Interaction protéines/laser

Les protéines produites par les organismes vivants sont constituées d'une longue chaîne d'acides aminés. Cette chaîne doit se replier sur elle-même d'une façon précise déterminée par le code génétique pour pouvoir être utilisée par la cellule. Ce repliement se fait habituellement en trois étapes, mais seulement la première est spécifiée par le code génétique [35, 36, 37]. Un champ de recherche entier se penche depuis 50 ans sur la façon dont elles se replient amenant ainsi la mise en place de banques de données immenses comportant plus de 80000 façons possibles de repliements. Ce champ de recherche se penche aussi sur la prédiction de ces configurations. Les acides aminés sont liés ensemble par des liens peptidiques qui sont des liens

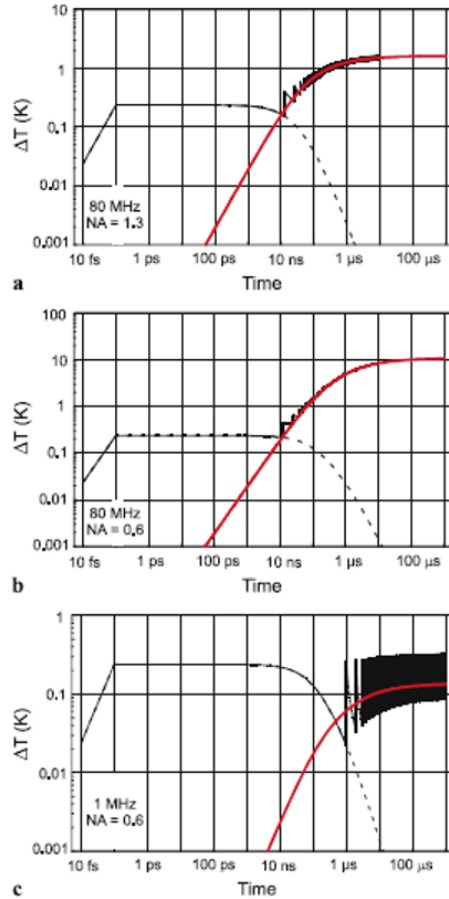


FIGURE 1.7 – Évolution de la température au centre du point focal du laser produit par un train d’impulsions de 100 fs à 800 nm dans l’eau pour différents NA et taux de répétition. Les lignes pointillées représentent l’élévation de la température pour une seule impulsion. La ligne rouge représente l’évolution de température pour une irradiation d’un laser continu avec la même puissance moyenne que le laser pulsé. Figure tirée de [27]

covalents [38]. Lorsque les chaînes se plient, les structures sont maintenues en place en majorité par des liens hydrogènes [1]. Ces faibles liens permettent aux protéines une grande flexibilité, mais ont comme désavantage qu’elles peuvent perdre leur forme ainsi que leur fonctionnalité lorsqu’elles sont exposées à des conditions trop rigoureuses [1].

Plusieurs travaux ont été réalisés sur l’application de champs électriques intenses à l’aide de laser sur des protéines [25, 29, 32, 39]. Ces champs sont créés en utilisant des impulsion laser ultra-courtes (femtosecondes). Comme mentionné à la section 1.4.1, le dommage créé par l’utilisation de ce type de faisceau se fait par l’ionisation des protéines par le plasma créé. Les effets mécaniques collatéraux reliés au phénomène de cavitation sont concentrés dans un volume de moins de 50 nm de diamètre. Comme ce volume est plus petit que le volume focal où se trouve le plasma, on considère donc que les effets sont négligeables. On peut donc se demander de quelle façon seront affectées les protéines du filament une fois que l’ablation

laser ait eu lieu.

Une étude récente [39] a utilisé des impulsions laser ultra courtes (70 fs) pour vaporiser et étudier les conformations de protéines. L'utilisation de ce type d'impulsion laser permet le transfert de macromolécules à la phase gazeuse à pression atmosphérique. Cette découverte est surprenante considérant qu'une impulsion laser intense a plutôt tendance à ioniser et briser les molécules [39, 25]. La clé de ce principe réside dans le fait que si la protéine est vaporisée avant qu'il y ait équilibre thermique, la conformation initiale pourra être conservée dans la phase gazeuse. Considérant le peu de dommages mécaniques et thermiques occasionnés par l'ablation laser femtoseconde on peut raisonnablement supposer que, lorsque le filament est brisé par une impulsion laser, les protéines à l'extrémité gardent leur conformation

1.6 Montage laser

Dans le but d'obtenir un montage expérimental robuste et automatisé, deux systèmes ont été mis en place pour stabiliser le faisceau. Premièrement, des miroirs stabilisent la position du laser en temps réel. Deuxièmement, la puissance d'entrée du faisceau dans le montage est finement contrôlée pour que celle-ci reste stable ou puisse être modifiée précisément et rapidement.

1.6.1 Stabilisation de la position

Le but recherché est de positionner un faisceau colimé pour qu'il remplisse complètement l'arrière de l'objectif d'un microscope inversé nous donnant ainsi un point focal très serré et donc un dommage très localisé. Comme de très faibles mouvements peuvent avoir de grandes conséquences sur l'endroit exact du faisceau focalisé lors de l'ablation et donc du dommage créé, la position du faisceau doit rester le plus stable possible. Ces faibles variations peuvent être de plusieurs natures (variations de température, vibrations d'une table ou causée par un ventilateur, etc.). Le parcours optique du laser femtoseconde utilisé s'étant sur environ 3 mètres puisque la source laser est située dans le local adjacent au laboratoire où se trouve notre montage. Pour garder la position du faisceau constante, un système de miroirs stabilisateurs (Optics in motion, Long beach, CA) a été installé.

Ce système repose sur deux miroirs à action rapide (*fast steering mirrors*, FSM) secondés par deux détecteurs de position (*position sensitive device*, PSD). Ce système nous donne les degrés de liberté nécessaires pour obtenir un faisceau stable au μm près. La figure 1.8 montre un schéma du montage. L'utilisation de 2 miroirs au lieu d'un seul permet une correction à la fois de la position, et de l'angle d'entrée du laser dans le microscope. Une fois en fonction, les miroirs fonctionnent en boucle ouverte. Si le faisceau est coupé ou bloqué, les miroirs reviennent à leur position initiale. Si l'alignement des PSDs n'est pas modifié, la position du faisceau sur l'image de la caméra reste le même. Nous avons donc un système autonome de

Miroir 1	Miroir 2	ΔX_{max} (μm)	ΔY_{max} (μm)	$\sigma \Delta X$ (μm)	$\sigma \Delta Y$ (μm)
Fermé	N/A	7,04	3,69	0,74	0,44
En fonction	N/A	0,30	2,13	0,04	0,09
Fermé	Fermé	7,78	20,11	1,44	2,01
En fonction	En fonction	1,77	1,26	0,13	0,29

TABLE 1.1 – Performances du système de stabilisation laser. ΔX_{max} et ΔY_{max} représentent l'écart entre les valeurs de positions minimum et maximum récoltées par l'oscilloscope. La déviation standard de la distribution des positions en X et en Y fut calculée par l'oscilloscope. Les résultats des deux premières lignes du tableau ont été obtenus en n'utilisant que le premier miroir et en lisant les positions à l'aide de PSD 1. Les résultats des deux dernières lignes ont été obtenus en lisant les positions à l'aide de la PSD 2.

stabilisation laser qui en plus accélère énormément l'alignement initial du laser en début de journée.

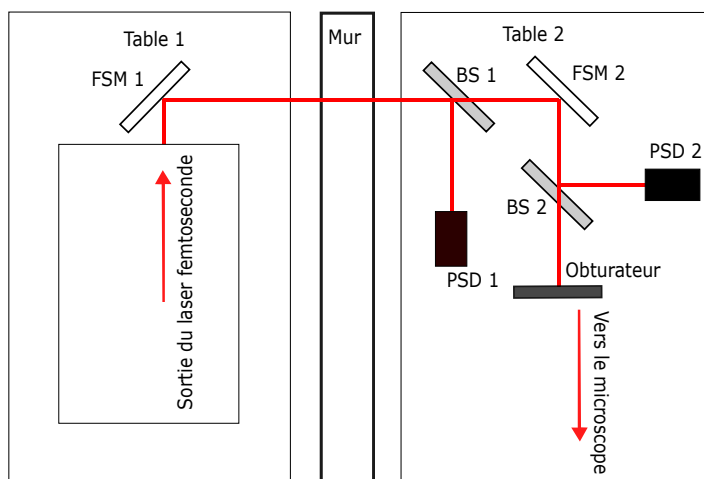


FIGURE 1.8 – Montage du système de FSM pour la stabilisation de la position du laser. Le faisceau est réfléchi par le FSM 1 qui le propage jusqu'à un miroir séparateur de faisceau (*beam splitter*, BS) sur la deuxième table optique. La distance entre les deux tables est d'environ 3m. Une faible portion de la puissance est déviée vers la PSD 1 (environ 4%). Celle-ci est situé à la même distance du BS 1 que le FSM 2. Le miroir 1 s'assure donc que le faisceau reste toujours au centre du deuxième miroir. Le même principe recommence pour le FSM 2 avec 4% de la puissance restante réfléchi par le BS 2 vers la PSD 2 et le reste se rendant à un obturateur situé à la même distance du BS 2 que la PSD 2 contrôlant l'entrée du laser vers le microscope. Le deuxième miroir s'assure que le faisceau soit toujours aligné dans le milieu de l'obturateur. Le reste de l'alignement jusqu'au microscope se fait avec des miroirs standards.

Pour mesurer la performance du système, la position du faisceau en X et en Y sur les PSD sont lues par un oscilloscope durant une période de 5 minutes. Ces positions⁴ qui varient dans le temps avec les fluctuations du laser sont obtenues à un taux d'acquisition de 85 Hz.

4. Les signaux donnés par les PSD sont en V. Sachant que le détecteur mesure 9 mm x 9 mm, on obtient un facteur de conversion de 0,45 $\mu\text{m}/\text{mV}$.

Taux de répétition	$\lambda_{\text{centrale}}$	FWHM	Puissance	Δt
10 kHz	~ 790 nm	± 30 nm	55-70 mW	75-100 fs
100 kHz	~ 790 nm	± 30 nm	550-700 mW	75-100 fs
250 kHz	~ 790 nm	± 30 nm	1.2-1.5 W	75-100 fs

TABLE 1.2 – Caractéristiques de la source d’impulsions laser fs utilisée (RegA). $\lambda_{\text{centrale}}$ représente la longueur d’onde centrale du laser. La largeur à mi-hauteur (*Full width at half maximum*, FWHM) du spectre de fréquences du laser est aussi indiquée. Δt est la durée des impulsions. Les 3 taux de répétitions sont ceux utilisés par les différents groupes partageant le laser.

La déviation standard de la distribution des positions est alors calculée par l’oscilloscope. Le tableau 1.1 illustre les performances obtenues avec les FSMs pour différentes configurations. On remarque que la déviation standard de la position lorsque les miroirs sont en fonction est environ 11 fois plus petite en X et 7 fois plus petite en Y par rapport au système fermé.

Malgré le fait que les mouvements soient relativement petites (de l’ordre de quelques μm), le système est crucial à l’alignement du faisceau laser. En effet, pour que les dommages laser soient très concentrés, le faisceau doit remplir l’arrière de l’objectif et ainsi être focalisé dans le plus petit volume possible. Comme les cibles d’ablation (filaments, corps de bactéries) sont de l’ordre de grandeur du μm ou moins, chaque μm de fluctuation doit être pris en compte et corrigé le plus possible. Ce système de stabilisation réussit sans problème à garder la position du faisceau stable durant les expériences ainsi que d’une journée à l’autre.

1.6.2 Stabilisation de la puissance

Le laser utilisé est un RegA 9000 (*Coherent Inc.*) Le taux de répétition est ajustable entre 10 - 250 kHz avec une puissance jusqu’à 1.5 W (Voir tableau 1.2). Comme le laser est partagé par différents groupes de recherche ne travaillant pas nécessairement avec les mêmes conditions expérimentales, nous avons mis en place un système de stabilisation de la puissance laser arrivant au microscope qui permet l’utilisation de la source laser en tout temps. Le but de ce système est de pouvoir profiter du laser indépendamment du taux de répétition dont se servent d’autres utilisateurs tout en contrôlant le taux que nous utilisons pour nos expériences. Il nous permet aussi de nous assurer d’une puissance stable dans le temps de même que la possibilité de la modifier rapidement et précisément.

Cellule de Pockels

L’effet Pockels provoque une biréfringence dans un milieu optique lors de l’application d’un fort champ électrique. L’indice de réfraction change de façon linéaire avec l’intensité du champ électrique. Lorsque l’axe optique du cristal est aligné avec la direction de propagation du faisceau laser, le cristal agit comme une lame de retard. En trouvant le voltage donnant un retard de 90° , on obtient une lame demi-onde modulable à l’aide d’un voltage contrôlable. Le

retard d'une cellule de pockels est donné par

$$\Delta\varphi = 2\pi n_0^3 r_{63} V / \lambda_0 \quad (1.1)$$

avec r_{63} la constante électro-optique en m/V , n_0 est l'indice de réfraction *ordinaire* du cristal, V la différence de potentiel appliquée en V et λ_0 la longueur d'onde du laser dans le vide. Pour une lame $\lambda/2$, $\Delta\varphi = \pi$, ce qui donne en utilisant (1.1)[40]

$$\Delta\varphi = \pi \frac{V}{V_{\lambda/2}}$$

$$V_{\lambda/2} = \frac{\lambda_0}{2n_0^3 r_{63}}$$

Pour nos conditions ($\lambda_0 \sim 800$ nm), un voltage de $V_{\lambda/2} = 2.9$ kV doit être appliqué pour obtenir une lame $\lambda/2$.

Dans le but de pouvoir ajuster le taux de répétition nous avons installé une cellule de Pockels dans le trajet optique ainsi que 2 polariseurs linéaires, un avant et un après la cellule de Pockels. Lorsque les polariseurs sont croisés, cette combinaison agit comme un obturateur électronique. En effet, lorsqu'il n'y a aucun voltage d'appliqué, une très faible puissance laser passe au travers (en raison de l'imperfection des polariseurs). Cette puissance (quelques μW) est bien en deçà de la limite inférieure nécessaire à l'ablation laser. Lorsque le voltage est appliqué, une grande majorité de la puissance incidente est propagée. Comme le temps requis pour créer la biréfringence est d'environ 10 ns et que le temps entre 2 impulsions laser est au minimum de 4 μs , il devient alors possible de sélectionner des impulsions individuelles à un taux de répétition de notre choix allant jusqu'à un maximum de 1 kHz (ce maximum est limité par l'électronique d'alimentation de la cellule de Pockels). En synchronisant l'envoi du voltage avec les impulsions du déclencheur (*trigger*) laser, nous avons donc une sortie laser flexible indépendante de l'utilisation des autres groupes.

En plus de cet obturateur électronique, nous avons installé une lame $\lambda/2$ sur un moteur rotatif à l'avant du premier polariseur. Comme le laser utilisé est polarisé, la lame fait tourner sa polarisation (voir figure 1.9) nous permettant avec l'aide du premier polariseur (P1) de modifier de façon rapide et robuste la puissance du laser. Pour obtenir la puissance maximum, la lame $\lambda/2$ est tournée de façon à avoir la polarisation du laser alignée avec le premier polariseur. En variant l'orientation de la lame $\lambda/2$, nous pouvons ainsi contrôler la puissance se rendant au microscope. Finalement, un programme LabView a été fait en collaboration avec Sébastien Fournier-Laberge dans le cadre d'un cours Projet contrôlant la puissance entrant au microscope. Dans le but de ne pas avoir à manipuler plusieurs éléments chapeautant l'accès du laser (cellule de pockels, obturateurs, lame $\lambda/2$), ce programme a été mis sur pied pour regrouper le tout sur une seule et même interface. La figure 1.10 montre une version schématisé des éléments du parcours optique.

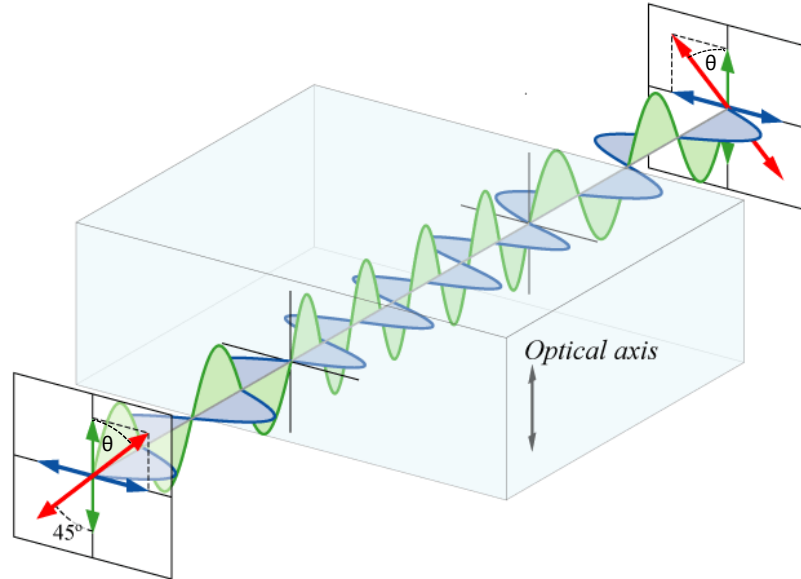


FIGURE 1.9 – lame $\lambda/2$ montrant comment le changement de phase est accumulé par la lame retardatrice. Dans cet exemple, la polarisation à 45° (oscillant dans les cadrans 2 et 4) est tournée de 90° (oscillant dans les cadrans 1 et 3). Pour une polarisation générale linéaire, celle-ci est tournée de 2θ par rapport à l'axe optique de la lame $\lambda/2$. Figure reproduite avec l'autorisation de [40]

Pour calibrer le montage, les deux puissance-mètres sont reliés à l'ordinateur ainsi que le moteur contrôlant la lame $\lambda/2$. Un programme LabView fait faire un tour complet de la lame $\lambda/2$ et enregistre les mesures de puissance avant et après la cellule de Pockels. Une fois cette courbe acquise, le deuxième puissance-mètre est retiré du trajet optique et la puissance sur le premier puissance-mètre est utilisé en temps réel pour contrôler le moteur de la lame $\lambda/2$. La puissance voulue est entrée et le moteur stabilise cette puissance. Le programme contrôle également l'ouverture et la fermeture du deuxième obturateur ainsi que le voltage envoyé à la cellule de Pockels pour contrôler le nombre d'impulsions laser.

Ce programme permettrait donc en théorie de stabiliser en temps réel la puissance à l'entrée du microscope à une précision de quelques μW . Les expériences réalisées dans cette thèse ont cependant été effectuées avec des ajustements manuels de la puissance avec le moteur rotatif de la lame $\lambda/2$ dû à la durée relativement courte des expériences. La puissance laser restait assez stable au cours des expériences pour nos besoins. Cependant, lorsque des expériences plus longues seront réalisées dans le futur, ce montage sera très avantageux pour assurer la stabilité de la puissance laser dans le temps.

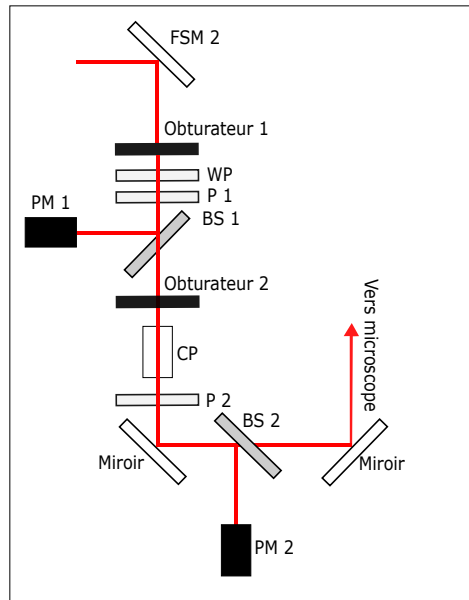


FIGURE 1.10 – Montage stabilisant la puissance laser. Le faisceau ayant été précédemment stabilisé en position par les FSM, il peut ensuite continuer le trajet vers le microscope lorsque le premier obturbateur (S1) est ouvert. Il passe ensuite par la lame $\lambda/2$ qui fait tourner la polarisation du laser pour passer par le premier polariseur linéaire (P1) laissant passer la polarisation aligné avec l'axe de la cellule de Pockels (CP). Comme les séparateurs de faisceau (BS) sont dépendant de la polarisation, le faisceau est polarisé avant celui-ci. Une faible partie du faisceau ($\sim 4\%$) est dirigée vers le premier puissance-mètre (PM1). Le faisceau passe ensuite par la CP et par le P2 et est dirigé vers le microscope. Un deuxième PM peut être ajouté directement dans le trajet optique ou après un BS pour s'assurer de la puissance ou lors de la calibration.