

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2020/240131 A1**

(43) Date de la publication internationale  
03 décembre 2020 (03.12.2020)

(51) Classification internationale des brevets :  
G01N 21/17 (2006.01) G01N 29/24 (2006.01)  
G01N 21/63 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2020/050878

(22) Date de dépôt international :  
26 mai 2020 (26.05.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
19 05641 28 mai 2019 (28.05.2019) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE DE BORDEAUX [FR/FR] ;  
35 place Pey Berland, 33000 BORDEAUX (FR). CENTRE

NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
- CNRS [FR/FR] ; 3 rue Michel Ange, PARIS, 75016  
(FR). INSTITUT POLYTECHNIQUE DE BORDEAUX  
[FR/FR] ; 1 RUE DU DOCTEUR ALBERT SCHWEITZER,  
33400 TALENCE (FR). ECOLE NATIONALE SUPERIEURE  
D'ARTS ET METIERS (ENSAM) [FR/FR]  
; 151 boulevard de l'Hopital, 75013 PARIS (FR).

(72) Inventeurs : AUDOIN, Bertrand ; 15 avenue de Brivazac,  
33600 PESSAC (FR). LIU, Liwang ; Hertogstraat 155-202,  
3001 HERLEVEE (BE).

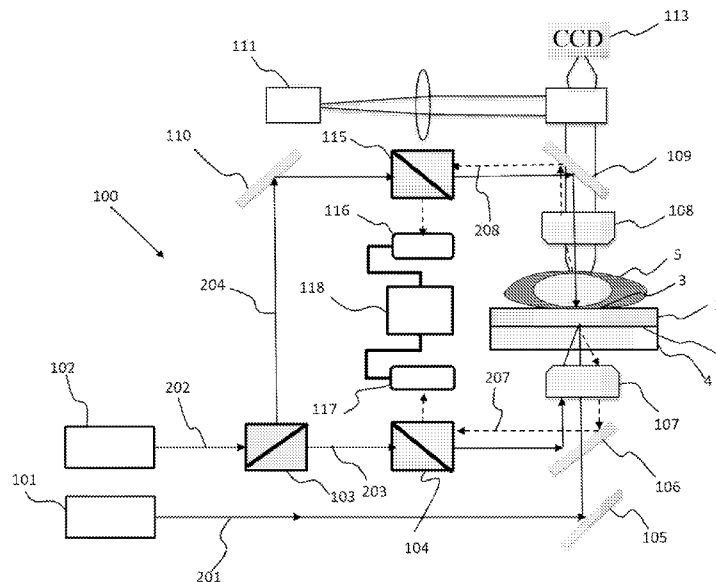
(74) Mandataire : PLASSERAUD IP ; 66 rue de la Chaussée  
d'Antin, 75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,

(54) Title: PICOSECOND ACOUSTIC MEASURING SYSTEM WITH DOUBLE SENSOR BEAMS

(54) Titre : SYSTEME DE MESURE ACOUSTIQUE PICOSECONDE A DOUBLE FAISCEAUX SONDAS

[Fig. 3]



(57) Abstract: The invention relates to a picosecond acoustic measuring system (100) for analysing a sample (5). According to the invention, the system comprises a transduction means which has a first interface (6) in contact with a transparent substrate (4) and a second interface (3) in contact with the sample (5), a first laser source (101) which is configured to generate a pump beam (201), a second laser source (102) which is configured to generate a first sensor beam (203) and a second sensor beam (204), the pump beam being configured to generate acoustic waves in the transducer means (4), the first sensor beam being configured so as to detect in real time a variation of the coefficient of acoustic reflection of the second interface (3) by elasto-optical coupling, the second sensor beam (204) being configured so as to detect in real time the Brillouin oscillations which are linked to the Brillouin interaction between the



WO 2020/240131 A1

CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

**(84) États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée:**

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

---

second sensor beam (204) and some of the acoustic waves which are propagated in the sample, a photodetection system (116, 117) which is configured to measure simultaneously and at the same location of the sample a signal of variation of the reflectivity at the second interface (3) linked to the Brillouin oscillations and a signal of variation of the reflectivity at the first interface (6) linked to a variation of the coefficient of the acoustic reflection.

**(57) Abrégé :** L'invention concerne un système de mesure acoustique picoseconde (100) pour l'analyse d'un échantillon (5). Selon l'invention, le système comprend un moyen de transduction ayant une première interface (6) en contact avec un substrat transparent (4) et une seconde interface (3) en contact avec l'échantillon (5), une première source laser (101) configurée pour générer un faisceau pompe (201), une seconde source laser (102) configurée pour générer un premier faisceau sonde (203) et un second faisceau sonde (204), ledit faisceau pompe étant configuré pour générer des ondes acoustiques dans le moyen transducteur (4), ledit premier faisceau sonde étant configuré de manière à détecter en temps réel une variation du coefficient de réflexion acoustique de la seconde interface (3) par couplage élasto-optique, ledit second faisceau sonde (204) étant configuré de manière à détecter en temps réel les oscillations de Brillouin liées à l'interaction Brillouin entre ledit second faisceau sonde (204) et une portion des ondes acoustiques se propageant dans l'échantillon, un système de photodétection (116, 117) configuré pour mesurer simultanément et au même point de l'échantillon un signal de variation de la réflectivité au niveau de la seconde interface (3) liée aux oscillations de Brillouin et un signal de variation de la réflectivité au niveau de la première interface (6) liée à une variation du coefficient de la réflexion acoustique.

## SYSTEME DE MESURE ACOUSTIQUE PICOSECONDE A DOUBLE FAISCEAUX SONDES

### Domaine technique

[0001] La présente invention concerne un système de mesure de propriétés  
5 mécaniques d'un échantillon à l'échelle microscopique ou nanoscopique.

[0002] Elle concerne plus particulièrement un système de mesure des oscillations de Brillouin et d'un coefficient de réflexion acoustique pour l'analyse non destructive d'un échantillon. Plus précisément, elle concerne un système de mesure acoustique picoseconde comportant deux faisceaux sondes.

10 [0003] Cette technique non invasive avec une résolution microscopique ou nanoscopique est particulièrement adaptée pour étudier les propriétés mécaniques d'une cellule biologique pour la compréhension du fonctionnement physiologique et pathologique tout en préservant l'intégrité de la cellule.

### Technique antérieure

15 [0004] La technique de mesure acoustique picoseconde est basée sur un dispositif d'optique ultra-rapide pompe-sonde qui utilise un faisceau lumineux de pompe comprenant une ou plusieurs impulsions laser pour la génération de phonons acoustiques cohérents dans un échantillon, et un faisceau lumineux de sonde décalé dans le temps avec un délai ajustable par rapport au faisceau  
20 pompe pour la détection des oscillations de Brillouin dans une gamme spectrale allant du GHz au THz. Les impulsions laser de pompe sont des impulsions laser ultra-brèves. Dans le présent document, on entend par impulsion ultra-brève une impulsion dont la durée est comprise entre une dizaine de femtoseconde et une  
25 centaine de picoseconde (10-12 s). Ainsi, des ondes acoustiques de fréquence allant de GHz jusqu'au THz (10<sup>12</sup> Hz) peuvent être générées, permettant une caractérisation d'un échantillon avec une échelle nanométrique.

[0005] La figure 1 représente schématiquement un dispositif et procédé d'acoustique picoseconde selon l'art antérieur. Le dispositif comprend une source laser pour générer un faisceau lumineux de pompe 10, ou faisceau pompe et une  
30 autre source pour générer un faisceau lumineux de sonde 11, ou faisceau sonde.

Un échantillon à analyser 2 est déposé sur un transducteur acousto-optique 1. Le faisceau de pompe 10 est incident sur l'échantillon à analyser et transmis en direction de l'interface 3 entre l'échantillon et le transducteur. L'impulsion pompe focalisée à l'interface génère des ondes acoustiques 20, 22 qui se propagent de part et d'autre de l'interface 3. Ces ondes acoustiques induisent des perturbations de l'indice de réfraction de l'échantillon. Le faisceau sonde est également focalisé à l'interface. Les ondes acoustiques 21 générées se propageant dans l'échantillon forment une interface optique qui se déplace à la vitesse de propagation de l'onde acoustique dans l'échantillon. Une portion du faisceau sonde 13 qui n'est pas absorbée est réfléchi à l'interface entre l'échantillon et le transducteur. Une autre portion du faisceau sonde 12 est rétrodiffusée du fait de l'interaction Brillouin sur l'interface acoustique. Les interférences de ces deux réflexions créent des modulations ou des oscillations temporelles. Un changement de réflectivité maximal est mesuré quand une interférence constructive entre les rayons réfléchis a lieu, tandis que pour une interférence destructive, on mesure un changement de réflectivité minimal. En fonction du temps, les oscillations, dites oscillations de Brillouin, s'établissent. En mesurant la fréquence des oscillations Brillouin, on est capable de remonter à la célérité des ondes acoustiques. En outre, se superpose un signal en échelon de période plus grande que celle des oscillations Brillouin. En associant cette période à la célérité des ondes acoustique, il est possible de mesurer l'épaisseur de l'échantillon.

**[0006]** La publication T. Dehoux, M. Abi Ghanem, O. F. Zouani, J.-M. Rampnoux, Y. Guillet S. Dilhaire, M.-C. Durrieu et B. Audoin, « All-optical broadband ultrasonography of single cells », Scientific Reports, 5 :8650, DOI 10.1038, 2015, décrit un dispositif à impulsions opto-acoustiques, comprenant un premier et un second laser à impulsions picosecondes, utilisé dans une autre configuration pour l'analyse d'un échantillon 5 fixé sur un transducteur de titane 1 qui est lui-même déposé sur un substrat 4, ici en saphir. Comme l'illustre la figure 2, les deux faisceaux pompe 10 et sonde 11 sont focalisés du même côté, à l'interface de contact saphir-titane 6. Chaque impulsion laser de pompe est absorbée dans le film de titane et génère une impulsion acoustique, qui se réfléchit sur l'interface titane-cellule. Le second laser émet des impulsions sonde 11 à une autre longueur

d'onde et une autre fréquence de répétition. Une photodiode acquiert, en fonction du temps, les variations de réflectivité optique par couplage élasto-optique sur l'interface titane-saphir 6. Cette configuration du dispositif acoustique picoseconde permet de mesurer le coefficient de réflexion acoustique à l'interface titane-cellule.

- 5 Ainsi, dans cette configuration où les impulsions pompe-sonde sont focalisées par le dessous, côté substrat, le système de mesure acoustique picoseconde permet de mesurer l'impédance acoustique de la cellule et d'étudier l'adhérence d'une cellule unique à un film de titane via le coefficient de réflexion acoustique.

### **Problème technique**

- 10 **[0007]** La première configuration du dispositif acoustique picoseconde telle qu'illustrée sur la figure 1 permet de mesurer la vitesse de propagation des ondes acoustiques dans un échantillon, ainsi que son épaisseur à travers les oscillations de Brillouin. La deuxième configuration du dispositif acoustique picoseconde, telle qu'illustrée sur la figure 2, permet de mesurer son impédance acoustique et la
- 15 qualité d'adhérence via le coefficient de réflexion acoustique. En raison de leur configuration distincte, il n'est donc pas possible d'acquérir de manière simultanée en temps réel toutes ces mesures, en un même point de l'échantillon et en une seule mesure.

- [0008]** Un autre inconvénient de cette méthode de mesure est que l'acquisition
- 20 est longue pour accéder à l'ensemble des paramètres physiques de l'échantillon car il faut modifier la configuration du système selon les mesures à réaliser, impliquant un temps de mise en œuvre plus long. En effet, l'acquisition des deux signaux de sonde issus des deux configurations est effectuée en deux étapes. Il est nécessaire de changer la connexion des câbles de l'une ou l'autre des
- 25 photodiodes de sonde sur l'entrée amplificateur lock-in. De ce fait, le temps d'acquisition total des deux mesures serait plus long.

- [0009]** Une autre difficulté d'utiliser simultanément des deux configurations est liée à l'alignement des trois spots de faisceau focalisés sur une longue distance pour assurer une détection efficace des phonos acoustiques transmis. En effet,
- 30 dans le cas de la deuxième configuration qui consiste à focaliser le faisceau sonde et le faisceau pompe par le dessous du milieu, à l'interface Ti-substrat, il n'est pas

possible de localiser les faisceaux de focalisation sur l'échantillon. Pour s'affranchir de ce problème, il est nécessaire de s'assurer que le faisceau pompe focalisé de dessous est parfaitement aligné avec un autre faisceau sonde focalisé de dessus. Une fois que la position du faisceau pompe est repérée, le faisceau sonde est focalisé du même côté que le faisceau pompe.

[0010] Il est également difficile de mettre en œuvre les deux configurations de mesure simultanément avec un dispositif acousto-optique conventionnel tel que décrit ci-dessus. En effet, dans les deux configurations, une ligne à retard mécanique est utilisée pour suivre temporellement le phénomène acoustique en augmentant l'écart temporel entre la pompe et la sonde. Ainsi, les dispositifs connus utilisant des lignes à retard mécanique requièrent un temps d'acquisition long, ce qui rend le dispositif incompatible dans le cas d'une acquisition d'images, en particulier dans le cas des échantillons biologiques dynamiques.

[0011] Par ailleurs, dans un tel système, les signaux à détecter sont très faibles, de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-4}$  provoquées par la déformation mécanique associée à la propagation de l'onde acoustique. Leur détection nécessite l'utilisation d'une détection synchrone qui inclut donc un amplificateur lock-in, qui entraînerait un coût plus important.

[0012] En outre, du fait de l'imprécision sur la position de mesure entre les deux configurations, l'échantillon doit être homogène pour que les données acquises selon les deux systèmes soient représentatives des propriétés mécaniques de l'échantillon. De ce fait il n'est pas possible de caractériser l'hétérogénéité d'un échantillon.

[0013] Il est donc souhaitable de disposer d'un système et d'une méthode d'analyse multiparamétrique qui soit rapide et fiable, pour accéder aux propriétés mécaniques de l'échantillon.

## **Exposé de l'invention**

[0014] L'invention vient améliorer la situation. Il est proposé un système de mesure acoustique picoseconde pour l'analyse d'un échantillon, le système comprenant :

- un support de l'échantillon comprenant un moyen de transduction opto-

acoustique et un substrat transparent, ledit moyen de transduction ayant une première interface en contact avec le substrat transparent et une seconde interface en contact avec l'échantillon,

- une première source laser configurée pour générer un faisceau pompe, ledit  
5 faisceau pompe étant constitué d'une série d'impulsions lumineuses de pompe ultrabrèves ayant une fréquence de répétition (F) située dans un domaine spectrale compris entre plusieurs dizaines de mégahertz et plusieurs dizaines de gigahertz,
- une seconde source laser configurée pour générer un faisceau sonde principal  
10 constitué d'une série d'impulsions lumineuses de sonde ultrabrèves ayant une fréquence de répétition (F') située dans un domaine spectral compris entre plusieurs dizaines de mégahertz et plusieurs dizaines de gigahertz,
- un séparateur de faisceau configuré pour diviser ledit faisceau sonde en un premier faisceau sonde et en un second faisceau sonde,
- 15 - des premiers moyens opto-mécaniques pour diriger le faisceau pompe et le premier faisceau sonde vers la première interface par transmission depuis une surface libre du substrat et focaliser le faisceau pompe et le premier faisceau sonde sur ladite première interface, ledit faisceau pompe et le premier faisceau sonde étant alignés coaxialement,
- 20 - ledit faisceau pompe étant configuré pour générer des ondes acoustiques dans le moyen transducteur se propageant depuis la première interface vers la seconde interface, une portion des ondes acoustiques étant réfléchiée à la seconde interface et une portion des ondes acoustiques étant transmise dans l'échantillon;
- ledit premier faisceau sonde étant configuré de manière à détecter en temps  
25 réel une variation du coefficient de réflexion acoustique de la seconde interface par couplage élasto-optique entre le premier faisceau sonde et les ondes acoustiques renvoyées par la seconde interface vers la première interface,
- des seconds moyens opto-mécaniques pour diriger le second faisceau sonde vers la seconde interface par transmission depuis une surface libre de l'échantillon  
30 et focaliser le second faisceau sonde sur la seconde interface, le second faisceau sonde étant aligné avec le faisceau pompe et le premier faisceau sonde de sorte à venir sonder au même point de l'échantillon,
- ledit second faisceau sonde étant configuré de manière à détecter en temps réel

les oscillations de Brillouin liées à l'interaction Brillouin entre le second faisceau sonde et la portion des ondes acoustiques se propageant dans l'échantillon,

- un système de photodétection configuré pour mesurer simultanément et au même point de l'échantillon un signal de variation de la réflectivité au niveau de la seconde interface liée aux oscillations de Brillouin et, un signal de variation de la réflectivité au niveau de la première interface liée à une variation du coefficient de la réflexion acoustique,

- une unité d'acquisition de données connectée au système de photodétection et configurée pour enregistrer simultanément lesdits signaux de variation.

10 **[0015]** De façon avantageuse, le système de mesure de la présente invention offre la possibilité d'utiliser les données acquises simultanément et en un même point de l'échantillon et indépendamment, à savoir la fréquence Brillouin et l'impédance acoustique, pour obtenir la densité massique et la compressibilité sans autre donnée que l'indice optique.

15 **[0016]** Selon un mode de réalisation de l'invention, le faisceau pompe ayant une longueur d'onde de pompe, les premier et second faisceaux sonde ayant une longueur d'onde de sonde, la longueur d'onde de sonde est différente de la longueur d'onde de pompe.

20 **[0017]** Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le faisceau pompe ayant une longueur d'onde de pompe, les premier et second faisceaux sonde ayant une longueur d'onde de sonde, la longueur d'onde de sonde est égale à la longueur d'onde de pompe.

25 **[0018]** Les caractéristiques exposées dans les paragraphes suivants peuvent, optionnellement, être mises en œuvre. Elles peuvent être mises en œuvre indépendamment les unes des autres ou en combinaison les unes avec les autres :

- le moyen de transducteur opto-acoustique est un film métallique ayant une épaisseur comprise entre une dizaine de nanomètres et quelques micromètres,

30 - le substrat est un substrat transparent pour la longueur d'onde du faisceau pompe et la longueur d'onde du premier faisceau sonde, ledit substrat ayant une épaisseur, de préférence supérieure à la longueur de diffusion thermique dans le substrat pour la fréquence de répétition du faisceau pompe,



- un système de caméra configuré pour localiser les taches de focalisation du faisceau pompe et du second faisceau sonde sur l'échantillon.

**[0019]** De façon avantageuse, le système de photodétection comprend un premier photodétecteur configuré pour mesurer un signal de variation de la réflectivité au niveau de la seconde interface liée aux oscillations de Brillouin, et un second photodétecteur configuré pour mesurer un signal de variation de la réflectivité au niveau de la première interface liée à une variation du coefficient de la réflexion acoustique de la seconde interface.

**[0020]** Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le support de l'échantillon est monté sur deux platines de translation motorisé suivant deux directions X et Y orthogonales dans un plan horizontal de l'échantillon.

**[0021]** L'invention propose également un procédé de mesure acoustique picoseconde pour l'analyse d'un échantillon fixé sur un moyen de transduction opto-acoustique, ledit moyen de transduction ayant une première interface de contact avec un substrat transparent et une seconde interface de contact avec l'échantillon, le procédé comprenant les étapes suivantes :

- générer un faisceau pompe constitué d'une série d'impulsions lumineuses de pompe ultrabrèves ayant une fréquence de répétition (F) située dans un domaine spectral compris entre plusieurs dizaines de mégahertz et plusieurs dizaines de gigahertz,
- le faisceau pompe étant dirigé vers la première interface par transmission depuis la surface libre du substrat et focalisé sur ladite première interface de manière à générer des ondes acoustiques dans ledit moyen de transduction opto-acoustique,
- générer simultanément un premier faisceau sonde et un second faisceau sonde, lesdits faisceaux étant constitués chacun d'une série d'impulsions lumineuses de sonde ultrabrèves ayant une fréquence de répétition (F') située dans un domaine spectral compris entre plusieurs dizaines de mégahertz et plusieurs dizaines de gigahertz,
- aligner le faisceau pompe et les deux faisceaux sondes selon un axe vertical perpendiculaire à un plan de l'échantillon,
- ledit premier faisceau sonde étant dirigé vers la première interface de contact par

transmission depuis la surface libre du substrat et focalisé sur la première interface de manière à détecter en temps réel une variation du coefficient de réflexion acoustique de la seconde interface par couplage élasto-optique entre le premier faisceau sonde et les ondes acoustiques renvoyées par la seconde interface vers la première interface,

5 - ledit second faisceau sonde étant dirigé vers la seconde interface par transmission depuis la surface libre de l'échantillon et focalisé à la seconde interface de manière à détecter en temps réel les oscillations de Brillouin liées à l'interaction Brillouin entre ledit second faisceau sonde et une portion des ondes  
10 acoustiques se propageant dans l'échantillon,

- photo-détecter simultanément et au même point de l'échantillon une variation de la réflectivité au niveau de la seconde interface liée aux oscillations de Brillouin et une variation de la réflectivité au niveau de la première interface liée à une variation du coefficient de la réflexion acoustique de la seconde interface,  
15 - mesurer les deux signaux en fonction du temps.

[0022] Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, l'échantillon est déplacé suivant un axe X-X et un axe Y-Y dans un plan (XY) de sorte à positionner le faisceau pompe et les deux faisceaux sondes point par point sur l'échantillon pour obtenir une cartographie à deux dimensions des oscillations  
20 de Brillouin et du coefficient de réflexion acoustique.

### **Brève description des dessins**

[0023] D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après, et à l'analyse des dessins annexés, sur lesquels :

#### **25 Fig. 1**

[0024] [Fig. 1] représente schématiquement le principe d'une mesure de diffusion Brillouin selon l'art antérieur.

#### **Fig. 2**

[0025] [Fig. 2] représente schématiquement le principe d'une mesure de réflexion  
30 acoustique selon l'art antérieur.

**Fig. 3**

[0026] [Fig. 3] représente schématiquement un système de mesure acoustique picoseconde selon un mode de réalisation de l'invention.

**Fig. 4**

5 [0027] [Fig. 4] est une vue agrandie de la figure 3 montrant le faisceau pompe et le premier faisceau sonde en incidence sur la surface libre du substrat transparent et le second faisceau sonde en incidence sur la surface libre de l'échantillon.

**Fig. 5A**

10 [0028] [Fig. 5A] représente un exemple de mesure de la variation de la réflectivité en fonction du temps détectée par le second faisceau sonde en un point à l'interface échantillon-titane par interaction Brillouin avec les ondes acoustiques propageant dans l'échantillon.

**Fig. 5B**

15 [0029] [Fig. 5B] représente un exemple de mesure de la variation de la réflectivité en fonction du temps détectée par le premier faisceau sonde au même point à l'interface titane-substrat.

**Fig. 6A**

[0030] [Fig. 6A] représente une cartographie de l'amplitude de la fréquence de Brillouin d'une cellule biologique.

20 **Fig. 6B**

[0031] [Fig. 6B] représente une cartographie de l'épaisseur de la cellule.

**Fig. 6C**

[0032] [Fig. 6C] représente une cartographie de la réflexion acoustique à l'interface cellule-titane.

25 **Fig. 6D**

[0033] [Fig.6D] représente une cartographie de l'impédance acoustique de la cellule.

**Fig. 6E**

[0034] [Fig. 6E] représente une cartographie de la densité de masse de la cellule.

**Description des modes de réalisation**

[0035] Les dessins et la description ci-après contiennent, pour l'essentiel, des  
5 éléments de caractère certain. Ils pourront donc non seulement servir à mieux  
faire comprendre la présente invention, mais aussi contribuer à sa définition, le  
cas échéant.

[0036] Sur la figure 3, on a représenté un système de mesure acoustique  
picoseconde 100 selon un mode de réalisation de l'invention. Dans ce mode de  
10 réalisation, le système comprend deux sources d'impulsion laser distinctes 101,  
102. Une première source 101 d'impulsions laser ultrabrèves génère un faisceau  
laser pompe 201 constitué d'une série d'impulsions de pompe à la fréquence F.  
Une seconde source 102 d'impulsions laser ultrabrèves génère un faisceau laser  
sonde 202 constitué d'une série d'impulsions sonde à une autre fréquence F' ou à  
15 une même fréquence F. A titre d'exemple et notamment dans l'exemple  
d'utilisation du système de mesure acoustique picoseconde pour mesurer les  
propriétés mécaniques d'une mono-cellule qui sera détaillé ci-dessous, le train  
d'impulsions laser pompe a une durée égale à 400 fs à une longueur d'onde de  
1030 nm, avec un taux de répétition de 50 MHz. Le train d'impulsions laser sonde  
20 a une longueur d'onde de 515 nm avec un taux de répétition voisin.

[0037] Dans le présent document on entend par train d'impulsions laser, ou, de  
manière équivalente, série d'impulsions laser, une série temporelle d'impulsions  
laser, dans laquelle chaque impulsion est émise à un instant séparé  
temporellement de  $1/F$  de l'impulsion suivante et/ou précédente, où F représente  
25 la fréquence de répétition du train d'impulsions. De façon avantageuse, les  
impulsions laser d'un même train d'impulsions ont toutes les mêmes propriétés  
spectrales et temporelles. A titre d'exemple non limitatif, le domaine spectral de la  
fréquence de répétition est situé entre 50 MHz et 2 GHz.

[0038] Le système 100 comprend également un support d'échantillon sur lequel  
30 est fixé un échantillon 5 à analyser. Le support d'échantillon comprend un moyen  
de transduction opto-acoustique 1 et un substrat transparent 4. L'échantillon est

fixé par collage ou par des liaisons chimiques sur le moyen de transduction opto-acoustique. Le moyen de transduction présente une première interface de contact 6 avec le substrat et une seconde interface de contact 3 avec l'échantillon.

**[0039]** Le moyen de transduction opto-acoustique est par exemple un film  
5 métallique ayant une épaisseur comprise entre quelques dizaines de nanomètres et quelques micromètres, et absorbant à la longueur d'onde du faisceau pompe. De plus, L'épaisseur est choisie de manière à limiter la diffusion thermique du faisceau pompe dans l'échantillon. Dans le cas où l'échantillon est par exemple  
10 une cellule, le transducteur est de préférence un transducteur biocompatible. A titre d'exemple, le transducteur peut être composé d'un film mince métallique de titane biocompatible déposé sur le substrat transparent.

**[0040]** De préférence, le substrat transparent a une épaisseur supérieure à la  
longueur de diffusion thermique dans le substrat pour la fréquence de répétition de la pompe. A titre d'exemple, le substrat est un substrat de saphir avec une  
15 épaisseur de 1 mm dont la transparence permet de focaliser le faisceau pompe à la première interface par transmission dans le substrat.

**[0041]** Des moyens opto-mécaniques connus 105, par exemple à miroirs ou à  
composants polarisants dirigent le faisceau pompe 201 généré vers la première  
interface 6 par transmission depuis la surface libre du substrat. Le faisceau pompe  
20 est focalisé sur la première interface avec un premier objectif 107.

**[0042]** Le système de mesure acoustique picoseconde 100 comprend en outre  
un cube séparateur de polarisation 103 placé sur le chemin du faisceau laser  
sonde principal 202 pour séparer le faisceau sonde 202 en un premier faisceau  
laser sonde 203 et un second faisceau laser sonde 204.

25 **[0043]** D'autres moyens opto-mécaniques connus 104, 106 dirigent le premier  
faisceau laser sonde 203 vers la première interface 6 par transmission depuis la  
surface libre du substrat 4. Le premier faisceau sonde est focalisé également sur  
la première interface 6 avec le premier objectif 107. Comme l'illustrent les figures  
3 et 4, le faisceau pompe et le premier faisceau sonde sont alignés coaxialement  
30 et focalisés en un même point sur la première interface 6.

**[0044]** En sortie du cube séparateur 103, le seconde faisceau sonde 204 est dirigé vers la seconde interface 3 par des moyens opto-mécaniques connus 110, 115, 109 par transmission depuis une surface libre de l'échantillon. L'échantillon est transparent pour la longueur d'onde du second faisceau sonde. Le second  
5 faisceau est focalisé sur la seconde interface 3 avec un second objectif 108 en un point de la seconde interface.

**[0045]** De manière avantageuse, le faisceau pompe, le premier faisceau sonde et le second faisceau sonde sont alignés selon un axe vertical Z grâce à l'utilisation d'un microscope intégré, qui permet de visualiser la géométrie et l'emplacement  
10 des trois faisceaux pendant l'alignement avec une précision submicronique. De cette façon, le premier faisceau sonde et le second faisceau sonde sont configurés pour venir sonder un même point de l'échantillon.

**[0046]** Comme l'illustre la figure 4, le faisceau pompe est configuré pour générer des ondes acoustiques dans le transducteur. L'absorption de chaque impulsion de pompe dans le transducteur sur une profondeur d'épaisseur nanométrique génère  
15 des nano-impulsions acoustiques 21 à haute fréquence, jusqu'à THz, se propageant à une célérité de quelques nanomètres par picoseconde depuis la première interface 6 vers la seconde interface 3. Une portion des ondes acoustiques est réfléchiée à la seconde interface 3 et renvoyée vers la première  
20 interface 6, et une portion des ondes acoustiques 21 est transmise dans l'échantillon en raison du déséquilibre d'impédance acoustique à cette interface et se propage dans l'échantillon.

**[0047]** Les ondes acoustiques réfléchies à la seconde interface 3 se dirigent vers la surface inférieure de la couche du transducteur, perturbant la réflectivité optique  
25 de la surface du transducteur sur le premier faisceau sonde en raison du couplage élasto-optique.

**[0048]** Les ondes acoustiques transmises à travers la seconde interface se propagent dans l'échantillon 5 et interagissent avec le second faisceau sonde focalisé à la seconde interface pour générer des oscillations Brillouin.

30 **[0049]** Le système de mesure 100 de la figure 3 comprend en outre un système de détection configuré pour mesurer simultanément la variation de la réflectivité

optique en fonction du temps liée aux oscillations Brillouin et la variation de réflectivité liée à une variation du coefficient acoustique de la première interface. Le système comprend deux photodétecteurs 116, 117 pour mesurer respectivement la variation de réflectivité optique du premier et du second faisceau sonde simultanément. Les photodétecteurs détectent les variations des réflectivités et les envoient vers une unité d'acquisition de données 118 à double voies pour un enregistrement simultané. De manière avantageuse, l'unité d'acquisition 118 est munie d'une grande mémoire intégrée pour permettre l'acquisition en temps réel des données issues des deux sondes.

10 **[0050]** Contrairement aux dispositifs de l'art antérieur qui sont basés sur une détection synchrone avec l'utilisation d'une ligne à retard optique, le dispositif de la présente invention permet d'utiliser un échantillonnage optique asynchrone, permettant une détection de signaux faibles basée sur un moyennage double rapide grâce à l'utilisation de l'unité d'acquisition à deux canaux. Le dispositif de la présente invention est alors beaucoup plus compact, moins onéreux et surtout beaucoup plus rapide ce qui le rend compatible avec l'acquisition d'images telles que décrite ci-dessous.

20 **[0051]** Le système de mesure acoustique picoseconde à double faisceaux sondes de la présente invention permet d'enregistrer simultanément et en fonction du temps les oscillations Brillouin dans l'échantillon par le second faisceau sonde et le coefficient de réflexion acoustique à l'interface transducteur-échantillon par le premier faisceau sonde au même point de l'échantillon. En combinant les deux mesures réalisées par les deux sondes, il est alors possible d'extraire la vitesse de propagation des ondes acoustiques dans l'échantillon et l'épaisseur de l'échantillon à travers les oscillations Brillouin, ainsi que l'impédance acoustique et la qualité d'adhésion de l'échantillon à travers le coefficient de réflexion acoustique de l'interface échantillon-transducteur.

30 **[0052]** Selon l'invention, le système de mesure 100 comprend en outre un système de caméra CCD 113 permettant de localiser la tache de focalisation du second faisceau sonde sur l'échantillon. De même, en utilisant une couche mince partiellement transparente, telle qu'une couche de métal d'épaisseur inférieure à

la pénétration optique de la pompe, soit de quelques nanomètres, la caméra CCD permet également de localiser le faisceau de pompe.

**[0053]** Selon une variante, le système comprend une source de lumière blanche 111 pour la visualisation de l'échantillon. Selon une autre variante, le système  
5 comprend une source de lumière fluorescente pour la visualisation de l'échantillon.

**[0054]** Nous allons maintenant détailler l'analyse de la détection de la diffusion Brillouin par le second faisceau sonde dans l'échantillon et la détection du coefficient de réflexion acoustique par le premier faisceau sonde de l'interface échantillon-transducteur 3.

10 **[0055]** Comme l'illustre la figure 4, le faisceau pompe 201 est dirigé par les moyens opto-mécaniques composés de miroirs 105, 106 vers la première interface 6 par transmission depuis la surface libre 4.1 du substrat et focalisé à l'interface 6 par l'intermédiaire d'un premier objectif 107. Le second faisceau sonde 204 est dirigé par les autres moyens opto-mécaniques composés de miroirs  
15 110, 115, 109 vers la première interface transducteur-échantillon 3 par transmission depuis la surface libre de l'échantillon et focalisé sur l'interface 3 par l'intermédiaire d'un second objectif 108. Le faisceau pompe et le second faisceau sonde sont alignés selon l'axe vertical Z.

**[0056]** Lorsque l'impulsion optique du faisceau pompe 201 est absorbée par le  
20 matériau transducteur opto-acoustique 1, qui est par exemple un matériau métallique tel que titane, des ondes acoustiques sont générées. Les ondes acoustiques 21 générées se propagent dans le transducteur depuis la première interface vers la seconde interface. Une portion des ondes acoustiques est transmise dans l'échantillon et forme une interface optique 20 qui se déplace à la  
25 vitesse de propagation de l'onde acoustique dans l'échantillon. Le second faisceau sonde 204 est focalisé à l'interface transducteur-échantillon 3. Une portion du second faisceau sonde 204 qui n'est pas absorbée par l'échantillon est réfléchi à l'interface 3 entre l'échantillon 5 et le transducteur 1. Une autre portion du second faisceau sonde 204 est rétro-diffusée du fait de l'interaction Brillouin sur  
30 l'interface acoustique. Les interférences de ces deux réflexions créent des modulations ou des oscillations temporelles. Un changement de réflectivité maximal est mesuré quand une interférence constructive entre les rayons réfléchis



a lieu, tandis que pour une interférence destructive, on mesure un changement de réflectivité minimal. En fonction du temps, les oscillations, dites oscillations Brillouin, s'établissent.

**[0057]** La figure 5A montre un exemple d'une courbe 8 de ces oscillations de Brillouin en fonction du temps mesurée avec un faisceau sonde de longueur d'onde  $\lambda = 515$  nm dans un échantillon qui est ici une cellule. La transformée de fourrier de ces oscillations permet de déterminer la fréquence de Brillouin  $f_B$ . Cette interaction Brillouin peut être produite lorsque le nombre d'onde des phonons est double de celui du faisceau sonde. Cette condition est remplie lorsque la fréquence acoustique est égale à la fréquence de résonance Brillouin. Dans le cas où les faisceaux sont en incidence normale, la fréquence de Brillouin est définie selon la relation suivante :  $f_b = 2nv/\lambda$ , où  $n$  est l'indice optique de l'échantillon,  $v$  la vitesse de propagation de l'onde acoustique et  $\lambda$  la longueur d'onde du faisceau sonde. Ainsi, connaissant l'indice optique de l'échantillon et  $\lambda$ , on est capable de remonter à la vitesse de propagation des ondes acoustiques en mesurant la fréquence de Brillouin  $f_B$ . En outre, se superpose un signal en échelon de période  $2\tau$  plus grande que celle des oscillations Brillouin. En associant cette période à la célérité des ondes acoustiques il est également possible de mesurer l'épaisseur de l'échantillon selon la relation  $e = v\tau$ .

**[0058]** Nous allons maintenant détailler l'analyse de la détection du coefficient de réflexion acoustique par le premier faisceau sonde à la seconde interface titane-échantillon.

**[0059]** Comme l'illustre la figure 4, pour cette seconde mesure effectuée en même temps que la première mesure et au même endroit sur l'échantillon, le faisceau pompe reste inchangé. Le premier faisceau sonde 203 est dirigé par les moyens opto-mécaniques composés de miroirs 104, 106 vers la première interface transducteur-substrat 6 par transmission depuis la surface libre 4.1 du substrat et focalisé à l'interface 6 titane-substrat par l'intermédiaire du premier objectif 107. Le faisceau pompe 201 et le premier faisceau sonde 203 sont par conséquent alignés coaxialement selon l'axe vertical Z. Cet alignement entre le faisceau pompe et le premier faisceau sonde est réalisé grâce à l'alignement

réalisé préalablement entre le faisceau pompe et le seconde faisceau sonde dont les taches focales sont localisées grâce à une caméra.

**[0060]** Les ondes acoustiques générées dans le transducteur se propagent depuis la première interface 6 vers la seconde interface 3. Une portion des ondes acoustiques est transmise dans l'échantillon et une portion des ondes acoustiques est réfléchiée à la seconde interface 3 en direction de la première interface 6. Les ondes acoustiques font des allers-retours dans le transducteur et perturbent la réflectivité optique de la première interface du premier faisceau sonde. Ainsi il est possible de mesurer la réflectivité acoustique en un point à l'interface transducteur-échantillon en mesurant la variation en fonction du temps de la réflectivité optique de la première interface pour le premier faisceau sonde.

**[0061]** La figure 5B montre une courbe 9 de la variation de la réflectivité mesurée par le second faisceau sonde en fonction du temps en un point de l'interface transducteur-échantillon. En utilisant un traitement temps-fréquence par ondelettes, il est possible d'extraire le coefficient de réflexion acoustique dans l'espace fréquentiel. Selon un modèle bien établi, cette dépendance en fréquence du coefficient de réflexion acoustique est reliée à la qualité de contact entre deux solides. Il est connu par exemple de modéliser l'interface par des ressorts sans masse et de raideur par unité de surface  $K$ . L'amplitude du coefficient de réflexion acoustique  $R_{ac}$  est alors définie par la relation suivante :

**[0062]** [Math. 1]

$$R_{ac} = \left| \frac{Z_{Ti} - Z_C + i\omega Z_{Ti} Z_C / K}{Z_{Ti} + Z_C + i\omega Z_{Ti} Z_C / K} \right|$$

**[0063]** Où  $Z_{Ti}$  est l'impédance acoustique du transducteur de titane et  $Z_C$  l'impédance acoustique de l'échantillon. Le coefficient acoustique  $R_{ac}$  dépend de la fréquence de l'onde  $\omega$  et de la raideur  $K$  du ressort, c'est-à-dire de l'interface. A partir de cette relation, il est donc possible de déterminer l'impédance de l'échantillon  $Z_C$  et la raideur de l'interface titane-échantillon  $K$  à partir du coefficient de réflexion acoustique  $R_{ac}$ . Pour cela, le coefficient de réflexion théorique calculé

est ajusté par rapport à la valeur mesurée  $R_{ac}$  par une régression linéaire, en faisant varier l'impédance acoustique  $Z_C$  de l'échantillon et la raideur  $K$ .

**[0064]** Il est donc possible d'extraire à partir de la valeur expérimentale du coefficient de réflexion l'impédance acoustique et la raideur de l'interface titane-  
5 échantillon.

**[0065]** Grâce à ces deux mesures effectuées simultanément et au même point de l'échantillon, le système de mesure acousto-optique offre la possibilité d'extraire la densité de l'échantillon  $\rho$  selon la relation suivante :

**[0066]** [Math 2]

$$\frac{\rho}{2n} = \frac{Z}{f_B \lambda}$$

10

**[0067]** Où  $n$  est l'indice optique du milieu,  $Z$  l'impédance acoustique de l'échantillon,  $f_B$  la fréquence Brillouin, et  $\lambda$  la longueur d'onde du faisceau sonde.

**[0068]** Par ailleurs, il est également possible de calculer le module d'élasticité  $M$  selon la relation  $M = Z v$  où  $v$  est la vitesse de propagation des ondes acoustiques  
15 dans l'échantillon, ou plus directement par la relation  $2nM = Zf_B\lambda$ .

**[0069]** Selon un autre mode de réalisation particulièrement avantageux, le support est monté sur deux platines de translation motorisées x-y permettant de positionner le faisceau pompe 201 et les deux faisceaux sonde 203, 204 suivant les deux directions X et Y à l'interface titane-échantillon et à l'interface titane-  
20 substrat, permettant ainsi de réaliser les mesures décrites ci-dessus point par point sur l'échantillon et de réaliser une cartographie de structures micrométriques à deux dimensions de l'échantillon.

**[0070]** Nous allons maintenant présenter un exemple d'application du système de mesure à double sonde pour cartographier les propriétés mécaniques d'une  
25 cellule. Le support de l'échantillon est constitué d'un film de titane déposé sur un substrat transparent de saphir. Le film de titane a une épaisseur de 300 nm et le substrat une épaisseur de 1 mm. La cellule adhérente sur la surface du

transducteur de titane peut avoir subi une fixation biologique, par exemple par de la paraformaldehyde.

**[0071]** Le faisceau laser pompe est constitué d'une série d'impulsions pompe ayant une durée d'impulsion de 400 fs et une longueur d'onde de pompe de 1030 nm. Les deux faisceaux sonde sont constitués chacun d'une série d'impulsions sonde ayant une durée d'impulsion de 400 fs et une longueur d'onde de sonde de 515 nm. Les sources laser fonctionnent à une fréquence de répétition de 50 MHz avec un décalage  $\Delta f$ . Pendant la mesure, le maintien de ce décalage est assuré par un dispositif électronique d'asservissement permettant l'ajustement de la longueur de la cavité laser générant le faisceau sonde. Cette différence dite de battement définit la durée nécessaire pour une acquisition de la variation de réflectivité. En enregistrant la variation temporelle de l'intensité du faisceau sonde pendant une période de battement à l'aide d'une photodiode, la réponse de l'échantillon est dilatée dans le temps par effet stroboscopique. Le principe du fonctionnement du dispositif asynchrone permettant un échantillonnage optique asynchrone est décrit plus en détail dans le document WO2007045773. Ce montage permet des acquisitions plus rapides, avec une vitesse d'acquisition typique de l'ordre de 16 point/mn et une résolution temporelle sub-picoseconde.

**[0072]** La figure 6A représente un exemple de cartographie de la fréquence Brillouin 2D obtenue pour la cellule de la même manière que la fréquence Brillouin en un point à l'interface transducteur-échantillon. La variation de la réflectivité en fonction du temps est enregistrée à chaque point sondé par le second faisceau à l'interface transducteur-échantillon. La figure 6B représente la cartographie de l'épaisseur obtenue pour la même cellule. La figure 6C représente la cartographie de la réflexion acoustique à l'interface titane-cellule détectée par le premier faisceau sonde à l'interface saphir-titane en déplaçant l'échantillon suivant X et Y. Les ondes acoustiques sont générées à chaque point de mesure par le faisceau pompe. La figure 6D représente la cartographie de l'impédance acoustique Z déterminée et la figure 6E représente la cartographie de la densité de masse calculée de la cellule en connaissant la fréquence Brillouin et l'impédance acoustique pour chaque point sondé simultanément par le premier faisceau sonde et le second faisceau sonde.

[0073] Le contraste de ces images montre que le système de mesure acousto-optique à double faisceaux sondes permet de cartographier au sein d'une même cellule en une seule mesure non seulement la fréquence Brillouin, l'épaisseur et l'impédance acoustique de la cellule, mais aussi sa densité massique. Ces images  
5 montrent que la solution de la présente invention permet d'imager sans contact et sans agents de contraste l'hétérogénéité spatiale de ces grandeurs, ce qui était impossible par les moyens antérieurs à l'invention.

[0074] Le système de mesure acousto-optique et le procédé de la présente invention revendiqué combine :

- 10 - une architecture optique à double sonde,
- un échantillonnage optique asynchrone au lieu de l'utilisation d'une ligne à retard optique, permettant une détection de signaux faibles basée sur un moyennage rapide au lieu d'une détection synchrone, et rendant ainsi le système compatible avec l'imagerie,
- 15 - un double moyennage rapide en utilisant une unité d'acquisition à deux canaux, qui est munie d'une grande mémoire intégrée pour permettre l'acquisition en temps réel des données issues des deux sondes à des taux de déclenchement élevés, permettant ainsi une acquisition de données rapide et simultanée en quelques secondes .

20 [0075] La synergie issue de la mise en œuvre de tous ces éléments permet d'accéder sans contact à des grandeurs mécaniques (masse volumique, compressibilité) qui ne sont pas accessibles par une mesure seule et en temps réel.

### **Application industrielle**

25 [0076] L'invention peut trouver à s'appliquer dans différents domaines technologiques, tels que photonique, microélectronique ou biologie cellulaire. Les mesures simultanées des oscillations Brillouin et les mesures du coefficient de réflexion acoustique peuvent en effet être analysées pour en déduire des paramètres (densité, élasticité) et la qualité de contact entre une ou plusieurs  
30 couches minces transparentes, utilisées par exemple dans des systèmes ou composants optiques ou électroniques. En biologie cellulaire, grâce au système opto-acoustique à double faisceaux sondes de la présente divulgation qui permet

de mesurer simultanément des oscillations Brillouin et le coefficient de réflexion acoustique au même point de la cellule, il a été possible de réaliser en une seule mesure une cartographie de la fréquence Brillouin, de l'épaisseur, de l'impédance acoustique, de l'adhérence, du module d'élasticité et de la densité massique d'une

5 cellule à une échelle subcellulaire. De plus, la rapidité de la mesure est compatible avec la dynamique d'un grand nombre d'échantillons, contrairement aux dispositifs de l'art antérieur qui sont limités à des échantillons quasi-inertes en raison du

10 temps de l'acquisition d'un seul signal de plusieurs minutes. L'invention est particulièrement adaptée à l'étude des propriétés mécaniques d'une cellule pour la

compréhension de son fonctionnement physiologique et pathologique tout en préservant l'intégrité de la cellule.

## Revendications

**[Revendication 1]** Système de mesure acoustique picoseconde (100) pour l'analyse d'un échantillon (5), le système comprenant :

- un support de l'échantillon comprenant un moyen de transduction opto-acoustique (1) et un substrat transparent (4), ledit moyen de transduction ayant une première interface (6) en contact avec le substrat transparent (4) et une seconde interface (3) en contact avec l'échantillon (5),
- une première source laser (101) configurée pour générer un faisceau pompe (201), ledit faisceau pompe étant constitué d'une série d'impulsions lumineuses de pompe ultrabrèves ayant une fréquence de répétition (F) située dans un domaine spectral compris entre plusieurs dizaines de mégahertz et plusieurs dizaines de gigahertz,
- une seconde source laser (102) configurée pour générer un faisceau sonde principal (202) constitué d'une série d'impulsions lumineuses de sonde ultrabrèves ayant une fréquence de répétition (F') située dans un domaine spectral compris entre plusieurs dizaines de mégahertz et plusieurs dizaines de gigahertz,
- un séparateur de faisceau (103) configuré pour diviser ledit faisceau sonde en un premier faisceau sonde (203) et en un second faisceau sonde (204),
- des premiers moyens opto-mécaniques (105, 106, 107) pour diriger le faisceau pompe (201) et le premier faisceau sonde (203) vers la première interface (6) par transmission depuis une surface libre du substrat et focaliser le faisceau pompe (201) et le premier faisceau sonde (203) sur ladite première interface (6), ledit faisceau pompe (201) et le premier faisceau sonde (203) étant alignés coaxialement,
- ledit faisceau pompe étant configuré pour générer des ondes acoustiques dans le moyen transducteur (4) se propageant depuis la première interface vers la seconde interface, une portion des ondes acoustiques étant réfléchiée à la seconde interface et une portion des ondes acoustiques étant transmise dans l'échantillon;
- ledit premier faisceau sonde étant configuré de manière à détecter en temps réel une variation du coefficient de réflexion acoustique de la seconde interface (3) par couplage élasto-optique entre le premier faisceau sonde (203) et les ondes acoustiques renvoyées par la seconde interface (3) vers la première interface (6),

- des seconds moyens opto-mécaniques (110, 109, 108) pour diriger le second faisceau sonde (204) vers la seconde interface (3) par transmission depuis une surface libre de l'échantillon et focaliser le second faisceau sonde sur la seconde interface (3), ledit second faisceau sonde (204) étant aligné avec ledit faisceau pompe (201) et ledit premier faisceau sonde (203) de sorte à venir sonder au même point de l'échantillon,
- ledit second faisceau sonde (204) étant configuré de manière à détecter en temps réel les oscillations de Brillouin liées à l'interaction Brillouin entre ledit second faisceau sonde (204) et une portion des ondes acoustiques se propageant dans l'échantillon,
- un système de photodétection (116, 117) configuré pour mesurer simultanément et au même point de l'échantillon un signal de variation de la réflectivité au niveau de la seconde interface (3) liée aux oscillations de Brillouin et un signal de variation de la réflectivité au niveau de la première interface (6) liée à une variation du coefficient de la réflexion acoustique,
- une unité d'acquisition de données (118) connectée au système de photodétection configurée pour enregistrer simultanément lesdits signaux de variation.

**[Revendication 2]** Système selon la revendication 1, dans lequel le faisceau pompe (201) ayant une longueur d'onde de pompe, les premier (203) et second (204) faisceaux sonde ayant une longueur d'onde de sonde, la longueur d'onde de sonde est différente de la longueur d'onde de pompe.

**[Revendication 3]** Système selon la revendication 1, dans lequel le faisceau pompe (201) ayant une longueur d'onde de pompe, les premier (203) et second (204) faisceaux sonde ayant une longueur d'onde de sonde, la longueur d'onde de sonde est égale à la longueur d'onde de pompe.

**[Revendication 4]** Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le moyen de transducteur opto-acoustique (1) est un film métallique ayant une épaisseur comprise entre dizaine de nanomètres et quelques micromètres.

**[Revendication 5]** Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le substrat (4) est un substrat transparent pour la longueur d'onde du faisceau pompe et la longueur d'onde du premier faisceau sonde, ledit substrat



ayant une épaisseur, de préférence supérieure à la longueur de diffusion thermique dans le substrat pour la fréquence de répétition du faisceau pompe.

**[Revendication 6]** Système selon l'une des revendications précédentes, comprenant en outre un système de caméra (111, 113) configuré pour localiser  
5 les taches de focalisation du faisceau pompe et du second faisceau sonde sur l'échantillon.

**[Revendication 7]** Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le système de photodétection comprend un premier photodétecteur (116) configuré pour mesurer un signal de variation de la réflectivité au niveau de la  
10 seconde interface (3) liée aux oscillations de Brillouin et un second photodétecteur (117) configuré pour mesurer un signal de variation de la réflectivité au niveau de la première interface (6) liée à une variation du coefficient de la réflexion acoustique de la seconde interface (3).

**[Revendication 8]** Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le support de l'échantillon est monté sur deux platines de translation  
15 motorisées suivant deux directions  $X$  et  $Y$  orthogonales dans un plan horizontal de l'échantillon.

**[Revendication 9]** Procédé de mesure acoustique picoseconde pour l'analyse d'un échantillon (5) fixé sur un moyen de transduction opto-acoustique (1), ledit  
20 moyen de transduction ayant une première interface de contact (6) avec un substrat transparent (4) et une seconde interface de contact (3) avec l'échantillon, le procédé comprenant les étapes suivantes :

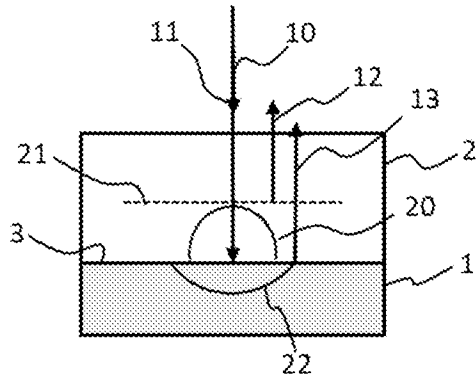
- générer un faisceau pompe (201) constitué d'une série d'impulsions lumineuses de pompe ultrabrèves ayant une fréquence de répétition (F) située dans un  
25 domaine spectral compris entre plusieurs dizaines de mégahertz et plusieurs dizaines de gigahertz,
- le faisceau pompe étant dirigé vers la première interface (6) par transmission depuis la surface libre du substrat (4.1) et focalisé sur ladite première interface (6) de manière à générer des ondes acoustiques (21) dans ledit moyen de  
30 transduction opto-acoustique,
- générer simultanément un premier faisceau sonde (203) et un second faisceau sonde (204), lesdits faisceaux étant constitués chacun d'une série d'impulsions

lumineuses de sonde ultrabrèves ayant une fréquence de répétition ( $F'$ ) située dans un domaine spectral compris entre plusieurs dizaines de mégahertz et plusieurs dizaines de gigahertz,

- 5 --aligner le faisceau pompe (201) et les deux faisceaux sondes (203, 204) selon un axe vertical perpendiculaire à un plan de l'échantillon,
- ledit premier faisceau sonde (203) étant dirigé vers la première interface (6) de contact par transmission depuis la surface libre du substrat (4.1) et focalisé sur la première interface (6) de manière à détecter en temps réel une variation du coefficient de réflexion acoustique de la seconde interface (3) par couplage élasto-  
10 optique entre le premier faisceau sonde (203) et les ondes acoustiques (21) renvoyées par la seconde interface (3) vers la première interface (6),
- ledit second faisceau sonde (204) étant dirigé vers la seconde interface (3) par transmission depuis la surface libre de l'échantillon et focalisé à la seconde interface (3) de manière à détecter en temps réel les oscillations de Brillouin liées  
15 à l'interaction Brillouin entre ledit second faisceau sonde (204) et une portion des ondes acoustiques (20) se propageant dans l'échantillon,
- photo-détecter simultanément et au même point de l'échantillon une variation de la réflectivité au niveau de la seconde interface (3) liée aux oscillations de Brillouin et une variation de la réflectivité au niveau de la première interface (6) liée à une  
20 variation du coefficient de la réflexion acoustique de la seconde interface (3),
- mesurer les deux signaux de variation en fonction du temps.

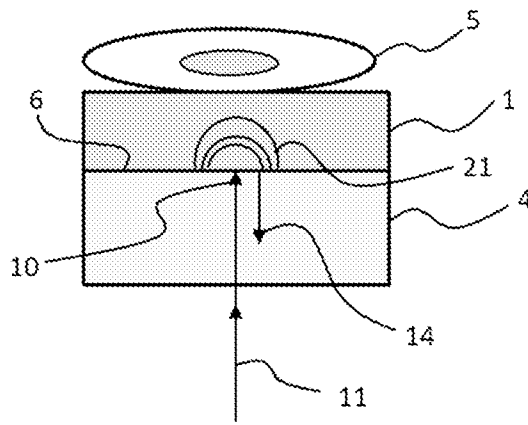
**[Revendication 10]** Procédé de mesure acoustique picoseconde selon la revendication 9, dans lequel l'échantillon est déplacé suivant l'axe X-X et l'axe Y-Y dans un plan (XY) de sorte à positionner le faisceau pompe et les deux faisceaux  
25 sonde point par point sur l'échantillon pour obtenir une cartographie à deux dimensions des oscillations de Brillouin et du coefficient de réflexion acoustique.

[Fig. 1]



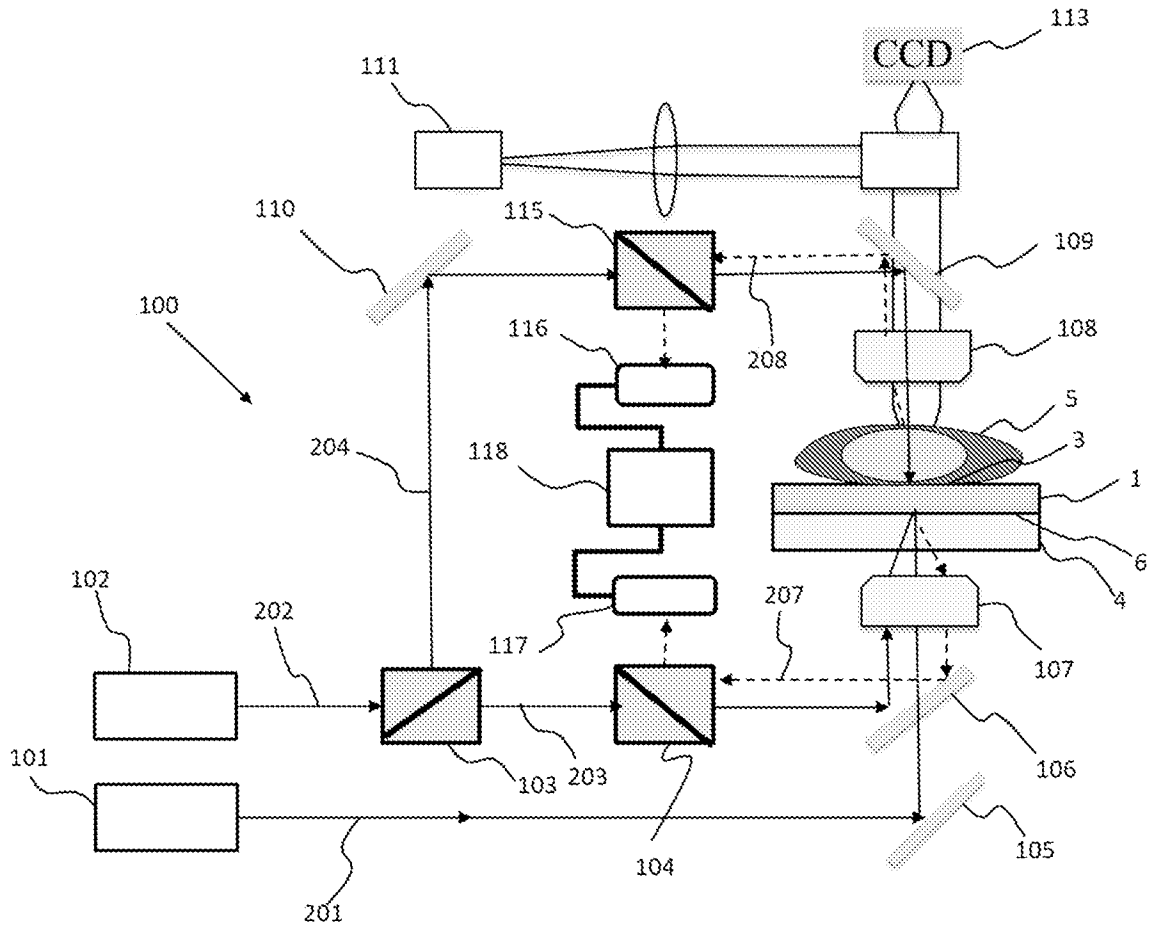
Art Antérieur

[Fig. 2]

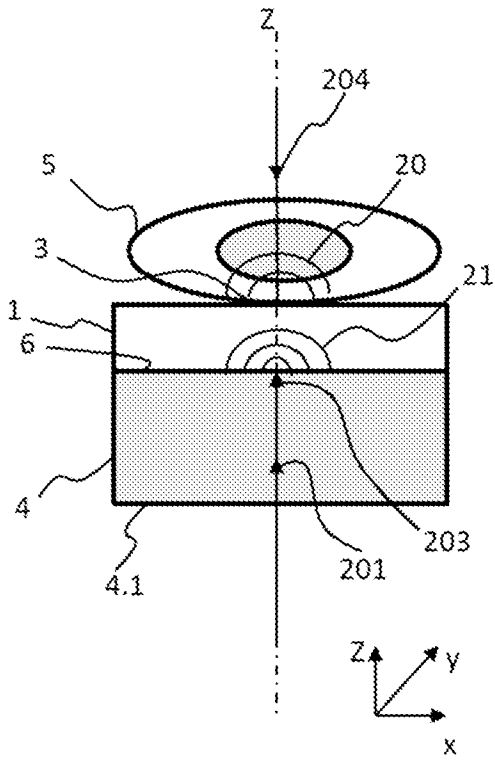


Art Antérieur

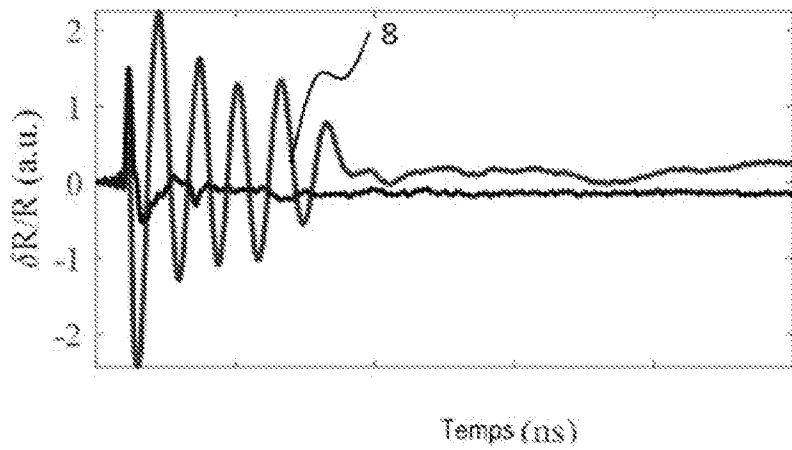
[Fig. 3]



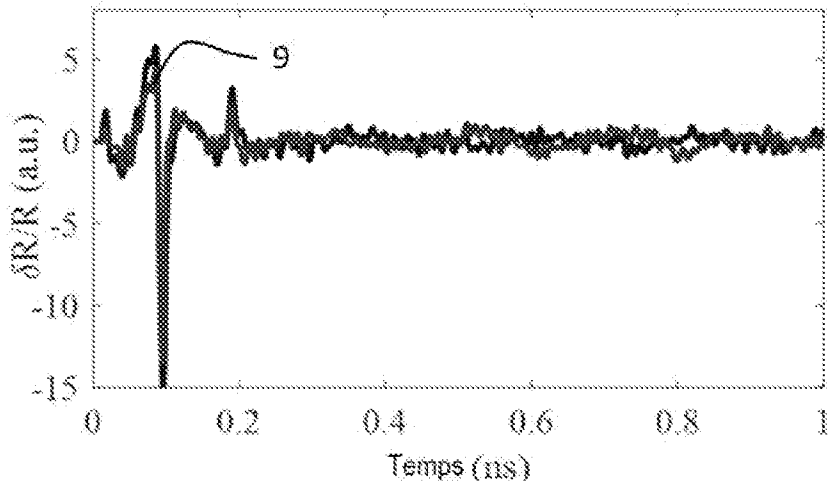
[Fig. 4]



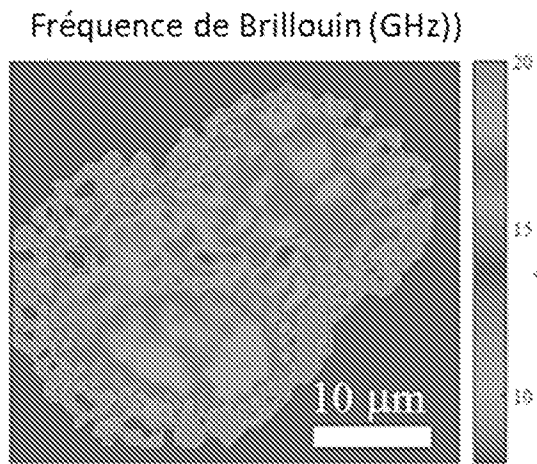
[Fig. 5A]



[Fig. 5B]

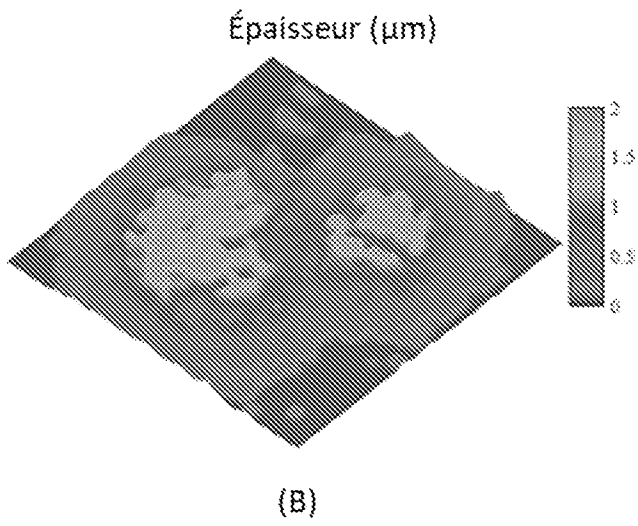


[Fig. 6A]

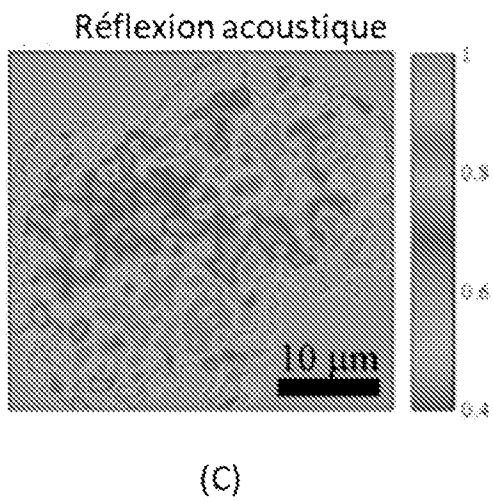


(A)

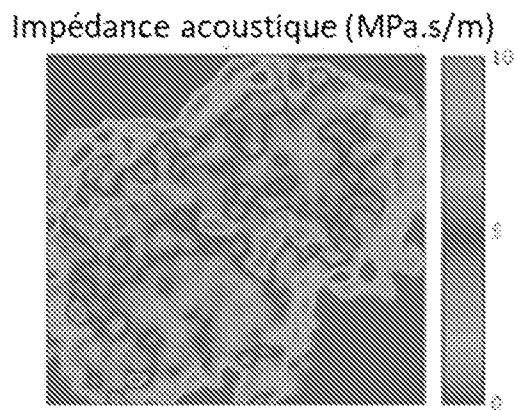
[Fig. 6B]



[Fig. 6C]

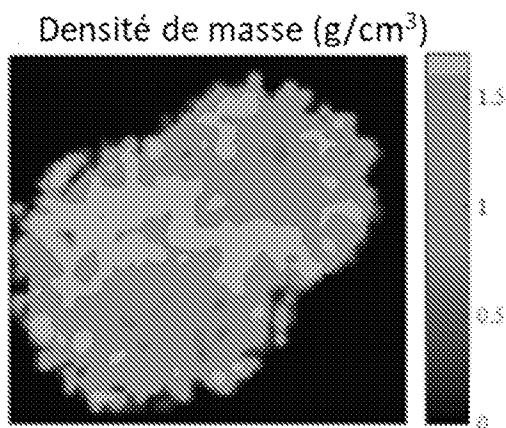


[Fig. 6D]



(D)

[Fig. 6E]



(E)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/FR2020/050878**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>G01N 21/17</b> (2006.01)i; <b>G01N 21/63</b> (2006.01)i; <b>G01N 29/24</b> (2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOMAS DEHOUX ET AL. "Probing single-cell mechanics with picosecond ultrasonics" <i>ULTRASONICS</i> , GB, Vol. 56, 01 February 2015 (2015-02-01), pages 160-171 DOI: 10.1016/j.ultras.2014.07.010 ISSN: 0041-624X, XP055664481	1,2,4-10
Y	page 161, right-hand column, paragraph 2 page 164, left-hand column, paragraphs 2,3 page 165, left-hand column, last paragraph - right-hand column page 166, right-hand column - page 167 figures 2,4,8,10	3,6,8,10
Y	GUSEV VITALYI E ET AL. "Advances in applications of time-domain Brillouin scattering for nanoscale imaging" <i>APPLIED PHYSICS REVIEWS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, 2 HUNTINGTON QUADRANGLE, MELVILLE, NY 11747</i> , Vol. 5, No. 3, 12 July 2018 (2018-07-12), DOI: 10.1063/1.5017241 XP012229987 abstract page 9, left-hand column	3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>26 August 2020</b>		Date of mailing of the international search report <b>03 September 2020</b>
Name and mailing address of the ISA/EP <b>European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands</b> Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer <b>D'Alessandro, Davide</b> Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/FR2020/050878**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	T. DEHOUX M. ABI GHANEMO F. ZOUANI J.-M. RAMPNOUX Y. GUILLET S. DILHAIRE M.-C. DURRIEU B. AUDIOIN. "All-optical broadband ultraso-nography of single cells" <i>SCIENTIFIC REPORTS</i> , Vol. 5, 2015, page 8650 XP055362063 cited in the application abstract page 2, left-hand column, last paragraph - right-hand column figure 1	6,8,10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2020/050878

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N21/17      G01N21/63      G01N29/24 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	THOMAS DEHOUX ET AL: "Probing single-cell mechanics with picosecond ultrasonics", ULTRASONICS., vol. 56, 1 février 2015 (2015-02-01), pages 160-171, XP055664481, GB ISSN: 0041-624X, DOI: 10.1016/j.ultras.2014.07.010	1,2,4-10
Y	page 161, colonne de droite, alinéa 2 page 164, colonne de gauche, alinéas 2,3 page 165, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite page 166, colonne de droite - page 167 figures 2,4,8,10 ----- -/--	3,6,8,10
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 26 août 2020		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 03/09/2020
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé D'Alessandro, Davide

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>GUSEV VITALYI E ET AL: "Advances in applications of time-domain Brillouin scattering for nanoscale imaging", APPLIED PHYSICS REVIEWS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, 2 HUNTINGTON QUADRANGLE, MELVILLE, NY 11747, vol. 5, no. 3, 12 juillet 2018 (2018-07-12), XP012229987, DOI: 10.1063/1.5017241 abrégé page 9, colonne de gauche -----</p>	3
Y	<p>T. DEHOUX M. ABI GHANEMO F. ZOUANI J.-M. RAMPNOUX Y. GUILLET S. DILHAIRE M.-C. DURRIEU B. AUDOIN: "All-optical broadband ultraso-nography of single cells", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 5, 2015, page 8650, XP055362063, cité dans la demande abrégé page 2, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite figure 1 -----</p>	6,8,10