



HAL
open science

Development of a highly sensitive and versatile analytical technique by using laser-induced breakdown spectroscopy: Applications to aerosols and biological materials

Nicolas Leone

► **To cite this version:**

Nicolas Leone. Development of a highly sensitive and versatile analytical technique by using laser-induced breakdown spectroscopy: Applications to aerosols and biological materials. Chemical Sciences. Chimie ParisTech, 2007. English. NNT : . pastel-00004873

HAL Id: pastel-00004873

<https://pastel.hal.science/pastel-00004873>

Submitted on 23 Mar 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Ecole doctorale :

GENIE DES PROCEDES ET HAUTE TECHNOLOGIE

Présentée par :

M. Nicolas LEONE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS 6

Sujet de la thèse :

**DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE D'ANALYSE
HAUTEMENT SENSIBLE ET POLYVALENTE PAR
SPECTROSCOPIE DE PLASMA INDUIT PAR LASER :
APPLICATIONS AUX AEROSOLS ET AUX MATERIAUX
BIOLOGIQUES**

Soutenue le 5 juillet 2007

Devant le jury composé de :

M. Jacques AMOUROUX	Professeur de l'Université Paris VI	Directeur de thèse
M. Michel VARDELLE	Professeur de l'Université de Limoges	Rapporteur
M. Jean AUBERT	Professeur de l'Université Paris XI	Rapporteur
M. Francis BERENBAUM	Professeur de l'Université Paris VI	Examineur
M. Philippe ADAM	Docteur ès Sciences	Examineur
M. Michel DESGRANGES	Docteur ès Sciences	Examineur
M. Göran OLOFSSON	Ingénieur	Invité
M. Patrick MAUCHIEN	Ingénieur	Invité

*A la mémoire de mon oncle,
A ma famille, ici et là-bas.*

Résumé

La spectroscopie de plasma (10^4K et 10^{16} électron. cm^{-3}) induit par laser pulsé ns (LIBS) est développée pour caractériser tout échantillon chimique ou biologique (gaz, surface homogène ou hétérogène, aérosol), de façon *in situ*, rapide ($\sim 10^{-6}$ s), sensible et reproductible, à des fins de classification, voire d'identification. Le volume échantillonné optiquement est reproductible pour les plasmas dans les gaz ($\sim 1\text{mm}^3$) et sur surfaces (diamètre d'impact $\sim 10^2\mu\text{m}^2$). Cela permet d'étalonner la technique pour le dosage multiélémentaire à des seuils de l'ordre du ppm, voire du ppb, y compris pour des particules microniques.

Les marqueurs spectraux des matériaux biologiques (Ca, Mg, Na, K, P et C) sont identifiés par traitement statistique selon une analyse en composantes principales permettant de classer les échantillons par nature. On vérifie comment les observables discriminantes sont détectés pour diverses formes bactériennes : pastilles comprimées de bactéries lyophilisées, cultures végétatives sur boîtes de Pétri à un seuil minimal déterminé d'environ 10^3 bactéries, et aérosols suspendus. L'exploitation statistique des identifiants permet de distinguer les bactéries par rapport à des milieux nutritifs et des leurres. Dans le cas de l'analyse au vol de bactéries aérosolisées, la détection est plus complexe et aléatoire du fait des faibles teneurs élémentaires disponibles, ce qui nécessite leur concentration préalable.

La LIBS, calibrée pour les gaz, surfaces et aérosols, est alors transposée en outil transportable, polyvalent et sensible ouvrant de vastes champs applicatifs : diagnostics biomédicaux, suivi en ligne de procédés industriels, contrôle qualité environnementale...

Mots clés : LIBS, TRELBS, plasma, laser, spectroscopie, analyse, aérosol, particule, bactérie, statistique, détection, classification

Abstract

The ns-duration pulsed laser-induced breakdown (10^4K and 10^{16} electron. cm^{-3}) spectroscopy (LIBS) is developed for characterizing every chemical or biological sample (gas, homogeneous or heterogeneous surface, and aerosol) *in situ*, rapidly ($\sim 10^{-6}$ s), in a sensitive and reproducible manner, for classification purposes, and even identification. The optically sampled volume is reproducible for the plasmas in gases ($\sim 1\text{mm}^3$) and on surfaces (diameter of impact $\sim 10^2\mu\text{m}^2$). The calibration of the technique is then possible for the multielementary measurement with limits of detection of about 1 ppm, and even 1 ppb, also comprising micron-sized particles. The spectral markers of biological materials (Ca, Mg, Na, K, P, and C) are identified by means of a statistical treatment based on a principal components analysis, which lets to classify the samples according to their nature. We study how the discriminating observables are detected for various bacterial kinds: compressed pellets of bulk freeze-dried bacteria, vegetative growths on Petri dishes with a measured minimal threshold of about 10^3 *Bacillus*-typed bacteria, and suspended aerosols. The statistical exploitation of the spectral markers leads to distinguish bacteria both from their nutritive media, and interferon. In the case of direct on flight analysis of aerosolized bacteria, the detection is more complex and random due to the weak elementary available ratios, which necessitates their preliminary concentration.

The LIBS technique, that has been calibrated for gases, surfaces and aerosols, is engineered under a transportable, versatile and sensitive tool adapted to numerous applications: biomedical diagnosis, on line monitoring of industrial processes, environmental quality control...

Key words: LIBS, TRELBS, plasma, breakdown, laser, spectroscopy, analysis, aerosol, particle, bacteria, statistic, detection, classification

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du Département Détection Physique, sous l'égide de Philippe Adam, au Centre d'Etudes du Bouchet (CEB), établissement d'expertise de la Délégation Générale pour l'Armement (DGA). Cette étude a été effectuée sous la direction du Professeur Jacques Amouroux du Laboratoire de Génie des Procédés Plasmas et Traitement de Surfaces (Unité de recherche EA 3492) de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris 6.

Je lui exprime ma plus profonde et sincère gratitude pour son soutien scientifique, sa disponibilité, ses qualités humaines et ses méthodes de pensées permettant une autre vision du monde environnant. Je lui suis humblement reconnaissant pour la confiance qu'il m'a accordée depuis le début malgré l'éloignement des sites, ce qui nous a souvent contraint à des réunions très tardives, mais toujours constructives malgré les diverses difficultés rencontrées.

Je remercie le CEB et ses directeurs successifs : en premier lieu l'Ingénieur Général de l'Armement Norbert Fargère, pour m'avoir permis de m'engager dans un processus de qualification doctorale en assurant une fonction d'expert sous un statut militaire au CEB dans des conditions matérielles exceptionnelles ; enfin Monsieur Christophe Pezron, actuel directeur. Je tiens également à remercier l'Administration du CEB et de la DGA pour avoir facilité l'achat de matériels scientifiques et m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès ; ainsi que le Service de Programme Nucléaire et de Missiles pour avoir accepté de lancer le marché relatif au Démonstrateur Opérationnel LIBS, validé au cours de cette étude.

J'adresse ma grande reconnaissance à Messieurs les Professeurs Michel Vardelle (Sciences des Procédés Céramiques et de Traitements de Surfaces de la Faculté des Sciences et Techniques de Limoges) et Jean Aubert (Institut d'Electronique Fondamentale de l'Université Paris 11). Ils ont accepté d'être membres et rapporteurs du jury malgré leur emploi du temps chargé en cette période. De la même manière, je remercie Messieurs le professeur Francis Berenbaum du service de rhumatologie du CHU Saint-Antoine, Michel Desgranges, directeur adjoint au CEB, Philippe Adam, expert en détection physique au CEB, Patrick Mauchien du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) et Göran Oloffson du centre militaire suédois expert en détection chimique et biologique (FOI-Swedish Defence Research Agency). Ils ont bien voulu examiner ce travail en dépit des contraintes horaires et géographiques.

Je tiens à exprimer mon respect le plus sincère à Monsieur Philippe Adam pour son accueil au sein du laboratoire, ses conseils scientifiques toujours clairvoyants, sa disponibilité malgré ses activités, son humanité, les projets auxquels il a grandement contribué comme le démonstrateur. Je n'oublie pas nos discussions souvent tard le soir sur de nombreux domaines dépassant le cadre de l'aventure menée au CEB.

Je remercie mes collègues – anciens et actuels - du Département de Détection Physique du CEB pour leur soutien, leur disponibilité, et la bonne ambiance générale durant cette période chère de ma vie, et plus particulièrement Céline Caron et sa gentillesse, Jean-Pierre Chiaroni et son dynamisme, le sous-lieutenant Geoffrey Fath, Thierry Tasse depuis ses Landes, Christophe Guerin mon ancien voisin. J'associe mes pensées à Michel Baudet, Claude Ponge, Céline Bernon, aux anciens thésards (Stéphane Morel, Laurens Dudragne et Henri Lancelin) ainsi qu'à tous les personnels temporaires et permanents du CEB. J'insiste tout particulièrement pour l'Ingénieur de l'Armement (oui Monsieur !) Bertrand Sapolin pour les moments passés dans et hors du CEB et l'avènement d'une grande amitié et du plus sincère respect pour ce que tu es.

Pour finir, je salue tous les occupants de la Salle Damiot et du « Red Cross » - Volontaires Aspirants (Samina, Sébastien, JC, Yannick, Stéphanie, Dom, Virginie, Geoffrey, Amélie, Adeline, Rudy, Mickael, Natacha, etc....), gendarmes et stagiaires (Gregory D'Arthur !) pour les moments inoubliables de vie en communauté qui ont contribué à me faire avancer durant ces dernières années. Je n'oublie pas mes amis et connaissances du côté « obscur » de la fac : Anthony et Marc pour les instants toujours agréables en ou hors de la France (!), Audrey (Si !) et les anciens des promos du DEA de Chimie Appliquée et Génie des Procédés Industriels.

Finalmente (questa volta é vero !), voglio ringraziare la mia famiglia in Francia (papa, mama, Ida, Claudia, Enzo, David, Michael, nonni, zii e cugini) e quella lontana a San Giovanni Rotondo (Puglia, Italia !) Grazie per sostenermi. Per sempre sarrebe nel mio cuore ed io sarro orgoglioso di vuoi !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	17
I. DEVELOPPEMENTS DE L'ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE DE PLASMA INDUIT PAR LASER	21
I.1. PREAMBULE.....	21
I.2. PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE DE PLASMA INDUIT PAR LASER.....	22
I.2.1. Principe général.....	22
I.2.2. Spécificités analytiques de la technique LIBS.....	23
I.2.3. Les différents types d'interactions laser et matière.....	25
I.3. FORMATION D'UN PLASMA EN MILIEU GAZEUX.....	26
I.3.1. Caractéristiques et mécanisme de claquage diélectrique d'un gaz avec formation d'un plasma.....	26
I.3.2. Initiation d'un plasma : apparition des premiers électrons libres.....	27
I.3.2.1.1. L'ionisation multiphotonique.....	28
I.3.2.1.2. L'effet thermoionique.....	28
I.3.2.1.3. L'effet tunnel.....	29
I.3.2.1.4. Conclusions sur le choix du type de lasers.....	29
I.3.3. Croissance du plasma.....	29
I.3.4. Paramètres influant sur la formation et l'analyse spectroscopique du plasma.....	30
I.3.4.1. Influence de la pression.....	30
I.3.4.2. Rôles de l'énergie et longueur d'onde du pulse laser.....	30
I.3.4.3. Incidences de la durée de pulse et du diamètre du faisceau laser.....	31
I.3.4.4. Présence de microparticules.....	32
I.4. ABLATION LASER D'UNE SURFACE PAR FORMATION D'UN PLASMA.....	32
I.4.1. Phénoménologie de l'interaction laser-matière dense.....	32
I.4.2. Rôle des paramètres optiques contrôlant l'ablation laser.....	34
I.4.2.1. La longueur d'onde laser.....	34
I.4.2.2. L'énergie du pulse laser.....	35
I.4.2.3. Gains analytiques par pulses multiples : cas de la LIBS double pulse.....	35
I.4.2.4. Durée du pulse : régimes LIBS picoseconde, nanoseconde et femtoseconde.....	36
I.4.2.5. Conclusion sur les paramètres laser pour ablater une surface.....	38
I.5. DIAGNOSTIC DES PLASMAS PAR SPECTROSCOPIE D'EMISSION ATOMIQUE.....	38
I.5.1. Relaxation du plasma : résolution temporelle nécessaire des raies d'émission.....	38
I.5.2. Spectrométrie d'émission atomique : résolution spectrale qualitative des raies caractérisant la matière excitée par plasma.....	40
I.5.3. Exploitation quantitative des intensités des raies d'émission.....	41
I.5.3.1. Bases de données bibliographiques.....	41
I.5.3.2. Méthodes d'obtention des limites de sensibilité.....	42
I.5.4. Détermination de la température électronique du plasma.....	42
I.6. CONTROLE DU VOLUME ECHANTILLONNE PAR LE PLASMA : ROLES DES PARAMETRES CONTROLANT LA DENSITE DE PUISSANCE DES PLASMAS.....	44
I.6.1. Calcul de la densité d'énergie au point focal.....	44

I.6.1.1.	Influence de la défocalisation du laser sur une surface	45
I.6.1.2.	Calcul du rayon du faisceau laser au foyer de la lentille	46
I.6.1.3.	Densité d'énergie dans le cas d'un faisceau laser focalisé dans l'air.....	47
I.6.1.4.	Densité d'énergie de choc dans le cas d'un faisceau laser focalisé sur une surface	49
I.6.2.	<i>Formation du cratère</i>	51
I.6.2.1.	Influence de la longueur d'onde.....	51
I.6.2.2.	Influence de l'énergie.....	51
I.6.3.	<i>Influence de la FTSD sur le diamètre d'impact</i>	53
I.6.4.	<i>Conclusion : la LIBS comme méthodologie analytique calibrée</i>	54
I.7.	CAS PARTICULIER DE LA PRESENCE DE PARTICULES DANS UN GAZ : AEROSOL, NANOMATERIAUX, CLUSTERS DE CONDENSATION	54
I.7.1.	<i>LIBS et aérosols</i>	54
I.7.2.	<i>Spécificité de l'échantillonnage de particules par un plasma</i>	55
I.7.3.	<i>Modèle de dissociation de particules dans un plasma induit par laser ns</i>	59
I.7.4.	<i>Paramètres influents de l'interaction laser/particule</i>	59
I.7.4.1.	Seuil de claquage	59
I.7.4.2.	Efficacité d'ionisation.....	60
I.7.5.	<i>Cas particulier des aérosols aqueux</i>	61
I.8.	CONCLUSIONS.....	61
II.	CARACTERISTIQUES DES UNITES D'ANALYSES LIBS REALISEES	63
II.1.	CARACTERISTIQUES DE BASES D'UNE CHAINE DE MESURE PAR LIBS	63
II.2.	VUES D'ENSEMBLE DES APPAREILLAGES COMPOSANT LA CHAINE LIBS DU LABORATOIRE	64
II.3.	PROCEDE D'ELABORATION DU PLASMA	65
II.3.1.	<i>Lasers Nd :YAG</i>	65
II.3.1.1.	Le laser Quantel Brillant	65
II.3.1.2.	Le laser Quantel Big Sky CFR200.....	66
II.3.1.3.	Caractéristiques des lasers Nd :YAG	66
II.3.1.4.	Système optique (miroir et lentille).....	67
II.3.2.	<i>Système d'analyse de surface</i>	67
II.3.3.	<i>Cellule d'analyse de gaz et d'aérosols</i>	68
II.3.4.	<i>Système de détection</i>	69
II.3.4.1.	Fibre optique	70
II.3.4.2.	Systèmes dispersifs	72
II.3.4.2.1.	Monochromateur et détecteur iCCD associée pour obtenir des spectrogrammes résolus de largeur réduite	72
II.3.4.2.2.	Spectromètre à réseau Echelle couplé à un détecteur iCCD : compromis pour obtenir des spectrogrammes résolus à large bande spectrale	74
II.3.5.	<i>Traitement des données</i>	76
II.3.5.1.	Informations qualitatives : identifications des raies d'émission.....	76
II.3.5.1.1.	Raies élémentaires.....	76
II.3.5.1.2.	Raies moléculaires	79
II.3.5.2.	Intensité d'une raie d'émission atomique.....	79
II.3.5.3.	Calcul du rapport signal sur bruit.....	80

II.3.5.4.	Informations quantitatives : identifications des raies d'émission	80
II.3.5.4.1.	Définition de la concentration limite (C_L) ou limite de détection.....	80
II.3.5.4.2.	Limites de détection en milieu gazeux	80
II.3.5.4.3.	Estimation de la stoechiométrie des molécules gazeuses	81
II.3.5.5.	Choix de la procédure utilisée pour l'étalonnage sur surface	82
II.3.5.6.	Approches multivariées.....	84
II.4.	CONCLUSIONS.....	85
III.	METHODOLOGIE DE LA CHAINE DE MESURE D'UN AEROSOL AQUEUX	
	MULTIELEMENTAIRE	87
III.1.	OBJECTIFS POUR LA DETECTION DES AEROSOLS	87
III.2.	NOTIONS D'AEROSOLOGIE	88
III.2.1.	<i>Définition d'un aérosol.....</i>	88
III.2.2.	<i>Bruit de fond atmosphérique et contamination particulaire.....</i>	89
III.2.2.1.	Composition et caractéristiques générales	89
III.2.2.2.	Aspects toxicologiques	89
III.3.	OBTENTION DE L'INFORMATION GRANULOMETRIQUE.....	90
III.3.1.	<i>Les dimensions statistiques des aérosols.....</i>	90
III.3.2.	<i>Établissement d'une granulométrie.....</i>	91
III.3.3.	<i>Obtention des distributions des tailles aérodynamiques par granulomètre APS.....</i>	92
III.3.3.1.	Principe	93
III.3.3.2.	Informations disponibles.....	93
III.4.	ADEQUATION DE LA SENSIBILITE ELEMENTAIRE DE LA LIBS DANS LE CAS DES AEROSOLS AQUEUX ..	94
III.4.1.	<i>Approche empirique de la quantité minimale de matière échantillonnable</i>	94
III.4.2.	<i>Quantité d'atomes détectable dans le volume d'un plasma induit par laser.....</i>	95
III.4.3.	<i>Couplage et imagerie de l'interaction d'un plasma et de particule</i>	98
III.4.4.	<i>Choix de modèles particuliers multi élémentaires.....</i>	99
III.4.5.	<i>Génération de courants linéaires de microgouttelettes par orifice vibrant.....</i>	100
III.4.5.1.	Principe	100
III.4.5.2.	Choix de solutions multiélémentaires étalonnées.....	102
III.4.5.3.	Couplage de la LIBS avec les courants linéaires de microgouttelettes séparées	103
III.4.5.4.	Paramètres LIBS et protocole des mesures	106
III.4.5.5.	Balayage et sélection de zones spectrales	107
III.4.5.5.1.	Détection du magnésium sur la région 246-286 nm	107
III.4.5.5.2.	Détection du calcium sur la région 385-425 nm.....	108
III.4.5.5.3.	Détection du sodium sur la région 570-610 nm.....	108
III.4.5.6.	Etablissement d'une courbe d'étalonnage pour le calcium	109
III.4.5.7.	Etablissement d'une courbe d'étalonnage pour le magnésium.....	110
III.4.5.8.	Etablissement d'une courbe d'étalonnage pour le sodium	111
III.4.5.9.	Bilan des limites de détection pour le calcium, le magnésium et le calcium.....	112
III.5.	METHODOLOGIE DE TRAITEMENTS STATISTIQUES DES DONNEES SPECTRALES	112
III.5.1.	<i>Bases pour la classification d'un ensemble d'échantillons.....</i>	112
III.5.2.	<i>Classification d'aérosols aqueux par analyse en composantes principales (ACP).....</i>	113
III.5.2.1.	Principe de l'Analyse en Composantes Principale des données spectrales	113

III.5.2.2.	Expériences LIBS et protocole de traitements des données spectrales obtenues.....	114
III.5.2.3.	Résultats et discussions.....	115
III.6.	PROBLEMATIQUES DE L'ECHANTILLONNAGE DIRECT DES AEROSOLS PAR LIBS	119
III.6.1.	<i>Analyse directe des particules au vol</i>	119
III.6.2.	<i>Modèle probabiliste d'interactions plasma/particule(s)</i>	120
III.6.3.	<i>Approches expérimentales de l'interaction statistique plasma-particule(s)</i>	121
III.6.3.1.	Influence de la concentration des particules.....	121
III.6.3.2.	Résultats et discussions.....	122
III.6.3.2.1.	Spectres et raies d'émission détectées	122
III.6.3.2.2.	Critères spectraux sélectifs témoignant d'une interaction plasma-particule(s).....	123
III.6.3.2.3.	Validation du modèle probabiliste d'interactions et détermination du volume d'analyse et d'observation du plasma.....	127
III.6.3.2.4.	Quantités de particules interagissant avec chaque plasma.....	127
III.6.3.2.5.	Perspectives d'amélioration : déclenchement du tir laser sur la particule	129
III.6.4.	<i>Prélèvement et concentration d'aérosols par filtration</i>	129
III.7.	CONCLUSIONS.....	130
IV.	ANALYSE LIBS DE MILIEUX HETEROGENES : APPLICATIONS A LA DETECTION BACTERIENNE	131
IV.1.	MOTIVATIONS ET OBJECTIFS POUR LA DETECTION BACTERIENNE	131
IV.2.	LE MONDE BACTERIOLOGIQUE.....	131
IV.2.1.	<i>Définition des bactéries</i>	131
IV.2.2.	<i>Structures et morphologies des bactéries</i>	133
IV.2.2.1.	Le contenu cytoplasmique.....	133
IV.2.2.2.	La membrane cytoplasmique	134
IV.2.2.3.	Les différents types de parois bactériennes	135
IV.2.2.4.	Les enveloppes optionnelles et remarquables : cas de la spore bactérienne	137
IV.2.3.	<i>Compositions élémentaires et moléculaires des bactéries</i>	138
IV.2.4.	<i>Stratégies envisagées pour l'analyse d'un système doublement hétérogène</i>	140
IV.3.	BILAN MATIERE D'UNE BACTERIE ET FAISABILITE DE SON ANALYSE PAR LIBS	141
IV.3.1.	<i>Choix d'un modèle géométrique</i>	141
IV.3.2.	<i>Composition élémentaire du modèle</i>	141
IV.3.3.	<i>Comparaison teneurs élémentaires d'une bactérie et limites de détection de la LIBS</i>	142
IV.4.	MISE AU POINT DE L'ANALYSE LIBS SUR DES MATERIAUX BACTERIENS	147
IV.4.1.	<i>Stratégie de développement d'une analyse LIBS représentative et adaptée aux bactéries</i>	147
IV.4.2.	<i>Recherche de marqueurs élémentaires de matériaux biologiques</i>	147
IV.4.2.1.	Approches bibliographiques d'analyses par LIBS de matériaux biologiques sous forme massive ...	147
IV.4.2.2.	Approches bibliographiques d'analyses par LIBS d'aérosols bactériens	149
IV.4.3.	<i>Validation des choix d'identification d'agents biologiques sur bactéries et pollens compressés : ouverture du flacon bactérien et analyse des vacuoles</i>	150
IV.4.3.1.	Listes des modèles bactériens choisis	150
IV.4.3.2.	Bactéries lyophilisées et compressées sous forme de pastilles homogènes.....	151
IV.4.4.	<i>Mise au point de l'analyse LIBS de bactéries : ouverture du flacon bactérien</i>	152

IV.4.4.1.	Conditions d'acquisition	152
IV.4.4.2.	Balayage spectral	152
IV.4.4.3.	Détection de marqueurs spectraux de natures minérale et organique.....	157
IV.4.4.4.	Corrélation entre les éléments minéraux détectés et les structures bactériennes	157
IV.4.4.5.	Corrélation entre les éléments organiques détectés et les structures bactériennes.....	158
IV.4.4.6.	Corrélation entre les fragments moléculaires CN détectés et les structures bactériennes.....	158
IV.4.4.6.1.	Résumés de résultats obtenus sur l'exploitation des raies CN.....	159
IV.4.4.6.2.	Vérification expérimentale de l'origine des raies CN en régime LIBS nanoseconde.....	159
IV.4.4.6.3.	Rôle des liaisons CC simples et doubles – rôle des liaisons intramoléculaires C-N	160
IV.4.4.6.4.	Perspectives du régime LIBS femtoseconde pour caractériser les CN intramoléculaires	161
IV.4.5.	<i>Choix et justification d'une observable spectrale reproductible</i>	<i>162</i>
IV.4.5.1.	Utilisation d'une somme de rapports d'intensités de raies	162
IV.4.5.2.	Justification de la reproductibilité de l'observable choisie en terme d'indicateur thermique.....	163
IV.4.5.3.	Vérification de l'ouverture du flacon bactérien et de l'analyse des vacuoles.....	165
IV.4.6.	<i>Validation de l'observable pour discriminer les échantillons bactériens</i>	<i>166</i>
IV.4.7.	<i>Influence de la nature milieu nutritif sur le choix de l'observable.....</i>	<i>168</i>
IV.4.8.	<i>Sélectivité de l'observable.....</i>	<i>169</i>
IV.4.9.	<i>Limites du critère choisi et perspectives d'améliorations proposées</i>	<i>170</i>
IV.4.9.1.	Utilisation d'un second observable avec un RIC basé sur K/C	170
IV.4.9.2.	Ebauche d'un traitement des données multivariées.....	172
IV.4.10.	<i>Discrimination par analyse multivariée des données spectrales.....</i>	<i>172</i>
IV.4.10.1.	Motivations d'emplois de méthodes de traitements statistiques des données spectrales.....	172
IV.4.10.2.	Applications à la classification des pastilles bactériennes par analyse en composantes principales .	173
IV.4.10.2.1.	Préparation des données.....	173
IV.4.10.2.2.	Représentation des spectres dans l'espace des composantes principales	174
IV.4.11.	<i>Conclusions sur la recherche de marqueurs spectraux et discriminants d'échantillons biologiques</i>	<i>175</i>
IV.5.	ANALYSES DE CULTURES BACTERIENNES SUR GELOSE	176
IV.5.1.	<i>Préambule</i>	<i>176</i>
IV.5.2.	<i>Culture hétérogènes de bactéries sur gélose nutritive.....</i>	<i>176</i>
IV.5.3.	<i>Cultures bactériennes en couche homogène.....</i>	<i>178</i>
IV.5.4.	<i>Caractérisations des nappes bactériennes homogènes.....</i>	<i>179</i>
IV.5.5.	<i>Spectrogrammes Echelle du système diphasique couche de Bacillus atropheus sur gélose... 180</i>	<i>180</i>
IV.5.6.	<i>Contrôle de l'ablation et distinction de la couche bactérienne sur la gélose.....</i>	<i>181</i>
IV.5.6.1.	Analyses sélectives LIBS du système diphasique couche bactérienne-gélose	182
IV.5.6.2.	Influence du paramètre FTSD sur la profondeur ablatée pour le système diphasique couche bactérienne-gélose	183
IV.5.6.3.	Choix du paramètre FTSD pour une ablation sélective de la couche bactérienne.....	184
IV.5.6.4.	Caractéristiques du profil d'ablation.....	185
IV.5.7.	<i>Spectrogrammes réduits du système diphasique couche de Bacillus atropheus sur gélose ... 186</i>	<i>186</i>
IV.5.7.1.	Spectrogramme couvrant la région 383 à 423 nm.....	186
IV.5.7.2.	Spectrogramme couvrant la région 762 à 772 nm.....	187
IV.5.7.3.	Spectre à bande réduite (246 à 286 nm) de la couche de <i>Bacillus atropheus</i> sur gélose TSA.....	188
IV.5.7.4.	Bilans sur les compositions de la nappe de <i>Bacillus atropheus</i> et de la gélose TSA.....	189

IV.5.8.	<i>Quantification du nombre de bactéries analysées par chaque plasma.....</i>	190
IV.5.8.1.	Approche géométrique.....	190
IV.5.8.2.	Approche spectroscopique.....	194
IV.5.8.3.	Applications : sensibilité en phosphore provenant du <i>Bacillus atropheus</i> sur gélose.....	195
IV.5.9.	<i>Classification de différentes couches bactériennes par analyse en composantes principales</i>	196
IV.5.9.1.	Paramètres LIBS et préparations des données.....	196
IV.5.9.2.	Représentations des spectres réduits à 15 observables sur les 3èes composantes principales.....	197
IV.5.10.	<i>Conclusions sur les cultures bactériennes sur gélose.....</i>	198
IV.6.	ANALYSES DE FLUX D'AEROSOLS BACTERIOLOGIQUES.....	198
IV.6.1.	<i>Objectifs.....</i>	198
IV.6.2.	<i>Préparation des échantillons.....</i>	199
IV.6.3.	<i>Paramètres d'acquisition.....</i>	201
IV.6.4.	<i>Spectrogrammes large bande spectrale.....</i>	201
IV.6.5.	<i>Liste des marqueurs détectés.....</i>	202
IV.6.6.	<i>Discussion.....</i>	203
IV.6.6.1.	Absence de raies du phosphore.....	203
IV.6.6.2.	Conclusion sur le faible nombre de raies détectées sur l'analyse LIBS d'aérosols bactériens.....	203
IV.6.7.	<i>Applications des méthodes de classifications par méthode statistiques.....</i>	204
IV.6.7.1.	Introduction.....	204
IV.6.7.2.	Analyse en composantes principales des données analytiques LIBS.....	204
IV.6.7.2.1.	Préparation des données sous forme matricielle.....	204
IV.6.7.2.2.	Résultats de l'analyse en composantes principales.....	205
IV.6.7.3.	Bases d'une classification par ACP pour une détection d'alerte d'échantillons.....	206
IV.7.	CONCLUSIONS.....	207
V.	CAHIER DES CHARGES POUR UN DEMONSTRATEUR LIBS TRANSPORTABLE.....	209
V.1.	APPORTS DE LA METHODOLOGIE LIBS.....	209
V.2.	MOTIVATIONS POUR LE DEVELOPPEMENT D'UN DETECTEUR LIBS DE TERRAIN.....	209
V.3.	CAHIERS DES CHARGES FONCTIONNELLES POUR UN DETECTEUR D'ALERTE ET DE CONTROLE DE CONTAMINATIONS BIOLOGIQUE ET CHIMIQUE.....	210
V.4.	DEVELOPPEMENT DU DEMONSTRATEUR OPERATIONNEL LIBS.....	211
V.4.1.	<i>Les développements de démonstrateurs LIBS : revue bibliographique.....</i>	211
V.4.1.1.	Détecteurs LIBS portables.....	211
V.4.1.2.	Détecteurs LIBS transportables.....	213
V.4.2.	<i>Cahier des charges recherchées pour un démonstrateur opérationnel LIBS.....</i>	214
V.4.3.	<i>Caractéristiques de la chaîne de mesure LIBS développée.....</i>	215
V.4.3.1.	Description du concept.....	215
V.4.3.2.	Système optique.....	217
V.4.3.3.	Le spectromètre.....	218
V.4.3.4.	Le système de prélèvement sélectif des particules ambiantes.....	219
V.4.3.5.	Présentation des fonctions du démonstrateur opérationnel sur le terrain.....	221
V.5.	VALIDATION DU DEMONSTRATEUR SUR CIBLES BACTERIENNES.....	222
V.5.1.	<i>Applications à la détection de menaces bactériennes.....</i>	222

V.5.2.	<i>Analyses par LIBS de cultures bactériennes après prélèvement sur gélose</i>	223
V.5.3.	<i>Protocole Expérimental d'analyses LIBS de géloses bactériennes</i>	224
V.5.3.1.	Protocoles de cultures des boîtes de Pétri	224
V.5.3.1.1.	Choix des espèces bactériennes.....	224
V.5.3.1.2.	Conditions de cultures des bactéries sur géloses	225
V.5.3.1.3.	Paramètres de culture prises en compte pour les analyses LIBS	226
V.5.3.2.	Porte échantillon	226
V.5.3.3.	Paramètres d'acquisition LIBS	227
V.5.3.4.	Spectrogrammes Echelle d'analyse LIBS de nappes homogènes de <i>Bacillus flexus</i>	227
V.5.3.5.	Traitement des données spectrales	229
V.5.4.	<i>Classification d'échantillons par traitement statistique des données multivariées obtenues par LIBS</i>	229
V.5.4.1.	Différenciation de plusieurs espèces bactériennes et influence du temps d'analyse LIBS après 24 heures de croissance	229
V.5.4.2.	Influence du vieillissement des bactéries (24h, 48h et 72h) sur leur classification par analyse en composantes principales.....	231
V.5.4.3.	Influence du milieu de culture.....	233
V.5.5.	<i>Conclusions sur l'analyse de géloses bactériennes hétérogènes</i>	234
V.6.	VALIDATION DU DEMONSTRATEUR SUR CIBLES CHIMIQUES	235
V.6.1.	<i>Expertises LIBS de surfaces peintes de types polyuréthane et glycérophthalique vierges ou contaminées par des molécules simulant la présence de toxiques</i>	235
V.6.2.	<i>Choix des paramètres LIBS</i>	235
V.6.3.	<i>Analyse de peintures vierges OTAN polyuréthane et Française glycérophthalique</i>	236
V.6.4.	<i>Détection de contaminations chimiques des peintures par molécules simulant des toxiques</i>	238
V.6.4.1.	Détection du marqueur phosphore sur peintures contaminées par TEP	238
V.6.4.2.	Détection du marqueur soufre sur peintures contaminées par DMSO.....	239
V.6.5.	<i>Classification des contaminations de surfaces par analyse multivariée des données spectrales (ACP)</i>	240
V.6.5.1.	Classification de peintures contaminées par des agents chimiques	241
V.6.5.2.	Classification de peintures contaminées par des agents biologiques modèles et des interférents.....	243
V.6.5.2.1.	Choix d'échantillons biologiques et minéraux déposés sur les peintures	243
V.6.5.2.2.	Analyses LIBS de peintures contaminées par des dépôts biologiques ou minéraux.....	244
V.6.5.2.3.	Analyse en composantes principales pour classifier des dépôts biologiques ou minéraux contaminant des peintures	246
V.6.6.	<i>Conclusion sur la classification de contaminations de surfaces peintes</i>	247
V.7.	APPLICATIONS A L'ANALYSE DE PARTICULES SUSPENDUES	247
V.7.1.	<i>Préambule</i>	247
V.7.2.	<i>Liste des échantillons particuliers</i>	247
V.7.3.	<i>Paramètres LIBS</i>	249
V.7.4.	<i>Résultats et Discussion</i>	249
V.7.5.	<i>Classification par analyse multivariée en composantes principales</i>	250
V.8.	CONCLUSIONS SUR L'APPORT DU DEMONSTRATEUR LIBS.....	250
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	253

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	259
LISTE DES TABLEAUX	273
ANNEXE I – ELEMENTS MATHEMATIQUES ET INFORMATIQUES DE TRAITEMENTS MULTIVARIÉS DES DONNÉES : ANALYSES EN COMPOSANTES PRINCIPALES.....	277
ANNEXE II – COUPLAGE DE LA LIBS AU SUIVI D’UN PROCÉDE DE PURIFICATION DU SILICIUM DE QUALITE PHOTOVOLTAÏQUE	281
ANNEXE III – ANALYSES PAR LIBS DE TISSUS ORGANIQUES POUR DIAGNOSTICS BIOMEDICAUX.....	287
ANNEXE IV – ANALYSE PAR LIBS DES ELEMENTS METALLIQUES DES SUIES DIESEL COLLECTÉES SUR FILTRES.....	295
ANNEXE V – METHODES DE CALCUL POUR ESTIMER LA TEMPERATURE ELECTRONIQUE DU PLASMA	299
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	303

INTRODUCTION

Le choix d'une méthode d'analyse *in situ* et sans prélèvement autre que par processus physiques (procédé optique par exemple) représente un champ d'investigations pour de multiples applications dans des domaines civils et militaires : détection rapide sur le terrain de contaminations à l'état de traces, analyse à distance d'effluents dans l'atmosphère, contrôle en ligne de la qualité d'un procédé de fabrication, classification fiable d'échantillons inconnus (surfaces solides, liquides, etc.), etc. La présente étude a pour finalité la détection de risques militaires, en particulier ceux liés à la présence d'agents bactériologiques. Pour aborder un tel travail, le choix d'une méthodologie crédible par sa reproductibilité et sa sensibilité - et sur laquelle le travail sera basé - est primordiale.

Le développement d'une chaîne d'analyse est établi sur une technique innovante telle que la spectroscopie de plasma induit par laser (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy ou LIBS). Cela permet de considérer le couplage entre, d'une part, un plasma issu de l'interaction entre un faisceau laser pulsé et la matière à analyser ; et d'autre part la spectrométrie d'émission. La résolution de l'intensité des radiations lumineuses du plasma définit à la fois les propriétés thermiques et le volume d'échantillonnage liés à ce plasma. Ces deux paramètres représentent une base pour diagnostiquer :

1. **la nature des espèces présentes dans le plasma** grâce aux raies caractéristiques émises aussi bien par des éléments électrophiles à potentiels d'ionisation élevés (phosphore P, soufre S ou des halogènes tels que fluor F ou chlore Cl) que par des éléments à fort pouvoir émissif (cas des alcalins ou des alcalinoterreux).
2. **les teneurs quantitatives des composants élémentaires de la matière analysée.** Les résolutions spatiale, spectrale et temporelle du volume émissif du plasma sont respectivement et successivement assurées par : une fibre optique collectant les radiations ; un spectromètre décomposant les différentes longueurs d'onde caractéristiques des espèces excitées présentes ; un détecteur de type CCD intensifiant et numérisant les intensités liées aux longueurs d'onde des espèces durant un laps de temps significatifs. Les spectrogrammes générés informatiquement sont alors exploités par rapport à des bases de données.

La technique LIBS apparaît comme la méthode la plus appropriée pour une réponse fiable (due à la robustesse énergétiques et aux qualités optiques des pulses laser utilisés), rapide (grâce aux pulses durant environ 5 ns) et étalonnée en densité de puissance et par conséquent

en quantité de matière analysée (emploi de flashes laser focalisés et d'énergie reproductible de 80 à 150 mJ). Ces qualités permettent de définir un volume d'échantillonnage suffisamment reproductible, intense énergétiquement, et d'une durée de vie de l'ordre de 10 μ s.

La chaîne de mesure LIBS développée - et évoluant avec les dernières technologies - a déjà fait l'objet de nombreuses études et de plusieurs thèses en particulier. Le présent travail a pour objectif de la calibrer sur des bactéries dont on peut dire au premier degré qu'elles sont similaires à des gouttelettes micrométriques d'aérosols dont les volumes sont de quelques μm^3 et dont les compositions chimiques comprennent quelques parties par million (ppm) d'éléments tels que calcium, magnésium, phosphore, etc. Pour aboutir à l'analyse des bactéries, la première phase consiste à travailler avec des aérosols aqueux étalonnés en composition car ils sont constitués par des eaux minérales connues pour leurs teneurs élémentaires parfaitement reproductibles. Cette étape initiale a pour dessein la mise au point d'un protocole d'analyse permettant de quantifier les doses minimales observables et qualifiables.

Dans une deuxième partie du travail, un traitement statistique multivarié (analyse en composantes principales ou ACP) des données spectrales multiélémentaires issues des analyses LIBS des particules d'aérosols est développé pour valider l'aptitude de la technique LIBS à distinguer différents types d'échantillons particuliers. Cet étalonnage ouvre le champ de l'analyse des aérosols au sens général.

Les aspects de la détection directe par LIBS des particules au vol seront également abordés en terme de statistiques et de sensibilité.

Dans la suite de l'étude, une recherche est entreprise pour définir les identifiants spécifiques des bactéries et appréhender leur détectabilité par la technique LIBS. Les bactéries sont ensuite étudiées et analysées par LIBS sous leurs diverses formes naturelles : spores lyophilisées similaires à une poudre compressée, culture de bactéries à l'état végétatif, suspensions de bactéries isolées.

La première démarche consiste à remonter à la signature élémentaire, voire moléculaire, la plus précise et intrinsèque des matériaux bactériens qui sont des microorganismes vivants présentant une activité métabolique illustrée par exemple avec l'adénosine triphosphate (ATP). Un rapport reproductible de raies élémentaires telles que P/C est sélectionné dans le cadre de spores lyophilisées : le phosphore P apparaît comme un identifiant du rôle clé et intrinsèque du métabolisme bactérien.

L'étape suivante nous conduit à identifier les bactéries sous forme végétative par rapport à leur gélose nutritive sur laquelle elles se développent. Le but est d'observer comment la bactérie peut être affectée par la gélose. Dès lors que les bactéries sont échantillonnées par le plasma, le traitement statistique précédemment développé constitue un outil pour distinguer et classer différentes bactéries.

Cette troisième étape évalue alors la crédibilité de la méthode développée, et cela, tant par la recherche d'identifiants spectraux discriminants, que par la validité de la génération des aérosols modèles. Nous mettons ainsi en évidence la présence de bactéries que nous distinguerons par rapport à leur gélose et à des leurres.

La dernière étape du travail consiste à définir le nombre de bactéries nécessaires pour permettre l'obtention d'un seuil d'alerte compatible avec l'exigence de la sécurité civile et militaire. Dans cet esprit, un détecteur LIBS transportable est développé pour constituer un outil d'alerte autonome, utilisable sur le terrain et de manière versatile pour détecter tout type d'échantillon à risque (surfaces contaminées ou inconnues, ambiances toxiques, etc.). Des analyses sont ainsi effectuées sur des bactéries cultivées sur boîte de Pétri et analysées en ligne par l'intermédiaire de l'outil mobile. De même, l'appareillage LIBS est validé sur des surfaces peintes contaminées par des agents chimiques modèles, des bactéries et des leurres.

Ce dernier point ouvre un champ applicatif très important car, outre le secteur militaire lié aux risques chimiques et biologiques, nous transposons le système LIBS dans des domaines aussi multiples et variés que ceux du secteur biomédical, industriel et environnemental.

I. DEVELOPPEMENTS DE L'ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE DE PLASMA INDUIT PAR LASER

I.1. PREAMBULE

La spectroscopie de plasma induit par laser (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, ou par acronyme, LIBS) est basée sur l'information émise lors de l'interaction laser-matière. Ce phénomène a été observé dans les années 60 peu de temps après l'invention du laser. Lorsqu'une quantité de matière (surface ou gaz) reçoit une densité d'énergie telle que l'on obtient par absorption de l'onde électromagnétique la rupture des atomes et des molécules avec formation d'ions et d'électrons ; ce que l'on appelle « claquage » ; au point focal de quelques centimètres à plusieurs dizaines de mètres, il y a alors formation d'un micro plasma de haute énergie.

A la fin des années 1970 et au début des années 1980, les évolutions technologiques font apparaître des lasers robustes à pulses reproductibles, ainsi que des détecteurs sensibles et intensifiés pour la détection spectrométrique hautement sensible. La caractérisation des plasmas induits par laser prend dès lors un essor : l'exploitation des informations qualitatives et quantitatives issues de l'ellipsoïde de courte durée (10 μ s environ) ouvre la voie à une technique analytique émergente.

La technique LIBS permet la génération d'un plasma induit par laser dans tous les milieux (gaz surface solide, surfaces liquides, etc.) ; elle correspond au transfert d'énergie qui qualifie le processus de dissociation, d'excitation et d'ionisation et le volume d'échantillonnage. Son évolution spatiale et temporelle constitue la difficulté du processus de l'analyse par spectrométrie d'émission. La compréhension des interactions laser-matière exige la conception d'un outil analytique qui assemble plusieurs sous-systèmes (laser, optiques, spectromètre, détecteur, algorithme de traitement des données spectrales). L'intérêt de cette technique réside dans la rapidité de l'information délivrée (quelques microsecondes), dans sa sensibilité et dans l'aptitude du dispositif à n'exiger aucun prélèvement manuel. Dans ce contexte, la détection des risques chimiques, bactériologiques, industriels ou militaires, imposent de considérer des « échantillons » non prélevés sous leur forme physique initiale (gaz, surface, liquide et aérosol). Dès lors, les différents états physiques cités et en particulier ceux qui se présentent sous la forme particulière : aérosols, spores bactériennes, clusters, nanopoudres - ainsi que leurs mélanges - sont susceptibles d'être étudiés.

L'état de l'art sur ce sujet a débuté dès 1992 avec les thèses effectuées au Centre d'Etudes du Bouchet (CEB), centre expert de la Délégation Générale pour l'Armement (DGA) pour les problèmes de détection, de protection de décontamination des risques nucléaires, biologiques et chimiques des personnels et équipements militaires nationaux. Nous disposons d'une réserve de connaissances, tant au niveau instrumental, banques de données, techniques analytiques et méthodes d'interprétation des résultats à partir des enregistrements spectroscopiques. Ainsi, le choix des lasers, des lentilles de focalisation, des fibres optiques, des réseaux spectroscopiques et d'informatique de suivi constitue la base de notre équipement. Cependant, notre but vise l'analyse de systèmes binaires (aérosols, spores bactériennes, nanoparticules, etc.). Il s'agit là d'une tâche complexe dans la mesure où notre objectif est tout à la fois de définir le volume d'échantillonnage du plasma, l'homogénéité des prélèvements, la sensibilité de la méthode, sa précision et sa répétitivité.

I.2. PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE DE PLASMA INDUIT PAR LASER

I.2.1. Principe général

Les thèses précédentes menées au CEB par H. Lancelin [1], L. Dudragne [2] et S. Morel [3] ont respectivement porté sur le développement de la spectroscopie de plasma induit par laser (LIBS) pour l'analyse de gaz, de surfaces inconnues et/ou contaminées par des molécules chimiques ou biologiques. Les mécanismes de formation du plasma induit par laser pulsé durant quelques ns ont été présentés de façon très détaillée. Dans la suite, leurs résultats fondamentaux sont résumés avec un rappel des principaux paramètres qui conditionnent l'interaction laser-cible. Nous précisons que le régime considéré dans ce rapport est de type monopulse durant chacun quelques nanosecondes.

Le principe général de la méthodologie LIBS consiste à focaliser un faisceau laser - succession de photons - de durée, de longueur d'onde et d'énergie connues sur la cible à analyser [4]. La densité d'énergie au point focal en fonction des propriétés physiques des milieux (absorbance, réflectance, densité d'état, potentiel d'ionisation, etc.) conduit aux processus d'absorbance de l'onde électromagnétique du pulse laser avec formation d'un plasma dense ayant une composition atomique représentative de la cible étudiée (gaz, liquide, solide, aérosols, etc.).

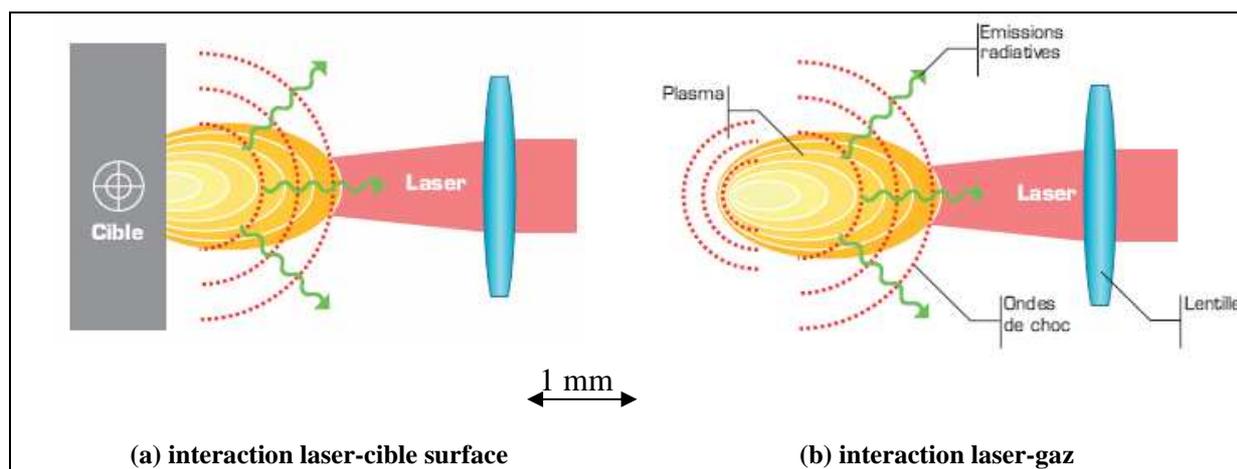


figure I-1 : Schémas de principe et effets d'interactions entre un faisceau laser pulsé et une cible (surfaces, gaz, liquide, aérosols)

Au point focal, la densité des ondes électromagnétiques provoque la fragmentation de la matière, c'est-à-dire, la formation d'un système atomes-ions-électrons. Pour un pulse laser de durée 5 nanosecondes (ou $5 \cdot 10^{-9}$ s), la densité d'énergie peut dépasser des valeurs de $10 \text{ MW} \cdot \text{cm}^{-2}$ et permet un échantillonnage de quelques microgrammes. Le plasma généré apparaît sous forme d'un volume ellipsoïdal de quelques mm^3 qui est associé à l'onde de choc causée par l'expansion violente du plasma. Dès lors, le volume plasma représente l'échantillon à analyser à partir des espèces excitées présentes dans la phase vapeur. Lors de la relaxation du plasma, les processus d'émissions photoniques caractérisent les désexcitations radiatives. Celles-ci sont caractéristiques de transitions électroniques intrinsèques de la structure atomique de la matière excitée. L'identification à la fois qualitative et quantitative est alors possible en considérant en particulier les rapports d'intensités de raies (analyse moléculaire, rôle des hétéroatomes, etc.).

L'analyse par LIBS repose sur l'échantillonnage produit dans la zone du point focal afin d'aboutir à l'analyse de gouttelettes d'aérosols de dimensions micrométriques ; ainsi qu'à celle de la détection plus spécifique des échantillons bactériens.

I.2.2. Spécificités analytiques de la technique LIBS

La densité d'énergie au point focal s'exprime dans notre cas par une forte température électronique laquelle conduit à une température des atomes et des ions comprise entre 15000 et 20000 K. Dans ces conditions, tous les atomes présents représentent les espèces moléculaires ou des structures minérales engagées dans l'ellipsoïde plasma. Leur analyse ne dépend dès lors que de l'identification des raies atomiques. Toutefois, l'avantage de la LIBS à ce niveau énergétique réside dans le fait que les espèces électrophiles difficiles à analyser par d'autres méthodes spectroscopiques (telles que les atomes de type halogène) présentent

comme tous les éléments les raies caractéristiques des états excités, c'est-à-dire en accord avec les banques de données. Dès lors, la composition par l'identification des rapports de raies constituent un des atouts spécifiques de la LIBS compte tenu de sa réponse linéaire dans une large plage de concentrations.

Les raies moléculaires seront généralement absentes fondamentalement, sauf pour des espèces comme CN traditionnelles de l'interaction entre l'azote atomique du plasma et les traces de carbone de la cible.

Les résultats de spectroscopie de plasma induit par laser présentent souvent des limites de détections élevées comparées à celles des autres méthodes. Néanmoins, elle possède de nombreux avantages qui en font une des rares techniques d'analyse in situ, quasi non destructive et en temps réel, applicable aux analyses en milieux hostiles :

1. **Plasma généré et observé par des moyens optiques**, ce qui évite toute pollution due à la présence d'électrode par exemple. Cela permet de déporter la mesure car aucun accès physique à l'échantillon n'est nécessaire : un accès optique vers l'échantillon suffit. Des mesures locales (quelques cm) et des mesures à distance (plusieurs mètres, voire dizaines et centaines de m) [5],
2. **Pas de préparation de l'échantillon**,
3. **Analyse rapide** : le temps d'analyse sur 1 tir est inférieur à la durée de vie du plasma soit quelques 10^{-6} s.
4. **Méthode multiphase** applicable au gaz, aux liquides déposés sur une surface, aux surfaces elles-mêmes par ablation laser suivi d'une formation de plasma au sein des vapeurs extraites et aussi aux aérosols.
5. **Analyse quasi non destructive** : le volume d'analyse est très petit, en milieu gazeux quelques dizaines de mm^3 , et sur surface le diamètre de l'impact varie de quelques dizaines à quelques centaines de μm , sur des épaisseurs de quelques μm voire inférieures selon la nature des matériaux.
6. **Obtention de hautes températures** ($T > 10000 \text{ K}$) permettant l'excitation et l'ionisation d'atomes très électronégatifs tels que le fluor et le chlore.

De plus, contrairement à la plupart des autres méthodes utilisant un plasma (ICP par exemple), aucun gaz plasmagène n'est nécessaire, ce qui évite de transporter le polluant, et limite les interférences spectrales aux seules raies de l'azote et de l'oxygène de l'air. [6] [7] [8]

I.2.3. Les différents types d'interactions laser et matière

L'analyse de systèmes binaires (air vecteur de matières particulaires ou surface polluée, effluents sous forme de nanoparticules d'unité industrielle, etc.) exige d'effectuer un « échantillonnage » homogène du système binaire, c'est-à-dire de valider l'absorbance du flux laser par la qualification et la quantification des raies spectrales émises par le mélange étudié. L'approche expérimentale du processus d'interaction laser-matière nous est apparue comme la mieux adaptée au problème posé (cf. figure I-2).

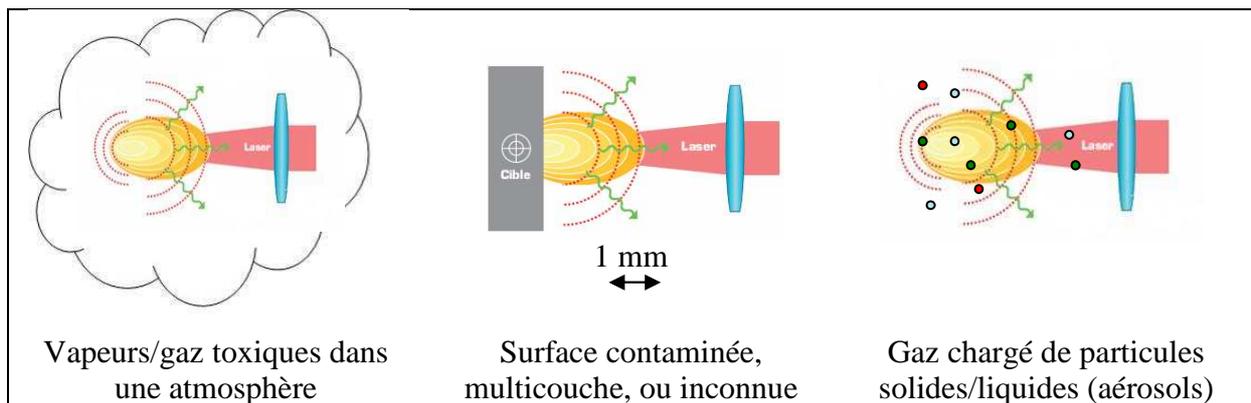


figure I-2 : Schémas de principe des différentes interactions possibles entre un pulse laser focalisé et la phase physique d'un échantillon

Les familles d'interactions laser-matière étudiées peuvent être classées de la façon suivante :

- **Interaction entre faisceau laser et atmosphère** (exemple : air ambiant pollué par une molécule chimique sous forme vapeur dans des conditions données de température et de pression). Dans ce cas la matrice est symbolisée par un gaz ou un mélange de gaz. Le plasma est formé au sein du système avec un volume de quelques mm^3 , soit un volume échantillonné de 0,1 à 0,2 mm^3 .
- **Interaction entre faisceau laser et milieu à haute densité d'états (solide, liquide, etc.)**. Le processus d'interaction laser-matière conduit à un « prélèvement » d'un volume de matière de quelques μm^3 . On peut valider les dimensions du volume de matière analysée à partir de matériaux multicouches ou de photographies par des techniques d'imagerie (microscopie électronique à balayage MEB, etc.).
- **Le cas le plus complexe concerne la situation d'un milieu binaire représenté par un ensemble de particules solides ou liquides en suspension dans un fluide** (gaz ou liquide). Ce système binaire correspond à la définition des aérosols solides ou liquides. L'air ambiant est un aérosol naturel composé d'une matrice gazeuse chargée de particules solides et liquides de tailles et de natures variables. L'échantillonnage devient donc plus complexe puisqu'il s'agit de qualifier des espèces dispersées pour en connaître la composition.

Pour tout type d'interaction, il est nécessaire de connaître le volume d'échantillonnage lequel seul déterminera la quantité de matière analysée. Pour cet objectif, nous décrivons les mécanismes d'interaction laser-matière, ainsi que les paramètres influents, pour les gaz (purs ou chargés de particules) et pour les surfaces (contaminées ou non)

I.3. FORMATION D'UN PLASMA EN MILIEU GAZEUX

I.3.1. Caractéristiques et mécanisme de claquage diélectrique d'un gaz avec formation d'un plasma

La figure I-3 illustre l'existence furtive – ici correspondant à la durée d'ouverture de l'obturateur photographique - d'un plasma thermique de quelques mm de long issu de la focalisation d'un pulse laser dans l'air ambiant soumis à claquage.

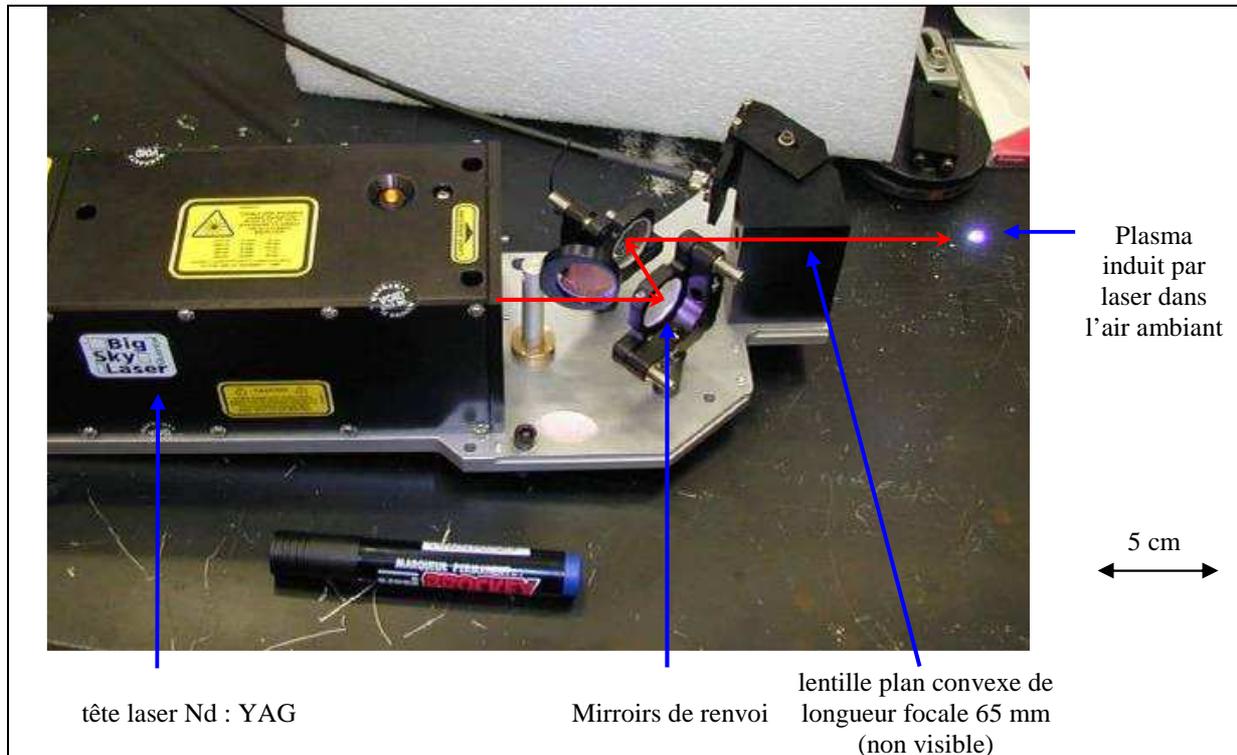


figure I-3 : Photographie de la chaîne optique permettant l'induction d'un plasma dans l'air ambiant par une pulse laser Nd : YAG (Quantel CFR200) d'énergie 100 mJ et de durée 7 ns focalisé par une lentille plan-convexe de longueur focale 65 mm

Le mécanisme proposé pour le claquage d'un gaz par Radziemski *et al.* [9] et Niemax [10] présente deux étapes séquentielles, suivies d'un retour à l'équilibre énergétique par relaxation des espèces composant le plasma :

1. **La première étape est l'initiation avec formation d'électrons libres par des processus d'ionisation multiphotonique, d'ionisation thermoïonique et d'ionisation par effet tunnel** des atomes, molécules, voire de particules minérales (poussière) présentes dans la région focale.
2. **La deuxième étape est la croissance du plasma par ionisation en cascade ou avalanche électronique** : les électrons primitifs entraînent le claquage des atomes présents dans la région focale pour former le plasma. L'ionisation en cascade permet l'augmentation de la densité électronique dans le volume focal. Ce phénomène induit une élévation de l'absorption énergétique par la prédominance d'effet **Bremsstrahlung inverse** (collisions électron-atome). Le taux d'augmentation des électrons libres dépend ainsi des champs électriques induits, des mécanismes de collisions qui facilitent la diminution de l'énergie électronique (collisions élastiques et inélastiques de type électron-atome et électron-molécule, excitation vibrationnelle des molécules, dissociation et ionisations des atomes), ainsi que du nombre d'électrons libres dans la région d'avalanche.
3. **Une dernière étape est la relaxation du plasma** : elle débute en queue d'émission du pulse laser quand il n'y a plus un apport d'énergie suffisant pour maintenir le plasma dans son état.

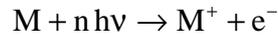
I.3.2. Initiation d'un plasma : apparition des premiers électrons libres

L'initiation du plasma consiste à mettre en route les mécanismes de création d'électrons libres. Les premiers électrons libres présents (rayonnement cosmique et émission thermoïonique) contribuent à l'apparition de nouveaux électrons libres qui eux-mêmes continuent le processus. La concentration en électrons libres augmente alors rapidement : une forme de réaction en chaîne se produit.

L'activité radio terrestre et les émissions cosmiques entraînent naturellement une faible ionisation des molécules gazeuses : la concentration électronique N_e en milieu atmosphérique est comprise entre 10 et 10^3cm^{-3} . Trois autres phénomènes peuvent être impliqués dans la formation d'électrons libres :

I.3.2.1.1. L'ionisation multiphotonique

L'ionisation multiphotonique ou MPI (*Multiple Photon Ionisation*) est l'absorption simultanée par un atome ou une molécule de plusieurs photons d'énergie $h\nu$ jusqu'à ionisation de celui-ci. Le phénomène d'ionisation multiphotonique est décrit par la réaction :



M : atome éjecté de l'échantillon et vaporisé **ν** : fréquence du laser

n : nombre de photons **e^-** : électron libre

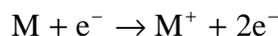
h : constante de Planck ($6.626.10^{-34}$ kg.m².s⁻¹) **M⁺** : atome ionisé

Si ϵ_1 est l'énergie d'ionisation de la particule, le nombre n de photons d'énergie **h ν** doit donc être supérieur à la partie entière de $(\epsilon_1 / h\nu + 1)$ pour qu'il y ait ionisation. Le taux d'ionisation multiphotonique **ω** , pour un laser d'irradiance **I** (W.cm⁻²) est proportionnel à **Iⁿ**. [11]

Smith *et al.* [12] ont montré que les processus de MPI sont observés uniquement pour des énergies de photon de l'ordre de 1 eV ou plus. La longueur d'onde du laser intervient : le nombre de photons nécessaire pour excéder le potentiel d'ionisation devient plus faible. L'ionisation multiphotonique montre une dépendance vis à vis de paramètres tels que la durée de pulse, le diamètre du faisceau laser et la pression. Une durée de pulse faible ($< 10^{-7}$) et une pression réduite favorise la MPI.

I.3.2.1.2. L'effet thermoïonique

Les électrons absorbent l'énergie du pulse laser. S'ils acquièrent suffisamment d'énergie, ils provoquent des collisions et peuvent ioniser les atomes de l'échantillon présents dans la vapeur. Le nombre d'électrons libres augmente de manière exponentielle par réactions en chaîne multiples :



M : atome éjecté de l'échantillon et vaporisé **M⁺** : atome ionisé

e^- : électron libre

Ce phénomène intervient quand le gaz contient des microparticules de taille supérieure à 0,1 μm dont la densité en milieu atmosphérique normal est supérieure à 10^3 particules.cm⁻³. Irradiées par le laser, la température des microparticules augmente générant des électrons par émission thermoïonique.

I.3.2.1.3. L'effet tunnel

L'effet tunnel est purement quantique : c'est la probabilité qu'un électron du cortège électronique d'un atome s'échappe suite à la modification du champ électromagnétique vu par cet électron, sous l'effet d'une intense radiation laser.

I.3.2.1.4. Conclusions sur le choix du type de lasers

Dans notre étude, un laser Nd:YAG est utilisé. Les photons délivrés ont une longueur d'onde de 1064 nm, soit une énergie $h\nu \sim 1$ eV. L'énergie d'ionisation de la plupart des gaz étant d'au moins 10 eV, il faut donc que la particule absorbe simultanément 10 photons pour être ionisée. Les gaz que nous utilisons sont filtrés et asséchés en général. Il est donc peu probable que le processus de génération d'électrons par effet thermoionique soit prépondérant. Par contre il n'est pas improbable que le processus d'ionisation multiphotonique soit majoritairement responsable de la formation des électrons initiaux.

I.3.3. Croissance du plasma

Les électrons ainsi générés vont absorber l'énergie du rayon laser par **collisions Bremsstrahlung inverses** : un électron libre absorbe l'énergie du faisceau laser par collisions inélastiques avec des ions et des atomes jusqu'à être suffisamment énergétique pour ioniser les atomes présents dans la vapeur, c'est la formation du plasma. L'expansion du plasma a lieu préférentiellement à contre-courant du faisceau laser, en direction de la source d'apport énergétique. La vitesse de croissance est de l'ordre de 10^5 m.s⁻¹, mais de façon anisotrope selon les directions, ce qui explique la forme caractéristique du plasma en forme d'ellipsoïde. Les premiers électrons accélérés par collisions Bremsstrahlung inverses créent de nouveaux électrons libres par ionisation. Le nombre d'électrons libres augmentant rapidement, le phénomène d'ionisation est de plus en plus important dans la « vapeur d'atomes », c'est « **l'ionisation en cascade** » entraînant la croissance du plasma. Durant son développement, le plasma va simultanément absorber et réfléchir la lumière du faisceau laser et atteindre une température de l'ordre de 10 000 K ainsi qu'une densité électronique allant de 10^{17} à 10^{19} électrons.cm⁻³. Un intense continuum est simultanément émis et dû au rayonnement de freinage issu des interactions électron-électron.

I.3.4. Paramètres influant sur la formation et l'analyse spectroscopique du plasma

De nombreux travaux expérimentaux ont été entrepris pour définir le seuil de claquage diélectrique d'un gaz. Ils abordent tous l'énergie limite au-delà de laquelle le mécanisme d'avalanche électronique transforme le milieu gazeux isolant en un milieu électriquement conducteur riche en électrons, c'est-à-dire en plasma.

I.3.4.1. Influence de la pression

Le modèle théorique proposé par Canavan *et al.* [13] prévoit une **diminution du seuil de claquage quand la pression augmente**.

Dans nos applications à finalité d'analyse *in situ* et de terrain, l'environnement d'analyse ne doit pas être modifié : nous travaillerons en permanence à pression atmosphérique (10⁵ Pa)

I.3.4.2. Rôles de l'énergie et longueur d'onde du pulse laser

L'énergie du pulse laser est un facteur très influent pour la taille du plasma et les intensités des raies d'émission. L. Dudragne [2] a montré une **corrélation forte entre l'énergie du pulse laser et les intensités des raies**, par exemple pour les éléments à fort potentiel d'ionisation comme le chlore ($E_{exc} = 10,5\text{eV}$ pour la transition liée à la longueur d'onde $\lambda = 837,594\text{nm}$) et le fluor ($E_{exc} = 14,5\text{eV}$ pour celle à $\lambda = 685,602\text{nm}$). Pour le soufre ($E_{exc} = 7,8\text{eV}$ pour $\lambda = 921,291\text{nm}$) les intensités atteignent un palier à 150 mJ : tout élément ne peut absorber qu'une certaine quantité d'énergie leur permettant d'atteindre un état excité.

Une hausse de l'énergie du pulse laser permet de générer un plasma plus volumineux lequel excite davantage de matière. Dudragne [2] montre cependant dans ses expériences que la valeur du rapport signal/bruit passe par un optimal pour une concentration d'élément finie.

L'ionisation multiphotonique est proportionnelle à l'intensité laser et à sa longueur d'onde suivant l'expression $I e^{1/\lambda}$. L'augmentation du phénomène d'ionisation par Bremsstrahlung inverse est fonction de l'inverse de la longueur d'onde selon $1/\lambda^2$. Pour des longueurs d'onde courtes (énergie élevée) l'ionisation multiphotonique augmente beaucoup plus rapidement que l'ionisation en cascade.

A partir de la théorie de l'avalanche, Hughes *et al* [14] ont défini l'expression du seuil de claquage I_{seuil} pour un gaz :

$$I_{seuil} = (n_{da} / g_g) \times (f / \nu_{ca})^2 \times (1 / t_p) \times \ln(n_e V) \quad \text{équation I-1}$$

n_{da} : densité en atome neutre

t_p : durée du pulse laser

g_g : paramètre dépendant du gaz

n_e : densité électronique

f : fréquence du pulse laser

V : volume focal du faisceau laser

v_{ca} : fréquence de collision des atomes neutres

Pour de l'air constitué exclusivement d'azote et d'oxygène, une densité en atome neutre de 10^{16} cm^{-3} , un paramètre intrinsèque de l'air donné par l'auteur [14] égal à $3,3 \cdot 10^{21}$, une longueur d'onde laser λ_{pulse} de 532 nm (c'est-à-dire une fréquence laser $f=5.6 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$ avec $f=c/\lambda_{\text{pulse}}$), une durée de pulse de 7ns, une densité électronique de 10^{13} cm^{-3} , une fréquence de collision d'atomes neutres $\tau_e = 5.2 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, et le volume focale de $0,16 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-3}$, l'équation I-1 permet de calculer **un seuil de claquage de l'air de $2,2 \cdot 10^{14} \text{ W.cm}^{-2}$** . Expérimentalement, L. Dudragne a mesuré un seuil de $4,48 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$ à $\lambda=1064 \text{ nm}$ dans un mélange $\text{CF}_2\text{Cl}_2/\text{Air}$ et des valeurs dans un domaine de 10^9 à $10^{14} \text{ W.cm}^{-2}$ sont mentionnées dans la littérature [15] [16]. La présence d'impuretés contribue à diminuer le seuil de claquage (cf. suite).

La longueur d'onde du laser utilisé joue un rôle important sur le seuil de claquage d'un gaz selon L. Dudragne [2]. En se plaçant dans un environnement filtré, les électrons sont principalement générés par ionisation multiphotonique. Un abaissement du seuil de claquage devient possible par diminution de la longueur d'onde du laser, malheureusement ceci tend à diminuer l'intensité de certaines raies d'émissions atomiques augmentant ainsi leur limite de détection. Pour cette raison, **la longueur d'onde fondamentale $\lambda=1064 \text{ nm}$ d'un laser pulsé Nd :YAG a été privilégiée.**

I.3.4.3. Incidences de la durée de pulse et du diamètre du faisceau laser

Pour le phénomène d'ionisation en cascade, le seuil de claquage est déterminé quand le taux d'énergie absorbée par les électrons libres compense les pertes d'énergie dues à l'excitation des atomes ou des molécules du gaz. Les processus dominant les pertes sont : la diffusion des électrons, l'attachement d'électron par l'oxygène en milieu atmosphérique, l'excitation électronique d'atomes.

D'après Smith *et al.* [12], les temps caractéristiques respectifs de ces processus dépendent de la pression P (en atm) et du diamètre du faisceau laser d (en cm) selon : $t_{\text{diff}} = 2,7 \cdot 10^{-5} P \cdot d^2$, $t_{\text{att}} = 10^{-9} P^{-1}$ et $t_{\text{ex}} = 1,2 \cdot 10^{-11} P^{-1}$. La durée de ces différents temps vis à vis de la durée de pulse t_p jouent un rôle prédominant sur le seuil de claquage. Sacchi *et al.* [17] déclarent dominant le processus d'avalanche électronique ou Bremsstrahlung inverse pour des pulses

laser de quelques ns (10^{-9} s). Pour des pulses laser d'une durée inférieure à la ns, le mécanisme prédominant pour la formation du plasma semble être l'ionisation multiphotonique.

Smith *et al.* [18] a montré une diminution du seuil de claquage quand le diamètre du faisceau laser augmente. Ce phénomène est apparemment indépendant de la nature du gaz (air, He et Ar) et de la longueur d'onde du laser (Ruby : 0,69 μm , Nd:YAG : 1,064 μm et CO₂ : 10,6 μm). Il est lié à l'augmentation de la densité de puissance inversement proportionnelle à la valeur du diamètre du faisceau laser pulsé (cf. partie I.6.1, page 44).

I.3.4.4. Présence de microparticules

L'absence de microparticules de taille supérieure à 0,1 μm dans le volume de focalisation entraîne une augmentation du seuil de claquage d'un gaz. Par filtration des microparticules de l'azote gazeux, Yablonovitch *et al.* [19] a montré que le seuil de claquage passe de 10^9 à 10^{12} W.cm^{-2} . Une augmentation de la taille des particules en suspension dans l'air induit une baisse de la dépendance du seuil de claquage face à ces particules [20]. Les variations des valeurs de seuil de claquage sont dues aux différences de pureté des échantillons, c'est-à-dire à la teneur en molécules de type H₂O, CO₂, aux impuretés minérales à bas seuils d'ionisation telles que NaCl, CaO, SiO₂, aux éléments métalliques ; ainsi qu'à la longueur d'onde du laser utilisé.

Dans l'optique d'analyser des particules d'aérosols présentes dans le volume focal de formation du plasma, nous pouvons prévoir que la présence d'aérosols ou d'une surface dense diminue le seuil de claquage. Le choix de paramètres optiques et laser pour obtenir une densité d'énergie égale au seuil de claquage pourrait être utilisé pour ne générer un plasma qu'en présence de matière.

I.4. ABLATION LASER D'UNE SURFACE PAR FORMATION D'UN PLASMA

I.4.1. Phénoménologie de l'interaction laser-matière dense

Le mécanisme de formation d'un plasma sur ou au voisinage de matière dense (surface solide, liquide) diffère par rapport à celui des gaz, en particulier dans la phase initiale durant laquelle la densité de puissance issue du flash laser focalisé chauffe violemment la surface.

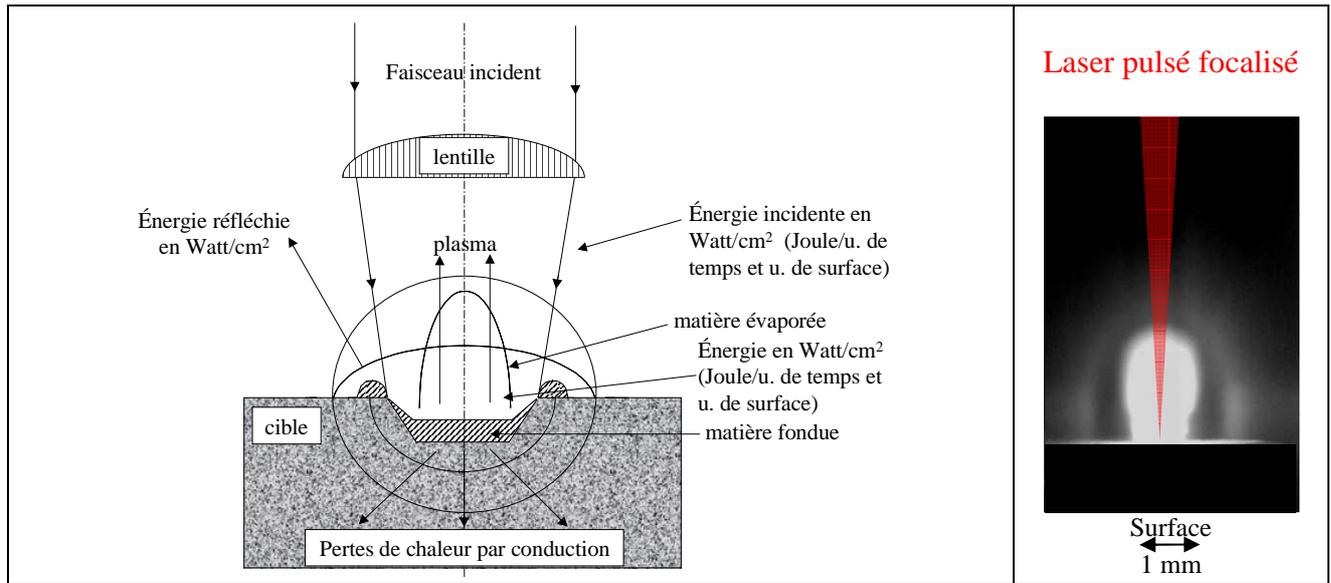


figure I-4 : Schéma de principe et photographie de l'interaction laser-surface. Photographie d'un pulse laser d'énergie 100 mJ et de longueur d'onde 1064 nm, focalisé par une lentille de longueur focale de 65 mm

L'effet de fusion et de volatilisation se traduit à la fin de l'interaction par l'apparition d'une zone plus ou moins endommagée : zone affectée thermiquement ou cratère. Les phénomènes d'interaction entre un faisceau laser de puissance et une cible solide sont :

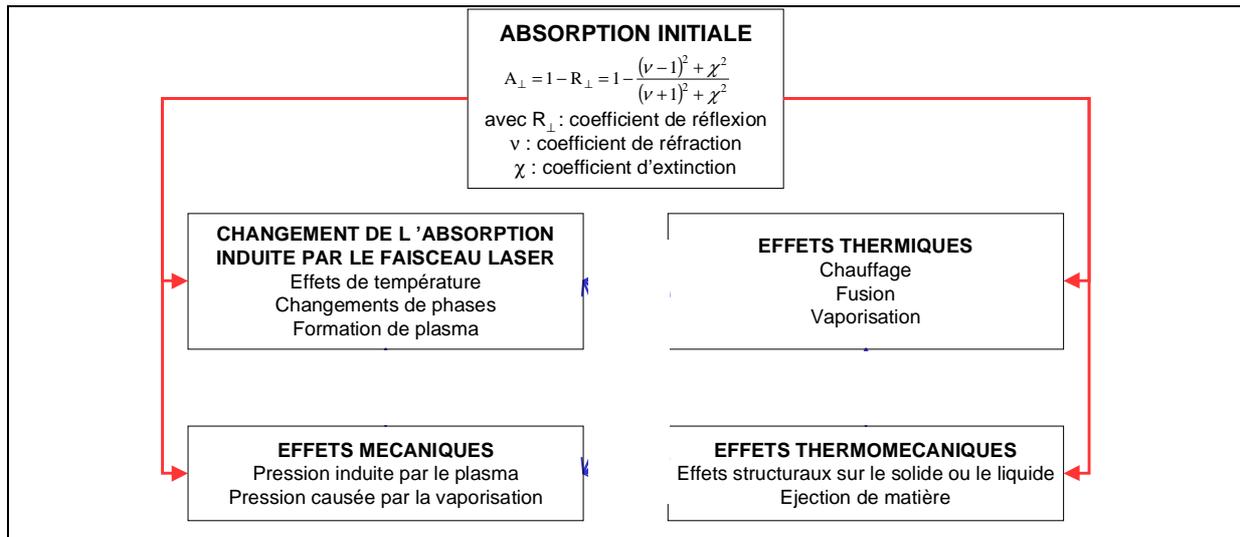


figure I-5 : Phénomènes se produisant lors de l'interaction laser-matière

1. **Absorption de la lumière laser incidente par la surface qui contrôle la vaporisation de l'échantillon** : un transfert d'énergie est créé entre les radiations incidentes et la matrice du matériau par l'intermédiaire des électrons. La température de la surface augmente rapidement et la chaleur est transmise par conduction au sein de la cible. L'énergie déposée est tellement supérieure à la chaleur latente de vaporisation que la surface irradiée ne peut évacuer la chaleur par conduction : sa température locale dépasse le point d'ébullition du matériau et conduit à un phénomène de vaporisation.

2. **Initiation du plasma** : le matériau vaporisé absorbe l'énergie laser incidente formant une sorte de bouclier (couche limite absorbante) vis à vis de la surface. La matière éjecte des atomes de surface ainsi que quelques électrons (émission thermoïonique). Au même instant, dans la « vapeur d'atomes » éjectée, se trouvent des atomes de surface, des électrons libres présents naturellement (issus du rayonnement cosmique) et d'autres électrons libres venant de la matière chauffée. Si l'énergie du pulse laser dépasse le seuil de claquage (énergie minimale nécessaire pour initier le plasma) des électrons libres sont induits. La température de la vapeur croît et un plasma se forme. Le plasma est initié par absorption de l'énergie laser incidente à travers des processus d'ionisation multiphotonique et d'absorption Bremsstrahlung inverse électrons-ions. [21]

La figure I-6 résume la formation du plasma par impact de pulse laser de durée 6 ns :

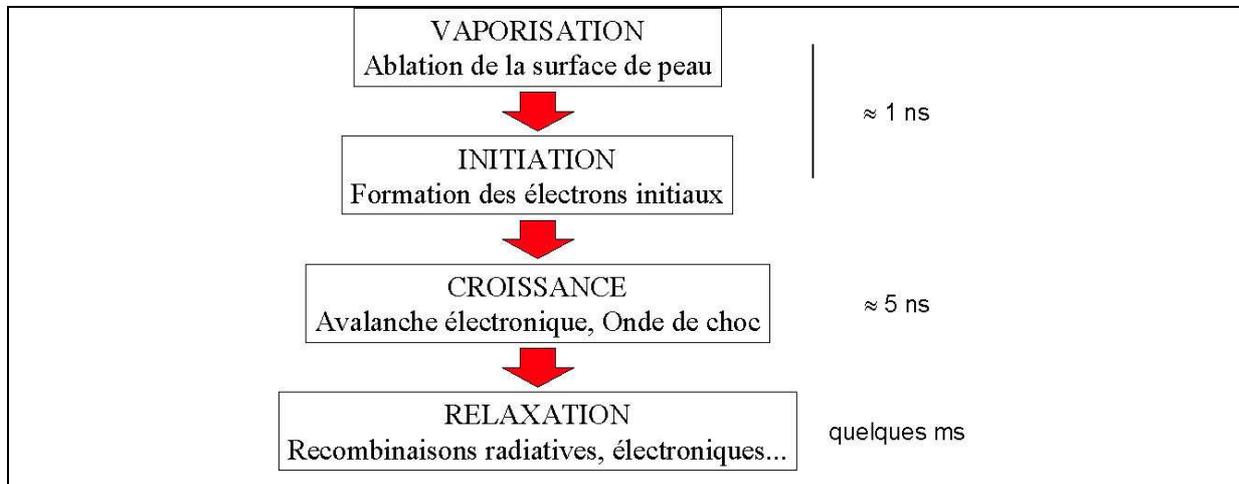


figure I-6 : Etapes de la formation d'un plasma induit par laser d'une durée de pulse de 6 ns

Expérimentalement et pratiquement, le cycle intégral d'initiation, de croissance et de relaxation d'un plasma induit par un pulse laser de durée de quelques ns représentent un laps de temps de seulement quelques microsecondes. L'analyse spectroscopique d'un tel plasma est donc très rapide, ce qui permet de reproduire rapidement les plasmas.

I.4.2. Rôle des paramètres optiques contrôlant l'ablation laser

I.4.2.1. La longueur d'onde laser

Divers travaux ont montré **l'influence de la longueur d'onde du laser** λ_{laser} sur les émissions radiatives du plasma :

- Le temps nécessaire pour s'affranchir des émissions Bremsstrahlung augmente avec λ_{laser} (le délai optimal entre la fin du pulse et l'ouverture du détecteur augmente avec la longueur d'onde) [22],

- Les longueurs d'onde laser courtes induisent une forte onde de choc (vitesses supersoniques) capable d'exciter les atomes et de générer un plasma secondaire. Les longueurs d'onde laser dans l'infrarouge quant à elles ne paraissent pas induire des ondes de choc suffisamment fortes pour exciter efficacement les atomes de la région secondaire. Le calcul des températures le long du plasma (suivant l'axe du faisceau laser), pour plusieurs longueurs d'onde laser, montrent en effet une température qui décroît quand la longueur d'onde du laser augmente. On attribue ce manque d'efficacité des longueurs d'onde de l'infrarouge à l'absorption du faisceau laser par le plasma augmentant pour les grandes λ_{laser} [23]

I.4.2.2. L'énergie du pulse laser

L. Dudragne [2] a montré que lorsque l'énergie de pulse laser augmente :

- le plasma devient spatialement plus reproductible et s'accroît en volume,
- l'intensité des raies des éléments au sein du plasma augmente linéairement pour un plasma sur surface tant que l'on observe des portions de plasma proches de la surface de la cible (entre 0 et 1 mm),
- l'évolution du rapport signal sur bruit passe par un maximum situé entre 80 et 100 mJ,
- la répartition spatiale des intensités de raie est identique quel que soit l'élément observé (optimum du signal observé au même endroit quel que soit l'élément).
- Le seuil de claquage est plus bas pour les solides en comparaison des gaz : la surface fournissant des électrons libres induisant plus facilement l'avalanche électronique.

I.4.2.3. Gains analytiques par pulses multiples : cas de la LIBS double pulse

Pour améliorer les limites de détection élémentaire de la LIBS, Cremers *et al.* [24] ont envisagé l'utilisation d'un double pulse laser résolu dans le temps, principalement pour l'analyse en milieu liquide : une première impulsion laser crée une cavité gazeuse dans laquelle un deuxième pulse est focalisé orthogonalement au premier pour induire un plasma dans le gaz ou à la surface d'un échantillon. L'intérêt de cette technique est de modifier l'environnement d'analyse qui passe de liquide à gazeux, et donc d'éviter de perdre de l'énergie d'un seul plasma pour vaporiser la matière.

Cette technique se développe pour diverses applications comme l'analyse de surface. Le premier pulse génère un environnement propice à l'ablation par un deuxième pulse qui sert au reclaquage (ou « reheating ») du premier plasma. L'énergie du premier pulse laser est destinée à ablater et à vaporiser la surface. Un deuxième pulse peut ainsi réchauffer le plasma et

réexciter les atomes et les ions en son sein.

C. Gautier [25] a démontré que l'emploi de double pulse en configuration de « reheating », permettait d'augmenter significativement l'intensité des raies ioniques. La meilleure répartition de la densité de puissance par deux pulses successifs d'énergie (E_1 et E_2) induit avec un délai entre les deux (en général quelques μs) permet d'augmenter sensiblement la température du milieu plasma en comparaison avec un seul pulse de même énergie globale ($E_1 + E_2$) : les performances analytiques sont améliorées.

La LIBS à pulses multiples n'est pas mise en oeuvre dans nos expériences car il est nécessaire d'utiliser deux sources laser et une configuration optique complexe et encombrante (focalisation successive des deux pulses en géométrie orthogonale ou colinéaire). Le gain analytique est potentiellement intéressant à terme.

I.4.2.4. Durée du pulse : régimes LIBS picoseconde, nanoseconde et femtoseconde

La durée du pulse est un paramètre important qui conditionne le régime d'induction et d'interaction laser-matière. Moenke-Blankenburg [26] a estimé la densité de puissance minimale requise d'un pulse laser pour permettre la vaporisation de matière irradiée :

$$I_{\min} = \frac{\rho L_v \kappa^{1/2}}{t_{\text{pulse}}^2} \quad \text{équation I-2}$$

avec :

- | | |
|--|--|
| ρ : densité du matériau de la cible | κ : diffusivité thermique de la cible |
| L_v : chaleur latente de vaporisation | t_{pulse} : durée du pulse |

Pour de l'aluminium pur, I_{\min} est voisine de $1,75 \cdot 10^8 \text{ W.cm}^{-2}$.

Les interactions de la matière massive avec des pulses de durée μs ou ns (notre cas) engendrent des phénomènes successifs de chauffage, de fusion du solide et d'évaporation du liquide. Des flashes laser de durée plus courte telle que la femtoseconde (fs, 10^{-15} s) ont une durée de vie inférieure au temps d'initiation du plasma : la vaporisation de la matière est directe et les cratères sont de formes très régulière, adaptée à la gravure ou à l'étude des couches multiples d'une surface (en microélectronique) :

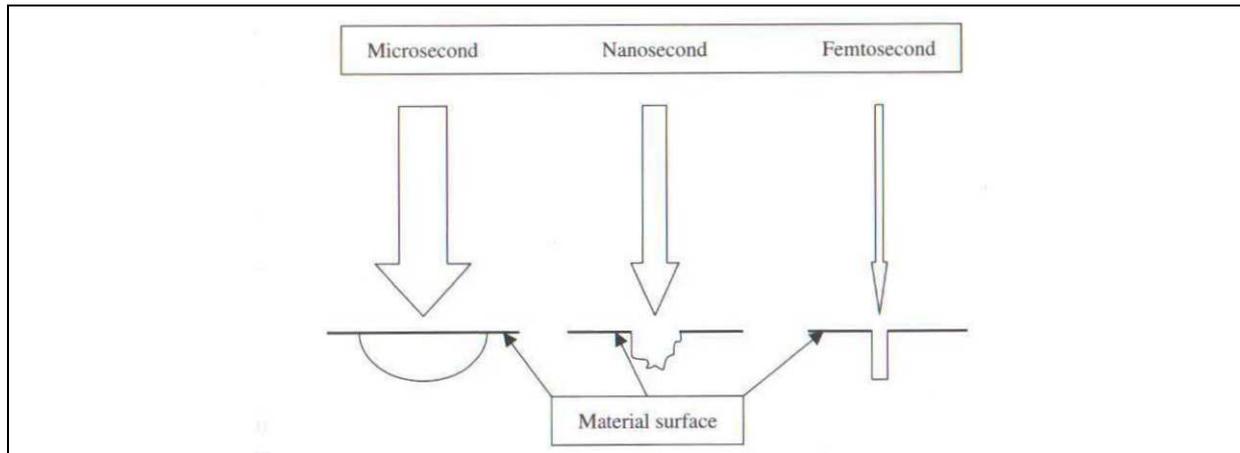


figure I-7 : profils des cratères d'ablation obtenus selon la durée du pulse laser focalisé [27]

Le processus d'ablation est initié par l'obtention d'une densité critique d'électrons libres. La principale source d'électrons libres, pour des laser produisant des pulses ultra courts de l'ordre de la fs est l'ionisation multiphotonique. A l'inverse ceux créés par des lasers ns proviennent de collisions provoquant l'ionisation (avalanche) : le nombre d'électrons initiaux entraîne de fortes fluctuations du seuil de claquage.

Le laser fs offre une meilleure reproductibilité : l'énergie du seuil de claquage décroît avec la durée du pulse. Ce type de laser permet de réduire considérablement les dommages occasionnés lors d'une analyse, ce qui est intéressant lors d'analyse de matériaux mous (composés biologiques par exemple) ou d'échantillons fragiles (archéomatériaux, etc...) nécessitant l'emploi de méthodes peu ou non destructives.

Les lasers fs sont de plus en plus utilisés en LIBS pour des applications où la résolution spatiale des structures est cruciale. Assion et al. [28] ont comparé l'efficacité de deux sources lasers fs et ns, la plus couramment utilisée en LIBS. Cette étude a pour objet l'analyse de Ca^{2+} d'une solution de CaCl_2 puis dans la paroi de cellules de tiges de tournesol. Les limites de détections calculées sont semblables pour les deux lasers. Cependant les émissions du continuum sont considérablement réduites et le seuil de claquage est plus faible avec le laser fs. L'énergie requise pour la formation du plasma par un laser ns entraîne la destruction totale de la cellule, de plus la quantité de matière ablatée varie significativement pour chaque tir. L'épaisseur ablatée par le laser fs est inférieure à l'épaisseur de la paroi de la cellule et correspond à un volume de l'ordre du femtolitre. De par les faibles dommages causés à l'échantillon ce type de technique a un large champ d'applications dans les domaines biologique, médical ou microélectronique

Les principaux inconvénients des lasers fs résident dans leur fonctionnement délicat par rapport aux lasers ns (moindre stabilité du faisceau, fragilité et encombrement des appareillages) les réservant à des expériences de laboratoire. Leur prix commercial demeure encore élevé (près d'un facteur 10 par rapport aux lasers de type ns).

Pour ces raisons, nos expériences seront encore effectuées avec des lasers ns robustes qui permettent d'obtenir des profils ablations, selon les paramètres optiques choisis, avec des résolutions de l'ordre du μm [3] [29] et permet de distinguer des structures multicouches de faibles épaisseurs : L. Dudragne ablate sélectivement des couches de 30 nm d'or déposées sur du PTFE. [2]

I.4.2.5. Conclusion sur les paramètres laser pour ablater une surface

La bibliographie a montré qu'il était préférable d'utiliser un laser dans l'ultraviolet pour des analyses de surface pour des raisons de reproductibilité et de signal spectroscopique. Néanmoins, l'expérience accumulée avec les précédentes thèses nous amène à conserver le laser Nd:YAG de **longueur d'onde 1064 nm délivrant des pulses de durée de quelques nanoseconde** pour pouvoir effectuer des analyses sur différents supports : gaz, surface, liquide et aérosols. En effet, cette longueur d'onde permet d'avoir des résultats très satisfaisants.

De plus, ce laser possède, de plus, de nombreux avantages :

- Disponibilité commerciale à un prix raisonnable,
- Maîtrisé technologiquement (reproductibilité élevée des pulses, miniaturisable),
- Bon rendement énergétique,
- Energie de pulse importante et taux de répétition de quelques centaines de Hz.

Une énergie de pulse inférieure à **100 mJ** est suffisante pour des analyses sur surface, la durée du pulse devant être de l'ordre de la nanoseconde (**6 à 8 ns** dans nos expériences).

I.5. DIAGNOSTIC DES PLASMAS PAR SPECTROSCOPIE D'EMISSION ATOMIQUE

I.5.1. Relaxation du plasma : résolution temporelle nécessaire des raies d'émission

Pour le régime d'induction du plasma dans nos études, la durée du pulse laser est de l'ordre de quelques nanosecondes et l'énergie d'environ 100mJ. En fin de pulse laser, il n'y a plus d'apport d'énergie : le plasma évacue l'énergie précédemment acquise sous forme de :

1. **Emissions Bremsstrahlung ou rayonnement de freinage** : ralentissement des électrons qui perdent de l'énergie par collisions élastiques et inélastiques avec des atomes et émettent des radiations.
2. **Recombinaisons électroniques** : un atome capture un électron.
3. **Désexcitations radiatives** : un atome capture un électron et émet un photon d'énergie $h\nu$.

Le temps de vie caractéristique du plasma dépend de la nature transitoire des densités électroniques et peuvent être distinguées par spectroscopie d'émission résolue dans le temps :

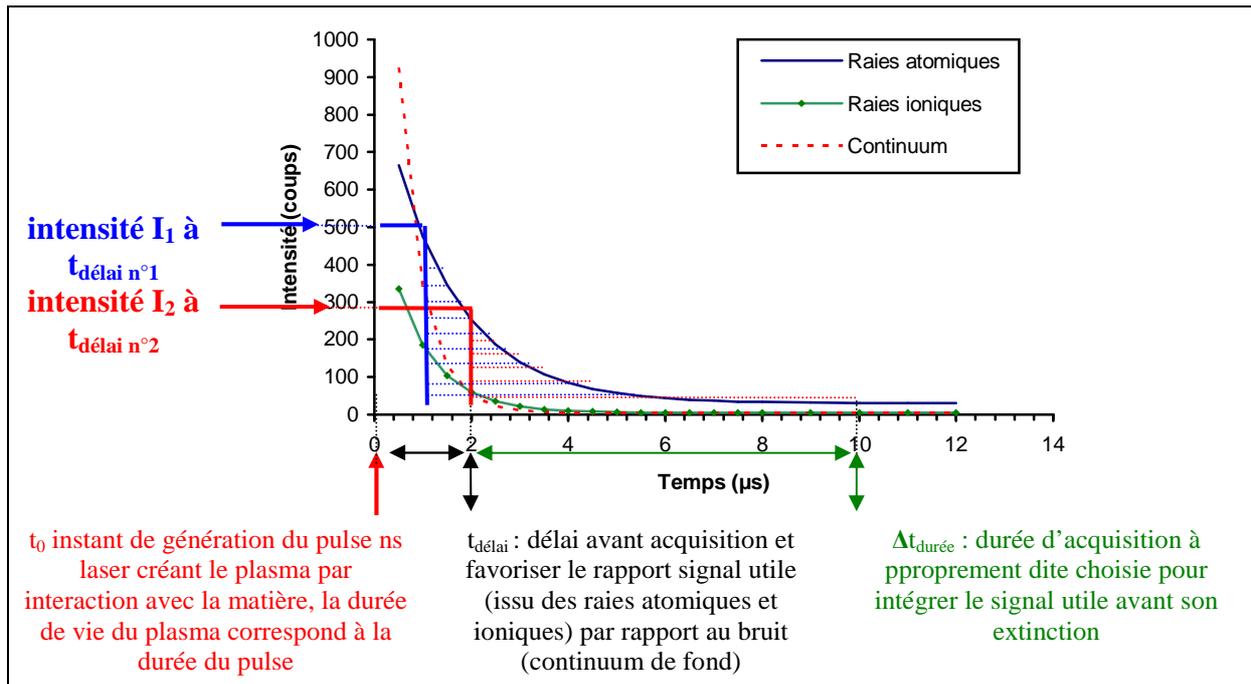


figure I-8 : Evolution temporelle des émissions radiatives d'un plasma induit par laser

- **Phase n°1** : une émission radiative (continuum) est due au rayonnement des électrons libres (Bremsstrahlung, rayonnement de freinage). Il masque les raies d'émissions atomiques et ioniques des éléments durant environ $2 \mu\text{s}$ et doit donc ne pas être considéré pour l'acquisition du spectre (délai de 1 à $2 \mu\text{s}$). Son profil de désexcitation est de type exponentiel fortement décroissant : la résolution temporelle par retard de l'acquisition (on parlera de **délai**) des raies atomiques et ioniques, dont les profils de désexcitation sont moins prononcés, est alors obligatoire dans le régime monopulse ns pour pouvoir exacerber le signal utile (raies atomiques et ioniques) du bruit de fond spectral.
- **Phase n°2** : entre 0,5 et $2 \mu\text{s}$ après la formation du plasma, les émissions proviennent majoritairement des espèces ionisées.
- **Phase n°3** : entre 2 et $10 \mu\text{s}$, les radiations sont principalement dues à la désexcitation des espèces atomiques neutres.

Dans ces dernières phases (au bout de 1 à 2 μs et jusqu'à environ 10 μs), l'intensité du continuum a fortement diminué et laisse apparaître les raies d'émission atomiques et ioniques des éléments du plasma. Le spectre sera acquis dans cette phase. Deux paramètres temporels seront ainsi systématiquement optimisés dans le but de maximiser le rapport « signal d'émission des raies » par rapport au bruit issu du continuum de fond spectral) :

- **Délai d'acquisition $t_{\text{délai}}$** : durée au bout de laquelle on débute l'enregistrement des émissions après avoir attendu la diminution d'émission du continuum,
- **Durée d'acquisition $\Delta t_{\text{durée}}$** : durée d'enregistrement proprement dite d'une partie de la durée de vie des émissions des raies atomiques et ioniques avant que celles-ci ne s'éteignent.

La figure I-8 illustre le rôle crucial de la résolution temporelle avec le décalage de l'acquisition. Pour exemple, le signal acquis entre le délai $t_{\text{délai n}^\circ 1}$ et $t_{\text{délai n}^\circ 1} + \Delta t_{\text{durée}}$ peut être plus important qu'un délai $t_{\text{délai n}^\circ 2}$ plus élevé. Toute série d'expériences LIBS sera optimisée pour maximiser le rapport signal par rapport au bruit (RSB).

- **Phase n°4** : au-delà de 10 μs , le rayonnement provient surtout de molécules simples générées en périphérie de l'ellipsoïde plasma (C_2 , CN) ou par des recombinaisons atomiques.

La quatrième phase (au-delà de 10 μs) correspond aux bandes d'émission moléculaires caractéristiques des recombinaisons atomiques ayant lieu au cours du refroidissement du plasma. Cette phase peut être intéressante pour certaines analyses (étude des molécules aromatiques) : les raies d'émissions atomiques tendent donc à disparaître au profit de ces bandes moléculaires très stables (C_2 , CN...). Nous verrons ultérieurement la possibilité d'utiliser ces raies moléculaires comme biomarqueurs pour la détection et l'analyse par LIBS des pollutions (contaminations) bactériennes.

I.5.2. Spectrométrie d'émission atomique : résolution spectrale qualitative des raies caractérisant la matière excitée par plasma

La LIBS permet de détecter et doser des espèces atomiques par la résolution temporelle des raies émises par le plasma. Dans le plasma, on peut supposer une distribution des populations des niveaux excités selon la loi de Boltzmann. Lors d'une transition d'un état supérieur i vers un état inférieur j , l'intensité I_{ij} d'une raie émise par un élément est donnée par l'équation I-3 :

$$I_{ij} = \frac{1}{4\pi} \frac{hc}{\lambda_{ij}} \frac{N g_i A_{ij}}{Z(T_{\text{exc}})} \exp\left(-\frac{E_i}{kT_{\text{exc}}}\right) \quad \text{équation I-3}$$

avec :

h : constante de Planck

T_{exc} : température d'excitation

c : vitesse de la lumière
 λ_{ij} : longueur d'onde de la transition
 A_{ij} : probabilité de transition pour la raie considérée
 g_i : poids statistique du niveau d'énergie de départ i de la raie d'émission
 N : densité d'espèce contenue dans le plasma
 $Z(T_{exc})$: fonction de partition
 E_i : énergie du niveau excité à partir du quel la transition a lieu

Les raies d'émission sont liées à des longueurs d'onde caractéristiques d'une transition électronique d'un élément. Elles sont identifiables par l'intermédiaire de bases de données internationales de spectroscopie comme celles du National Institute Of Standards ou NIST [30]. La figure I-9 identifie des raies du soufre par exemple. Des informations quantitatives peuvent être extraites via les hauteurs (ou aire) de raies.

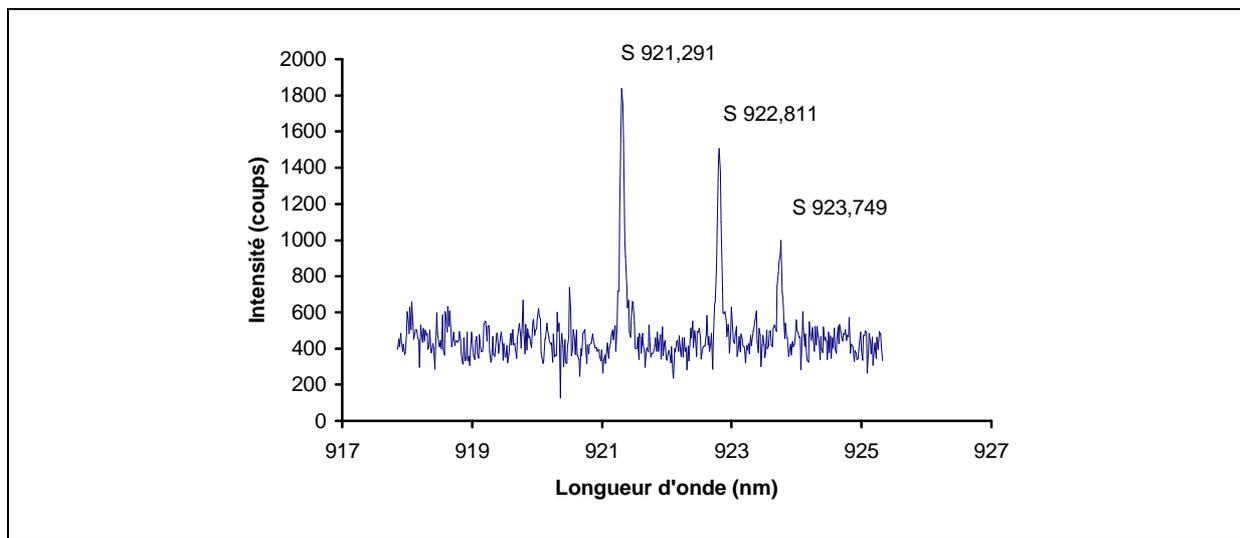


figure I-9 : Spectrogramme obtenu avec un monochromateur doté d'un réseau $1200 \text{ traits.mm}^{-1}$ et couplé à un détecteur iCCD. Région spectrale 917-927 nm d'émission LIBS d'un gaz SF_6 pur détecté par un pulse laser Nd :YAG d'énergie 100 mJ et de durée 6 ns focalisé par une lentille plan-convexe de longueur focale 65 mm. Autres paramètres : accumulation de 100 tirs sur un spectre, délai et durée d'acquisition d'un tir : 1 μs et 20 μs .

I.5.3. Exploitation quantitative des intensités des raies d'émission

L'équation I-3 relie l'intensité I et la densité d'espèce N contenues dans le plasma. Si le plasma est représentatif de la composition de l'échantillon, il est possible de réaliser des analyses quantitatives élémentaires en traçant des droites d'étalonnage.

I.5.3.1. Bases de données bibliographiques

La bibliographie présente de nombreux calculs des limites de détection établies expérimentalement sur divers type d'échantillons. Les tableaux suivants compilent les tendances en sensibilité élémentaire atteinte par LIBS. [31]

Elément	Matériau	Raie d'émission (nm)	Limite de détection	Ref.
C	Gaz CF ₂ Cl ₂ dans air Acier	C (I) : 247,856	3 ppm	CEB [32]
		C (I) : 97,7	1,2 ppm	
Ti	aluminium	Ti (I) : 423,5	3 ppm	[33]
Ca	gouttelette lignite	Ca (I) : 393,36	20 ppb	[34]
		Ca (I) : 396,85	60 ppm	[35]
Cu	Acier Sol	Cu (I) : 327,4	30 ppm	[36]
		Cu (I) : 324,75	6 ppm	[37]
Al	Alliage de zinc Bois	Al (I) : 309,27	9 ppm	[38]
		Al (I) : 394,403	18 ppm	[39]
Mg	Aluminium aérosol	Mg (II) : 280,3	200 ppb	[33]
		Mg(I) : 285,2	20 fg	[101]
Pb	aérosol sol	Pb (I) : 405,78	10 ppm	[40]
			17 ppm	[41]

tableau I-1 : Exemples d'éléments recherchés par LIBS dans un échantillon dans l'air

I.5.3.2.

Méthodes d'obtention des limites de sensibilité

Dans le chapitre suivant, nous rappellerons les calculs permettant l'accès aux limites de détection depuis l'exploitation de intensités nettes (hauteurs) de raies d'émission pour :

- Doser des éléments de façon absolue pour les gaz et les particules suspendues
- Etablir des concentrations relatives pour des traces élémentaires diluées dans une matrice présentant des majorants (cas des surfaces).

L'exploitation plus poussée ouvre même la voie à l'identification :

- Etablissement de la stoechiométrie des molécules gazeuses
- Classifications d'échantillons par traitement multivariés des identifiants spectraux.

I.5.4. Détermination de la température électronique du plasma

Le plasma thermique induit par pulse laser est un milieu présentant des états transitoires se désexcitant de façon exponentiel dès la fin du pulse (cf. figure I-8, page 39). La température du plasma évolue de la même façon. Son estimation est possible si et seulement si l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique local (ETL) est faite. L'expression de Boltzmann est alors utilisable pour calculer la température :

$$I = g_i A_i \lambda_i \exp\left(-\frac{E_i}{k_b T_{exc}}\right) \quad \text{équation I-4}$$

avec g_i le facteur de dégénérescence, A_i la probabilité de transition, λ_i la longueur d'onde de transition, E_i l'énergie de l'état supérieur, k_b la constante de Boltzmann ($k_b=8,62 \cdot 10^{-5} \text{ eV.K}^{-1}$) et T_{exc} la température du plasma donnée à un certain délai.

Le tracé de la courbe $\ln(I \cdot \lambda_i / g_i A_i) = -E_{exc} / k_b T_{exc} = f(E_{exc} / k_b)$ issue de l'équation I-4 de la loi de Boltzmann permet d'obtenir une droite de la pente $(-1/T_{exc})$ qui fournit la valeur de la température plasma pour un laps de temps donné selon l'hypothèse de : la température calculée est une moyenne durant un court délai de la phase de relaxation du plasma. Expérimentalement les T_{exc} sont de l'ordre de 10000 K : la température électronique des plasmas sera estimée dans la partie expérimentale et dans l'annexe V. La figure I-10 illustre l'ordre de grandeur des espèces excitées dans un plasma d'air.

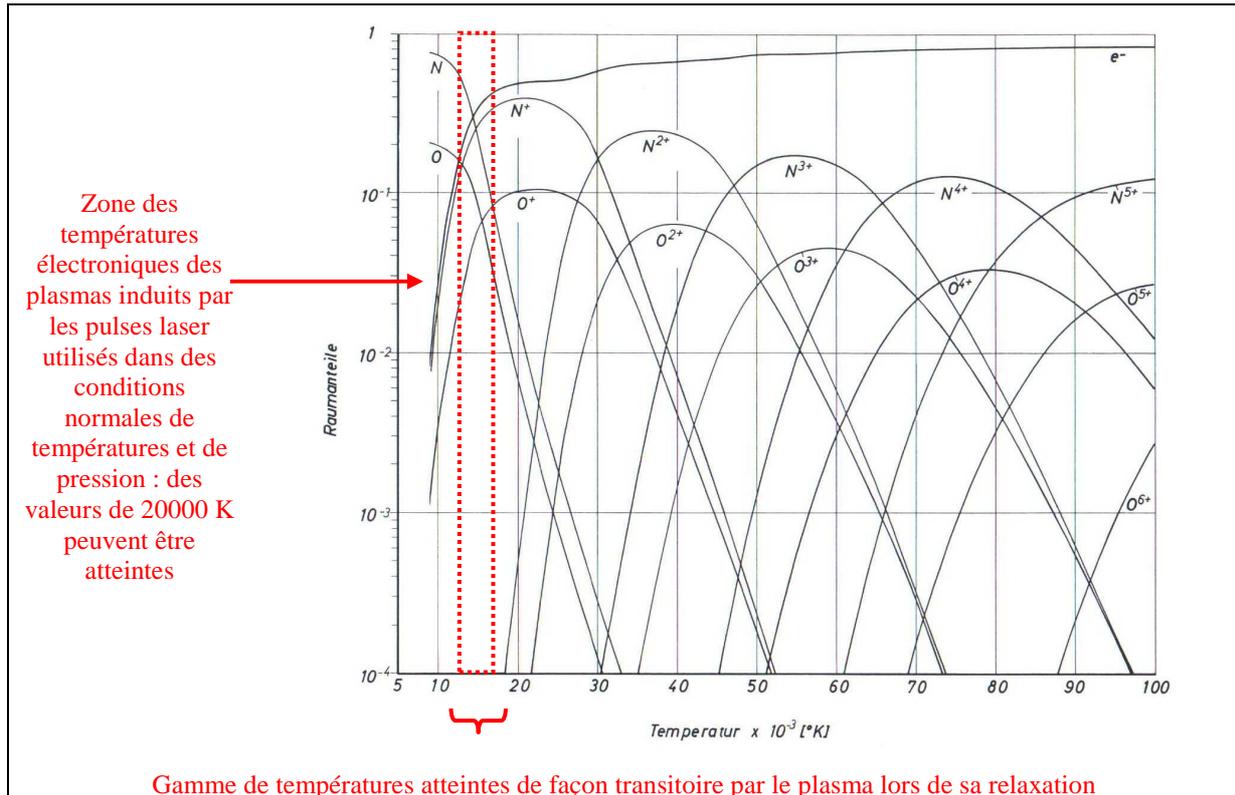


figure I-10 : Diagramme illustrant la composition des espèces dans un plasma généré dans l'air selon la température du milieu plasma à l'équilibre thermodynamique et à la pression de 1 bar [42]

Le fait de détecter des raies atomiques (I, espèces neutres excitées) et des raies ioniques (II, espèces ionisées une fois et excitées) établit que les plasmas sont des milieux hautement énergétiques. Cela confirme aussi la nécessaire résolution temporelle de l'acquisition des espèces excitées (atomiques et ioniques) se relaxant : il faudra choisir les meilleurs paramètres temporels (délai et durée de l'acquisition de chaque plasma) pour optimiser le rapport signal/bruit spectral.

I.6. CONTROLE DU VOLUME ECHANTILLONNE PAR LE PLASMA : ROLES DES PARAMETRES CONTROLANT LA DENSITE DE PUISSANCE DES PLASMAS

Le faisceau en sortie de laser est focalisé sur la cible (gaz ou surface solide ou liquide) à l'aide d'une lentille. Si la densité de puissance est suffisante : un plasma est créé. Selon les propriétés du faisceau laser (diamètre initial, énergie et durée de pulse) et de la distance focale de la lentille, le plasma est caractérisé par une densité de puissance (quantité d'énergie par unité de surface). Elle conditionne la taille du plasma dans l'air et la quantité de matière ablatée en surface. Les précédentes thèses effectuées au CEB [1] [2] [3] se sont attachées avec soin à préciser et mesurer systématiquement :

- **Pour un plasma dans l'air** : ses dimensions et sa densité de puissance sont connues pour évaluer le volume d'échantillonnage (gaz, particules) et résoudre spatialement la répartition des espèces excitées en observant les différentes zones plus ou moins émissives, donc plus ou moins chaudes du plasma.
- **Pour une ablation surfacique** : la densité de puissance déposée en surface conditionnant la quantité de matière ablatée sous forme d'un cratère conique présentant un certain diamètre prévisible et une épaisseur mesurable.

I.6.1. Calcul de la densité d'énergie au point focal

La densité d'énergie déposée peut être calculée dans le cas des deux types d'interactions selon un plasma créé dans l'atmosphère ou sur surface. Il faut préalablement déterminer la taille de la tâche focale suivant la longueur d'onde laser, la taille du faisceau laser, la longueur focale et la distance tâche focale–surface (FTSD).

En focalisant une impulsion laser, la densité de puissance du faisceau augmente tout au long du trajet optique, atteignant son apogée au foyer. La taille du faisceau laser au point d'impact avec la matrice échantillonnée (gaz ou surface) est déterminée avec les caractéristiques du faisceau et de la lentille (cf. figure I-11 et l'équation I-5) :

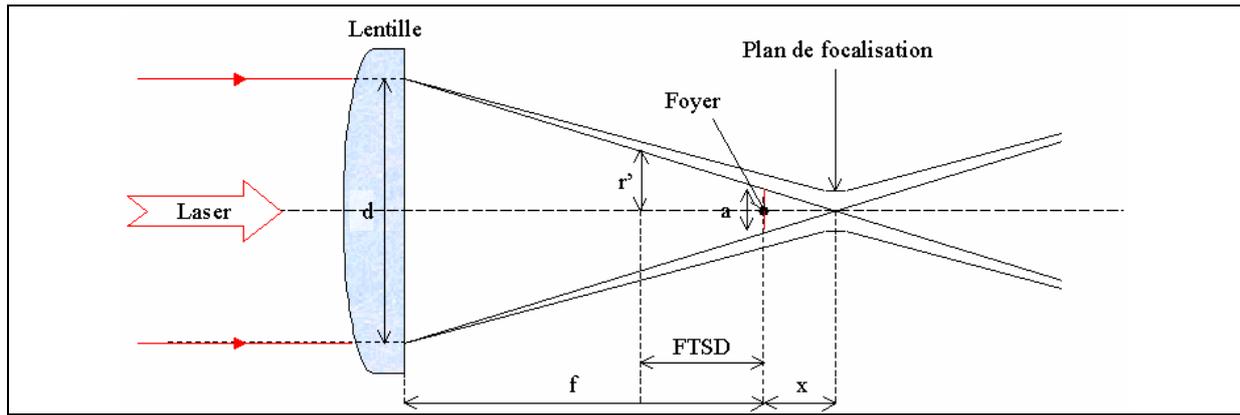


figure I-11 : Focalisation d'un faisceau laser par une lentille convergente

$$\frac{d/2}{f+x} = \frac{r}{x} = \frac{r'}{x+|\text{FTSD}|} \quad \text{équation I-5}$$

d : diamètre du faisceau incident

a : diamètre de la tâche focale à FTSD=0 mm

f : focale de la lentille

r = a/2

FTSD : Focal To Sample Distance ou distance tâche focale–surface

x : écart entre le point d'impact théorique et le plan de focalisation réel

r' : rayon du faisceau au niveau des impacts quel que soit la défocalisation (FTSD ≠ 0)

I.6.1.1.

Influence de la défocalisation du laser sur une surface

La distance entre la surface à échantillonner et la longueur focale de la lentille ou FTSD (Focal To Sample Distance) est un facteur important influençant l'initiation du plasma, sa forme, son analyse spectroscopique et donc la quantité de matière ablatée, l'intensité des émissions radiatives de plasma et la taille de l'impact :

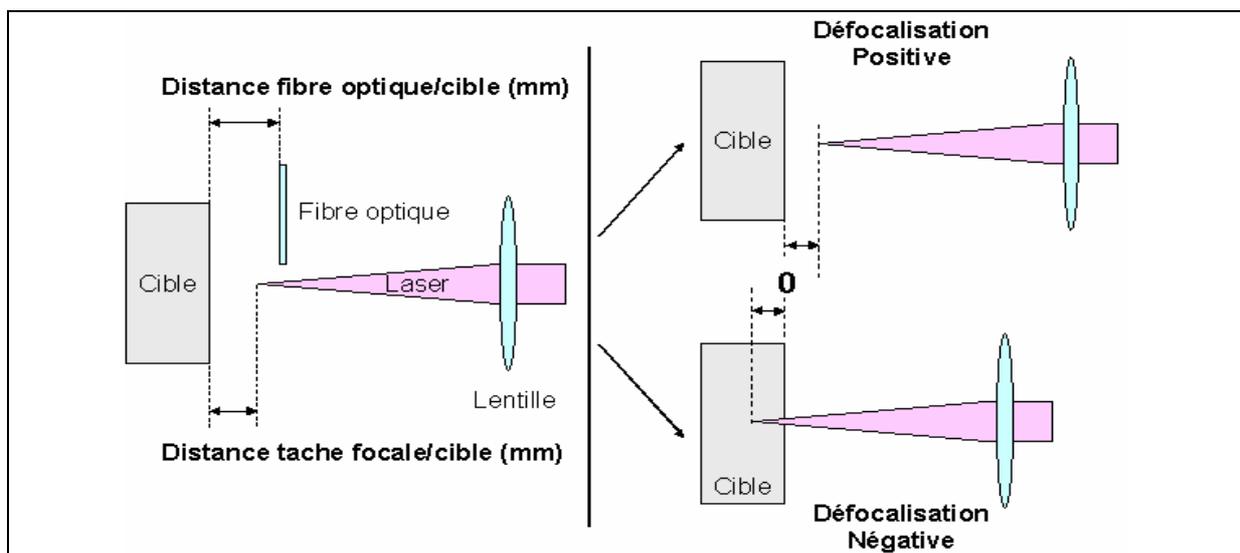


figure I-12 : Schéma de principe sur la défocalisation (FTSD)

- **FTSD négative ou défocalisation négative** : plasma froid et de petite taille. L'impact observé est caractérisé par un cratère profond (plusieurs dizaines de μm)
- **FTSD nulle** : distance lentille-cible égale à la distance focale. Un anneau chaud se forme autour du plasma, ce qui réduit les performances de l'analyse spectroscopique.
- **FTSD positive ou défocalisation positive** : plasma prenant la forme d'un plasma induit en milieu gazeux. Des molécules d'air ambiant peuvent participer à la formation du plasma. Les impacts observés sont généralement larges et superficiels.

La figure I-12 illustre également l'importance de la résolution spatiale pour imager des diverses zones du plasma. L. Dudragne [2] et S. Morel [3] ont montré que les états excités se répartissent différemment dans le plasma à cause des gradients thermiques et des effets complexes de l'onde de choc présentant une vitesse supersonique ($> 10^5 \text{ m.s}^{-1}$).

I.6.1.2. Calcul du rayon du faisceau laser au foyer de la lentille

Pour une FTSD de 0 mm, les formules d'optique permettent le calcul du diamètre **a** (en mm) du faisceau au foyer de la lentille :

$$a \approx f \cdot \theta \quad \text{équation I-6}$$

avec **f** la focale de la lentille en mm et **θ** la divergence du laser en radian, donnée par :

$$\theta = k \cdot 2,44 \cdot \frac{\lambda}{d} \quad \text{équation I-7}$$

λ est la longueur d'onde du laser, **d** le diamètre du faisceau et **k** le facteur de qualité du faisceau (nombre de fois la limite de diffraction) égal à 2 pour un laser Nd:YAG. D'où :

$$a \approx 2,44 \cdot \frac{kf\lambda}{d} \quad \text{équation I-8}$$

Pour une FTSD de 0 mm et avec $\lambda = 1,064 \cdot 10^{-3} \text{ mm}$; $f = 130 \text{ mm}$ et $d = 8 \text{ mm}$, le calcul donne un diamètre **a** du faisceau au foyer : **$a = 8,4 \cdot 10^{-2} \text{ mm} = 84 \pm 5 \mu\text{m}$** , d'où le rayon **r** correspondant du faisceau ($a/2$) égal à $4,2 \cdot 10^{-2} \text{ mm} = 42 \mu\text{m}$.

Si une surface est placée à la distance **f**, le cratère témoigne de l'ablation. La figure I-13 montre un impact mesuré, assez proche de la valeur théorique ($\sim 100 \mu\text{m}$ au lieu eu de $84 \mu\text{m}$).

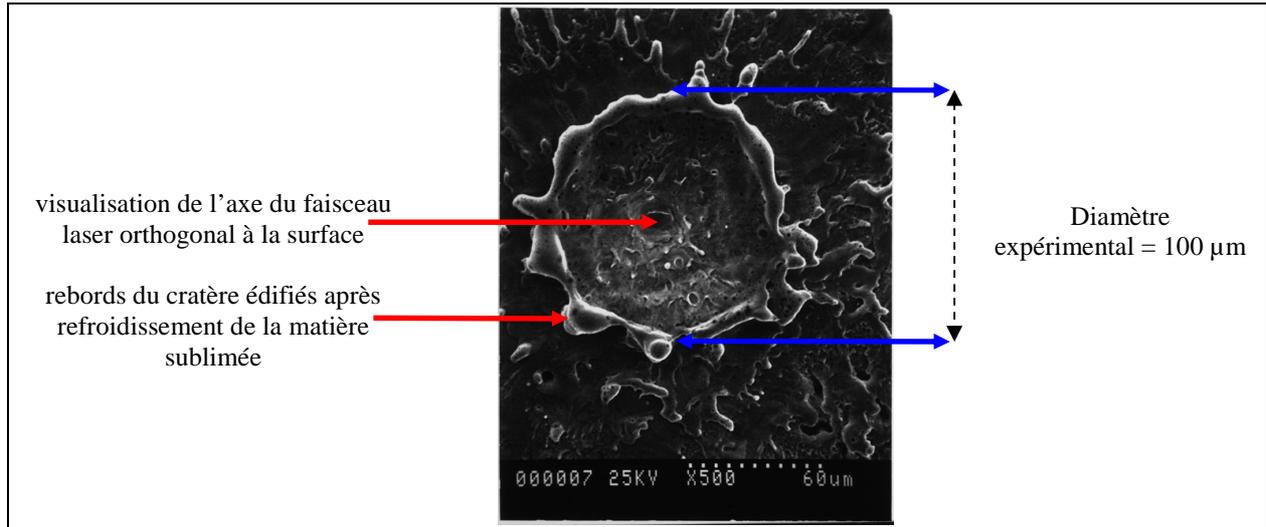


figure I-13 : Image MEB d'un impact sur cible métallique ($\lambda_{\text{laser}} : 1064\text{nm}$; $E_{\text{pulse}} : 100\text{mJ}$, FTSD : 0mm)

S. Morel [3] a établi une relation empirique entre le diamètre de la tache focale du faisceau laser et le diamètre de l'impact :

$$D_{\text{exp}} \approx 0,4.D_{\text{théo}} + 400 \quad \text{équation I-9}$$

Le diamètre d'impact total sur la surface est plus important puisque le plasma, opaque avec un laser à 1064nm, s'étale et érode la surface au delà du point focal. L'équation I-8 montre que le diamètre théorique a peut facilement être réduit :

- en augmentant la taille du faisceau, limitée par le diamètre de la lentille de focalisation,
- en diminuant la longueur d'onde du laser,
- ou en diminuant la longueur focale de la lentille.

Avec les valeurs considérées, nous obtenons $x = 1,38$ mm qui permet d'obtenir les valeurs de r^2 , le rayon du faisceau au point d'impact en fonction de la FTSD :

FTSD (mm)	$d' = \text{diamètre de l'impact en } \mu\text{m}$
0	84 ± 5
± 1	145 ± 9
± 2	206 ± 13
± 3	267 ± 17

tableau I-2 : Diamètre du faisceau laser à l'endroit de l'impact en fonction de la FTSD

I.6.1.3. Densité d'énergie dans le cas d'un faisceau laser focalisé dans l'air

La formation d'un plasma dans l'air ou en surface correspond à un phénomène de claquage ou "breakdown", c'est à dire à l'ionisation de l'air ou de la matière éjectée de la cible. Les conditions d'apparition d'un claquage dépendent de la densité d'énergie apportée. La densité d'énergie Φ apporté en W.cm^{-2} par le flux laser sur la surface en fonction des conditions expérimentales est calculée selon l'équation I-10 :

$$\Phi = \frac{P}{s} = 0,21 \cdot P \left(\frac{d}{kF\lambda} \right)^2 \quad \text{équation I-10}$$

P : puissance en W d : diamètre du faisceau en cm F : focale de la lentille (F = 13,0 cm)

λ : longueur d'onde du faisceau ($\lambda = 10,64 \cdot 10^{-5}$ cm)

k : facteur de qualité du faisceau Nd :YAG (k = 2)

La puissance du pulse laser est calculée par le rapport entre l'énergie du pulse laser et la durée du pulse : $P = \frac{E}{t_p}$, avec E, énergie du pulse laser (par exemple E = 100 mJ = $100 \cdot 10^{-3}$ J) et t_p , durée du pulse ($t_p = 6 \cdot 10^{-9}$ s).

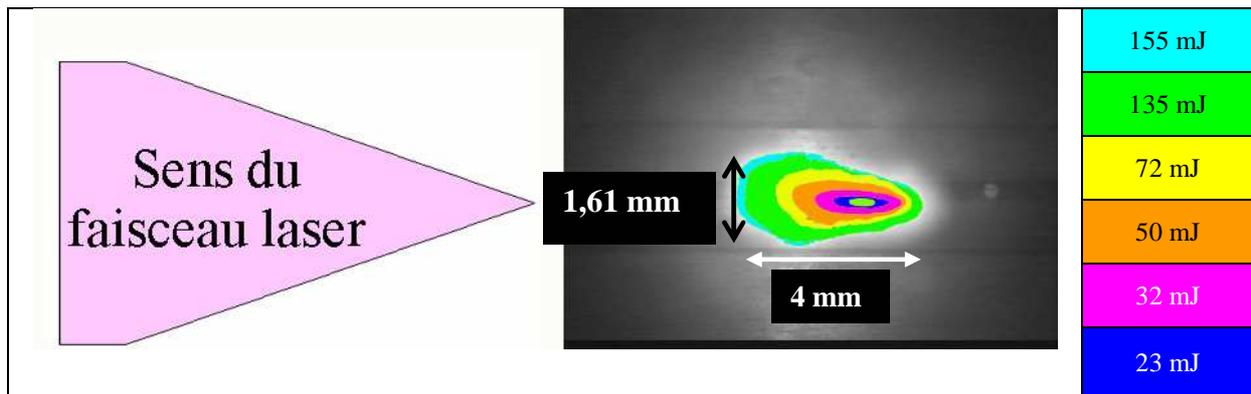


figure I-14 : Forme et dimensions d'un plasma ellipsoïdal induit dans l'air par laser ns, de longueur d'onde $\lambda = 1064$ nm, de diamètre 5 mm et focalisé par une lentille de focale 65 mm selon des énergies variables

Comme illustré par la figure I-14 et vérifié expérimentalement par Dudragne [2], les plasmas induits par pulse laser selon des paramètres optiques connus présentent une densité de puissance et une taille reproductibles qui permet comme on va le voir dans la suite du rapport de définir un volume d'échantillonnage d'une atmosphère.

La résolution spatiale des zones du plasma permettent de sélectionner les zones les plus émissives (aux environs du point focal de la lentille pour toute espèce) dans le but d'avoir des rapports signal/bruit optimisés (cf. figure I-15).

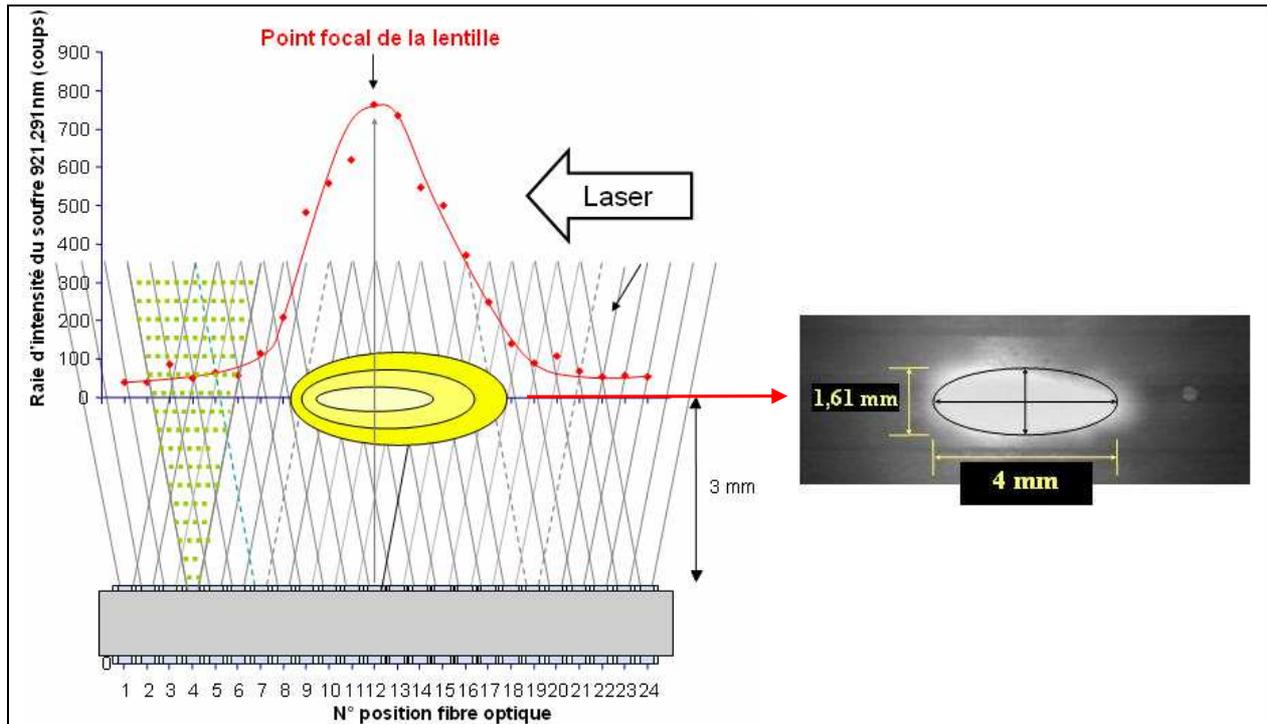


figure I-15 : Evolution de l'intensité des raies d'émissions (ici S) selon les zones du plasma résolues spatialement par observation par fibre optique – Méthode développée au CEB pour estimer la taille du plasma [1] [2]

I.6.1.4. Densité d'énergie de choc dans le cas d'un faisceau laser focalisé sur une surface

Connaissant les valeurs du rayon r' du faisceau en fonction de la défocalisation, la densité d'énergie Φ (en $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$) se calcule selon la surface du faisceau à l'endroit de l'impact :

$$\Phi = \frac{E}{\pi \cdot (r')^2 \cdot t_p} \quad \text{équation I-11}$$

Comme pour les paramètres précédents, la longueur focale a une grande influence sur la forme et la taille du plasma induit sur la cible solide : cet effet est différent selon la nature du matériau. L. Dudragne [2] a étudié, sur des cibles solides (PTFE et PVC) le comportement du plasma en fonction de la longueur focale et de la **FTSD** (Focus To Sample Distance, c'est à dire la localisation de l'échantillon solide par rapport au point focal).

Les changements, de longueur et de surface du plasma (avec la FTSD ou la focale de la lentille), entraînent une modification de la répartition spatiale des intensités de raies. Au niveau de l'analyse, une lentille de focale importante permet d'avoir un grand domaine de défocalisation où les intensités des raies sont significatives. C'est pourquoi pour nos études, une **lentille de longueur focale assez importante a été choisie (65 mm)** permettant ainsi un bon compromis pour analyser à la fois des gaz et des aérosols et expertiser des surfaces.

Le rôle de l'onde de choc est aussi crucial sur le signal spectroscopique obtenu. Pour des FTSD positives (point focal en dehors de la surface) Dudragne [2], Morel [43] observent la

présence d'un plasma atmosphérique situé près de la focale de la lentille et d'un autre plus petit sur la surface de l'échantillon (voir image de plasmas sur cible PVC avec figure I-16).

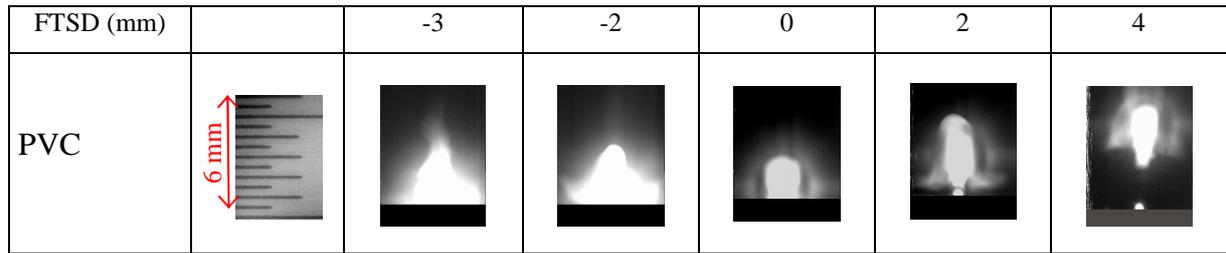


figure I-16 : Images de plasma induit sur cible de PVC en fonction de la défocalisation du laser

Les ondes de choc générées par les plasmas engendrent d'autant plus de mouvements de matière éjectées que la défocalisation est positive : les atomes en surface sont ainsi arrachés et aboutissent dans le plasma aérien, ce qui explique les profils des figure I-17 et figure I-18. Ces phénomènes doivent être pris en compte lors de l'ablation de contamination de surface pour éviter d'éjecter trop de matière.

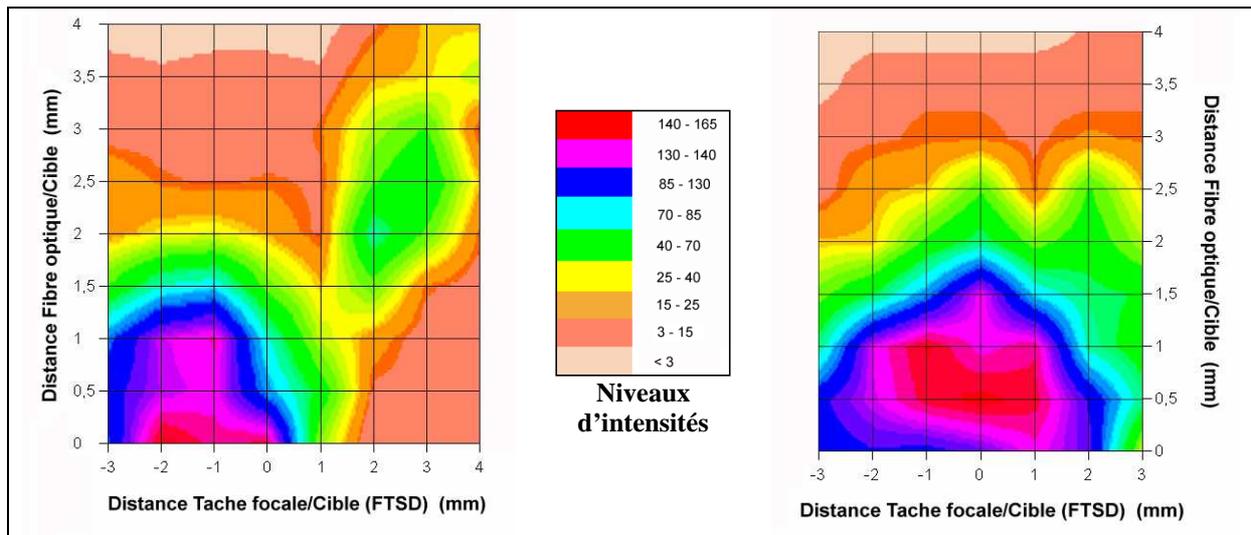


figure I-17 : Evolution des intensités selon les distances FTSD et fibre/cible dans le cas de la lentille de focale 65 mm

figure I-18 : Evolution des intensités selon les distances FTSD et fibre/cible dans le cas de la lentille de focale 130 mm

La FTSD influence l'initiation du plasma, sa forme, la quantité de matière ablatée et l'analyse spectroscopique.

La résolution spatiale des raies d'émission d'un plasma s'avère cruciale pour obtenir des intensités importantes et des rapports signal sur bruit optimisés.

I.6.2. Formation du cratère

I.6.2.1. Influence de la longueur d'onde

Le taux de matière éjectée (et donc la forme de la zone ablatée) est expliqué par la relation entre le coefficient d'absorption de la surface de la cible et la longueur d'onde émise :

$$\alpha = \frac{4\pi}{\lambda} \chi \quad \text{équation I-12}$$

avec α coefficient d'absorption de la surface, λ longueur d'onde du rayonnement et χ indice d'absorption du solide.

Le coefficient d'absorption augmente donc quand la longueur d'onde diminue. Fabbro *et al* [44] ont déterminé un taux de masse ablatée en $\text{kg.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ au moyen d'un laser verre néodyme à haute densité d'énergie ($10^{15} \text{ W.cm}^{-2}$), en doublant et en quadruplant sa fréquence par un cristal de dihydrogèphosphate de potassium (KDP). La corrélation expérimentale masse ablatée/longueur d'onde est la suivante :

$$m = 110. \left[\frac{\Phi_a}{10^{14}} \right]^{1/3} . \lambda^{-4/3} \quad \text{équation I-13}$$

avec Φ_a : flux absorbé en W.cm^{-2} .

Pour les raisons précédemment évoquées, nous considérerons toujours dans nos expériences la longueur d'onde fondamentale $\lambda=1064 \text{ nm}$ d'un laser pulsé Nd :YAG.

I.6.2.2. Influence de l'énergie

En fonction de l'énergie de pulse, la cible interagit plus ou moins avec le flux photonique. S. Morel [3] a calibré par profilomètre l'impact laser sur une peinture OTAN en polyuréthane (Microscope Confocal Lumière Blanche μSurf de Nanofocus GmBh). Cet appareil permet d'obtenir, par lecture optique, des vues topographiques de dessus, de profil et en 3D. Les impacts issus des plasma laser ont été étudiés selon l'énergie de pulse, le nombre de tirs, la fréquence du laser.

Les impacts laser produits pour des énergies de pulse variant de 20 à 150 mJ (cf. figure I-19) présentent un diamètre compris entre 100 et 500 μm lorsque la focalisation correspond à une FTSD de -2 mm , valeur en accord avec celle obtenue avec les images MEB.

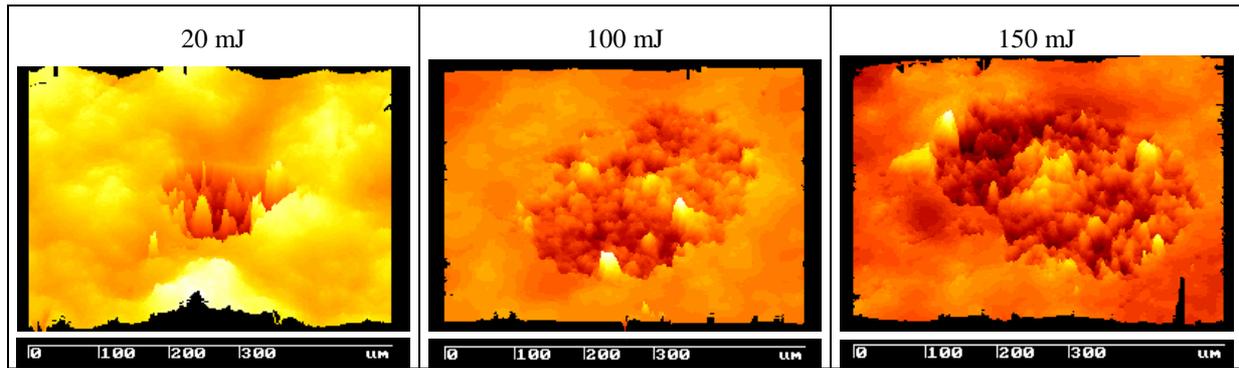


figure I-19 : Images d'impact obtenues sur une peinture OTAN à l'aide d'un profilomètre pour différentes énergies laser (Nombre de tir : 1 ; Distance focale : 130 mm ; FTSD : -2 mm).

Une relation empirique est extrapolée entre le diamètre expérimental du cratère et la densité de puissance Φ utilisée et permet d'estimer le diamètre d'impact :

$$D_{\text{exp}} \approx 1,84 \cdot 10^7 \cdot \Phi^{-0,5} + 400 \quad \text{équation I-14}$$

Dans une deuxième étape, l'influence du nombre de tirs sur la taille des impacts est étudiée (cf. figure I-20). Pour d'un seul tir laser, le profil de l'impact est très « torturé ». Pour 10 tirs, la zone d'analyse apparaît comme une concavité de révolution sphérique. Une comparaison entre 10 tirs effectués tir à tir et à 50 Hz montre dans le même tableau que l'impact à 50 Hz est moins régulier et élargi : le matériau n'a pu se refroidir avec un tir toutes les 20 ms.

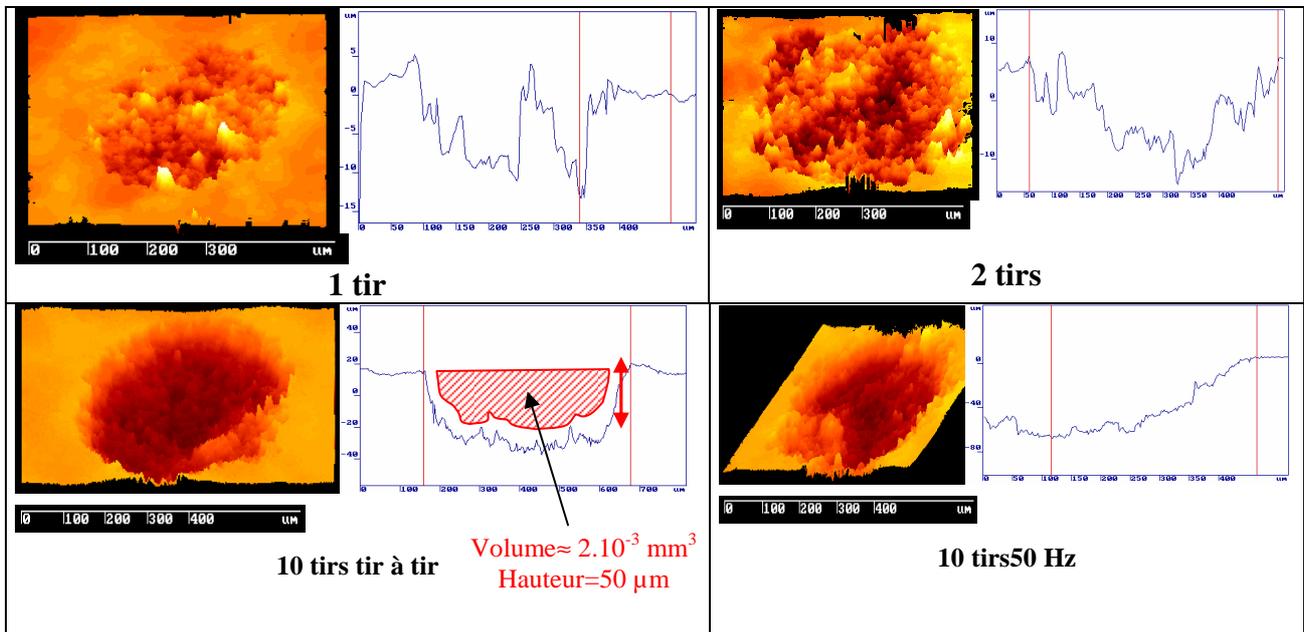


figure I-20 : Images d'impact obtenues sur une peinture OTAN à l'aide d'un profilomètre pour différents nombres de tirs laser (Energie de pulse : 100 mJ ; Distance focale : 130 mm ; FTSD : -2 mm).

Un contrôle de la profondeur ablatée est possible comme montré par Dudragne dans sa thèse qui ablate sélectivement des couches d'or d'épaisseurs nanométriques connues déposées par plasma sur du PTFE. La figure I-21 montre qu'un seul tir à 80 mJ permet de creuser intégralement une couche de 30 nm d'or par le suivi de la raie Au à 751,073 nm. De même,

pour un tir à 100 mJ, il est possible d'estimer l'épaisseur maximale ablatée sur une couche d'or d'épaisseur variable : 35 nm permettent de protéger du PTFE comme le montre l'évolution de la raie du fluor à 755,224 nm présentant un palier.

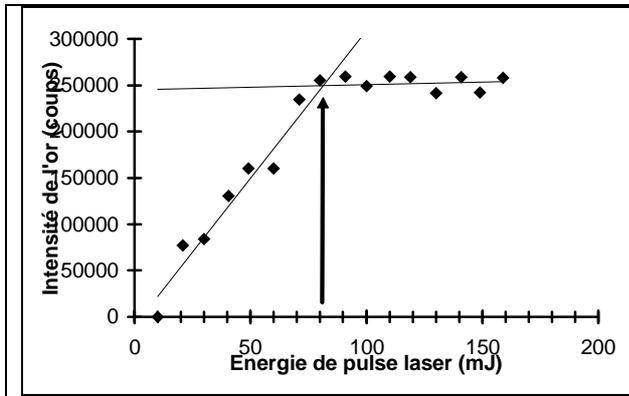


figure I-21 : Evolution de l'intensité de la raie de l'or à 751,073 nm en fonction de l'énergie de pulse laser – Cible PTFE recouverte de 30 nm d'or

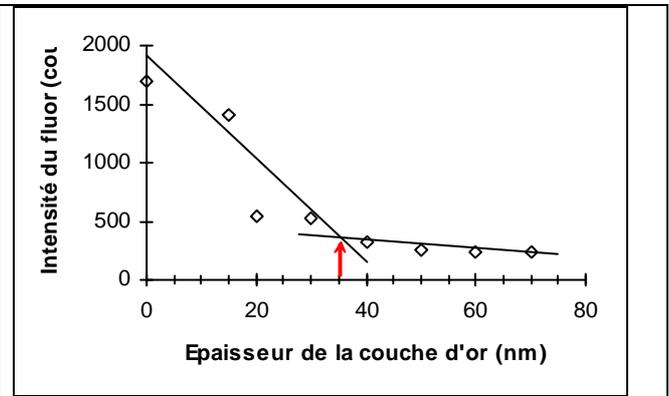


figure I-22 Evolution de l'intensité de la raie du fluor à 755,224 nm en fonction de l'épaisseur de la couche d'or déposée sur la cible de PTFE – Energie de pulse = 100 mJ – Défocalisation négative = -2 mm.

Selon la densité de puissance et le nombre de pulse accumulés sur une position d'une surface, l'ablation laser permet de résoudre en profondeur et latéralement la composition d'une surface. Les applications sont alors nombreuses : discrétisation d'une contamination surfacique de la surface elle-même, résolution spatiales des structures multi couches en microélectronique, etc.

I.6.3. Influence de la FTSD sur le diamètre d'impact

Comme la surface de la tâche focale du faisceau laser varie avec la distance tâche focale–surface (FTSD), il faut mesurer la surface de l'impact selon la FTSD (cf. figure I-23) :

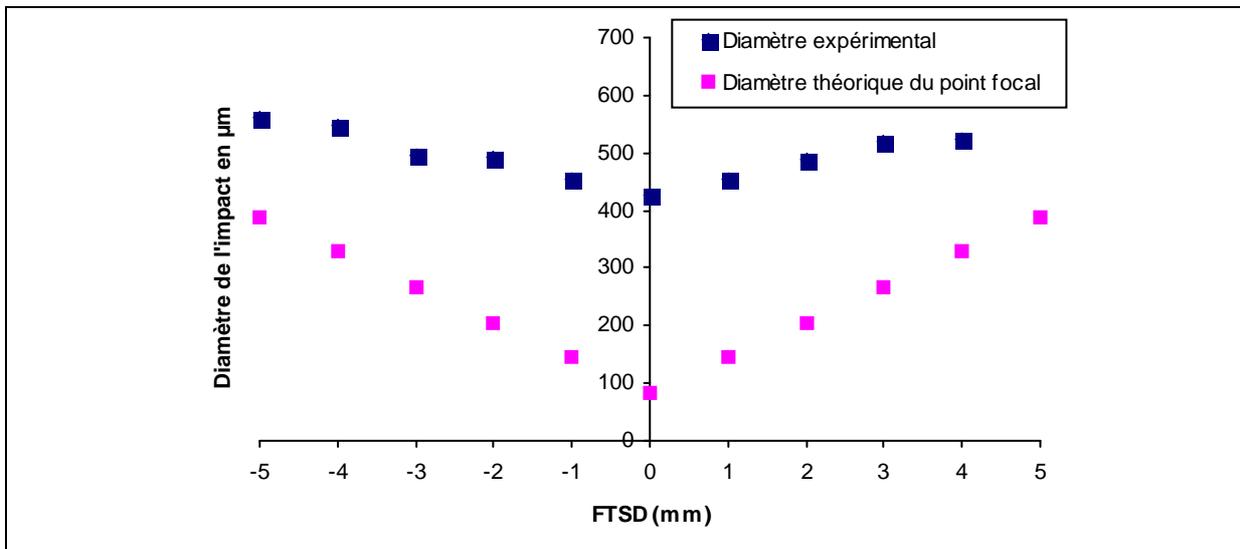


figure I-23 : Evolution du diamètre théorique et expérimental de l'impact en fonction de la FTSD.

La taille de l'impact est symétrique par rapport à une défocalisation nulle tout comme la taille de la tâche focale du faisceau symétrique par rapport au point focal de la lentille.

L'analyse spectroscopique de l'ablation laser contrôlée et issue de l'interaction entre un pulse ns et une surface constitue donc un outil analytique étalonné.

I.6.4. Conclusion : la LIBS comme méthodologie analytique calibrée

La LIBS permet donc la génération d'un plasma dont les caractéristiques sont maîtrisées en termes de :

- volume de gaz ou quantité de matière ablatée
- analyses qualitatives des espèces composant le plasma
- exploitations quantitatives des intensités de raies d'émission à des fins de dosage, mais aussi d'identification et de classification comme illustrée dans la suite.

I.7. CAS PARTICULIER DE LA PRESENCE DE PARTICULES DANS UN GAZ : AEROSOL, NANOMATERIAUX, CLUSTERS DE CONDENSATION

I.7.1. LIBS et aérosols

La présence de particules dans un gaz, et dans l'air en particulier, exprime la situation traditionnelle de milieux naturels ou industriels caractérisés par un système binaire, voire ternaire. En effet, les centres de nucléations (ions métalliques, clusters, etc.) sont responsables d'agrégats moléculaires, en général des molécules d'eau, mais peuvent être le support d'aérosols toxiques (vapeurs de composés organiques volatiles – COV – en postcombustion, émanations d'élevage industriels, activités agricoles de traitements, etc.).

Dans ces conditions, l'étude de la LIBS en milieu appelé aérosol revêt un caractère particulièrement important tant par la diversité des applications que par la qualification nécessaire du volume du plasma créée par le pulse laser. Le volume du plasma dépend des propriétés diélectriques du gaz en général de l'air dans les activités de la sécurité civile et militaire, mais également des aérosols présents, de leur composition et des agrégats métalliques associées, voire des bactéries, spores ou grains de pollen.

Les mécanismes d'interactions entre une particule et un laser focalisé induisant un plasma sont complexes. La physique des plasmas fournit peu d'informations concernant les processus physiques et les échelles temporelles de dissociations d'une particule dans un plasma de durée de vie courte (croissance en quelques ns, puis relaxation en quelques μ s).

Martin *et al.* [45] ont fait une revue sur les couplages LIBS pour l'analyse d'aérosols. Fondamentalement, les mécanismes du couplage LIBS-particule(s) sont voisins de ceux du gaz avec des seuils de claquage abaissés (présence de microparticules), par contre l'échantillonnage apparaît statistique, ce qui nécessite un protocole particulier.

I.7.2. Spécificité de l'échantillonnage de particules par un plasma

L'axe essentiel de notre étude va résider dans l'analyse par LIBS d'un aérosol (aqueux ou minéral) et de ce fait la densité de l'aérosol en terme de particules par unité de volume est l'un des enjeux majeurs. La notion d'échantillonnage sans prélèvement préalable constitue l'intérêt essentiel de la LIBS. Encore faut-il pouvoir définir le volume d'analyse et la probabilité de présence de l'aérosol dans le volume d'analyse concerné ou encore peut-on l'exprimer en terme de probabilité de rencontre entre un plasma localisé et des particules souvent de taille de quelques micromètres. Des variations dans la densité d'aérosols peuvent affecter la probabilité qu'une particule soit le volume plasma. Plusieurs possibilités existent :

- **Aucune particule n'est présente** dans le volume plasma,
- **Particule localisée dans les régions périphériques du plasma**, donc froides et par conséquent présentant de faibles irradiances,
- **Particules localisées dans les régions les plus denses en énergie du plasma**, au centre du plasma et par conséquent présentant de très hautes irradiances.

Pour échantillonner des particules d'aérosols, un modèle de distribution en loi de Poisson sera considéré et basé sur la concentration N en particules et le volume d'échantillonnage V . La probabilité F qu'une particule soit dans un volume d'échantillonnage V donné (soit la région spatiale définie par le faisceau laser focalisé, soit celle représentée par le volume physique du plasma) peut être calculée selon l'équation déjà définie par :

$$F = 1 - e^{(-V \cdot N)} \quad \text{équation I-15}$$

Grâce à ce modèle probabiliste, de nombreuses applications ont été effectuées pour analyser directement sur les aérosols en vol.

L'équipe de Hahn a largement contribué à ce domaine par une analyse conditionnelle en monocoupe sur des particules uniques afin d'améliorer la sensibilité de la méthode [46] [47]. Cette étude statistique repose sur la connaissance du volume du plasma. L'étude de Carranza et Hahn [83] propose la détermination du volume du plasma sous trois aspects : statistique, physique et le dernier basé sur les émissions du plasma. Lors de cette étude un laser ND:YAG

délivrant une énergie de pulse de 315 mJ permet de générer des plasmas hautement reproductibles. L'analyte utilisé est une solution contenant des particules de silices de différentes tailles (diamètres de 1,0 ; 1,5 et 2,1 μm) dispersées sous forme d'aérosol de concentration comprise entre 2 et 5 particules. cm^{-3} . L'analyse conditionnelle en mono tir, repose sur la validation d'une interaction plasma/particule lorsque l'intensité de la raie de l'élément observé dépasse une certaine limite.

Le volume statistique du plasma est déterminé à l'aide de la loi de Poisson de l'équation I-15. F représente le taux de rencontre plasma/particule, et μ le nombre moyen de particules dans le volume du plasma. Ce dernier est définie par :

$$\mu = N \cdot V \quad \text{équation I-16}$$

N est la densité de particules dans l'aérosol et V le volume du plasma. Pour de faibles valeurs de μ le taux de rencontre plasma/particule peut être approximé : $F \approx \mu \approx NV$

Le volume statistique V_s du plasma est alors donné par :

$$V_s = -\ln(1 - F) / N \quad \text{équation I-17}$$

Une solution de particules de silice de 2 μm de diamètre a permis de déterminer un volume statistique de $1,17 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$. Le médiocre coefficient de détermination ($R^2=0.931$) de la courbe ($-\ln(1 - F) = f(N)$) ayant permis de calculer ce volume s'explique par l'interaction laser/particule avant le point focal provoquant la formation du plasma et l'enregistrement d'une interaction plasma/particule faussant ainsi le taux de rencontre F .

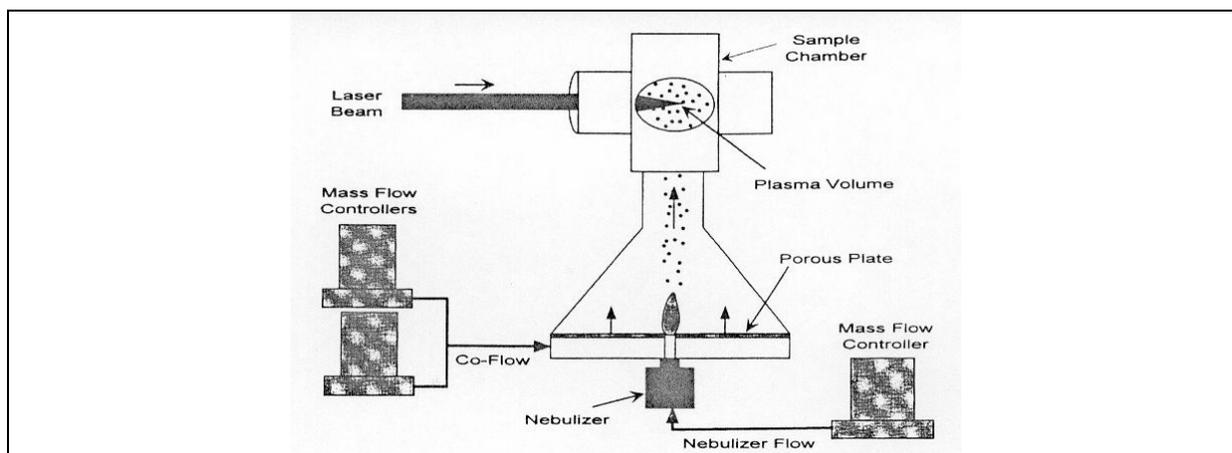


figure I-24 : Schéma du système de génération d'aérosol couplé avec une chambre d'analyse LIBS

Pour des aérosols de faibles densités particulaires, la concentration massique d'analyte par volume de gaz C peut être déterminée par une analyse conditionnelle, en employant le protocole décrit précédemment selon :

$$C = XF \quad \text{équation I-18}$$

X est la concentration massique équivalente en intensité moyennée sur l'ensemble des spectres validés, F est le taux de rencontre plasma-particule. Plus classiquement $C = mN$, m est la masse moyenne d'analyte par particule. En couplant avec les équations précédentes on obtient la relation :

$$X = m/V \quad \text{équation I-19}$$

V est ici le volume du plasma basé sur ses émissions. Le volume obtenu est de $2,38 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$.

Hahn en extrapole la taille d de la particule analysée par la relation :

$$d = \left(\frac{6 \cdot x \cdot V}{\pi \cdot \rho \cdot f} \right)^{1/3} \quad \text{équation I-20}$$

avec ρ la densité de la molécule dont est issue la particule, f la fraction massique de l'élément d'intérêt par rapport à la molécule, x la teneur massique de l'élément dans le volume plasma V.

Le volume physique du plasma est obtenu en mesurant l'absorbance de celui-ci. Un second faisceau laser (Nd : YAG, 532 nm) est tiré 20 ns après le faisceau initiale (Nd : YAG, 1064 nm), en mesurant sa transmission (loi de Beer-Lambert), rapport de l'énergie transmise sur l'énergie du faisceau en l'absence de plasma, les limites du plasma sont ainsi dessinées. Le volume physique est alors de $1,44 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$.

Les trois volumes de plasma obtenus par Hahn sont relativement proches bien que provenant de phénomènes différents, la nature statistique du prélèvement d'une particule par un plasma, la vaporisation de la particule pour le plasma physique, la diffusion de l'analyte pour le volume calculé selon les émissions du plasma.

Il ressort de cette étude que le volume statistique du plasma n'est pas homogène lorsque l'on considère l'interaction plasma/particule. Le volume du plasma calculé à partir des émissions du plasma est nettement plus grand que le volume statistique et est indépendant de la taille des particules introduites indiquant que les particules dans le plasma sont totalement vaporisées.

L'accumulation matière particulaire par filtration par exemple est également effectuée.

Etant donnée son caractère d'analyse in situ, sensible, reproductible, de multiples études relatent le couplage de la LIBS pour la détection de matière particulaire sous forme suspendue ou déposée :

- Hahn *et al.* [48] [49] détectent des effluents métalliques dans l'atmosphère,

- De même, Carranza *et al.* [50] échantillonne l'air ambiant pour détecter les résidus métalliques de feux d'artifice,
- Buckley *et al.* [51][52] échantillonnent les particules minérales de l'air urbain prélevé et concentré par impaction,

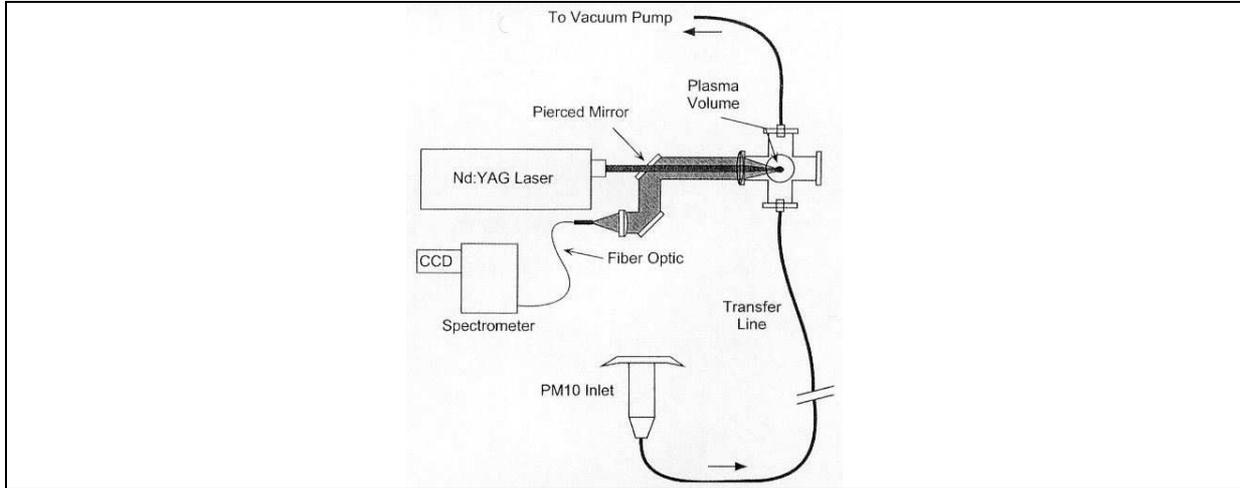


figure I-25 : Schéma du système d'échantillonnage de l'air ambiant via un PM10

- Panne *et al.* [53] analysent des filtres sur lesquels ont été préalablement impactés des particules d'air ambiant,

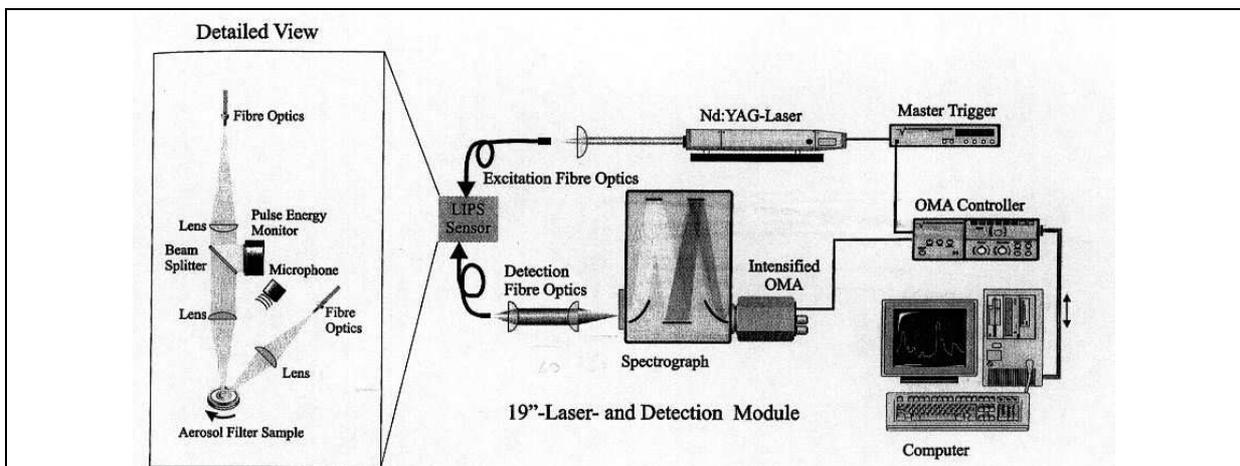


Figure I-26 : Dispositif expérimental pour l'analyse LIBS d'aérosols de métaux lourds sur filtres

- Lombaert *et al.* [87] collectent les effluents de gaz d'échappement moteur diesel sous forme de suies et d'espèces métalliques témoins du fonctionnement et de l'usure moteur.

L'analyse au vol d'aérosols par la technique LIBS apparaît moins abordée et développée que l'analyse de gaz ou de surfaces denses telles que les solides : le problème d'échantillonnage est important comme nous le verrons dans les prochains chapitres.

La bibliographie illustre une grande variété d'application de la LIBS pour la matière particulaire.

I.7.3. Modèle de dissociation de particules dans un plasma induit par laser ns

La dissociation d'une particule représente des procédés complexes mêlant : la fusion de la particule, sa vaporisation, sa fragmentation, sa sublimation, son ionisation moléculaire, sa dissociation et son ionisation atomique. [54] [55]

Un modèle simple serait que les phénomènes de dissociation et d'émission soient instantanés et spatialement homogènes. Or expérimentalement, Lithgow *et al.* ont constaté une inhomogénéité de l'émission [52] avec des zones davantage émissives et liées aux différences de température du plasma.

De même, Hahn *et al.* [56] ont estimé la masse maximale qu'un pulse laser Nd :YAG à 1064 nm d'énergie 320 mJ - focalisé pour avoir une tâche focale de diamètre 100 μm – pouvait vaporiser en considérant l'analyse de billes de silice microniques de diamètre 1 à 5,1 μm en suspension. L'analyse spectrale montre un palier des intensités émises pour les raies du Si à partir de diamètre supérieur à 2,1 μm : toute la masse n'est pas analysée pour une quantité donnée de puissance.

Horeither *et al.* [57] [58] [59] imagent et analysent spectralement l'interaction entre un plasma et des billes de borosilicates de diamètre 2 μm . Le taux de rencontre entre les pulses et les particules suspendues est d'environ 20%. L'imagerie résolue dans le temps des interactions entre le plasma et une particule montre une diffusion d'espèces atomiques (par exemple le calcium) provenant de la particule dans le plasma selon une valeur de l'ordre de diffusion de plusieurs $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Il est mis en évidence que la particule n'agit pas directement avec le faisceau laser mais avec le plasma.

La résolution temporelle des raies d'émission met aussi en évidence une dissociation de ces espèces Ca avec le temps de l'ordre de 10 μs : cela permet de dimensionner la durée d'acquisition des spectres qui doivent être assez longues (on choisit une durée de 20 μs).

Le couplage plasma induit par laser avec des aérosols est complexe et encore peu compris. Nous allons dans notre étude exploiter les acquis obtenus pour l'analyse des gaz et des surfaces pour calibrer l'analyse d'aérosols.

I.7.4. Paramètres influents de l'interaction laser/particule

I.7.4.1. Seuil de claquage

La présence de particules d'aérosols diminue le seuil de claquage d'un gaz et par conséquent le favorise [60]. La détection de la composition de ces agrégats de tailles variant de quelques

nanomètres (10^{-9} m) à quelques microns (10^{-6} m), leur absorbance étant en fait plus importante que celle des molécules O_2 ou N_2 .

I.7.4.2. Efficacité d'ionisation

L'interaction entre un faisceau laser et des particules a fait l'objet de multiples études théoriques et expérimentales. Les mécanismes d'interaction entre une particule d'aérosol et un faisceau laser hautement énergétique sont nécessaires pour développer une analyse de particules par LIBS.

Généralement, **avec des faisceaux laser de basse énergie**, l'absorption par l'aérosol de la radiation électromagnétique et sa dispersion sont les facteurs dominants de l'interaction laser-matière [61] [62]. Ces phénomènes sont largement utilisés pour des problématiques environnementales telles que les transferts radiatifs, les modifications climatiques ou de quantité de particules dans l'air. Des outils analytiques sont développés pour ces usages : par exemple le LIDAR dont le principe est basé sur la rétrodiffusion d'une onde laser incidente ou les mesureurs de tailles de particules (granulomètres optiques).

Au contraire, une interaction entre une ou plusieurs particule(s) et un faisceau laser de haute énergie comme en méthode LIBS entraîne d'autres phénomènes prédominants : chauffage rapide de la matière et vaporisation instantanée des particules. Dans le cadre de la LIBS, Armstrong et al [63] ont proposé un modèle pour le mécanisme d'interaction entre laser et matière particulaire.

A l'issue des observations expérimentales, deux principaux facteurs semblent impliquer le claquage induit par laser des aérosols :

1. **Le nombre total de particules ou densité particulaire N et la granulométrie** ou distribution en taille des aérosols $f(D_p)$ avec D_p la taille des particules.
2. **Le volume focal V** du faisceau laser à la position de formation du plasma.

Radziemski *et al.* [4] suggèrent une expression pour calculer le seuil de claquage I_{seuil} des aérosols selon la résolution de l'inéquation suivante :

$$N \int_{D_p^0(I)}^{\infty} v(I)F(D_p)dD_p \geq 1 \quad \text{inéquation I-21}$$

avec : $D_p^0(I)$ le plus petit diamètre de particule détectable pour une valeur I d'irradiance laser donnée ; $v(I)$ le volume dans la tâche focale du faisceau où l'irradiance est supérieure à la valeur du seuil de claquage I_0 . La valeur du seuil de claquage I_{seuil} est alors la plus petite valeur I pour laquelle l'inéquation I-21 est satisfaite.

I.7.5. Cas particulier des aérosols aqueux

La modification du claquage diélectrique d'un gaz en présence d'aérosols aqueux fait l'objet de nombreuses études tant sur le plan de la prévision des orages que dans celui du domaine de la sécurité industrielle (cas des disjoncteurs par exemple). A titre d'illustrations, on peut citer les travaux de Chang, Eickmans *et al.* [64] [65] qui ont examiné par résolution spatiale les émissions d'aérosols de microgouttelettes aqueuses.

I.8. CONCLUSIONS

Le savoir accumulé pour l'expertise LIBS de surfaces ou de gaz permet d'appréhender le couplage de la LIBS pour l'analyse de l'échantillon le plus complexe : les particules d'aérosols. En suspension dans un gaz vecteur ou déposées en surface, ces dernières constituent un milieu binaire.

Les prochaines étapes consisteront donc à :

- Etudier la faisabilité de la détection des espèces atomiques contenues dans les particules d'aérosols à partir des performances analytiques des bancs expérimentaux initialement développées pour l'analyse LIBS de gaz et surfaces,
- Adapter les configurations optiques et mécaniques pour discrétiser les particules d'aérosols par rapport à leurs matrices interférentes,
- Exploiter – après optimisation – les marqueurs propres à la catégorie d'échantillons d'intérêt (particules et matrices (gaz et surfaces)).

II. CARACTERISTIQUES DES UNITES D'ANALYSES LIBS REALISEES

II.1. CARACTERISTIQUES DE BASES D'UNE CHAINE DE MESURE PAR LIBS

Lors des trois thèses menées au CEB entre 1992 et 2002 sur la thématique de la LIBS, un montage expérimental calibré été développé pour répondre aux fonctions de la LIBS :

1. Génération de plasmas calibrés en taille et densité de puissance pour gaz et surfaces,

2. Résolutions des raies d'émissions issues du plasma, selon trois niveaux :

- **spatiale** (échantillonnage optique des zones du plasma présentant les rapports signal sur bruit maximisés),
- **spectrale** (séparation des longueurs d'onde caractéristiques des raies d'amission),
- **temporelle** (décalage de l'acquisition pour minimiser le RSB et durée d'intégration optimisée des émissions radiatives)

Les études ont principalement été effectuées grâce à un montage de laboratoire développé depuis 1992 au CEB mais qui a été modifié durant cette thèse :

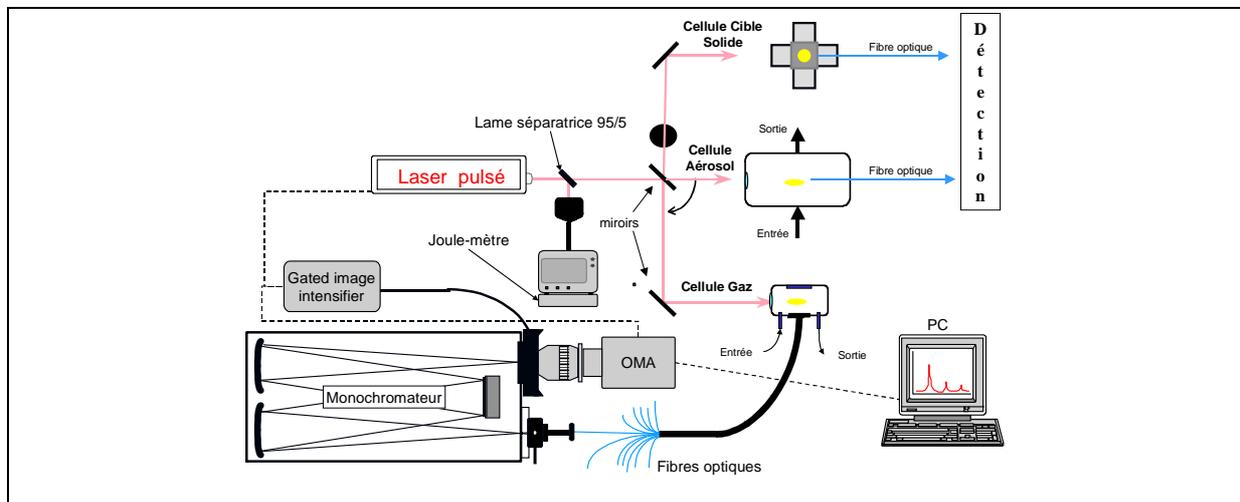


figure II-1 : Schéma de principe du montage LIBS de laboratoire avec laser, réacteurs, fibre optique, spectromètre, détecteur

1. **Remplacements de matériels obsolètes et en fin de vie** (détecteur)
2. **Acquisition de nouvelles technologies** : détecteur iCCD intégrant intensificateur et générateur de portes temporelles (Roper PI MAX), laser miniaturisé (Quantel CFR200 et spectromètre compact à large bande spectrale et son détecteur iCCD (Andor Mechelle complet). Les protocoles et paramètres pour détecter les gaz et surfaces sont conservés.

3. Conception d'un réacteur pour aérosol, en s'inspirant des acquis sur les gaz.

Le protocole débute par le déclenchement d'un pulse d'un des deux lasers Nd :YAG (quelques ns et $\lambda=1064$ nm) équipant le banc. Les pulses sont acheminé par des miroirs de renvoi vers une lentille de focalisation montée, soit en face avant de la cellule d'analyse de gaz et d'aérosols, soit au-dessus de platines motorisées pour les surfaces.

Le pulse laser engendre, au niveau de la focale de la lentille (65 ou 130 mm), la formation d'un plasma thermique dont les émissions radiatives sont recueillies par une fibre optique (longueur : 3 m), et acheminées vers un spectromètre (monochromateur ou spectromètre à réseau Echelle). En sortie de ce dernier, un détecteur intégrant un intensificateur couplé à un générateur de portes temporelles permet une résolution temporelle des émissions du plasma. L'utilisation d'un détecteur iCCD muni d'un pavé de 1024 x 1024 photodiodes permet une analyse spectrale sur différents domaines suivant le réseau utilisé (10 nm ou 40 nm avec les réseau holographiques respectivement à 1200 traits/mm et 300 traits/mm ; ou un spectrogramme global de 200 nm à 1000 nm avec le réseau Echelle). Les données sont recueillies par un ordinateur et présentées sous forme de spectre.

II.2. VUES D'ENSEMBLE DES APPAREILLAGES COMPOSANT LA CHAÎNE LIBS DU LABORATOIRE

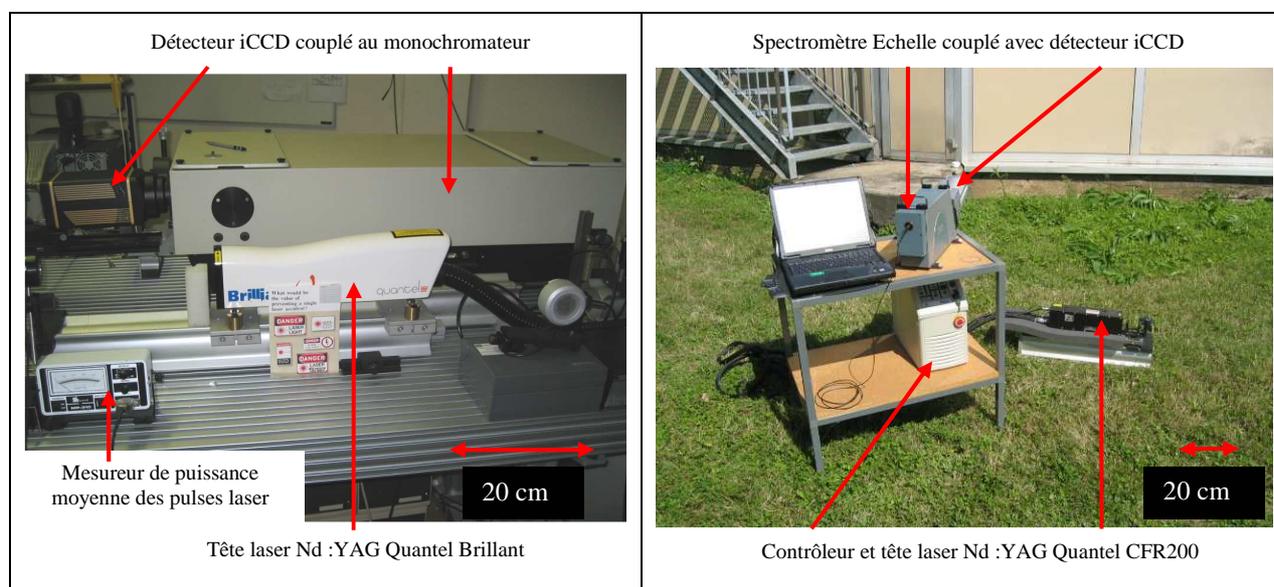


figure II-2 : Photographie des composants de base du dispositif d'analyse LIBS de référence. A gauche, les dispositifs de laboratoire ; à droite, les nouveaux appareillages compacts pour appréhender les analyses sur un dispositif transportable

La figure II-2 illustre les générations anciennes et éprouvées de monochromateur et laser, avec les nouvelles technologies de lasers et spectromètres compacts et mobiles.

II.3. PROCÉDE D'ÉLABORATION DU PLASMA

II.3.1. Lasers Nd :YAG

Deux lasers équipent le banc expérimental du laboratoire.



figure II-3 : Tête laser Quantel Brilliant



figure II-4 : Tête laser Quantel Big Sky CFR 200

II.3.1.1. Le laser Quantel Brilliant

Le laser Quantel Brilliant a été retenu pour son importante fréquence de répétition de 50 Hz., en particulier adaptée pour l'analyse en phase gazeuse avec un rapport signal sur bruit optimisé en accumulant sur une seule analyse de 500 à 1000 tirs, tout en gardant un temps d'analyse acceptable de 10 à 20 secondes [2].

Brilliant est un laser Nd :YAG pulsé à une longueur d'onde de 1064 nm. Il comprend une baie d'alimentation et une tête laser monolithique constituée d'un barreau YAG dopé Nd³⁺ (6 mm de diamètre et 115 mm de long) et d'une lampe flash, dans une cavité de pompage (diffuseurs céramiques).

L'énergie de pulse laser est continûment réglable entre 10 et 160 mJ, non pas en jouant sur la tension imposée à la lampe flash, mais en décalant dans le temps le trigger du Q-switch interne par rapport à l'ordre de tir de la lampe flash. Nous parlerons de délai de fluorescence.

Le laser possède une sortie TTL (0-5V), sur la baie d'alimentation, ajustable de -500 à +500 ns, permettant la synchronisation entre l'émission d'un pulse laser et la détection spectroscopique.

II.3.1.2. Le laser Quantel Big Sky CFR200

Généralant des pulses similaires en durée et longueur d'onde par rapport au Brillant, le CFR200 a été choisi pour sa robustesse et sa compacité tant pour la tête (étanche à la poussière et durcie) que pour le contrôleur assurant l'alimentation électrique, ceci afin d'appréhender le développement d'un dispositif LIBS transportable.

L'énergie des pulses est réglable de 10 à 225 mJ en modifiant la tension de la lampe Flash. La fréquence de tirs est un peu moindre que le Brillant (simple tir ou 1, 2, 5, 10 et 15 Hz). Comme le Brillant, le CFR 200 est contrôlable à distance par des contrôles commandes développées au CEB.

II.3.1.3. Caractéristiques des lasers Nd :YAG

	Brillant	CFR200
Longueur d'onde	1064 nm	1064 nm
Tête laser		
Dimension : L x l x H (cm)	47 x 8 x 14	32 x 9 x 8
Poids (kg)	5	3
Baie d'alimentation		
Dimension : L x l x H (cm)	59 x 29 x 57	37 x 36 x 19
Poids (kg)	43	12
Energie maximale	160 mJ	225 mJ
Fréquences de répétition	Tir à tir (surface) ou de 5 à 50 Hz (gaz ou aérosols)	Tir à tir (surface) ou de 1 ; 2 ; 5 ; 10 ou 15 Hz (gaz ou aérosols)
Dérive en énergie à 50Hz sur 8 heures de fonctionnement	± 3 %	± 4 %
Stabilité en énergie tir à tir	± 3 %	± 4 %
Pulse		
Durée	6 ns	8 ns
Diamètre en sortie de tête	5	5,27
Divergence	0,34 mrad	1,08 mrad

tableau II-1 : Principales caractéristiques des lasers Brillant (Nd :YAG à $\lambda=1064$ nm)

La grande reproductibilité (écart type inférieur à 2%) entre chaque pulse d'énergie entre 50 et 200 mJ explique la grande reproductibilité des volumes échantillonnées par le plasma.

La figure II-5 illustre la reproductibilité des pulses laser délivrés selon l'énergie proportionnelle à la tension de la lampe flash du laser Nd :YAG CFR200. Sur ce modèle, la variation de tension peut expliquer la forte variabilité à basse énergie.

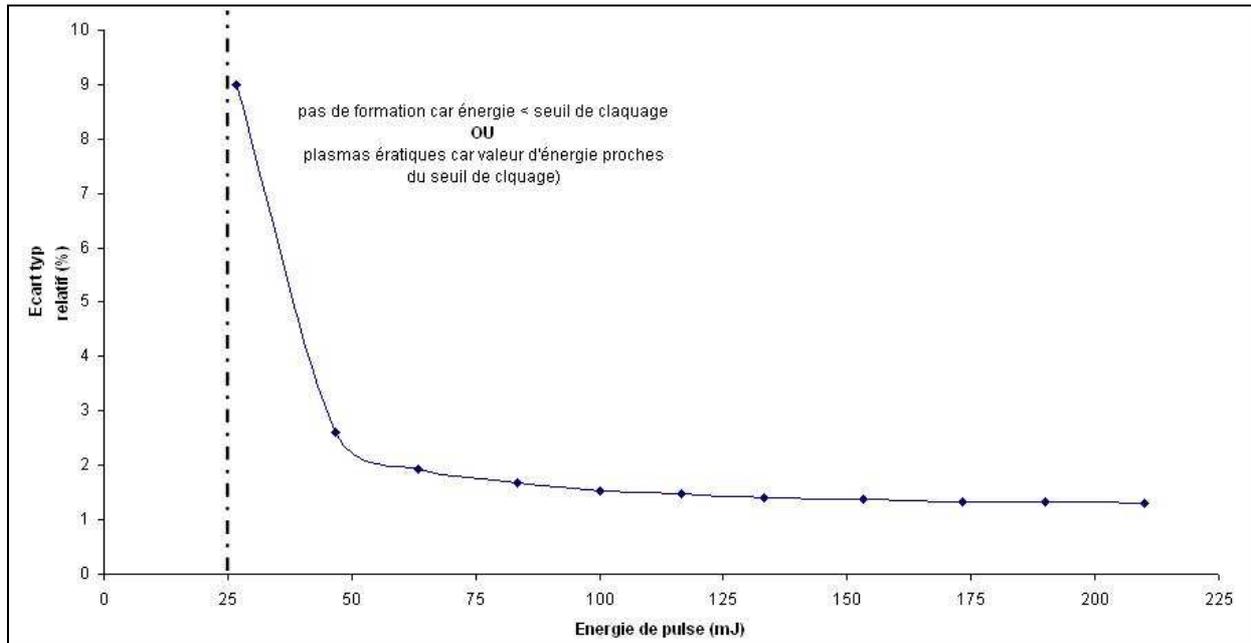


figure II-5 : Reproductibilité mesurée pour le laser Quantel Big Sky selon l'énergie délivrée et mesurée par calorimétrie sur 10 séries de 10 tirs pour chaque valeur d'énergie

II.3.1.4. Système optique (miroir et lentille)

Le faisceau laser est acheminé vers la lentille à l'aide de miroirs de façon à obtenir une orientation verticale du faisceau perpendiculairement à la lentille. Les miroirs sont plans, de diamètre 38 mm, d'épaisseur 10 mm et de réflexion maximale à 1064 nm (Melles Griot : 02 MPG 009/291). Sur le chemin optique d'environ 1 m, un élargisseur de faisceau permet de passer d'un diamètre de faisceau laser de 5 mm à 8 mm (grossissement $f_1/f_2=92\text{mm}/58\text{mm}=1,6$ avec f_1 , distance focale de la lentille convexe du télescope, et f_2 , distance focale de la lentille concave) : ceci diminue la tache focale et le seuil de claquage.

La lentille de focalisation est une lentille plan convexe (BK7 : Melles Griot : 01LPX129, traitée antireflet, diamètre de 25,4 mm) de focale 130 mm $\lambda = 1064\text{nm}$. La disposition des miroirs et de la lentille permet d'obtenir un plasma toujours au même endroit sur la cible.

II.3.2. Système d'analyse de surface

Le montage a été conçu pour faciliter l'analyse sur surface afin de pouvoir poser les échantillons sans les altérer (cas des archéomatériaux). Un système élévateur par vis micrométrique permet de positionner la cible suivant la distance tache focale-surface (FTSD) désirée. Un système de déplacement automatisé est possible suivant les axes XY à l'aide de platines motorisées Micro-Contrôle M-UTM100PE1 pilotées par un logiciel Visual Basic™.

Ce type d'analyse peut être intéressant pour obtenir une cartographie de la surface à échantillonner.

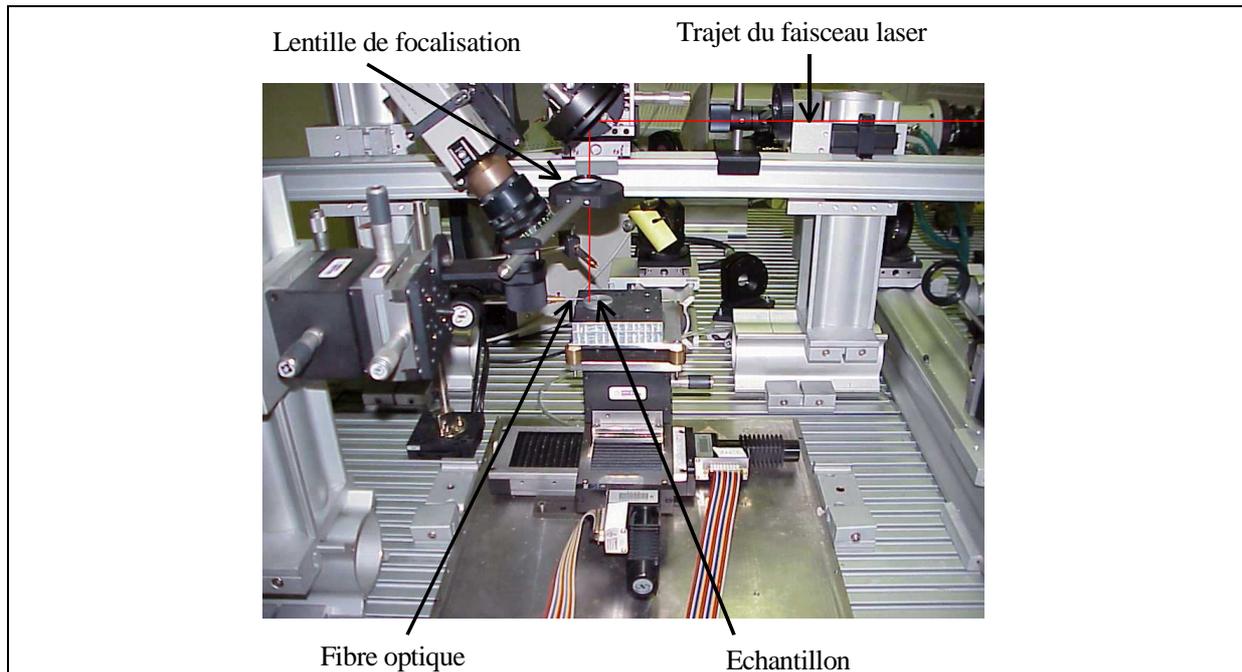


figure II-6 : Zone de l'impact laser dans le montage LIBS

II.3.3. Cellule d'analyse de gaz et d'aérosols

Mise au point au CEB, elle est constituée d'une cuve étanche en acier inoxydable (316 L). Elle reçoit le faisceau laser à travers une lentille plan convexe en borosilicate (BK7 : Melles Griot, traitée antireflet, diamètre de 25,4 mm) fixée à l'une des extrémités. Un support de fibre optique monté sur vis micrométrique permet d'imager le plasma pour suivre l'évolution spatiale des raies d'émission du plasma. Des buses d'entrée et de sortie permettent :

- **L'introduction de gaz étalonnés en composition et concentration** par l'intermédiaire de molécules modèles (CFCs, SF₆ dilué dans N₂ et dans de l'air reconstitué) débitées par un banc de dilution. Les gaz sont « poussés » dans le réacteur pour en occuper le volume de façon homogène, puis s'évacuent naturellement par la buse de sortie. Le plasma est spatialement résolu en déplaçant la fibre montée sur platine à pas micrométriques.

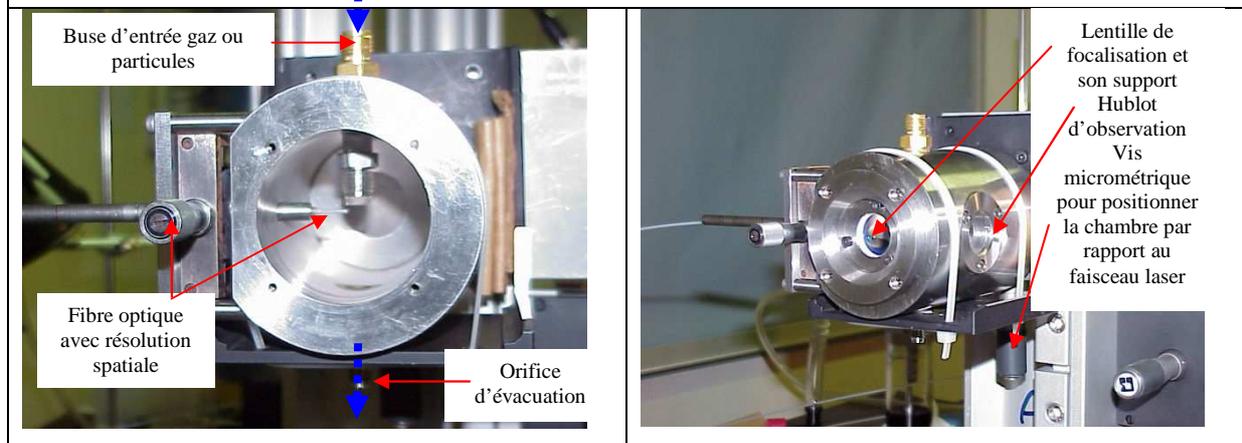
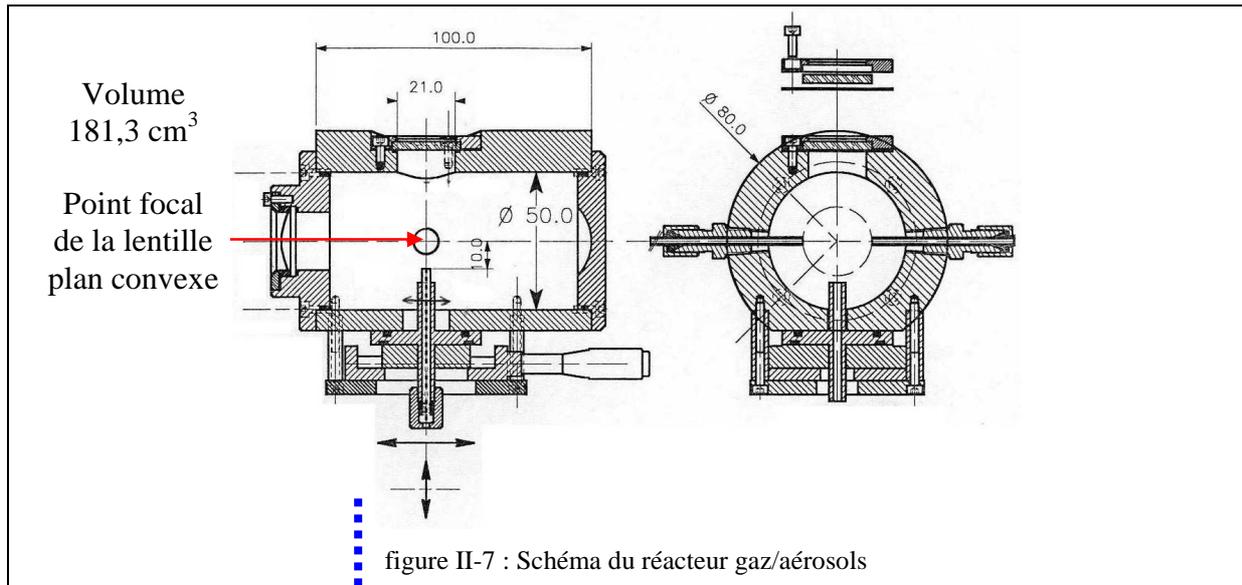


figure II-8 : Réacteur gaz/aérosol ouvert avec buse d'entrées et sortie des gaz ou aérosols selon un axe au centre duquel est généré le plasma résolu spatialement par fibre optique mobile par vis micrométrique

figure II-9 : Réacteur gaz/aérosols clos avec le porte-lentille plan convexe positionnée sur le chemin optique du faisceau laser

- **L'introduction de courant linéaire et laminaires de particules modèles étalonnées en concentrations et composition**, ou la formation de nuages plus ou moins dilués. Pour les aérosols, les métrologies de génération et de mesure granulométrique sont expliquées dans le chapitre III. En général, les particules sont introduites dans le réacteur par une buse liée à un générateur, l'évacuation se fait par la pompe d'aspiration du granulomètre (débit maximal : 5 L.min⁻¹). Les particules sont dirigées vers la position où la densité d'énergie est la plus élevée pour maximiser les interactions.

II.3.4. Système de détection

Afin d'assurer une plus grande souplesse du dispositif, des fibres optiques acheminent les photons émis vers le système d'analyse spectroscopique. L'ensemble instrumental retenu

comprend un monochromateur et un spectromètre à réseau Echelle, chacun étant couplé un détecteur propre de type iCCD intégrant un générateur de porte et un intensificateur.

II.3.4.1. Fibre optique

Les différentes régions du plasma au dessus de la surface sont explorées par une fibre optique placée perpendiculairement à l'axe du faisceau laser. Le support de la fibre comporte un pas de vis millimétrique pour régler la distance entre fibre optique et plasma (5 mm en général).

La fibre optique utilisée est le modèle HCG M1000T (fourni par SEDI), d'ouverture numérique faible (0,22), de 1000 μm de cœur. Elle est constituée d'un cœur de silice de très haute pureté, d'un "cladding" de silice dopée fortement en ions OH^- , d'une gaine primaire en polymère dur et d'un revêtement extérieur en Tefzel :

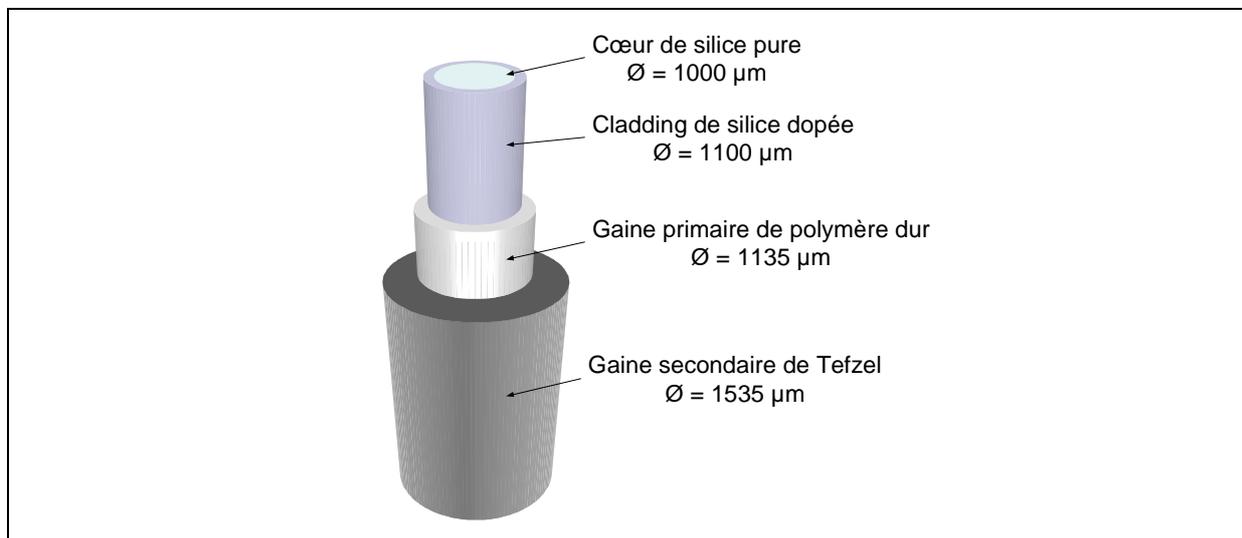


figure II-10 : Détail d'une fibre optique HCG M1000T

La fibre optique HCG possède un facteur de transmission de 200 nm à 1250 nm, adapté à son utilisation dans les domaines de l'UV, du visible et du proche infrarouge.

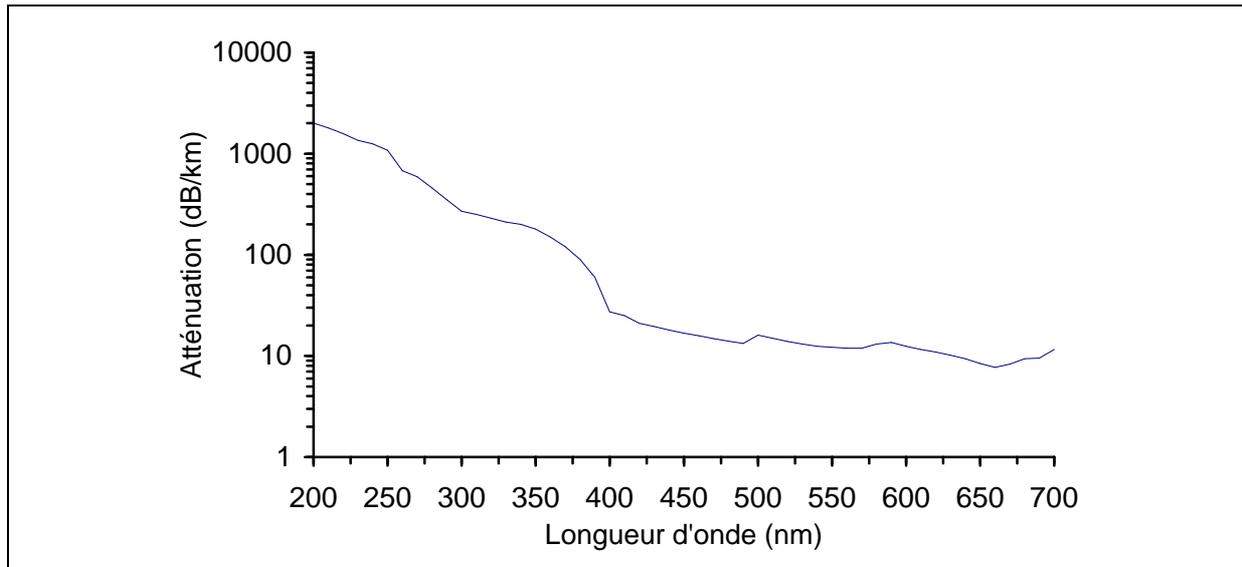


figure II-11 : Atténuation de la fibre optique HCG en fonction de la longueur d'onde (données constructeur)

L'intensité du signal transmis (I) par la fibre optique s'exprime sous la forme :

$$10 \times \log \frac{I_0}{I} = \alpha l, \text{ avec } \alpha, \text{ coefficient d'atténuation (db/km), } l \text{ longueur de fibre (km).}$$

L'atténuation en dB pour 1 mètre est $A = 10 \cdot \log \frac{I_0}{I}$ soit $\frac{I_0}{I} = 10^{A/10}$.

Le tableau II-2 indique le pourcentage de transmission calculé pour les raies des éléments phosphore, fluor, carbone, chlore et soufre, avec une longueur de fibre de 3 mètres.

Longueur d'onde (nm)	Atténuation A (dB/km)	I (% de I_0)
C(I) : 247,856	1050	48,42
P(I) : 253,560	890	54,08
P(II) : 603,404	12,5	99,14
F(I) : 685,604	9,45	99,35
C(I) : 833,515	9,6	99,34
Cl(I) : 837,594	9,9	99,32
S(II) : 921,290	92,3	93,82

tableau II-2 : Pourcentages de transmission des fibres optiques HCG aux longueurs d'onde étudiées

D'après ces valeurs de transmission, la fibre HCG est suffisante pour explorer tout le spectre de l'UV au proche IR.

II.3.4.2. Systèmes dispersifs

II.3.4.2.1. Monochromateur et détecteur iCCD associée pour obtenir des spectrogrammes résolus de largeur réduite

➤ Le monochromateur THR 1000

Le monochromateur, un THR 1000 (Jobin-Yvon) de type Czerny-Turner asymétrique (1 m de focale) est muni d'un réseau gravé de 1200 traits/mm blazé à 400 nm (domaine spectral : 300-1000 nm). Sa précision en longueur d'onde est de $\pm 0,5 \text{ \AA}$ (pouvoir pour résoudre deux raies successives $R=\lambda/\Delta\lambda=13000$). Sa résolution est augmentée par l'emploi d'un réseau holographique à 3600 traits/mm ; notons cependant que le réseau à 3600 traits/mm est blazé dans l'ultraviolet et ne permet pas l'observation de raies à des longueurs d'onde supérieures à 450 nm. En revanche, un troisième réseau à 300 traits/mm blazé à 250 nm (domaine spectral : 200-700 nm) est utilisé pour avoir des fenêtres spectrales plus larges.

L'entrée du monochromateur est munie d'une fente à lèvres droites ajustable en largeur par vis micrométrique de 0 à 3 mm avec une précision de 5 μm (optimum à 80 μm), sa hauteur est réglable par bonds : 1, 2, 5, 10, 20 mm (optimum à 5 mm). La fente d'entrée est munie d'un support de fibre optique type SMA. En sortie le monochromateur est équipé d'une monture d'adaptation pour recevoir le détecteur. Le réseau est monté sur une platine micrométrique motorisée et un logiciel de commande du moteur pas à pas permet le déplacement automatique du réseau pour se caler sur la fenêtre spectrale d'analyse.

➤ Le détecteur iCCD Roper Pi :MAX

	CCD E2V	1024 x 1024 pixels
	Taille pixels	13 x 13 μm
	Refroidissement	De -5 à -20°C par effet Peltier forcé par air De -20 à -40°C si forcé par eau
	Dynamique	16 bits, 65536 coups
	Vitesse d'obturation	2 ns

figure II-12 : Photographies et caractéristiques du détecteur Roper iCCD couplé à la fente de sortie du monochromateur THR1000

La caméra PI MAX de Roper Scientific intègre un tube intensifiant qui a pour rôle de multiplier les photons caractéristiques issus des émissions radiatives provenant de la relaxation du plasma. Il gère également la résolution temporelle nécessaire pour s'affranchir du continuum et ainsi effectuer une optimisation du rapport signal sur bruit. En amont du tube intensificateur, une fenêtre en quartz est utilisée car sa longueur d'onde minimale de transmission est de 185 nm, ce qui est suffisant pour obtenir notre domaine d'intérêt (ultra violet, visible, proche infrarouge : cf. figure II-13).

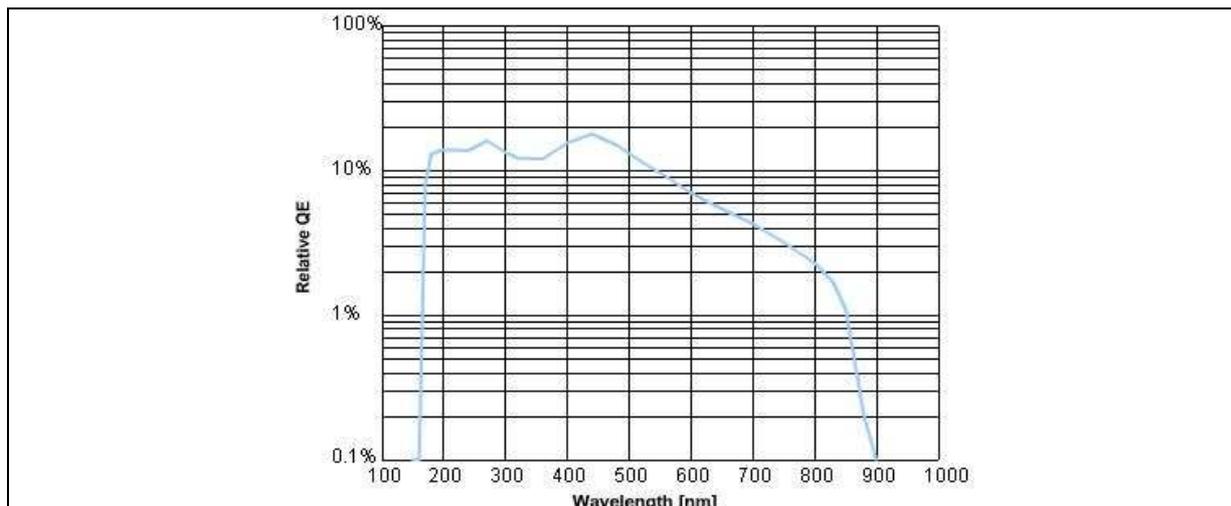


figure II-13 : Courbe d'efficacité quantique du tube intensificateur identiques des deux détecteurs iCCD Roper et Andor

En aval, un détecteur de technologie CCD (charge coupled devices) composés d'un pavé de 1024x1024 pixels convertit les photons multipliés en signal électronique selon une dynamique de 16 bits= 2^{16} =65536 photons cumulables par pixel. La fréquence d'obtention d'un spectre est de 37 Hz, compatible avec les fréquences élevées des lasers Nd:YAG. Un contrôleur externe gère les liaisons avec le laser et un ordinateur permet le paramétrage des différentes valeurs et la visualisation des spectres par le logiciel WinSpec (version 2.5.15.4).

Avantages du système monochromateur+iCCD : excellentes performances en résolution ($R=\lambda/\Delta\lambda=13000$), fréquence importante (37 Hz) d'acquisition et d'obtention de spectres compatible avec la fréquence de tir élevée des lasers Nd:YAG, et sensibilité validées pour les gaz et surfaces à l'ordre du ppm.

Inconvénients : encombrement et poids le limitant au laboratoire, présence de réseau holographique mobile et sujet au dérèglement en calibration, largeur spectrale limitée à 10 et 40 nm avec les réseaux 1200 et 300 traits. mm^{-1} (par contre chaque fenêtre est optimisée).

→ L'apparition d'équipements spectroscopique plus compacts, performants, résolus et doté d'une largeur spectrale beaucoup plus étendue a motivé l'acquisition d'un nouveau système dispersif en complément de cet ensemble de référence.

II.3.4.2.2. Spectromètre à réseau Echelle couplé à un détecteur iCCD : compromis pour obtenir des spectrogrammes résolus à large bande spectrale

Deux types de spectromètres et détecteurs semblent adaptés en terme de coût et compacité pour obtenir des spectrogrammes large bande en une seule acquisition, contrairement au monochromateur qui nécessite la rotation du réseau gravé et de multiples acquisitions et calibrations en longueurs d'onde pour fournir une large gamme spectrale.

- **Spectromètres miniatures haute résolution couplés en série (type Ocean Optics, Avantes)** : dotés chacun de barrettes linéaire de CCD non intensifiées et couplés en série pour obtenir un large domaine spectral (200-1000 nm). L'avantage majeur de ces détecteurs réside en leur compacité extrême permettant d'entrevoir un ensemble LIBS vraiment portable. Cependant, non intensifiés ils ne sont pas assez sensibles pour détecter des traces [66]. Ce produit n'a pas été choisi car l'absence d'intensification peut être préjudiciable à la sensibilité. Prochainement, ce type de spectromètres sera équipé d'un intensificateur et donc son intérêt sera à reconsidérer.
- **Spectromètre large bande de type Echelle**. Ce procédé [67] permet l'enregistrement simultané d'un large domaine spectral (200-950 nm) sans coupure et en une seule acquisition. Le réseau Echelle disperse les longueurs d'onde λ linéairement puis les ordres pour chaque λ sont rangés verticalement via un prisme. Une image en deux dimensions est obtenue et numérisée sur le pavé de 1024x1024 pixels d'un détecteur intensifié de type de iCCD (modèle Andor iStar 734 WR présentant une réponse théorique sur un domaine 250-950 nm). Le tube intensificateur est exactement similaire à la Roper Pi : MAX accolé au monochromateur. Un traitement informatique de l'image 2D recompose un spectre linéaire. L'avantage majeur d'un tel système est l'obtention d'un spectre large bande en une seule acquisition et avec une bonne résolution ($\lambda/\Delta\lambda = 5000$) comparable avec le réseau 300 traits/mm du monochromateur THR1000 (13000). Le revers de la médaille réside dans l'énorme quantité de données numériques des 1024x1024=10⁶ pixels à convertir à la fréquence de 1 MHz, soit un spectre par seconde. Cela peut être problématique pour des applications à importante fréquence d'acquisition.

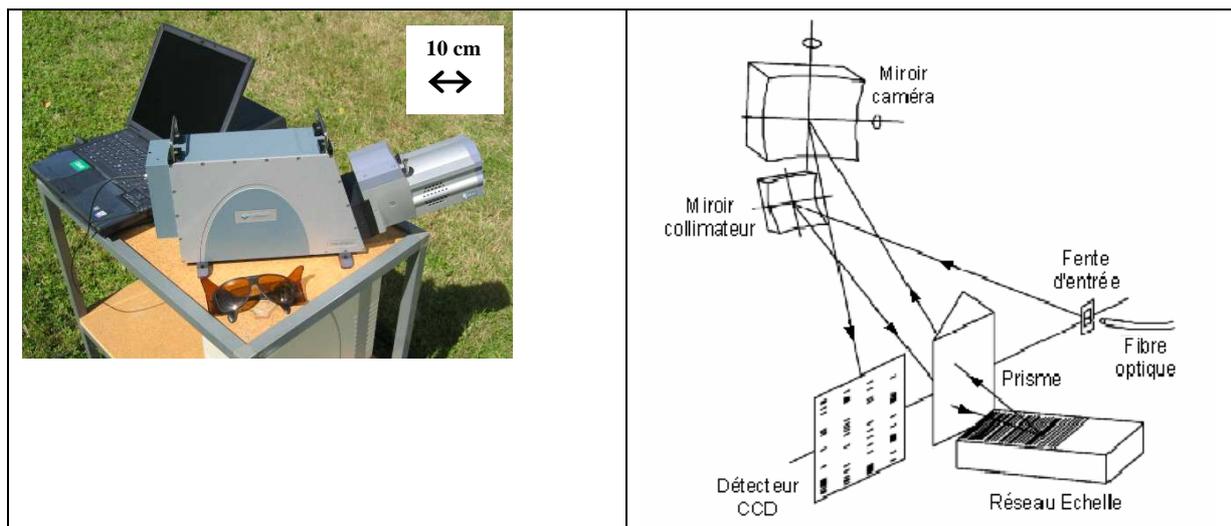


figure II-14 : Photographie et schéma de principe du spectromètre à réseau Echelle Andor Mechelle5000

Domaine spectral (nm)	200 à 950 continûment
Longueur focale (mm)	190
Résolution spectrale $\lambda/\Delta\lambda$	5000
CCD E2V 4710	1024 x 1024 pixels
Taille pixels	19 x 19 μm
Refroidissement	-20 °C par effet Peltier forcé par air (-40°C par eau)
Dynamique acquisition	16 bits
Vitesse d'obturation	2 ns (minimale)
Dimensions Mechelle + Caméra (cm)	57 x 22 x 16
Poids (kg)	12,3

tableau II-3 : Caractéristiques de l'ensemble spectromètre Mechelle et du détecteur iCCD iStar

Avantages du spectromètre Echelle couplé à un détecteur iCCD sont : compacité, poids raisonnable pour une transportabilité, absence de pièce mobile (réseau et prisme fixes), large bande spectrale (200 à 950 nm) simultanément et de façon résolue ($R=\lambda/\Delta\lambda=5000$) pour distinguer toute raie d'intérêt, intensification du signal.

Inconvénients : l'acquisition multiélémentaire simultanées impose de faire un choix de compromis avec les paramètres. La réponse du détecteur iCCD en rendement quantique n'est pas continue sur une large zone, des gammes de longueurs d'onde seront optimisées au détriment d'autres pour optimiser le rapport signal/bruit. Enfin, l'obtention de spectres à large bande induit la gestion de nombreuse données numériques : les 1024x1024, soient plus d'un million de pixels sont lu par un convertisseur de fréquence 1 MHz. Une seconde est nécessaire pour numériser un spectrogramme, ralentissant la multiplication de spectres

Elém.		λ (nm)	Int. Rel.	A_{ki} ($10^8 s^{-1}$)	$E_{exc.}$ (eV)
Ag	I	328,068	55000	1,4	3,8
	I	338,289	28000	1,3	3,6
	I	520,908	1000	0,75	6
Al	I	256,799	10	0,23	4,8
	I	257,510	10	0,28	4,8
	I	265,249	10	0,13	4,6
	I	266,039	10	0,26	4,6
	II	281,618	4000	3,83	6 + 11,8
	I	308,215	24	0,63	4
	I	309,271	26	0,74	4
	I	394,401	24	0,49	3,1
	I	396,152	26	0,98	3,1
As	I	245,653	170	0,07	6,5
	I	278,020	170	0,78	6,7
	I	286,045	100	0,55	6,6
Au	I	267,595	3400	1,64	4,6
	I	312,278	1600	0,19	
B	I	249,677	1000	1,2	4,9
	I	249,773	1000	2,4	4,9
Ba	II	389,178	1400	1,67	5,2 + 5,7
	II	413,066	1500	1,8	5,2 + 5,7
	II	455,404	65000	1,17	5,2 + 2,7
	II	493,409	20000	0,95	5,2 + 2,5
	I	553,555	1000	1,19	2,2
Be	I	265,062	15	3,23	7,4
	II	313,041	480	1,15	9,3 + 3,9
	II	313,107	320	1,15	9,3 + 3,9
	I	332,101	35	0,07	6,4
	I	332,109	40	0,21	6,4
	I	332,134	45	0,34	6,4
Bi	I	278,052	360	0,31	5,8
	I	289,798	4000	1,53	5,6
	I	293,830	3200	1,23	6,1
	I	298,903	2800	0,55	5,5
	I	306,772	9000	2,07	4
	I	472,255	600	0,12	4
Br	II	470,485	500	1,1	11,8 + 2,6
	II	478,550	500	0,94	11,8 + 2,6
	II	481,670	500	1,1	11,8 + 2,6
	I	751,296	40000	0,12	
	I	844,655	40000	0,12	
C	I	247,856	800	0,34	7,7
	I	495,712	247,856 x2		
	II	426,726	1000		11,3+20,8
	I	833,515	520	0,35	9,1
Ca	II	315,887	170	3,1	6,1 + 7
	II	317,933	180	3,6	6,1 + 7
	I	364,441	20	0,36	5,3
	II	393,366	230	1,47	6,1 + 3,1
	II	396,847	220	1,4	6,1 + 3,1
	I	422,673	50	2,18	2,9
	I	445,478	30	0,87	4,7
Cd	I	326,106	300	0,004	3,8
	I	346,620	1000	1,2	7,3
	I	361,051	1000	1,3	7,3
	I	643,847	2000	0,59	7,3

Elém.		λ (nm)	Int. Rel.	A_{ki} ($10^8 s^{-1}$)	$E_{exc.}$ (eV)
Cl	II	479,455	99000		12,9+15,4
	I	833,331	18000	0,16	10,5
	I	837,594	99900	0,28	10,5
	I	842,825	15000	0,24	10,5
Co	I	340,512	11000	1	4
	I	345,350	21000	1,1	4
	I	346,580	5100	0,09	3,6
	I	352,981	7300	0,46	4
Cr	II	283,563	2500	2	6,7 + 5,9
	II	284,325	1700	0,64	6,7 + 5,9
	II	284,984	1200	0,92	6,7 + 5,9
	I	425,435	20000	0,31	2,9
	I	427,480	16000	0,31	2,9
	I	428,972	10000	0,31	2,9
	I	520,452	5300	0,51	3,3
	I	520,604	8400	0,51	3,3
	I	520,844	11000	0,51	3,3
	Cu	I	261,837	2500	0,31
I		282,437	1250	0,08	5,8
I		296,116	2500	0,04	
I		324,754	10000	1,39	3,8
I		327,396	10000	1,37	3,8
I		406,264	2000	0,21	
I		465,112	2000	0,38	
I		510,554	1500	0,02	3,8
I		515,324	2000	0,60	6,2
I		521,820	2500	0,75	6,2
F		I	683,426	9000	0,24
	I	685,602	50000	0,45	14,5
	I	687,022	8000	0,38	14,5
	I	690,246	15000	0,31	14,5
Fe	I	248,327	10000	4,9	5
	I	248,814	4000	4,7	5
	I	249,064	3000	3,8	5
	I	252,285	4000	2,9	4,9
	II	259,940	2000	2,2	7,9 + 4,8
	I	271,903	4000	1,4	4,5
	II	275,573	800	2,1	7,9 + 5,5
	I	344,061	6000		
	I	358,120	4000	1,02	4,3
	I	371,993	8000	0,16	3,3
	I	373,713	6000	0,14	3,4
	I	374,556	6000	0,11	3,4
	I	385,991	10000	0,10	3,2
	I	388,628	4000	0,05	3,2
I	404,581	4000	0,86	4,5	
Ga	I	287,424	6	1,2	4,3
	I	294,364	6	1,4	4,3
	I	403,299	10	0,49	3,1
	I	417,204	10	0,92	3,1
H	I	486,133	80	0,20	12,7
	I	656,279	180	0,64	12
Hg	I	253,652	15000	0,08	4,9
	I	365,015	2800	1,3	8,8
	I	404,656	1800	0,21	7,7
	I	435,833	4000	0,56	7,7
In	I	451,132	18000	1,02	3

Elém.		λ (nm)	Int. Rel.	A_{ki} ($10^8 s^{-1}$)	$E_{exc.}$ (eV)
K	I	404,414	18	0,01	3,1
	I	404,721	17	0,01	3,1
	I	766,490	25	0,39	1,6
	I	769,896	24	0,38	1,6
Li	I	610,364	320	0,12	3,9
	I	670,784	3600	0,37	1,8
Mg	II	279,553	1000	2,6	7,6 + 4,4
	II	280,270	600	2,6	7,6 + 4,4
	I	285,213	6000	4,95	4,3
	II	292,863	2	1,2	7,6 + 8,6
	II	293,651	3	2,3	7,6 + 8,6
	I	382,935	140	0,94	5,9
	I	383,231	300	1,27	5,9
	I	383,826	500	1,68	5,9
	I	516,734	75	0,12	5,1
	I	517,270	220	0,35	5,1
	I	518,361	400	0,58	5,1
	Mn	II	257,610	12000	
II		259,373	6200	2,6	7,4 + 4,8
II		260,569	4300	2,7	7,4 + 4,8
I		279,482	6200	3,7	4,4
I		279,827	5100	3,6	4,4
I		280,106	3700	3,7	4,4
I		403,075	27000	0,17	3,1
I		403,307	19000	0,16	3,1
I		403,449	11000	0,16	3,1
Mo	II	281,615	1700		7,1 + 4,8
	II	284,823	1700		7,1 + 4,7
	I	313,259	14000	1,79	
	I	379,825	29000	0,69	3,3
	I	386,411	29000	0,62	3,3
N	I	348,546	174,273 x 2		
Na	I	330,237	1200	0,28	3,7
	I	330,299	600	0,28	3,7
	I	568,822	560	0,12	4,2
	I	588,995	80000	0,62	2,1
	I	589,592	40000	0,62	2,1
Ni	I	305,082	3500	0,60	4,1
	I	341,476	8200	0,55	3,6
	I	349,296	5500	0,98	3,6
	I	351,505	6600	0,42	3,6
	I	352,454	8200	1	3,5
O	I	777,194	870	0,37	10,7
	I	777,417	810	0,37	10,7
	I	777,539	750	0,37	10,7
P	I	253,397	750	0,20	7,2
	I	253,560	950	0,95	7,2
	I	255,326	750	0,71	7,1
	I	255,491	500	0,30	7,1
Pb	I	280,199	25000	1,6	5,7
	I	282,319	14000	0,26	5,7
	I	283,307	35000	0,58	4,4
	I	287,331	14000	0,37	5,6
	I	357,273	35000	0,99	6,1
	I	363,958	50000	0,34	4,4
	I	368,347	70000	1,5	4,3
	I	373,993	25000	0,73	6
	I	405,782	95000	0,89	4,4

Elém.		λ (nm)	Int. Rel.	A_{ki} ($10^8 s^{-1}$)	$E_{exc.}$ (eV)
S	I	361,462	180,731 x 2		6,8
	I	921,291	1500	0,3	7,8
	I	922,811	1050	0,28	7,8
	I	923,749	810	0,28	7,8
Sb	I	252,852	2000		6,1
	I	259,805	1500		5,8
	I	287,792	1000		5,3
	I	323,252	600		6,1
Si	I	326,751	700		5,8
	I	250,690	425	0,47	4,9
	I	251,432	375	0,61	4,9
	I	251,611	500	1,21	4,9
Sn	I	251,920	350	0,45	4,9
	I	252,411	425	1,81	4,9
	I	252,851	450	0,77	4,9
	I	263,129	190		
	I	288,158	1000	1,89	5,1
	I	390,552	300	0,12	5,1
	I	270,651	700	0,66	
	I	283,999	1400	1,7	4,8
Sr	I	285,062	200	0,33	
	I	286,332	1000	0,54	4,3
	I	300,914	700	0,38	4,3
	I	303,412	850	2	4,3
	I	317,505	550	1	4,3
	I	326,234	550	2,7	4,8
	II	407,771	46000	1,42	5,7 + 3
	II	421,552	32000	1,27	5,7 + 2,9
	I	460,733	65000	2,01	2,7
Ti	II	323,452	6600	1,38	6,8 + 3,9
	II	334,941	12000		
	II	336,121	7200	1,1	6,8 + 3,7
	I	365,349	7200	0,75	3,4
	I	399,864	7800	0,41	3,1
	I	453,324	6000	0,88	3,6
	I	498,173	5800	0,66	3,3
V	II	309,311	3800		
	I	318,398	5300	2,5	3,9
	I	370,358	3800	0,92	3,6
	I	437,924	12000	1,1	3,1
Zn	I	438,472	7000	1,1	3,1
	I	328,233	500	0,90	7,8
	I	330,259	800	1,2	7,8
	I	330,294	700	0,67	7,8
Zr	I	334,502	800	0,17	7,8
	I	636,234	1000	0,47	7,7
	II	339,197	5700		6,8 + 3,9
Zr	II	343,823	4700		6,8 + 3,8
	I	351,960	2000		3,5
	II	357,247	2100		6,8 + 3,6
	I	360,119	3500		3,6
	I	468,780	2300		3,4

tableau II-5 : Raies d'émission atomiques et ioniques des éléments observés dans un plasma (I : élément atomique, II : atome simplement ionisé, Int. Rel. : intensité relative d'après bibliographie, A_{ki} : probabilité de transition ($10^8 s^{-1}$), $E_{exc.}$: potentiel d'excitation en eV).

II.3.5.1.2. Raies moléculaires

Par LIBS, des têtes de bandes moléculaires sont observables : elles correspondent à une recombinaison entre atomes. Les raies moléculaires les plus facilement identifiables sont les bandes de Swan C₂ et les bandes violettes CN.

	Δv	λ (nm)	CN → associées aux séquences vibrationnelles de têtes de bandes situées à 421,60 ($\Delta v=-1$), 388,34 ($\Delta v=0$) et 359,03 nm ($\Delta v=+1$), proviennent de la transition électronique ($B^2\Sigma^+ - X^2\Sigma^+$)	Δv	λ (nm)
	C ₂ → associées aux séquences vibrationnelles $\Delta v = +2, +1, 0, -1, -2$ de la transition électronique $d^3\Pi_g - a^3\Pi_u$	-2		619,1	
-1		563,6	-1	419,71	
0		516,5	0	418,08	
+1		473,7	0	416,67	
+2		438,37	0	415,80	
				+1	388,34
					387,14
					386,17
					359,03
					358,58
					358,39

tableau II-6 : Longueurs d'onde des raies moléculaires de C₂ et CN avec en gras les principales têtes de bandes (détail de toutes les raies pour les bandes violettes CN).

Nous utiliserons les bandes violettes CN comme marqueurs de la température électronique du plasma dans l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique local dans le chapitre IV. Nous verrons également que ces raies revêtent un rôle important pour les matrices carbonées interagissant dans la périphérie du plasma.

II.3.5.2. Intensité d'une raie d'émission atomique

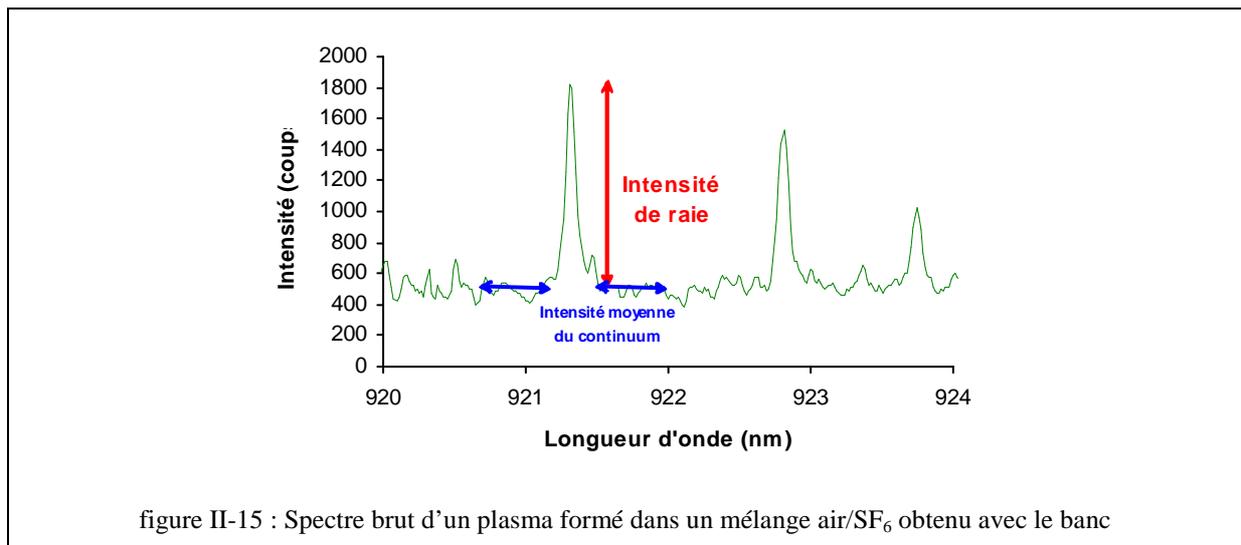


figure II-15 : Spectre brut d'un plasma formé dans un mélange air/SF₆ obtenu avec le banc

$$I_{\text{Raie}} = I_{\text{Brut}} - I_{\text{Cont}}$$

équation II-1

Avec I_{Raie} intensité de la raie (en coups ou nombre de photons s'accumulant contre les pixels du pavé de CCD), I_{Bruit} intensité maximale de la raie mesurée par rapport à la ligne de base du spectre (en coups), et I_{Cont} intensité moyenne du continuum (bruit de fond électronique et optique, en coups).

Les sources du bruit de fond électronique observé sont diverses : bombardement électronique (issu du rayonnement cosmique), agitation thermique des pixels du CCD (phénomène atténué par le refroidissement du pavé numérique), etc.

II.3.5.3. Calcul du rapport signal sur bruit

$$\text{RSB} = \frac{I_{\text{Raie}}}{I_{\text{BdF}}} \quad \text{équation II-2}$$

avec RSB le rapport signal sur bruit, I_{Raie} l'intensité de la raie, I_{BdF} l'intensité du bruit de fond spectral ou écart type des intensités sur 0,5 nm de part et d'autre de la raie considérée.

II.3.5.4. Informations quantitatives : identifications des raies d'émission

II.3.5.4.1. Définition de la concentration limite (C_L) ou limite de détection

Pour comparer les résultats d'analyse à ceux de la bibliographie internationale, les limites de détection ou concentrations limites C_L sont calculées en utilisant la formule suivante [69] :

$$C_L = \frac{Z\sigma_b}{\alpha} \quad \text{équation II-3}$$

avec σ_b , l'écart type du bruit (ou I_{BdF}) en coups, et α la pente de la droite d'étalonnage en coups/unité de concentration.

Nous avons choisi $Z=2$, ce qui correspond à un niveau de confiance de 97,7 % sur une répartition supposée gaussienne du bruit. En général, les concentrations des droites d'étalonnage et les limites de détection sont données en ppm en masse : ppm (g/g).

II.3.5.4.2. Limites de détection en milieu gazeux

L. Dudragna [2] a expliqué la procédure d'obtention des limites de détection pour un gaz. Ainsi, la limite de détection en milieu gazeux avec l'atome de chlore s'obtient en traçant les

courbes d'étalonnage suivant l'intensité moyenne de la raie à 837,594 nm pour chaque concentration [Cl].

Sur la figure II-16 est représentée la courbe d'étalonnage du chlore pour diverses concentrations [Cl] : elle suit une loi linéaire, avec un coefficient de régression proche de 1, sur une gamme de concentration de l'ordre de 1000 ppm, donc $I_{Cl} = \alpha_{Cl} X [Cl]$

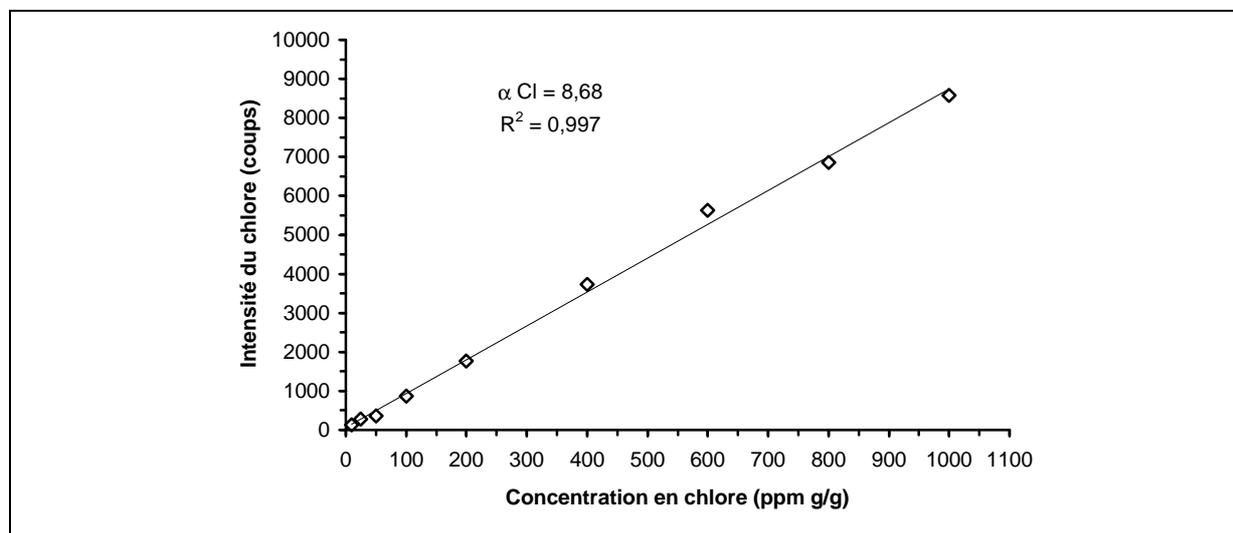


figure II-16 : Droite de concentration du chlore – Mélanges CF₂Cl₂/Air – Délai = 4,2 μs – Temps d'obturation de l'intensificateur = 20 μs – Energie de pulse laser = 100 mJ – Accumulation sur 1000 tirs.

La pente de la droite de concentration du chlore vaut ici à titre indicatif $\alpha_{Cl} = 8,68 \pm 0,74$ et $\sigma_b = 411$ soit une limite de détection du chlore de 95 ± 8 ppm (g/g).

Les limites de détections ont été de nouveau mesurées et améliorées avec les derniers appareillages dont la caméra Roper qui a remplacé avantageusement le détecteur utilisé lors trois thèses menées au CEB sur la LIBS.

Elément	Longueur d'onde (nm)	Phase	Densité de puissance : $4,6 \cdot 10^{11} \text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ - Diamètre tâche focale : $67,5 \mu\text{m}$ - Volume plasma = $5,43 \text{mm}^3$ THR1000 + iCCD PIMAX
			Limites de détection en ppm (m/m) obtenues, critère IUPAC Z=2
Cl	837,594	Gaz CF ₂ Cl ₂ dans air	55
C	247,856	Gaz CF ₂ Cl ₂ dans air	3
S	921,291	Gaz SF ₆ dans air	500
F	685,602	Gaz CF ₂ Cl ₂ dans air	20

tableau II-7 : Limites de détection obtenues sur des atomes de molécules gazeuses de type Fréon et SF₆ avec le dispositif actuel doté du monochromateur THR1000 couplé au détecteur iCCD PIMAX

II.3.5.4.3. Estimation de la stoechiométrie des molécules gazeuses

L. Dudragne [2] a démontré la possibilité d'identifier des molécules gazeuses présentant un nombre différent d'un même atome par la connaissance du rapport des pentes de leur droite de

calibration. Soit une molécule M de formule F_aCl_b avec a et b, coefficients stœchiométriques en fluor et chlore, la concentration en M est inconnue et notée [C]. On a :

- $[F] = a[C]$ et $[Cl] = b[C]$ car la molécule est totalement dissociée au sein du plasma,
- $I_F = \alpha_F [F]$ et $I_{Cl} = \alpha_{Cl} [Cl]$, avec α_F et α_{Cl} les pentes des droites d'étalonnages ramenées à un atome.
- Par mesure des intensités de raies : $\frac{I_F}{I_{Cl}} = \frac{\alpha_F}{\alpha_{Cl}} \frac{[F]}{[Cl]}$ ou $\frac{I_F}{I_{Cl}} = X \frac{[F]}{[Cl]}$

avec $X = \alpha_F / \alpha_{Cl} = \text{constante}$ car les pentes des droites de concentration sont proportionnelles au nombre d'atomes contenus dans la molécule mise en jeu. D'où la relation :

$$\frac{I_F}{I_{Cl}} = X \frac{a[C]}{b[C]} \quad \text{soit} \quad \frac{I_F}{I_{Cl}} \times \frac{\alpha_{Cl}}{\alpha_F} = \frac{a}{b}$$

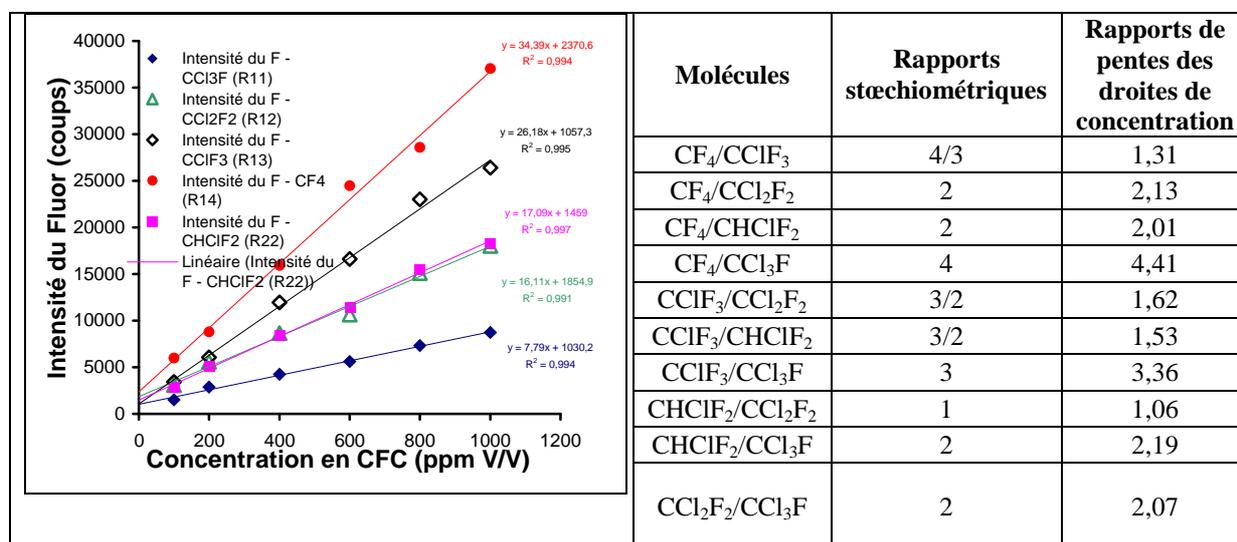


figure II-17 : Droites de concentration du fluor pour différents CFCs et tableaux des comparaison entre les rapports stœchiométriques et les rapports de pente des droites de concentration de l'élément fluor.

L'intérêt de cette analyse est la possibilité de discréditer des molécules non organiques possédant les même éléments qu'un toxique chimique, par évaluation du nombre de ces éléments dans leurs structures.

II.3.5.5. Choix de la procédure utilisée pour l'étalonnage sur surface

Dans sa thèse [3], S. Morel a défini une procédure de calibrage (concentrations relatives et non absolues) sur surface par l'utilisation d'un rapport liant la quantité d'un élément minoritairement présent dans la matière, par rapport à celle d'un élément référent, composé dont la concentration est stable : le plomb pour une pièce de monnaie plombée, le cuivre pour un bronze (alliage cuivre et étain).

L'intensité d'une raie atomique dépend du nombre d'atomes excités, donc de la concentration de l'espèce, mais aussi de la température du plasma à travers un facteur exponentiel (cf. l'équation I-3 de Boltzmann en page 40). La température d'un plasma est difficile à déterminer avec précision puisqu'elle dépend de la puissance du laser, du degré de focalisation, de la durée du pulse laser, de la durée d'ablation, de l'élément pris en compte... La mesure d'un rapport d'intensité permet d'obtenir une dispersion plus faible que la simple mesure d'une intensité de raie, due à la correction des variations statistiques de la masse ablatée et des caractéristiques du plasma. Si les énergies des niveaux supérieurs des transitions sont relativement proches, le terme exponentiel de l'équation du rapport d'intensité de raies atomiques devient proche de l'unité, éliminant ainsi l'influence de la température du plasma : $\exp\left(\frac{E_i - E_j}{kT}\right) \approx 1$ avec

$E_i \approx E_j$. S. Morel a montré que l'accumulation de rapports d'intensités obtenus en multipliant les tirs laser sur une même position permet de minimiser les fluctuations.

$$X_n = \sum_{i=1}^n \left(\frac{I_{Sn}}{I_{Cu}} \right)_i \quad \text{équation II-4}$$

Des rapports d'intensités cumulés (RIC) sont effectués sur l'analyse LIBS de bronzes certifiés (alliage cuivre et étain, complété avec des impuretés) en considérant un minorant ou une impureté par rapport à l'élément de référence majoritaire, le cuivre.

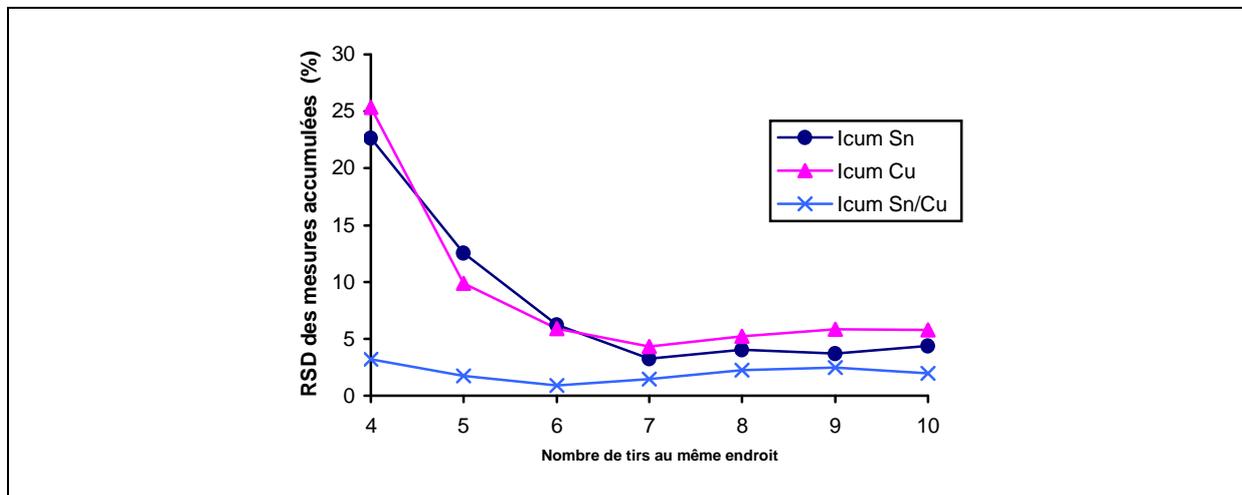


figure II-18 : Pourcentage d'erreur du rapport Sn/Cu non-cumulé et du même rapport pour des mesures cumulées sur 10 tirs sur une même position, en fonction du nombre de tirs en enlevant les 3 premiers tirs ($E_{\text{pulse}} : 100 \text{ mJ}$, FTSD : 0 mm)

La figure II-18 illustre un pourcentage d'erreur plus faible (environ 2%) en accumulant (ou moyennant) différents rapports d'intensité par rapport à des intensités seules sommées ou moyennées. Cette meilleure reproductibilité permet de cumuler des rapports sur une même

position comme l'atteste la figure II-19 et d'établir des dosages de d'éléments minorant par rapport à un élément référent interne.

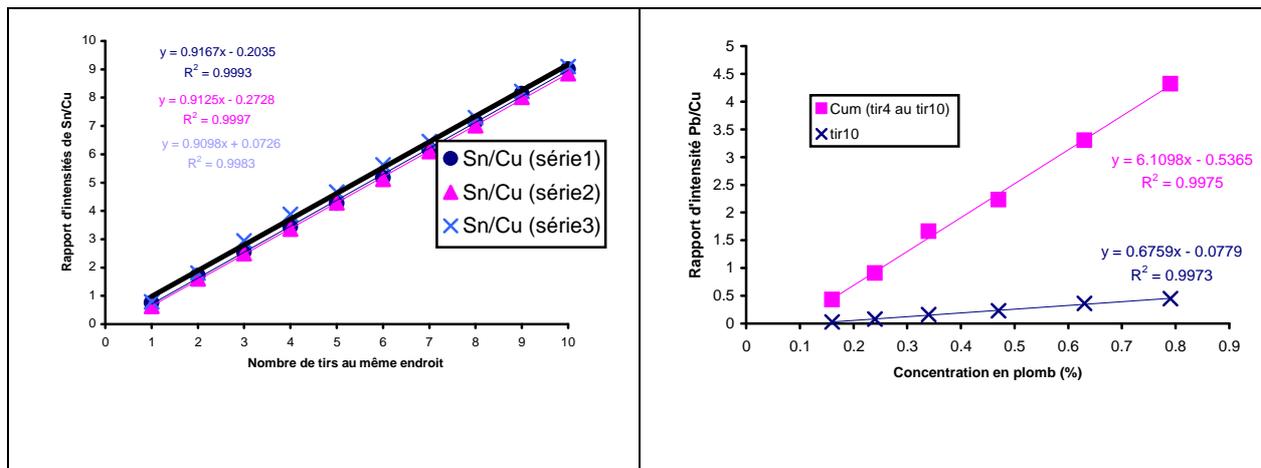


figure II-19 : Rapport d'intensité cumulé de Sn à 286,332 sur Cu à 282,437 pour trois séries de 10 tirs sur un même bronze ($E_{\text{pulse}} : 100 \text{ mJ}$, FTSD : 0 mm) – Applications : dosage de bronzes étalonnés avec Droite de concentration de Pb à 280,199 nm à l'aide de 6 matrices de bronze NIST (SS551 à SS556, Cu à 87 %) (réseau 1200 traits/mm, $E_{\text{pulse}} : 100 \text{ mJ}$, FTSD : 0 mm) ; rapport cumulé du 4^{ème} tir au 10^{ème} tir et rapport du dernier tir

Les procédures d'étalonnage d'éléments de molécules gazeuses ou sur surface permettent l'établissement de courbes de calibration permettant le calcul des limites de détection selon la norme IUPAC (cf. équation II-3, page 80). Ces limites ont été mises à jour et améliorées (environ d'un facteur 2) en utilisant le monochromateur couplé au nouveau détecteur Roper. Les résultats sont compilés dans la conclusion générale du document.

II.3.5.6. Approches multivariées

Les chapitres III et IV présenteront une méthode de traitement statistique des données multivariées qui va nous permettre de dépasser le cadre du simple dosage multiélémentaire pour pouvoir classifier les échantillons analysés en combinant leurs raies d'émissions.

L'apport du spectromètre Echelle à haut pouvoir résolutif est en ce sens fondamental car toutes les raies dont la longueur d'onde est comprises entre 200 et 950 nm seront simultanément détectées et exploitables pour caractériser la matière échantillonnée.

Les applications des chapitres III et IV, ainsi que l'annexe I précise les protocoles et le principe de préparation et de traitements de données issues des intensités de raies associées à une transition électronique élémentaire.

II.4. CONCLUSIONS

Le dispositif du laboratoire présente des appareillages et des protocoles éprouvés pour caractériser les gaz et les surfaces de façon sensible et optimisée grâce aux travaux des anciens doctorants qui ont contribué à développer et à valider l'outil pour les gaz et les surfaces. L'annexe II présentant le couplage de ce banc expérimental LIBS pour le suivi ex situ d'un procédé de purification du silicium photovoltaïque ultra pur le confirme.

Cependant, les améliorations apportées sont notables en termes de :

- **Diminution de l'encombrement des appareillages** (laser, spectromètre et détecteur iCCD associé) sans préjuger de pertes en performances à priori (gammes et robustesses des densités de puissance conservées, qualités optiques des pulses laser préservées, reproductibilité et répétitivité comparable pour accumuler et confirmer les analyses). La possibilité de développer un dispositif LIBS transportable hors du laboratoire pour des analyses in situ se confirme.
- **Gain analytique en terme d'identifiants spectraux accessibles en une seule acquisition grâce au spectromètre Echelle** : la richesse des informations disponibles augure l'accès à des informations supplémentaire pour diagnostiquer un échantillon inconnu. Les expériences menées dans les chapitre III, IV et V qualifieront quantifieront les nouveaux systèmes en termes de potentialités et performances.

III. METHODOLOGIE DE LA CHAINE DE MESURE D'UN AEROSOL AQUEUX MULTIELEMENTAIRE

III.1. OBJECTIFS POUR LA DETECTION DES AEROSOLS

Les aérosols sont des milieux binaires. Ils représentent des suspensions d'entités particulières solides ou liquides dans un fluide matriciel souvent gazeux, voire liquide (on parle alors d'hydrosol). Leur distribution en tailles et concentrations constitue la granulométrie de l'aérosol. L'instrument idéal pour l'analyse d'aérosols en temps réel devrait avoir les caractéristiques suivantes :

- **Prélèvement hautement efficace d'échantillons particuliers** de l'atmosphère,
- **Mesure en temps réel de la granulométrie** des particules prélevées,
- **Caractérisation de chaque particule** par analyse multiélémentaire sensible,
- **Quantification des masses de matière échantillonnée à des fins de dosage** : élaboration de courbes d'étalonnage ou de rapports semi quantitatifs,
- **Classification des particules en espèces** : à des fins de détection, voire d'identification de groupes d'échantillons chimiques et biologiques.

La LIBS se présente comme une technique d'analyse multiélémentaire et multiphase *in situ*, rapide, reproductible et sensible (ordre de grandeur typique du ppm). Son couplage à l'analyse de particules d'aérosols apparaît a priori possible si et seulement si la technique LIBS – avec le régime monopulse nanoseconde considéré – est suffisamment sensible pour détecter la présence des éléments constituant les particules d'aérosols présent dans le plasma. Cette partie vise ainsi plusieurs objectifs :

- 1. Appréhender puis vérifier expérimentalement la sensibilité élémentaire de la technique LIBS en régime monopulse nanoseconde pour la détection des teneurs élémentaires de particules d'aérosols de dimensions micrométriques,**
- 2. Développer une chaîne de détection par LIBS de modèles d'aérosols calibrés en termes de dimensions micrométriques et de composition chimique**

III.2. NOTIONS D'AEROSOLOGIE

III.2.1. Définition d'un aérosol

Inventée par Schmauss en 1920, la notion d'aérosol désigne la suspension dans un milieu gazeux de particules solides ou liquides, voire les deux [70]. La vitesse de chute des particules est suffisamment faible pour que l'aérosol soit stable. Typiquement la taille des particules présentes dans les aérosols est comprise entre 0,001 et 100 μm . Si la concentration des particules est assez élevée et est telle que la densité de l'aérosol soit 1% plus élevée que celle du gaz seul, l'ensemble constitue un nuage dont les propriétés diffèrent d'un aérosol dilué.

Dans l'air et dans des conditions normales, ceci correspond à des **particules de dimensions inférieures à 100 μm** , les plus fines n'ayant que quelques fractions de nanomètres. Typiquement, les particules d'origines biologiques (pollens, bactéries, etc.) sont généralement dans un domaine de l'ordre du micromètre, tandis que les aérosols chimiques ont plutôt une taille submicrométrique ($<10^{-6}$ m).

Ces entités peuvent demeurer stables dans l'atmosphère pendant des durées allant d'au moins quelques secondes à plusieurs années. Les aérosols sont des objets très sensibles soumis à divers phénomènes à considérer dans une chaîne de détection [71] :

- **Sédimentation** : mouvement des particules sous l'effet de la pesanteur,
- **Thermophorèse** : déplacements des particules vers des zones de températures décroissantes si un gradient thermique existe,
- **Photophorèse** : attraction ou répulsion sous l'effet d'un rayon lumineux,
- **Diffusionphorèse** : particules de constitution inhomogène se déplaçant dans un mélange de gaz sous l'action d'un gradient de concentrations,
- **Coagulation** : processus d'adhésion ou de fusion d'une particule avec une autre,
- **Phénomènes de répulsions électrostatiques** de particules chargées

Contrairement aux échantillons analysés en LIBS tels que les gaz occupant tout volume d'échantillonnage du plasma ou les surfaces solides aisées à localiser pour y induire un plasma, les particules d'aérosols sont des objets complexes à étudier à cause de leur taille réduite et leur mobilité par rapport au volume d'un plasma localisé. Une chaîne de détection doit tenir compte de ces spécificités.

III.2.2. Bruit de fond atmosphérique et contamination particulaire

III.2.2.1. Composition et caractéristiques générales

Les origines des particules d'aérosols sont multiples. Le diagramme du tableau III-1 montre la diversité et la complexité des aérosols présents naturellement ou artificiellement dans l'air :

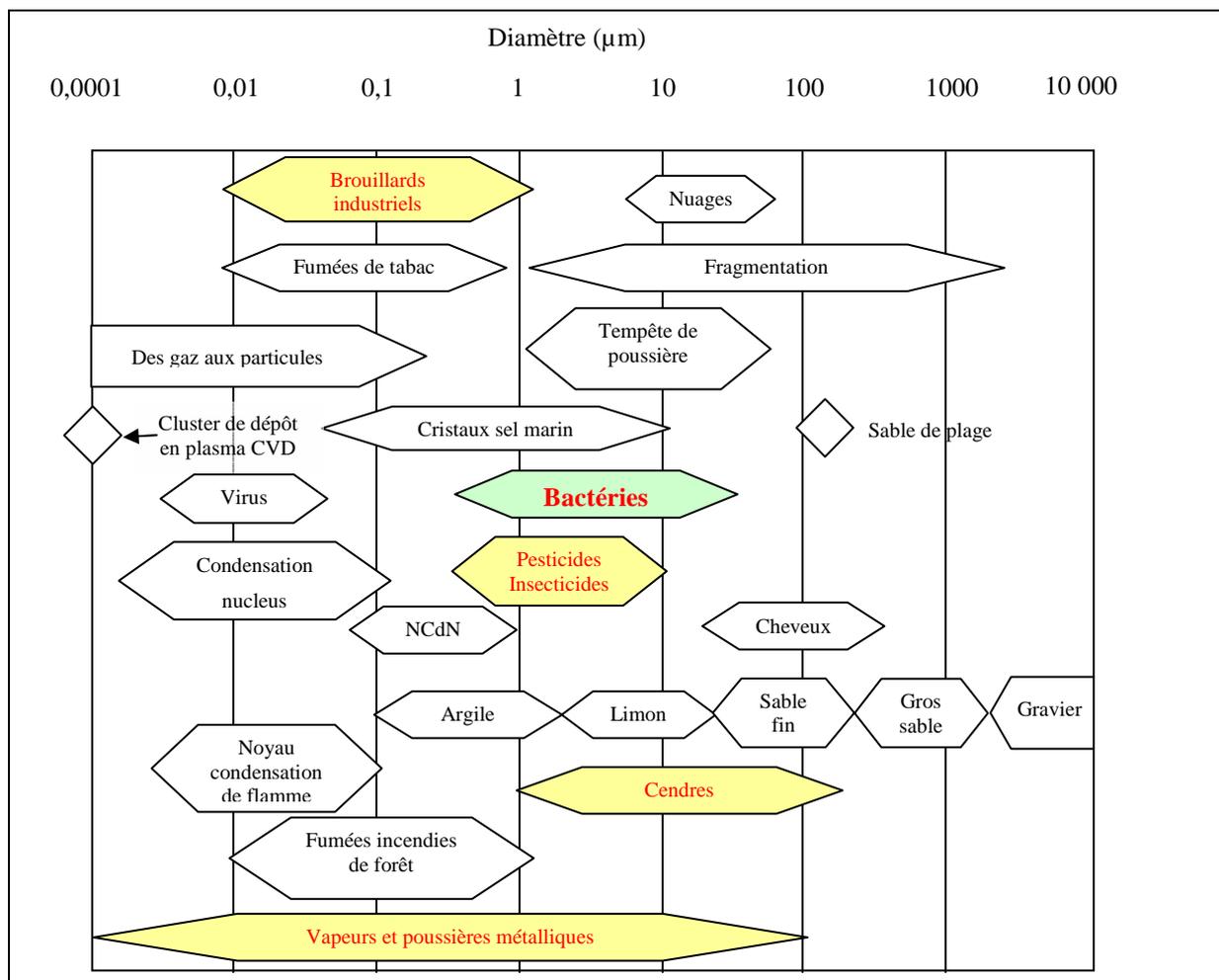


tableau III-1 : Gammes de tailles caractéristiques de diverses particules atmosphériques

Pour concevoir une chaîne de détection de menaces particulières, il est nécessaire de connaître le bruit de fond atmosphérique et de s'en affranchir autant que possible en choisissant les meilleurs marqueurs spectraux discriminants les menaces par rapport à des interférents potentiels pour éviter de fausses alarmes. [72]

III.2.2.2. Aspects toxicologiques

Les particules d'aérosols peuvent à la fois constituer des interférents à éliminer lors de procédés de fabrication mais également représenter des menaces pour l'homme. Les

obligations d'hygiène et de qualité de l'air sont des critères drastiques pour certaines catégories de procédés de fabrication. Par exemple le niveau d'empoussièremment d'une salle blanche où sont produits des systèmes microélectroniques doit être maintenu à une très faible concentration sous peine de polluer les surfaces.

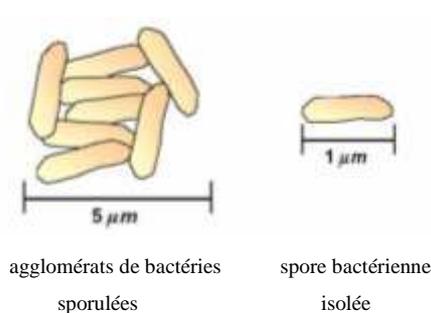


figure III-1 : Gammes de tailles caractéristique de particules d'aérosols bactériens isolé ou agglomérés

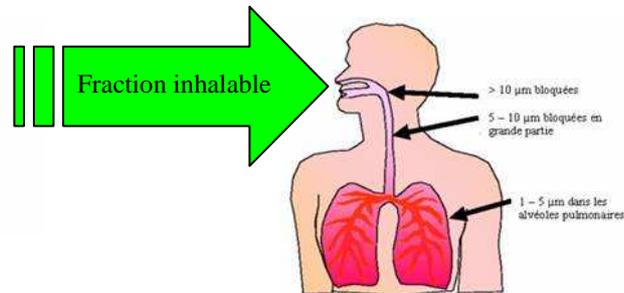


figure III-2 : Fraction inhalable des aérosols biologiques par le système respiratoire

Les contaminations d'atmosphère ou d'objet par des particules pathogènes renvoient aux contextes d'hygiène de l'air mais également à ceux de guerre biologique ou de terrorisme bactériologique. Les modes d'actions sont essentiellement basés sur la pénétration des corps humains ou animaux par contact, ingestion ou respiration de particules nocives. Dans ce dernier cas, on parle de la notion de fraction inhalable pour désigner les gammes de tailles particulières pouvant atteindre et contaminer les voies respiratoires comme illustrée sur la figure III-1 et la figure III-2.

Quand les particules parviennent vers ces tissus respiratoires, des processus d'altérations physiques et/ou chimiques peuvent apparaître selon la nature de la particule. Il existe une préoccupation pour les espèces métalliques des particules sub-micrométriques ou micrométriques créant des inflammations tissulaires ou une contamination sanguine. De même, les particules d'amiante sont dangereuses du fait de leur forme en aiguille provoquant des altérations des tissus pulmonaires. Les bactéries quant à elles sont un danger pathogène pour les tissus pulmonaires car elles y trouvent les conditions idéales (température, nutriments, etc.) pour se multiplier et contaminer en produisant des toxines.

III.3. OBTENTION DE L'INFORMATION GRANULOMETRIQUE

III.3.1. Les dimensions statistiques des aérosols

Les théories de la physique des aérosols sont établies, le plus souvent, pour des particules sphériques [70]. Malheureusement, les aérosols rencontrés habituellement dans l'air sont loin

d'avoir cette forme idéale. Le problème de la définition de la dimension d'une particule se pose et entraîne l'apparition de diamètres statistiques tels ceux illustrés par la figure III-3 :

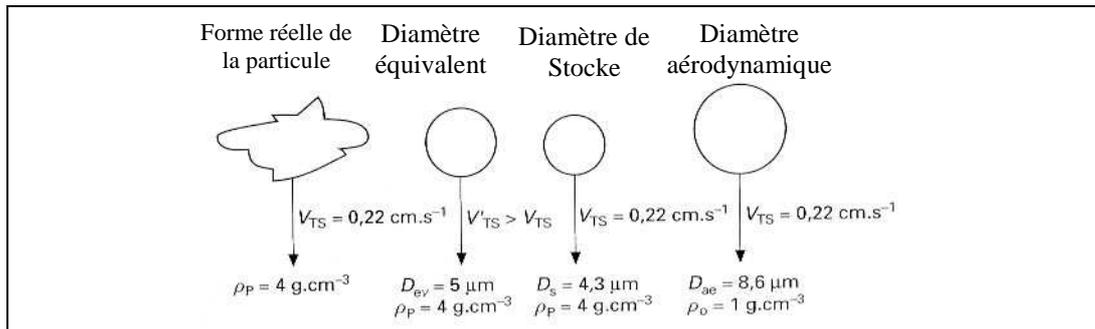


figure III-3 : Diamètres statistiques principaux utilisés pour représenter une particule réelle

- **Le diamètre d_{ev} du volume équivalent** : diamètre de la sphère possédant la même masse m que la particule étudiée et la masse volumique ρ du matériau de celle-ci

$$d_{ev} = \left[\frac{m}{(\pi/6) \cdot \rho} \right]^{1/3} \quad \text{équation III-1}$$

- **Le diamètre de Stocke d_s** : est le diamètre d'une sphère ayant la même vitesse de chute et la même masse spécifique que la particule considérée.
- **Le diamètre aérodynamique d_a** : constitue le diamètre d'une sphère ayant la même vitesse de chute que la particule, et une masse spécifique égale à 1 g.cm^{-3} :

$$d_a = \sqrt{\frac{\rho}{\chi}} \cdot d_{50} \quad \text{équation III-2}$$

ρ est la masse spécifique de l'aérosol dont χ est le facteur de forme de forme dynamique ; d_{50} est le diamètre médian en masse de la distribution granulométrique des aérosols. Grâce à des facteurs de forme, toute particule est représentée selon une sphère équivalente.

III.3.2. Établissement d'une granulométrie

L'aérosol rencontré le plus souvent est polydispersé, c'est-à-dire composé de particules de tailles différentes. Une interprétation statistique est donc nécessaire pour caractériser sa distribution granulométrique. Pour illustration, un logiciel couplé à un dispositif APS (appareil utilisé dans notre montage pour mesurer les diamètres aérodynamiques) représente de telles courbes :

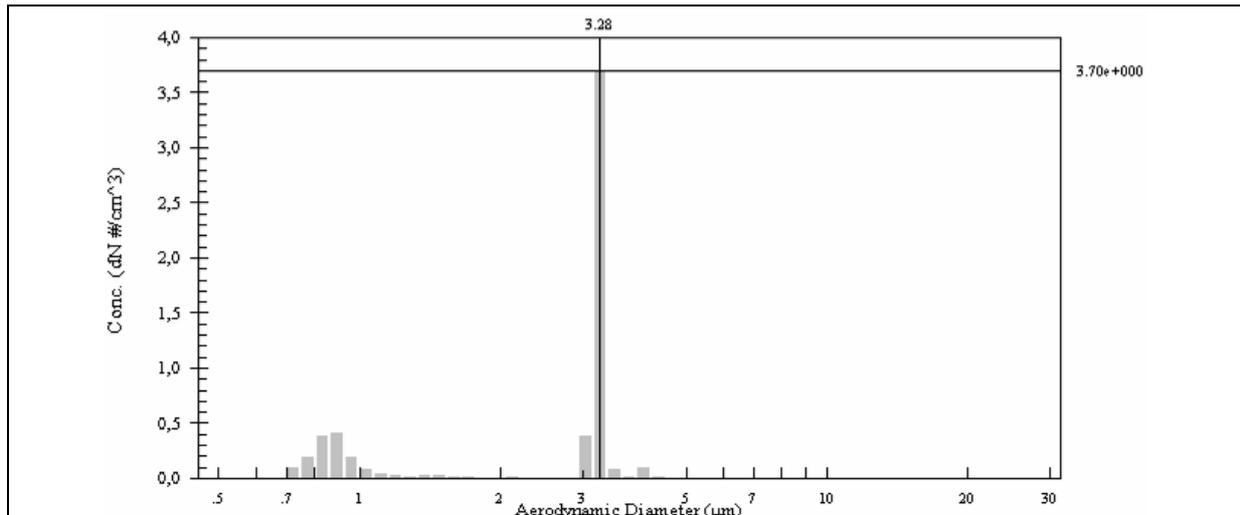


figure III-4 : Représentation granulométrique d'un aérosol monodispersé de particules NaCl de diamètre théorique 3 µm, mode principal mesuré 3,28 µm. Les particules sont dispersées dans l'air ambiant de mode granulométrique principal égal à environ 0,9 µm (logiciel *Aerosol Particle Manager*, TSI)

Dans une représentation granulométrique, des moyennes sont utilisées pour rendre compte des dimensions d'un ensemble de n_i particules de diamètre individuel d_i :

- **La moyenne arithmétique** pour calculer le diamètre moyen de : $\bar{d}_p = \frac{\sum n_i \cdot d_i}{\sum n_i}$
- **La moyenne géométrique** : $\bar{d}_i = N \cdot \sqrt[d_i \cdot n_i]{}$; avec $N = \sum n_i$
- **La médiane** : valeur du diamètre autour duquel se partagent les observations par moitié.
- **Le mode** : la valeur du diamètre pour lequel il y a le plus grand nombre d'observations.

La moyenne arithmétique classique n'est généralement pas le meilleur paramètre pour caractériser une distribution particulière : celle-ci peut être parfois affectée par les aérosols les plus gros ou les plus fins. Dans ce cas, la médiane (correspondant au diamètre qui coupe la distribution en deux parties égales) est plus adaptée.

Dans nos expériences, nous considérerons souvent des aérosols monodispersés ou polydispersés selon une gamme réduite de diamètres (typiquement de 1 à 40 µm, selon le type d'expérience et de matériau). Nous choisirons donc respectivement le mode et la moyenne arithmétique.

III.3.3. Obtention des distributions des tailles aérodynamiques par granulomètre APS

L'APS (Aerodynamic Particle Sizer) est basé sur les travaux de Wilson et Liu (1980) qualifiant un jet accéléré de particules par un vélocimètre laser Doppler. Un dispositif commercial

(modèle TSI 3320) sur ce principe est employé dans nos chaînes de détection en tant qu'instrument granulométrique pour mesurer :

- **La concentration numérique** par comptage des particules,
- **La distribution par taille ou granulométrie** pour chaque particule.

III.3.3.1. Principe

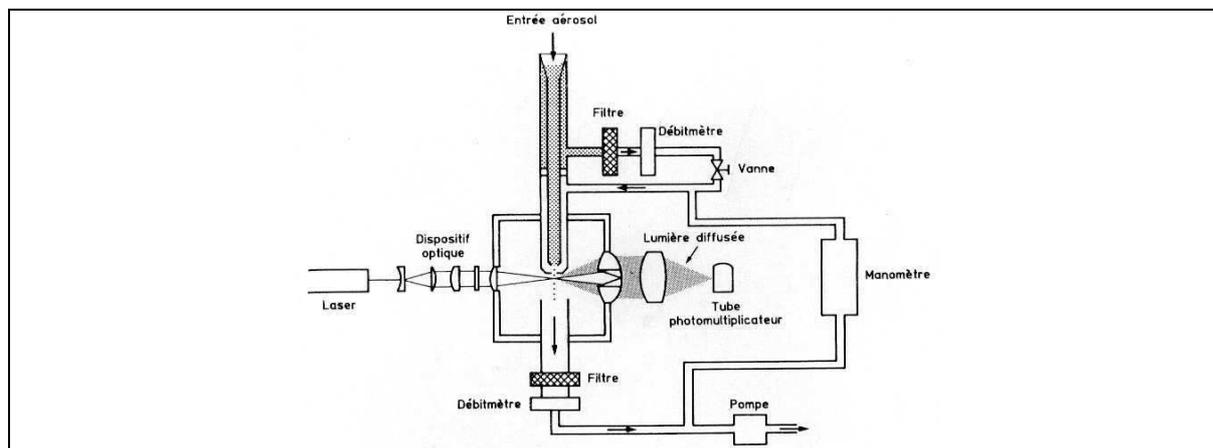


figure III-5 : Principe de fonctionnement de l'Aerodynamic Particle Sizer (APS, modèle 3320, société TSI Inc.)

Dans ce dispositif, l'air porteur des particules est fortement accéléré en passant au travers d'un petit orifice. Du fait de leur inertie caractérisée par leur temps de relaxation τ_p , les particules mettent un certain temps avant d'ajuster leur vitesse à celle du fluide porteur issu ici de l'air comprimé. Ce retard à l'ajustement est proportionnel à leur temps de relaxation et donc à leur diamètre aérodynamique. Ainsi ce diamètre peut être déterminé en mesurant la vitesse de chaque particule juste après l'orifice, à l'aide d'un faisceau laser dédoublé qui forme une zone d'interférométrie dans laquelle les particules passent. L'écart de longueur d'onde permet de déterminer la vitesse.

Le domaine couvert par l'APS est de 0,5 à 30 μm découpé en 30 modes ou classes granulométriques. L'APS permet d'obtenir en temps réel les distributions en taille d'aérosol.

III.3.3.2. Informations disponibles

Les informations de l'APS sont rafraîchies chaque seconde pour suivre en quasi temps réel toute évolution granulométrique de l'aérosol. Un logiciel (*Aerosol Instrument Manager* fourni par TSI) couplé avec l'APS fournit plusieurs valeurs dont la représentation granulométrique numérique (*number concentration*, en particules par cm^3 d'air échantillonné). La détection par vélocimétrie laser est sensible à la quantité de particules, indépendamment de leur masse, forme, composition ou autres caractéristiques. D'autres types d'informations sont extrapolables (cf. tableau III-2)

	Number Particle Size	Surface Particle Size	Mass Particle Size
median (μm)	3,227E+0	3,277E+0	3,284E+0
mean (μm)	2,665E+0	3,261E+0	3,356E+0
geo. mean (μm)	2,340E+0	3,199E+0	3,311E+0
mode (μm)	3,278E+0	3,278E+0	3,278E+0
geo. st. dev.	1,777E+0	1,248E+0	1,177E+0
total conc.	5.84 (#/cm ³)	69.75 ($\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$)	0.056 (mg/m ³)

tableau III-2 : Informations granulométriques accessibles par le logiciel de l'APS : nombres, surfaces et masse des particules. Pour chaque catégorie sont indiquées en μm : valeurs médianes (*median*) – moyennes arithmétiques (*mean*) – moyennes géométriques (*geometric mean*) – mode en μm - écart type géométrique (*geometric standard deviation*). La concentration numérique totale (*total concentration*) est en particules par cm^3 (#/cm³). Des informations surfaciques et massiques sont extraites de ces premières mesures expérimentales.

III.4. ADEQUATION DE LA SENSIBILITE ELEMENTAIRE DE LA LIBS DANS LE CAS DES AEROSOLS AQUEUX

III.4.1. Approche empirique de la quantité minimale de matière échantillonnable

L'un des enjeux fondamentaux de l'étude est d'appréhender le couplage de la technique LIBS pour détecter des particules d'aérosols de taille micrométrique, telles que des bactéries en suspension par exemple. Cette application est possible si et seulement si la sensibilité de la technique LIBS est en adéquation avec la quantité de matière contenue dans une telle particule vaporisée et excitée par le plasma.

L'étape primitive est la détermination de la quantité minimale de matière à priori échantillonnable et détectable par les dispositifs expérimentaux LIBS possédés et validés pour l'analyse de gaz et de surfaces. Des performances analytiques ont été établies en terme de limites de détections élémentaires pour certains atomes (halogènes et métaux par exemples). L'idée consiste à élaborer des bilans de matière pour les particules micrométriques présentes dans un plasma en extrapolant la sensibilité acquises pour les gaz.

L'objectif de notre approche est de savoir si les teneurs élémentaires contenues dans une particule de taille micrométrique telle qu'une bactérie sont compatibles avec les limites de détections validées sur des éléments de référence, en particulier des atomes issus de gaz de référence.

III.4.2. Quantité d'atomes détectable dans le volume d'un plasma induit par laser

La première phase de l'approche est d'estimer la quantité d'atomes dans le volume du plasma induit dans l'air. Chaque plasma est ici usuellement formé à l'aide d'un pulse laser ns d'énergie typique de plusieurs dizaines de millijoules et focalisé par une lentille plan convexe de distance focale de quelques centimètres. Les plasmas obtenus se présentent comme des milieux délimités spatialement et de forme analogue à celle d'une ellipse dont le grand axe mesure quelques millimètres.

Dans sa thèse, L. Dudragne [2] a établi expérimentalement les dimensions d'un plasma obtenu en focalisant grâce à une lentille de distance focale égale à 65 mm un faisceau laser Nd :YAG de diamètre initial équivalent à 5 mm, à la longueur d'onde de 1064 nm et d'énergie valant 100 mJ. Le plasma était à l'époque partiellement imagé par une fibre optique de diamètre de cœur de 365 μm et d'ouverture numérique de 0,22. L'extrémité de la fibre est positionnée à 3 mm du plasma et déplacée sur la longueur du plasma (cf. figure III-6).

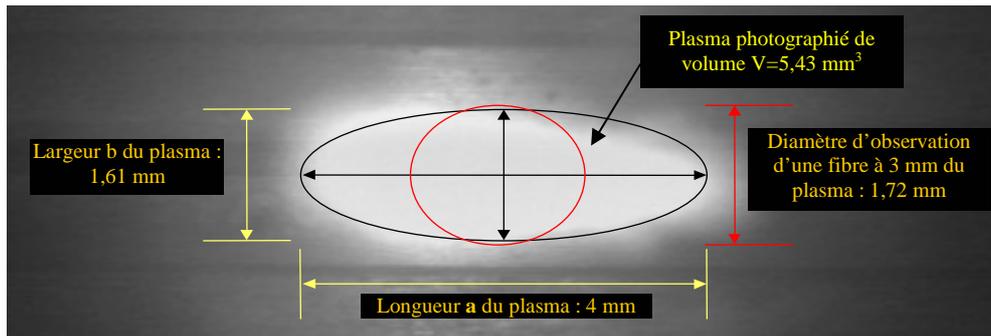


figure III-6 : Surface observée par une fibre optique mobile placée à 3 mm de l'axe du plasma

En assimilant le plasma à une ellipse de grand axe de longueur \underline{a} égale à 4 mm et de petit axe de distance \underline{b} valant 1,61 mm, il est possible d'approximer le volume \underline{V} de ce plasma à celui $\underline{V}_{\text{ellipse}}$ d'une ellipse selon :

$$V = V_{\text{ellipse}} = \frac{4 \times \pi}{3} \times \frac{a}{2} \times \left(\frac{b}{2}\right)^2 \approx 5,43 \text{ mm}^3 \quad \text{équation III-3}$$

Comme rappelé dans le chapitre I, un plasma induit dans l'air (mélange à 80% de N_2 et à 20% de O_2) peut être assimilé à un gaz dont la température \underline{T} est égale à environ 20 000 K à la pression atmosphérique $\underline{P}_{\text{atmo}}$ (hypothèse forte étant donnée l'existence de gradients thermiques en évolutions complexes durant la croissance et l'extinction du plasma). Dans le but d'établir un modèle très simplifié pour appréhender les limites de détection, on pose les hypothèses fortes que le plasma est semblable à un gaz parfait et que sa seule action est de se dilater. Il est

possible d'évaluer la quantité de molécules le composant par le volume molaire d'un gaz parfait à température ambiante T_0 (298K) et à pression ambiante P_{atmo} : $V_0=24 \text{ L.mol}^{-1}$. En utilisant la relation caractéristique des gaz parfaits liant le volume V_i du gaz à la température T_i selon $PV_i=nRT_i$ avec R la constante des gaz parfait et n les moles :

$$P_{atmo} \times V_{20000K} = nRT = nR \times 20000 \quad \text{équation III-4}$$

$$P_{atmo} \times V_{298K} = nRT_0 = nR \times 298 \quad \text{équation III-5}$$

Le rapport de l'équation III-5 avec l'équation III-4 permet d'approximer la quantité de molécules contenues dans le plasma induit par laser et par conséquent le volume V_{298K} du plasma assimilé à un gaz parfait à la température de 298K :

$$\frac{V_{298K}}{V_{20000K}} = \frac{298}{20000} \approx (67,2)^{-1} \rightarrow V_{20000K}=67xV_{298K} \quad \text{équation III-6}$$

Sachant qu'une mole de gaz parfait a un volume de 24 L à pression atmosphérique P_{atmo} et à $T=298 \text{ K}$, on déduit la quantité n de molécules présentes dans ce volume :

$$n_{20000K} = \frac{V_{298K}}{V_{20000K}} n_{298K} = \frac{V_{298K} \times N_{Avogadro} \times V_{plasma}}{V_{20000K} \times V_{molaire}} \quad \text{équation III-7}$$

$$n_{20000K} = \frac{8,09 \cdot 10^{-2} \cdot 10^{-6} \text{ dm}^3 \times 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{24 \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}} \approx 2 \cdot 10^{15} \text{ molécules}$$

L'air étant un mélange à 80% de N_2 et à 20% de O_2 , globalement une molécule d'air contient deux atomes. Chacun des plasmas générés dans nos expériences englobe $2n = 4 \cdot 10^{15}$ atomes .

La concentration atomique $C_{atomique}$ dans ce type de plasma est :

Les précédentes thèses effectuées au CEB sur la LIBS (H. Lancelin [1], L. Dudragne [2] et S. Morel [3]) – ainsi que les études menées dans ce rapport avec les nouveaux appareillages – ont eu pour finalité l'étude de la sensibilité des dispositifs expérimentaux.

Des procédures optimisées permettent d'approcher les limites de détection pour un certain nombre d'éléments – chlore, carbone, soufre et fluor – sous forme de gaz. Les paramètres choisis pour les optiques de focalisation (**lentille de longueur focale égale à 6,5 cm**) et le laser (**énergie de pulse = 100 mJ, diamètre du faisceau = 0,5 cm, longueur d'onde = 1,064x10⁻⁴ cm et durée de pulse = 6 ns**). En appliquant l'équation I-10 (page 48), la **densité d'énergie utilisée est égale à 4,66 10¹¹ W.cm⁻²**.

En posant l'hypothèse forte que le nombre d'atomes est indépendant du matériau (106 ppm correspond à 4.1015 atomes), on déduit les éléments du tableau III-3 par une règle de « trois ».

Elément	Longueur d'onde (nm)	Phase	Densité d'énergie moyenne : $4,6 \cdot 10^{11} \text{ W/cm}^2$ – Diamètre tâche focale : $67,5 \mu\text{m}$ Volume du plasma = $5,43 \text{ mm}^3$		Nombre d'atomes détectables dans le plasma de volume $5,43 \text{ mm}^3$	Concentration atomique détectable par unité de volume de plasma en mm^{-3}
			Limites de détection en ppm (m/m) obtenues avec le critère IUPAC	Spectromètre + détecteur utilisés		
Cl	837,594	Gaz CF_2Cl_2 dans air	90	THR1000 + iCCD OMA 4	$3,6 \cdot 10^{11}$	$6,7 \cdot 10^{10}$
			55	THR1000 + iCCD PIMAX	$2,2 \cdot 10^{11}$	$4,1 \cdot 10^{10}$
C	247,856	Gaz CF_2Cl_2 dans air	3	THR1000 + iCCD OMA 4	$1,2 \cdot 10^{10}$	$2,2 \cdot 10^9$
			4	THR1000 + iCCD PIMAX	$1,6 \cdot 10^{10}$	$3,0 \cdot 10^9$
S	921,291	Gaz SF_6 dans air	1500	THR1000 + iCCD OMA 4	$6,0 \cdot 10^{12}$	$1,1 \cdot 10^{12}$
			500	THR1000 + iCCD PIMAX	$2,0 \cdot 10^{12}$	$3,7 \cdot 10^{11}$
F	685,602	Gaz CF_2Cl_2 dans air	20	THR1000 + iCCD OMA 4	$8,0 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{10}$

tableau III-3 : Limites de détection pour les éléments Cl, C, S et F exprimées en nombre d'atomes détectables dans le volume du plasma induit par un pulse laser d'énergie 100 mJ, de longueur d'onde 1064 nm, de diamètre initial égal à 5 mm et focalisé par une lentille de distance focale égale à 65 mm. Deux types de spectromètres ont été utilisés comme indiqués.

Le tableau III-3 liste les limites de détection pour le chlore, le carbone, le soufre et le fluor selon la configuration énergétique du plasma employée et les spectromètres associés. La dernière colonne référence les limites de détection – initialement exprimées en parties par million (ppm) – en nombre d'atomes d'éléments d'intérêt auxquels la méthodologie LIBS développée peut être sensible. Si X ppm d'un élément E sont détectables, alors pour un million d'atomes, X atomes représentent cet élément E .

Selon les éléments considérés et les configurations d'appareillages utilisées, **des quantités typiques d'ordre de grandeur comprises entre 10^9 et 10^{12} atomes d'intérêt – initialement sous forme gazeuse – par volume élémentaire d'échantillonnage par plasma (en mm^3) sont détectables.**

Par extrapolation depuis ces acquis expérimentaux, la prochaine étape consiste alors à savoir si la technique LIBS est sensible ou non aux teneurs élémentaires contenues dans les particules d'aérosol afin d'y extraire des marqueurs spectraux.

III.4.3. Couplage et imagerie de l'interaction d'un plasma et de particule

Dans notre problématique de sensibilité analytique, il est nécessaire que le plasma englobe la ou les particules d'aérosol pour les vaporiser, les exciter et les analyser suivant le procédé LIBS. La figure III-7 schématise l'interaction entre un plasma de caractéristiques connues (température du « gaz » plasma estimée à 20000 K, volume déduit à partir des dimensions millimétriques mesurées) et une particule typique de l'atmosphère présentant une taille micrométrique. Une fibre de plus grand diamètre de cœur Φ ($\Phi = 1$ mm) est choisie pour échantillonner optiquement davantage de volume plasma, comparativement à celle utilisée dans le passé ($\Phi = 365 \mu\text{m}$, cf. figure III-6, page 95).

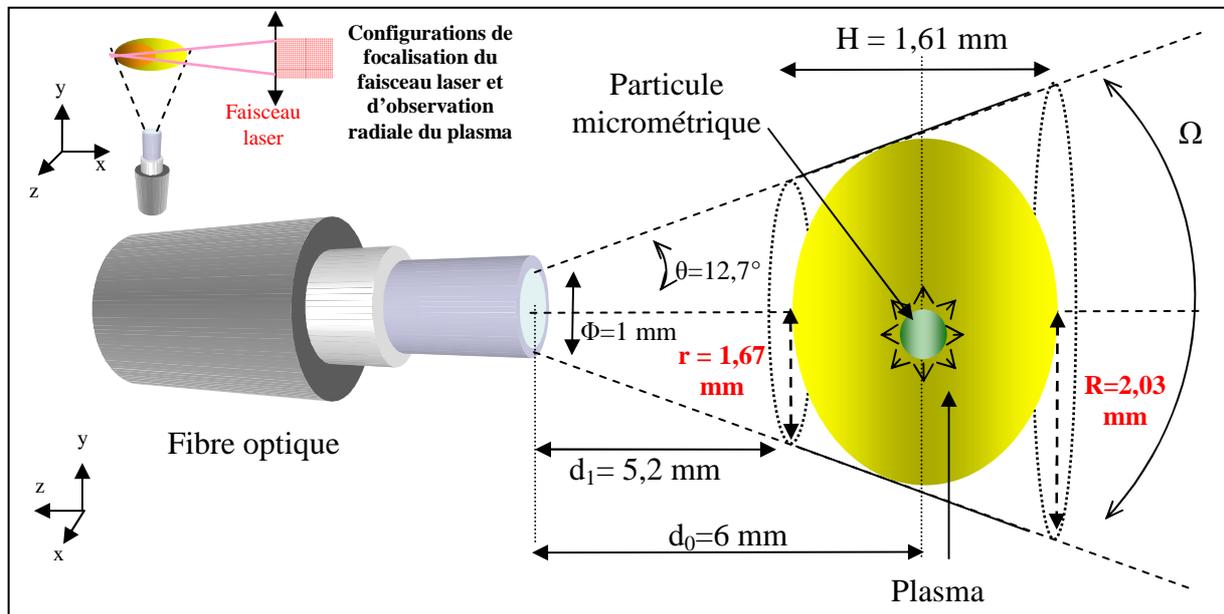


figure III-7 : Schéma illustrant le couplage d'une particule micrométrique vaporisée et excitée par un plasma typiquement généré avec les dispositifs LIBS possédés et imagé partiellement par fibre optique

La fibre optique présente une ouverture numérique $\Omega = \sin\theta = 0,22$, d'où l'angle $\theta = 12,7^\circ$. L'extrémité de la face d'observation de la fibre est placée à $d_0 = 6\text{mm}$ du centre du plasma exactement positionné au foyer de la lentille. La fibre a un diamètre de cœur Φ égal à $1000 \mu\text{m}$. Le volume V observé par la fibre optique est un cône tronqué, soit :

$$V = \pi H/3. (rR + R^2 + r^2) \quad \text{équation III-8}$$

- **$r = d_1 \cdot \tan \theta + \Phi/2 \approx 1,67 \text{ mm}$** , d'où une surface égale à $\pi R^2 \sim 8,8 \text{ mm}^2$.
- **$R = (H + d_1) \cdot \tan \theta + \Phi/2 \approx 2,03 \text{ mm}$** , soit surface égale à $\pi R^2 \sim 13,0 \text{ mm}^2$.

Dans les calculs suivants, nous considérerons un plasma de forme ellipsoïdale, induit avec une énergie de pulse de 100 mJ et présentant une longueur de 4 mm pour une largeur de 1,61 mm

(cf. figure III-6, page 95). La comparaison de ces dimensions avec celles d'observations par la fibre optique montre que le plasma est entièrement imagé en hauteur H ($2 \times r \approx 3,34 \text{ mm} > H = 1,61 \text{ mm}$) et en longueur L ($2 \times R = 4,06 \text{ mm} \approx L = 4 \text{ mm}$).

Si le plasma est transparent (optiquement mince), la fibre n'observe pas une surface émissive, mais un volume émissif V de plasma voisin du volume du cône tronqué de rayon $r \approx 1,67 \text{ mm}$ et $R \approx 2,03 \text{ mm}$ et de hauteur $H = 1,61 \text{ mm}$, soit environ $V=17,41 \text{ mm}^3$. Le plasma de volume moindre est entièrement imagé. La manière d'imager pourrait être améliorée en optimisant la distance d_0 entre la position de formation du plasma et la face nue de la fibre optique pour minimiser l'acquisition de la lumière environnante.

III.4.4. Choix de modèles particuliers multi élémentaires

Cette partie a fait l'objet d'une publication [73]

Pour appréhender et adapter le couplage de la méthodologie LIBS à la détection d'aérosols, la première étape consiste à vérifier expérimentalement la sensibilité analytique de nos dispositifs expérimentaux par rapport aux teneurs élémentaires de modèles représentatifs d'aérosols atmosphériques. Comme précédemment illustré par le tableau III-1 de la page 89, le bruit de fond atmosphérique présente naturellement une diversité de particules en termes de dimensions (de 10^{-4} à 10^4 micromètres), de natures minérales ou organiques, d'états inertes ou viables. Les compositions élémentaires peuvent être simples et homogènes – telles des particules de silice SiO_2 par exemple – ou complexes à l'instar de microorganismes vivants tels que des bactéries. Un protocole est développé pour générer des modèles particuliers calibrés suivant les paramètres suivants :

- Génération de particules présentant des dimensions aérodynamiques de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres en relation avec la détection de risques particuliers chimiques et biologiques,
- Contrôle de la composition de chaque particule, avec des teneurs élémentaires représentatives des catégories d'aérosols atmosphériques (particules salines homogènes, structures complexes des bactéries vivantes).
- Contrôle de la granulométrie (distribution en tailles et concentrations) au voisinage du plasma à l'aide d'une métrologie adaptée.

III.4.5. Génération de courants linéaires de microgouttelettes par orifice vibrant

III.4.5.1. Principe

Pour simuler des modèles d'aérosols calibrés et reproductibles en dimensions et en compositions, un générateur d'aérosol à orifice vibrant est utilisé (*Vibrating Orifice Aerosol Generator* ou VOAG, marque TSI, modèle 3450).

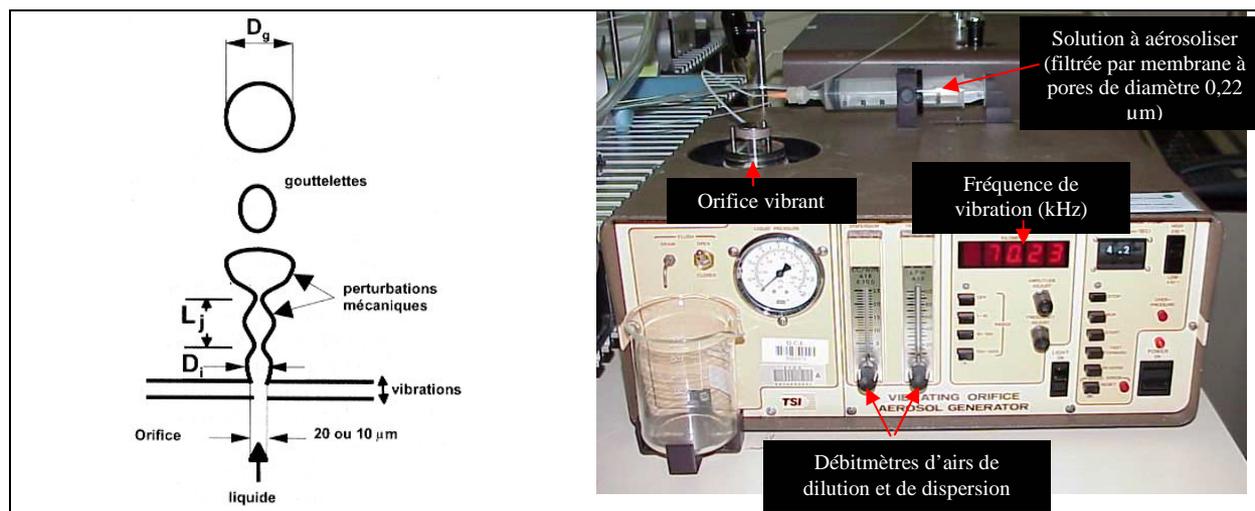


figure III-8 : Schéma de principe et photographie du générateur d'aérosols à orifice vibrant ou VOAG (marque TSI, modèle 3450)

Dans ce dispositif créé par Berglund et Liu [74], une solution de composition et de concentration connues en solutés est forcée à circuler dans un orifice de diamètre 20 μm micrométrique avec un débit de liquide Q_L adéquat (en $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) [75]. L'application d'une fréquence de vibration f (s^{-1}) constante sur l'orifice engendre une fragmentation du jet liquide en sortie d'orifice : il apparaît un courant linéaire et localisé selon un axe vertical microgouttelettes. Ce courant est composé de la solution initiale fragmentée en gouttelettes de diamètre micrométrique D_g égal et reproductible ($\pm 1\%$), et de volume V_g (en m^3) :

$$V_g = Q_L / f \quad \text{équation III-9}$$

Chaque microgouttelette contient les mêmes quantités de solvant volatil (ici, un mélange 50 :50 d'eau ultra pure et d'isopropanol) et de solutés non volatiles. L'idée est d'utiliser chacune des gouttelettes de taille micrométrique comme une matrice liquide contenant des teneurs élémentaires voisines de celles d'une particule d'aérosol atmosphérique.

Le diamètre D_g des gouttelettes micrométriques en sortie d'orifice est calculée selon :

$$D_g = \left(\frac{6 \times Q_L}{\pi \times f} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{équation III-10}$$

Q_L est le débit du liquide en sortie de l'orifice vibrant ($Q_L = 0,139 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ou $2,39 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$). La fréquence f de vibration de l'orifice est fixée à 80 kHz. L'application numérique donne une valeur de diamètre de microgouttelette D_g égale à **38,00 ± 0,04 μm**, soit un volume $V_{\text{gouttelette}}$ égal à 28730 μm^3 . Connaissant le diamètre de la microgouttelette, il est possible de calculer la quantité d'atomes présents. Le nombre de moles de molécules d' H_2O s'obtient depuis la masse d'une microgouttelette d'eau (densité $d=1$) selon :

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{m_{\text{gouttelette}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}} N_{\text{Avogadro}} = \frac{d_{\text{H}_2\text{O}} \cdot V_{\text{gouttelette}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}} N_{\text{Avogadro}} = 9,6 \cdot 10^{14} \quad \text{moles d'H}_2\text{O} \quad \text{équation III-11}$$

L'application numérique donne $n_{\text{H}_2\text{O}} = 9,6 \cdot 10^{14}$ molécules d' H_2O composées chacune de 3 atomes : une microgouttelette contient **3n_{H2O} = 2,88 10¹⁵ atomes**, soient **10²⁰ atomes par mm³** de volume élémentaire basé sur celui de la microgouttelette. On dispose donc d'une matrice aqueuse reproductible en volume dans laquelle on peut dissoudre des analytes en natures et en quantités connues. Connaissant le volume de la microgouttelette, il est possible d'estimer le diamètre de la particule sèche D_p correspondante dès lors de l'évaporation du solvant volatile via la relation suivante :

$$D_p = \sqrt[3]{\frac{6 \times Q_L \times (C + I)}{\pi \times f}} \quad \text{équation III-12}$$

C est la concentration volumique des solutés non volatiles et I est la concentration volumique en impuretés non volatiles composant le solvant volatil initial. La validité de cette formule et le bon fonctionnement du générateur sont vérifiés en mesurant la granulométrie des particules sèches (cf. illustration chapitre II) illustrant une concordance entre diamètre théorique et expérimental. Les particules générées par le générateur à orifice vibrant peuvent donc être analysées de deux façons :

1. **Soit par génération d'un plasma induit par laser sur le courant linéaire localisé de particules isolées et de tailles micrométriques présentes en sortie du générateur à orifice vibrant,**
2. Soit après évaporation du solvant volatile des microgouttelettes pour obtenir des particules résiduelles de dimensions micrométriques amoindries (diamètre D_p). Ces particules asséchées sont alors dirigées vers la position de formation du plasma pour des interactions aléatoires.

La première solution est considérée pour bien contrôler la position des particules générées dans le volume d'échantillonnage plasma.

III.4.5.2. Choix de solutions multiélémentaires étalonnées

Pour en tenir compte la diversité des aérosols atmosphériques naturels ou artificiels du tableau III-1 (page 89), des entités de composition multiélémentaires initialement sous forme de microgouttelettes sont générées avec le VOAG. Notre choix s'est porté sur la fragmentation de jets basés sur des eaux minérales ou de sources du commerce étalonnées en composition élémentaire et en concentration **[X]** pour chaque élément **X**.

Concentrations cationiques des eaux (mg/L ou ppm)	Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	Eau n°5
[Ca ²⁺]	4,1	26,5	45,0	46,1	89,0
[Mg ²⁺]	1,7	1,0	3,2	4,3	31,0
[Na ⁺]	2,7	0,8	5,1	6,3	17,0

tableau III-4 : Concentrations cationiques des eaux de source et minérales utilisées (données présentes sur les étiquettes des bouteilles)

Le tableau III-4 référence les masses élémentaires **m_X** de chaque élément **X** contenues dans chacune des microgouttelettes générées en sortie de VOAG. Les masses **m_X** sont calculées par le produit des concentrations élémentaires **[X]** avec le volume de gouttelette de diamètre **D_g**.

La connaissance des concentrations exprimées en ppm dans le tableau III-4 et de la valeur du nombre total d'atomes ($3 n_{H_2O}=2,88 \cdot 10^{15}$) contenus dans une microgouttelette de diamètre égal à 38 µm permet également de calculer les quantités atomiques en **Ca**, **Mg** et **Na**.

		Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	Eau n°5
Ca	Masse par gouttelette (fg)	118	761	1290	1320	2560
	Nombre d'atomes par gouttelette	$1,18 \cdot 10^{10}$	$7,63 \cdot 10^{10}$	$1,30 \cdot 10^{11}$	$1,33 \cdot 10^{11}$	$2,56 \cdot 10^{11}$
	Nombre d'atomes par volume élémentaire de plasma (mm ⁻³)	$2,17 \cdot 10^9$	$1,41 \cdot 10^{10}$	$2,39 \cdot 10^{10}$	$2,45 \cdot 10^{10}$	$4,72 \cdot 10^{10}$
Mg	Masse par gouttelette (fg)	49	29	92	124	891
	Nombre d'atomes par gouttelette	$4,90 \cdot 10^9$	$2,88 \cdot 10^9$	$9,22 \cdot 10^9$	$1,24 \cdot 10^{10}$	$8,93 \cdot 10^{10}$
	Nombre d'atomes par volume élémentaire de plasma (mm ⁻³)	$9,02 \cdot 10^8$	$5,30 \cdot 10^8$	$1,70 \cdot 10^9$	$2,28 \cdot 10^9$	$1,64 \cdot 10^{10}$
Na	Masse par gouttelette (fg)	78	23	147	181	488
	Nombre d'atomes par gouttelette	$7,78 \cdot 10^9$	$2,30 \cdot 10^9$	$1,47 \cdot 10^{10}$	$1,81 \cdot 10^{10}$	$4,90 \cdot 10^{10}$
	Nombre d'atomes par volume élémentaire de plasma (mm ⁻³)	$1,43 \cdot 10^9$	$4,24 \cdot 10^8$	$2,70 \cdot 10^9$	$3,34 \cdot 10^9$	$9,02 \cdot 10^9$

tableau III-5 : Masses et quantités en nombre d'atomes pour chaque élément constituant les gouttelettes générées
La comparaison des teneurs atomiques présentes dans une seule microgouttelette de diamètre 38 µm (de 10^8 à 10^{10} atomes par mm³ de volume de plasma de référence 5,43 mm³) avec celles

déTECTABLES par nos dispositifs LIBS et indiquées dans les deux dernières colonnes du tableau III-3 en page 97, fait apparaître des ordres de grandeur assez proches (de 10^9 à 10^{12} atomes par mm^3 de volume échantillonné par le plasma) en terme de sensibilité. **Une seule microgouttelette échantillonnée présente donc des teneurs parfois inférieures d'un facteur 10 par rapport à celles mesurables par la méthodologie LIBS.**

La prochaine étape consiste à positionner un nombre connu de microgouttelettes calibrées dans la zone de formation du plasma induit par laser.

III.4.5.3. Couplage de la LIBS avec les courants linéaires de microgouttelettes séparées

Le générateur d'aérosol fournit en sortie de son orifice vibrant un jet linéaire et localisé de microgouttelettes séparées et étalonnées en masse absolue d'analyte. L'objectif est d'induire des plasmas sur ces microgouttelettes localisées pour les analyser par LIBS :

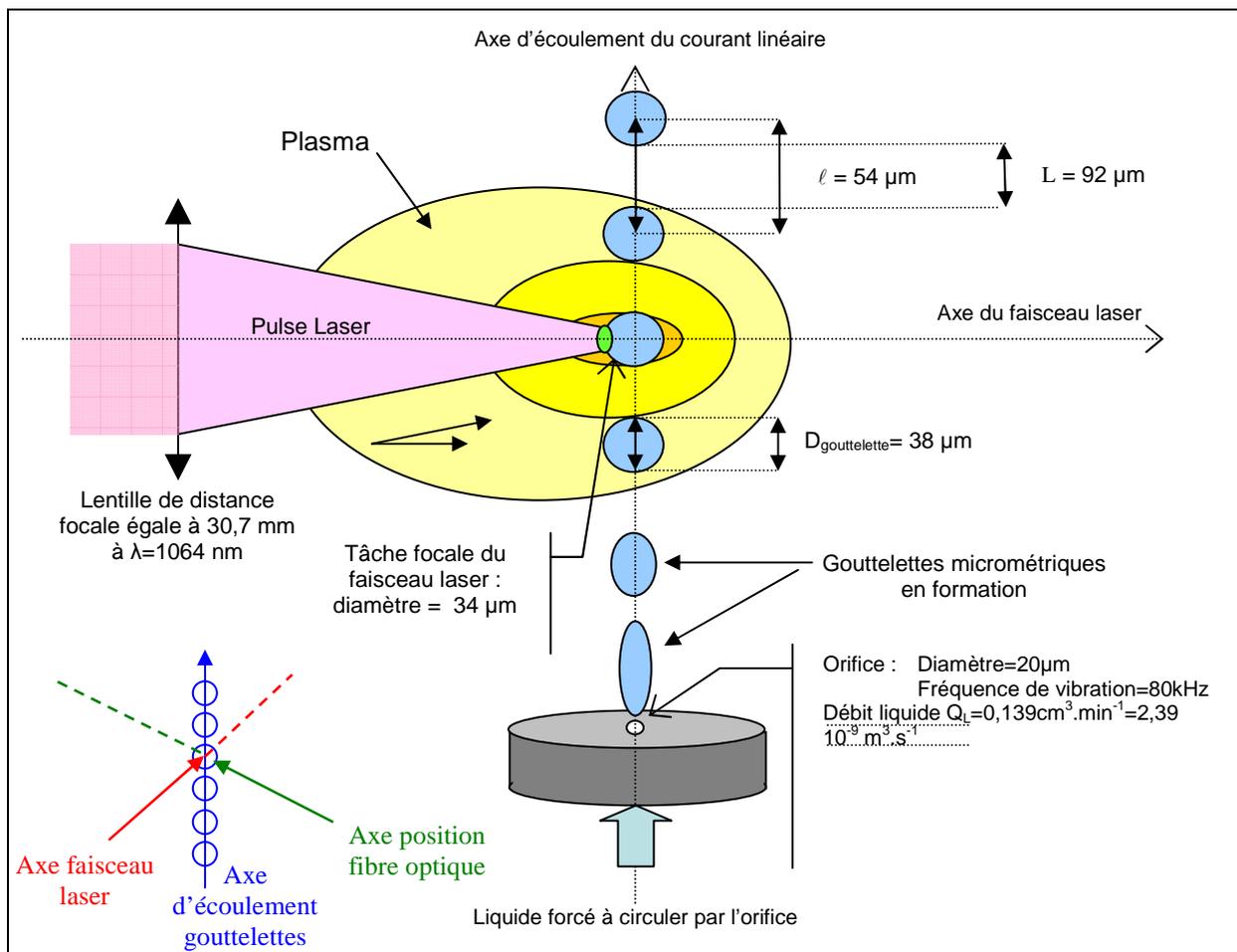


figure III-9 : Schéma du couplage plasma-courant linéaire de microgouttelettes séparées

Le courant linéaire de micro-particules liquides est entouré par un courant d'air épuré de débit égal à $80 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Ce dernier est destiné à entraîner et à assécher les particules par évaporation du solvant volatile qu'est l'eau. Sur les dix premiers centimètres, le courant de microgouttelettes demeure linéaire et les particules bien séparées. Au-delà de cette distance, les effets de gravités et la diminution de la masse des gouttelettes par évaporation progressive de l'eau volatile conduit à une dispersion des microgouttelettes dans toutes les directions. Pour éviter un dépôt des particules sur le générateur d'aérosol, un système d'aspiration est positionné à une distance d'environ un mètre au-dessus du VOAG. Grâce à des platines micrométriques supportant la lentille plan-convexe véhiculant le flash laser, la position de formation du plasma est localisée orthogonalement sur l'axe d'écoulement des microgouttelettes. Le but est de forcer les microgouttelettes à résider dans la zone du plasma la plus énergétique, c'est-à-dire localisée au niveau de la distance focale de la lentille.

Une lampe spécifique livrée avec le générateur permet de contrôler les positionnements adéquats de l'axe d'écoulement des microgouttelettes, de la lentille et de la fibre optique. La figure III-9 schématise le couplage plasma-courant linéaire de microgouttelettes séparées en sortie de générateur à orifice vibrant.

Les paramètres de focalisation du faisceau sont choisis pour optimiser le recouvrement de la tâche focale du faisceau laser par rapport à la présence d'une microgouttelette passant en position de formation du plasma. Les dimensions de la tâche focale dépendent des paramètres du laser et de l'optique de focalisation (cf. page 46). La collection du flux lumineux provenant de chaque plasma est assurée par le positionnement à 90° d'une fibre optique par rapport au plan vertical contenant l'axe du faisceau laser lui-même et le jet positionné à 90° de ce dernier. La distance entre la fibre optique et le plasma est de 5 mm.

La distance entre deux microgouttelettes successives est calculée grâce aux débits de liquide sortant du générateur à orifice vibrant. En sortie d'orifice, le débit liquide Q_L équivaut à $0,139\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ ou $2,32 \cdot 10^{-9}\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$. Sachant ce débit égal au produit de la section s de l'orifice de diamètre égal à $20 \mu\text{m}$ et de la vitesse V du liquide en sortie d'orifice, la valeur de cette vitesse V est obtenue par la relation :

$$V = Q_L / s \quad \text{équation III-13}$$

L'orifice présente un diamètre de D égal à $20 \mu\text{m}$ (diamètre vérifié par microscopie électronique à balayage). La section s est alors déduite selon :

$$s = \pi \times D^2 / 4 = 3,14 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \quad \text{équation III-14}$$

Nous pouvons alors calculer la vitesse v des gouttelettes en sortie d'orifice vibrant :

$$v = Q_L / s = 7,38 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1} \quad \text{équation III-15}$$

Une gouttelette est générée à chaque perturbation de l'orifice à fréquence équivalente à 80 kHz.

La distance ℓ entre le centre de deux gouttelettes successives vaut :

$$\ell = v/f = 92 \mu\text{m} \quad \text{équation III-16}$$

En tenant compte des rayons des particules se suivant, la distance L entre deux gouttelettes est approximée selon $L = 92 - 2 \times 19 = 54 \mu\text{m}$. Pour un plasma de hauteur de 1,61 mm, **un plasma engloberait au maximum $1610 \mu\text{m} / 92 \mu\text{m} = 17,5$ microgouttelettes.**

Elément		Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	Eau n°5
Ca	Masse élémentaire totale dans 17,5 gouttelettes (fg)	2065	13317	22575	23100	44800
	Nombre d'atomes dans 17,5 gouttelettes	$2,07 \cdot 10^{11}$	$1,34 \cdot 10^{12}$	$2,28 \cdot 10^{12}$	$2,33 \cdot 10^{12}$	$4,48 \cdot 10^{12}$
	Nombre d'atomes par volume échantillonné (mm^{-3})	$3,80 \cdot 10^{10}$	$2,47 \cdot 10^{11}$	$4,18 \cdot 10^{11}$	$4,29 \cdot 10^{11}$	$8,26 \cdot 10^{11}$
Mg	Masse élémentaire totale dans 17,5 gouttelettes (fg)	857,5	507,5	1610	2170	15592,5
	Nombre d'atomes dans 17,5 gouttelettes	$8,58 \cdot 10^{10}$	$5,04 \cdot 10^{10}$	$1,61 \cdot 10^{11}$	$2,17 \cdot 10^{11}$	$1,56 \cdot 10^{12}$
	Nombre d'atomes par volume échantillonné (mm^{-3})	$1,58 \cdot 10^{10}$	$9,28 \cdot 10^9$	$2,98 \cdot 10^{10}$	$3,99 \cdot 10^{10}$	$2,87 \cdot 10^{11}$
Na	Masse élémentaire totale dans 17,5 gouttelettes (fg)	1365	402,5	2572,5	3167,5	8540
	Nombre d'atomes dans 17,5 gouttelettes	$1,36 \cdot 10^{11}$	$4,03 \cdot 10^{10}$	$2,57 \cdot 10^{11}$	$3,17 \cdot 10^{11}$	$8,58 \cdot 10^{11}$
	Nombre d'atomes par volume échantillonné (mm^{-3})	$2,50 \cdot 10^{10}$	$7,42 \cdot 10^9$	$4,73 \cdot 10^{10}$	$5,85 \cdot 10^{10}$	$1,58 \cdot 10^{11}$

tableau III-6 : Quantités atomiques contenues dans l'ensemble des 17,5 microgouttelettes analysées par plasma

Le tableau III-6 compare les teneurs atomiques présentes dans l'ensemble des microgouttelettes analysées par le volume du plasma (de 10^9 à 10^{11} atomes par mm^3 de volume de plasma) avec celles détectables par nos dispositifs LIBS (de 10^9 à 10^{12} atomes par mm^3 de volume de plasma, cf. dernière colonne du tableau III-3, page 97). Les ordres de grandeur apparaissent très proches (de 10^9 à 10^{11} atomes par mm^3 de volume de plasma). **Les échantillons aqueux sont donc de teneurs similaires à celles mesurables par la méthodologie LIBS.**

Les plasmas sont générés sur les écoulements de microgouttelettes avec une configuration optomécanique telle que celle de la figure III-10 permet de visualiser le couplage du plasma sur le jet de microgouttelettes séparées. Nous soulignons qu'à cause de la lenteur de l'obturateur de l'appareil photographique utilisé, un phénomène flouant l'image déforme les dimensions du plasma et des microgouttelettes par rapport à la réalité.

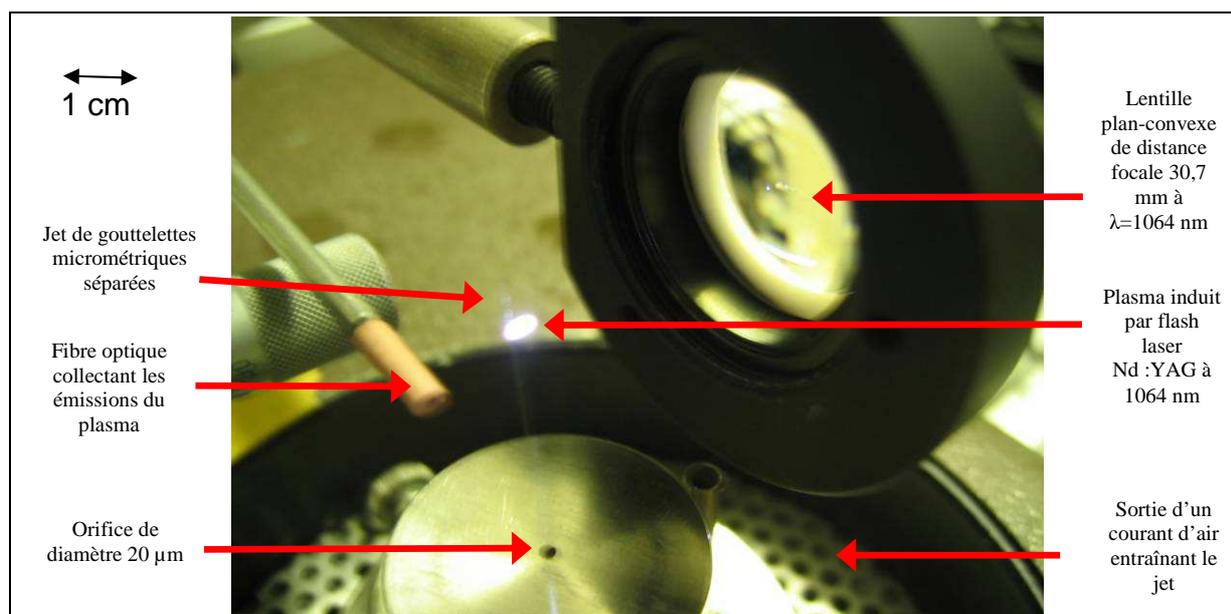


figure III-10 : Visualisation de l'interaction entre le plasma et le jet linéaire de microgouttelettes séparées. NB : les dimensions du plasma et des microgouttelettes sont déformées et étirées par rapport à la réalité du fait de la lenteur de l'obturateur de l'appareil photographique utilisé.

III.4.5.4.

Paramètres LIBS et protocole des mesures

Chaque plasma est induit en choisissant des paramètres optiques et laser de manière à obtenir une densité d'énergie analogues ($4,66 \text{ W.cm}^{-2}$) à celle employée pour établir les courbes d'étalonnage sur les gaz.

- Laser Quantel pur Nd : YAG à $\lambda = 1064 \text{ nm}$: Fréquence des tirs laser : 10 Hz – Durée de pulse de 6 ns et énergie du pulse : 100 mJ
- Lentille plan convexe de distance focale de 65 mm à $\lambda=1064 \text{ nm}$
- Densité énergétique au point focal : $4,7 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$
- Fibre optique de type HCG 1000 positionnée au point focale de la lentille
- Monochromateur THR1000 avec réseau 300 traits/mm :
 - Pour chaque spectre : largeur spectrale obtenue égale à 40nm
 - Sélection de régions spectrales incluant les raies des éléments des gouttelettes
- Détecteur iCCD Roper PI :Max :
 - Délai d'acquisition optimisé : 1 μs – Durée d'acquisition : 20 μs
 - Pour chaque type de gouttelettes : 3 séries de 100 spectres avec un plasma par spectre.

Pour chacune des solutions aqueuses multiélémentaires employées pour générer les microgouttelettes, trois séries de 100 tirs avec une fréquence de 10 Hz sont effectuées sur le jet de gouttelettes liquides localisées et séparées en sortie du générateur à orifice vibrant.

Pour chaque type de solution, un balayage spectral est préalablement effectué par pas de 40 nm depuis la longueur d'onde λ égale à 246 nm et jusqu'à 800 nm. Cette opération vise à sélectionner les domaines spectraux représentatifs des raies des éléments des microgouttelettes. Dans chacune des fenêtres spectrales les délais d'acquisition sont optimisés pour minimiser les risques de saturation d'intensités des raies.

III.4.5.5. Balayage et sélection de zones spectrales

Ce balayage aboutit à la sélection de trois régions spectrales significatives de la composition élémentaire intrinsèque de la particule liquide analysée par le plasma.

III.4.5.5.1. Détection du magnésium sur la région 246-286 nm

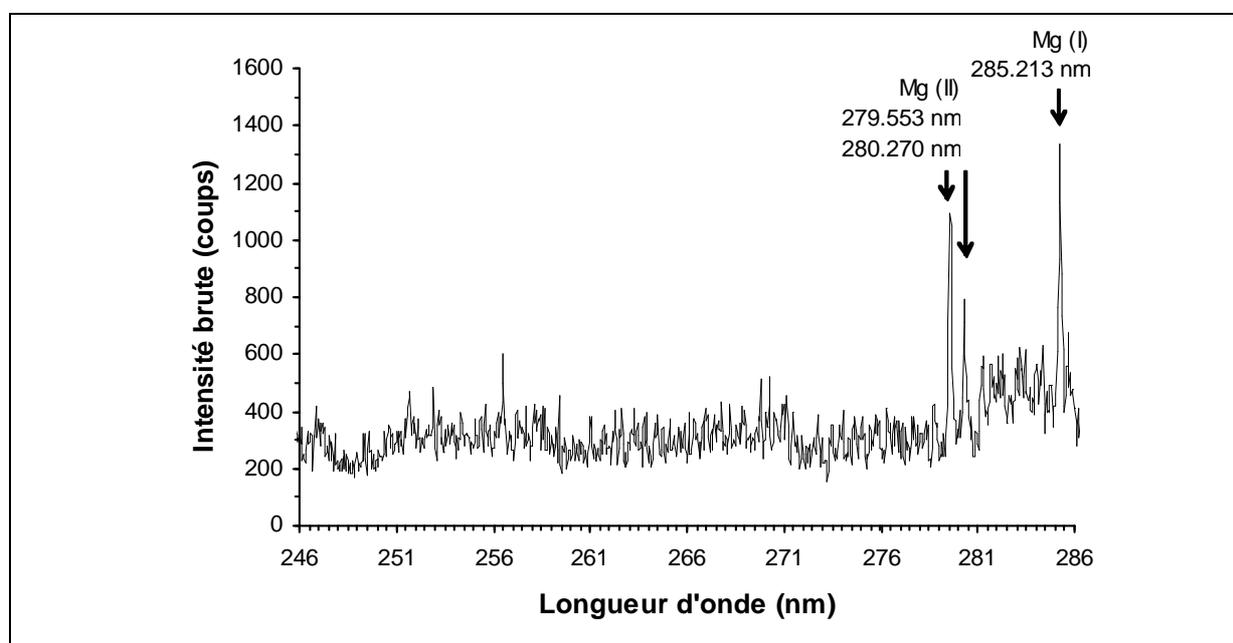


figure III-11 : Spectre sur la région 246-286 nm significatif d'une rencontre plasma-microgouttelettes issues de l'eau n°1 – Masse totale analysée de magnésium sous la forme Mg^{2+} = 857,5 10^{-15} g et quantité d'atomes correspondantes par unité de volume du plasma = 1,58 10^{10} mm^{-3} – Paramètres temporels LIBS : énergie de pulse = 100 mJ, délai d'acquisition = 1 μs ; durée d'acquisition = 20 μs

III.4.5.5.2. Détection du calcium sur la région 385-425 nm

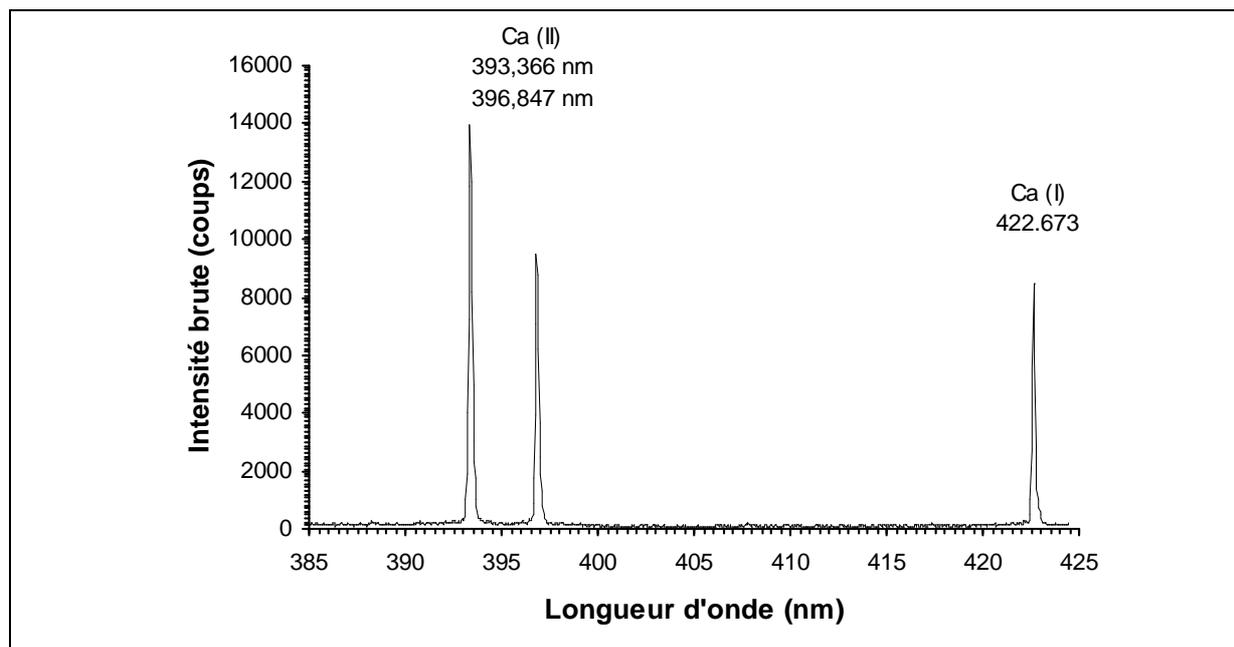


figure III-12 : Spectre sur la région 385-425 nm significatif d'une rencontre plasma-microgouttelettes issues de l'eau n°1 – Masse totale analysée de calcium sous la forme Ca^{2+} = 2065 fg et quantité d'atomes correspondantes par unité de volume du plasma = $3,80 \cdot 10^{10} \text{ mm}^{-3}$ – Paramètres temporels LIBS : énergie de pulse = 100 mJ, délai d'acquisition = $1 \mu\text{s}$; durée d'acquisition = $20 \mu\text{s}$

III.4.5.5.3. Détection du sodium sur la région 570-610 nm

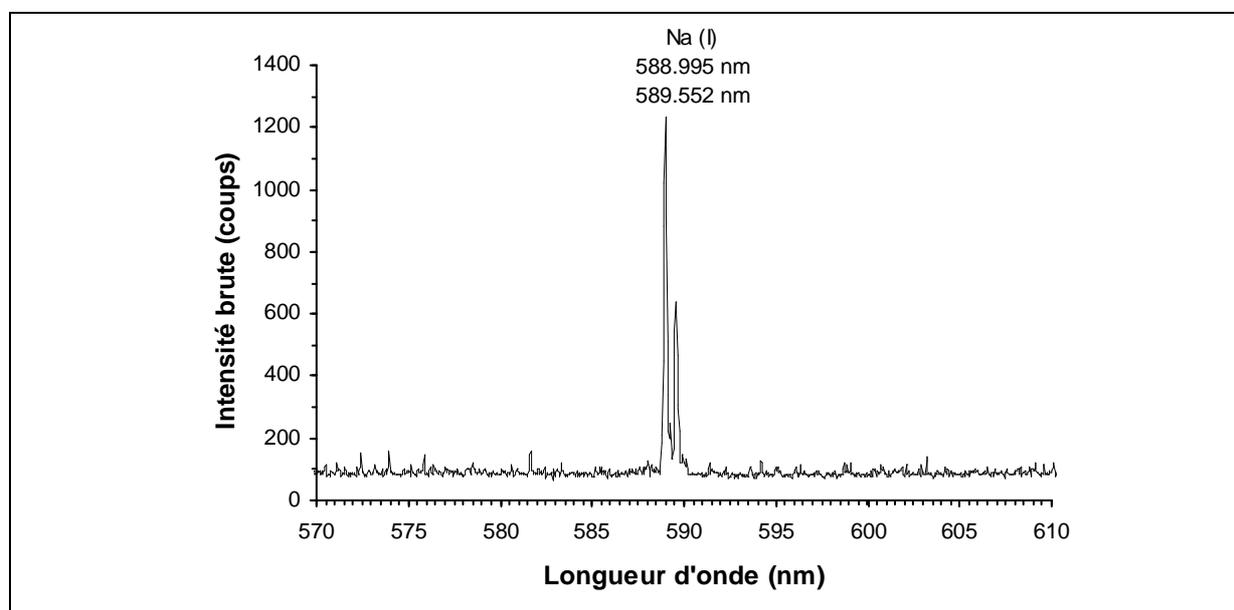


figure III-13 : Spectre sur la région 570-610 nm significatif d'une rencontre plasma-microgouttelettes issues de l'eau n°1 – Masse totale analysée de sodium sous la forme Na^+ = 1365 fg et quantité d'atomes correspondantes par unité de volume du plasma = $2,50 \cdot 10^{10} \text{ mm}^{-3}$ – Paramètres temporels LIBS : énergie de pulse = 100mJ, délai d'acquisition = $1 \mu\text{s}$; durée d'acquisition = $20 \mu\text{s}$

III.4.5.6. Etablissement d'une courbe d'étalonnage pour le calcium

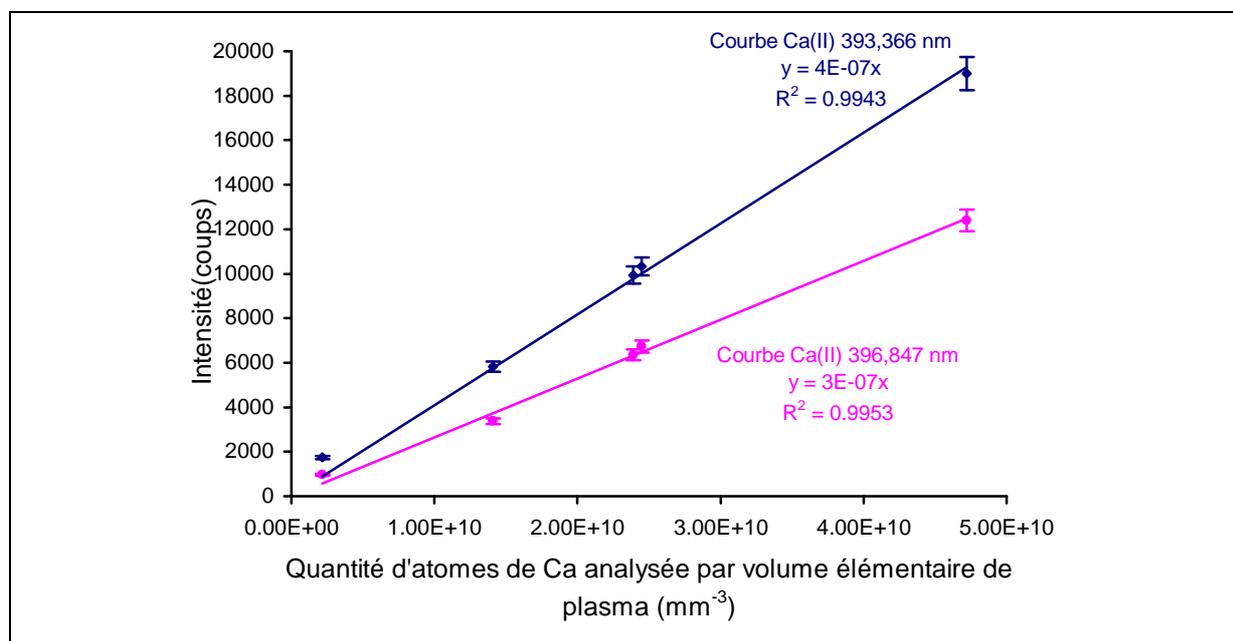


figure III-14 : Courbes de calibration basées sur les raies du Ca (II) à 393,366 nm (courbe en position haute) et à 396,847 nm (courbe en position basse) après sélection des raies d'intensité nette maximale. Pour chaque courbe est indiquée la relation linéaire.

En moyennant les intensités nettes des deux raies du Ca (II) (écart type relatif de l'intensité de la raie : 5,88 % pour la raie à 393,366 nm), les intensités I_{Ca} des raies du calcium sont proportionnelles à la quantité de matière présente dans les microgouttelettes analysées par le plasma. Une droite d'étalonnage est alors obtenue pour l'élément calcium présent dans les particules liquides générées par le VOAG. Les courbes obtenues sont linéaires et présentent toutes des coefficients de corrélation proches de 1. La droite de calibration considérée pour la raie Ca à 393,366 nm a pour équation (cf. figure III-14) :

$$I_{Ca} = 4 \cdot 10^{-7} \times \text{atomes Ca par mm}^3 \text{ de plasma} \quad \text{équation III-17}$$

L'équation III-17 permet d'établir la limite de détection du dispositif LIBS pour le calcium en utilisant le critère international IUPAC basé sur la formule :

$$C_L (Ca) = k \times \frac{\sigma_{\text{bruit}}}{\alpha} \quad \text{équation III-18}$$

σ_{Bruit} est l'écart type (en coups) du bruit de fond de la ligne de base entourant la raie d'intérêt. Il est calculé sur les trois plus petites concentrations dosées. α représente la pente de la droite de calibration (exprimé en coups.mm³). Le facteur k désigne le facteur de confiance. Nous considérons $k = 2$ pour un facteur de confiance égal à 97 %. L'application numérique basée sur

le niveau de bruit $\sigma_{Ca\ 393,366\ nm} = 4$ coups et la pente $\alpha = 4 \cdot 10^{-7}$ coups.mm³ donne la valeur de la concentration limite $C_L(Ca)$ détectable en quantité d'atomes de Ca présents par unité de volume de plasma :

$$C_L(Ca) = 2,0 \cdot 10^7 \text{ atomes de Ca par mm}^3 \text{ de volume de plasma, soit une masse de 1,1 fg}$$

III.4.5.7. Etablissement d'une courbe d'étalonnage pour le magnésium

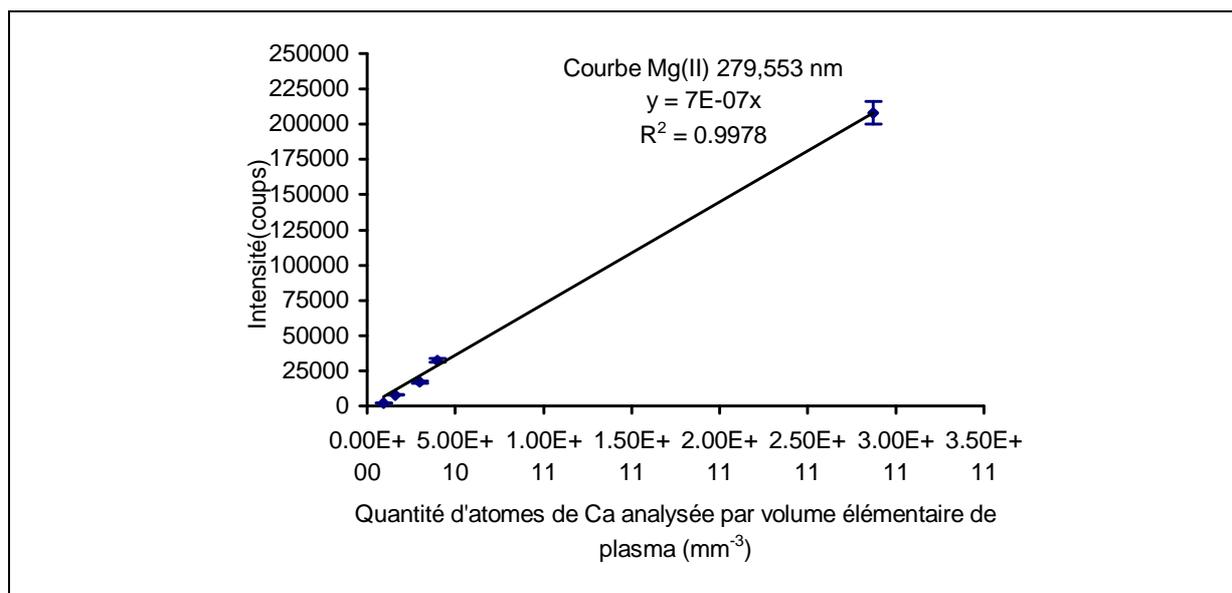


figure III-15 : Courbe de calibration basée sur les raies du Mg (II) à 279,553 nm après sélection des raies d'intensité nette maximale. La relation linéaire liant les mesures est indiquée.

Comme dans le cas de Ca, les intensités I_{Mg} de la raie de Mg sont proportionnelles à la quantité de matière présente dans chaque microgouttelette analysée (masse m_{Mg} de magnésium). L'écart type relatif est de 8,39%. La courbe obtenue est linéaire pour la raie Mg (II) à 279,553 nm selon :

$$I_{Mg} = 7 \cdot 10^{-7} \times \text{atomes de Mg par mm}^3 \text{ de volume de plasma}$$

équation III-19

L'équation III-19 permet d'établir la limite de détection du dispositif LIBS pour le magnésium en utilisant le critère international IUPAC. L'application numérique basée un niveau de confiance de 97% ($k=2$), sur le niveau de bruit $\sigma_{Mg\ 279,553\ nm} = 132$ coups et avec une pente égale à $\alpha = 7 \cdot 10^{-7}$ coups.mm³ donne la valeur de la concentration limite $C_L(Mg)$ détectable en quantité d'atomes de Mg présents par unité de volume de plasma :

$$C_L(Mg) = 3,8 \cdot 10^8 \text{ atomes de Mg par mm}^3 \text{ de volume de plasma, soit une masse de 20,5 fg}$$

III.4.5.8. Etablissement d'une courbe d'étalonnage pour le sodium

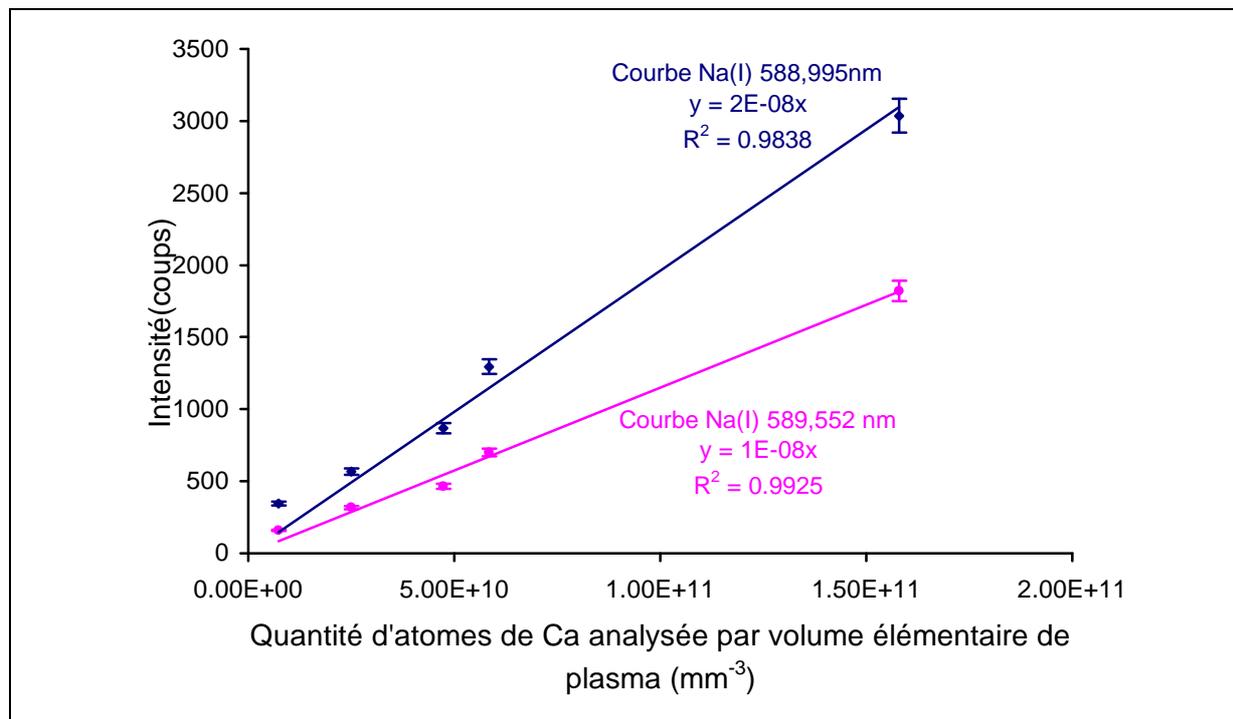


figure III-16 : Courbes de calibration basées sur les raies du Na (I) à 588,995 nm (courbe en position haute) et à 589,552 nm (courbe en position basse) après sélection des raies d'intensité nette maximale. Pour chaque courbe est indiquée la relation linéaire.

De même, la figure III-16 illustre la courbe d'étalonnage basée sur deux raies du sodium Na (I) à 588,995 nm et à 589,552 nm. L'écart type relatif pour la première raie est de 6,72 %. Une droite de tendance linéaire est tracée et son équation est indiquée. Comme précédemment, les intensités I_{Na} des raies du magnésium sont proportionnelles à la quantité de matière présente dans chaque microgouttelette analysée (masse m_{Na} de sodium). La courbe obtenue est linéaire pour la raie Na (I) à 588,995 nm avec pour équation :

$$I_{Na} = 2 \cdot 10^{-8} \text{ atomes de Na par volume élémentaire de plasma} \quad \text{équation III-20}$$

L'équation III-20 permet d'établir la limite de détection du dispositif LIBS pour le sodium en utilisant le critère international IUPAC. L'application numérique basée un niveau de confiance de 97 % (k=2), sur le niveau de bruit $\sigma_{Na\ 588,995\ nm} = 15$ coups et avec une pente égale à $\alpha = 2 \cdot 10^{-8}$ coups.mm³ donne la valeur de la concentration limite $C_L(Na)$ détectable en quantité d'atomes de Na présents par unité de volume de plasma :

$$C_L(Na) = 1,5 \cdot 10^9 \text{ atomes de Na par mm}^3 \text{ de volume de plasma, soit une masse de } 81,9 \text{ fg}$$

III.4.5.9. Bilan des limites de détection pour le calcium, le magnésium et le calcium

Les limites de sensibilité en termes de masses élémentaires sont converties en atomes détectables par unité de volume dans le tableau III-7 :

	Ca	Mg	Na
Masse élémentaire totale détectable (fg)	1,1	20,5	81,9
Nombre d'atomes par volume d'échantillonnage (mm ⁻³) si hypothèse d'analyser 17,5 microgouttelettes	2,0 10 ⁷	3,8 10 ⁸	1,5 10 ⁹
Limite de détection en ppm (m/m)	0,03	0,50	2,00

tableau III-7 : Bilan des limites de sensibilité exprimées en masses élémentaires, en ppm et en nombre d'atomes détectables par unité de volume élémentaire pour Ca, Mg et Na

Les limites de détection pour les éléments Ca, Mg et Na sont de l'ordre de grandeur du femtogramme. Ces valeurs serviront de référence pour traiter d'autres types d'échantillons particuliers contenant ces mêmes éléments.

Nota bene : le critère IUPAC de calcul des limites de détection tend à diminuer la sensibilité élémentaire de la technique. Le choix d'un critère k inférieur à 2 pourrait se justifier étant donné que l'on observe des raies d'émissions même si k est inférieur à 2 : un gain analytique serait alors possible.

Cette étude tend également à montrer que la technique LIBS peut être utilisée pour le contrôle des éléments contenus dans des solutions : eaux minérales ou du robinet, effluents industriels, etc. L'intérêt pour des applications civiles de contrôle en ligne et en temps réel est illustré.

III.5. METHODOLOGIE DE TRAITEMENTS STATISTIQUES DES DONNEES SPECTRALES

III.5.1. Bases pour la classification d'un ensemble d'échantillons

Dans un contexte de détection d'alerte, l'étape fondamentale est la classification – idéalement l'identification – de façon fiable de tout échantillon inconnue selon son caractère d'anormalité ou non, de danger potentiel ou de leurre. Le challenge analytique consiste désormais à utiliser la LIBS pour classifier des échantillons complexes.

Dans la partie précédente, nous avons mis en évidence les faibles quantités de matières contenues dans une particule de taille micrométrique sous forme de traces élémentaires avec des masses de quelques femtogrammes. L'analyse par plasma peut donc être problématique en termes d'identifiants spectraux disponibles pour des analyses qualitatives, voire quantitatives. Plutôt que de considérer un nombre limité de raies, l'idée est désormais de prendre en compte le maximum d'information contenue dans chacun des spectrogrammes. Un spectre contient n réponses (intensité d'émission I_i avec $i = 1$ à n) associées pour chacune des n longueurs d'onde λ_i . $n=1024$ avec le monochromateur et $n=25000$ environ avec le spectromètre large bande de type Echelle. Chaque réponse (intensité I_i) du couple (λ_i, I_i) constitue autant de marqueurs spectraux potentiels. Ces observables (λ_i, I_i) sont directement liés à la nature intrinsèque de l'échantillon analysé par LIBS.

Cependant, il est difficile de considérer de si nombreux observables pour décrire un système constitué de plusieurs échantillons voués à être classifiés d'après leurs informations spectrales. Une solution analytique réside dans l'utilisation de méthodes multivariées pour exploiter le maximum d'information contenue dans un spectrogramme en construisant une nouvelle représentation de ces variables dans un espace de dimension p (très) inférieure à n , avec classiquement $p = 2$ ou 3 . Ces méthodologies de traitement des données multidimensionnelles constituent les bases de la chimiométrie [76]. Ces outils statistiques sont employés en chimie analytique pour décrire et classifier divers échantillons de nature inconnue.

III.5.2. Classification d'aérosols aqueux par analyse en composantes principales (ACP)

III.5.2.1. Principe de l'Analyse en Composantes Principale des données spectrales

Avec le but de décrire et de classifier simplement un groupe d'échantillons inconnus – ici la nature d'un microgouttelette – une méthode est utilisée pour réduire des variables basées sur les longueurs d'onde λ_i et leur intensité I_i associée ou couples (λ_i, I_i) . L'analyse en composantes principales (ACP) est choisie. L'ACP est une méthode diminuant le nombre de variables grâce à la génération d'un nouvel ensemble de variables basées sur une combinaison linéaire des données initiales. L'ACP est une méthode non prédictive pour classifier des échantillons en se basant uniquement sur les intensité de raies spectrales (λ_i, I_i) obtenues par LIBS.

Quelques publications font état de l'utilisation d'un tel traitement pour classifier des échantillons complexes par la technique LIBS. Pour exemples, l'ACP est utilisée par Fink *et al.* [77] et Goode *et al.* [78] pour spécifier et trier des alliages métalliques. Munson *et al.* [79] classifient diverses surfaces contaminées. Sirven *et al.* classifient et identifient divers sols pollués ou non avec des métaux lourds [80].

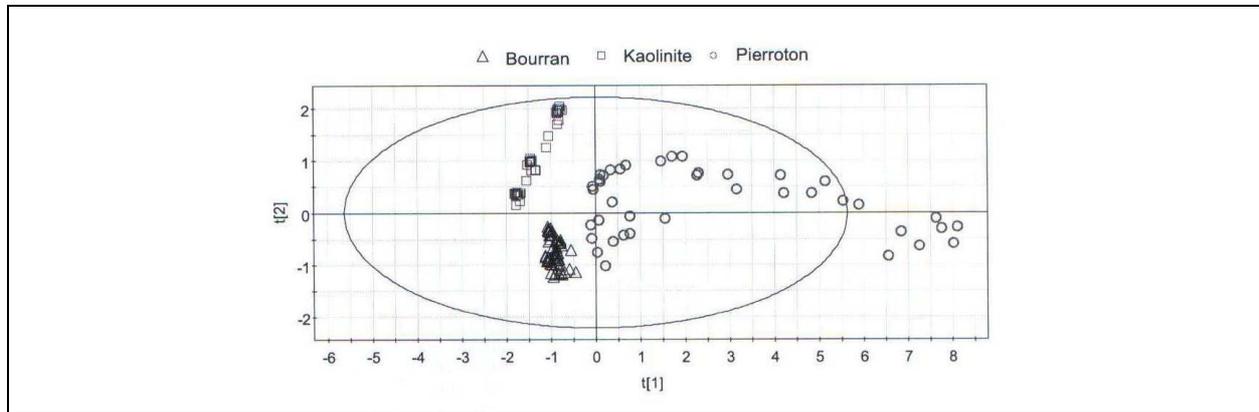


figure III-17 : Exemples de représentations en ACP des spectres de 3 sols différents analysés par LIBS (Sirven *et al.*)

L'annexe I explique en détail le fonctionnement de l'ACP. Un algorithme a été développé par nos soins sur la base du logiciel informatique Matlab 7.30.

III.5.2.2. Expériences LIBS et protocole de traitements des données spectrales obtenues

Nous considérons dix natures de microgouttelettes produites à partir de 10 solutions multiélémentaires (eaux minérales calibrées en composition, cf. tableau III-8) avec l'aide du générateur à orifice vibrant produisant des jets de microgouttelette de diamètre 38 μm . Chaque particule liquide contient donc une quantité connue d'éléments Ca, Mg et Na.

Pour chaque type de microgouttelette, des mesures LIBS sont effectuées en utilisant les mêmes paramètres optiques et laser que ceux ayant permis l'établissement des courbes de calibration (cf. partie III.4.5.4, page 106).

N° solution multiélémentaire	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Teneurs massiques élémentaires des microgouttelettes en ppm (m/m)</i>										
Ca	4,1	26,5	45,0	89,0	486,0	555,0	46,1	202,0	11,5	230,0
Mg	1,7	1,0	3,2	31,0	84,0	110,0	4,3	43,0	8,0	66,0
Na	2,7	0,8	5,2	17,0	9,1	14,0	6,3	4,7	11,6	40,0
<i>Masse élémentaire d'une microgouttelette de diamètre 38 µm (10⁻¹⁵ g)</i>										
Ca	117,8	761,4	1292,9	2557,1	13963,2	15945,7	1324,5	5803,6	330,4	6608,1
Mg	48,8	28,7	91,9	890,7	2413,4	3160,4	123,5	1235,4	229,8	1896,2
Na	77,6	23,0	146,5	488,4	261,5	402,2	181,0	135,0	333,3	1149,2

tableau III-8 : Composition massiques des microgouttelettes de solutions multiélémentaires analysées par LIBS

Pour chaque microgouttelette, trois séries de 100 spectres avec un tir par spectre sont effectuées sur trois domaines spectraux de largeur limité par le réseau à 300 traits.mm⁻¹ du monochromateur : **246-286 nm** (fenêtre du Mg mais aussi P ou C par exemple), **385-425 nm** (fenêtre du Ca, mais aussi Al par exemple) et **570-610 nm** (fenêtre du Na). L'ensemble des spectres peut alors être compilé sous forme d'un tableau de données ou matrice de données \mathbf{X}_{ij} . Chaque ligne \mathbf{i} de la matrice renvoie à un échantillon ; chaque colonne \mathbf{j} à un identifiant (ici la longueur d'onde). Chaque élément \mathbf{x}_{ij} de la matrice est alors l'intensité brute de la raie d'émission associée à λ_i .

Cette matrice constitue alors la base de travail de l'ACP : une nouvelle représentation de la matrice de données \mathbf{X}_{ij} est effectuée pour rassembler les échantillons (appelés individus \mathbf{i}) présentant des caractéristiques spectrales similaires et intrinsèques de leur nature. Un nouvel espace de variables est créé par l'intermédiaire de composantes principales (principal components ou PC) basées chacune sur une combinaison linéaires des différentes observables initiales – réponses (λ_i, \mathbf{I}_i).

III.5.2.3.

Résultats et discussions

Dans chaque fenêtre, on effectue l'ACP sur les identifiants présents : Ca, Mg et Na. En utilisant des représentations en 3 dimensions, on distingue plus ou moins facilement différentes correspondant chacun à un type de microgouttelettes générées.

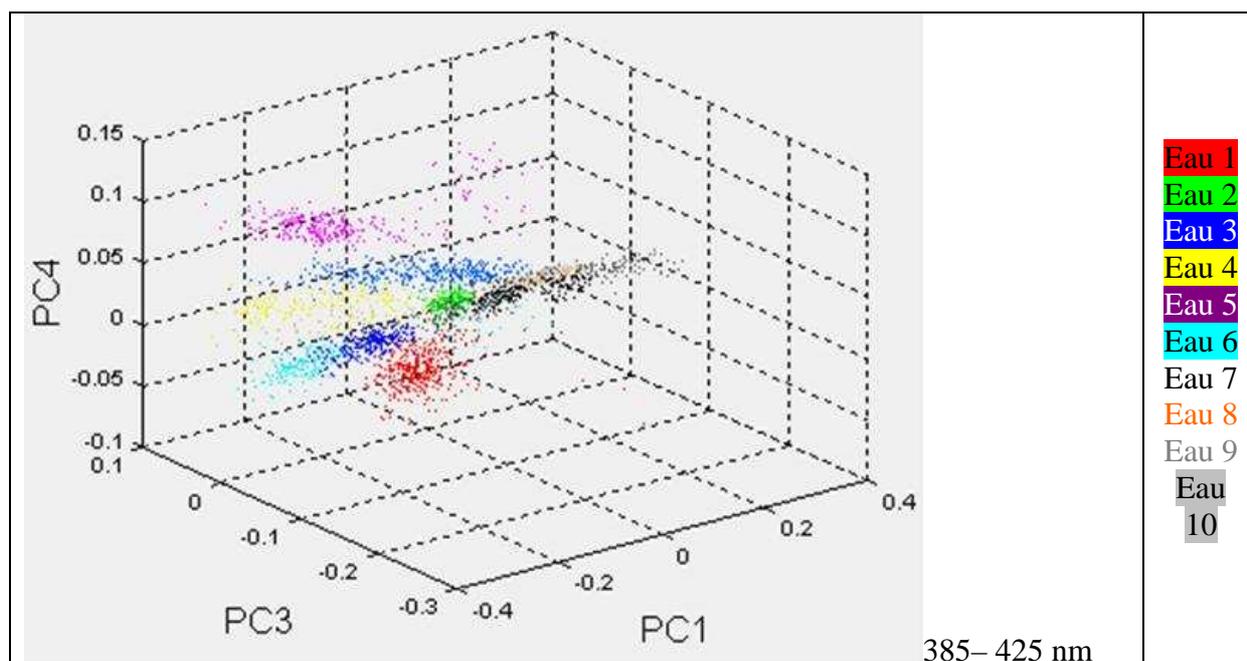


figure III-18 : Classification des types de microgouttelettes selon leur nature sur la fenêtre du calcium. Légende : Rouge = eau 1, Vert = eau 2, Bleu= eau 3, jaune = eau 4, Violet = eau 5, Bleu ciel= eau 6, Blanc = eau 7, Orange = eau 8, Gris clair = eau 9, Gris foncé = eau 10

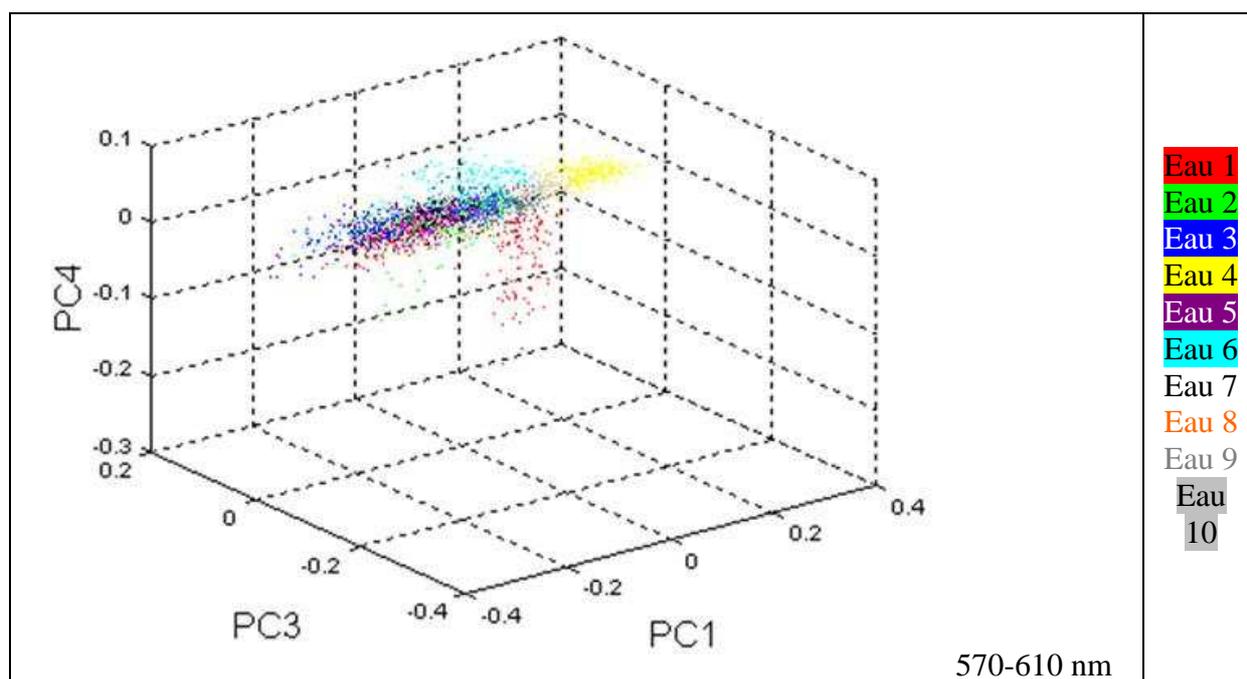


figure III-19 : Classification des types de microgouttelettes selon leur nature sur la fenêtre du sodium. Légende : Rouge = eau 1, Vert = eau 2, Bleu= eau 3, jaune = eau 4, Violet = eau 5, Bleu ciel= eau 6, Blanc = eau 7, Orange = eau 8, Gris clair = eau 9, Gris foncé = eau 10

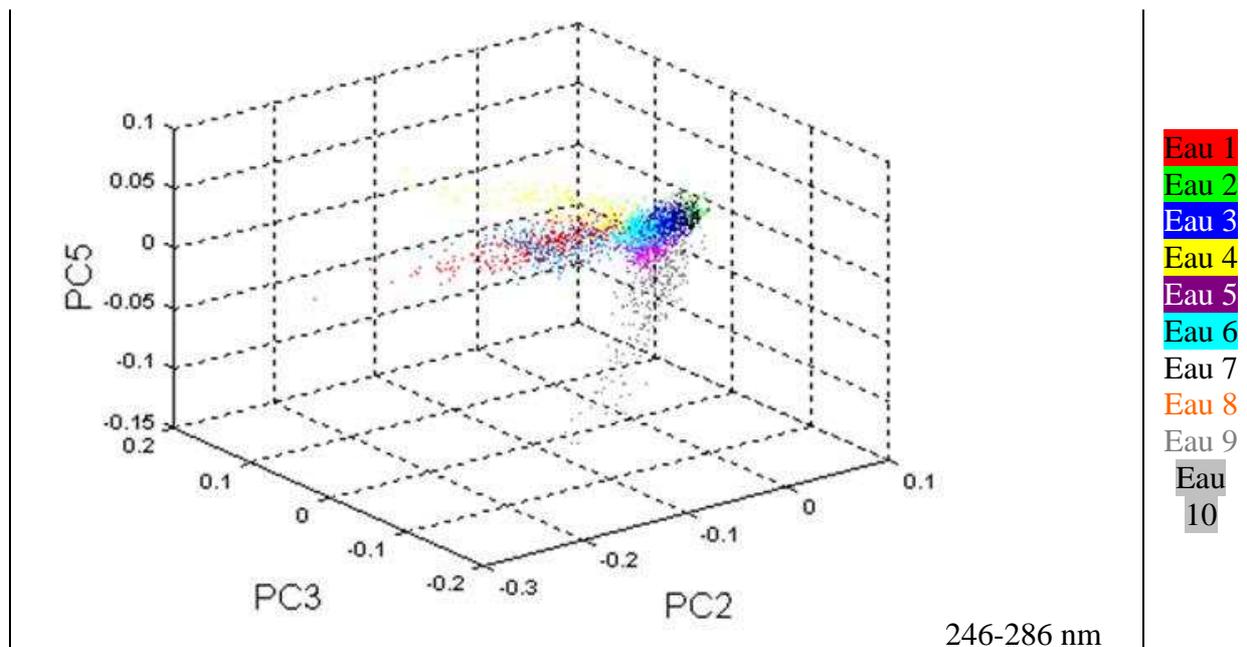


figure III-20 : Classification des types de microgouttelettes selon leur nature sur la fenêtre du magnésium.
 Légende : Rouge = eau 1, Vert = eau 2, Bleu= eau 3, jaune = eau 4, Violet = eau 5, Bleu ciel= eau 6, Blanc = eau 7, Orange = eau 8, Gris clair = eau 9, Gris foncé = eau 10

Nous pouvons observer que selon les fenêtres, la séparation entre les individus (échantillons) est plus ou moins évidente. Cela indique que des observables spectraux sont plus discriminants que d'autres. Ici, les identifiants basés sur les raies du Ca semble davantage discriminants que ceux basés sur les raies détectées de Na et Mg.

La dispersion des points est liée à la fluctuation du signal et à la position des microgouttelettes plus ou moins vaporisées intégralement par le plasma. Le fait d'acquérir des spectres relatifs à la formation d'un seul plasma est également préjudiciable à la répétitivité. Néanmoins, une classification s'opère.

Nous décidons alors de fusionner les données en recomposant un spectre élargi rassemblant les trois fenêtres en une seule. L'ACP est alors effectuées sur tous les identifiants disponibles en utilisant les raies d'émissions disponibles sur les trois fenêtres (Ca, Mg et Na). L'ACP est représentée en 3 dimensions avec la figure III-21.

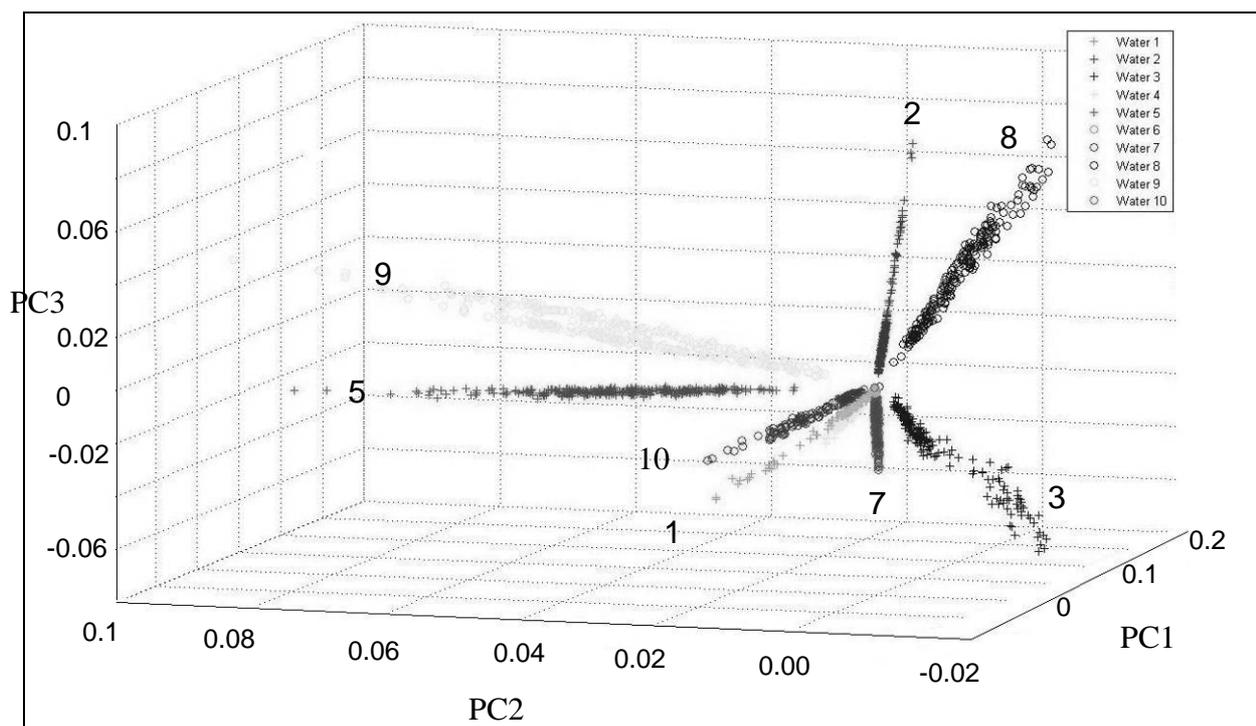


figure III-21 : Classification des échantillons par ACP en rassemblant les données disponibles sur les trois fenêtres spectrales (246-286 nm : C, P, Mg, 385-425 nm : Ca, K et 570-610 nm : Na))

Nous notons une meilleure discrimination des 10 eaux en combinant les marqueurs disponibles. L'idée est d'utiliser par la suite les spectrogrammes à large bande de type Echelle offrant l'acquisition simultanée de toutes les raies d'émissions de longueurs d'onde entre 200 et 1000 nm.

L'idée est alors de concevoir un véritable **«peigne spectral»** consistant, sur un spectrogramme, à sélectionner des régions d'intérêt en terme de la présence d'identifiants spectraux discriminants (par exemple, pour les microgouttelettes : Ca, Mg, Na, etc.). L'avènement de spectromètres à large bande comme ceux dotés de réseaux à Echelle (ou des spectromètres miniatures à haute résolution mis en série) va permettre de sélectionner les marqueurs spectraux. En effet, des critères propres aux méthodes statistiques permettent d'estimer la qualité de la représentation des variables.

Pratiquement, des critères (inertie) permettent de calculer les probabilités pour qu'un individu appartienne à un groupe d'échantillon.

De même, un traitement du signal peut être envisagé à l'avenir pour minimiser les fluctuations dans un groupe et faciliter la classification.

Le but étant de minimiser le taux de fausses alertes aussi bien faux positifs que faux négatifs.

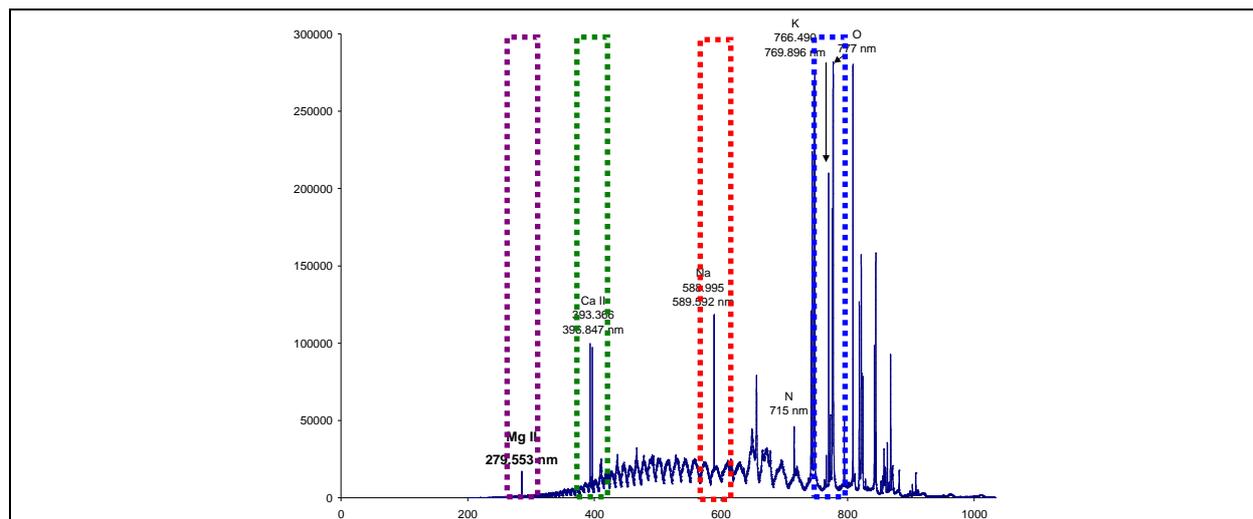


figure III-22 : Principe de sélection des bandes spectrales d'intérêt pour augmenter le pouvoir de discrimination de l'analyse en composante principale

En conclusion, l'ACP apparaît très prometteuse pour différencier des espèces échantillonnées selon la stratégie suivante :

- Créer des bases de données représentant des classes d'échantillons de référence obtenues selon des conditions précises (paramètres liés aux optiques, au laser, à l'acquisition) et des identifiants spectraux adéquats liés à des longueurs d'ondes d'intérêt,
- Corréler chaque observation à la classe la plus adéquate,
- Confirmer cette classification en reproduisant les analyses sil reste de la matière d'intérêt.

III.6. PROBLEMATIQUES DE L'ÉCHANTILLONNAGE DIRECT DES AÉROSOLS PAR LIBS

III.6.1. Analyse directe des particules au vol

L'idée est d'utiliser les potentialités de la technique LIBS pour analyser directement les particules suspendues et transportées dans le gaz vecteur. Cette stratégie représente plusieurs avantages :

- **Absence d'effets de matrice** autres que ceux du gaz vecteur,
- **Analyse in situ et sans prélèvement** des particules d'aérosols qui ne sont ni perturbés, ni pollués, ni dilués,
- **Possibilité de tendre vers l'analyse d'une seule particule** pour minimiser les interférences analytiques si plusieurs particules étaient englobées dans le plasma.

Pour appréhender la détection par LIBS des aérosols suspendus, des stratégies d'échantillonnage doivent être mises en place pour favoriser et déclencher la rencontre un plasma localisé et millimétrique et la ou les particule(s) micrométrique(s) non localisée(s). Deux possibilités existent.

Dans les précédentes applications (analyse de gaz, de surface, de microgouttelettes forcées à résider dans le plasma), l'échantillonnage par le volume plasma est toujours effectif. Au contraire, pour la matière particulaire telle que les aérosols (solides ou liquides) un problème d'échantillonnage existe à cause de la nature diphasique et des dimensions des particules d'aérosols. Dans le cadre de cette étude, nous considérons des particules solides ou liquides de taille micrométrique (typiquement de 1 à 100 μm en terme de diamètre aérodynamique). La comparaison entre les particules micrométriques objets de notre étude (10^{-6} m) et la taille du plasma (quelques 10^{-3} m) conduit à un rapport de taille de l'ordre 10^3 , soit un rapport de volume de 10^9 . Il convient alors de distinguer le nombre d'atomes contenus dans une particule d'aérosol et celui contenu dans un gaz pour interpréter le processus d'analyse :

- **Une ou plusieurs particules présente(s) dans le volume plasma** : l'interaction plasma-particule(s) est effective. Les éléments des particules et du gaz sont détectés.
- **Aucune particule au sein du volume plasma** : les spectres ne sont représentatifs que des atomes du gaz porteur.

III.6.2. Modèle probabiliste d'interactions plasma/particule(s)

Pour considérer des interactions entre un plasma de taille millimétrique localisé et des particules de taille micrométriques non localisées dans l'espace, un modèle probabiliste de type distribution en loi de Poisson est ici appliqué pour un plasma interagissant ou non avec k objets particuliers présents à une concentration de N particules par unité de volume. [81] [82] Le volume efficace d'interaction plasma-particule(s) est défini par le volume V issu du plasma. V tient compte des k particule(s) présente(s) dans le plasma et du volume du plasma effectivement imagé par la fibre optique. En se basant sur la distribution de Poisson généralisée, la probabilité P_k qu'un plasma échantillonne k particules est définie par :

$$P_k = \frac{\mu^k}{k!} \cdot e^{-\mu} \quad \text{équation III-21}$$

μ désigne le nombre d'échantillons (ici une ou plusieurs particules) présents dans le volume d'analyse V basé sur le plasma. En considérant une concentration particulaire N (nombre de particules par unité de volume), μ est exprimé selon :

$$\mu = V \times N \quad \text{équation III-22}$$

La probabilité P_0 de n'échantillonner aucune particule est déduite :

$$P_0 = e^{-\mu} \quad \text{équation III-23}$$

L'ensemble des probabilités P qu'un plasma échantillonne une ou plusieurs particules est directement obtenu selon :

$$P = \sum_{k=1}^{\infty} P_k = 1 - P_0 = 1 - e^{-\mu} \quad \text{équation III-24}$$

En combinant les deux équations, une relation liant le taux de rencontre plasma-particule(s) aux paramètres-clés du plasma et de la densité particulaire est obtenue :

$$P = 1 - e^{-\mu} = 1 - e^{-N \cdot V} \rightarrow -\ln(1 - P) = V \cdot N \quad \text{équation III-25}$$

L'analyse de la relation suggère une augmentation du taux de rencontre plasma-particule(s) P liée aux valeurs croissantes des concentrations particulières N . V désigne le volume d'analyse basé sur le plasma. Comme les plasmas générés sont reproductibles en volume, V est considéré constant. En mesurant expérimentalement les taux de rencontre P pour différentes concentrations particulières N , la valeur de V peut être déduite. Si le modèle probabiliste proposé est vérifié, les rencontres plasma-particule(s) seront favorisées par des valeurs importantes du couple $V \cdot N$. Cela induit donc de maximiser V et/ou N .

III.6.3. Approches expérimentales de l'interaction statistique plasma-particule(s)

III.6.3.1. Influence de la concentration des particules

- **Générations de courants particuliers monodispersés**

L'eau minérale commerciale n°1 calibrée en teneurs élémentaires (cf. tableau III-8 page 115) est utilisée en tant que solution multiélémentaire dans le VOAG. En sortie de colonne de séchage du VOAG, les particules – initialement de diamètre 38 μm (solutés + solvant aqueux volatil) – sont asséchées progressivement pour présenter une monodispersion autour du diamètre de 5,1 μm (+/- 0,05 μm) mesuré par APS. Les particules sont prélevées par tube Tygon pour être simultanément véhiculées vers un APS et vers la chambre aérosol. Selon la position du tube Tygon collectant les particules en sortie de colonnes de VOAG, une variation de la concentration en particules peut être obtenue et quantifiée par APS pour des valeurs allant de 30 à 150 particules par cm^{-3} (cf. tableau III-9).

	Densité 1	Densité 2	Densité 3	Densité 4
N, concentration particulaire (10^{-3}mm^{-3})	150	100	70	30

tableau III-9 : Liste des concentrations particulaire obtenues au voisinage de la position de formation du plasma

• **Paramètres LIBS**

- Laser utilisé : CFR 200 cadencé à 15 Hz – Energie du pulse : 100 mJ
- Réacteur utilisé : chambre pour particules – Distance focale de la lentille : 65,0 mm
- Distance fibre optique/plasma : 5 mm – Distance point focal/surface (FTSD) : 0 mm
- Spectromètre utilisé : Andor Mechelle avec détecteur iCCD Andor iStar WR
- Délai avant acquisition : 2 μs – Durée d'acquisition : 20 μs
- Nombre de tirs par série : 150 – Nombre de plasma par spectre : 1
- Nombre de séries par type d'échantillon : 3

III.6.3.2.

Résultats et discussions

III.6.3.2.1.

Spectres et raies d'émission détectées

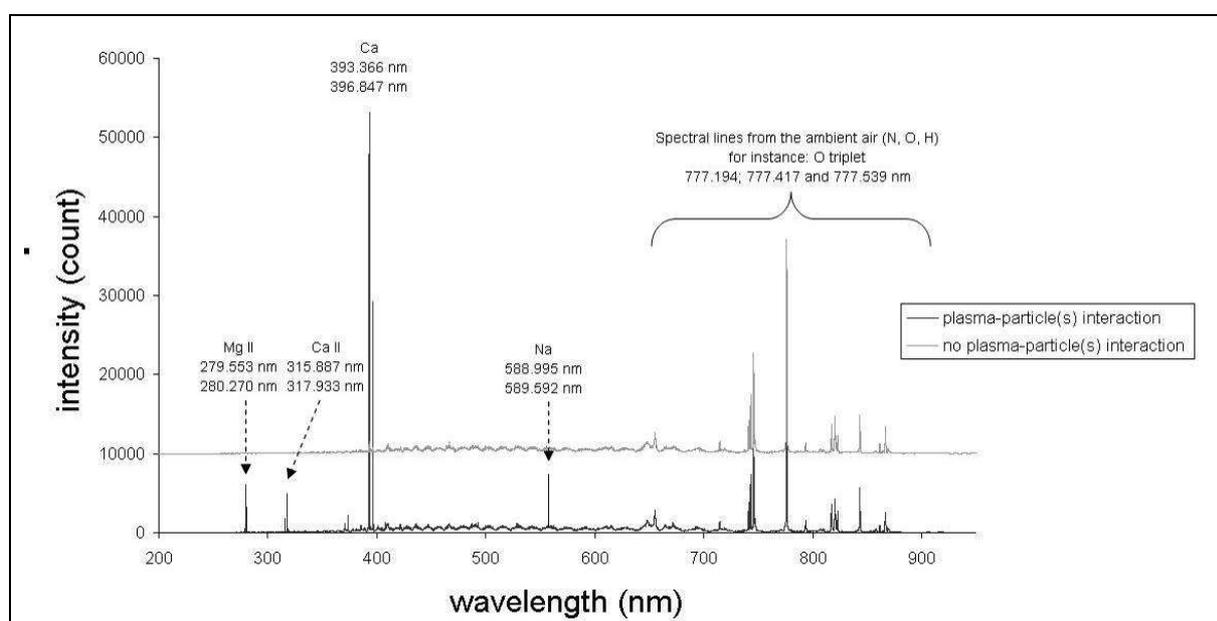


figure III-23 : Spectres large bande obtenus par analyses LIBS de courants de particules monodispersées asséchées (diamètre aérodynamique final : 5,1 μm) d'une solution d'eau minérale multiélémentaire. Le spectre en position inférieure réfère à la présence de particule(s) dans le plasma. Celui en position supérieure a trait à un plasma n'interagissant avec aucune particule si ce n'est l'air ambiant. Le spectre supérieur est juste décalé en ordonnée pour une meilleure distinction. Paramètres LIBS : un tir laser d'énergie 100 mJ, délai et durée avant acquisition = 2 et 20 μs respectivement.

Comme illustré par la figure III-23, deux types de spectres sont obtenus avec les caractéristiques suivantes avec des éléments détectés ou non selon :

Eléments détectés	Longueurs d'onde (nm)	Majorité des spectres	Minorité des spectres témoignant d'une interaction plasma-particule(s)
azote	N(I) 2 X 348,546	=	=
oxygène	O(I) : 777,194 ; 777,417 et 777,539	=	=
hydrogène	H _α : 656,279	=	=
magnésium	Mg(I) : 285,213 Mg(II) : 279,553 et 280,270	Absence	Raies importantes
calcium	Ca(I) : 422,673 – Ca(II) : 315,887, 317,933, 393,366 et 396,847	Absence	Raies importantes
sodium	Na(I) : 588,995 et 589,552	Absence	Raies importantes
potassium	K(I) : traces à 766.490 et 769.896	Absence	Traces

tableau III-10 : Liste des principales raies d'émission détectées dans la majorité des spectres et une minorité représentative d'interactions plasma-particule(s)

- > **Tous les spectres** se caractérisent par la présence dans la bande spectrale 600 à 1000 nm de raies d'émissions listées de façon non exhaustive dans le tableau III-10. Les éléments N, O et H réfèrent à la composition atomique des molécules constituant l'air transportant les particules d'aérosol. L'air entourant les aérosols est globalement propre. Les raies d'hydrogène en faible quantité peuvent provenir des vapeurs d'eau qui est le solvant volatil des microgouttelettes initialement générées par le VOAG.
- > **Certains spectres** font apparaître des raies des éléments constituant les particules multiélémentaires. Les éléments détectés (Mg, Ca, Na et K) sont issus des particules micrométriques échantillonnées par le plasma.

III.6.3.2.2. Critères spectraux sélectifs témoignant d'une interaction plasma-particule(s)

La figure III-24 illustre l'évolution de l'intensité nette de la raie du calcium à 393,366 nm en fonction du numéro du plasma imagé selon que des particules sont dispersées ou non au voisinage du plasma.

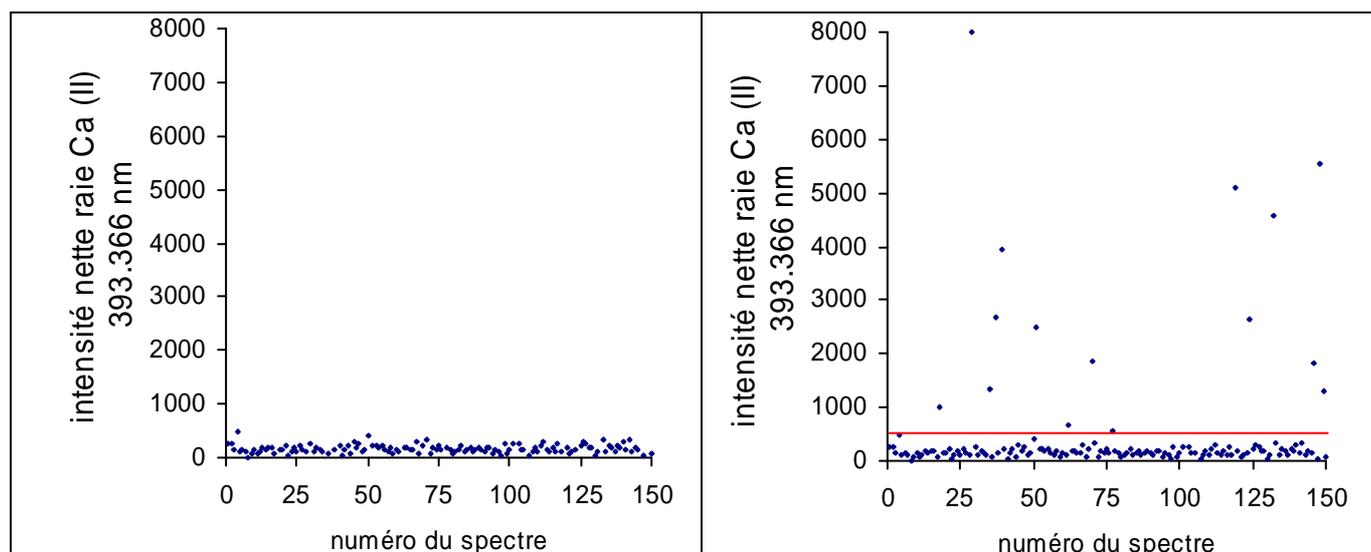


figure III-24 : Evolution de l'intensité nette de la raie du calcium Ca (II) à 393,366 nm en fonction du numéro de tir laser sur l'air de dispersion sans ou avec la présence de particules multiélémentaires. Paramètres LIBS : un simple tir laser d'énergie 100 mJ, délai et durée avant acquisition = 2 et 20 μ s respectivement. Tracé d'un seuil basé sur la moyenne de la ligne de base du continuum additionnée de trois fois la valeur d'intensité du bruit de fond spectral. 18 spectres répondent à ce critère. $N=0,150 \text{ cm}^{-3}$, diamètre aérodynamique : $5,10 \mu\text{m} (\pm 0,05)$

- **Dans une majorité de spectres**, la raie du Ca à 393,366 nm est absente. Seule une ligne de base du continuum d'émission est présente.
- **Pour une minorité de spectres**, les intensités sont supérieures à la moyenne de la ligne de base moyennée additionnée de trois fois l'intensité du bruit de fond spectral.

L'alternance de spectres révélateurs ou non d'interaction plasma-particule(s) est étudiée pour chacune des séries de 150 spectres obtenus en faisant varier la concentration particulaire initiale. Un spectre est significatif d'une rencontre plasma-matière particulaire si et seulement si l'intensité nette de la raie du calcium à 393,366nm est supérieure ou égale à l'intensité du continuum de la ligne de base augmentée de trois fois l'intensité du bruit spectral. Pour éviter de fausse sélection due à la présence d'artefact spectral, une vérification est faite en soumettant l'autre raie du doublet du calcium à 396,847 nm. Le tableau III-1 rend compte de l'inventaire des spectres répondant aux critères de sélection basés sur les raies du calcium.

	Densité 1	Densité 2	Densité 3	Densité 4
Ecart type relatif du continuum spectral au voisinage de la raie Ca (II) à 393,366 nm (%)	9,88	11,21	11,56	8,19
N : concentration particulaire (10^{-3} mm^{-3})	150	100	70	30
Nombre de spectres significatifs d'une interaction / 150 spectres totaux	18	12	7	3
F : taux de rencontre plasma/particule(s) (%)	12,0	8,0	4,7	2,0

tableau III-11 : Comptage des interactions effectives plasma-particule(s) selon la concentration particulaire initiale

Les résultats du tableau III-11 sont reportés sur la figure III-25 illustrant l'augmentation linéaire du taux de rencontre F plasma(s)-particules avec les quantités de particules environnant le plasma.

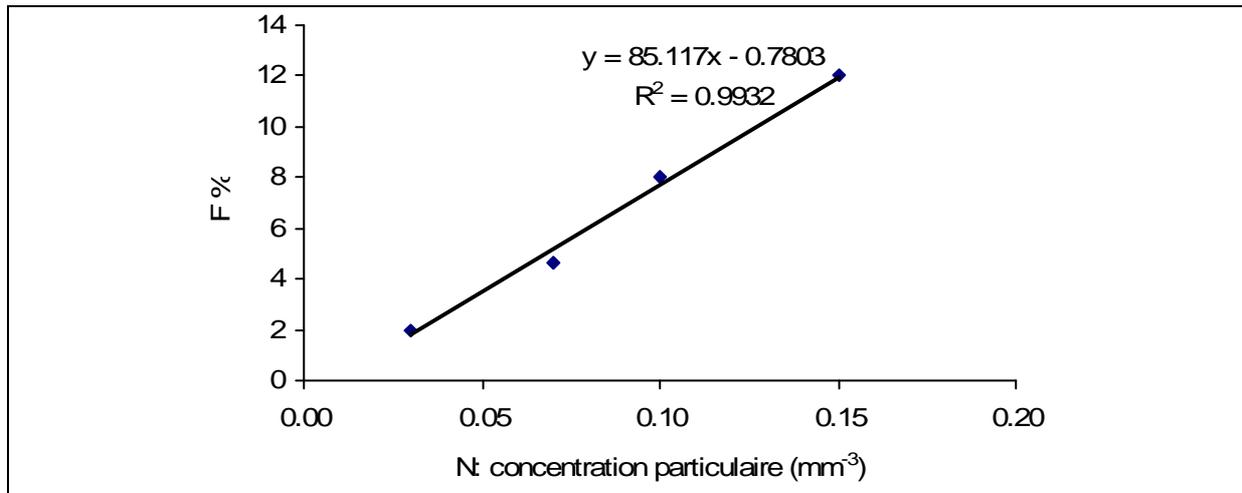


figure III-25 : Evolution du taux d'interaction plasma-particule(s) en fonction de la concentration particulaire N au voisinage du plasma

De 2 à 12 % des spectres témoignent de rencontres plasmas-particule(s). Ces faibles taux de rencontres apparaissent comme l'une des limitations du couplage de la LIBS à l'analyse de particules d'aérosols suspendus : un plasma de volume 1 mm^3 échantillonnant des particules concentrées à $100 \text{ particules.cm}^{-3}$, soit $0,1 \text{ particules.mm}^{-3}$ entraînent mathématiquement un taux de rencontre de 10%. Si les taux de rencontres sont directement dépendants de la concentration particulaire avoisinant le plasma, leur durée d'obtention est liée à la fréquence d'échantillonnage du détecteur utilisé pour numériser les raies d'émission. Le laps de temps nécessaire à l'obtention de deux spectres successifs – avec un plasma par spectre – est techniquement limité par la fréquence d'acquisition de détecteur iCCD accolé au spectromètre considéré (large bande Echelle ou bande réduite du monochromateur).

Chaque plasma est imagé à partir d'un délai d'acquisition et pendant une certaine durée. Ce laps de temps permet d'éclairer les pixels CCD du détecteur pour imprimer l'empreinte spectrale des différentes longueurs d'onde caractéristiques du plasma. A la fin de la durée d'acquisition, cette empreinte est convertie en spectrogramme. Selon la largeur spectrale désirée, on emploie un type de spectromètre doté d'une fréquence d'acquisition f maximale propre comme explicité dans le tableau III-12 :

	Monochromateur THR1000 + détecteur iCCD Roper PiMAX	Spectromètre Echelle Andor + iCCD Andor iStar
Nombre de pixels utilisés imagés	1024	Spectrogramme Echelle en 2 dimensions de 1024 x 1024 pixels
Nombre d'informations de type (longueur d'onde λ_i , Intensité I_i) par spectre	1024	Entre 25000 et 30000 selon la calibration
f : Fréquence maximale d'obtention d'un spectre (Hz ou s^{-1})	37	1

tableau III-12 : Durée d'obtention d'un spectre selon la fréquence d'acquisition des spectromètres utilisés

Le taux **F** de rencontre plasma-particule(s) dépend de la concentration particulaire **N** initiale. La durée Δt d'obtention d'un spectre représentatif d'une rencontre plasma-particule(s) est liée à la fréquence **f** d'acquisition du spectromètre utilisé selon la relation :

$$\Delta t = \frac{1}{f \times F(N)} \quad \text{équation III-26}$$

Selon la concentration initiale **N**, chacune des séries de 150 spectres a été effectuée avec le spectromètre Echelle dans le but d'obtenir des spectrogrammes à large bande spectrale (200–1000 nm) pour accéder à la composition multiélémentaire des particules micrométriques. Cependant, le principe de fonctionnement de réseau Echelle vient ralentir l'obtention de la statistique permettant d'analyse au vol les particules. Etant donnée la fréquence d'acquisition de 1 Hz entre deux spectres, 150 secondes sont nécessaires pour chaque série de spectres. Le tableau III-13 illustre la limitation es problème dilemme entre l'obtention d'un spectre large bande peut être complété de la façon suivante :

	Densité 1	Densité 2	Densité 3	Densité 4
N : concentration particulaire (10^{-3} mm^{-3})	150	100	70	30
F : taux de rencontre plasma/particule(s) (%)	12,00	8,00	4,67	2
Δt (spectre Echelle à large bande) : durée d'obtention en seconde d'un spectre signifiant une rencontre plasma-particule(s) avec le spectromètre Echelle	8,33	12,50	21,41	50
Δt (spectre monochromateur à bande étroite) : durée d'obtention en seconde d'un spectre signifiant une rencontre plasma-particule(s) avec le monochromateur	0,22	0,34	0,58	1,35

tableau III-13 : Calculs des durées nécessaires à l'obtention d'un spectre significatif d'une interaction effective plasma-particule(s) selon le type de spectromètre utilisé

III.6.3.2.3. Validation du modèle probabiliste d'interactions et détermination du volume d'analyse et d'observation du plasma

Chaque plasma est imagé au moyen d'une fibre optique dotée d'une ouverture numérique caractérisée par un angle solide. Le volume d'analyse est le volume observé par le détecteur et est lié à l'angle solide d'observation de la fibre optique d'ouverture numérique 0,22. Dans notre configuration, tout le plasma est imagé, avec l'hypothèse d'un plasma optiquement fin. Un volume d'analyse peut ainsi être défini comme la partie du volume du plasma qui à la fois vaporise et excite la particule, et qui est aussi imagé par la fibre optique. Le concept de volume d'analyse V a été introduit dans l'expression de la distribution en loi de Poisson (cf. équation III-23, page121, voir aussi [83]).

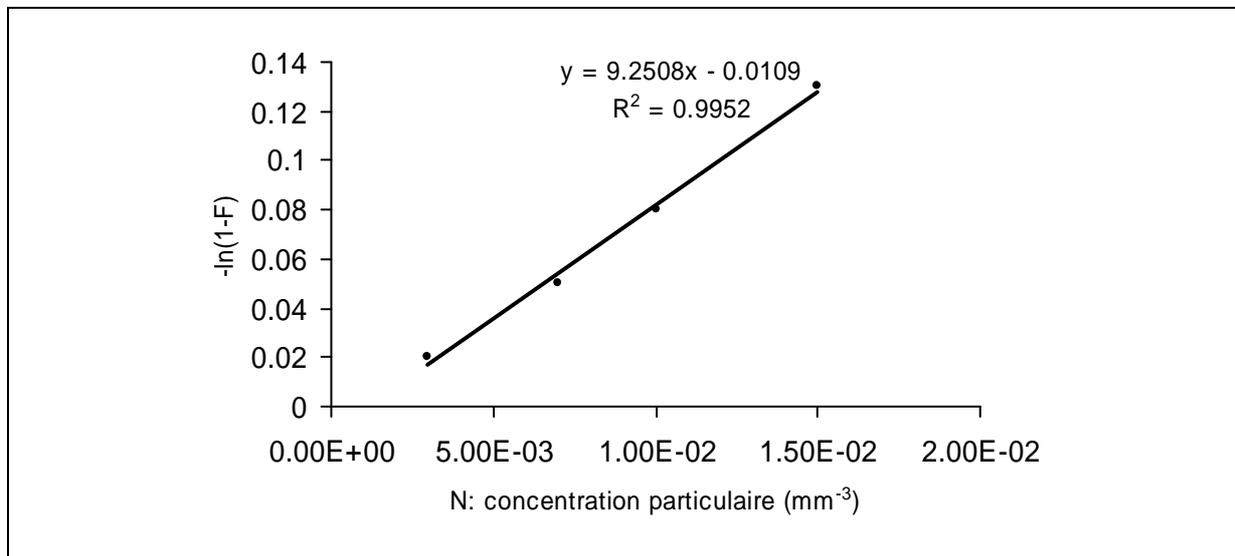


figure III-26 : Détermination du volume V statistique d'observation des interactions plasma-particule(s)

La courbe de la figure III-26 est linéaire. La pente de la courbe de tendance correspondante est égale au volume $V = 9,2 \text{ mm}^3$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que le volume macroscopique mesuré pour le plasma et égal à $5,43 \text{ mm}^3$.

III.6.3.2.4. Quantités de particules interagissant avec chaque plasma

Connaissant V , nous calculons les probabilités théoriques d'interaction entre un plasma et une ou des particule(s). L'équation III-21, page 120, exprime le cas général de la probabilité P_k [84] qu'un plasma interagisse avec k particules. Si $k = 1$, la probabilité théorique d'interaction P_1 du plasma

avec une seule particule est $P_1 = \mu \times e^{-\mu}$. Les probabilités théoriques P_k et P_1 sont calculées avec les conditions expérimentales et listées dans le tableau III-14 :

N : Densité particulaire des particules échantillonnées (10^{-3} mm^{-3})	N_C : densité particulaire après l'impacteur virtuel doté d'un facteur de concentration de 10 (10^{-3} mm^{-3})	μ : nombre de particules dans le volume V du plasma observé : $\mu = V * N_C$	P_1 : probabilité d'interaction de type plasma/particule unique : $P_1 = \frac{\mu}{1!} \times e^{-\mu}$	P : probabilité d'interaction de type plasma/une ou plusieurs particule(s) : $P = 1 - e^{-\mu}$	F : probabilité expérimentale incluant tout type d'interactions plasma/particule(s) en %	Comparaison	
						P_1/F	P/F
15	150	0,14	0,12	0,13	12,0	1,02	1,09
10	100	0,09	0,09	0,09	8,0	1,07	1,12
7	70	0,07	0,06	0,06	4,7	1,32	1,36
3	30	0,03	0,03	0,03	2,0	1,37	1,39

tableau III-14 : Comparaison entre les taux théoriques et expérimentaux des rencontres plasma-particule(s)

La comparaison entre les interactions théoriques P_1 et P_2 calculées et celles expérimentalement constatées F est effectuée par les rapports P_1/F et P_2/F , montre que P_1/F est légèrement plus proche de 1 que P_2/F que la majorité des interactions plasma-particule(s) : chaque plasma interagit donc préférentiellement avec une seule particule.

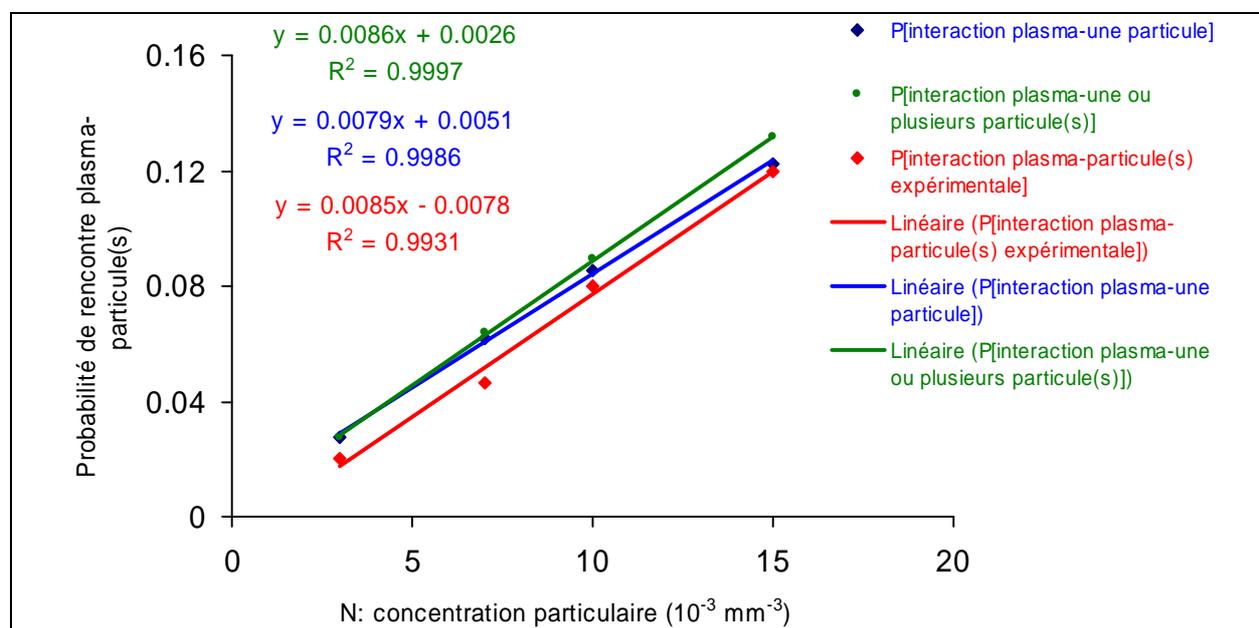


figure III-27 : Comparaison des taux de rencontre plasma/particule(s) théoriques et expérimentaux

Le bénéfice de cette observation réside dans l'échantillonnage par le plasma d'une seule particule, évitant les interférences issues de l'analyse simultanée de plusieurs entités. Le problème apparaît quand les teneurs élémentaires d'une seule particule sont faibles et inférieures aux limites de détection de la technique LIBS. L'agglomération de plusieurs particules pour augmenter la quantité

de matière analysée serait alors une solution pour analyser davantage de matière et donc détecter les raies d'émissions.

III.6.3.2.5. Perspectives d'amélioration : déclenchement du tir laser sur la particule

Des méthodes analytiques, telles que la fluorescence induite par laser (LIF), mettent en œuvre une barrière optique qui détecte la présence de particule(s) et déclenche le tir laser [117]. Un système analogue a été envisagé dans le cadre de la thèse, cependant sa mise en œuvre complexe n'a pas été rendu possible : maîtrise de l'écoulement pour positionner la particule dans la section efficace de mesure, gestion d'une électronique de précision déclenchant par asservissement le laser, etc.).

Cependant, l'équipe de Hybl *et al.* [85] a récemment couplé une chaîne LIBS en aval d'un appareil utilisant un principe de fluorescence en amont : la première méthode non destructive déclenche alors le tir du laser pour générer un plasma sur la matière particulaire ainsi localisée.

Des impacteurs aérodynamiques (cf. chapitre V) permettent aussi de concentrer et focaliser des particules diluées. [86]

III.6.4. Prélèvement et concentration d'aérosols par filtration

De nombreux travaux font état de l'analyse par LIBS de dépôts particulaires. Au CEB, une étude conjointe a été effectuée pour caractériser les espèces élémentaires présentes dans des particules de suies diesel prélevées par filtration en sortie d'échappement moteur. Lombaert *et al.* [87] ont utilisé des filtres pour concentrer les suies pendant des durées connues. L'annexe IV résume ces résultats obtenus avec notre dispositif LIBS lors d'une collaboration.

Cette méthode présente l'avantage de localiser les particules, ainsi que d'augmenter les quantités d'éléments à détecter (métaux, etc.) comme constaté dans la partie précédente concernant la probabilité qu'un plasma interagisse avec une ou plusieurs particules. Les applications sont multiples : qualifications des particules toxiques présentes dans les gaines de filtration des masques de respirations des fantassins ou d'abris, qualité de l'air filtré dans une salle blanche, dans des circuit d'air conditionné, etc.

Les inconvénients résident dans la durée de dépôts des particules (quelques minutes à plusieurs heures selon les cas) pouvant apparaître peu adaptée à la détection d'alerte de particules toxiques (quelques minutes au maximum pour donner l'alerte). De plus pour des particules toxiques impactées, un risque de re-aérosolisation peut exister lors de la manipulation des filtres.

III.7. CONCLUSIONS

Le chapitre a permis de qualifier et de calibrer la technique LIBS dans le cas des teneurs élémentaires d'aérosols aqueux de taille micrométrique selon les points suivants :

- **Contrôle de la rencontre entre un plasma et une quantité étalonnée de matière sous forme de microgouttelettes calibrées en taille et en composition multiélémentaire** : les particules aqueuses sont forcées à résider dans le plasma pour y être analysées par LIBS,
- **Limites de détection établies pour les éléments Ca, Mg et Na de l'ordre du ppm, voir de la dizaine de ppb** : l'outil LIBS est qualifié en tant que méthode de dosage multiélémentaire à des seuils voisins ou inférieurs au ppm pour de nombreux éléments.
- **Reproductibilité de la mesure** : la robustesse et l'échantillonnage par le plasma permettent de classer les microgouttelettes par traitement statistique multivarié,
- **Fiabilité du diagnostic** : la rapidité du diagnostic LIBS permet de multiplier les mesures et donc de confirmer les résultats et rendre crédible l'établissement de base de données,

L'exploitation des nombreuses et riches données spectrales par des méthodes statistiques multivariées a permis d'établir les potentialités de détection et de discriminations d'échantillons complexes tels les particules multiélémentaires et micrométrique. La voie de l'identification d'échantillons est ouverte à des fins de détection d'alerte de menaces chimiques au sens large.

Un des objectifs du chapitre a également consisté à coupler la méthodologie LIBS à la détection directe de particules d'aérosols de tailles micrométriques. Les résultats montrent que la détection est complexe et aléatoire à cause de l'aléa de rencontre plasma-particule(s), fonction de la concentration particulaire au voisinage du plasma selon une loi de Poisson. L'étude des probabilités montre des taux d'interaction faibles (environ 10 % pour des concentrations initiales d'ordre de 100 particules.cm⁻³, échantillonnées sous forme de courant linéaires). Les calculs montrent des interactions préférentiellement entre un plasma et une particule avec la gamme de concentrations particulaire utilisées. Dans ce cas, des raies d'émission sont détectées si les quantités élémentaires sont compatibles avec les limites de détection de la LIBS. Le recours à une concentration, voire une agglomération de particules semble nécessaire pour augmenter taux de rencontre et quantités de matière analysée.

Désormais, nous allons spécifier un aérosol particulier : l'aérosol biologique et notamment bactérien.

IV. ANALYSE LIBS DE MILIEUX HETEROGENES : APPLICATIONS A LA DETECTION BACTERIENNE

IV.1. MOTIVATIONS ET OBJECTIFS POUR LA DETECTION BACTERIENNE

Les bactéries sont les plus petits organismes vivants autonomes. Ces particules de tailles micrométriques sont semblables à des édifices aqueux et carbonés rassemblant des éléments minéraux et organiques. De par leur morphologie ces micro-organismes peuvent être facilement dispersés par voie aérienne ou contaminer une surface.

La méthodologie LIBS se propose d'identifier et d'analyser les bactéries sous forme particulaire ou déposée. Etant données la diversité et la complexité des entités composant le bruit de fond biologique de l'atmosphère la méthode de détection devra être basée sur la mesure de marqueurs spectraux spécifiques et discriminants des bactéries. Les objectifs de ce chapitre sont donc :

1. **Rechercher des marqueurs spectraux** accessibles par la méthode LIBS et spécifiques d'échantillons bactériens,
2. **Mettre en place des stratégies d'exploitation pertinentes des marqueurs spectraux** détectés par LIBS de façon fiable et reproductible. Le dessein final est de savoir si une détection ou une classification d'échantillons bactériens parmi d'autres est possible.
3. **Appréhender en laboratoire le traitement des différents cas opérationnels de rencontres sur le terrain de la menace bactérienne par l'étude de la sensibilité de la méthode LIBS** : analyses des dépôts de bactéries à l'état végétatif ou sporulé ; détection directe en vol de bactéries sous forme aérosolisée.

IV.2. LE MONDE BACTERIOLOGIQUE

IV.2.1. Définition des bactéries

Les bactéries appartiennent à la classe des cellules dites procaryotes, par opposition à celles eucaryotes végétales (plantes et champignons) et animales. Elles se caractérisent par leur petite taille (de l'ordre du micromètre contre environ dix micromètres pour la moyenne des cellules eucaryotes), mais aussi par leur structure particulière (essentiellement l'absence de membrane séparant le chromosome bactérien du cytoplasme) et leur mode de division. [88]

La morphologie détaillée des bactéries ne fut révélée que grâce au microscope électronique. A cause de leur taille micrométrique, le pouvoir de résolution du microscope optique se révéla bien trop faible. Les bactéries se distinguent des virus, qui sont généralement de taille encore plus petite (inférieure à 100 nm), essentiellement par l'existence en elles à la fois d'acide ribonucléique (ARN) et d'acide désoxyribonucléique (ADN), alors que les virus n'ont qu'un seul type d'acide nucléique, et par le fait que les virus sont incapables de répliquer autonome. Contrairement aux virus qui sont des parasites intracellulaires obligatoires des cellules eucaryotes ou procaryotes, les bactéries peuvent généralement se répliquer dans des milieux inertes indépendamment de la présence de cellules vivantes.

La figure IV-1 schématise les caractéristiques des procaryotes qui possèdent un contenu (cytoplasme et organelles) et un contenant (membrane cytoplasmique et paroi bactérienne). Cette dernière est un constituant unique des bactéries. Des structures extérieures aux membranes existent aussi (capsule ou flagelles permettant aux bactéries de se mouvoir).

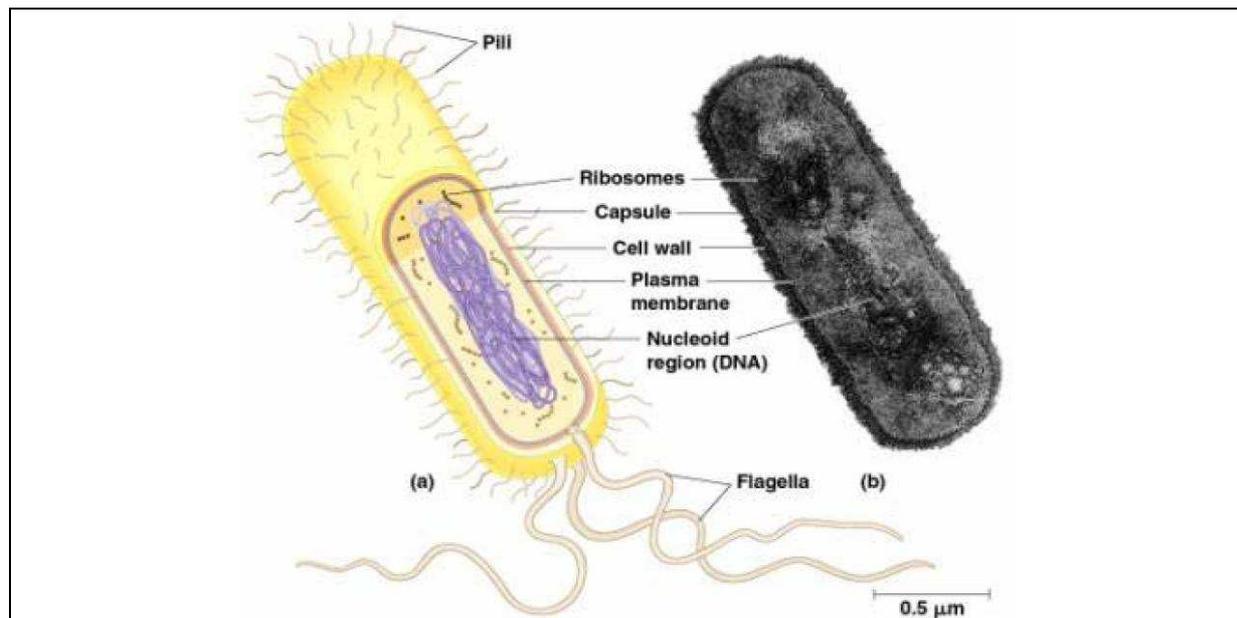


figure IV-1 : Schéma et photographie par microscopie électronique d'une bactérie – ici un *Bacillus* – sous sa forme végétative

La bactérie est dotée d'un métabolisme assurant les fonctions vitales basiques (respiration, nutrition, multiplication, etc.). Ce micro-organisme interagit continûment avec son milieu environnant avec des échanges chimiques (eau et sels minéraux) et biochimiques (production d'énergie, fabrication d'une coque protectrice en cas d'environnement critique, etc.)

IV.2.2. Structures et morphologies des bactéries

La diversité du monde bactérien est essentiellement due à l'extrême variété des fonctions bactériennes plutôt qu'à d'importantes différences structurelles ou morphologiques. Comme illustré sur la figure IV-2, la cellule bactérienne comporte, comme toute cellule vivante, un génome, un cytoplasme et des enveloppes :

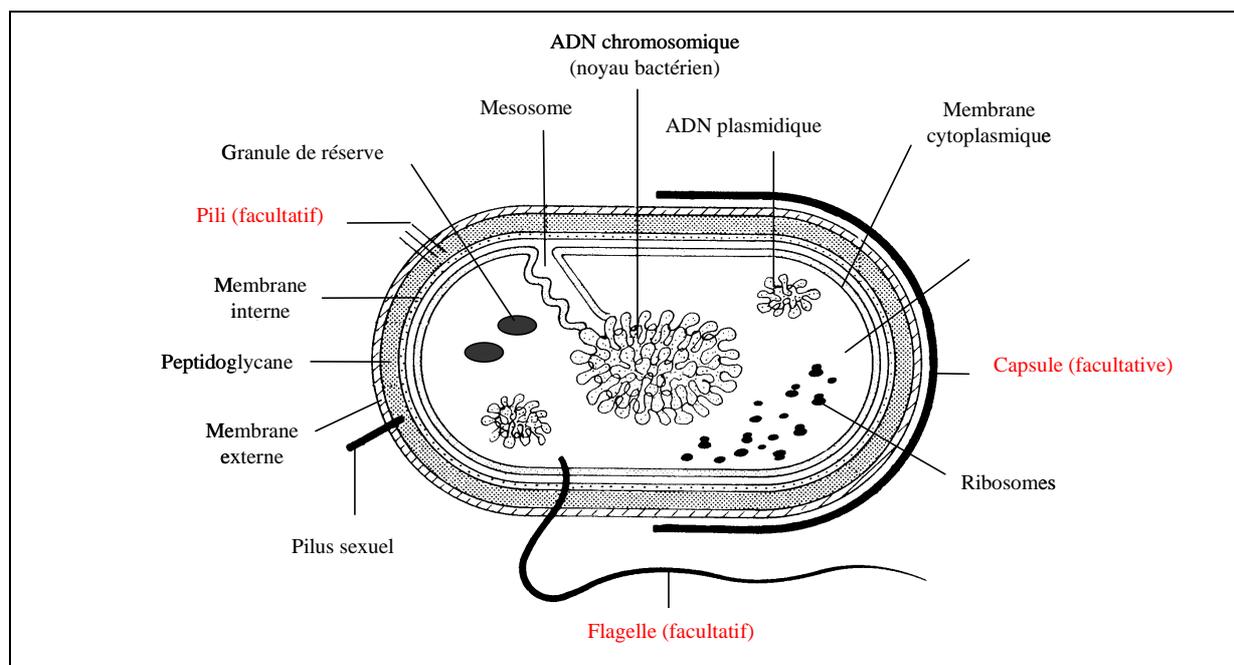


figure IV-2 : Schéma général d'une bactérie avec ses constituants constants et optionnels selon la nature et l'environnement de la bactérie [89]

Une rapide description des composants structurant les bactéries est entreprise pour appréhender de potentiels marqueurs spectraux utilisables à des fins d'analyses spectroscopiques.

IV.2.2.1. Le contenu cytoplasmique

Le **cytoplasme** de la cellule bactérienne est un hydrogel colloïdal occupant tout l'espace intracellulaire. Il n'est pas séparé du chromosome bactérien, contrairement aux cellules eucaryotes dont le cytoplasme est séparé du noyau par la membrane nucléaire. Le liquide cytoplasmique contient les substances de réserve nécessaires à l'activité métabolique : amidon (glucides : C, H, O), glycogène, (glucides complexes), sels minéraux, etc.

Le **génom**e bactérien est figuré par un filament d'acide désoxyribonucléique (ADN) faisant office de chromosome unique composé **d'acides aminés** constitués par fonctions amines $-NH_2$. La boucle d'ADN bactérien est pelotonnée à l'intérieur du cytoplasme. Ce contenu est à la base du codage et de l'expression des gènes eux-mêmes utilisés pour l'identification des bactéries par des

méthodes microbiologiques et génétiques complexes (extraction et réplication des brins d'ADN, lectures du rôle des gènes à des fins d'identification, etc.).

Les **vacuoles** baignant dans le liquide cytoplasmique sont associées aux fonctions vitales (métabolisme, respiration, etc.) des bactéries et aux échanges de protéines et de **minéraux** avec l'extérieur. Les bactéries, capables de survivre indépendamment de tout parasitisme intracellulaire, sont tolérantes à de grandes variations de concentration ionique dans leur milieu et à des changements de pression osmotique, grâce aux systèmes de régulation exercés par la membrane cytoplasmique et à la rigidité de la paroi. L'équilibre en **ions potassium et phosphore**, essentiels pour le métabolisme énergétique des bactéries, est maintenu constant à l'intérieur de la cellule bactérienne, indépendamment des concentrations relatives de ces ions dans le milieu de culture [90] : nous verrons, par la suite, l'importance de cette remarque d'un point de vue analytique. La plupart des bactéries tolèrent des concentrations modérées de **sodium** (de l'ordre de 0,9%), bien que cet élément ne soit indispensable qu'à la croissance de certaines bactéries dites halophiles. C'est notamment le cas des bactéries adaptées au milieu marin ou à d'autres biotopes d'eau salée, qui sont exigeantes vis-à-vis du sodium et qui peuvent tolérer des concentrations de sodium atteignant 3%. Ces bactéries, soudainement transférées dans un milieu de faible concentration ionique, seront lysées.

IV.2.2.2. La membrane cytoplasmique

La **membrane cytoplasmique** est une barrière critique séparant le cytoplasme de son environnement. Sa structure est en double feuillet de nature phospholipidique (faible épaisseur : 7,5 nm) présentant **une région hydrophile contenant des groupements phosphates et du glycérol**, et **une région hydrophobe composés d'acides gras à longues chaînes carbonées**. Cette structure est associée à des enzymes. Les fonctions de la membrane cytoplasmique sont la respiration (fabrication d'énergie via l'adénosine triphosphate ou ATP) et le transfert de substances entre le cytoplasme et l'extérieur. Tous les nutriments pénètrent par cette membrane, inversement, les déchets produits y sont transférés pour être évacués vers l'extérieur. Les bactéries sont généralement tolérantes à des variations de pH entre 6 et 9, grâce à la régulation exercée par leur membrane cytoplasmique à l'encontre des ions **H⁺**.

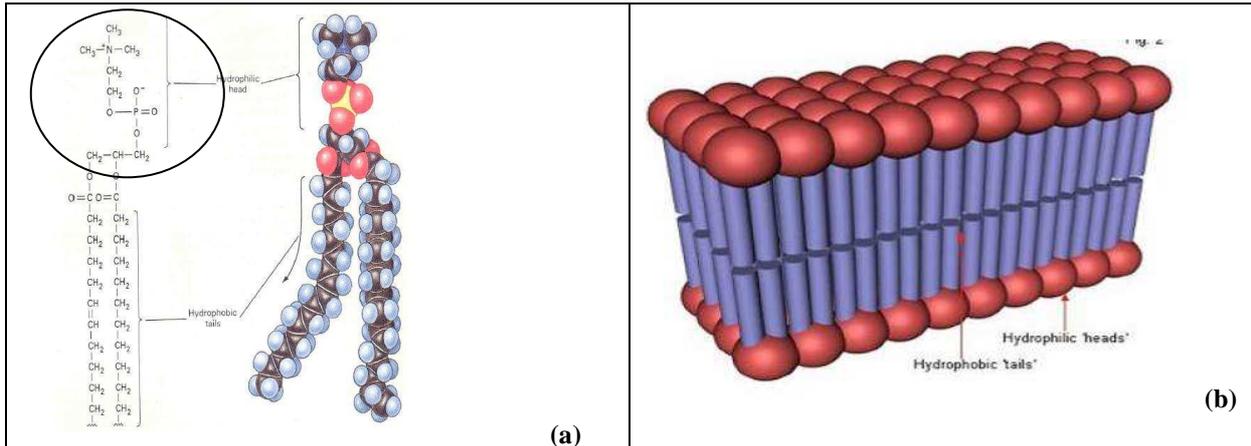


figure IV-3 : Description et structure en double feuillet des phospholipides de membrane cytoplasmique [88]

IV.2.2.3. Les différents types de parois bactériennes

La **paroi** enveloppe la cellule bactérienne et lui donne sa forme caractéristique et sa rigidité en la protégeant contre les variations de pression osmotique interne (de 5 à 20 atm). Le composant principal de la paroi bactérienne est le **peptidoglycane** lequel présente des déterminants antigéniques majeurs de lipopolysaccharide (LPS). La présence d'antigènes en surface des parois est utilisée lors de procédés immunologiques complexes basés sur des réactions à bases d'anticorps spécifiques à des fins de reconnaissance.

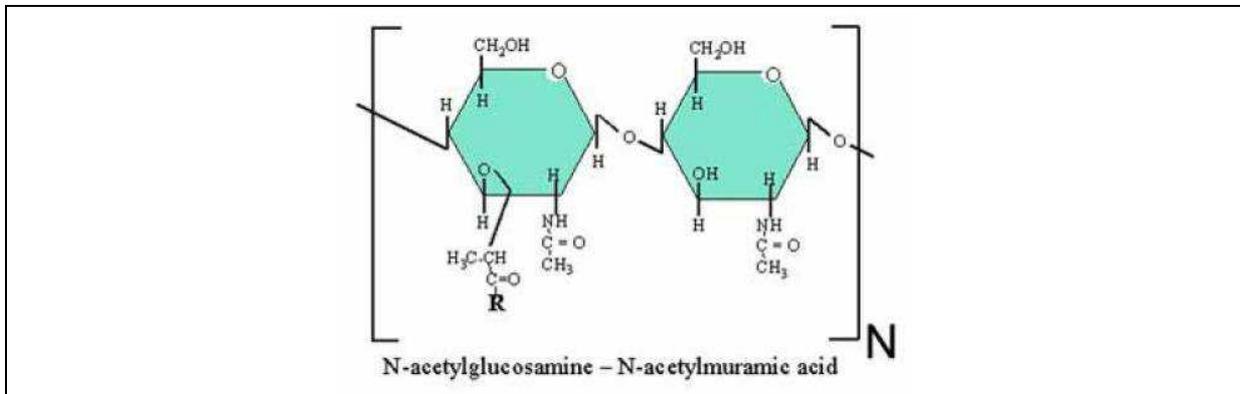


figure IV-4 : Structure de la molécule de peptidoglycane, constituant principal des parois bactériennes [88]

Le **peptidoglycane** forme un réseau de macromolécules englobant le cytoplasme de la bactérie (cf. figure IV-4). Cette structure englobe un grand nombre de **cycles aromatiques** potentiellement intéressants lors d'analyses LIBS. Il est composé de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) associés à des acides aminés. Cette structure de base de la paroi des bactéries est indispensable à la division de la bactérie. Selon la nature de leur paroi, on distingue 2 types de bactéries selon la classification établie par le test de Gram :

- **La paroi des bactéries dites Gram positives** (cf. figure IV-5) est relativement **épaisse** (20 à 80nm) et dense, pouvant atteindre 100 nm et représenter jusqu'à 30 % du poids sec de la cellule. Elle est composée, outre le **peptidoglycane à 90 %**, d'acide téichoïque, les deux constituants étant intimement liés. Les exemples de bactéries Gram « + » sont typiquement les *Bacillus* et les *Staphylococcus*.

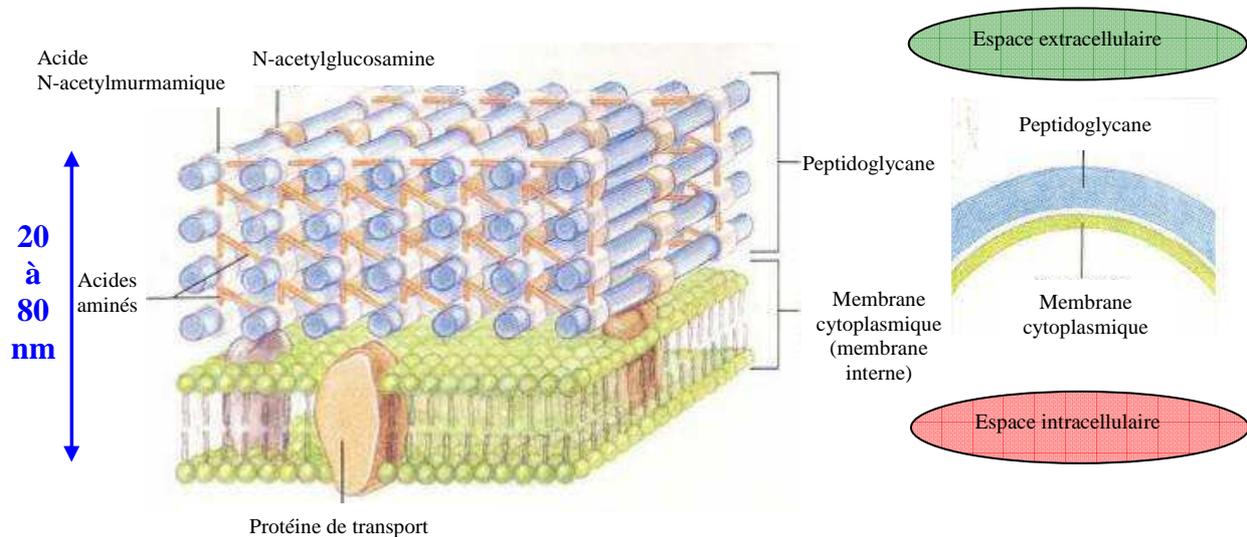


figure IV-5 : Composition des deux types de parois bactériennes « Gram-positive » [90]

- **La paroi des bactéries Gram négatives** est plus **mince** (10 à 15 nm). La couche de peptidoglycane n'excède pas 20 nm et la paroi ne représente guère plus de 10 à 15 % du poids sec de la cellule bactérienne. L'exemple typique de telles bactéries est *Escherichia coli*. La distinction de structure de la paroi entre bactéries Gram positives et bactéries Gram négatives est liée à l'existence chez ces dernières d'une membrane externe dont la structure est analogue à celle de la membrane cytoplasmique (**lipopolysaccharidique (LPS)** et lipoprotéique). Cette membrane externe supplémentaire est remarquable avec la présence de LPS, de protéines liées entre elles par des **cations divalents tels que Ca^{2+} , Mg^{2+}** .

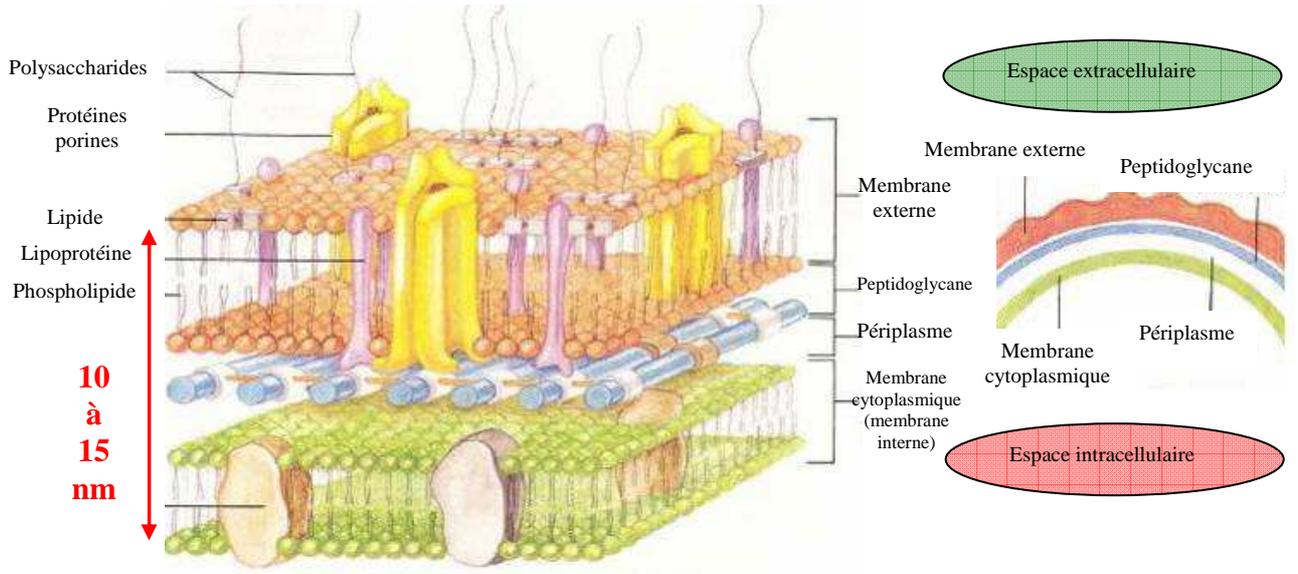


figure IV-6 : Composition des deux types de parois bactériennes « Gram-négative » [90]

IV.2.2.4. Les enveloppes optionnelles et remarquables : cas de la spore bactérienne

Une *enveloppe superficielle* de nature protéique se trouve parfois à l'extérieur de la paroi des bactéries. Plus généralement et parfois spécifiquement, certaines espèces bactériennes élaborent une volumineuse *capsule* de nature polysaccharidique (cf. *spore* de la figure IV-7).

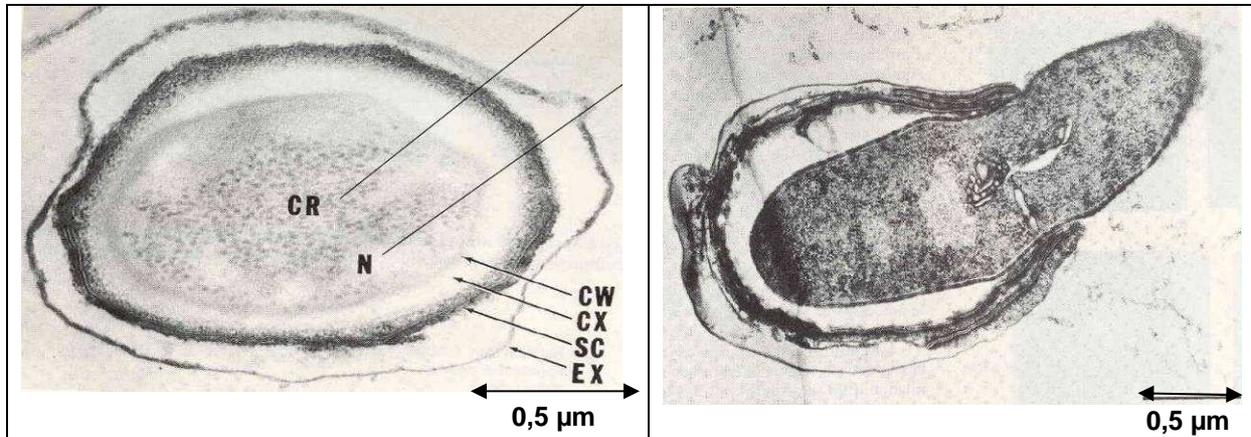
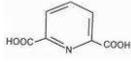


figure IV-7 : Spore de *Bacillus anthracis* sous microscope électronique. CR : ribosomes, N : protoplasma et nucléole, CW : paroi sporale, CX : cortex fait de peptidoglycane, SC : manteau protéique riche en ponts disulfures, EX : exospore lipoprotéique contenant 20% d'hydrates de carbone [88]

figure IV-8 : *Clostridium pectinovorum* émergent de la spore en germination (cliché établi par microscopie électronique) [88]

Cette capsule explique la virulence des bactéries (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus anthracis* provoquant la maladie du charbon) ou bien alors est source de formation de « biofilms » - tels que *Staphylococcus epidermidis* - très résistant aux tentatives de décontamination.

Son rôle est de protéger la bactérie contre la phagocytose et contre les agents physiques et chimiques (ultra sons, chaleur, radiations, temps, pression, etc.). La sporulation est une caractéristique de certaines bactéries tels que les *Bacillus*. Cette faculté leur permet de survivre de nombreuses années faces à des conditions sévères externes et favorise leur dissémination.

La capsule est majoritairement composée d'**acide dipicolinique**  comptant jusqu'à 15% du poids sec de la bactérie. Cet acide est complexé à des ions **calcium Ca^{2+}** , cela explique l'importante résistance des spores à la chaleur. La présence importante de calcium et de cycles aromatiques précurseurs de raies **CN** est potentiellement d'intérêt en tant que marqueurs spectraux en LIBS. Comme indiqué par la légende de la figure IV-7, cette paroi contient également des peptidoglycanes et des minéraux remarquables comme du soufre. A titre indicatif, cet artifice protecteur va leur permettre de résister à des conditions de températures relativement élevées et à un certain nombre d'agents létaux. Par conséquent, un procédé de stérilisation de milieux de cultures utilisé en laboratoire est l'autoclave. Ce procédé va chauffer le système à plus de 120°C pour tuer ces endospores car l'eau bouillante (100°C) ne suffit pas pour toutes les désactiver.

La forme sporulée est la forme dite passive et contractée des bactéries qui redeviennent actives et végétatives par germination (cf. figure IV-8) lorsque les conditions ambiantes – température adéquate, présence de nutriments, etc. – sont favorables.

IV.2.3. Compositions élémentaires et moléculaires des bactéries

Les parties précédentes illustrent que les bactéries sont globalement assimilables à des entités aqueuses et carbonées contenant des éléments minéraux et organiques souvent à l'état de traces [91]. Une analogie est alors directement faite avec les particules de taille micrométrique et de composition multiélémentaire étudiées dans le chapitre précédent.

La structure des bactéries précédemment décrite a mis en évidence la présence d'éléments et de molécules potentiellement utilisables en tant que marqueurs spectraux détectables par la méthode LIBS. La composition chimique des micro-organismes n'est pratiquement jamais déterminée de manière précise. En particulier, au niveau des éléments minéraux, la composition est éminemment variable selon les conditions ambiantes variables. A titre d'exemples, le tableau IV-1 définit la composition d'une bactérie telle qu'*Escherichia coli* :

Macromolécules	% du poids sec	Éléments	% de matière sèche	Éléments	% de matière sèche
Protéines	40-70	Carbone	53	Magnésium	0,1-0,5
Acides nucléiques (de l'ADN, de l'ARN, des monomères de nucléotides, acides aminés, etc.)	13-34	Oxygène	20	Sodium	0,5-1,0
Lipides	10-15	Azote	12	Calcium	0,01-1,1
		Hydrogène	7	Fer	0,02-0,2
		Phosphore	2-3	Cuivre	0,01-0,2
		Soufre	0,2-1,0	Manganèse	0,001-0,01
		Potassium	1,0-4,5		

tableau IV-1 : Composition massique de la matière sèche d'une bactérie *Escherichia coli* d'après [92]

La majorité de la masse des cellules vivantes est constituée de quatre atomes : **carbone, oxygène, hydrogène et azote**. D'autres atomes sont quantitativement moins nombreux mais fonctionnellement très importants : **phosphore, calcium, magnésium, soufre, fer, zinc, manganèse, cuivre, molybdène et cobalt**.

L'eau H₂O représente la grande majorité de la masse d'une bactérie : de **70 à 90 %**. Le reste est constitué par les macromolécules, surtout les protéines.

L'activité métabolique est assurée par de multiples échanges en particulier par l'intermédiaire d'ions tels que ceux listés dans le tableau IV-2 :

Ion	Fonction
K ⁺	Cation principal, cofacteur de certains enzymes
NH ⁴⁺	Forme inorganique principale de N lors de son assimilation
Mg ²⁺	Cofacteur d'un grand nombre d'enzymes
Ca ²⁺	Cofacteur de certains enzymes
Fe ²⁺	Présent dans les cytochromes et autres enzymes
Mn ²⁺	Cofacteur de plusieurs enzymes
Mo ²⁺	Présent dans plusieurs enzymes, responsable de l'assimilation de N
Co ²⁺	Présent dans la vitamine B12 et les coenzymes qui en dérivent
Cu ²⁺	Présent dans plusieurs enzymes
Zn ²⁺	Présent dans plusieurs enzymes
Cl ⁻	Non requis par de nombreuses bactéries
SO ₄ ²⁻	Source principale de S dans la plupart des milieux
PO ₄ ³⁻	Participe à de nombreuses réactions métaboliques

tableau IV-2 : Ions inorganiques présents dans une cellule bactérienne croissant en milieu minimal en glucose et fonctions associées d'après [93]

Ces données représentent une base de choix d'éléments choisis comme potentiels marqueurs de matériel biologiques comme les bactéries.

IV.2.4. Stratégies envisagées pour l'analyse d'un système doublement hétérogène

L'inventaire des entités structurant les bactéries permet d'appréhender les stratégies à adopter pour analyser ces objets biologiques par la technique LIBS.

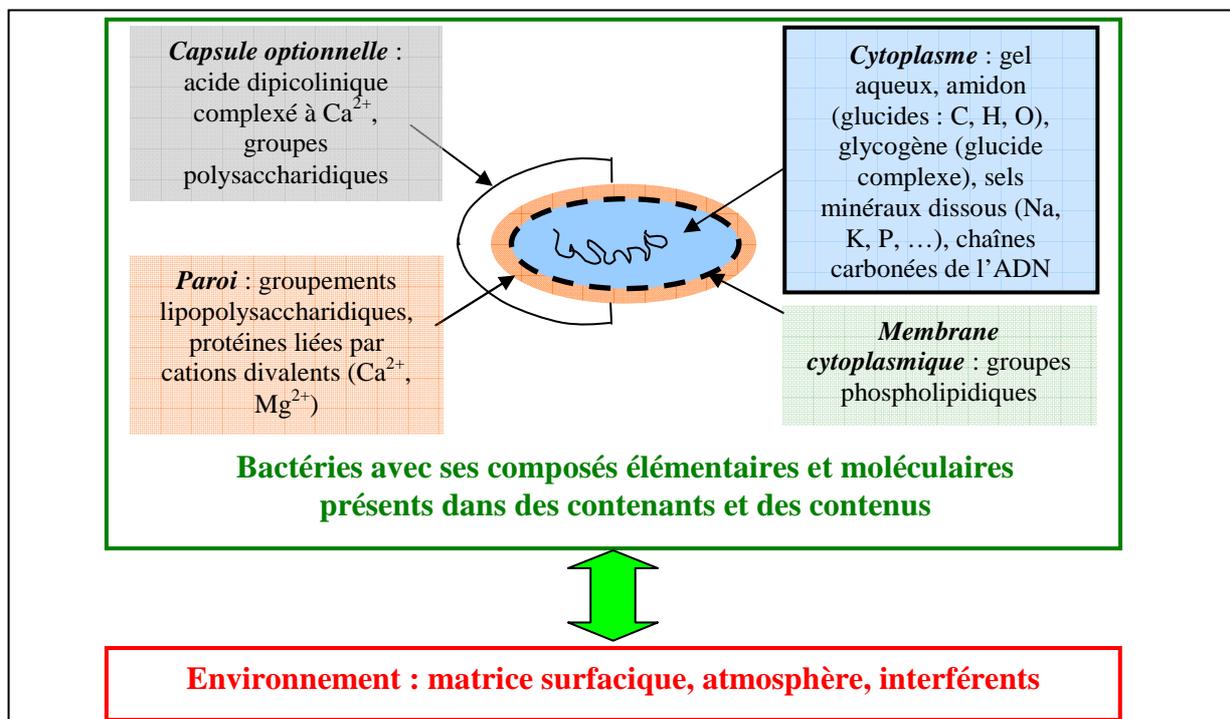


figure IV-9 : Synoptique du système doublement hétérogène à considérer dans le cadre de l'expertise par LIBS d'un ensemble bactérien – édifice aqueux et carboné compartimenté selon des contenants (parois, voire capsule) et des contenus (éléments du cytoplasme, etc.) – présent dans un environnement (atmosphère, surface, etc.)

Finalement, l'analyse par LIBS d'une ou plusieurs bactéries est assimilable à l'expertise par plasma d'un système doublement hétérogène :

1. **Nécessité de distinguer la ou les bactéries par rapport à son environnement immédiat.**
Que la bactérie soit en suspension dans l'atmosphère ou déposée en surface, le plasma devra vaporiser et exciter sélectivement la bactérie représentant l'échantillon d'intérêt.
2. **Nécessité d'analyser les différents constituants de la bactérie.** Le plasma devra s'affranchir idéalement du « flacon » représenté par les parois externes de la bactérie pour également vaporiser et exciter les éléments du cytoplasme lesquels constituent des marqueurs spectraux potentiellement spécifiques.

Le succès face à tel challenge analytique nécessite d'adapter la LIBS pour coupler chaque plasma induit à l'analyse sélective d'une ou plusieurs bactéries présentes dans son environnement (suspension atmosphérique, amas surfacique). Dès lors que le plasma analyse effectivement les

divers composants du milieu bactérien, l'emploi de marqueur spectraux discriminatoires est alors nécessaire à des fins de détection, voire de classification.

IV.3. BILAN MATIERE D'UNE BACTERIE ET FAISABILITE DE SON ANALYSE PAR LIBS

IV.3.1. Choix d'un modèle géométrique

Considérons une particule biologique comme une entité présente dans l'environnement ambiant. Comme illustrée sur la figure IV-10, une particule d'aérosol biologique – par exemple une spore de *Bacillus* – peut être assimilée à un cylindre de 2,5 μm de haut avec un diamètre 1 μm . Le calcul du volume V équivaut à environ $2 \mu\text{m}^3$, soit une masse m d'environ 2 pg en considérant une densité d proche de celle de l'eau ($d = 1 \text{ g.cm}^{-3}$). Le modèle cylindrique peut également être substitué par une sphère.

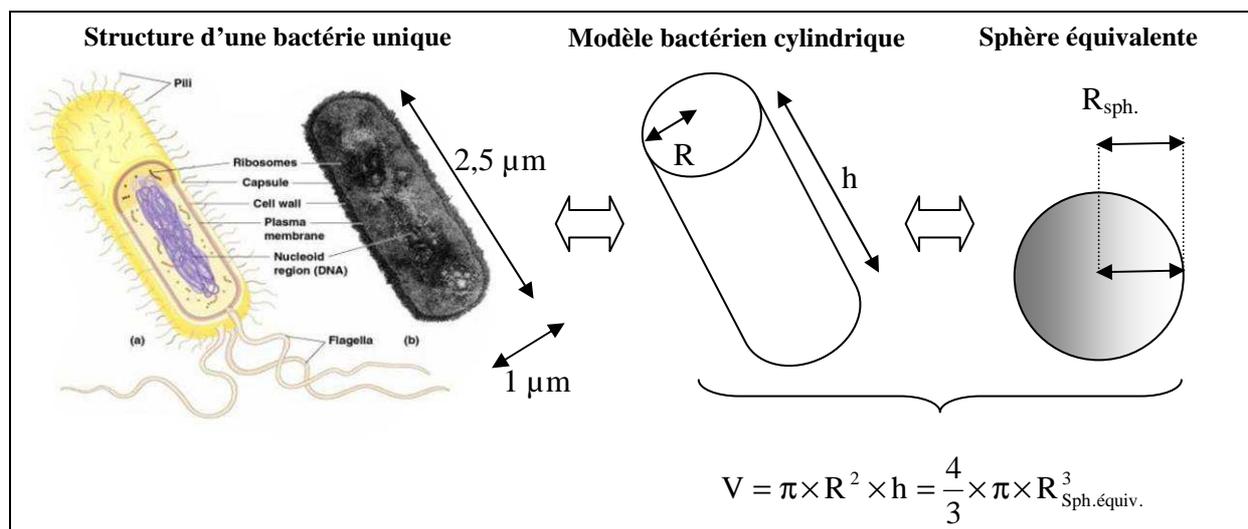


figure IV-10 : Modélisation de bactéries de type *Bacillus* sous la forme d'un cylindre et de sa sphère équivalente de dimensions micrométriques

IV.3.2. Composition élémentaire du modèle

Les données issues de la microbiologie et de la bactériologie permettent d'approcher la composition d'une particule biologique en termes d'ordres de grandeurs des teneurs en éléments. Le tableau IV-3 informe sur la composition en masses élémentaires relatives pour divers aérosols biologiques représentatifs du bruit de fond atmosphérique. Ces particules d'aérosol apparaissent comme des structures multiélémentaires.

Le tableau IV-3 met à priori en évidence la composition élémentaire singulière des bactéries par rapport aux spores fongiques. Les éléments constituant les bactéries apparaissent toujours en

quantités différentes (cf. rapports différents de 1) en comparaison des teneurs élémentaires pour les spores.

Eléments en % de la masse totale d'une cellule bactérienne de référence <i>Bacillus globigii</i> : masse unitaire=2 pg	Trois souches différentes de <i>Bacillus globigii</i>			Teneur élémentaire moyenne en % pour les trois BG	Spores fongiques typiques de certains végétaux :			Teneur élémentaire moyenne en % pour les trois spores	Rapport quantité élément bactérie BG/spore
	BG-1 %	BG-2 %	BG-3 %		Avoine %	Blé %	Maïs %		
Ca	1,160	1,080	10,21	4,150	0,160	0,015	0,120	0,098	42,2
Mg	0,300	0,370	2,800	1,157	0,200	0,094	0,190	0,161	7,2
Na	0,450	0,380	5,820	2,217	0,013	0,011	0,017	0,014	162,2
K	0,490	0,490	0,680	0,553	1,600	2,240	1,630	1,823	0,3
Fe	0,670	0,570	0,009	0,416	0,025	0,003	0,008	0,012	34,7
P	2,300	2,320	8,520	4,380	0,440	0,410	0,580	0,477	9,2
Mn	0,008	0,012	0,100	0,040	0,006	0,002	0,004	0,004	10

tableau IV-3 : Composition élémentaire de la matière pour 3 espèces de *Bacillus globigii* (notées BG-1, BG-2 et BG-3) et pour 3 exemples d'interférents biologiques (spores fongiques végétales)

IV.3.3. Comparaison teneurs élémentaires d'une bactérie et limites de détection de la LIBS

Bien que les conditions de culture et de conservation des bactéries influent directement sur les teneurs élémentaires des bactéries lesquelles sont des organismes vivant en équilibre avec leur environnement externe, il est raisonnable d'estimer les teneurs élémentaires depuis ces données issues de la littérature. Une particule unique de *Bacillus globigii* est ainsi assimilée au cylindre aqueux précédent de volume $V \approx 2 \mu\text{m}^3$ et de masse $m \approx 2 \text{pg}$ avec l'hypothèse d'une densité unitaire. Les pourcentages massiques des éléments du tableau IV-3 permettent le calcul de leurs masses absolues. Le tableau IV-4 liste la composition massique absolue pour trois cellules individuelles de *Bacillus*.

Le tableau IV-4 permet une ébauche de comparaison des performances analytiques de la LIBS en terme de limites de détection élémentaires nécessaires pour doser les teneurs des atomes constituant une bactérie. Une particule d'aérosol bactérien contient classiquement des éléments en quantité présentant des ordres de grandeur typiques du femtogramme (10^{-15}g). Hormis le calcium, dans certains cas et selon la nature de la bactérie, les limites de détection pour le magnésium et le sodium apparaissent supérieures aux teneurs élémentaires d'une bactérie.

Eléments de la matière sèche d'une bactérie	Masses élémentaires en fg (10^{-15} g) et quantités atomiques par cm ⁻³ de volume d'échantillonnage pour une particule de 2 pg : exemples pour 3 souches de <i>Bacillus globigii</i>			Sensibilité obtenue avec notre dispositif LIBS sur aérosols aqueux de type microgouttelette s, en fg	Sensibilité déterminée par Hahn <i>et al</i> [94] sur particules d'aérosols, en fg	Sensibilité déterminée par Hybl <i>et al</i> [101] sur particules d'aérosols, en fg (critère 3 σ)
	BG-1	BG-2	BG-3			
Ca	23,2 fg 3,5.10 ⁸ atomes 6,4.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	21,2 fg 3,2.10 ⁸ atomes 6,0.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	204,2 fg 3,1.10 ⁹ atomes 5,6.10 ¹¹ atomes.cm ⁻³	1,1 fg 1,6.10 ⁷ atomes 3,0.10 ⁹ atomes.cm ⁻³	0,5 fg	30
Mg	6,0 fg 1,5.10 ⁸ atomes 2,7.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	7,4 fg 1,8.10 ⁸ atomes 3,4.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	56,0 fg 1,4.10 ⁹ atomes 2,5.10 ¹¹ atomes.cm ⁻³	20,5 fg 5,1.10 ⁸ atomes 9,3.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	1,2 fg	20
Na	9,0 fg 2,4.10 ⁸ atomes 4,3.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	7,6 fg 2,0.10 ⁸ atomes 3,7.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	116,4 fg 3,1.10 ⁹ atomes 5,6.10 ¹¹ atomes.cm ⁻³	81,9 fg 2,1.10 ⁹ atomes 3,9.10 ¹¹ atomes.cm ⁻³	3,3 fg	100
K	9,8 fg 1,5.10 ⁸ atomes 2,78.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	9,8 fg 1,5.10 ⁸ atomes 2,78.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	13,6 fg 2,1.10 ⁸ atomes 3,86.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	Non déterminée	Non déterminée	Non déterminée
Fe	13,4 fg 1,4.10 ⁸ atomes 2,66.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	11,4 fg 1,2.10 ⁸ atomes 2,26.10 ¹⁰ atomes.cm ⁻³	0,2 fg 1,9.10 ⁶ atomes 3,57.10 ⁸ atomes.cm ⁻³	Non déterminée	Non déterminée	Non déterminée
P	46,0 fg 8,9.10 ⁸ atomes 1,65.10 ¹¹ atomes.cm ⁻³	46,4 fg 9,0.10 ⁸ atomes 1,66.10 ¹¹ atomes.cm ⁻³	170,0 fg 3,3.10 ⁹ atomes 6,10.10 ¹¹ atomes.cm ⁻³	Non déterminée	Non déterminée	Non déterminée
Mn	0,2 fg 1,7.10 ⁵ atomes 3,23.10 ⁸ atomes.cm ⁻³	0,2 fg 2,6.10 ⁵ atomes 4,84.10 ⁸ atomes.cm ⁻³	2,0 fg 2,2.10 ⁷ atomes 4,04.10 ⁹ atomes.cm ⁻³	Non déterminée	Non déterminée	Non déterminée

tableau IV-4 : Masses élémentaires des composés minéraux contenues dans une seule bactérie de masse égale à 2 pg : valeurs pour trois différentes particules de *Bacillus globigii* (BG-1, BG-2 et BG-3) – Comparaison entre les masses élémentaires de Ca, Mg et Na présents dans une bactérie BG et les limites de détection de référence en LIBS pour les mêmes éléments contenus dans des particules calibrées et analysées par LIBS.

Notre dispositif a été optimisé en termes de limites de détection pour les éléments Ca, Mg et Na. A titre de comparaison, les performances analytiques de notre méthodologie LIBS (régime monopulse nanoseconde) sont évaluées par rapport à celles de la bibliographie.

Les équipes de Hahn *et al* [94], ainsi qu'Hybl *et al* [101] ont publié des limites de détection pour les éléments Ca, Mg et Na contenus dans des particules d'aérosols solides calibrées en compositions et analysées dans de l'air davantage purifié que dans nos expériences. Dans les deux publications, les particules sont suspendues dans un réacteur étanche contenant uniquement de l'air reconstitué sec (80% N₂ et 20% O₂). Dans notre cas, le jet linéaire de microgouttelette est généré dans un courant d'air purifié mais se mélangeant avec l'air ambiant car aucune cellule étanche n'est utilisée, d'où la participation du bruit de fond atmosphérique ambiant. Notre système apparaît

moins sensible que celui de Hahn *et al.* Cependant les échantillons sont analysés dans des conditions approchant davantage le cas opérationnel (analyse en présence d'air ambiant).

Pour appréhender la sensibilité nécessaire pour détecter les teneurs élémentaires constituant une seule bactérie, les masses absolues du tableau IV-4 présentes dans chaque bactérie assimilable à un édifice aqueux de volume $V \approx 2 \mu\text{m}^3 = 2 \cdot 10^{-15} \text{dm}^3$ sont converties en concentrations relatives exprimées en $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ou ppm selon l'équation IV-1 :

$$[\text{X}](\text{ppm ou mg} \cdot \text{dm}^{-3}) = \frac{m_{\text{X}}(\text{mg})}{10^{12} \times V_{\text{bactérie}}(\text{dm}^3)} \quad \text{équation IV-1}$$

En assimilant une bactérie à un édifice aqueux de volume V, la quantité de molécules H₂O dans V est obtenue selon l'équation IV-2 :

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{m_{\text{bactérie}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}} \cdot N_{\text{Avogadro}} = \frac{d_{\text{H}_2\text{O}} \cdot V_{\text{bactérie}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}} \cdot N_{\text{Avogadro}} = 6,7 \cdot 10^{10} \text{ H}_2\text{O par bactérie} \quad \text{équation IV-2}$$

Chaque molécule H₂O contenant 3 atomes, environ $2 \cdot 10^{11}$ atomes composent l'édifice aqueux modélisant une bactérie. Les quantités élémentaires (Ca, Mg, Na, etc.) sont alors obtenues en convertissant les concentrations exprimées en ppm selon l'équation IV-3 pour tout élément X :

$$n_{\text{X}} = \frac{[\text{X}](\text{ppm})}{10^6} \times n_{\text{H}_2\text{O}} \quad \text{équation IV-3}$$

Les teneurs élémentaires obtenues sont comparées avec les limites de détections exprimées en quantités d'atomes par volume élémentaire de plasma de taille millimétrique (volume de référence : $V_{\text{plasma}} = 5,43 \text{ mm}^3$, cf. page 95). Le tableau IV-5 liste méthodiquement et successivement le résultat des conversions pour les éléments Ca, Mg et Na.

Elément	☺ (<1) : sensibilité élémentaire de la LIBS compatible avec une seule bactérie ☹ (>1) : sensibilité élémentaire de la LIBS incompatible avec une seule bactérie	BG-1	BG-2	BG-3	Limites absolues et relatives de détection obtenues avec notre dispositif LIBS
Ca	Masse dans une bactérie (fg)	23,2	21,2	204,2	1,1
	Quantité de Ca d'une bactérie par rapport à sensibilité en Ca de la LIBS	21,1	19,3	185,6	
	Concentration relative (mg.dm ⁻³ ou ppm)	11600	10600	102100	☺☺☺
	Quantité d'atomes Ca par bactérie	2,33 10 ⁹	2,13 10 ⁹	2,05 10 ¹⁰	
	Quantité d'atomes Ca en mm ⁻³ de volume élémentaire de plasma de référence (V _{plasma} =5,43mm ³)	4,29 10 ⁸	3,92 10 ⁸	3,77 10 ⁹	2,0 10⁷
Mg	Masse dans une bactérie (fg)	6	7,4	56	20,5
	Quantité de Mg d'une bactérie par rapport à sensibilité en Mg de la LIBS	0,3	0,4	2,7	
	Concentration relative (mg.dm ⁻³ ou ppm)	3000	3700	28000	☹☹☺
	Quantité d'atomes Mg par bactérie	6,02 10 ⁸	7,42 10 ⁸	5,62 10 ⁹	
	Quantité d'atomes Mg en mm ⁻³ de volume élémentaire de plasma de référence	1,11 10 ⁸	1,37 10 ⁸	1,03 10 ⁹	3,8 10⁸
Na	Masse dans une bactérie (fg)	9	7,6	116,4	81,9
	Quantité de Na d'une bactérie par rapport à sensibilité en Na de la LIBS	0,1	0,1	1,4	
	Concentration relative (mg.dm ⁻³ ou ppm)	4500	3800	58200	☹☹☺
	Quantité d'atomes Na par bactérie	9,03 10 ⁸	7,63 10 ⁸	1,17 10 ¹⁰	
	Quantité d'atomes Na en mm ⁻³ de volume élémentaire de plasma de référence	1,66 10 ⁸	1,40 10 ⁸	2,15 10 ⁹	1,5 10⁹
K	Masse dans une bactérie (fg)	9,8	9,8	13,6	Non déterminées
	Concentration relative (mg.dm ⁻³ ou ppm)	4900	4900	6800	
	Quantité d'atomes K par bactérie	9,83 10 ⁸	9,83 10 ⁸	1,36 10 ⁹	
	Quantité d'atomes K en mm ⁻³ de volume élémentaire de plasma de référence	1,81 10 ⁸	1,81 10 ⁸	2,51 10 ⁸	
Fe	Masse dans une bactérie (fg)	13,4	11,4	0,2	Non déterminées
	Concentration relative (mg.dm ⁻³ ou ppm)	6700	5700	100	
	Quantité d'atomes Fe par bactérie	1,34 10 ⁹	1,14 10 ⁹	2,01 10 ⁷	
	Quantité d'atomes Fe en mm ⁻³ de volume élémentaire de plasma de référence	2,48 10 ⁸	2,11 10 ⁸	3,70 10 ⁶	
P	Masse dans une bactérie (fg)	46	46,4	170	Non déterminées
	Concentration relative (mg.dm ⁻³ ou ppm)	23000	23200	85000	
	Quantité d'atomes P par bactérie	4,62 10 ⁹	4,66 10 ⁹	1,71 10 ¹⁰	
	Quantité d'atomes P en mm ⁻³ de volume élémentaire de plasma de référence	8,50 10 ⁸	8,57 10 ⁸	3,14 10 ⁹	
Mn	Masse dans une bactérie (fg)	0,2	0,2	2	Non déterminées
	Concentration relative (mg.dm ⁻³ ou ppm)	100	100	1000	
	Quantité d'atomes Mn par bactérie	2,01 10 ⁷	2,01 10 ⁷	2,01 10 ⁸	
	Quantité d'atomes Mn en mm ⁻³ de volume élémentaire de plasma de référence	3,70 10 ⁶	3,70 10 ⁶	3,70 10 ⁷	

 tableau IV-5 : Comparaison des teneurs élémentaires (Ca, Mg et Na notamment) typiquement présentes dans une seule bactérie de type *Bacillus* avec les performances analytiques de notre banc expérimental LIBS

Le tableau IV-5 indique que les teneurs en élément **Ca** contenues dans une seule bactérie (modèle *Bacillus* ici) sont toujours supérieures à la sensibilité de la LIBS pour l'élément Ca. Au contraire, concernant les éléments **Mg** et **Na** pour certains échantillons bactériens individuels, les performances analytiques de la LIBS pourraient être problématiques car insuffisantes en sensibilité. Les autres éléments (**K**, **Fe**, **P** et **Mn**) n'ont pas été étalonnés. Cependant, étant données que les limites de détections de ces éléments sont typiquement de l'ordre du ppm en LIBS, nous pouvons formuler l'hypothèse que globalement la méthodologie LIBS – du moins dans le régime monopulse nanoseconde considéré – présente des limites de détection très proches, voire parfois insuffisantes pour détecter les teneurs de certains éléments présents dans une seule bactérie comme le résume la figure IV-11 pour *Bacillus globigii* :

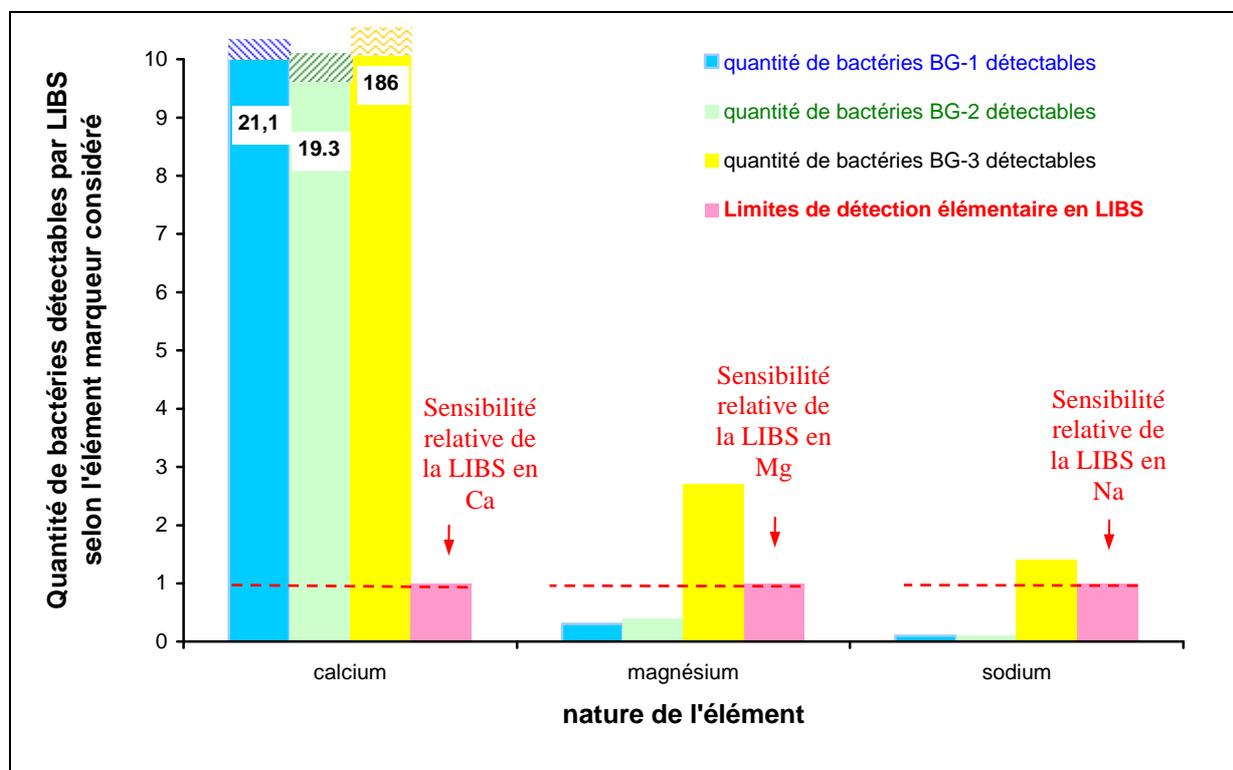


figure IV-11 : Histogramme comparant les teneurs en atomes Ca, Mg et Na composant une bactérie unique de *Bacillus globigii* de types BG-1, BG-2 et BG-3 présentes dans un plasma de volume de référence par rapport aux limites de détection exprimées en quantité d'atomes de Ca, Mg et Na présentes dans ce même plasma

A priori, cette lacune en sensibilité doit être interprétée comme une nécessité d'accumuler ou d'agglomérer si possible plusieurs bactéries dans le volume du plasma pour augmenter les quantités de matières analysées et donc amplifier les raies de marqueurs spectraux potentiels. Des procédés de filtration de bactéries initialement suspendues et prélevées dans l'air ou alors des cultures bactériennes peuvent à priori permettre d'augmenter les quantités de matériau bactérien à analyser.

IV.4. MISE AU POINT DE L'ANALYSE LIBS SUR DES MATERIAUX BACTERIENS

IV.4.1. Stratégie de développement d'une analyse LIBS représentative et adaptée aux bactéries

Nous venons d'appréhender les potentialités analytiques de la méthodologie LIBS considérée en régime monopulse nanoseconde. Les limites de détections pourraient à priori être au niveau voire inférieures aux teneurs élémentaires d'une seule bactérie. Ce constat préalable permet d'orienter la mise au point de l'analyse LIBS pour rendre représentative la détection des marqueurs de matériaux bactériens. La stratégie adoptée repose sur deux étapes :

1. La recherche de marqueurs spectraux sur des quantités importantes et homogènes de matériaux bactériens (bactéries lyophilisées sous forme de pastilles)
2. La mise à l'épreuve de ces marqueurs spectraux potentiels sur des échantillons davantage dilués en quantité de matière de façon à traiter, à terme, différents cas opérationnels (analyse de cultures bactériennes sur gélose, analyse de suspensions de bactéries aérosolisées)

IV.4.2. Recherche de marqueurs élémentaires de matériaux biologiques

La méthodologie LIBS est fondamentalement une technique de spectroscopie d'émission atomique. L'analyse des bactéries par celle-ci ne peut donc qu'essentiellement être basée sur les composés élémentaires de ces échantillons biologiques.

IV.4.2.1. Approches bibliographiques d'analyses par LIBS de matériaux biologiques sous forme massive

- Morel et al (2003) [95] : recherche de marqueurs biologiques discriminants et spécifiques d'un ensemble de bactéries par rapport à deux types de pollens. La LIBS est employée pour analyser des pastilles homogènes contenant chacune un type connu de bactérie ou de pollen. Des éléments minéraux (Ca, Na, Mg, Fe et K) et organiques (C, H, O, N, P), ainsi que des fragments moléculaires (CN et C₂) spécifiques des matériaux bactériens ont été détectés. Un observable reproductible et sélectif basé sur des rapports cumulés d'intensités de raies du carbone par rapport au phosphore permet la classification de six bactéries différentes et de deux pollens quels que soient le milieu de culture ou la souche.

Ces résultats effectués au CEB sont représentés partiellement dans ce rapport. Comme initialement suggérés à partir de l'étude sur les aérosols aqueux du chapitre précédent, les données spectrales sont exploitées de nouveau par des méthodes statistiques multivariées pour exacerber la richesse des informations spectrales disponibles à des fins de classifications des échantillons.

➤ **Miziolek et al (2003) [96] : analyse de 3 souches de *Bacillus* et d'interférents atmosphériques (pollens, poussières, etc.) sous forme de dépôts sur des membranes d'argent.** Les données LIBS (raies détectées de **Ca, Na, Mg, Fe, K, C, H, O et N**) sont exploitées par des méthodes statistiques pour mettre en évidence la richesse des informations spectrales et permettre une première classification des échantillons selon leur nature.

➤ **Kim et al 2004 [97] : analyse de souches bactériennes basée sur raies Ca et phosphate.** Kim et al étudient la composition en **Ca** et en groupements fonctionnels **phosphate** d'un ensemble de bactéries (*Bacillus thurengiensis* T34, *Escherichia coli* IHII/Pht315, *Bacillus subtilis* 168, *Bacillus megaterium* QM B1551, et *Bacillus megaterium* PV361) à l'état végétatif (1 jour de culture) puis à l'état de spores (5 jours de culture).

Lorsque les bactéries prennent la forme de spores, elles absorbent alors une quantité plus importante de calcium qui réagit avec l'acide dipicolinique. Cette substance confère aux bactéries une bonne protection face à l'environnement. Ce phénomène est observé par Kim sur la distribution des intensités des raies du calcium (393,7 et 396,9 nm) effectivement plus intenses pour les bactéries sous forme de spores.

L'observation de l'évolution de l'intensité des raies du phosphore (588,1 et 588,7 nm) lors du passage de la bactérie de l'état végétatif à l'état de spore permet de considérer les raies du phosphore comme marqueurs pour des analyses ultérieures. Cette étude montre que l'on peut distinguer différentes espèces de bactéries selon les éléments qu'elles absorbent dans leur milieu. La classification, par un diagramme à deux dimensions avec comme variables les raies normalisées les plus intenses du calcium et du phosphore des cinq souches de bactéries, démontre que la LIBS a le potentiel d'identifier les bactéries avec un minimum de préparation.

➤ **Snidder et al (2006) [98] : stratégie d'échantillonnage par impaction de bactéries selon leurs diamètres aérodynamiques et traitement du signal.** Les dépôts bactériens

homogènes sont analysés par LIBS. Les éléments détectés sont à posteriori représentatifs des composants de base des bactéries : **C, Ca, Na, Mg et K**.

- **Baudeflet et al (2006) [99] utilisent des ablations en régime femtoseconde pour analyser des bactéries *Escherichia coli* (Gram négative) et *Bacillus subtilis* (Gram positive) agglomérées sur des filtres de nitrate de cellulose.** Par rapport au régime d'ablation par un laser nanoseconde, la détection des traces élémentaires (**C, Mg, CN, Ca, C₂, Na, H, K**) est améliorée. Les raies **CN** intramoléculaires sont davantage mises en évidence par rapport au régime laser classique utilisant une pulse laser nanoseconde.

IV.4.2.2. Approches bibliographiques d'analyses par LIBS d'aérosols bactériens

- **Boiten et al (2003) [100] analysent par LIBS des grains de pollens isolés.** Des éléments minéraux (**Ca, Na, Mg, Fe et K**) et organiques (**C, H, O, N**) propres au pollen sont détectés. L'analyse par spectroscopie Raman de ces mêmes échantillons est effectuée à des fins de comparaison et d'amélioration de la classification des différents échantillons.
- **Hybl et al (2003) [101] analysent par LIBS des nuages concentrés bactériens (spores de *Bacillus* et de champignon) et les classent par analyse en composantes principales (ACP) des raies détectées.** L'adéquation de la sensibilité de la LIBS pour l'analyse des teneurs élémentaires (**Mg, Ca et Na**) contenues dans une seule particule est également démontrée.
- **Dixon et al (2005) [102] illustrent la faisabilité de la détection par LIBS d'aérosols bactériens.** Des particules bactériennes (*Bacillus*) isolées sont détectées. Des critiques sont lancées sur les limites discriminatoires de la LIBS pour identifier exactement la présence anormale d'une menace biologique : peu de marqueurs spectraux seraient accessibles (**Ca et Na**), ce qui semble cohérent à posteriori avec notre discussion sur le bilan matière d'une bactérie et le couplage de la LIBS, cf. partie IV.3 à partir de la page 141.
- **Hybl et al (2006) [85] couplent la méthode LIBS (analyse élémentaire) avec la LIF (Laser-induced fluorescence ou détection de la fluorescence induit par laser sur un échantillon vivant) pour hausser le pouvoir de discrimination.** De bons résultats sont

présentés. Quelques problèmes de détection peuvent à posteriori être liés à l'hygrométrie des particules.

Les publications et nos études préliminaires laissent entrevoir la présence de plusieurs marqueurs spectraux potentiels : **minéraux (Ca, Na, Mg, Fe et K)**, **organiques (C, H, O, N, P)**, ainsi que des **fragments moléculaires (CN et C₂)**

IV.4.3. Validation des choix d'identification d'agents biologiques sur bactéries et pollens compressés : ouverture du flacon bactérien et analyse des vacuoles

IV.4.3.1. Listes des modèles bactériens choisis

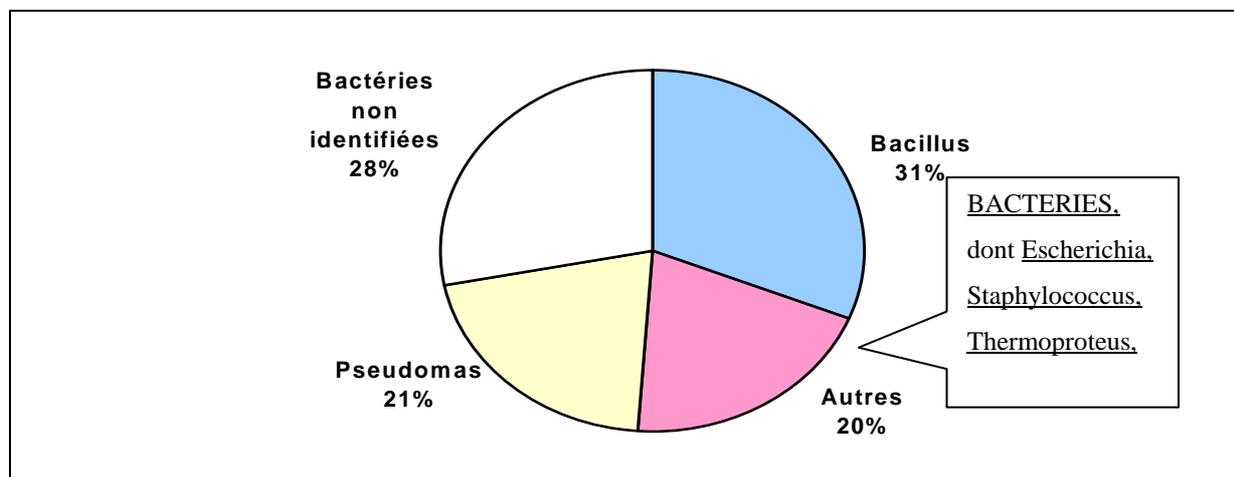


figure IV-12 : Composition en espèces microbiennes de l'air

Compte tenu de la composition de l'air ambiant en espèces bactériennes, nous avons opté pour l'analyse préférentielle d'un type de Bacillus : *Bacillus globigii*. L'étude porte également sur *Bacillus thurengiensis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*.

AGENTS PATHOGENES	SIMULANT AGENTS	NOTATION	REFERENCE DE LA SOUCHE UTILISEE	CLASSIFICATION GRAM CORRESPONDANTE
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus globigii</i> (souche n°1)	BG-1	CEB 93/0029	<i>positive</i>
	<i>Bacillus globigii</i> (souche n°2)	BG-2	DERA Porton Down « Spywood »	
	<i>Bacillus thurengiensis</i>	BT	CEB 97/0027	
	<i>Bacillus atropheus</i>	BA	CEB A1-C99	
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Escherichia coli</i>	EC	CEB D2001	<i>négative</i>
<i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	CEB-Bégin 00/114	<i>positive</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	PM	CEB-Bégin 00/116	<i>négative</i>
<i>Néant : présent dans le bruit de fond atmosphérique</i>	<i>Macrocooccus equiperfcicus</i>	ME	CEB 03/0261	<i>positive</i>

tableau IV-6 : Principaux agents pathogènes et organismes simulants correspondants. La classification de type Gram positive et négative est indiquée pour chacune des bactéries à des fins d’appréhension du type de paroi – épaisse ou fine – considérée. Une bactérie naturellement présente dans l’air ambiant est également considérée.

Nota bene : *Bacillus globigii* = *Bacillus atropheus* dans la nomenclature internationale

IV.4.3.2. Bactéries lyophilisées et compressées sous forme de pastilles homogènes

Les analyses préliminaires destinées à rechercher les marqueurs spectraux ont été effectuées sur des pastilles de bactéries lyophilisées fabriquées selon les étapes suivantes :

- **Croissance bactérienne pendant 24 heures dans une suspension liquide nutritive,**
- **Centrifugation de la suspension, lavages successifs des bactéries pour ôter le milieu de cultures,**
- **Lyophilisation des amas bactériens centrifugés** (sublimation basse température et sous vide),
- **Pastillage des lyophilisats sous forme d’amas circulaire et plan de diamètre 13 mm.**

Une presse sous vide est utilisée pour fabriquer des pastilles à partir de la poudre obtenue après lyophilisation (cf. figure IV-13). La pression appliquée est de 375 MPa pendant 5 minutes puis 750 MPa pendant 10 minutes.

Les pastilles constituent un support facilement utilisable dans le cadre de notre montage LIBS. Cependant, il n’est pas très bien adapté à l’analyse de particules biologiques dans

l'environnement : le temps de préparation des échantillons est de quelques jours, durée très longue en comparaison avec la rapidité d'analyse de la méthode LIBS. Nous verrons plus tard l'avantage de développer cette technique vers l'analyse en temps réel d'aérosol.

Cependant, les pastilles sont composées intégralement d'une même bactérie lyophilisée. Le plasma ablatera et excitera donc uniquement des bactéries. Ce protocole d'analyse est utilisé pour rechercher des marqueurs spectraux discriminants des bactéries tout en s'affranchissant des interférents (matrice, milieu de culture, etc.). Le volume ablaté est quantifiable : un nombre précis d'atomes issus des bactéries peut donc être analysé. Cette remarque peut permettre d'appréhender la sensibilité de la technique LIBS.

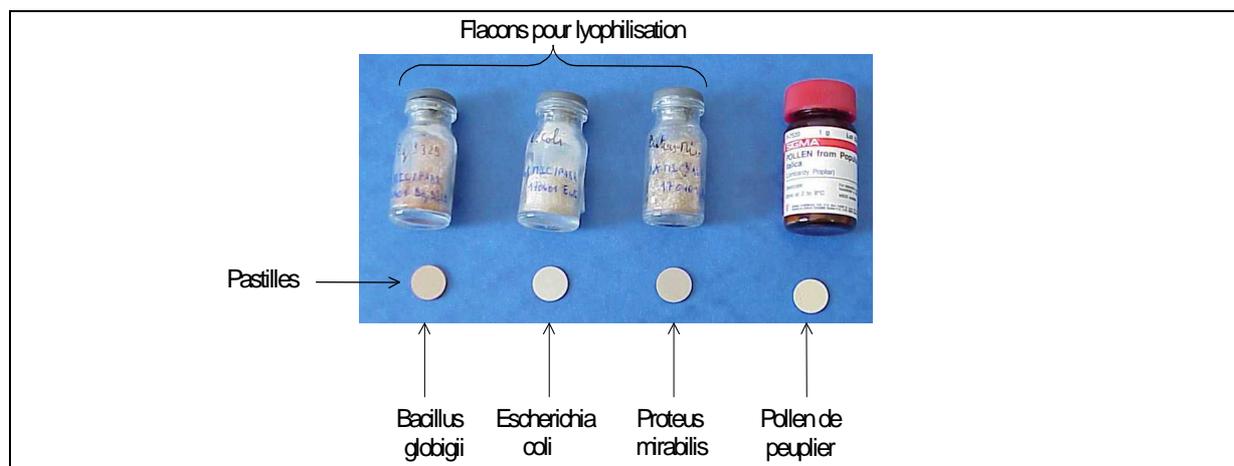


figure IV-13 : Exemple de pastilles de diamètre 13 mm et d'épaisseur 2 mm (bactéries et pollen)

IV.4.4. Mise au point de l'analyse LIBS de bactéries : ouverture du flacon bactérien

IV.4.4.1. Conditions d'acquisition

Dans cette partie, les pastilles bactériennes sont analysées selon les paramètres suivants :

- Laser Quantel Brilliant avec faisceau de diamètre égal à 8 mm et d'énergie valant 100 mJ
- Distance focale de la lentille : 130 mm – Distance point focal/surface (FTSD) : 0 mm
- Densité énergétique au niveau du plan point focal : **$3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$**
- Distance fibre optique/surface : 0mm (sur surface) – Distance fibre optique/plasma : 5 mm
- Spectromètre Mechelle + détecteur iCCD : Gain maximal (255), délai : 1 μs , durée 20 μs

IV.4.4.2. Balayage spectral

L'empreinte spectrale de la souche n°1 de *Bacillus globigii* a été réalisée entre 200 nm et 880 nm à l'aide du spectromètre doté du réseau de type Echelle et de la fibre optique HCG1000. Le

spectre obtenu en Figure IV-14 : correspond à l'accumulation de 2 tirs sur une même position d'une pastille de *Bacillus globigii* (souche BG-1).

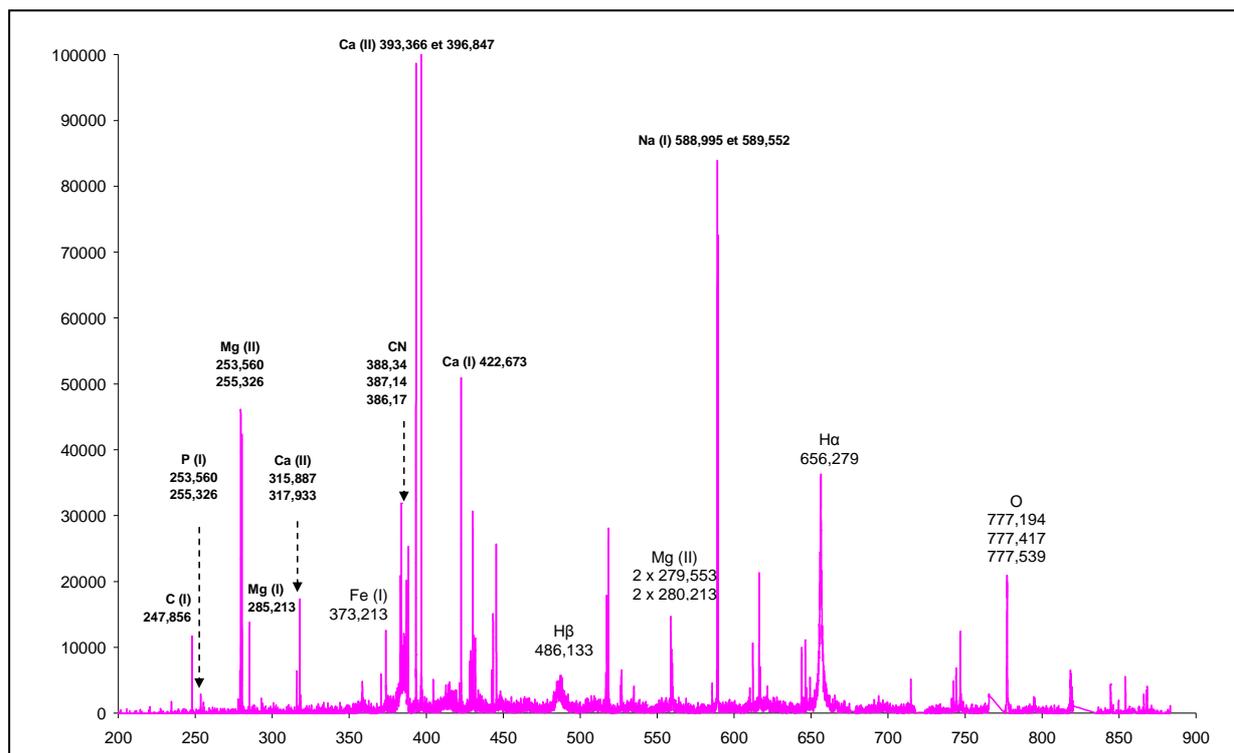


Figure IV-14 : Spectre à large bande (200 nm à 900 nm) obtenue simultanément par le réseau Echelle après analyse LIBS d'une pastille homogène de *Bacillus globigii* (souche BG-1) – Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s

Grâce au réseau large bande de type Echelle, les éléments constituant les bactéries compressées sous forme de pastilles homogènes sont simultanément détectés. Pour une meilleure lecture des raies composant l'empreinte spectrale des bactéries, le spectrogramme large bande est décomposé en fenêtres réduites.

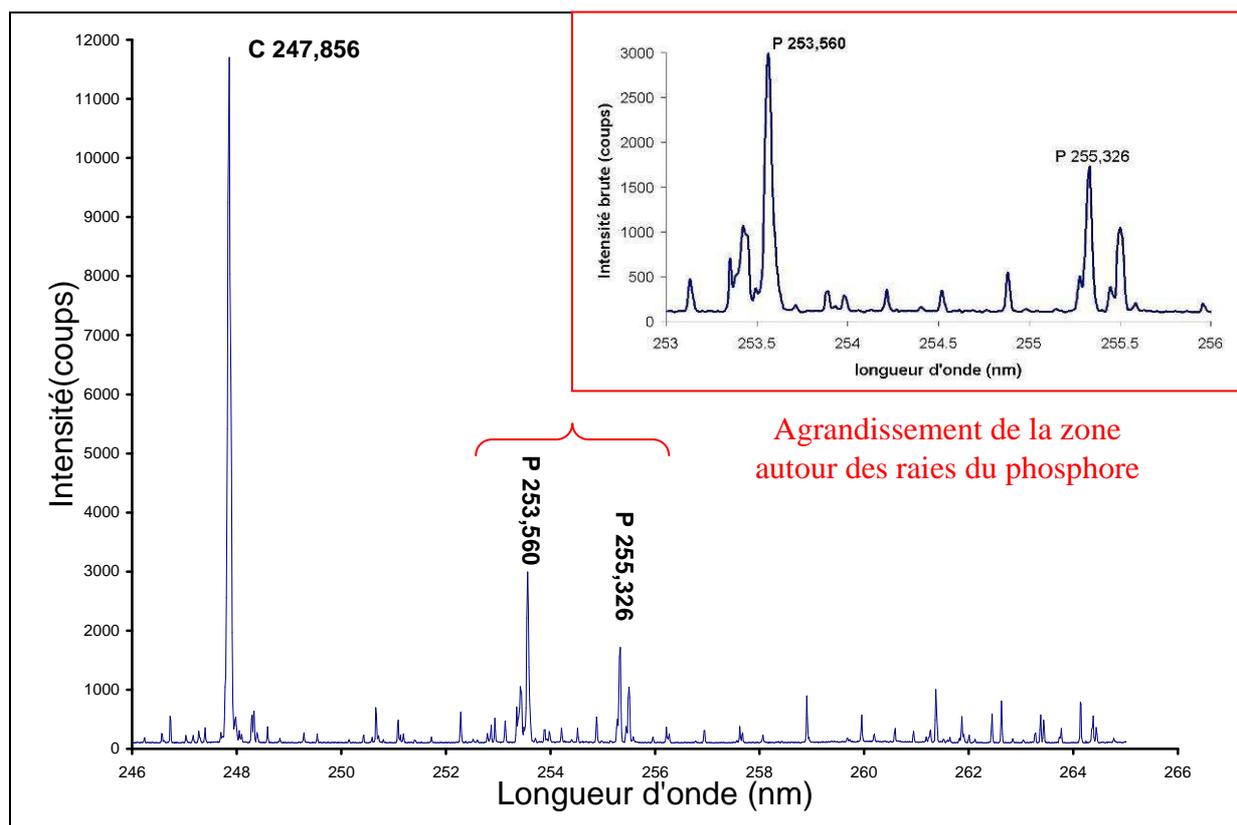


figure IV-15 : Fenêtre spectrale 246 à 264 nm présentant les raies du carbone C et du phosphore P pour *Bacillus globigii* (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s

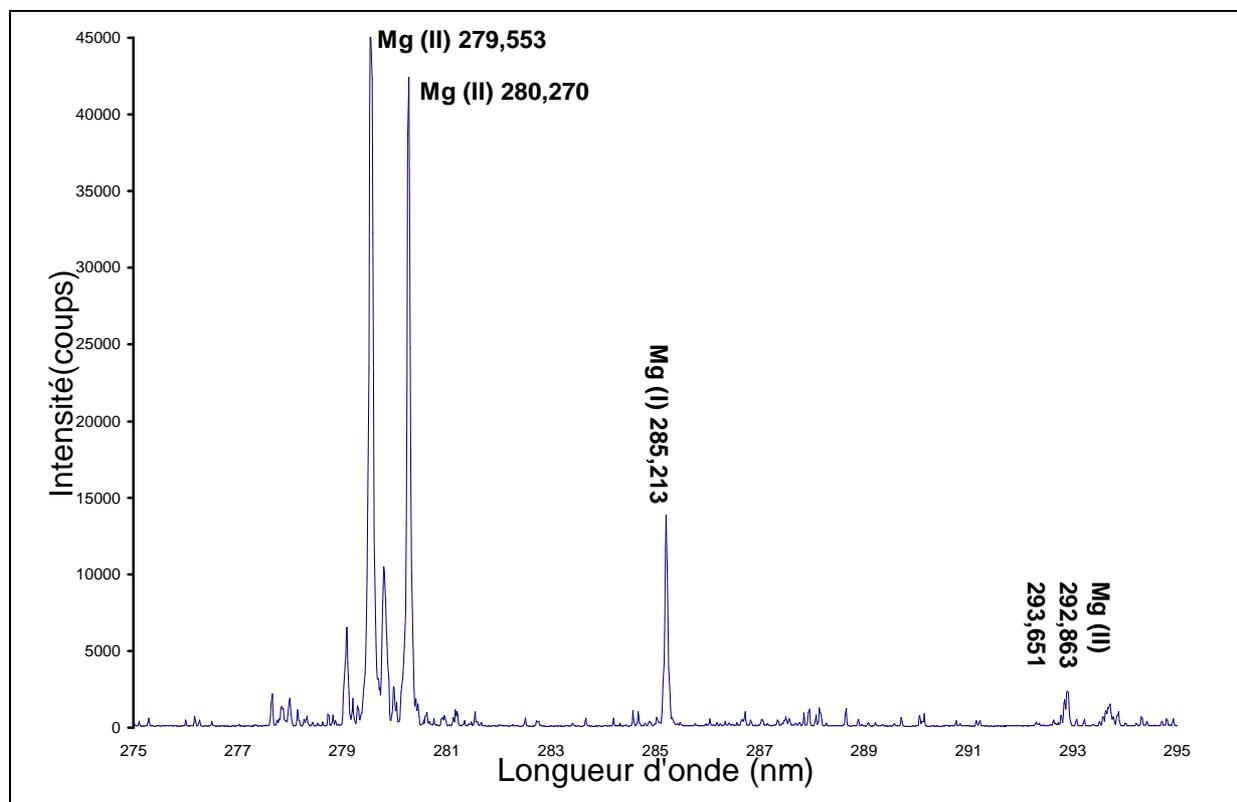


figure IV-16 : Fenêtre 275-295nm des raies ioniques et atomiques du Mg pour *Bacillus globigii* (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s

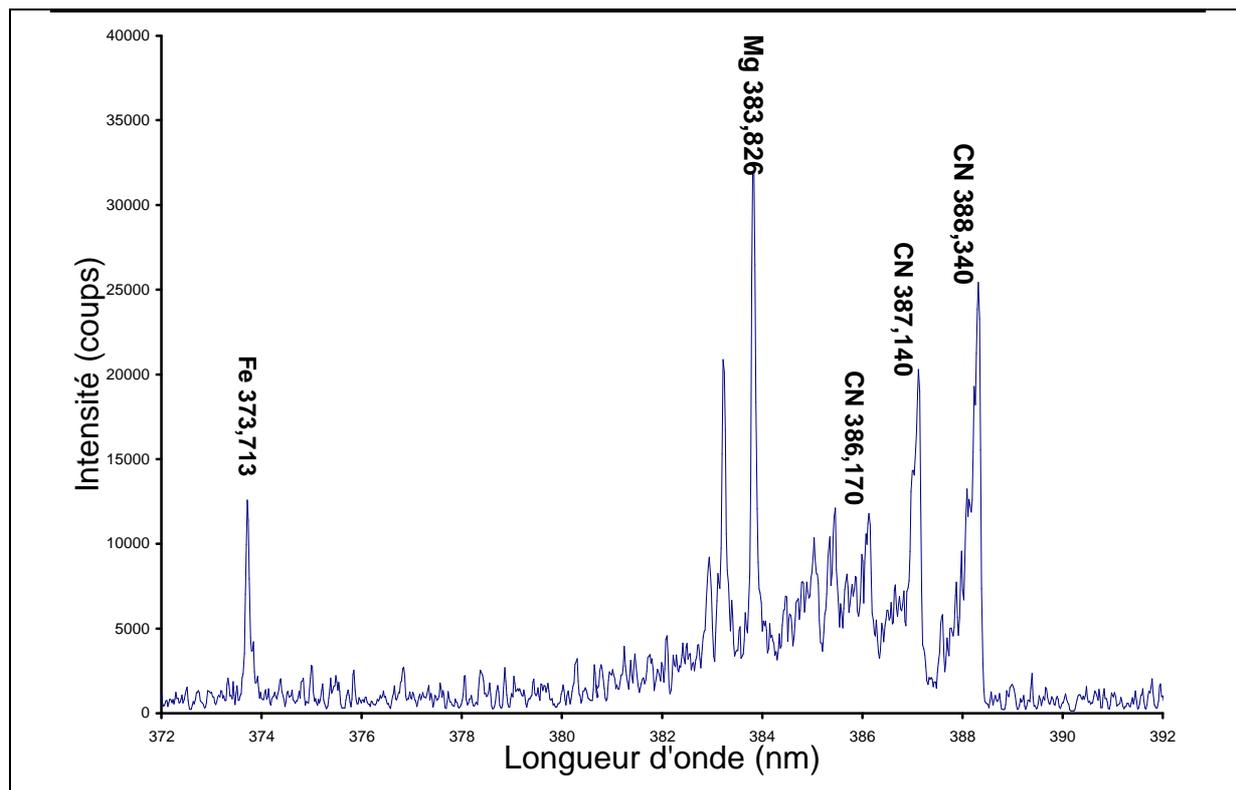


figure IV-17 : Fenêtre spectrale 372 à 392 nm présentant les raies du fer Fe, du magnésium Mg et les fragments moléculaires des bandes violettes CN pour *Bacillus globigii* (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s

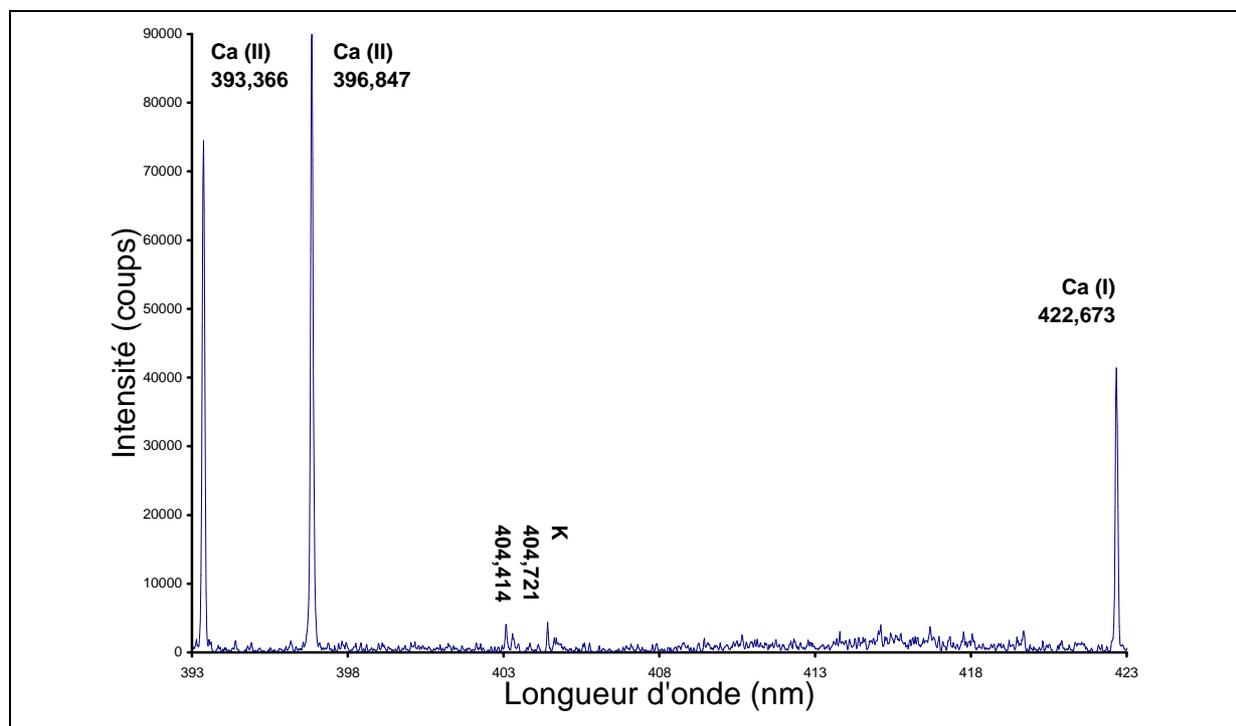


figure IV-18 : Fenêtre spectrale 393 à 423 nm présentant les raies ioniques (II) et atomiques (I) du calcium Ca et les raies atomiques du potassium K pour *Bacillus globigii* (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s

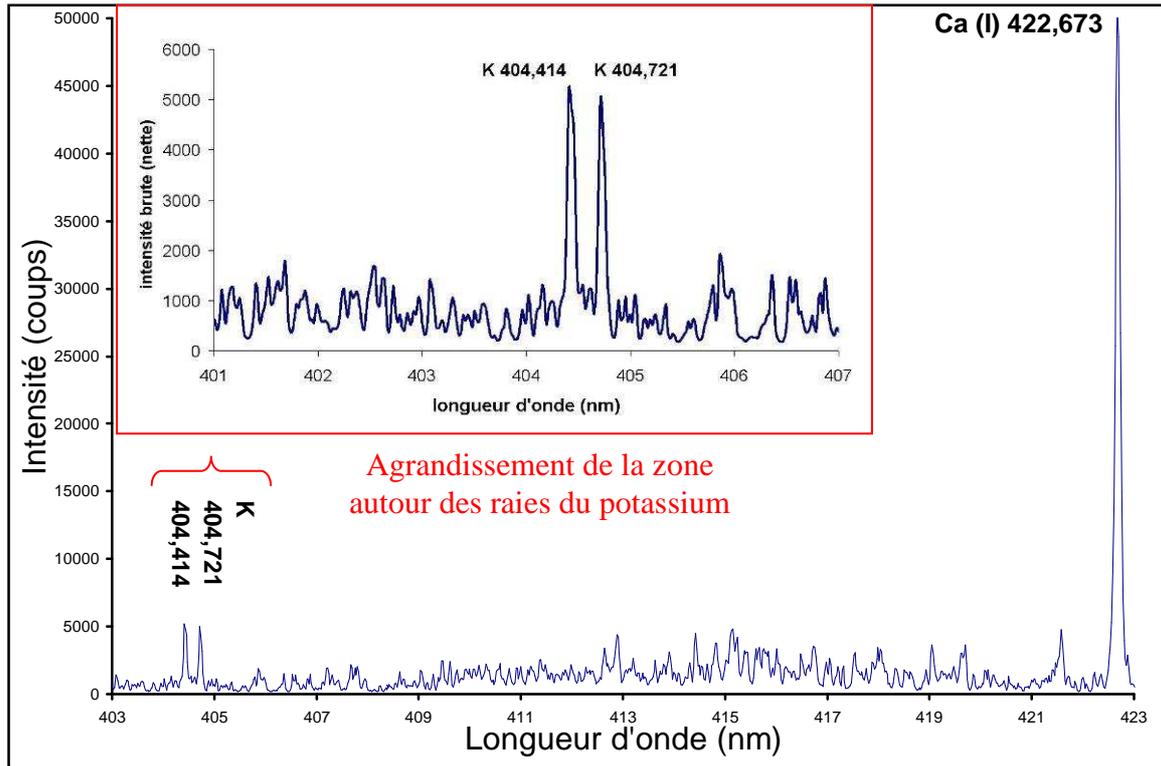


figure IV-19 : Fenêtre spectrale 403 à 423 nm présentant les raies du potassium K et de nouveau le calcium Ca pour *Bacillus globigii* (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s

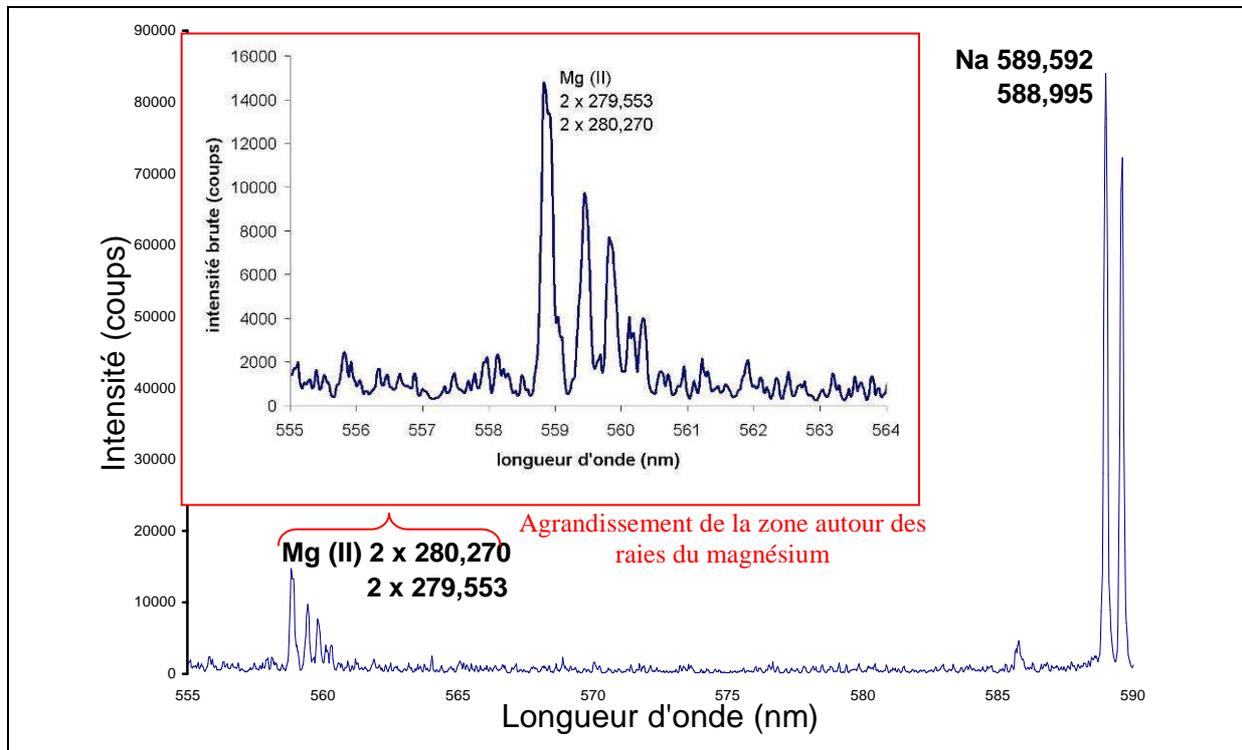


figure IV-20 : Fenêtre spectrale 555 à 590 nm présentant les raies du sodium Na et de nouveau les raies à l'ordre n°2 du magnésium Mg pour *Bacillus globigii* (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s

La nature des raies détectées avec le spectromètre à réseau Echelle est en total accord avec les analyses LIBS effectuées par S. Morel, N. Leone *et al.* [95] sur ces mêmes pastilles bactériennes avec le monochromateur THR1000 sur des fenêtres spectrales réduites. Pour obtenir une largeur spectrale aussi importante (de 200 à 900 nm en une seule acquisition), il était cependant nécessaire de multiplier les expériences LIBS car chaque spectrogramme présentait une largeur spectrale de 40 nm.

Désormais, les résultats obtenus lors du balayage spectral vont être corrélés avec les informations fournies par la littérature à propos de la composition des bactéries. Parmi les éléments détectés, on peut distinguer deux types : les raies atomiques ou ioniques et les raies moléculaires.

IV.4.4.3. Détection de marqueurs spectraux de natures minérale et organique

Le tableau IV-7 recense de façon non exhaustive les raies des espèces élémentaires et moléculaires détectées grâce au balayage spectral illustré par la Figure IV-14 de la page 153 :

<i>Eléments minéraux détectés et longueurs d'onde correspondantes</i>		<i>Eléments organiques détectés et longueurs d'onde correspondantes</i>		<i>Raies moléculaires détectées et longueurs d'onde correspondantes</i>	
Mg	<i>Atomique : 285,213 nm Ionique : 279,553 nm ; 280,270 nm ; 292,863 nm ; 293,651 nm</i>	C	<i>Atomique : 247,856 nm</i>	Bandes violettes CN	388,34 nm ; 387,14 nm ; 386,17 nm
Na	<i>Atomique : 588,995 nm ; 589,552 nm</i>	N	<i>Atomique : 588,995 nm ; 589,552 nm</i>		
Fe	<i>Atomique : 373,713 nm</i>	P	<i>Atomique : 253,560 nm ; 255,326 nm</i>		
K	<i>Atomique : 404,414 nm ; 404,721 nm ; 766,490 nm ; 769,896 nm</i>	H	<i>H_α 656,279 nm H_β 486,133 nm</i>		
Ca	<i>Atomique : 422,673 nm Ionique : 393,366 nm, 396,847 nm</i>				

tableau IV-7 : Liste non exhaustive des raies des éléments minéraux et organiques typiquement détectées dans les bactéries telles que *Bacillus globigii* par LIBS

IV.4.4.4. Corrélation entre les éléments minéraux détectés et les structures bactériennes

Aux vues des résultats du tableau IV-7, les éléments **Mg, Na, Fe, K et Ca** sont potentiellement utilisables pour la caractérisation des bactéries. A priori Na et Ca sont présents dans l'atmosphère, ce qui pourrait empêcher leur utilisation comme identifiant des bactéries.

A la lumière de l'inventaire de la structure des bactéries (cf. parties IV.2.2.3, page 135 et IV.2.2.4 à la page 137), la présence de **calcium** et de **magnésium** semble étroitement liée à la nature des parois bactériennes car ces éléments – sous leur forme de cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} - sont des composants majoritaires des parois dans le cas des bactéries Gram négative (telles qu'*Escherichia coli*) et des espèces Gram positive comme *Bacillus globigii*. Les éléments **sodium** et **potassium** participent également activement à l'activité métabolique notamment pour la régulation de la pression osmotique interne (cf. page 133).

Intuitivement, l'observation de ces éléments peut également laisser suggérer que le plasma est si robuste énergétiquement que les parois bactériennes sont ouvertes et que les composants internes aux bactéries (cytoplasme, etc.) sont bien analysés. Une vérification quantifiée sera cependant effectuée par la suite.

IV.4.4.5. Corrélation entre les éléments organiques détectés et les structures bactériennes

Les raies des éléments organiques C, N, P, H sont détectés comme illustré par la Figure IV-14. Le carbone atomique est intéressant pour l'analyse en tant que marqueur organique. Le **phosphore** est lui aussi remarquable car sa concentration dans une bactérie reste stable.

De façon comparable au paragraphe précédent, le fait d'observer le phosphore présent dans le cytoplasme des bactéries est une manière de remarquer que le plasma vaporise à posteriori à la fois les composants externes (parois) et internes (cytoplasme) pour une analyse représentative de toute la structure bactérienne.

IV.4.4.6. Corrélation entre les fragments moléculaires CN détectés et les structures bactériennes

La région spectrale 345-445 nm illustrée par la figure IV-17 en page 155 témoigne de **raies moléculaires de type CN**, appelées également raies violettes. A priori, l'observation des raies CN serait justifiée sachant que dans toute structure vivante comme les bactéries, les molécules clés de la vie – ADN, ARN, ATP – sont constituées d'acides aminés basés sur des fonctions amines ($-NH_2$) qu'engendre des raies CN.

IV.4.4.6.1. Résumés de résultats obtenus sur l'exploitation des raies CN

Il est établi qu'en périphérie du plasma les fragments moléculaires excités de type C_2^* réagissent avec l'azote excité N_2^* de l'air ambiant pour donner des fragments CN^* émettant des raies caractéristiques détectées en LIBS. D'après Portnov *et al* [103] [104], les raies d'émission C_2^* sont majoritairement issues de la décomposition des noyaux aromatiques contenant des carbones insaturés. Les liaisons simples C-C contribuent de façon moindre par rapport à une même quantité de carbones de cycles aromatiques. Portnov *et al* ont mis en évidence le lien entre les variations d'intensité de la bande de C_2 et le nombre de cycles aromatiques de la molécule.

St-Onge *et al* [105] démontrent que les intensités des raies CN sont proportionnelles au nombre de liaisons C_2 présentes dans la molécule avec une contribution plus importante de liaisons C_2 conjuguées issues de cycles aromatiques par rapport à des liaisons simples C-C. Cela indique que les raies CN proviennent de combinaisons entre liaisons « CC » (selon leur présence : contributions majoritaires des liaisons C_2 multiples, rôles minoritaires des C_2 simples) et l'azote de l'air selon l'équation IV-4 :



équation IV-4

Les raies CN – essentiellement témoins indirects de la présence de liaisons simples ou multiples CC – seraient ainsi difficilement utilisables pour la détection d'espèces biologiques caractérisées par la présence d'acides aminés contenant des fonctions amines –CNH–.

IV.4.4.6.2. Vérification expérimentale de l'origine des raies CN en régime LIBS nanoseconde

S. Morel *et al.* [95] discutent du rôle des raies CN observées par LIBS. Un résumé des résultats est présenté ci-dessous. Différentes molécules organiques ont été mises sous forme de pastille. Les paramètres d'analyses par spectroscopie de plasma induit par laser sont les suivants :

- Energie du pulse : 100 mJ
- Distance focale de la lentille : 130 mm – Distance point focal/surface (FTSD) : 0 mm
- Distance fibre optique/plasma : 5 mm – Distance fibre optique/surface : 0 mm
- Nombre de tirs par série : 10 – Nombre de séries : 5
- Spectromètre Echelle + iCCD Andor
- Délai d'acquisition de chaque plasma se relaxant : 1 μ s – Durée d'acquisition : 20 μ s

IV.4.4.6.3. Rôle des liaisons CC simples et doubles – rôle des liaisons intramoléculaires C-N

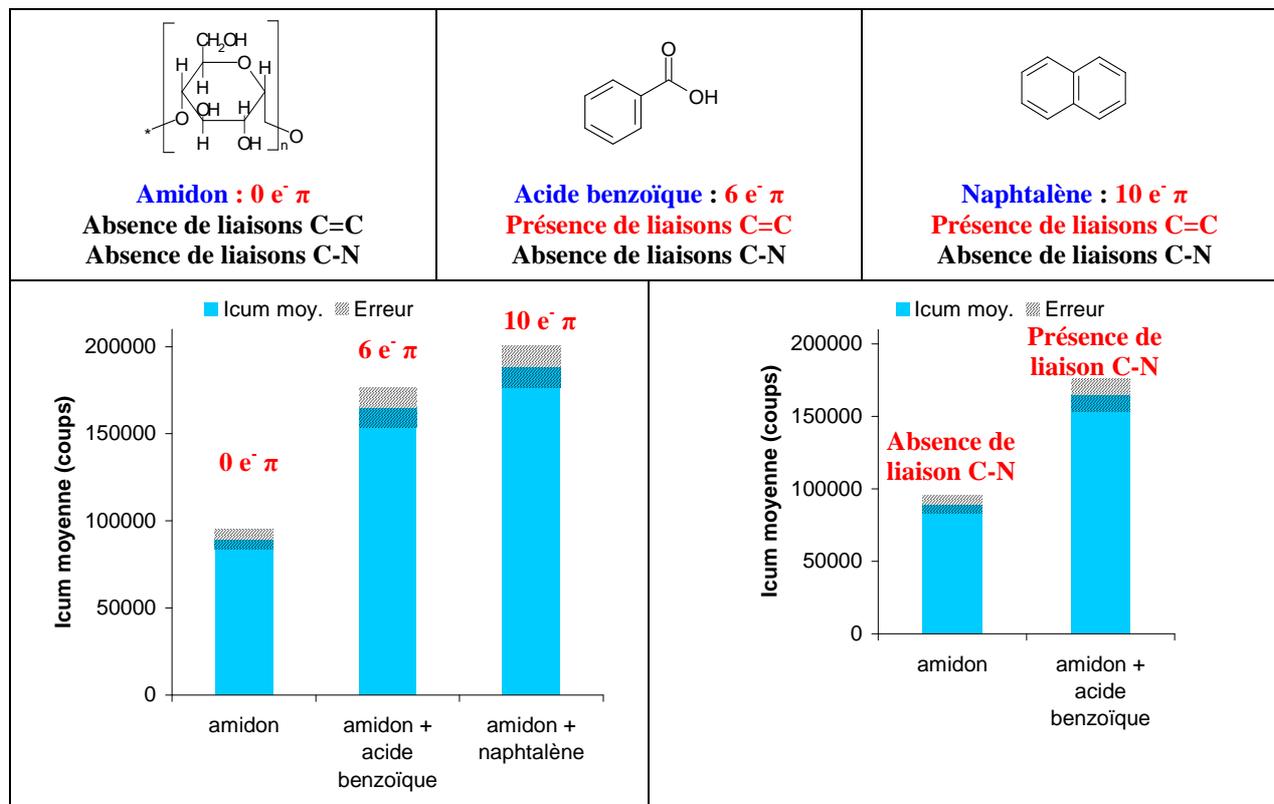


figure IV-21 : Moyenne sur 5 séries de la différence d'intensité des bandes CN à 387,140 nm et 386,170 nm, cumulée après 10 tirs sur des pastilles d'amidon pur, d'amidon enrichi à 10% en acide benzoïque et d'amidon enrichi à 10% en naphtalène

figure IV-22 : Moyenne sur 5 séries de la différence d'intensité des bandes CN à 387,140 nm et 386,170 nm, cumulée après 10 tirs sur des pastilles d'amidon pur et d'amidon enrichi à 10% en glycine

○ Rôle des raies C-C et C=C

Sur la figure IV-21 est représentée l'intensité d'une raie CN en fonction de différents mélanges de molécules préparées avec des quantités égales en carbone : amidon, amidon+acide benzoïque et amidon+naphtalène. Le nombre de liaisons C=C des cycles, provenant de l'acide benzoïque ou du naphtalène, joue un rôle direct sur l'intensité des raies :

→ **Les liaisons C=C de type aromatique sont, elles, à l'origine d'une formation importante de fragments CN par l'intermédiaire des fragments C₂.** La présence des raies CN en proportion importante est ici directement liée à la structure des bactéries constituées par de multiples groupements carbonés souvent cycliques tels que dans les parois comme illustrées dans la partie IV.2.2.3, page 135.

○ **Rôle des raies C-N**

Le mécanisme de formation des CN, dans le cas des carbones saturés (comme dans l'amidon), est différent de celui des carbones conjugués (comme dans le naphthalène). Au contraire et comme l'illustre la figure IV-22, la présence de liaisons CN, comme par exemple au sein d'une molécule de glycine, n'influence pas l'intensité des raies CN.

→ Les raies CN ne pourront donc pas être utilisées comme marqueurs de la concentration en aminoacides dans la bactérie. Les liaisons simples C-N intramoléculaires ne jouent pas un rôle majeur dans l'émission des bandes violettes CN. Des vérifications peuvent être entreprises en analysant les pastilles organiques sous atmosphère ne contenant pas d'azote (sous vide ou sous argon par exemples).

En conclusion, l'utilisation des raies CN en tant que marqueur organique est très délicate : au sein d'un organisme vivant, la variété organique est encore trop grande pour réussir à démêler l'écheveau. Par contre, il peut constituer un outil de marquage énergétique du plasma et de ce fait permettre une normalisation du rapport pulse laser – température du plasma produit. Cet aspect est abordé dans la partie IV.4.5.2, page 163.

IV.4.4.6.4. Perspectives du régime LIBS femtoseconde pour caractériser les CN intramoléculaires

Récemment, Baudalet *et al.* [99] ont précisé l'origine des structures contribuant à l'émission des raies CN en utilisant un laser Nd:YAG délivrant des pulses femtosecondes et non nanosecondes. Le plasma induit par un régime d'ablation de type femtoseconde permet une ablation plus douce en terme de température et d'effets thermiques par rapport aux pulses nanosecondes classiquement employés (cf. partie I.4.2.4, page 36), ce qui entraîne une minimisation de l'excitation des raies atmosphériques, et au contraire une exacerbation des raies intrinsèques des matériaux ablatés. Par ce mode, des bactéries *Escherichia coli* (Gram négative) et *Bacillus subtilis* (Gram positive) agglomérées sur des filtres de nitrate de cellulose sont analysées par LIBS. Par rapport au régime d'ablation par un laser nanoseconde, la détection des traces élémentaires est améliorée et les raies CN intramoléculaires sont davantage mises en évidence. L'inconvénient majeur réside dans le coût des lasers pulsés femtosecondes récemment disponibles et moins éprouvés que les classiques laser pulsés Nd:YAG.

IV.4.5. Choix et justification d'une observable spectrale reproductible

IV.4.5.1. Utilisation d'une somme de rapports d'intensités de raies

Le but des investigations menées par S. Morel *et al.* [95] était de pouvoir observer des caractéristiques intrinsèques aux matériaux biologiques à l'aide des marqueurs spectraux pour établir une discrimination des bactéries analysées. Pour cela, des rapports d'intensités cumulées (RIC) furent utilisés pour constituer des données observables relativement stables du fait du faible pourcentage d'erreur (écart type) observé d'une expérience à une autre.

$$\text{RIC} = \sum_{i=4}^{10} \left(\frac{I_a}{I_b} \right)_i \quad \text{équation IV-5}$$

a représente l'élément d'intérêt et **b** l'élément de référence. Un rapport d'intensité a été privilégié en utilisant une raie du carbone comme élément majoritaire pour la référence (autour de 50%). Comme rappelé dans les premiers chapitres de ce rapport, l'erreur (écart type) est diminuée lorsqu'on considère les rapports d'intensité plutôt que les intensités intrinsèques. La sélection des fenêtres spectrales étudiées devra tenir compte du fait que deux raies caractéristiques de l'échantillon (par exemple P et C) devront apparaître sur une même fenêtre pour être exploitables (cf. figure IV-15) : l'emploi du spectromètre Echelle est en ce sens adapté, contrairement au monochromateur de largeur spectrale limitée à quelques dizaines de nm selon le type de réseau holographique employé.

La figure IV-23 illustre la reproductibilité de l'observable RIC issue de 10 tirs sur une même position de l'échantillon. En ce sens, l'usage du monochromateur fournissant des spectrogrammes de largeurs spectrales réduites est un désavantage par rapport au spectrographe de type Echelle permettant l'obtention simultanée d'une large bande spectrale (de 200 à 1000 nm).

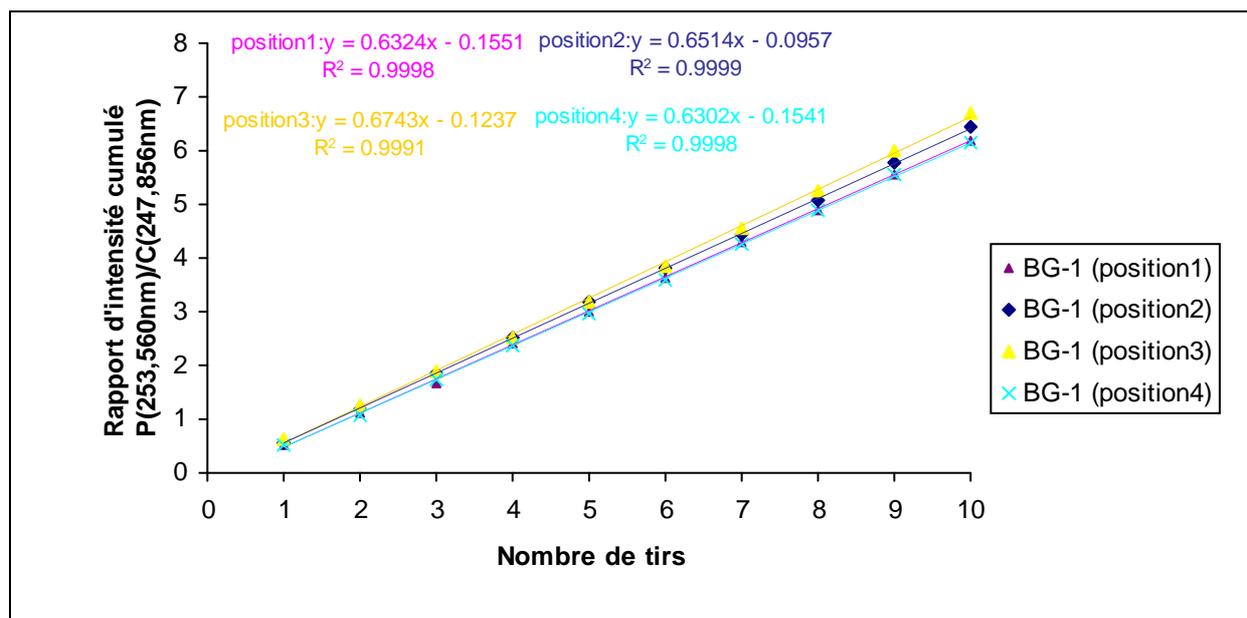


figure IV-23 : Evolution des rapports d'intensités de P/C (RIC P/C) cumulés sur 10 tirs sur une même position (un rapport par tir) pour 4 différentes positions d'une pastille de *Bacillus globigii* n°1. Paramètres LIBS : énergie de pulse=100 mJ, délai avant acquisition=1 μ s, durée d'acquisition=20 μ s

Les précédents résultats ont montré que le rapport d'intensités cumulés (RIC) de type P/C représentait un observable reproductible (faible erreur) et discriminante pour un ensemble d'échantillons (ici 6 bactéries et 2 pollens) comprimés sous forme de pastilles homogènes.

IV.4.5.2. Justification de la reproductibilité de l'observable choisie en terme d'indicateur thermique

Le critère RIC s'avère particulièrement bien adapté à la morphologie des échantillons préparés sous la forme de pastilles planes et homogènes car uniquement constituées de lyophilisat d'une bactérie connue. Pour valider la pertinence de cet observable, il faut vérifier que les différentes valeurs calculées pour les RICs obtenus eux-mêmes depuis la mesure d'intensités de raies d'intérêt cumulées sur plusieurs tirs sont étroitement liées à la nature intrinsèque des échantillons et non à une fluctuation de la température du plasma entre chaque tir laser.

Pour cet objectif, nous calculons indirectement les valeurs de la température T de chaque plasma dans une série de 10 tirs effectués pour chaque pastille bactérienne. Avec l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique local, l'expression de Boltzmann relie l'intensité I_{raie} d'une raie d'émission à la température d'excitation T_{exc} selon l'équation IV-6 suivante :

$$I_{Raie} = g_i A_i \lambda_i \exp\left(-\frac{E_i}{k_b T_{exc}}\right) \quad \text{équation IV-6}$$

avec g_i le facteur de dégénérescence, A_i la probabilité de transition, λ_i la longueur d'onde de transition, E_i l'énergie de l'état supérieur, k_b la constante de Boltzmann ($k_b=8,62 \cdot 10^{-5} \text{ eV.K}^{-1}$) et T_{exc} la température du plasma donnée à un certain délai. En utilisant le rapport de deux raies d'émission I_{Raie1} et I_{Raie2} , on obtient l'équation IV-7 :

$$\frac{I_{\text{Raie2}}}{I_{\text{Raie1}}} = \frac{g_2 A_2 \lambda_2}{g_1 A_1 \lambda_1} \cdot \exp\left(\frac{1}{k_b} \left(\frac{E_1 - E_2}{T}\right)\right) \quad \text{équation IV-7}$$

Le rapport de deux intensités des raies 2 et de 1 est ainsi globalement proportionnel à un terme de type exponentiel relié à (E_1-E_2/T_2) car tous les autres facteurs sont constants. La température d'excitation T est estimée par l'intensité de raies d'émission de type CN obtenues par analyse LIBS d'une pastille de bactérie *Bacillus globigii* (BG-1) :

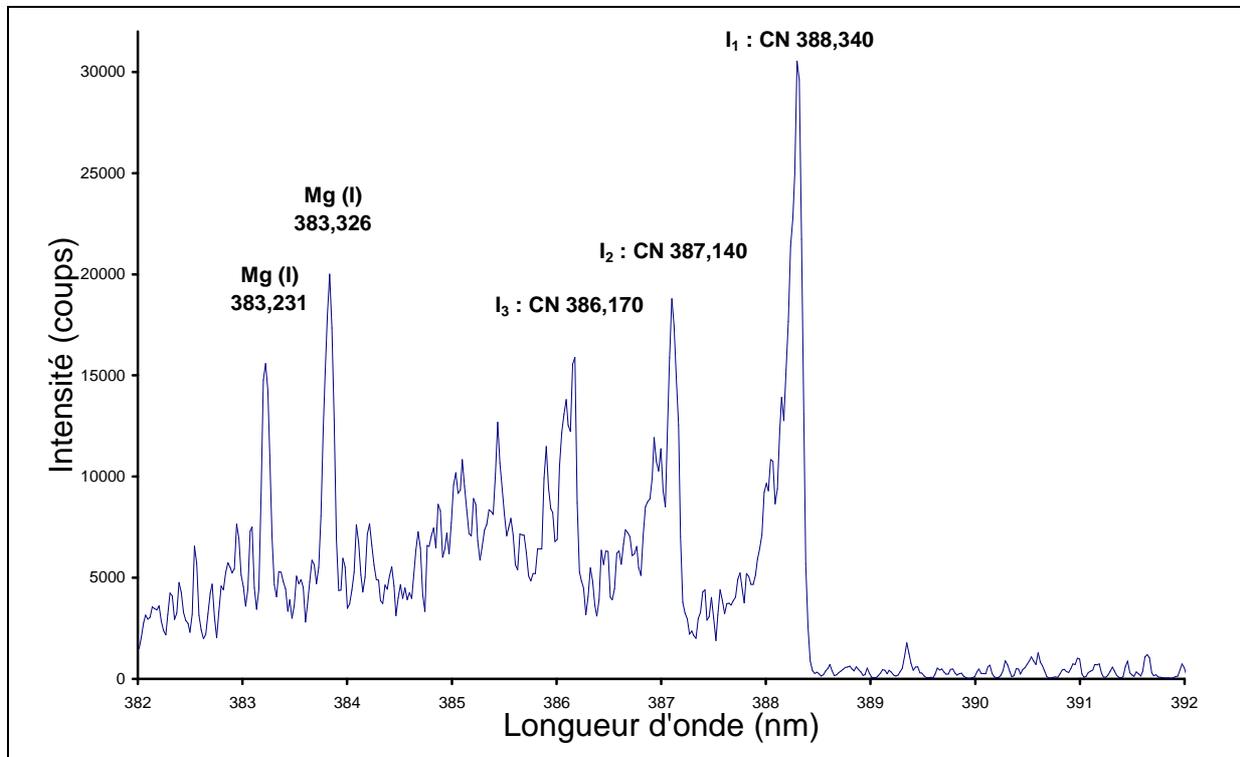


figure IV-24 : Visualisation des têtes de bandes des bandes violettes moléculaires CN. Spectre issu de la formation d'un seul plasma (tir n°4 parmi une série de 10 tirs effectués sur une même position) sur une pastille de *Bacillus globigii* (souche n°1). Paramètres LIBS : énergie de pulse = 100 mJ, délai avant acquisition = 1 μ s, durée d'acquisition = 20 μ s

Le tableau IV-8 liste les rapports d'intensités de raies basées sur les raies CN mesurées pendant la durée d'ouverture de l'obturateur du détecteur iCCD. Une série de 10 plasmas est effectuée sur une même position. Le 4^{ème} tir est considéré pour les calculs.

Composition des pastilles	I ₁ CN (λ=388,340nm)	I ₂ CN (λ=387,140nm)	I ₃ CN (λ=386,170nm)	I ₁ /I ₂	I ₂ /I ₃
Amidon	89220	71977	63046	1,24	1,14
Glycine	86426	69701	60615	1,24	1,15
Amidon + Acide maléique	72464	58837	52254	1,23	1,13
Amidon + Glycine	81000	64783	57149	1,25	1,13
Amidon + Ac. Benzoïque	133788	108151	91668	1,24	1,18
Amidon + Naphtalène	146087	122707	103823	1,19	1,18

tableau IV-8 : Calculs des rapports d'intensités de raies CN après 1 μs de relaxation pour démontrer la reproductibilité de la température des plasmas induit par laser

L'obtention de rapports constants d'intensités de raies CN (cf. valeurs des rapports I₁/I₂ et I₂/I₃) est directement reliée à la stabilité de la température T pour les trois raies considérées. Ce fait confirme expérimentalement la reproductibilité de la température des plasmas induits. En combinant cette reproductibilité thermique à la reproductibilité en taille des plasmas induit par les lasers de type Nd:YAG, chaque plasma constitue bien un milieu robuste qui permet d'ablater une quantité finie de matière.

Pour information, la valeur de la température T_{plasma} du plasma après 1 μs de relaxation du plasma est estimée à environ **9500 K** en utilisant la relation de Boltzmann sur les raies de l'hydrogène. Durant cette première microseconde, la température aurait atteint un maximum d'environ 20000 K avant de se relaxer. **L'annexe V renseigne sur deux méthodes de calculs de la température d'excitation des raies d'émissions : méthode de Boltzmann sur les raies du cuivre, utilisation d'un logiciel comparant les profils théoriques et expérimentaux des bandes CN.**

Les quantités ablatées étant alors identiques, le critère RIC est directement dépendant de la concentration calibrée. Cette remarque confirme l'importance de la maîtrise de l'interaction plasma-matière pour obtenir une analyse représentative de cette dernière sous toute forme (surface homogène des pastilles bactériennes, surface hétérogène des couches bactériennes sur gélose, particules d'aérosols bactériens suspendus et captés par le plasma).

IV.4.5.3. Vérification de l'ouverture du flacon bactérien et de l'analyse des vacuoles

Les éléments détectés par la LIBS sur les pastilles bactériennes semblent à la fois liés aux éléments majoritairement présents dans le cytoplasme bactérien (comme **Na**) et à ceux constituant en grande partie les parois externes (**Mg**, **Ca**, **C** des cycles carbonés via les raies **CN**, etc.). Le spectre large bande de la Figure IV-14 de la page 153 liste ces éléments.

Pour vérifier la robustesse énergétique de chaque plasma permettant à la fois de vaporiser et d'exciter les constituants externes (parois) et internes (cytoplasme) de chaque bactérie, nous

avons étudié l'évolution du rapport d'intensités des raies CN et Na en supposant que les raies CN renvoient aux constituants externes de la bactérie et les Na au cytoplasme interne. Comme illustré par la figure IV-25, les rapports d'intensité des raies CN/Na sont reproductibles comme le prouve la relation linéaire obtenue en accumulant les rapports. Cela indique que chaque plasma est suffisamment robuste pour analyser l'ensemble des constituants de chaque bactérie.

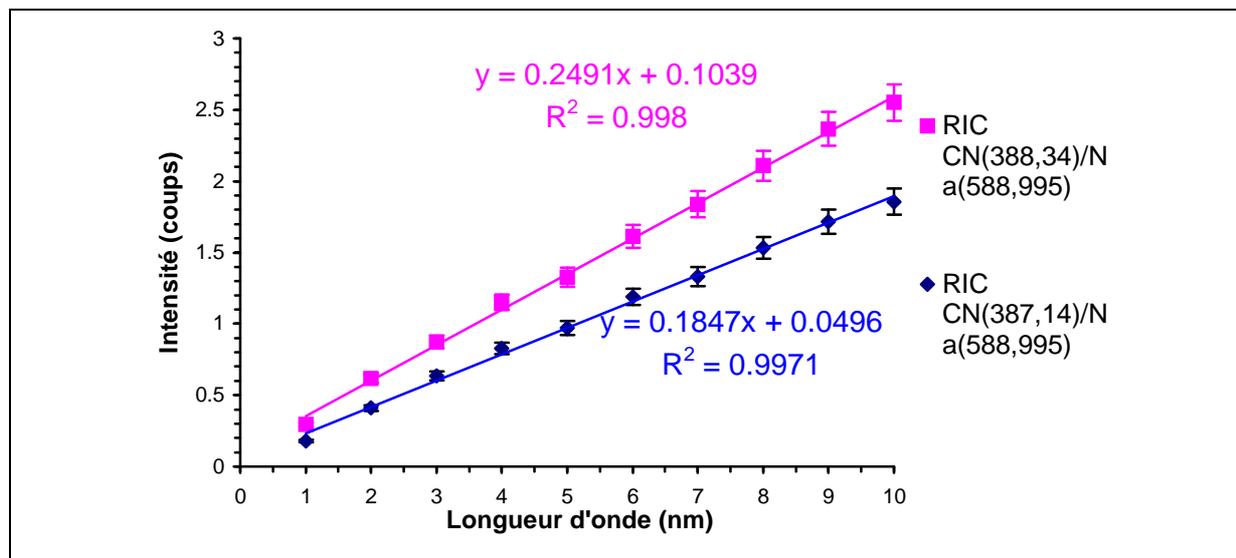


figure IV-25 : Evolution des rapports d'intensités cumulés basés sur les raies CN et Na (RIC CN/Na) obtenues après 10 tirs sur *Bacillus globigii* souche n°1. Paramètres LIBS : énergie du pulse laser = 100 mJ, délai avant acquisition = 1 µs, durée de l'acquisition = 20 µs

IV.4.6. Validation de l'observable pour discriminer les échantillons bactériens

Plusieurs rapports de raies – **P(253,560nm)/C(247,856nm)** ; **P(253,560nm)/Mg(285,213nm)** ; **C(247,856nm)/Mg(285,213nm)** – ont été mesurés sur deux pastilles de *Bacillus globigii* souche 1 (**BG-1a** et **BG-1b**) préparées selon le même protocole (souche, milieu de culture, conditions de croissance et pastillage identiques) mais à un an d'intervalle pour étudier l'influence du temps. Pour cet objectif et comme illustré par la figure IV-26 de la page 167, les spectrogrammes large bande fournis par le réseau Echelle permettent d'obtenir aisément les intensités de raies utilisées dans les RIC.

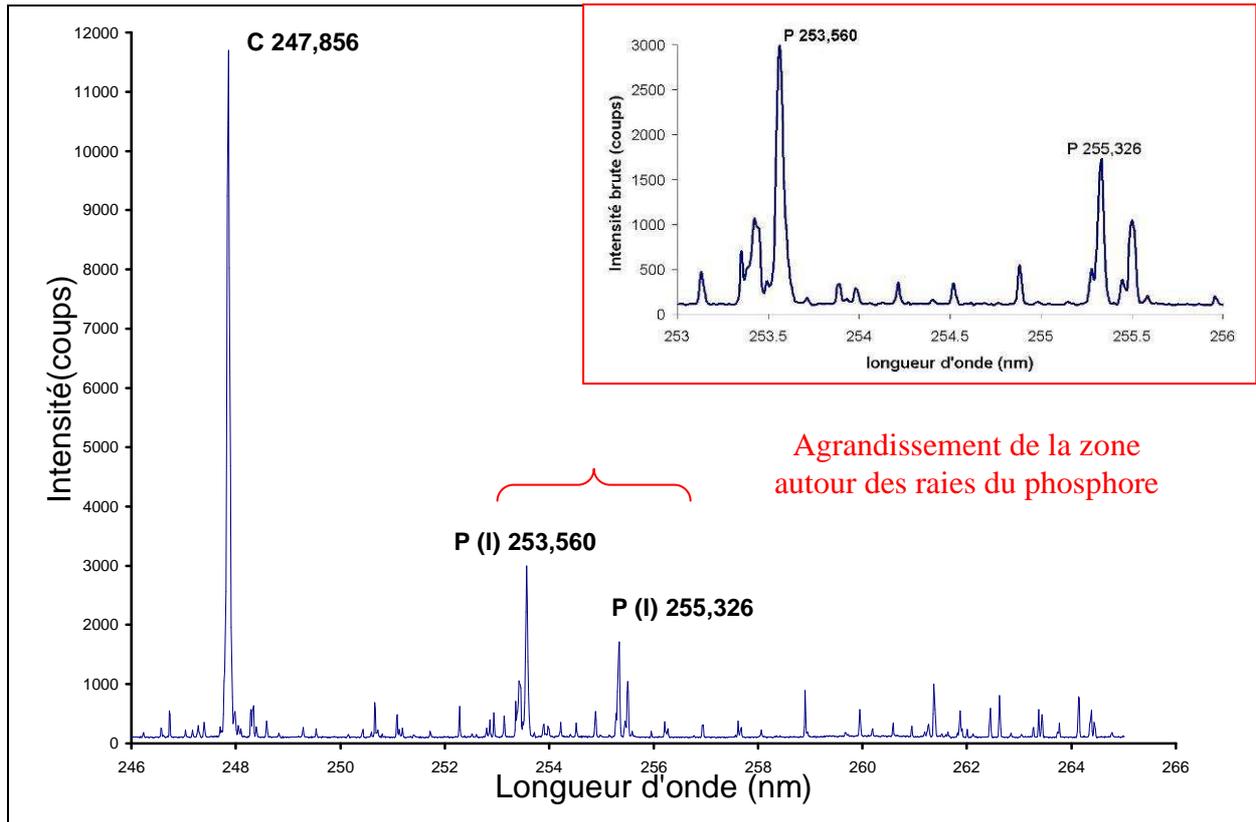


figure IV-26 : Fenêtre spectrale 246 à 264 nm présentant les raies du carbone C et du phosphore P pour *Bacillus globigii* (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse = 100 mJ, délai avant acquisition = 1 μ S, durée d'acquisition = 20 μ s

On constate à la lecture des 3 graphiques ci-dessous que le rapport P/C fournit des résultats reproductibles d'un échantillon à l'autre tandis que l'introduction du magnésium dans le rapport est une source de non reproductibilité. Ces résultats confirment la stabilité de la concentration en phosphore dans la cellule bactérienne.

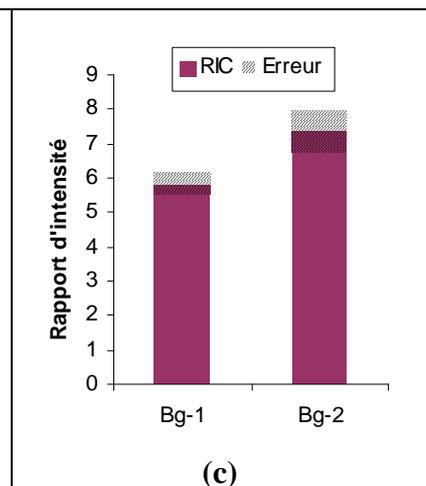
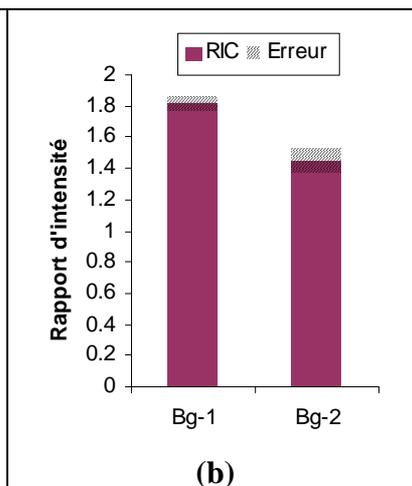
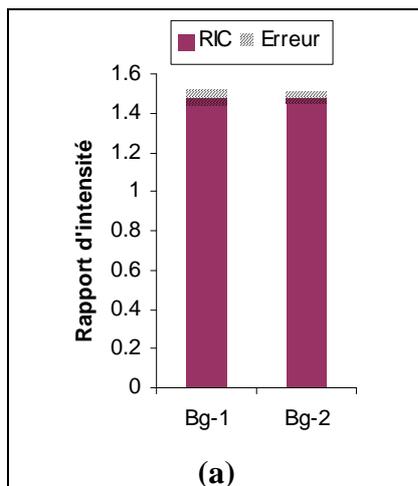


figure IV-27 : Histogramme des RIC des raies P(253,560nm) par rapport à C(247,856nm) entre deux pastilles de BG-1

figure IV-28 : Histogramme des RIC des raies P(253,560 nm) par rapport à Mg(285,213 nm) entre deux pastilles de BG-1

figure IV-29 : Histogramme des RIC des raies C(247,856 nm) par rapport à Mg(285,213nm) entre deux pastilles de BG-1

Le rapport d'intensité cumulé (RIC) P/C est implicitement relié à la protéine d'ATP de la bactérie puisque le carbone (pris comme référent interne) et le phosphore sont observables pour les bactéries. Le rapport P/C est donc spécifique d'une espèce.

IV.4.7. Influence de la nature milieu nutritif sur le choix de l'observable

Pour valider ce choix nous avons qualifié l'influence du milieu de culture sur la composition des bactéries et par conséquent sur les rapports d'intensités cumulées. Deux pastilles de *Bacillus globigii* souche 1 ont été analysées, l'une constituée de bactéries issues d'un milieu de culture à dominante organique (2YT), l'autre à dominante minérale.

<i>Milieu de culture organique (2YT)</i> (pour 1 litre)	<i>Milieu de culture minéral</i> (pour 1 litre)
16g de Bactotryptone 10g d'extrait de levure (yeast extract) 5g de NaCl H ₂ O déionisée qsp 1 litre	0,3g de MgSO ₄ .7H ₂ O 1g de NH ₄ Cl 4g de NaNO ₃ 0,150g de CaCl ₂ 5g de glucose

tableau IV-9 : Composition des deux milieux de cultures utilisés pour une même culture initiale de *Bacillus globigii* souche 1 avant lyophilisation et pastillage

La figure IV-30 confirme que montre que le RIC P/C est identique pour les deux milieux de culture. Cette constatation valide une fois de plus l'utilisation des rapports d'intensités P/C cumulés pour la détection et l'identification de bactéries.

Par contre, l'utilisation de la raie du magnésium se révèle encore une fois non appropriée (cf. figure IV-31). En effet, la présence dans le milieu minéral d'une grande proportion d'ions Mg²⁺ provoque une augmentation notable de cet ion au sein de la bactérie : la bactérie assimile davantage de ce type de nutriment car il est disponible en grande quantité dans son environnement. L'assimilation de P semble au contraire limitée et régulée, ce qui peut expliquer sa constance dans une bactérie qui autorégule ses concentrations en P et K d'après la littérature (lutte contre la pression osmotique). Ce phénomène s'est reproduit aussi avec le calcium où la concentration dans le milieu minéral est plus importante.

Une fois de plus, **le RIC P/C reste reproductible** quelque soit le milieu de culture des bactéries (cf. figure IV-30) : ce critère peut être considéré comme un élément discriminant pour les matériaux biologiques. La bactérie se comporte comme une membrane filtrant préférentiellement les nutriments disponibles mais conservant toujours des quantités constantes de P. En effet, en connaissant le rapport P/C d'une espèce donnée, il est possible d'établir une discrimination brute.

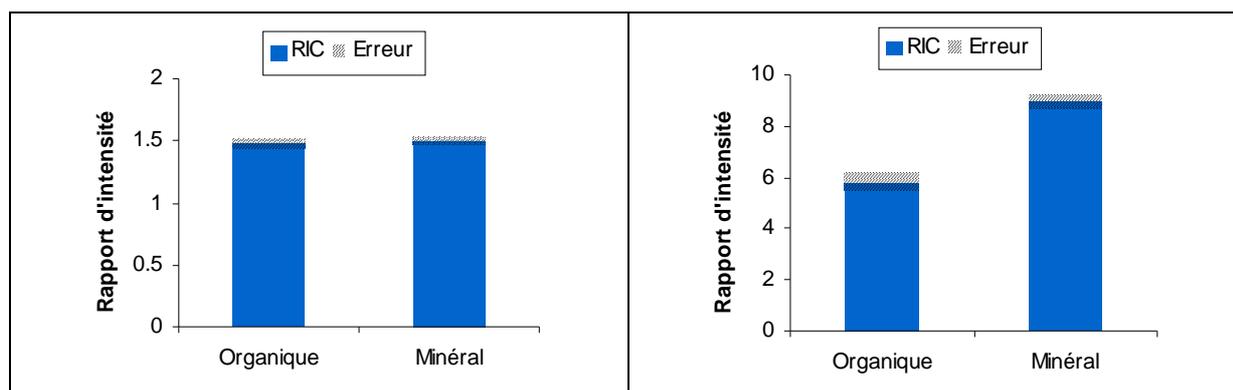


figure IV-30 : Histogramme des RIC des raies P(253,560nm) par rapport à C(247,856nm) pour des cultures d'un même *Bacillus globigii* dans un milieu organique et dans un milieu minéral

figure IV-31 : Histogramme des RIC des raies Mg(285,213nm) par rapport à C(247,856nm) pour des cultures d'un même *Bacillus globigii* dans un milieu organique et dans un milieu minéral

IV.4.8. Sélectivité de l'observable

Pour vérifier ceci, les rapports d'intensités cumulées P/C ont été calculés et comparés pour les six espèces bactériennes – listées dans le tableau IV-6, page 151 – et deux types de pollen, orme (**Sigma P-8020, lot 59C0597**) et peuplier (**Sigma P-7520, lot 33H0058**) mis sous pastille de façon analogue aux bactéries pour estimer la perturbation de l'environnement sur l'identification de bactéries. La composition chimique du contenu vivant du pollen est assez singulière. La fraction azotée, importante (16 à 40% du poids sec du pollen), est constituée pour moitié d'acides aminés, parmi lesquels figurent les vingt acides aminés universellement présents dans les cellules vivantes. Les résultats des calculs sont regroupés sur la figure IV-33. A l'exception des deux souches de *Bacillus globigii* d'une part, et des souches *Bacillus thurengiensis* et *Escherichia coli* d'autre part, nous pouvons observer que les rapports d'intensités cumulées (RIC) P/C des diverses espèces – bactéries et pollens – montrent des différences notables qui conduisent à leur discrimination effective parmi les matériaux considérés. La constance du RIC P/C peut être également observée sur d'autres bactéries et constitue donc une donnée observable discriminante dans le cadre de la détection des agents biologiques par LIBS.

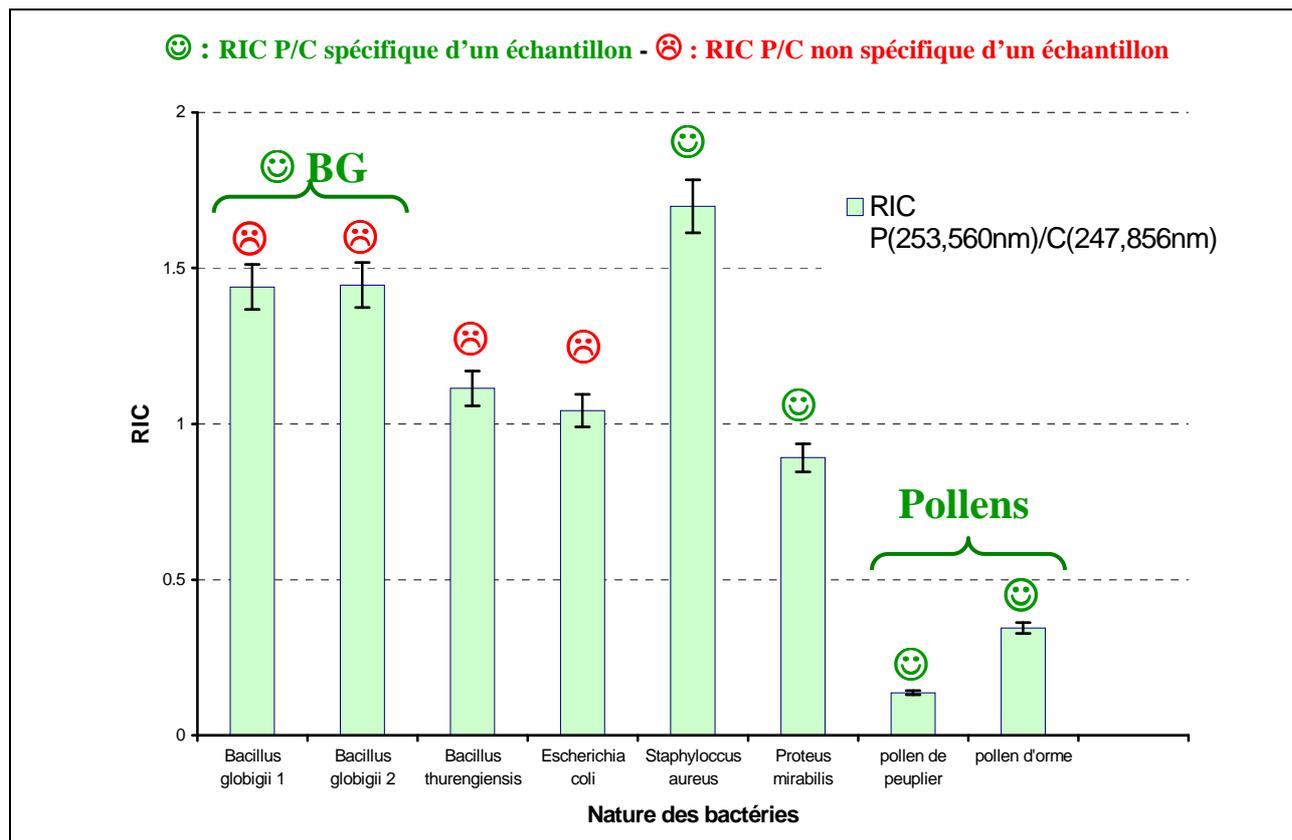


figure IV-32 : Comparaison des rapports d'intensités cumulés de la raie du phosphore à 253,560 nm par rapport à celle du carbone à 247,856 nm pour différentes bactéries dont deux souches de BG. Paramètres LIBS : pulse de 100 mJ. Paramètres temporels : délai avant acquisition = 1 μ s et durée de l'acquisition = 20 μ s

IV.4.9. Limites du critère choisi et perspectives d'améliorations proposées

IV.4.9.1. Utilisation d'un second observable avec un RIC basé sur K/C

L'emploi d'un observable simple et basé sur un rapport d'intensités cumulées (RIC) permet de classer un ensemble limité d'échantillons : 4 bactéries parmi six et deux pollens échantillonnés. Des limites peuvent cependant être établies rétrospectivement sur l'emploi d'un tel critère RIC tant sur l'exhaustivité de son pouvoir discriminant que sur les conditions pratiques de son utilisation. Sans remettre en cause les RIC lesquels corréleront étroitement les variations d'intensités intrinsèques à la nature des échantillons analysés (bactérie ou pollen), l'emploi de cette observable ne peut se faire que s'il est possible de multiplier les tirs laser sur une même position : cela nécessite d'avoir suffisamment de matière à échantillonner. Cela est vrai pour les pastilles comprimées générées en laboratoire. Cependant dans un cas opérationnel, les échantillons auront plutôt la forme de très fines colonies bactériennes sur gélose ou bien se

présenteront sous forme de particules d'aérosols ayant une forme isolée, en suspension ou filtrée sur membrane. Ainsi, la matière à détecter sera disponible en faible quantité en comparaison avec le cas des pastilles compressées.

Enfin, le RIC considéré jusqu'à maintenant est basé sur l'utilisation de deux raies, ici P à 253,553 nm et C à 247,856 nm. Or, les spectrogrammes utilisés – le monochromateur ou mieux le spectromètre Echelle – fournissent une multitude de raies d'émission toutes étroitement et intrinsèquement liées à la nature de l'échantillon analysé.

A ce titre et en utilisant la richesse des spectrogrammes issus du réseau Echelle pour l'analyse des pastilles bactériennes, un second RIC est considéré avec les intensités de la raie du potassium K à 404,414 nm (cf. spectre détaillé de la figure IV-19, page 156) par rapport à celle du carbone à 247,856 nm. Le premier RIC P/C est également repris (cf. spectre détaillé de la figure IV-15, page 154).

Les résultats sont compilés sur la figure IV-33 laquelle permet de comparer et de préciser les potentialités de classification des bactéries sous forme de pastille selon la valeur des RICs de P/C et K/C.

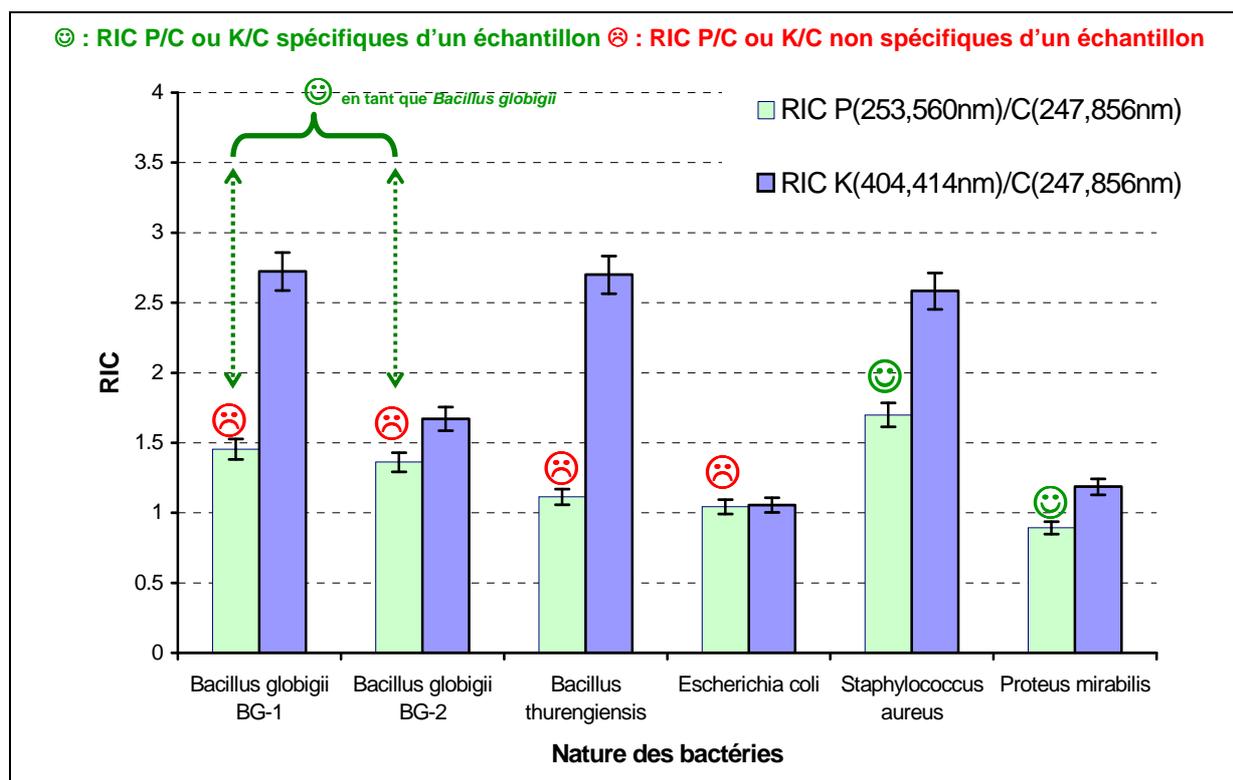


figure IV-33 : Comparaison de deux rapports d'intensités cumulés (RIC) des raies du phosphore à 253,560 nm et du potassium à 404,414 nm par rapport à celle du carbone à 247,856 nm pour différentes bactéries dont deux souches de BG. Sauf indication tous les échantillons bactériens ont été cultivés dans un milieu identique.

Paramètres LIBS : 10 pulses de 100 mJ. Paramètres temporels : délai avant acquisition = 1 µs et durée de l'acquisition = 20 µs

IV.4.9.2. Ebauche d'un traitement des données multivariées

Deux observables sont désormais étudiés : les RICs de P/C et de K/C.

➤ Classification selon le RIC de P/C

La différenciation de la plupart des échantillons bactériens selon leur nature est confirmée grâce à l'utilisation du RIC P/C. Même si le RIC P/C n'est pas spécifique entre les deux *Bacillus globigii* de souches différentes (BG-1 et BG-2, cf. tableau IV-6, page151), nous pouvons noter que BG-1 et BG-2 forme eux-mêmes un groupe de *Bacillus globigii* avec un RIC spécifique par rapport aux autres échantillons.

➤ Classification selon le RIC de K/C

L'introduction du RIC K/C apparaît moins discriminant que le RIC basé sur P/C. Les RIC K/C de *Bacillus globigii* BG-1, *Bacillus thurengiensis* et *Staphylococcus aureus* ne sont pas spécifiques. Au contraire, les trois autres bactéries se distinguent par des RICs K/C spécifiques. Le RIC de K/C malgré son caractère moins discriminant que P/C permet cependant de préciser et d'améliorer la classification des différentes bactéries étudiées : il permet ainsi de différencier les 2 types de *Bacillus globigii* présentant des RIC P/C similaires mais des RIC K/C distincts. Pour les deux raisons citées et en s'inspirant des exploitations statistiques de la richesse spectrale de toutes les raies d'émissions constituant des données multivariées établie dans le chapitre III concernant la classification des aérosols aqueux, il est décidé à nouveau d'exploiter les données spectrales obtenues par LIBS sur les pastilles bactériennes et de pollen.

IV.4.10. Discrimination par analyse multivariée des données spectrales

IV.4.10.1. Motivations d'emplois de méthodes de traitements statistiques des données spectrales

Dans le précédent chapitre, l'emploi inédit d'une méthode statistique telle que l'analyse en composantes principales (ACP) a permis de classifier des microgouttelettes selon la nature de la solution multiélémentaire calibrée utilisée pour les générer. Chaque microgouttelette était analysée par un seul plasma lequel, après analyse spectroscopique, fournissait un unique spectrogramme large bande regroupant des marqueurs spectraux caractéristiques des composants de chaque particule.

L'idée est reprise ici pour une application sur chacun des plasmas générés sur les pastilles à base de bactéries ou de pollen. L'étude de la température de chacun des plasmas (cf. partie IV.4.5.2, page163) a montré la robustesse énergétique et la reproductibilité de ces derniers. L'utilisation d'un plasma calibré en terme d'énergie et de dimensions est justifiée pour vaporiser et exciter une particule d'aérosol aqueux.

Ces modèles sont intégrés dans des logiciels dédiés de calculs déjà employés au CEB dans d'autres techniques analytiques. L'ACP peut constituer une voie de recherche prépondérante dans notre étude car cette méthode permet une discrimination effective à partir des informations obtenues en LIBS Il faut cependant déterminer quelles sont les informations discriminantes.

IV.4.10.2. Applications à la classification des pastilles bactériennes par analyse en composantes principales

IV.4.10.2.1. Préparation des données

Les données brutes issues des précédentes expériences sont traitées par la méthode non prédictive de l'analyse en composantes principales (ACP) pour tenter d'observer une classification des spectres selon la nature de l'échantillon analysé.

Etant donnée la quantité trop importante des observables disponibles (intensités nettes de raies d'émission associée à sa longueurs d'onde) dans les spectrogrammes large bande Echelle obtenus (supérieure à 25000 intensités de raie liée à une longueurs d'onde composant les pixels d'un spectrogramme) contrairement au 1024 observables des spectrogrammes issus du monochromateur à bande spectrale réduite, il est nécessaire de réduire le nombre d'observables pour des considérations de calculs informatiques. Il est décidé d'appliquer l'ACP sur des régions spectrales larges 10 nm englobant chacune les 14 raies d'émission d'intensités les plus importantes et extraites des spectrogrammes Echelle :

<i>Elément</i>	<i>Longueurs d'onde (nm)</i>
C	247,856
P	253,560 ; 255,326
Ca	393,366 ; 396,847
Mg	279,553 ; 280,270
Na	588,995 ; 589,552
K	766,490 ; 769,896
Fe	373,713
CN	388,34 ; 387,14

tableau IV-10 : Liste des observables spectrales sélectionnées pour les calculs des composantes principales de l'analyse en composantes principales (ACP)

Dès lors que cette sélection d'observables spectrale est établie, nous considérons les mêmes séries d'analyses LIBS précédentes pour 4 types de pastilles bactériennes précédemment considérées (*Bacillus thurengiensis* BT, *Staphylococcus aureus* SA, *Proteus mirabilis* PM, *Escherichia coli* EC) et 2 espèces de pollens (orme et peuplier). Pour chaque type de pastille, nous traitons 2 séries de 10 tirs sur une même position par série, soient 20 spectres par nature d'échantillon selon les mêmes paramètres décrits en page 152. Les intensités nettes des 14 longueurs d'onde d'intérêt pour chacun des échantillons sont rassemblées sous la forme d'une matrice avec en ligne les 14 intensités nettes relevées pour les observables en colonnes.

IV.4.10.2.2. Représentation des spectres dans l'espace des composantes principales

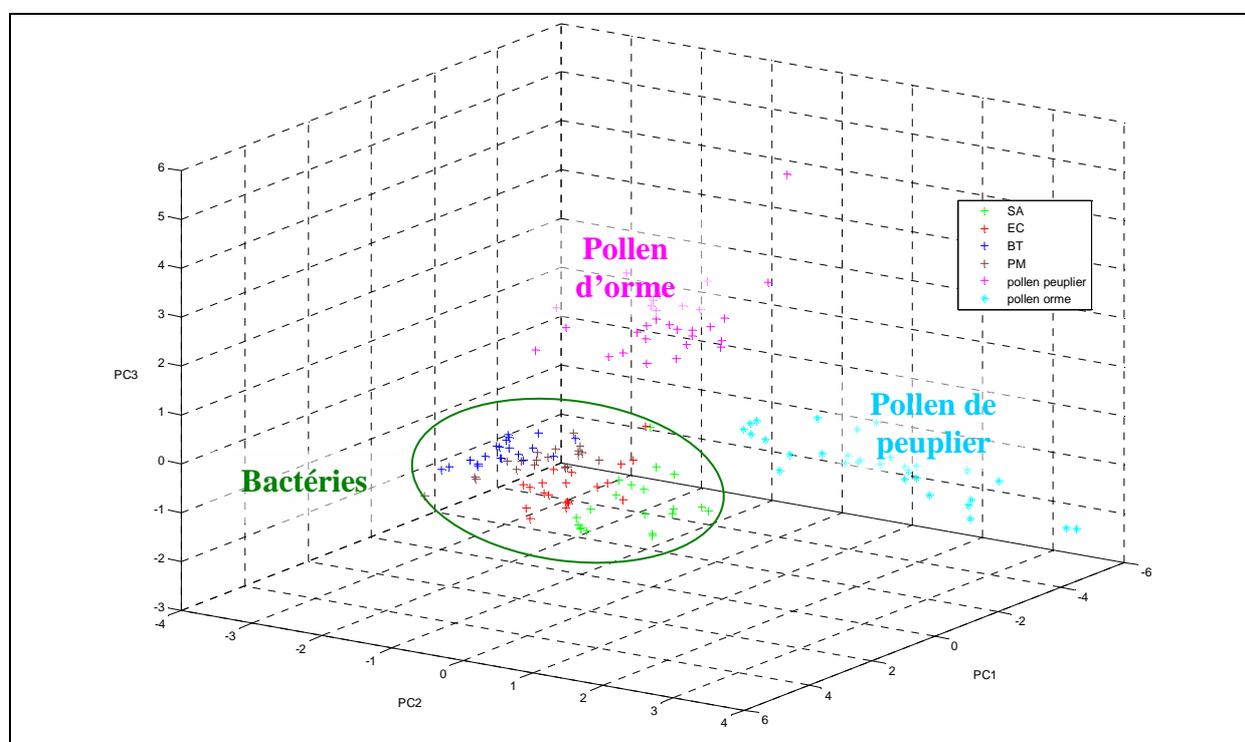


figure IV-34 : Analyse en composantes principales (ACP) illustrant la richesse des informations multivariées (ici 14 longueurs d'onde) issues de spectres LIBS de 4 types de pastilles bactériennes et de 2 pollens. Chaque point représente les 14 longueurs d'onde dans le nouvel espace établi sur les 3 principales composantes (PC1, PC2 et PC3) elles-mêmes combinaisons linéaires des 14 longueurs d'onde.

La figure IV-34 décrit le regroupement des informations multivariées issues des spectres propres à chaque échantillon. En considérant plusieurs longueurs d'onde dans chacun des spectrogrammes obtenus pour chaque plasma et non plus uniquement le seul critère RIC de P/C, l'analyse en composantes principales permet de classifier le groupe des bactéries et deux groupes spécifiques des pollens. Cette classification est directement due à la reproductibilité

des plasmas induits lesquels permettent d'exciter quantitativement les teneurs élémentaires spécifiques de chacun des échantillons.

L'analyse des données multivariées témoigne également de la richesse des spectrogrammes en informations utiles dépassant le cadre des seules raies de P et C. Cela peut être d'intérêt pour certains éléments effectivement présents dans l'échantillon mais présentant une émissivité faible : ainsi le cas du phosphore dont la concentration dans les bactéries est équivalente à celle d'autres éléments tels que Ca ou Na est flagrant. La faible émissivité peut être expliquée par les réponses spectrales des détecteurs iCCD qui présentent effectivement une faible réponse pour des longueurs d'onde inférieures à 300 nm.

IV.4.11. Conclusions sur la recherche de marqueurs spectraux et discriminants d'échantillons biologiques

Cette sous-partie permet de confirmer les potentialités de la technique LIBS pour détecter et discriminer des matériaux biologiques comme les bactéries sous la forme de pastilles homogènes et massives de matière bactérienne. Les conclusions partielles sont alors :

- **La LIBS met en évidence la présence de marqueurs spectraux intrinsèques des éléments et molécules constitutifs de matière biologique.** Ces marqueurs sont à la fois des éléments organiques tels que **C** et **P**, minéraux comme **Mg**, **Ca**, **Na** et **K**. Les raies moléculaires de type **CN** reflètent également les caractères carbonés et aromatiques des cycles majoritairement présents dans les structures biologiques.
- L'analyse de rapports **CN/Ca** et les considérations thermiques illustrant la reproductibilité et la robustesse (température de chaque plasma voisine de 9500 K établie sur les raies CN et Cu, après 1 μ s de relaxation) témoignent que chaque cellule bactérienne est globalement excitée. Tous les composants (parois externe, cytoplasme de l'intérieur) sont détectés grâce aux éléments les constituant.
- L'exploitation statistique des données multivariées (ici, les multiples intensités des raies d'émissions associée à une longueur d'onde) fournit des informations inédites dépassant le cadre de simples rapports entre deux raies (P/C par exemple) pour classifier les échantillons complexes tels que les bactéries. L'analyse en composante principale permet ainsi de trier les spectres selon leur nature (bactérie ou pollens) ouvrant la voie à l'établissement de bases de données.

IV.5. ANALYSES DE CULTURES BACTERIENNES SUR GELOSE

IV.5.1. Préambule

Les analyses précédentes de bactéries sous forme de pastilles comprimées ont permis d'appréhender les potentiels marqueurs spectraux présents dans les bactéries et accessibles par le plasma de la méthodologie LIBS couplée. Les éléments détectés semblent directement liés à la structure des bactéries dotées d'un squelette carboné et d'un cytoplasme contenant des minéraux. Les objectifs essentiels de cette partie sont de deux ordres :

1. Distinguer une couche bactérienne (homogène en compositions et épaisseur) par rapport à sa gélose support,
2. dès lors que cette distinction est faite, élaborer une méthodologie pour classifier plusieurs espèces cultivées en couches homogènes sur gélose.

IV.5.2. Culture hétérogènes de bactéries sur gélose nutritive

La croissance bactérienne sur gélose est une technique microbiologique simple [88].

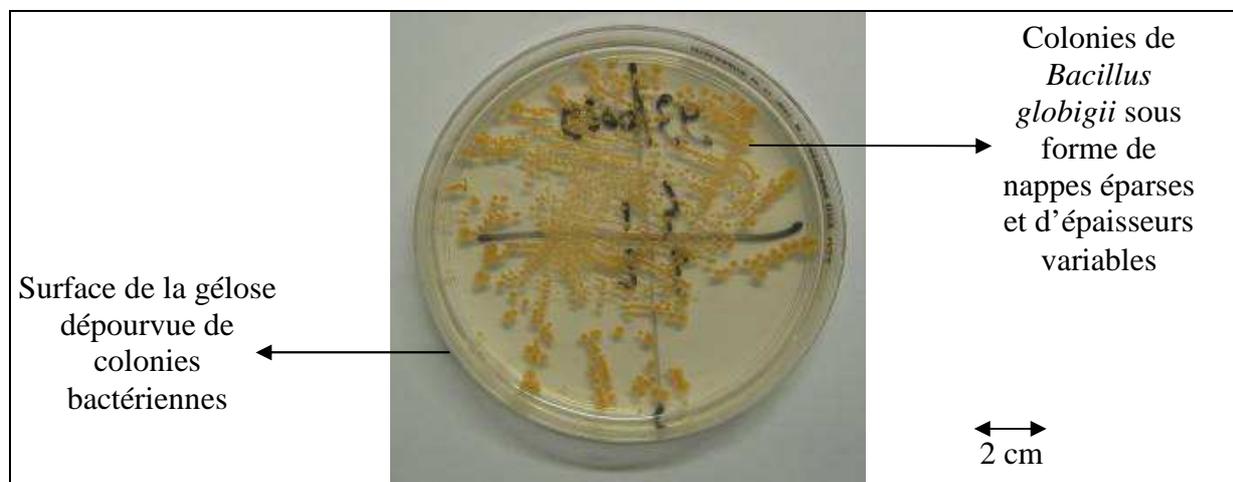


figure IV-35 : Boîte de Pétri sur laquelle ont été cultivées pendant 24 heures à 37°C des colonies de *Bacillus globigii* initialement déposées sur une gélose de type triptica-soja (TSA)

Des bactéries à l'état de latence sont initialement déposées de façon quelconque sur la surface de la gélose. Des nappes bactériennes d'aires et d'épaisseurs hétérogènes apparaissent selon les conditions ambiantes et les nutriments disponibles. La figure IV-35 illustre la croissance de bactéries de type *Bacillus globigii* (souche CEB 93/0029) déposées durant 24 heures sur une gélose nutritive. Les cultures bactériennes sont effectuées dans une étuve à une température idéale de 37°C par analogie avec la température des mammifères et avec une hygrométrie

régulée. Dans ce type de croissance, les colonies bactériennes se présentent sous forme d'amas pouvant atteindre plusieurs millimètres d'épaisseur et générant une surface avec un relief très irrégulier et d'aspect granuleux.

La préparation est moins lourde que celle des pastilles. Cependant, l'analyse est moins aisée pour des raisons pratiques de positionnement de la fibre optique. La conservation pose également des problèmes avec des risques de pollution des cultures après ouverture de la boîte stérile. Les colonies bactériennes présentent un cycle de vie à considérer : croissance des colonies jusqu'à épuisement des nutriments contenus dans la gélose et régression de population jusqu'à l'extinction des bactéries au bout de quelques jours.

D'un point de vue analytique, la culture de bactéries sur gélose engendre un système hétérogène. L'échantillon d'intérêt est sous la forme de couches bactériennes lesquelles recouvrent un support nutritif gélifié à l'aide d'un agent tel que l'agar, composant issu de certaines algues marines et ne constituant pas un nutriment. Les géloses typiquement utilisées sont des gels plans contenus dans une boîte de Pétri circulaire (diamètre 8,5 cm pour le modèle Biomérieux utilisé, cf. figure IV-35). Les géloses employées contiennent des substances nutritives essentiellement basées sur des sucres et des minéraux. Nous utiliserons une gélose de type *Tryptica-Soja Agar* – notée TSA – préalablement stérilisée par autoclave (chauffage à une température supérieure à 100° C à haute pression) pour ôter tout risque de pollution. La gélose peut être problématique en tant qu'interférents spectraux potentiellement analysés par LIBS.

En outre, les échantillons bactériens sous forme de cultures sur gélose représentent des surfaces aux caractéristiques très différentes par rapport à celles classiquement expertisées (polymères, métaux, roches, etc.). Les colonies bactériennes apparaissent comme des échantillons à la fois humides, mous et très fragiles de type gels. Les plasmas induits sur ces surfaces seront donc différents en terme d'interaction plasma-matière par rapport aux matériaux durs, secs et homogènes jusqu'ici considérés. Une optimisation de l'interaction plasma-matière bactérienne est donc indispensable pour optimiser l'analyse de la couche bactérienne d'intérêt. L'analyse par LIBS de telles structures nécessite un réglage rigoureux de la position de formation du plasma de façon à tenter de maîtriser la quantité de matière ablatée.

Cette forme d'échantillonnage de bactéries cultivées sur gélose est utilisée lors de prélèvements de classes granulométriques de bactéries présentes dans une atmosphère ambiante potentiellement contaminée. Des appareillages commerciaux emploient des boîtes de Pétri contenant une gélose sur laquelle viennent s'impacter les bactéries de l'air prélevé (granulomètres à étages de type Andersen prélevant les particules de l'air selon leur classe granulométrique, « Slit Sampler » qui les prélève sur une période donnée) Une mise à l'étuve

pendant 24 heures permet la croissance (ou non) des particules bactériennes pour des analyses ultérieures. Le couplage de la technique LIBS sur le résultat des prélèvements – les nappes de bactéries – se trouve ainsi directement justifiés.

IV.5.3. Cultures bactériennes en couche homogène

Afin d'assurer une meilleure interaction plasma-matière bactérienne déposée sur gélose, un protocole est suivi pour obtenir des couches bactériennes d'épaisseur homogène et non plus hétérogène comme précédemment.

Des suspensions de bactéries de nature et quantité connues (1 mL contenant $1,4 \times 10^9$ bactéries *Bacillus atropheus* et *Escherichia coli*, et 1 mL de $1,0 \times 10^8$ bactéries *Micrococcus equiperdicus*) sont étalées à l'instant $t = 0$ de manière homogène sur la gélose. Connaissant le cycle de croissance des bactéries et son facteur de multiplication, il est possible d'obtenir des nappes homogènes d'épaisseurs régulières et reproductibles correspondant après une durée connue à la reproduction bactérienne

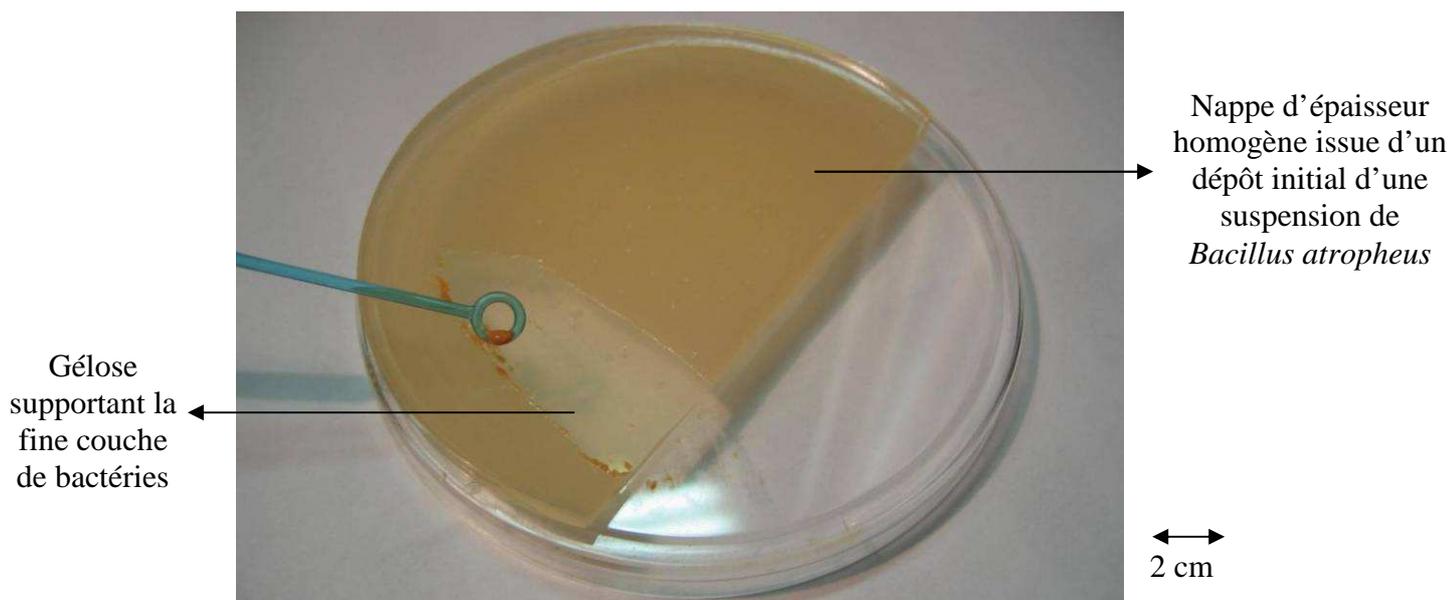


figure IV-36 : Photographie prise 24 heures après la culture de bactéries de type *Bacillus atropheus* initialement réparties sur une gélose de type TSA. A titre illustratif, un grattoir en plastique est utilisé pour ôter la fine couche de bactéries développées sur la gélose nutritive.

La génération d'un plasma sur une couche de composition homogène en bactéries et d'épaisseur connue permet d'optimiser l'interaction laser-matière bactérienne pour une meilleure représentativité. En effet, cela permet de discriminer les bactéries de leur gélose support pour minimiser les interférences spectrales.

Les valeurs des épaisseurs des couches sont directement liées aux conditions de croissance (durée, type de gélose, température, hygrométrie, etc.). Dans nos études, les cultures sur gélose

de type TSA selon ce protocole de croissance bactérienne sont toujours analysées par LIBS au bout de l'instant $t = 24$ heures de mise à l'étuve.

A l'aide d'une caméra analogique, nous avons mesuré l'épaisseur de plusieurs coupes de géloses supportant une couche bactérienne s'étant développée durant 24 heures (cf. figure IV-37). Etant donné le protocole de croissance suivi et pour des conditions similaires d'analyse, toutes les colonies bactériennes présentent des **épaisseurs "e" comprises entre 75 et 100 μm** .

Nous considérons une épaisseur e égale à 100 μm dans nos calculs après 24 heures de croissance bactérienne.

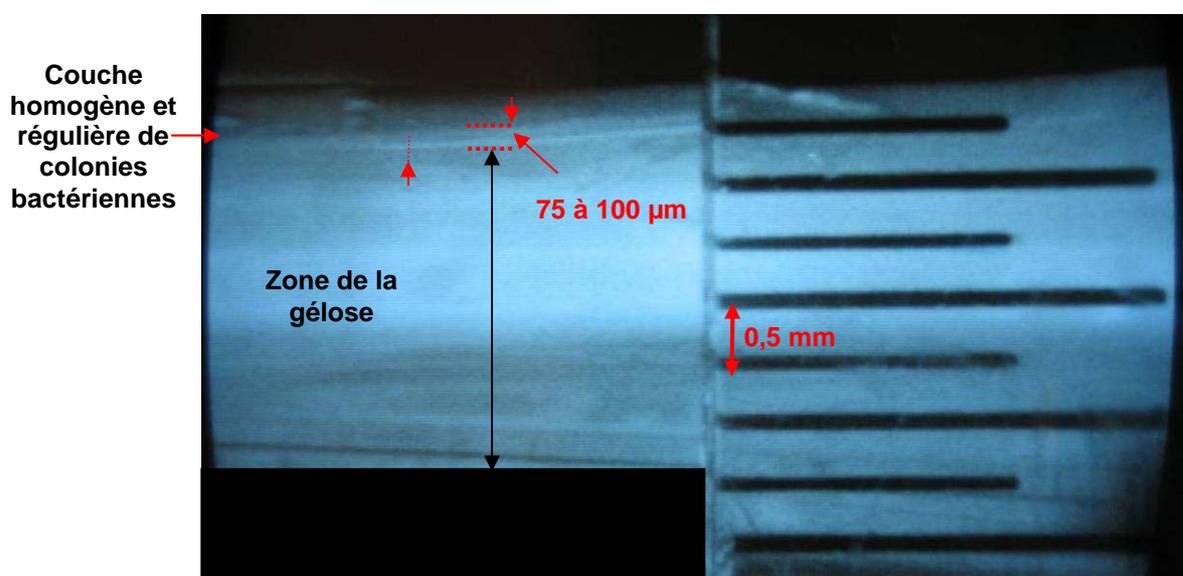


figure IV-37 : Observation d'une coupe de gélose TSA recouverte par une couche de *Bacillus atropheus* imagée par caméra haute résolution et comparaison par rapport à un réglet

IV.5.4. Caractérisations des nappes bactériennes homogènes

Grâce à la procédure de contrôle de l'ablation du système hétérogène couche bactérienne-gélose, les spectrogrammes LIBS d'un plasma induit sur une position de nappes homogène sur boîtes de Pétri sont représentatifs des seules bactéries. Ce protocole va nous permettre désormais d'aboutir à trois objectifs :

- 1. Préciser la composition des constituants du système diphasique : la couche de bactérie et sa gélose TSA,**
- 2. Quantifier le nombre de bactéries analysées par le plasma** car nous avons accès au volume ablaté uniquement constitué de bactéries,

3. Classifier les échantillons représentés par les couches bactériennes homogènes selon leur nature avec pour but d'élaborer des bases de données préliminaires basées sur des observables spectrales discriminantes.

IV.5.5. Spectrogrammes Echelle du système diphasique couche de *Bacillus atropheus* sur gélose

Pour discriminer la couche de bactéries par rapport à la gélose, les compositions globales des géloses avec et sans couche superficielle de bactéries cultivées sont obtenues par LIBS.

➤ Paramètres d'analyses LIBS

- Laser Quantel CFR 200 : pulse de diamètre 5 mm, durant 5 ns et d'énergie valant 100 mJ
- Distance focale de la lentille=65 mm
- Distances : fibre optique HCG1000/plasma=5 mm – Fibre optique/surface=0 mm – Point focal/surface (FTSD)= -1 mm (à priori <0 pour éviter l'effet de l'onde choc sur la couche bactérienne fragile)
- Densité énergétique au niveau du plan focal : **4,7 10¹¹ W.cm⁻²**
- Spectromètre large bande Echelle (200-950 nm) couplé à la fibre HCG1000
- Détecteur iCCD : gain maximal (255) ; délai avant acquisition=1 µs et durée d'acquisition = 20 µs – Mode d'acquisition=spectre moyennée de 5 séries d'un plasma par spectre

➤ Spectrogramme large bande (200-950 nm) pour la composition globale de *Bacillus atropheus* sur gélose TSA

La figure IV-38 illustre les différences de compositions élémentaires entre la couche de *Bacillus atropheus* et la gélose TSA qui est le support nourricier.

Nous observons également qu'un monopulse laser induisant un plasma permet à priori de distinguer des colonies bactériennes de leur support. Il s'agit donc d'éviter le recours à l'accumulation de tirs sur une même position. Cela est potentiellement dommageable étant donnée la faible quantité de matériau biologique présent sur une gélose.

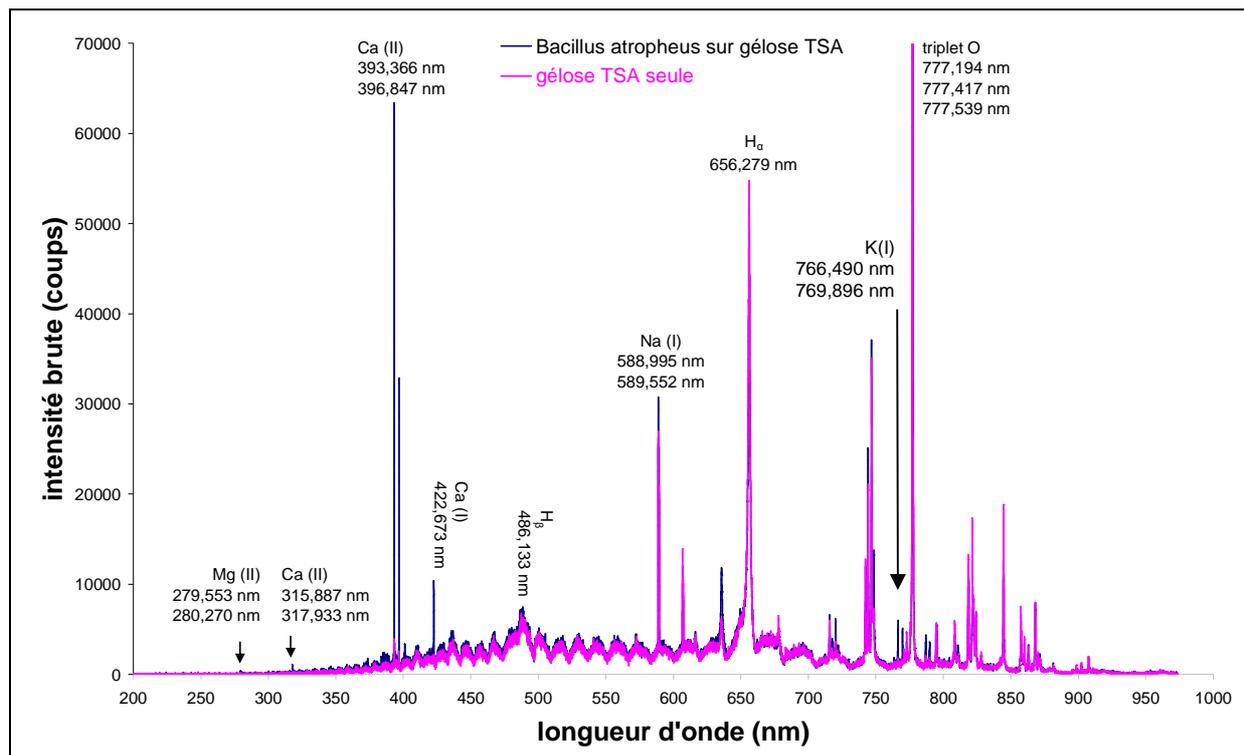


figure IV-38 : Superposition de spectrogrammes large bande illustrant les compositions globales de la gélose seule et d'une couche de *Bacillus atropheus* sur gélose TSA. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 100 mJ et densité d'énergie de $4,7 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$

IV.5.6. Contrôle de l'ablation et distinction de la couche bactérienne sur la gélose

La figure IV-37 illustre les caractéristiques des couches bactériennes en surface de gélose. Etant donnée la faible épaisseur des couches bactériennes cultivées – environ $100 \mu\text{m}$ comme indiqué précédemment – le plasma doit être positionné de façon à n'ablater que l'amas bactérien et non la gélose nourricière interférente.

Pour cet objectif, nous décidons de faire varier la densité d'énergie déposée sur les couches : on modifie la distance entre la longueur focale de la lentille et la surface de l'échantillon (ou Focal To Sample Distance ou FTSD, cf. partie I.6.1.1, page 45). Cette procédure permet d'induire le plasma plus ou moins profondément dans la couche bactérienne déposée sur la gélose. La valeur de la FTSD influence l'analyse spectroscopique et la quantité de matière ablatée. Il s'ensuit une modification de l'intensité des émissions radiatives et de la taille de l'impact. Cependant, la densité d'énergie devra être suffisamment élevée pour exciter les constituants atomiques vaporisés des bactéries.

IV.5.6.1. Analyses sélectives LIBS du système diphasique couche bactérienne-gélose

➤ **Paramètres d'analyses LIBS**

- Laser Quantel CFR 200 : pulse de diamètre 5 mm, durant 5 ns et d'énergie valant 135 mJ
- Distance focale de la lentille=65 mm
- Distances : fibre optique HCG1000/plasma=5 mm – Fibre optique/surface= 0 mm – point focal/surface (FTSD)=variable de -1 à +1 mm par pas de 0,5 mm
- Densité énergétique au niveau du plan focal variant de **1,2 à 6 10¹¹ W.cm⁻²**
- Monochromateur THR1000 avec réseau à 300 traits/mm
- Détecteur iCCD : gain maximal (255), délai avant acquisition = 1 µs, durée d'acquisition = 20 µs

➤ **Choix d'un marqueur spectral**

La figure IV-39 de la page 183 illustre les différences d'intensités d'émission des raies du calcium à 393,366 nm et à 396,847 nm entre la couche de bactéries et sa gélose support.

Les deux raies du calcium sont choisies pour distinguer la couche bactérienne de la gélose. En faisant varier la densité d'énergie au point focale, il est possible d'ablater plus ou moins profondément la surface de la couche de bactérie sur la gélose. Le but est alors l'ablation sélective de la seule couche de bactéries.

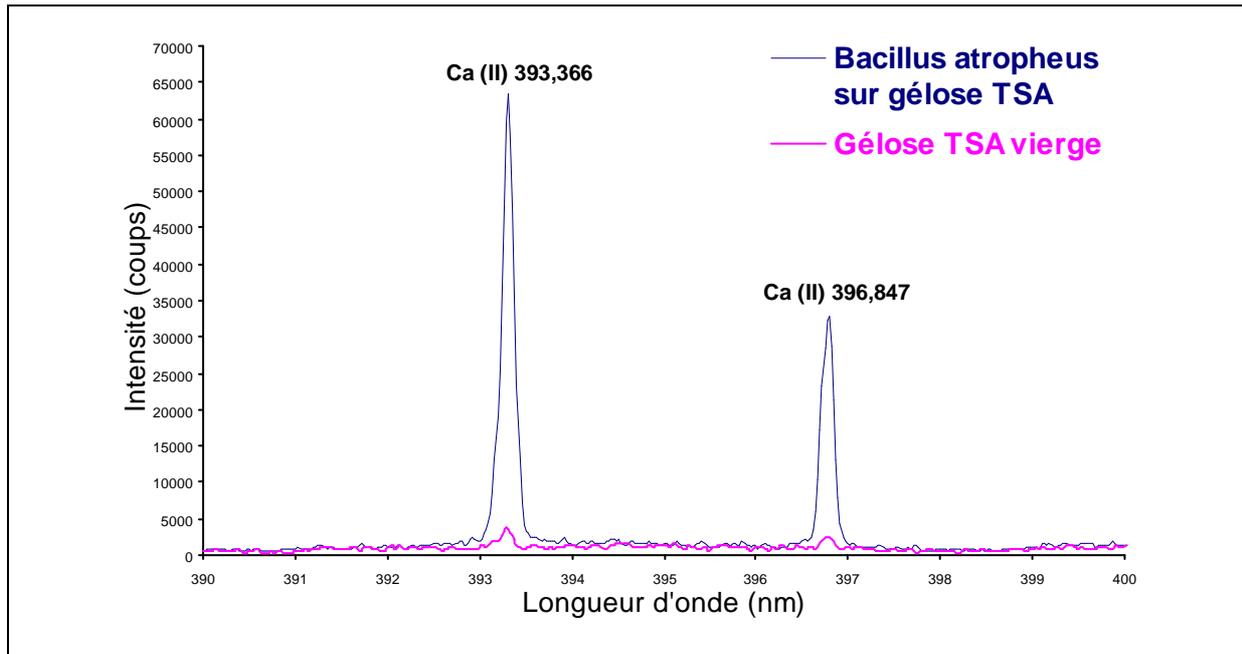


figure IV-39 : Détails du spectrogramme de la figure IV-38 illustrant l'intensité des raies du calcium à 393,366 nm et à 396,847 nm entre la couche bactérienne de *Bacillus atropheus* et sa gélose de culture. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 100 mJ et densité d'énergie de $4,7 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs

IV.5.6.2. Influence du paramètre FTSD sur la profondeur ablatée pour le système diphasique couche bactérienne-gélose

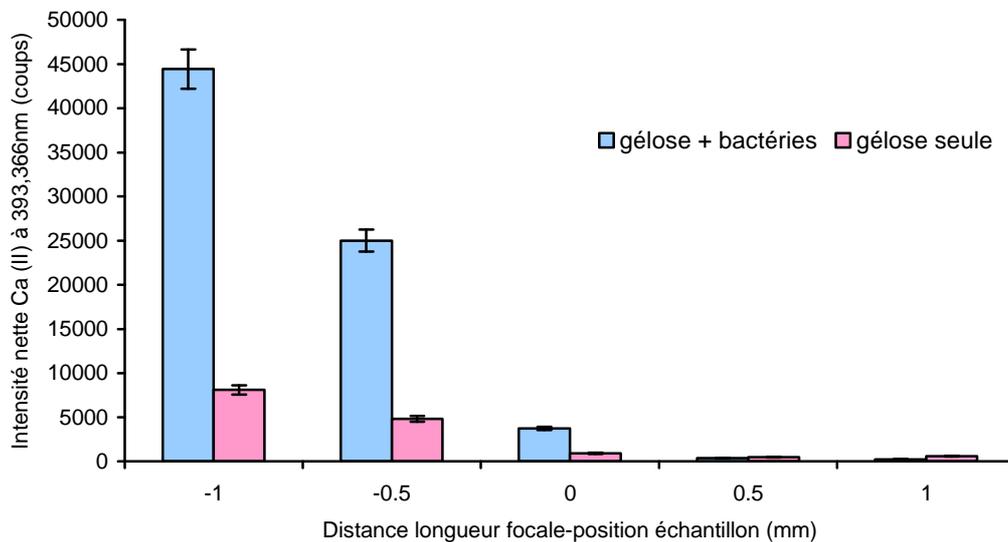


figure IV-40 : Evolution de l'intensité de la raie de Ca à 393,366 nm selon la distance entre la longueur focale de la lentille et la surface de boîte de Pétri couverte ou non d'une couche de *Bacillus atropheus* d'épaisseur égale à 100 μm . Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ avec diverses valeurs de densités énergétiques de $1,2$ à $6 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs

La variation de la FTSD entraîne une ablation plus ou moins importante de la surface (gélouse et/ou couche bactérienne selon les cas) car le plasma est plus ou moins dense en énergie au

niveau de la zone d'impact. L'évolution de la raie du calcium est directement reliée à la présence ou non de bactéries.

Pour les FTSD > 0, peu de signal émissif est mesuré : le fait de considérer des FTSD positives induit la formation d'un plasma sur la surface et au niveau de la phase aérienne au-dessus de l'impact : l'onde de choc de ce plasma vient perturber la surface molle en éjectant de la matière. La focalisation du pulse laser sur une surface apparaît d'autant plus cruciale et importante que le matériau est hétérogène (couche bactérienne sur gélose) et fragile.

IV.5.6.3. Choix du paramètre FTSD pour une ablation sélective de la couche bactérienne

La validation du choix de cette valeur de FTSD égale à -0,5 mm est vérifiée en suivant l'évolution des intensités de la raie du Ca sur une même position.

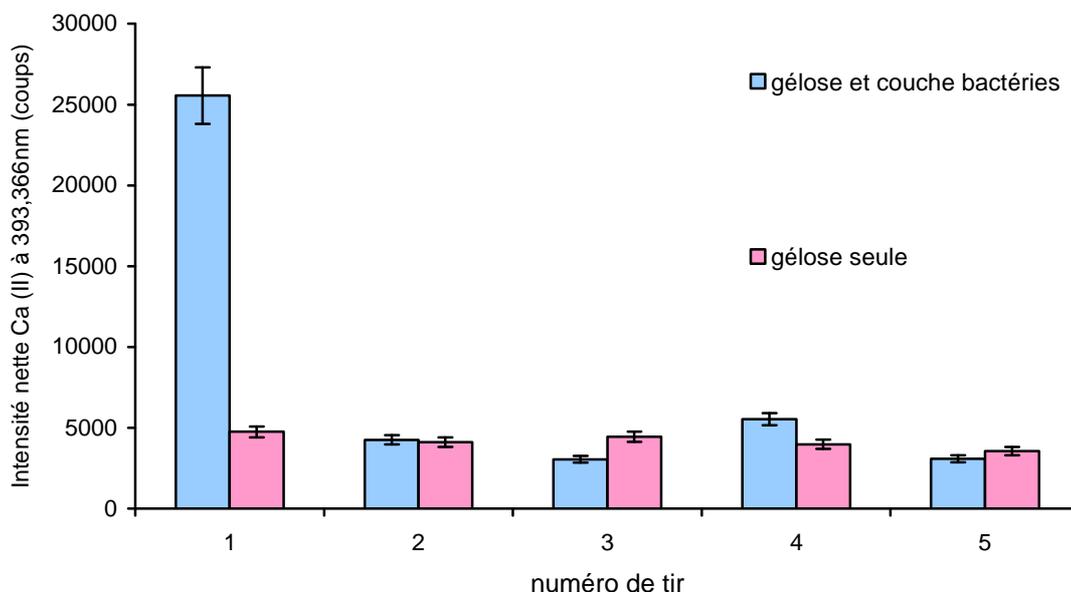


figure IV-41 : Evolution de l'intensité de la raie du Ca à 393,366 nm selon le numéro du tir sur une même position de gélose couverte ou non par une couche bactérienne de *Bacillus atropheus*. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ densité énergétique de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs

La couche de bactérie est si fragile qu'un tir laser parvient à la traverser avec la plupart des valeurs de FTSD considérées. Le choix d'une FTSD égale à -0,5 mm est adéquate. Un seul pulse laser induit à 135 mJ permet l'ablation de l'intégralité de l'épaisseur de chaque couche bactérienne.

IV.5.6.4. Caractéristiques du profil d'ablation

Le choix d'une FTSD égale à -0,5 mm permet l'ablation sélective de la couche de bactéries par rapport à sa gélose support. A l'aide d'une caméra analogique doté d'un puissant zoom permettant un agrandissement adapté, le profil de l'ablation est caractérisé par la forme d'un **cratère de diamètre D égal à 200 μm environ** (cf. figure IV-42) :

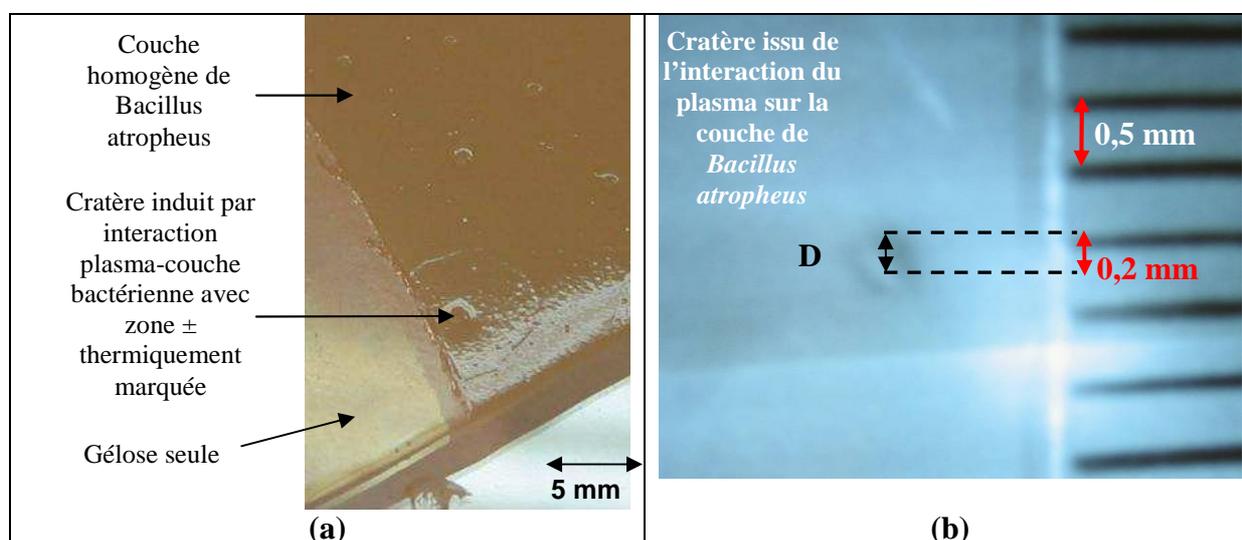


figure IV-42 : Photographies du cratère issu de l'interaction entre un plasma et la couche bactérienne de *Bacillus atropheus* d'épaisseur 100 μm . (a) aspect de cratère non optimisé terme de profondeur ablatée – (b) diamètre de 200 μm d'un cratère avec un contrôle de l'ablation de toute la couche épaisse de 100 μm

L'ablation est donc contrôlée et calibrée en épaisseur (100 μm) et diamètre (200 μm) de couche bactérienne ablatée. Les analyses LIBS des couches bactériennes sur gélose sont représentatives des seules bactéries du système hétérogène gélose-couche bactérienne. Ce réglage est déterminant car pour des conditions de cultures bactériennes analogues à celles utilisées ici, des analyses de routine sur de tels supports sont envisageables. Cette procédure permettra également de définir le cahier des charges du démonstrateur opérationnel objet du dernier chapitre du rapport.

IV.5.7. Spectrogrammes réduits du système diphasique couche de *Bacillus atropheus* sur gélose

- Laser Quantel CFR 200 : pulse de diamètre 5 mm, 5 ns et d'énergie valant 135 mJ (voltage de la lampe flash = 7,5 V)
- Distance focale de la lentille=65 mm
- Distances : fibre optique HCG1000/plasma=5 mm – Fibre optique/surface=0 mm – Plan focal/surface (FTSD)= - 0,5 mm
- Densité énergétique au niveau du plan focal : **2,3 10¹¹ W.cm⁻²**
- Spectromètre large bande Echelle avec fibre HCG 1000 ou monochromateur THR1000 avec réseau 300 traits/mm pour une meilleure sensibilité dans l'Ultra-Violet ($\lambda < 300$ nm)
- Détecteur iCCD : gain maximal (255) ; délai = 1 μ s et durée d'acquisition = 20 μ s
- Mode d'acquisition : spectre moyennée de 5 séries d'un plasma par spectre

IV.5.7.1. Spectrogramme couvrant la région 383 à 423 nm

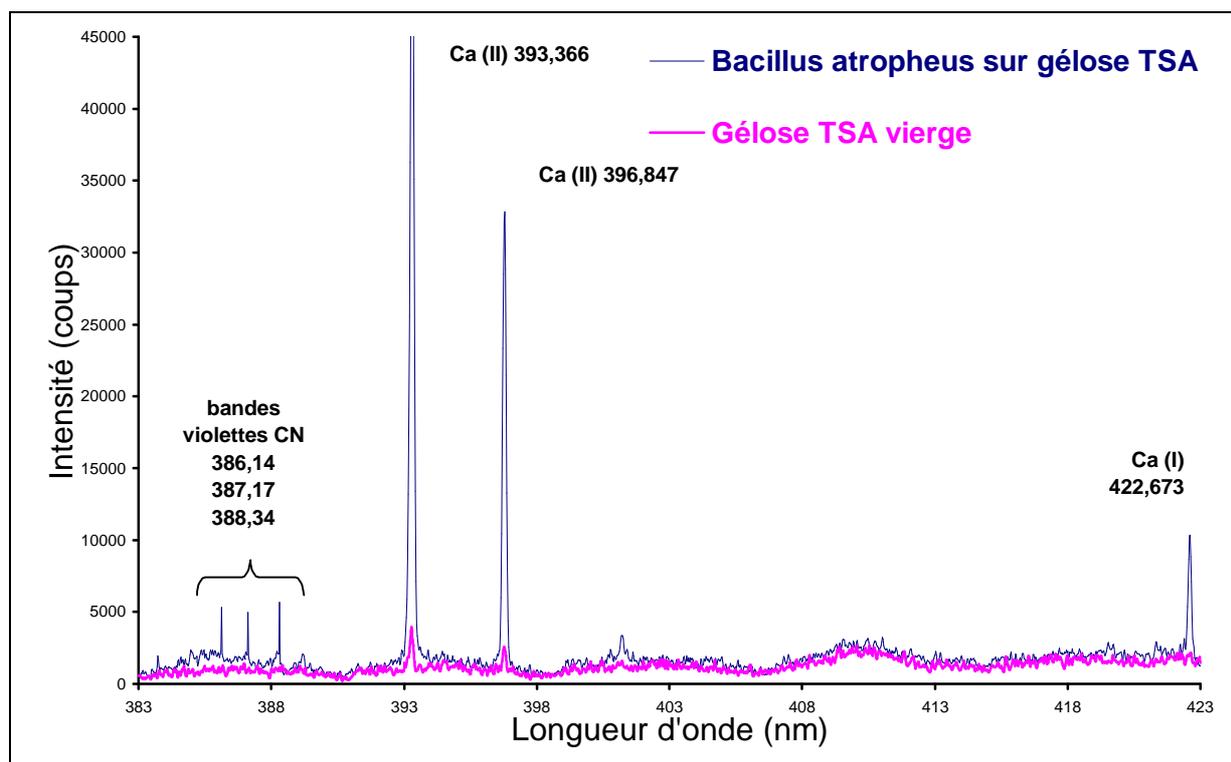


figure IV-43 : Détails d'un spectrogramme Echelle sur la zone spectrale 283 à 423 nm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11}$ W.cm⁻², délai avant acquisition égal à 1 μ s et durée d'acquisition égale à 20 μ s

La figure IV-43 met en évidence des teneurs très différentes en calcium entre la couche de *Bacillus atropheus* et la gélose TSA seule. La présence de calcium en quantités importantes

semble directement issue des parois bactériennes riches en élément Ca – et Mg – complexés à des protéines membranaires comme décrit au début du chapitre présent.

La présence de raies violettes du système CN (cf. figure IV-43) est indirectement liée à la présence des nombreux composés cyclo-aromatiques constituant les matériaux biologiques des bactéries et de l'interaction avec l'atmosphère de travail (air ambiant), cf. page 159.

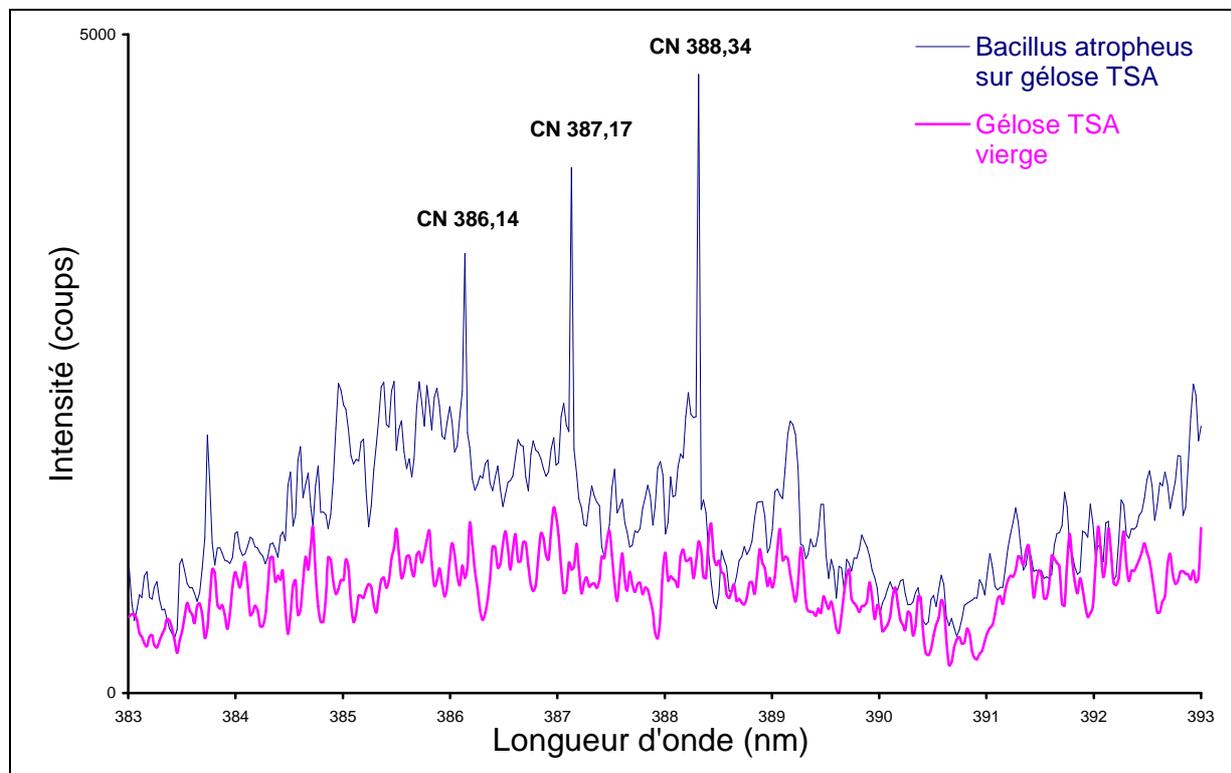


figure IV-44 : Détails de raies CN issues d'un spectrogramme Echelle sur la zone spectrale 383 à 393 nm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs

L'utilisation du logiciel LIFBASE permet d'approximer la température d'excitation des raies CN. La valeur trouvée (environ 6500 K, cf. page 163 et ANNEXE V) confirme la température importante du plasma lors de l'existence des raies moléculaires CN.

IV.5.7.2. Spectrogramme couvrant la région 762 à 772 nm

Le potassium est détecté sur les bactéries et est à posteriori absent de la gélose. La présence de potassium semble provenir directement du contenu interne cytoplasmique des bactéries. Les concentrations en potassium – de même que celles en phosphore – sont mutuellement régulées à l'intérieur de la bactérie qui lui permet de lutter contre les variations de la pression osmotique.

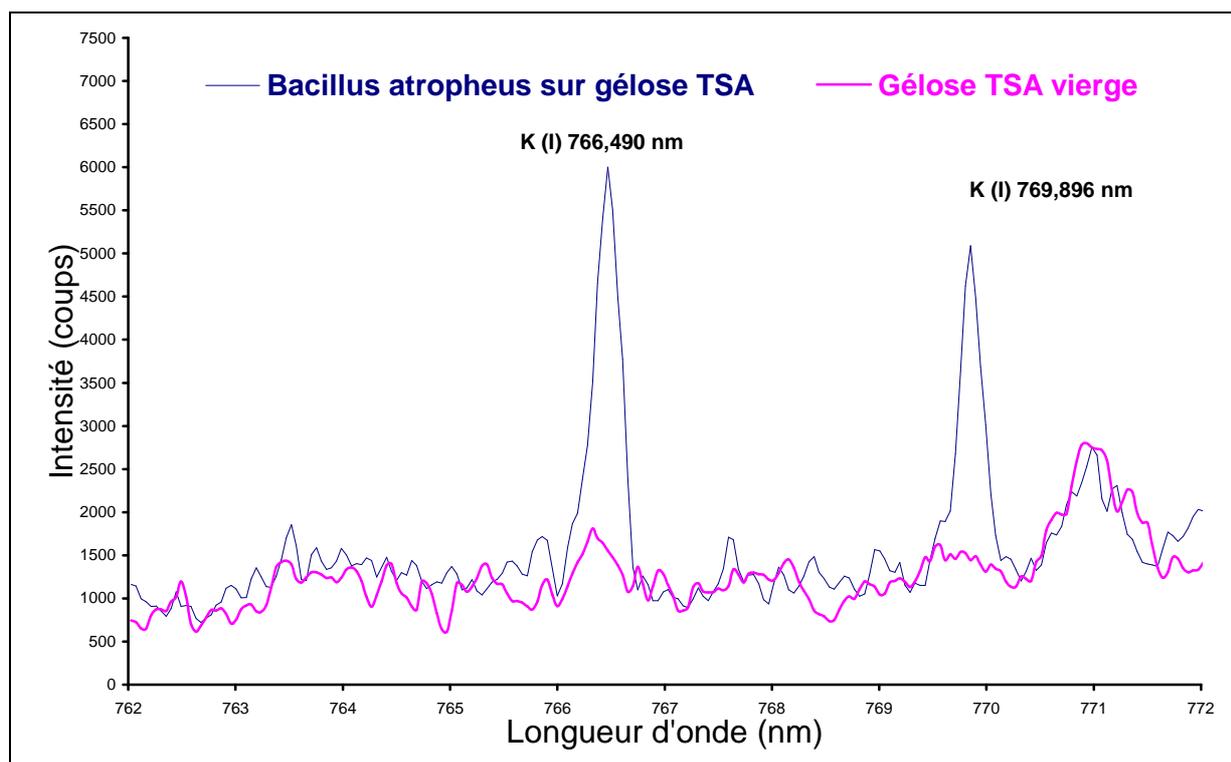


figure IV-45 : Agrandissement du spectrogramme Echelle sur la zone spectrale 762 à 772 nm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs

IV.5.7.3. Spectre à bande réduite (246 à 286 nm) de la couche de *Bacillus atropheus* sur gélose TSA

Faute de sensibilité suffisante due à la faible réponse du spectromètre Echelle associé au détecteur iCCD, le monochromateur THR1000 doté du réseau à 300 traits/mm est ici employé pour amplifier les émissions dans le domaine de longueurs d'ondes inférieures à 300 nm.

La figure IV-46 indique la présence importante de carbone et de magnésium dans les bactéries vis-à-vis de la gélose TSA.

La présence de la raie du phosphore P à 253,560 nm confirme à posteriori le caractère spécifique de cet élément dans les bactéries. Malgré l'optimisation des paramètres laser et du détecteur iCCD, la raie de P demeure faible en comparaison avec le cas des pastilles sèches de bactéries compressées. La présence de l'eau et la moindre quantité de matière bactérienne peuvent expliquer cette moindre émissivité de la raie du P, d'autant plus que cette raie est peu émissive avec notre dispositif expérimental.

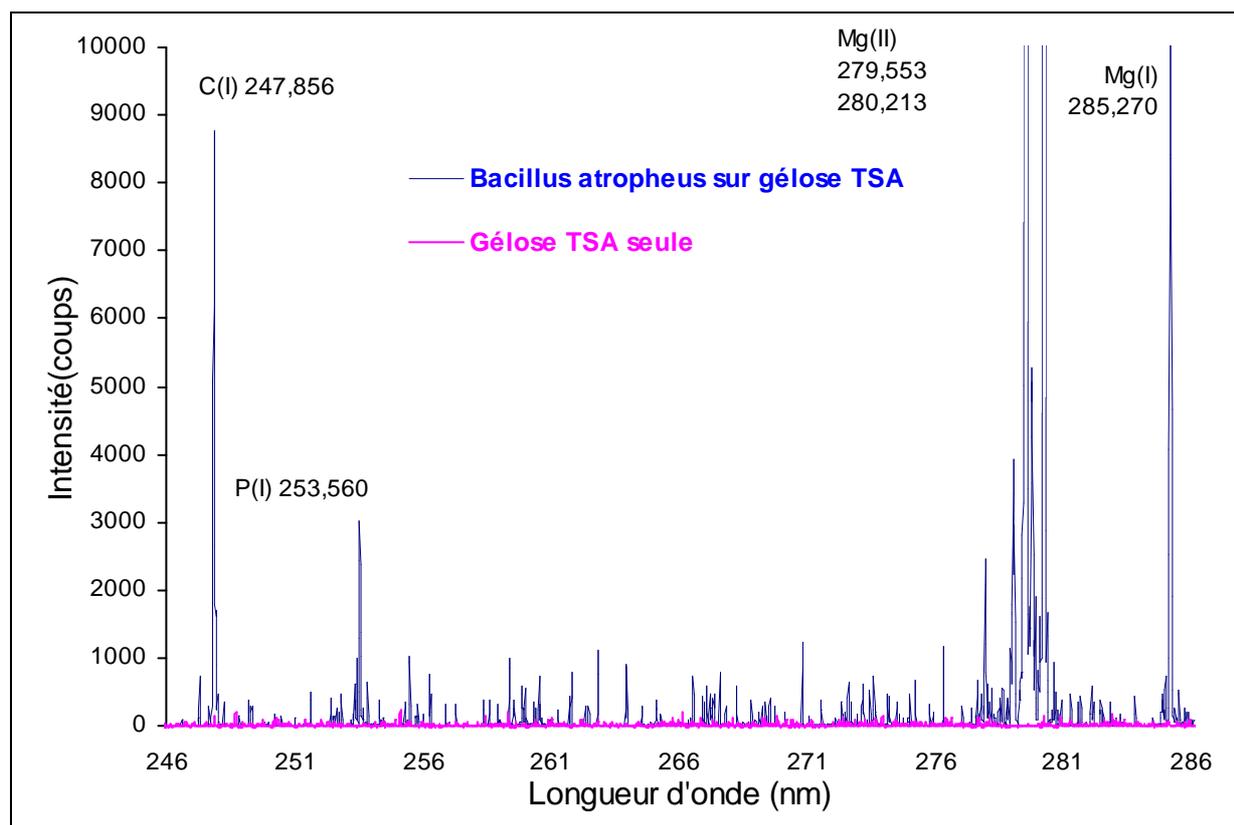


figure IV-46 : Spectrogramme bande réduite 246 à 286 nm obtenue avec le monochromateur THR1000 doté du réseau à 300 traits/mm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs

IV.5.7.4. Bilans sur les compositions de la nappe de *Bacillus atropheus* et de la gélose TSA

Eléments associés aux raies	Raies en nm	<i>Bacillus atropheus</i> sur gélose TSA	Gélose TSA seule
C	247,856	+	-
Ca	393,366 396,847 422,673	++	-
P	253,560	+	Absence
Mg	279,553 280,270 285,213	++	-
Na	588,995 589,552	+	+
K	766,490 769,896	+	Absence
CN	386,14 387,17 388,34	++	Absence

tableau IV-11 : Composants des couches de *Bacillus atropheus* cultivées sur gélose TSA. Légende : ++ et + = quantité très importantes ou notable du composé ; - = faible quantité du composé dans un échantillon par rapport au second échantillon

La composition de la gélose TSA présente des éléments minéraux. Par comparaison, *Bacillus atropheus* se distingue cependant de la gélose TSA par des teneurs élémentaires importantes, voire spécifiques, Ca, Mg, K et P directement liées aux composants de la structure interne (Ca et Mg des parois) ou interne (K et P du contenu cytoplasmique).

IV.5.8. Quantification du nombre de bactéries analysées par chaque plasma

Cette partie a pour objectif de calculer le nombre de bactéries analysées par chaque tir laser, c'est-à-dire présentes dans la bulle plasma produite.

IV.5.8.1. Approche géométrique

Les observations effectuées précédemment lors du protocole de maîtrise de l'ablation sélective de la couche bactérienne sur la gélose (cf. IV.5.6, page 181) ont permis de déterminer l'épaisseur e (environ 100 μm) et le diamètre D (environ 200 μm) du cratère induit par l'interaction plasma-couche bactérienne homogène. En adoptant un modèle d'ablation en calotte de révolution sphérique, nous pouvons approximer la quantité de matière ablatée selon la figure IV-47.

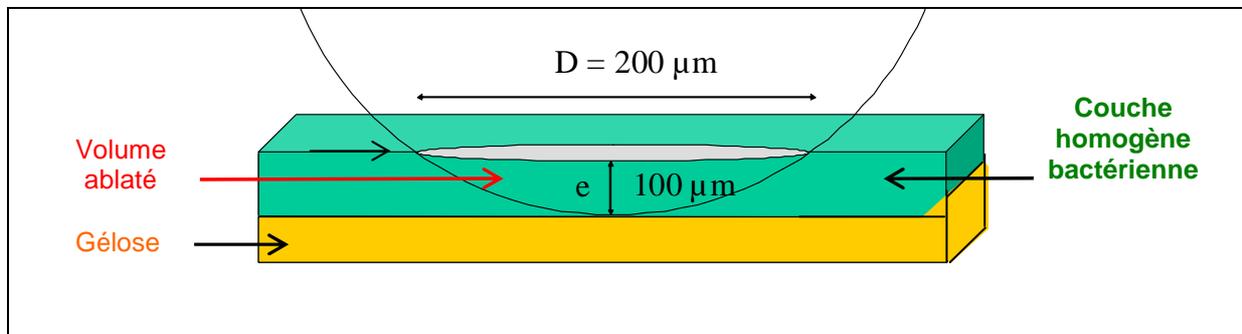


figure IV-47 : Schéma du profil d'ablation en calotte de révolution sphérique de la gélose recouverte de la fine couche de croissance bactérienne d'épaisseur d'environ 100 μm

Si le cratère est en forme de calotte de révolution sphérique de diamètre $D = 200 \mu\text{m}$ et d'épaisseur $e = 100 \mu\text{m}$ (profondeur estimée pour une densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$), on calcule un volume V ablaté de :

$$V = \frac{2}{3} \cdot \pi \cdot D^2 \cdot e - \left(\frac{2}{6} \cdot \pi \cdot \left(\frac{D}{2} - e \right) \cdot (eD - e^2) \right) = 2,09 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \quad \text{équation IV-8}$$

La problématique réside désormais dans la composition de ce volume ablaté :

1. Nous connaissons la quantité de bactéries déposées à l'instant $t = 0$ avant la phase de croissance bactérienne durant 24 heures. Une quantité $N_0 = 1,4 \cdot 10^9$ bactéries a été

uniformément déposée sur une gélose de diamètre $d_{\text{Gélose}}$ de 8,5 cm, d'où une concentration surfacique c :

$$c = N_0 / \left(\frac{\pi}{4} \times (d_{\text{Gélose}})^2 \right) = 1,4 \cdot 10^9 / 56,75 = 2,47 \cdot 10^7 \text{ bactéries.cm}^{-2}$$

2. L'ablation LIBS induit un cratère de diamètre mesuré de 200 μm , donc à l'instant à $t = 0$ la

surface de gélose présentait la quantité $c \times \frac{\pi}{4} \times (200 \cdot 10^{-4} \text{ cm})^2 \approx 7,76 \cdot 10^3$ bactéries.cm⁻².

3. Entre $t = 0$ et $t = 24$ heures qui est l'instant des analyses LIBS, les bactéries se sont développées de façon complexe et difficilement quantifiable. Dans le cas extrême, nous pouvons supposer que l'ensemble du volume ablaté est représenté par des bactéries. Dans ce cas, si une bactérie est assimilée à un cylindre de volume $V_{\text{bactérie}}$ égal à 2 μm^3 (cf. figure IV-10, page 141), le volume V ablaté contiendrait alors

$V/V_{\text{bactérie}} \approx 10^6$ bactéries. Cette hypothèse apparaît cependant trop forte car il est nécessaire de prendre en compte

« **l'espace vital** » entourant une bactérie. Pour des questions de viabilité et de mobilité, la distance entre deux bactéries est imposée par des processus de transfert de matière (H_2O , CO_2 , éléments nutritionnels, etc.). L'existence de cet espace vital pour les formes végétatives les distingue des formes sporulées ne nécessitant pas d'un tel espace. Dans ces conditions, il est raisonnable de doubler les dimensions de chaque bactérie pour tenir compte de cet espace. La conséquence est que le volume de la bactérie $V_{\text{bactérie}}$ est décuplé,

d'où le nouveau rapport $V/10V_{\text{bactérie}} \approx 10^5$.

→ A ce stade des calculs et avec les hypothèses fortes adoptées, la quantité de bactéries analysées serait donc comprise entre environ 10^4 et 10^5 . Ces valeurs semblent néanmoins très importantes : il n'est pas tenu compte de la nature particulière de l'interaction entre un plasma générant une onde de choc et la nature gélifiée et fortement aqueuse de la couche bactérienne sur la gélose.

4. Une nouvelle approche géométrique est alors entreprise en tenant compte à la fois du nombre de bactéries présentes dans le plasma et du cratère réellement ablaté par rapport au diamètre de la tâche focale irradiant la surface à la FTSD de -0,5 mm considérée.

a. Quantité de bactéries contenues dans le plasma induit sur la couche bactérienne sur gélose

Nous supposons que le volume du plasma est exclusivement composé des atomes des bactéries assimilables chacune à un cylindre de volume $2 \mu\text{m}^3$, de densité égale à 1 (similaire à H_2O) et donc de masse égale à $2 \cdot 10^{-12}$ g. Le but est de calculer le nombre de bactéries présentes dans un plasma de température 20 000K et de taille millimétrique (volume de $5,43 \cdot 10^{-6} \text{ dm}^3$, cf. équation III-3, page 95).

En tenant compte du facteur d'expansion pour l'eau dans l'air entre la température ambiante initiale de 298K et celle du plasma approximée à 20 000K (égal à 67,2 et établi avec l'équation III-6, page 96), une mole d'eau dans l'air représente un volume de 24 dm^3 environ à 298K et une masse de 18 g, alors à 20000K (température du plasma), 1 dm^3 représente $18/(24 \times 67,2) = 1/90$ g.

Ainsi, un plasma de volume $V = 5,43 \cdot 10^{-6} \text{ dm}^3$ constitue une masse m_0 d'eau de $V/90 = 6 \cdot 10^{-8}$ g. Connaissant la masse d'une bactérie $m_{\text{bactérie}} = 2 \times 10^{-12}$ g, cette masse d' H_2O représenterait : $m_0/m_{\text{bactérie}} = \mathbf{3 \cdot 10^4}$ bactéries.

→ Cette valeur apparaît inférieure d'environ un facteur 10 à 10^2 par rapport aux premières hypothèses précédentes. Pour l'expliquer, il est nécessaire de comparer le diamètre expérimentalement observé et celui prévu théoriquement.

b. Comparaison entre le diamètre du faisceau laser sur la surface d'impact et le diamètre du cratère mesuré expérimentalement

La partie I.6 en page 44 rappelle comment est calculé le rayon du faisceau au point d'impact avec le diamètre d du faisceau incident ($d=0,527 \text{ cm}$), la focale f de la lentille ($f=6,5 \text{ cm}$), l'écart x entre le point d'impact théorique et le plan de focalisation réel, et le rayon $r = a/2$ de la tâche focale à FTSD = -0,05 cm (valeur optimisée pour les géloses bactériennes)

Pour nos conditions expérimentales et pour une FTSD de -0,05 cm : longueur d'onde du laser $\lambda=1,064 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$; distance focale de la lentille $f=65 \text{ mm}$ et diamètre du faisceau laser $d=0,527 \text{ cm}$. Le diamètre a du faisceau au foyer vaut alors $a=3,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$. La distance $x=8 \cdot 10^{-2} \text{ cm}$ est déduite pour obtenir les valeurs de r rayon du faisceau au point d'impact : $5,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$, soit un **diamètre de faisceau de 104 μm** . La figure IV-48 schématise l'interaction laser-boîte de Pétri :

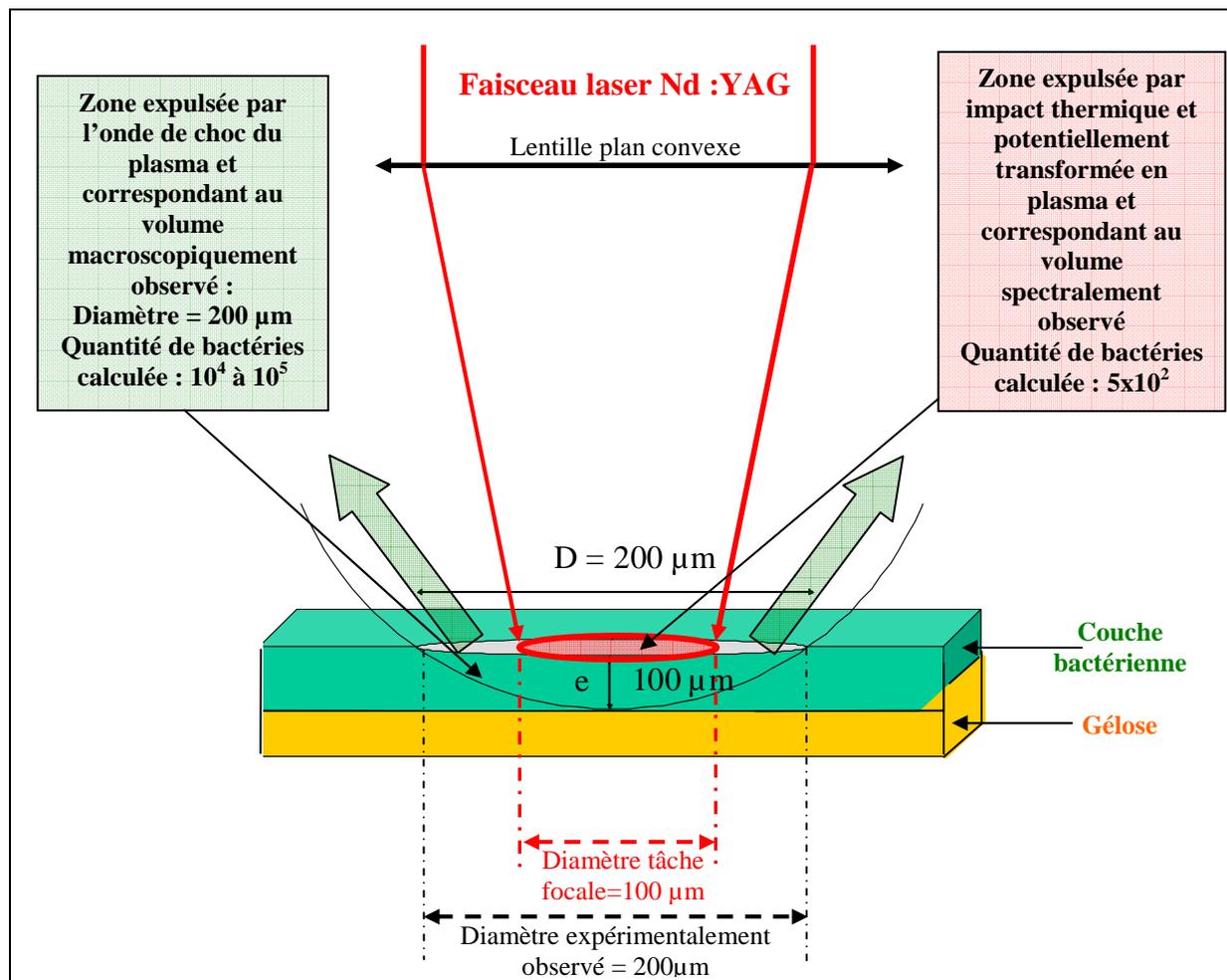


figure IV-48 : Schéma illustrant le diamètre expérimentalement observé et celui correspondant à la tâche focale du laser. Les quantités de bactéries contenues dans chacun des plasmas sont également indiquées.

Entre les deux surfaces considérées (diamètre du faisceau laser à l'impact = 104 µm ; diamètre expérimentalement mesuré = 200 µm environ), le rapport des diamètres est de 2, soit un rapport des surfaces de $2^2=4$. L'épaisseur e ablatée est commune : 100µm.

Dans ces conditions, la valeur du rapport égal à 4 se rapproche à un ordre de grandeur près du niveau des quantités de bactéries analysées sur les couches de gélose :

$$\frac{\text{quantité de bactéries potentiellement présentes dans le cratère ablaté}}{\text{quantité de bactéries présentes au niveau de l'impact du faisceau}} = \frac{10^4 \text{ à } 10^5}{10 \text{ à } 10^2} = 10^2 \text{ à } 10^4$$

En l'état actuel des mesures et des modèles, cette différence de un à deux ordres de grandeur ne peut être appréhendée tant que l'on n'aura pas déterminé si les bactéries émissives proviennent de la zone ablatée par la tâche focale du faisceau laser ou de celles présentes dans le cratère expérimentalement observé.

IV.5.8.2. Approche spectroscopique

Dans le chapitre III, des courbes d'étalonnage ont été établies pour les éléments Ca, Mg et Na. Une possibilité serait d'utiliser ces courbes en les appliquant aux intensités de raies Ca, Mg ou Na mesurées pour la quantité approximées de volume ablaté. Nous considérons le spectrogramme de la figure IV-49 mesuré avec le THR1000 sur la couche de *Bacillus atropheus* cultivé sur gélose TSA. Les paramètres utilisés ont été optimisés pour une détection optimale des intensités des raies P, et C notamment.

La figure III-15 de la page 110 donne l'équation III-19 de la droite de calibration pour l'élément magnésium avec la raie Mg(II) à 279,553 nm et selon un protocole présentant des conditions particulières (énergie de pulse : 100 mJ, densité énergétique = $4,7 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, etc.) :

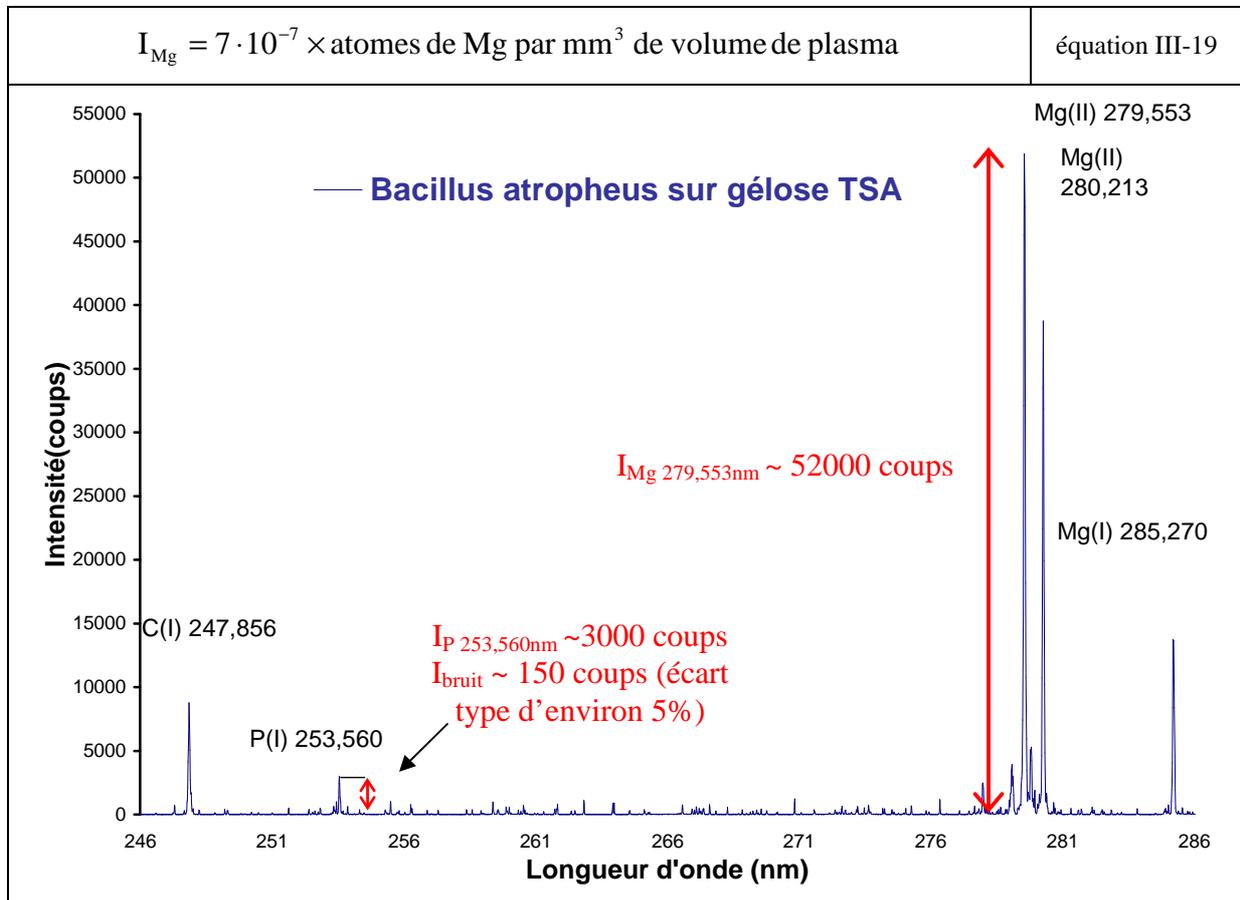


figure IV-49 : Spectrogramme bande réduite 246 à 286 nm obtenue avec le monochromateur THR1000 doté du réseau à 300 traits/mm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs , gain maximal (255)

Une possibilité serait d'utiliser la valeur de l'intensité I_{Mg} de la raie de Mg à 279,553 nm pour aboutir à la valeur initiale de matière échantillonnée et donc *in fine* à la quantité de bactéries présentes dans le plasma. La figure IV-49 de la page 194 indique $I_{Mg}=52000$ coups, d'où la quantité d'atomes Mg égale à environ $7,42 \times 10^{10}$ par mm^3 de volume élémentaire de plasma, sous l'hypothèse forte d'un transfert d'énergie similaire d'un plasma vers une surface ou vers un aérosol. Le tableau IV-5 de la page 145 permet de convertir cette quantité en nombre de bactéries de type *Bacillus* correspondantes : entre 10^1 et 2.10^2 .

Cette quantité apparaît en accord avec le modèle d'ablation établi précédemment et concluant à des valeurs légèrement supérieures jusqu'à un ordre de grandeur. Dans le cas des bactéries sur gélose une moindre quantité de matière serait analysée par rapport à l'analyse des particules d'aérosols : un effet de matrice semble donc intervenir. Les courbes de calibrage ont été faites sur de la matière particulaire suspendue dans l'air. Dans le cas des bactéries sur gélose, l'interaction plasma-couche bactérienne est différente avec davantage d'eau et la mollesse du matériau perturbant le couplage faisceau-bactéries, et par corollaire diminuant les quantités de matière ablatée.

→ A un facteur correctif près tenant compte de l'effet des matrices (à définir), les droites de calibration établies pour les aérosols inertes du chapitre III permettent donc d'approximer indirectement les quantités de bactéries détectables dans chaque plasma. Le modèle d'ablation des couches bactériennes et les observations expérimentales indiquent qu'environ 10^3 bactéries sont analysées par chacun des plasmas induits.

IV.5.8.3. Applications : sensibilité en phosphore provenant du *Bacillus atropheus* sur gélose

La figure IV-49 permet de préciser la sensibilité en élément phosphore provenant d'un matériau bactérien tel que *Bacillus atropheus*.

D'après les intensités des raies d'émission relevées et la gamme de bactéries présentes dans le volume ablaté sur les boîtes de Pétri (environ 10^2 bactéries analysées par chacun des plasma interagissant avec la couche bactérienne sur gélose), la raie du phosphore P à 253,560 nm est donc représentative de cette gamme de quantité de bactéries, d'où l'équivalence linéaire résumée dans le tableau IV-12.

	Quantité de <i>Bacillus atropheus</i> provenant des couches bactériennes sur gélose détectée par chacun des plasmas	
Quantité de bactéries présentes dans le volume ablaté	$10^3 - 10^4$	
Intensité de la raie (en coups)	P (253,560 nm) 3000	Mg (279,553 nm) 52000
Intensité d'émission correspondante pour une seule bactérie si modèle linéaire d'émissivité : $I_{P253,560nm}$ proportionnelle à la quantité de bactéries analysées	3 - 0,3	52 - 5,2
I_{bruit} : intensité du bruit spectral (en coups)	150	
Niveau d'acceptation d'une raie : critère IUPAC : $2 \times I_{\text{bruit}}$	300	
Quantité de bactéries émissives pour atteindre le critère IUPAC	$10^2 - 10^3$	<10 à $<10^2$

tableau IV-12 : Extrapolation des quantité minimale de bactérie de type *Bacillus* détectable par notre système LIBS selon un modèle d'équivalence linéaire des intensités de la raie de P à 255,560 nm

Précédemment, nous avons établi qu'une quantité de bactérie approximée à 10^3 était présente dans le plasma lors de l'ablation des couches bactériennes sur gélose. Le tableau IV-12 indique une valeur de **10^1 bactéries** devant être présentes dans le plasma pour observer le P. La nécessité d'accumuler de la matière bactérienne semble être la solution pour détecter le marqueur P issu d'échantillons bactériens très dilués, tels le cas des aérosols. Le recours à des filtres semble donc inévitable.

IV.5.9. Classification de différentes couches bactériennes par analyse en composantes principales

IV.5.9.1. Paramètres LIBS et préparations des données

Trois types différents de bactéries (*Bacillus atropheus*, *Micrococcus equiperdicus* et *Escherichia coli*) sont cultivés de façon analogue sur la gélose TSA.

Les analyses LIBS sont effectuées de la même façon qu'auparavant à $t = 24$ heures et à $t = 48$ heures, soit sur deux journées. 20 tirs sur des positions différentes de la gélose sont effectués pour chaque type de bactéries, soient 20 spectres par nature d'échantillon sont obtenus. En utilisant des régions spectrales englobant les intensités des 15 raies du tableau IV-11, page 189, une matrice de données est obtenue avec, en ligne les 15 intensités nettes relevées pour les observables en colonnes.

IV.5.9.2. Représentations des spectres réduits à 15 observables sur les 3^{èmes} composantes principales

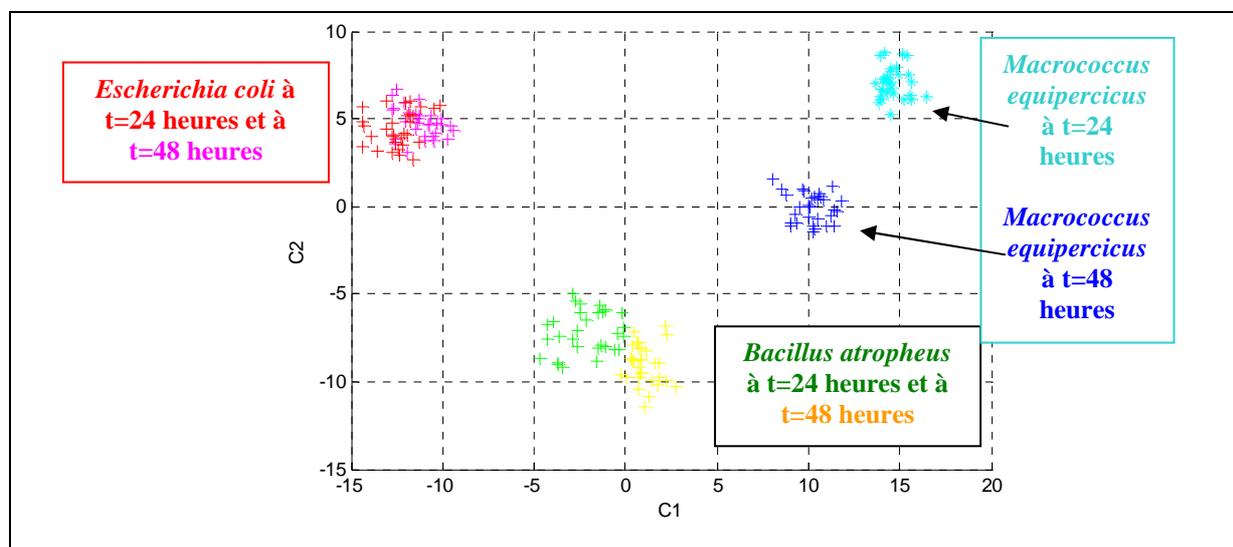


figure IV-50 : Analyse en composantes principales (ACP) illustrant la richesse des informations dans un spectre LIBS non limitée à quelques longueurs d'onde. Ici, l'ACP est appliquée à tout le spectre. Chaque point désigne un spectrogramme. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$, gain maximal (255)

Comme précédemment, selon la nature de la bactérie, les spectres se regroupent ensemble pour permettre une classification des échantillons. Les bactéries sont classées selon leur nature pour *Escherichia coli* et *Bacillus atropheus* quelque soit la durée de culture.

Cela n'est pas vérifié pour *Macrocooccus equipercicus*. La raison de cette déviation entre 24 heures et 48 heures de temps de croissance est difficile à établir étant donné qu'aucune pollution n'est venue enrayer le développement des cultures bactériennes similairement conservées :

- L'analyse des spectres montre des quantités plus importantes de minéraux (Ca, Mg, Na par exemple) détectés dans les bactéries à 48 heures par rapport à 24 heures.
- De plus, nous constatons un léger changement de teinte des bactéries lesquelles présentent une couleur plus sombre à 48 heures par rapport à 24 heures : des bactéries semblent être en train de dépérir.

La possible explication avancée est que ces bactéries ont atteint le maximum de leur développement en épuisant les nutriments de la gélose (d'où la concentration plus importante en minéraux à 48 heures comparée à 24 heures) ; les bactéries – faute de milieu nutritif – commenceraient à dépérir, ce qui explique le changement de couleur.

Quoiqu'il en soit, l'analyse de milieux vivants tels que les bactéries demeurent délicat car l'activité métabolique influe sur les quantités de nutriments, et donc d'éléments assimilés. Le phénomène est moins prononcé pour P, ce qui confirme l'intérêt du phosphore comme vu précédemment. La conception de bases de données devra être effectuées dans des conditions très précises en termes de durée de croissance et conditions de conservation avant analyses LIBS.

L'ACP prouve cependant encore une fois ses potentialités pour exploiter la richesse des données spectrales de toutes les raies des spectrogrammes de la LIBS. L'ACP classe les bactéries selon leur nature. L'indépendance du temps de croissance est même mise en évidence pour *Bacillus atropheus* et *Escherichia coli*.

IV.5.10. Conclusions sur les cultures bactériennes sur gélose

La LIBS détecte les marqueurs spectraux spécifiques de bactéries cultivées sur gélose. Cette étude a également permis de quantifier les limites de détection selon les éléments constituant les bactéries. L'analyse des nappes bactériennes sur gélose met aussi en lumière la moindre quantité de matière disponible par rapport aux cas des pastilles bactériennes. Néanmoins, même si le nombre de marqueurs spectraux diminue, des méthodes d'analyses multivariées des données permettent d'avoir accès à certaines caractéristiques intrinsèques de la nature des bactéries. Les aérosols représentent désormais le dernier cas à traiter concernant la forme de dispersion possible des bactéries.

IV.6. ANALYSES DE FLUX D'AEROSOLS BACTERIOLOGIQUES

Ces résultats ont fait partiellement l'objet d'une publication suite au congrès internationale High Temperature Plasma Processes 9th avec attribution d'un prix étudiant pour la présentation orale reliée [106]

IV.6.1. Objectifs

Les aérosols sont l'état physique courant des éléments biologiques aériens analysés dans l'environnement. L'analyse spectroscopique par la technique LIBS a été adaptée à l'analyse de particules solides sous forme d'aérosols. Cette méthode de détection est particulièrement adaptée à l'analyse *in situ* et en temps réel des échappements de particules métalliques retenues par un filtre. Elle se trouve être un moyen très fiable pour la caractérisation d'émissions toxiques industrielles.

Dans le but de valider le précédent protocole, nous considérons des échantillons représentatifs de situations opérationnelles. Des analyses LIBS sont effectuées directement sur des courants de particules bactériennes. Des interférents salins micrométriques sont simultanément dispersés pour simuler un bruit de fond atmosphérique.

Les objectifs à atteindre sont :

1. Appréhender le couplage de la LIBS sur des bactéries aérosolisées en terme de détection de marqueurs. Les aérosols bactériens représentent le cas opérationnel typique dans le cadre d'un épandage d'armes bactériologiques. Le chapitre III a illustré les limites de l'actuel système d'échantillonnage des particules par les plasmas successifs en terme de quantités peu importantes d'interaction plasma-particule(s).
2. Exploiter les marqueurs spectraux détectés à des fins idéales de classification des divers échantillons particuliers interagissant avec les plasmas induits. A l'instar de l'analyse des microgouttelettes calibrées et des bactéries en pastille ou sur gélose, des informations utiles peuvent cependant être extraites lorsque l'interaction plasma-particule(s) se produit.

IV.6.2. Préparation des échantillons

- Nature des bactéries

Pour simuler des suspensions aériennes de bactéries pathogènes *Bacillus anthracis* (BA) causant la maladie de l'Anthrax, deux bactéries *Bacillus globigii* (BG-1) et *Bacillus thurengiensis* (BT) non pathogènes sont utilisées pour leurs similitudes en termes de compositions élémentaires et propriétés aérodynamiques et morphologiques par rapport à BA. Elles sont fournies par le service de microbiologie du CEB et issue du soucier bactérien dudit centre selon la liste du tableau IV-13.

AGENT PATHOGENE	AGENTS SIMULANTS	
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus globigii</i> (BG-1) souche n°93/29 CEB/Pasteur	
	<i>Bacillus thurengiensis</i> (BT) souche 97/27 CEB	

tableau IV-13 : Référence des deux bactéries utilisées sous forme de courants particulières issus de nébulisation ultrasonique et photographies des suspensions liquides contenant 10^9 bactéries de *Bacillus globigii* (souche CEB 93/29 à droite) ou de *Bacillus thurengiensis* (souche CEB 97/89 à gauche)

▪ **Forme des bactéries étudiées**

Chacune des deux bactéries a été initialement cultivée dans des conditions similaires et selon les procédés classiques de microbiologie suivis au CEB :

- **Culture pendant 24 heures en suspension dans milieu nutritif à dominante organique** (type 2YT, cf. tableau IV-9, page 168)
- **Mise en suspension dans une solution tampon d'eau déionisée pour conservation**
- **Obtention de 50 mL de suspensions contenant 10^9 bactéries.mL⁻¹**

Deux suspensions de **BG-1** et **BT** – initialement sous forme végétative – sont alors soumises à des conditions de stress qui les forcent à sporuler. Les protocoles microbiologiques nécessaires à la sporulation impliquent des conditions de conservations sévères (baisse de température, absence de nutriments) pour obliger les bactéries de *Bacillus* à se contracter et à former une coque protectrice externe. Une suspension de **BT** est conservée à l'état végétatif.

▪ **Mode de dispersion**

Au moyen d'un nébuliseur, les bactéries sont suspendues sous forme de gouttelettes micrométriques dans un circuit clos connecté au mini-tunnel aérodynamique du Centre d'Etude du Bouchet. Une buse isocinétique est liée au mini-tunnel et prélève des particules biologiques suspendues pour les envoyer vers le réacteur « gaz/aérosols » du dispositif LIBS. Un granulomètre APS (modèle TSI 3320) est connecté en sortie de réacteur pour à la fois mesurer la granulométrie des particules et les aspirer à 5 L.min^{-1} . Les concentrations obtenues sont de l'ordre de **100 particules par cm³**.

IV.6.3. Paramètres d'acquisition

- Laser utilisé : CFR 200 cadencé à 1 Hz – Energie du pulse = 100 mJ
- Réacteur utilisé : chambre pour particules
- Distance focale de la lentille = 30,7 mm
- Distances : fibre optique/plasma = 5 mm – Point focal/surface (FTSD)= 0
- **Densité d'énergie induite à la position de formation du plasma = $2 \cdot 10^{12} \text{ W.cm}^2$**
- Spectromètre utilisé : Andor Mechelle avec détecteur iCCD Andor iStar WR
- Délai avant acquisition = 1 μs et durée d'acquisition = 20 μs
- Nombre de tirs par série = 100 – Nombre de plasma par spectre = 1
- Nombre de séries par type d'échantillon = 1
- Traitement ACP de chaque spectre brut

IV.6.4. Spectrogrammes large bande spectrale

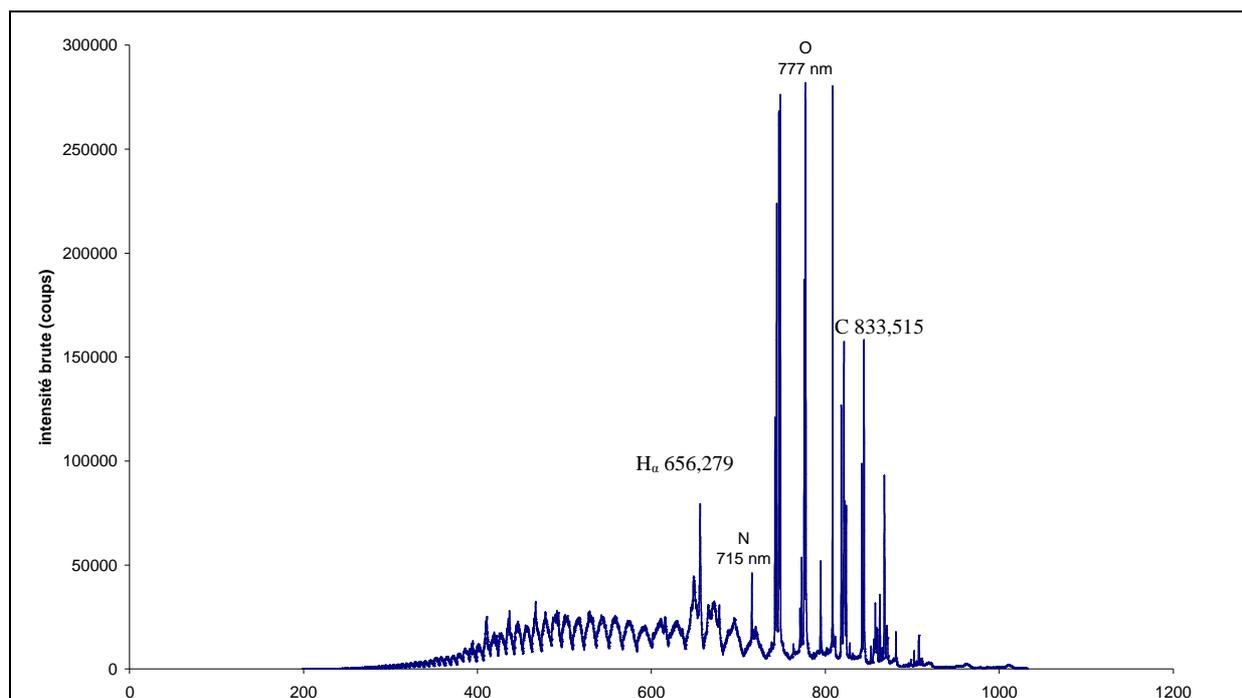


figure IV-51 : Spectre d'un tir laser sur l'air environnant les particules. Paramètres LIBS : pulse d'énergie = 100 mJ, spectromètre large bande de type Echelle avec délai avant acquisition = 1 μs et durée d'acquisition = 20 μs . Nombre de tirs par série = 100, nombre de plasma par spectre = 1, nombre de séries par type d'échantillon = 1

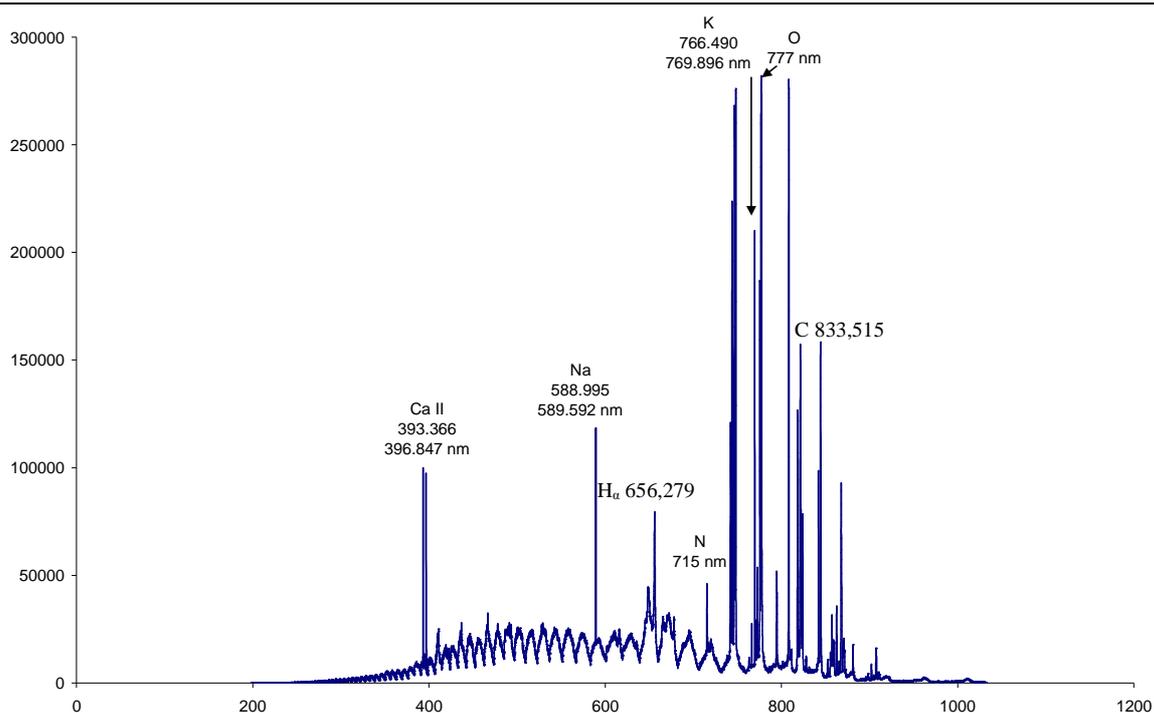


figure IV-52 : Spectre d'un tir laser sur une dispersion de *Bacillus globigii* n°1. Paramètres LIBS : pulse d'énergie = 100 mJ, spectromètre large bande de type Echelle avec délai avant acquisition = 1 μ s et durée d'acquisition = 20 μ s. Nombre de tirs par série = 100, nombre de plasma par spectre = 1, nombre de séries par type d'échantillon = 1

IV.6.5. Liste des marqueurs détectés

Comme pour les expériences faites avec des particules salines et présentées dans le chapitre précédent, une détection discrète des particules présentes ou non au sein du plasma est observée. Pour chaque type d'échantillon dispersé, deux types de spectres sont obtenus représentatifs ou non d'une interaction plasma-particule(s). Tous les spectres sont caractérisés par les raies élémentaires issues des particules présentes dans le plasma. Comme observé sur la figure IV-51 et la figure IV-52, en plus des raies issues de l'air environnant les particules (**N**, **H** et **O** essentiellement), les éléments suivants sont détectés :

Eléments détectés	Longueurs d'onde correspondantes (nm)
Magnésium (atomique et ionique)	279,553 – 280,270 – 285,213
Calcium (atomique et ionique)	393,366 – 396,847
Sodium (atomique)	588,995 – 589,552
Potassium (atomique)	766,490 – 769,896
Carbone (atomique)	833,515

tableau IV-14 : Eléments détectés par LIBS sur les courants de particules bactériennes

IV.6.6. Discussion

Les éléments détectés – **Mg, Ca, Na, K** et C – sont liés à la nature des particules présentes.

IV.6.6.1. Absence de raies du phosphore

Contrairement à l'analyse de bactéries sous forme de pastilles massives faites dans la partie précédente, **aucune raie du phosphore n'est détectée**. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence :

1. **Quantité faible de matière détecté** : l'absence de raies du phosphore semble directement reliée aux faibles concentrations particulières ($100 \text{ particules.cm}^{-3}$). La quantité de particules au sein de chaque plasma lui-même de taille millimétrique (environ 1 mm^3 , soient 10^{-3} cm^3) atteint alors des valeurs maximales de 0,1. Or, comme vu précédemment, il faudrait 10^1 à 10^2 bactéries présentes à l'intérieur du plasma pour observer les raies du P. Dans le cas des pastilles bactériennes pures et homogènes précédemment analysées, le matériel biologique était en quantité très importante comparé à la quantité d'analytes contenu dans une bactérie isolée sous forme d'un aérosol.
2. **Faiblesse de la courbe de réponse du détecteur iCCD relié au spectromètre Echelle pour les longueurs d'ondes inférieures à 300 nm**. Ce phénomène est aggravé par l'impossibilité de contrôler la position de la particule au sein du plasma, et donc la quantité de matière maximale vaporisée et excitée par le plasma. De même, aucune accumulation de plasma sur un même spectre n'est possible pour amplifier ce type de raies car l'échantillon bactérien est détruit par le premier plasma.

Le fait de ne pas observer le P est uniquement dû au problème de sensibilité du spectromètre large bande dans l'UV, domaine de longueur d'onde du phosphore (253,560 nm).

IV.6.6.2. Conclusion sur le faible nombre de raies détectées sur l'analyse LIBS d'aérosols bactériens

Même si les teneurs en **Ca, Na, Mg, K, C** sont faibles en valeurs absolues (quelques 10^{-12} g par bactérie), les raies correspondantes sont typiquement très émissives. La technique LIBS présente des limites de détection inférieures au ppm. A la vue de la concentration particulière employée ($0,1 \text{ particules.cm}^{-3}$) et en appliquant les considérations statistiques abordées dans la précédentes parties, on peut noter que chaque plasma correspond à l'analyse d'une seule particule.

IV.6.7. Applications des méthodes de classifications par méthode statistiques

IV.6.7.1. Introduction

Les éléments détectés proviennent des bactéries : l'analyse LIBS est donc représentative des aérosols bactériens même si l'élément phosphore n'est pas mesuré à cause de la sensibilité inadéquate du détecteur employé. Les données spectrales sont exploitées par l'analyse en composantes principales (ACP). L'étude des particules d'aérosols salins du précédent chapitre a mis en évidence l'aléa de la rencontre plasma-particule(s) laquelle devra idéalement être augmenté par des dispositifs de prélèvement et de focalisation dédiés. Dès lors qu'une interaction plasma-particule(s) monodispersée est effective, une variabilité dans les intensités des analytes d'intérêt est observée. Elle est causée par l'impossibilité de contrôler la position exacte de la matière particulaire dans ou en périphérie du plasma. Cette variabilité est d'autant plus accentuée que les teneurs en analytes sont faibles et proches du bruit de fond spectral. L'intensité des raies peuvent donc peu intense. Le fait de considérer les signaux des éléments d'intérêt les plus importants permet l'établissement de dosage élémentaire par des droites de calibrage.

La problématique de notre étude dépasse cependant le cadre du dosage élémentaire pour considérer la détection, voire l'identification d'échantillons bactériens. Pour ce dessein et en s'inspirant de la méthodologie développée dans le chapitre précédent, un traitement statistique et multivarié est effectué sur les données d'analyses LIBS de courants particulières d'aérosols et de modèles d'interférents.

IV.6.7.2. Analyse en composantes principales des données analytiques LIBS

IV.6.7.2.1. Préparation des données sous forme matricielle

Les données des spectres établis lors d'interactions plasma-particules (spectres sélectionnés) sont mises sous la forme de matrices. Chaque colonne \mathbf{j} représente une longueur d'onde $\lambda_{\mathbf{j}}$. Chaque ligne \mathbf{i} représente une observation, ici le spectre d'un échantillon analysé par un seul plasma. $\mathbf{I}_{\mathbf{ij}}$ est l'intensité correspondante.

Les spectres de tous les échantillons sont regroupés dans une matrice unique \mathbf{X} de données. \mathbf{X} est soumise à l'analyse en composantes principales (ACP).

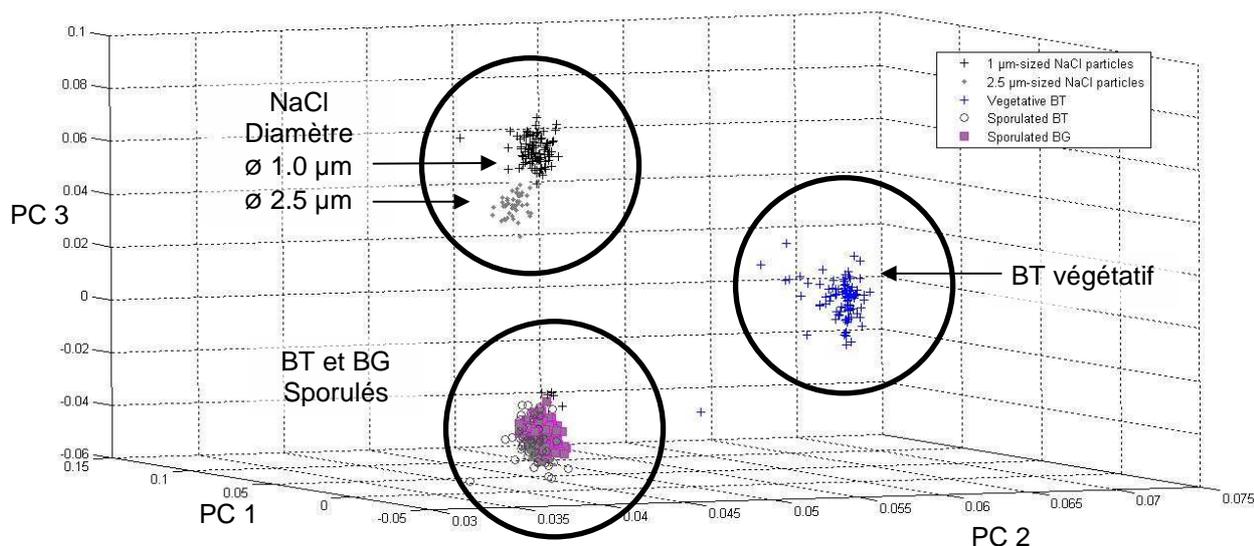


figure IV-53 : Discrimination par analyse en composantes principales des différents courants de bactéries et des sels interférents. Bases des composantes principales : C, P, Mg, Ca, K, Na

IV.6.7.2.2. Résultats de l'analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) des différents spectres génère la classification des spectres par groupes dans l'espace des composantes principales comme illustré par la figure IV-53. Les espèces bactériennes et les particules salines sont bien discriminées simplement par l'analyse. Une classification de ce nombre limité d'échantillons particuliers micrométriques (deux types de sels et trois bactéries) est effectuée. Le classement des échantillons en groupes séparés est intrinsèquement lié à leur nature.

➤ Présence des interférents salins

En considérant les particules de NaCl, nous notons que les spectres sont rassemblés dans un même groupe. Une observation plus précise de ce groupe indique que les spectres se séparent également selon les différents diamètres et donc les différentes quantités de matières. L'ACP fournit des informations qualitatives en permettant un classement des spectres selon la quantité de matière – ici NaCl – analysée par chaque plasma.

➤ Bactéries BT et BG sous forme de spores

Aucune distinction n'est observée entre les bactéries **BG** et **BT** puisqu'un seul groupe est formé. L'intérêt d'un seul regroupement est de classifier les spores analysées quelque soit l'espèce de *Bacillus* – ici *thurengiensis* ou *globigii* – cultivée dans des conditions similaires.

Si le P, spécifique des bactéries était détecté, la classification serait améliorée. Cependant, les résultats obtenus sont acceptables et optimistes dès lors qu'une solution sera trouvée pour doser le P de bactéries aérosolisées.

➤ Bactérie sous forme végétative

Les bactéries **BT** sous forme végétative apparaissent séparées des autres échantillons de **BT** sous forme sporulée. La configuration végétative correspond à l'état actif des bactéries de type *Bacillus* lesquels se multiplient grâce aux nutriments présents dans leur environnement avant dispersion.

Comme abordé dans la partie précédente, la composition élémentaire des bactéries est directement liée à l'activité métabolique laquelle affecte les teneurs élémentaires. En conséquence, les marqueurs spectraux basés sur les éléments détectés par la LIBS diffèrent en qualité et quantité. Ce fait est mis en évidence par l'ACP laquelle est basée sur les raies d'émission détectées et qui constituent les spectres large bande.

La configuration physique des bactéries dites végétatives est différente de celle des spores. En effet, pour faire face aux conditions externes sévères, les bactéries de genre *Bacillus* se contractent d'elles-mêmes et se protègent en formant une coque externe protectrice. Cette enveloppe contient une grande quantité d'acide dipicolinique (15% en poids) liée avec des cations calcium (cf. partie IV.2.2.3). Les teneurs importantes en Ca expliquent les raies intenses détectées par LIBS et affectent directement les résultats en ACP.

IV.6.7.3. Bases d'une classification par ACP pour une détection d'alerte d'échantillons

Les expériences précédentes traitées en ACP ont mis en lumière la possibilité de classer plusieurs échantillons de taille micrométrique et de natures différentes.

Ce procédé de classification des échantillons peut présenter un intérêt en terme de détection d'alerte suivant les étapes :

- 1. Dès lors qu'une entité particulière inconnue (bactérie, pollen, suie, poussière, etc.) est échantillonnée et analysée par le plasma induit par laser, un spectrogramme est généré avec des paramètres LIBS établis.**
- 2. Chaque spectre représentatif d'une interaction est préalablement sélectionné.**
- 3. Les spectres sélectionnés sont regroupés dans une matrice de données à analyser par ACP.**
- 4. L'ACP de cette matrice permet de positionner chaque spectre selon sa nature dans l'espace des composantes principales calculées. Le développement initial de bases de données incluant des échantillons de référence pourrait être d'intérêt à des fins de classification d'échantillons inconnus. Chaque échantillon de référence verrait son spectre (après traitement préparatoire) se positionner dans une zone précise de l'espace des composantes principales.**

IV.7. CONCLUSIONS

L'objectif essentiel du chapitre précédent était la mise en place de courbes de calibrage pour certains éléments (Na, Mg et Ca) présents dans des modèles d'aérosols calibrés en tailles et compositions. Ce travail a permis de quantifier de façon absolue la matière présente dans chacun des plasmas induits par laser et de dimensions millimétriques. L'emploi du critère IUPAC et la connaissance exacte de la nature et des quantités d'atomes analysés par le milieu plasma lui-même calibré en dimensions (volume de quelques mm³) et densité d'énergie (ordre de grandeur : 10¹¹ W.cm⁻²) ont permis de connaître les quantités d'atomes détectables par volume élémentaire. Ainsi, les chaînes d'excitation (système optique de focalisation du pulse laser) et de mesure (collection et analyse résolue des émissions par un spectromètre) sont entièrement calibrées pour connaître la quantité élémentaires analysée à des teneurs de quelques femtogrammes (10⁻¹⁵ g) pour les éléments Ca, Mg et Na.

L'outil de référence mis en place permet alors de doser des marqueurs atomiques à des teneurs compatibles avec les concentrations élémentaires des structures chimiques inertes ou biologiques de dimensions micrométriques. Les différentes formes d'échantillons traitées (matière massive et particules micrométriques suspendues dans l'air) ont montré l'adéquation en sensibilité de la LIBS pour doser des quantités de matière aussi faibles que celles présentes dans une seule bactérie de *Bacillus*. La détection de multiples marqueurs spectraux (Ca, Mg, P, K, etc.) représentatifs des structures bactériennes d'intérêt et leur exploitation par une méthode d'analyse multivariée des données (analyse en composante principale ou ACP) permettent

l'élaboration de bases de données pour classifier des échantillon selon leur nature. Malgré la complexité des échantillons bactériens évoluant continuellement avec leur environnement, la LIBS permet une discrimination d'un nombre limité d'échantillons biologiques par rapport à des structures inertes.

L'analyse d'aérosols suspendus a cependant confirmé la problématique d'une sensibilité insuffisante pour détecter certains marqueurs spectraux dès lors que quelques particules sont présentes dans le volume du plasma. Les calculs et les expériences ont démontré qu'une quantité minimale de 10 à 100 bactéries est nécessaire pour obtenir un nombre de marqueurs spectraux suffisants. Ce constat force à considérer la nécessité d'employer des systèmes accumulant la matière d'intérêt. L'usage de filtre pourrait être la solution.

Cette partie a contribué à mettre en exergue la polyvalence d'emploi de la technique LIBS grâce aux différentes phases traitées (surface dense et concentrée en matière des pastilles, structure gélifiée et diluée des couches bactériennes sur boîtes de Pétri et aérosols suspendus). L'étude des différentes formes de dispersion des bactéries a permis d'appréhender progressivement et méthodiquement la sensibilité de la méthodologie LIBS selon le type d'échantillon considéré.

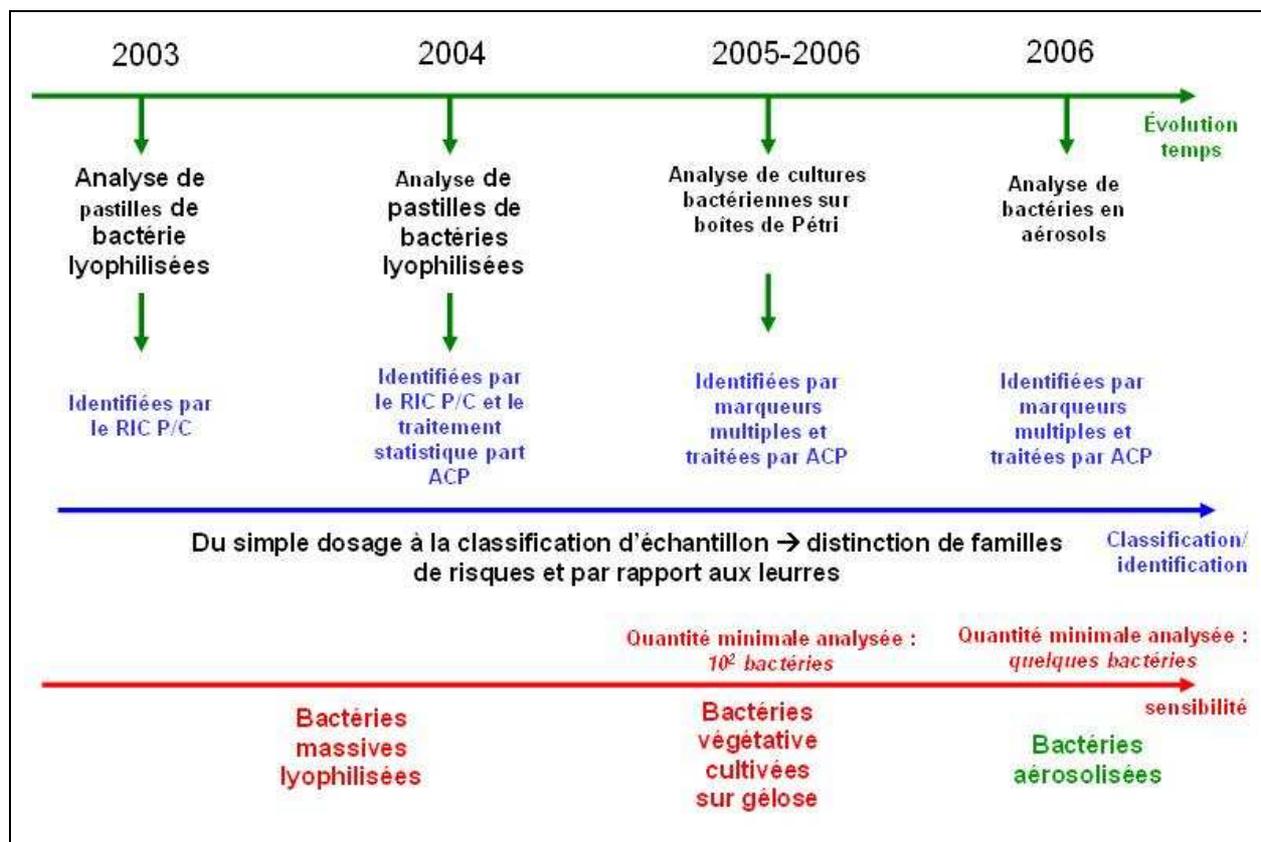


figure IV-54 : Diagramme récapitulatif des acquis dans l'expertise de matériaux biologiques par LIBS

V. CAHIER DES CHARGES POUR UN DEMONSTRATEUR LIBS TRANSPORTABLE

V.1. APPORTS DE LA METHODOLOGIE LIBS

Les chapitres précédents ont mis en évidence les caractéristiques de la méthodologie LIBS en termes d'outil analytique :

- **Sensible** : le chapitre III a présenté des courbes de calibration pour les éléments Ca, Mg et Na. Les plasmas induits et observés permettent la détection qualitative et quantitative de teneurs suffisamment basses pour pouvoir doser quelques bactéries comme illustré dans le chapitre IV. En ce sens, la LIBS constitue un outil de détection en phase avec la mesure des doses toxicologiques de traces de contaminations.
- **Fiable** : en combinant la reproductibilité des données spectrales issues des plasmas imagés, des bases de marqueurs spectraux peuvent être exploitées pour classifier les échantillons selon leur nature intrinsèque. La LIBS apparaît donc comme un outil de diagnostic d'échantillons inconnus sous toute physique.
- **Rapide** : le temps de relaxation du plasma (inférieur à 10^{-6} s), ainsi que sa résolution spectrale par spectrométrie large bande sous forme de marqueurs exploités statistiquement représente une durée totale d'une seconde environ. La répétitivité des mesures LIBS permet donc de qualifier la LIBS comme une méthode d'alerte.

La combinaison des qualités de la LIBS avec la miniaturisation des technologies constituant une chaîne de génération et d'acquisition des plasmas induits par pulse laser ouvrent la voie à la conception d'un appareil sensible, fiable et rapide d'analyse *in situ* d'échantillons.

V.2. MOTIVATIONS POUR LE DEVELOPPEMENT D'UN DETECTEUR LIBS DE TERRAIN

Les armées françaises sont aujourd'hui équipées de systèmes portables bien adaptés à la détection d'agents chimiques militaires (vésicants, organophosphorés). Une nouvelle génération de systèmes est cependant nécessaire pour étendre les capacités de détection aux agents biologiques et aux matériaux toxiques militaires.

Depuis près de vingt années, les développements exploratoires effectués par le département « Détection Physique » du Centre d'Etudes du Bouchet (CEB) sur la méthodologie LIBS ont permis d'appréhender ses potentialités pour détecter des toxiques chimiques sous formes

gazeuses (H. Lancelin [1]) et solides (L. Dudragne [2]) et pour alerter de la présence d'agents biologiques (S. Morel [3]). Afin d'évaluer les possibilités analytiques de la technique LIBS en dehors du laboratoire à des fins de détection sur le terrain de la contamination, la Délégation Générale pour l'Armement (DGA) – sur proposition directe du CEB – a permis le développement d'un dispositif analytique transportable basé sur le principe LIBS.

A partir de l'expertise technique et scientifique du CEB et grâce aux travaux préparatoires présentés dans ce rapport, la réalisation matérielle du démonstrateur a été confiée à un consortium (société Thales Security Services associée au Commissariat à l'Energie Atomique). Les critères initiaux demandés pour concevoir le détecteur LIBS transportable apparaissent sous la forme de 7 fonctions liées aux performances et aux capacités opérationnelles :

V.3. CAHIERS DES CHARGES FONCTIONNELLES POUR UN DETECTEUR D'ALERTE ET DE CONTROLE DE CONTAMINATIONS BIOLOGIQUE ET CHIMIQUE

Le démonstrateur doit répondre aux fonctionnalités analytiques et ergonomiques suivantes :

- **Fonction n°1** : permettre la détection de particules biologiques pathogènes (*Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, etc.) à partir de concentrations de 25 colonies bactériennes par litre d'air ambiant.
- **Fonction n°2** : permettre la détection de composés chimiques et des toxiques industriels chimiques contenant des éléments hétéroatomiques tels que : Cl, S, As, P, F, Br.

Catégories	Exemples types	Aspect	Voie de pénétration	Dose létale par inhalation DL ₅₀ mg.min.m ⁻³
Suffocants et toxiques du sang	Chlore Cl ₂ Phosgène COCl ₂	Gaz	Respiratoire	19 000 3 200
Vésicants	Ypérite C ₄ H ₈ Cl ₂ S Lewisite C ₂ H ₂ Cl ₃ As	Liquide peu volatil	Cutanée et respiratoire	1500
Neurotoxiques	Agents-G : Tabun (GA) C ₅ H ₁₁ O ₂ N ₂ P Sarin (GB) C ₄ H ₁₀ O ₂ FP Soman (GD) C ₁₇ H ₁₆ O ₂ FP	Liquide très volatil	Cutanée et respiratoire	300 100-200 40-70
	Agents-V : VX C ₁₁ H ₂₆ O ₂ NPS	Liquide peu volatil	Cutanée	35-45

tableau V-1 : Liste des gaz de combat avec formules chimiques et effets

- **Fonction n°3** : donner une information exploitable par l'opérateur sur le risque biologique (B) et chimique (C)
- **Fonction n°4** : pouvoir être déployé sur le terrain
- **Fonction n°5** : être apte au stockage et au transport

- **Fonction n°6** : résister aux agressions de l'environnement naturel
- **Fonction n°7** : résister aux agressions dues au contexte militaire

V.4. DEVELOPPEMENT DU DEMONSTRATEUR OPERATIONNEL LIBS

V.4.1. Les développements de démonstrateurs LIBS : revue bibliographique

Depuis le congrès international LIBS 2004 [107], des conférences et des groupes de travail sont annuellement organisés pour présenter les dernières avancées scientifiques et techniques conduisant aux développements d'outils analytiques basés sur le principe de la LIBS. Les acteurs opérationnels intéressés par les questions de sécurité militaire et civile (Etats major techniques des armées, spécialistes de la Protection Civile) se regroupent pour débattre, proposer leurs besoins et tester les développements de matériels opérationnels transportables ou portables utilisant la LIBS pour des applications d'analyses plus ou moins dédiées à des types d'échantillons (surfaces, gaz, etc.).

Les applications LIBS pour l'analyse de matériaux en liaison avec le secteur de la sécurité militaire et civile (détection de mines (études des alliages), de résidus explosifs (rapports stoechiométriques des C/N/O des molécules explosives, etc.) se développent. [108] [109] [110] Cet essor confirme et justifie nos désirs initiaux d'appréhender à la fois tous les cas de figure opérationnels en terme d'échantillonnage (analyse d'atmosphère contaminée par des gaz toxiques, expertise de contamination de surface et de surfaces inconnues, détection d'aérosols déposés ou suspendu, etc. tant dans les domaines des risques chimiques et biologiques). De plus, nos derniers choix de matériels miniaturisés et à large bande spectrale vont dans le sens d'une transportabilité hors du laboratoire et de la recherche multiélémentaire étant données la diversité des menaces et donc des identifiants spectraux à détecter.

Une revue bibliographique a été effectuée pour illustrer les potentialités de la technique LIBS à être transposée vers des outils de terrain à usage spécifique.

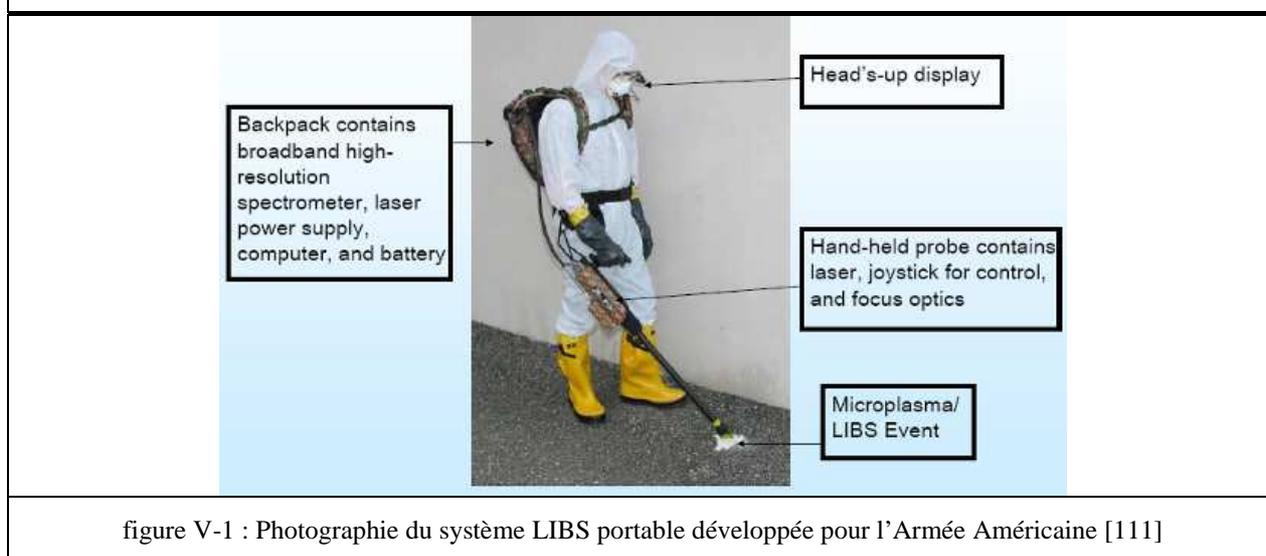
V.4.1.1. DéTECTEURS LIBS PORTABLES

➤ **Appareil portable par un militaire en opération**

Miziolek *et al* ont présenté en juillet 2004 un prototype d'appareil portable LIBS (*Man Portable LIBS* ou MP LIBS, cf. figure V-1 [111]) pour que les personnels militaires de l'Armée américaine analysent sur le terrain des surfaces potentiellement contaminées par des agents chimiques ou biologiques ou des explosifs. Le système se présente sous la forme d'une canne

portative contenant un laser Nd :Yag miniaturisé délivrant des pulses de longueur d'onde 1064nm sur la surface à analyser (énergie de pulse = 35 à 50mJ, fréquence =0,5 Hz). Les émissions radiatives issues du plasma sont collectées et focalisées vers une fibre optique reliée à un ensemble de monochromateurs miniaturisés mis en série pour couvrir un large domaine spectral de 200 à 980 nm avec une résolution de 0,1 nm. Le spectromètre est lié à un ordinateur et le tout est alimenté par une batterie : l'encombrement compact et la masse (12 kilos) de l'ensemble permet son transport dans un sac à dos (autonomie : 2 heures).

Cependant la puissance laser utilisée ne permet d'induire des plasmas que sur surface et non dans l'atmosphère. Aucune performance n'a été publiée pour cet appareil qui testé sur des matériaux massifs uniquement et jamais de traces.



➤ **Détecteur LIBS pour analyse du sol de la planète Mars**

Pour l'analyse en temps réel et *in situ* des éléments des roches (Ni, Fe, Zn, etc.) de Mars, la NASA et le CEA développent pour fin 2009 un détecteur LIBS miniature pour l'analyse à une distance de 5 mètres [112]. Un mini laser Nd :YAG fonctionne à 0,5 Hz et délivrant des pulses d'énergie 25 mJ. Un télescope collecte les radiations du plasma et les transmet à un mini monochromateur haute résolution doté d'un détecteur sur une plage réduite de longueur d'onde [113]. L'usage de l'outil est très spécifique.

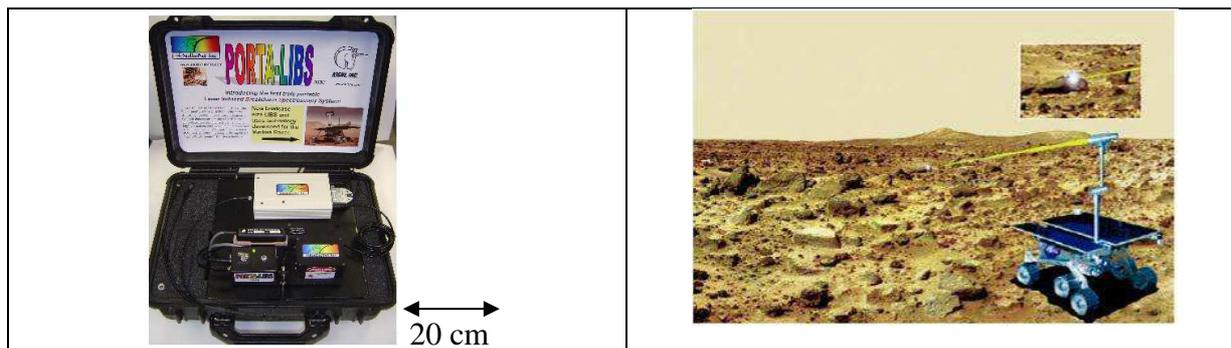


figure V-2 : Démonstrateur LIBS [112] NASA/CEA – Schéma de principe pour sols martiens (pression 7 torr)

V.4.1.2. DéTECTEURS LIBS TRANSPORTABLES

La société anglaise Foster+Freeman commercialise un appareil transportable pour l'analyse locale de comprimés pharmaceutiques [114]. Cet outil n'est conçu que pour analyser ce type d'échantillon solide et régulier pour détecter des raies dans un domaine réduit (200-600nm) avec un laser Nd :YAG à 1064 nm d'environ 50 mJ uniquement adapté à l'analyse de solides.



figure V-3 : Démonstrateur LIBS Ecco pour l'analyse de pastilles médicamenteuses [114]

La revue bibliographique sur les outils LIBS utilisable sur le terrain montre qu'ils sont toujours très spécifiques d'un échantillon : l'analyse de surface réclame moins d'énergie par pulse laser (inférieure à 50 mJ), ce qui permet la sélection d'équipements compacts. Or les fonctions demandées au démonstrateur LIBS est de pouvoir considérer tout type de famille de risques (surfaces, contaminations de surface, mais aussi gaz et aérosols nécessitent des énergies plus importantes (environ 100 mJ) et des protocoles d'acquisition différents. La diversité des menaces chimiques ou biologiques nécessite de dimensionner un système analytique regroupant tous les acquis effectués au CEB.

V.4.2. Cahier des charges recherchées pour un démonstrateur opérationnel

LIBS

Le chapitre II a décrit les matériels utilisés dans les dispositifs LIBS de laboratoire. Le renouvellement de matériels a mis en évidence une miniaturisation des composants tout en préservant les performances (sensibilité, résolution spectrale) et en augmentant la quantité d'informations spectrales :

- laser ns Nd :Yag compact fournissant des pulses énergétiques (de 10 à 200 mJ) à fréquence élevée pour reproduire et accumuler des tirs (> à 10 Hz),
- spectromètres large bande conciliant résolution spectrale importante ($\lambda/\Delta\lambda=5000$), large réponse spectrale (200 à 1000 nm sans coupure) et compacité
- détecteur iCCD intégrant un générateur de porte et alimenté électriquement par une simple carte contrôleur connectée à un ordinateur compact.

La compacité a permis de rendre mobile les différents composants pour s'extraire du laboratoire afin d'analyser des échantillons sans les déplacer. Les choix technologiques décidés pour les nouveaux dispositifs LIBS vont bien dans le sens de la revue précédemment établie à propos des développements portatifs et mobiles de dispositifs LIBS. Ces remarques sont importantes si l'on considère les applications intéressant la DGA : la détection d'alerte et de contrôle de la présence d'agents chimiques (C) et biologiques (B). Ces échantillons constituent un challenge analytique en termes de dimensionnement d'un démonstrateur opérationnel LIBS car ils peuvent apparaître sous plusieurs phases physiques : gaz de combat, toxiques déposés en surface, aérosols bactériens, etc. Les travaux menés depuis près de 20 années au CEB concernant la LIBS ont défini les meilleures configurations pour les différents types d'échantillons constituant la menace :

	GAZ/AEROSOL	SURFACES
Configurations énergétiques	<p>Nécessité de générer des densités de puissances élevées : $10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$. Paramètres classiques adoptés : pulses d'énergie 100 mJ et de durée de quelques ns focalisés avec une lentille plan convexe de longueur focale de 6,5 cm</p>	<p>Seuil de claquage < seuil de claquage de gaz : quelques mJ (par exemple 10 mJ) focalisé avec une lentille de longueur focale de 13 cm permet l'induction d'un plasma de surface (densité de puissance typique de l'ordre de 10^9 W.cm^{-2})</p>
Echantillonnage et observation des radiations	<p>Gaz : occupe systématiquement tout le volume du plasma. L'optimisation du rapport (signal émis/bruit spectral) est le problème essentiel résolu par la succession de plusieurs centaines de plasmas induit par des laser présentant une fréquence de tir élevée (de 10 à 50 Hz).</p> <p>Particules d'aérosols suspendues : échantillonnage statistique dû à l'aléa de positionnement des particules micrométriques dans le plasma. Il faut forcer les particules à se positionner dans le plasma (filtration sur membranes pour concentrer la matière particulaire, concentration aérodynamique des particules, conception d'une barrière optique générant un plasma si et seulement si les particules sont présentes à la position de formation du plasma, etc.)</p>	<p>La distance entre la longueur focale et la surface à analyser est très importante en terme de rapport signal/bruit. De 1 à 10 tirs sont nécessaires pour explorer une surface contaminée ou non.</p>

Tableau V-2 : Méthodes analytiques employées selon l'échantillon d'intérêt pour dimensionner les matériels du démonstrateur opérationnel LIBS

V.4.3. Caractéristiques de la chaîne de mesure LIBS développée

V.4.3.1. Description du concept

Pour répondre aux contraintes imposées par la détection de composés chimiques et biologiques dans des conditions de terrain la figure V-4 illustre le concept choisi avec 4 composantes :

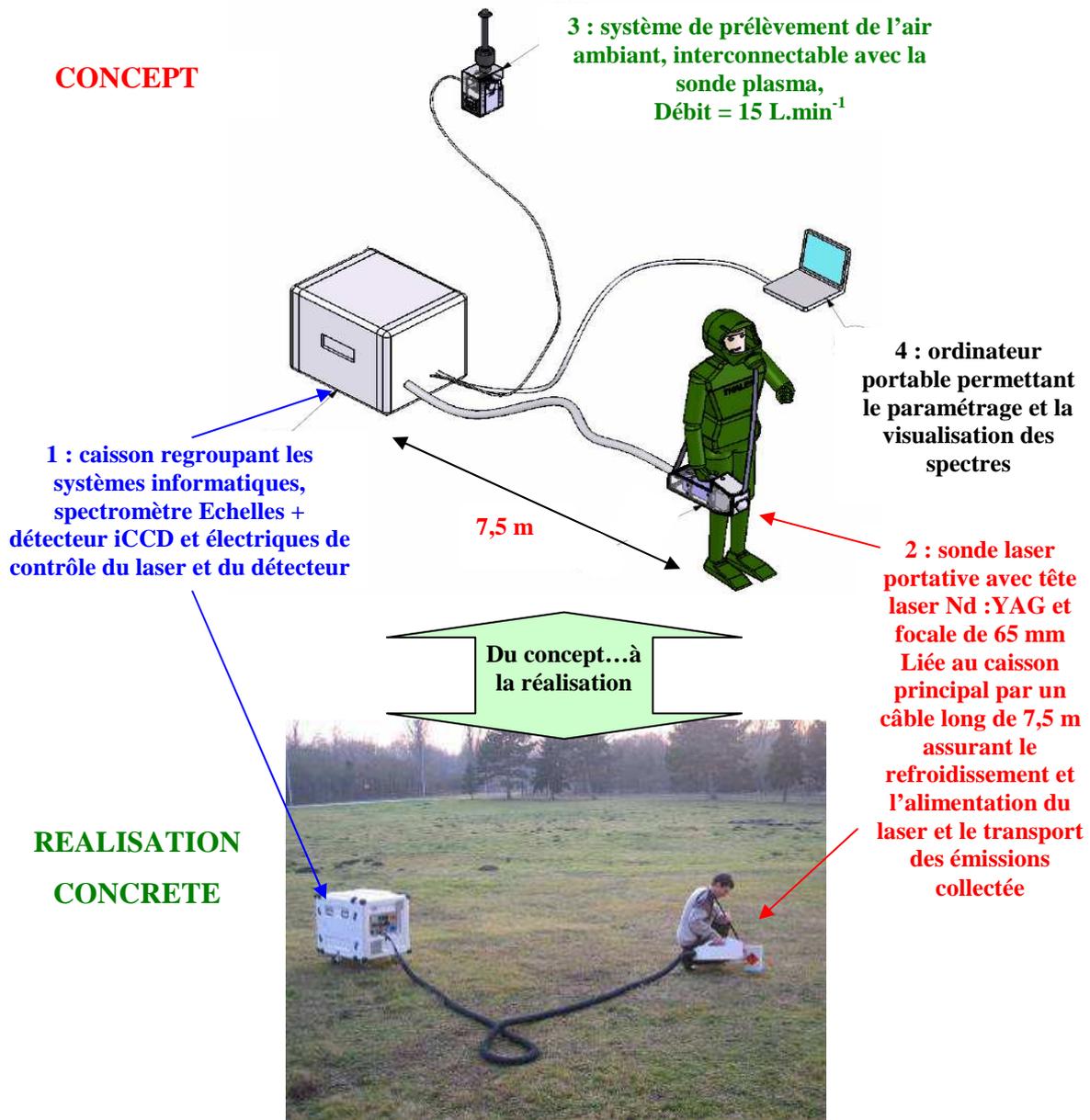


figure V-4 : Concept schématisé d'utilisation du démonstrateur opérationnel LIBS

1. **Un container mobile en résine** (volume $\approx 1\text{m}^3$, poids $\approx 70\text{ kg}$, déplacement sur roulettes, portable à deux personnes). Il comprend la gestion électrique et le système de refroidissement du laser, le spectromètre Echelle (marque Andor, modèle Mechelle 5000) et sa caméra iCCD (marque Andor, modèle iStar734). Un serveur informatique assure la gestion des différents périphériques du système et l'enregistrement des spectres.
2. **Une sonde portable pour l'analyse de surface ou de l'atmosphère ambiante et liée au container principal par un câble long de 7,5 m.** La sonde est constituée de la tête laser comprenant les optiques de collection du signal provenant du plasma ainsi que le laser (Quantel Big Sky CFR200 nanoseconde pulsé à 15 Hz ($\lambda=1064\text{ nm}$), énergie maximale de

pulse : 200 mJ max), le tout relié au container par un toron de 5 mètres. Pour l'analyse de surface, il suffit de poser le cône métallique fixant une valeur de FTSD de -1mm contre toute surface (cf. figure V-8, page 222 pour davantage de détails).

	CFR200
Longueur d'onde	1064 nm
Tête laser Dimension : L x l x H (cm) Poids (kg)	32 x 9 x 8 3
Baie d'alimentation Dimension : L x l x H (cm) Poids (kg)	37 x 36 x 19 12
Energie maximale	225 mJ
Fréquences de répétition	Tir à tir (surface) ou de 1 ; 2 ; 5 ; 10 ou 15 Hz (gaz ou aérosols)
Dérive en énergie à 50Hz sur 8 heures de fonctionnement	± 4 %
Stabilité en énergie tir à tir	± 4 %
Pulse Durée Diamètre en sortie de tête Divergence	7,45 ns 5,53 mm 0,62 mrad

tableau V-3 : Caractéristiques du laser CFR 200 embraqué dans la sonde portable

3. **Une veine de prélèvement accouplée à une pompe pour l'analyse d'aérosols,**
4. **Un ordinateur portable permettant de piloter et paramétrer à distance** laser et spectromètre par l'intermédiaire d'une interface interactive Homme-Machine (IHM).

V.4.3.2. Système optique

Habituellement collecté à 90° directement par une fibre optique, le plasma est ici imagé par un télescope placé à 12° hors de l'axe du laser, pour des raisons de contraintes d'encombrement (cf. figure V-5) . En effet la sonde portable munie d'un cône permettant d'ajuster la FTSD pour l'analyse de surface rend impossible la collecte du signal à 90° par fibre optique sans rendre encombrant le système. Cependant, à l'exception de l'étude de gaz ou d'aérosol dans un réacteur spécifique où un dispositif de collection à 90° par fibre optique est conservé.

La quantité de signal prélevée par le système dépend de l'angle solide (ou ouverture numérique notée ON) formé entre la collection d'optique et le plasma. L'ON du système de collection doit être en accord avec celui de la fibre optique relié au spectromètre. Dans notre cas une fibre optique de 500µm de diamètre, l'ON doit être de 0.1, sachant que $ON = \sin(\theta/2)$ avec θ angle solide en sortie de la fibre, l'angle du cône est de 6 °. Cette configuration permet de collecter 60 % des émissions provenant du plasma.

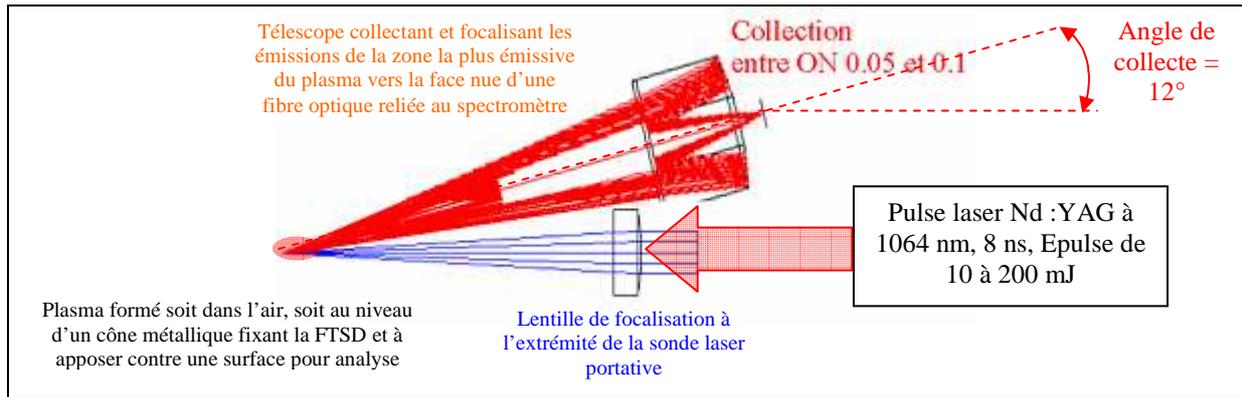


figure V-5 : Schéma de principe de fonctionnement du système optique de télescope collectant des raies de plasma et les focalisant sur une fibre optique reliée à la fente d'entrée du spectromètre

V.4.3.3. Le spectromètre

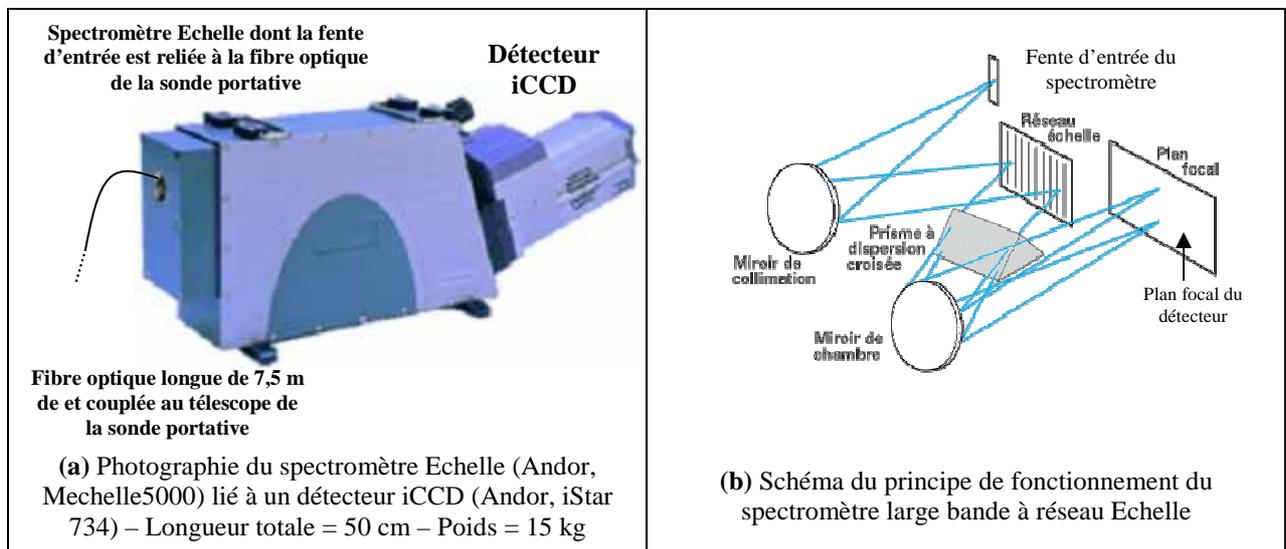


figure V-6 : Détails et schéma de principe de fonctionnement du spectromètre équipant le démonstrateur

Les démonstrateurs portables LIBS en cours de développement comportent pour la plupart des monochromateurs miniaturisés haute résolution (type Ocean Optics) couvrant l'ensemble du spectre de 200 à 900 nm à l'aide d'une mise en série de plusieurs spectromètres à réseau traitant simultanément une partie de la bande spectrale. L'absence de barrettes CCD intensifiées diminue leur sensibilité.

Jusqu'à présent la plupart des spectromètres étaient constitués d'un monochromateur accouplé à un OMA (Optical Multichannel Analyzer) comme celui de notre laboratoire (cf. chapitre II). Ce dispositif fiable présente une résolution importante mais une bande spectrale limitée (quelques dizaines de nm). L'utilisation d'un réseau Echelle permet de réaliser l'analyse optique multiélémentaire à haute résolution et de domaine spectral étendue comme vu avec

celui possédé et couplé sur le dispositif LIBS du laboratoire. Cette technique présente l'avantage de ne comporter aucune pièce en mouvement et d'être très compacte.

Le même modèle de spectromètre Echelle que celui du laboratoire est utilisé (cf. caractéristiques dans la partie II.3.4.2.2, page 74).

V.4.3.4. Le système de prélèvement sélectif des particules ambiantes

La principale difficulté de la détection d'aérosols est la gestion de l'interaction plasma/particule. La solution envisagée pour palier cette difficulté est une veine de prélèvement, système qui a déjà fait ses preuves sur un appareil de détection d'aérosols biologiques développé par le CEB et la société Proengin (Moniteur d'Alerte Biologique ou MAB) utilisant la spectrométrie de flamme à hydrogène (température d'environ 1500K, beaucoup plus « froid » qu'un plasma induit par laser ($T > 10000K$) et qui ne permet d'exciter qu'un nombre restreint d'atomes) [115]. De plus, seul les gaz chargés de particules peuvent être analysés (pas d'applications sur surface).

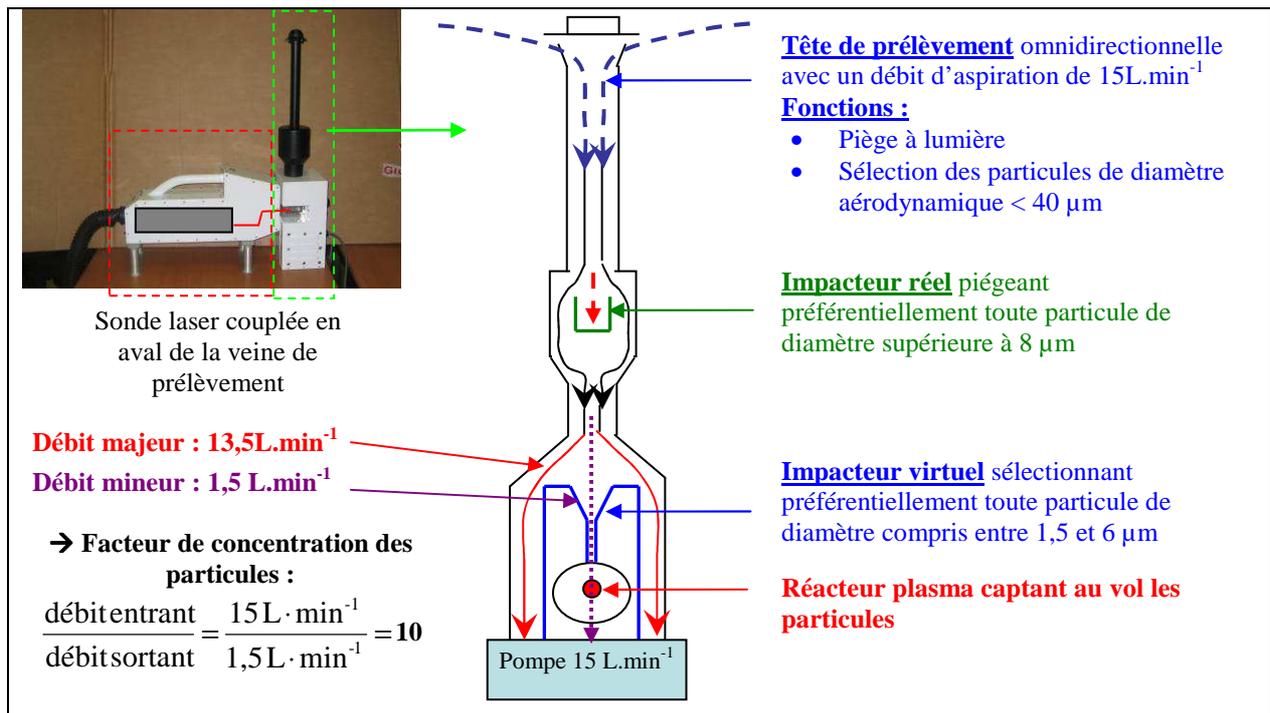


figure V-7 : Schéma de fonctionnement du système de prélèvement sélectif des tailles de particules présentant un risque respiratoire (bactéries, poussières, etc.)

La veine de prélèvement permet de sélectionner et de concentrer les particules qui nous intéressent selon leur diamètre aérodynamique. Son fonctionnement est basé sur l'inertie des particules entraînées par un flux d'air issu d'une pompe aspirant en aval à un débit de $15 L \cdot \text{min}^{-1}$

1. Ainsi, une sélection des particules de diamètres aérodynamiques d'intérêt biologique est opérée selon différentes étapes successives :

- **Sélection n°1 : à l'entrée de la veine, les particules de diamètre aérodynamique supérieurs à 40 µm** (poussière, insecte, gouttes de pluies, etc.) sont stoppées.
- **Sélection n°2 : à l'intérieur de la veine, un impacteur réel (au sens d'impaction physique des grosses particules dans un piège) élimine toute particule de diamètre aérodynamique supérieur à 8 µm de diamètre.**
- **Sélection n°3 : le reste des particules poursuit son cheminement vers un impacteur virtuel (dans le sens où les grosses particules sélectionnées quittent les lignes de courant pour se diriger non vers un piège mais vers la position de formation du plasma).** Le débit initial de 15 L.min⁻¹ est divisé par un facteur 10. On génère alors un débit d'air secondaire de 1,5 L.min⁻¹ permettant d'entraîner les particules comprenant un diamètre entre 1,5 et 8,0 µm par une collision balistique virtuelle vers la position de formation du plasma uniquement les particules. Une concentration de ces particules par un facteur 10 est alors obtenue.
- Le reste des particules de diamètre inférieur à 1,5 µm n'est pas sélectionné. Celles-ci poursuivent leur cheminement selon les lignes d'écoulement de l'air de débit primaire de 13,5 L.min⁻¹ vers la pompe aspirante en aval.

Les particules de diamètre d'intérêt (entre 1,5 et 8,0 µm) sortent de la veine de prélèvement par une buse de diamètre 4 mm et à un débit de 1,5 L.min⁻¹ et concentrées par un facteur 10 par rapport à la concentration en amont de la veine. Celles-ci se dirigent alors vers la position de formation du plasma avec une vitesse supérieure à 20 m.s⁻¹. Pour une concentration initiale de 100 particules par litre d'air ambiant prélevé par la pompe (on parlera de 100 cfu ou colonie formant unité ; en anglais on parlera d'ACPLA pour *Agent Containing Particle per Liter of Air* : désignant une particule de quelques µm contenant un agglomérat en général de plusieurs bactéries). Le nombre de particules arrivant en une minute seconde est de 1500, soit 25 par seconde au voisinage du plasma.

Nous disposons donc d'un outil pour simultanément sélectionner les particules ambiantes d'intérêt en termes de diamètres aérodynamiques compatibles avec la taille des bactéries, et aussi concentrer les particules vers la position de formation du plasma.

V.4.3.5. Présentation des fonctions du démonstrateur opérationnel sur le terrain

Le démonstrateur transportable LIBS a été conçu pour pouvoir être embarqué à bord d'un véhicule tout terrain de type Peugeot P4 dotant les Armées (cf. figure V-8). Toute surface ou atmosphère potentiellement contaminée ou de nature inconnue peuvent être expertisée selon les fonctionnalités offertes par le démonstrateur :

- **Analyse de surface (ou d'airmbiant)** par la sonde laser portative munie d'un cône métallique fixant la FTSD à -1 mm lorsque celui-ci est plaqué contre une surface contaminée.
- **Analyse aérosol** grâce à la configuration où la sonde laser sans son cône est connectée en aval de la veine de prélèvement précédemment décrite. Les particules d'intérêt sont alors forcées à circuler vers la position de formation du plasma.

Les tirs laser peuvent alors être déclenchés directement depuis la sonde portative selon un protocole établi initialement par l'opérateur.

Le système informatique enregistre ensuite les spectres en temps réel. Les raies d'émission d'intérêt composant chaque spectrogramme sont alors identifiées à l'aide d'un logiciel associant les raies détectées aux bases de données spectrales NIST. Les intensités des raies d'émission correspondantes sont alors exploitées par un second logiciel d'analyse statistiques des données multivariées pour classifier les échantillons selon leur nature. L'établissement de bases de données de référence permettra d'identifier les échantillons classifiés.



figure V-8 : Photographies des composants et des configurations du démonstrateur opérationnel LIBS

V.5. VALIDATION DU DEMONSTRATEUR SUR CIBLES BACTERIENNES

V.5.1. Applications à la détection de menaces bactériennes

La détection d'alerte du risque biologique (B) est l'une des préoccupations majeures du CEB. Elle constitue l'étape cruciale précédant et provoquant la mise en place des chaînes de protection et de décontamination. Le risque B est représenté par des bactéries pathogènes, des virus et des toxines. A des fins de détection, voire d'identification, les agents pathogènes et les interférents non pathogènes doivent être répertoriés. La nécessité d'éviter les fausses alertes des systèmes de détection du risque B en dépend directement.

Les méthodes usuelles pour détecter et identifier certains agents B reposent sur des principes de colorimétrie (i.e : tickets détecteurs spécifiques de familles bactériennes) ou d'immunologie

(i.e : tests immunologiques Elisa (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique) pour de premières informations rapides mais limitées. Des méthodes plus complexes à mettre en œuvre comme des analyses génétiques (i.e : La *polymerase chain reaction* ou PCR, ou encore amplification en chaîne par polymérase laquelle est une technique de répllication du matériel génétique prélevé d'organisme biologique) permettent d'identifier précisément le genre, ainsi que l'espèce en se basant sur les bases de données CEB entre autres.

Les limites en spécificité et temps de réponses de ces méthodes éprouvées peuvent être problématiques dans un contexte d'attaque bactériologique nécessitant une détection d'alerte rapide. De même, le traitement d'un grand nombre d'échantillons B mis en culture sur boîte de Pétri pourrait s'avérer long sans tri préalable et sans levé de doute rapide d'interférents.

Des méthodes d'analyses physiques répondent aux besoins d'une méthode de détection d'alerte locale comme la spectrophotométrie de flamme, la spectrométrie de masse [116], l'analyse Raman ou celle à infra rouge et transformée de Fourier : ces méthodes sont performantes mais souvent spécifiques et limités à des échantillons particuliers et/ou nécessite de préparer les échantillons. Des méthodes passives et actives existent telles que les LIDAR (*Light Detection And Ranging*, basé sur l'émission et la réception de faisceaux Laser à distance), la fluorescence induite par laser (LIF : fluorescence des molécules typique du vivant pour les bactéries [117]) ou les imageurs thermiques : ces techniques sont performantes mais également limités à des échantillons de type atmosphère contaminée.

La technique LIBS, validée en laboratoire en tant que méthode d'analyse multi élémentaire, *in situ* (sans prélèvement), polyvalent (adapté à toute forme de risque), reproductible (pour rendre crédible le diagnostic) et sensible (en terme d'adéquation avec les doses létales basses des toxiques) est alors développée sous forme d'outil transportable est autonome.

V.5.2. Analyses par LIBS de cultures bactériennes après prélèvement sur gélose

Le démonstrateur LIBS a été testé pour la classification de bactéries cultivées sur gélose. Contrairement aux cas d'analyses des nappes homogènes de bactéries effectuées dans le chapitre précédent (cf. partie IV.5, page 176), nous allons valider les aptitudes analytiques du démonstrateur pour détecter des nappes hétérogènes de bactéries représentatives d'aérosols bactériens prélevés dans l'air puis cultivés pendant un certain délai (24 heures) avant analyses LIBS.

La recherche de marqueurs spectraux sensibles, spécifiques et représentatifs d'un genre ou d'une espèce de bactérie a été le premier objectif à atteindre pour l'élaboration d'une méthode

de détection physique comme la LIBS. Le chapitre IV précédent a permis de valider la LIBS sur la détection de milieux bactériens sous forme de pastilles compressées, de cultures sur gélose, ainsi que sous forme d'aérosols dispersés. Selon la quantité de matière biologique disponible, le nombre de marqueurs spectraux était plus ou moins réduit. Ensuite, des exploitations quantitatives et statistiques des marqueurs ont été nécessaires pour discriminer les différents échantillons.

V.5.3. Protocole Expérimental d'analyses LIBS de géloses bactériennes

V.5.3.1. Protocoles de cultures des boîtes de Pétri

V.5.3.1.1. Choix des espèces bactériennes

	Genre	Espèce	Référence CEB
<i>Espèces représentatives du bruit de fond atmosphérique de la région parisienne</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>tumefaciens</i>	04/0167
	<i>Arthrobacter</i>	<i>nicotaniae</i>	03/0269
	<i>Exiguobacterium</i>	<i>acetylicum</i>	03/0276
	<i>Macrococcus</i>	<i>equiperficus</i>	03/0261
	<i>Bacillus</i>	<i>flexus</i>	03/0266
<i>Espèce choisie pour symboliser une anomalie dans la composition du bruit de fond atmosphérique</i>	<i>Bacillus</i>	<i>atropheus</i>	A1-C99

tableau V-4 : Liste des bactéries analysées – en couleur noire = les espèces bactériennes issues et représentatives du bruit de fond synthétique – en rouge = une espèce simulant un agent pathogène

Cinq espèces de bactéries typiques de la composition du bruit de fond atmosphérique de la région parisienne sont choisies : *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter nicotaniae*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Macrococcus equiperficus*, *Bacillus flexus*. Une espèce complémentaire, *Bacillus atropheus*, est aussi employée pour simuler une espèce non présente naturellement dans l'environnement et modélisant le comportement aérodynamique et la structure de l'agent pathogène *Bacillus anthracis*.

Toutes les bactéries sont initialement issues du soucier bactérien de CEB et conservées sous forme végétative sous forme de suspensions dans un milieu tampon à des concentrations de l'ordre de 10^9 bactéries.mL⁻¹.

V.5.3.1.2. Conditions de cultures des bactéries sur géloses

A l'aide d'une spatule stérile, quelques gouttes de chaque suspension sont badigeonnées de façon aléatoire sur la surface d'une boîte de Pétri contenant une éllose de composition connue (en général : Triptica-Soja-Agar ou TSA, toujours fourni par Biomérieux). Les bactéries sont alors mises en culture dans une étuve à 37°C pendant une période de 24 heures.

A cette issue, des colonies bactériennes sont visibles sous formes de nappes hétérogènes réparties de façon éparse sur leur gélose. En fait les positions de cultures des nappes de bactéries correspondent aux endroits où ont été réparties les suspensions bactériennes initiales. Le développement anarchique des bactéries sur les géloses suit un cycle naturel.

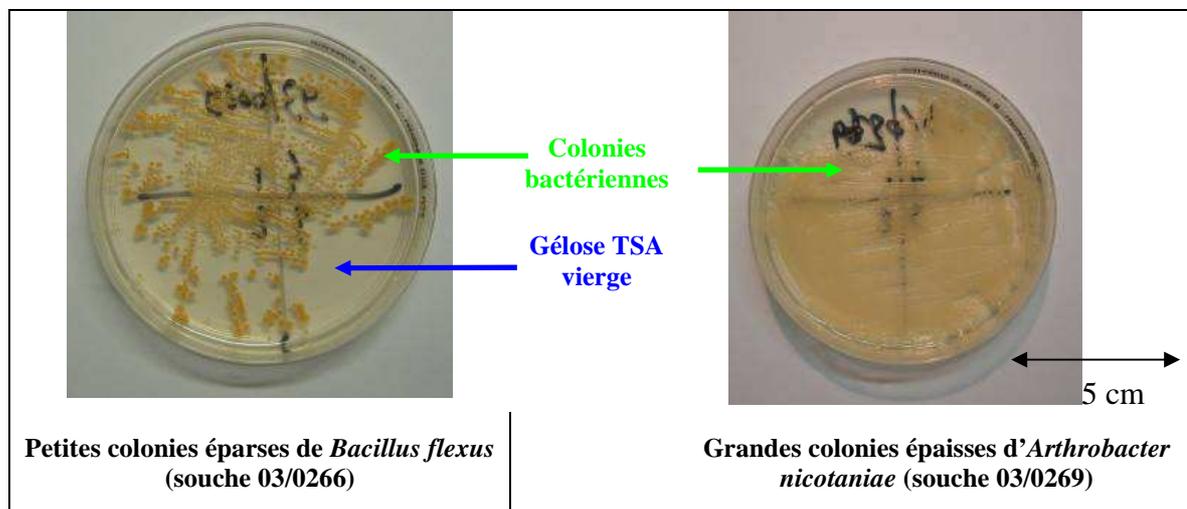


figure V-9 : Photographies de nappes bactériennes de *Bacillus flexus* et d'*Arthrobacter nicotaniae* (zones de couleur beige foncé des boîtes de Pétri) développées de façon aléatoire sur une gélose Triptica-Soja-Agar (zone beige claire des boîtes de Pétri)

La figure I-1 présente la répartition hétérogène des cultures bactériennes en terme de concentration des colonies : l'épaisseur est d'environ 1 mm pour les zones les plus denses en bactéries. Dans le précédent chapitre, nous avons dimensionné les paramètres d'analyse pour pouvoir ablater uniquement des couches homogènes de bactéries épaisses de 100 μm (cf. page 182). Nous adapterons les paramètres optiques et mécaniques de la sonde laser du démonstrateur pour être certain d'analyser uniquement une épaisseur de 100 μm composée de bactéries.

V.5.3.1.3. Paramètres de culture prises en compte pour les analyses LIBS

Deux paramètres concernant la culture des bactéries ont été modifiés :

- **Influence du temps de croissance** : des analyses LIBS sont effectuées toutes les 24 heures sur les mêmes échantillons bactériens développés en étuve.
- **Influence du milieu de culture par emploi de deux types de géloses nutritives standards et commerciales (fournies par la société Biomérieux, France) :**

- **TSA (Tryptica-Soja-Agar)**
- **Chocolat**

V.5.3.2. Porte échantillon

Un porte-échantillon (cf. Figure IV-14) est conçu pour adapter les boîtes de Pétri contenant les bactéries à analyser par la sonde laser du démonstrateur LIBS :

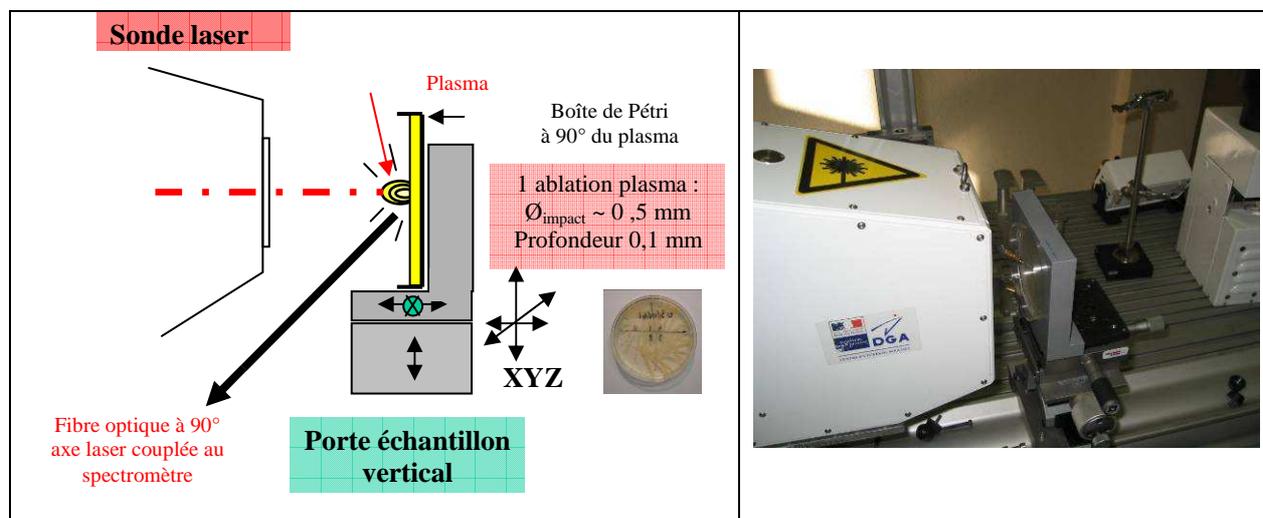


figure V-10 : Schéma et photographie du porte échantillon adapté à l'analyse de boîte de Pétri et couplé à la sonde laser du démonstrateur LIBS

L'échantillon (boîte de Pétri avec des nappes bactériennes de nature connue) est placé à 90° de l'axe laser sur un support commandé par trois vis micrométriques pour déplacer avec précision la boîte de Pétri. Nous avons décidé de remplacer le dispositif initial de collecte du signal par télescope orienté à 12° de l'axe laser par une fibre optique de 1000 µm de diamètre positionnée à 90° de l'axe de propagation du faisceau (configuration optique et mécanique identiques aux

expériences effectuées précédemment sur les nappes homogènes, cf. page 180). Cette solution présente l'avantage d'obtenir une résolution spatiale des émissions du plasma.

V.5.3.3. Paramètres d'acquisition LIBS

Les expériences du chapitre précédent effectuées sur les nappes homogènes de bactéries d'épaisseur 100 µm (cf. page 182) ont permis de choisir des paramètres optiques et mécaniques pour obtenir une ablation contrôlée d'épaisseur 100 µm.

- Pulse de la sonde du démonstrateur : Energie de pulse laser : 135 mJ (correspondant au voltage de la lampe flash du laser égal à 7 V) – Durée du pulse : 7 ns,
- Diamètre du faisceau incident : 5,5 mm
- Distance focale de la lentille à 1064 nm : 65 mm,
- Fibre optique de type silice/silice d'1 mm de diamètre et d'ouverture numérique 0,22 (soit un demi-angle solide d'observation de $\arcsin(0,22) = 12,7^\circ$),
- Distance fibre optique/plasma=3 mm – Distance plan focal/surface gélose (FTSD) = -0,5 mm (optimisée pour n'ablater qu'une épaisseur de 100 µm). **Pour cela, le cône métallique fixant une distance FTSD d'1 mm est ôté provisoirement.**
- Angle fibre optique / surface de l'échantillon : la fibre est à 45° de l'axe du faisceau laser,
- Distance longueur focale de la lentille et surface de l'échantillon : +1 mm,
- Spectromètre à réseau Echelle (large bande : 250 à 950 nm en une seule acquisition),
- Mode d'acquisition des spectres : 10 spectres par échantillons, avec l'acquisition des émissions d'un plasma par spectre,
- Délai avant acquisition : 1 µs – durée d'acquisition : 20 µs,
- Gain de l'intensificateur : 110 – Température de la caméra : -20°C.

V.5.3.4. Spectrogrammes Echelle d'analyse LIBS de nappes homogènes de *Bacillus flexus*

Etant donné le contrôle de l'ablation, les éléments détectés proviennent uniquement des bactéries. Leur nature est identique à celle des éléments constituant les nappes homogènes de bactéries analysées dans le chapitre précédent (cf. tableau IV-11, page 189).

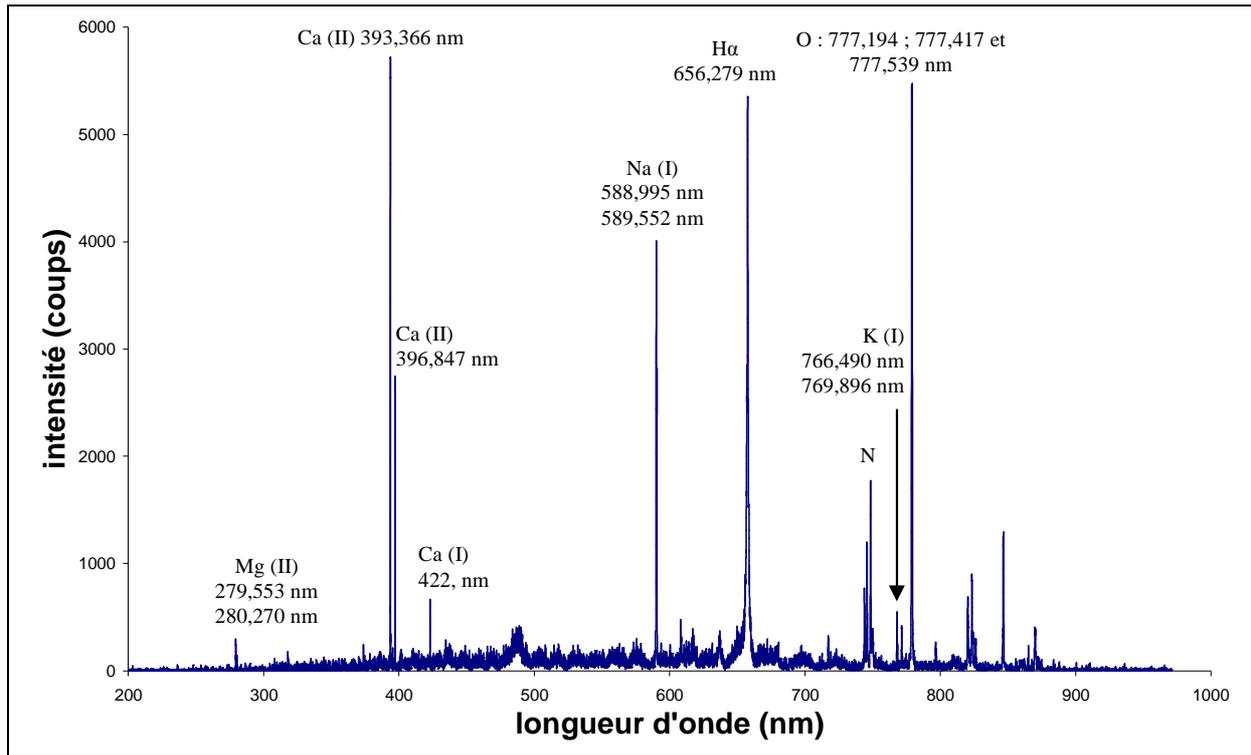


figure V-11 : Spectrogramme large bande illustrant la composition globale d'amas de *Bacillus flexus* sur gélose TSA. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs

Le tableau V-5 résume les composés détectés :

Eléments associés aux raies	Raies en nm
C	247,856
Ca	393,366 ; 396,847 ; 422,673
P	253,560
Mg	279,553 ; 280,270 ; 285,213
Na	588,995 ; 589,552
K	766,490 ; 769,896
CN	386,14 ; 387,17 ; 388,34

tableau V-5 : Liste des éléments détectés par LIBS de nappes hétérogènes de *Bacillus flexus* sur gélose TSA.

Ces spectrogrammes obtenus confirment les potentialités de la technique LIBS pour identifier les principaux marqueurs spectraux **minéraux** et **organiques** de l'environnement biologique : **Ca**, **Na**, **Mg**, **K**, **C**, **P**, ainsi que des traces de bandes **CN** issues de la recombinaison en périphérie du plasma entre le carbone des bactéries et l'azote atmosphérique.

Les autres bactéries (liste du tableau IV-4, page 224) cultivées sur gélose TSA dans les mêmes conditions de culture et d'analyse LIBS présentent des compositions élémentaires voisines.

V.5.3.5. Traitement des données spectrales

Afin d'extraire le maximum d'information des spectres enregistrés, nous mettons en place un protocole de traitement des données. Celui-ci sera constitué de deux étapes :

1. **Un premier traitement des spectrogrammes large bande consistant à éliminer les informations superflues en sélectionnant les raies d'intérêt identifiées par le logiciel intégré à l'interface** : une liste d'intensités de raies d'émission est obtenue depuis le spectre brut intégral. Nous considérons une sorte de « **peigne spectral** » limitant le nombre de données spectrales d'intérêt parmi la multitude de raies disponibles dans un spectrogramme large bande de type Echelle.
2. **Un second traitement statistique des spectres obtenus précédemment par une méthode d'analyse multivariée des données spectrales** : l'analyse en composante principale (ACP) des données d'intérêt est entreprise. L'ensemble de ces opérations est réalisé sous le logiciel Matlab intégré à l'interface graphique du démonstrateur LIBS.

V.5.4. Classification d'échantillons par traitement statistique des données multivariées obtenues par LIBS

V.5.4.1. Différenciation de plusieurs espèces bactériennes et influence du temps d'analyse LIBS après 24 heures de croissance

Les spectres larges bandes obtenus à l'aide du spectromètre « large bande spectrale » de type Echelle fournissent chacun 25000 données observables (25000 intensités de raies associées à chacun des pixels du détecteur iCCD relié à une longueur d'onde). L'Analyse en Composante Principale (ACP) nous permet de visualiser et de moyenniser les dispersions observées sur les raies d'intérêts telles que le calcium ou le sodium.

Une représentation sur les trois principales composantes – combinaisons linéaires des données spectrales LIBS d'intérêt – est obtenue par exploitation statistique des données spectrales des cinq bactéries analysées par LIBS après 24 heures de croissance à l'étuve.

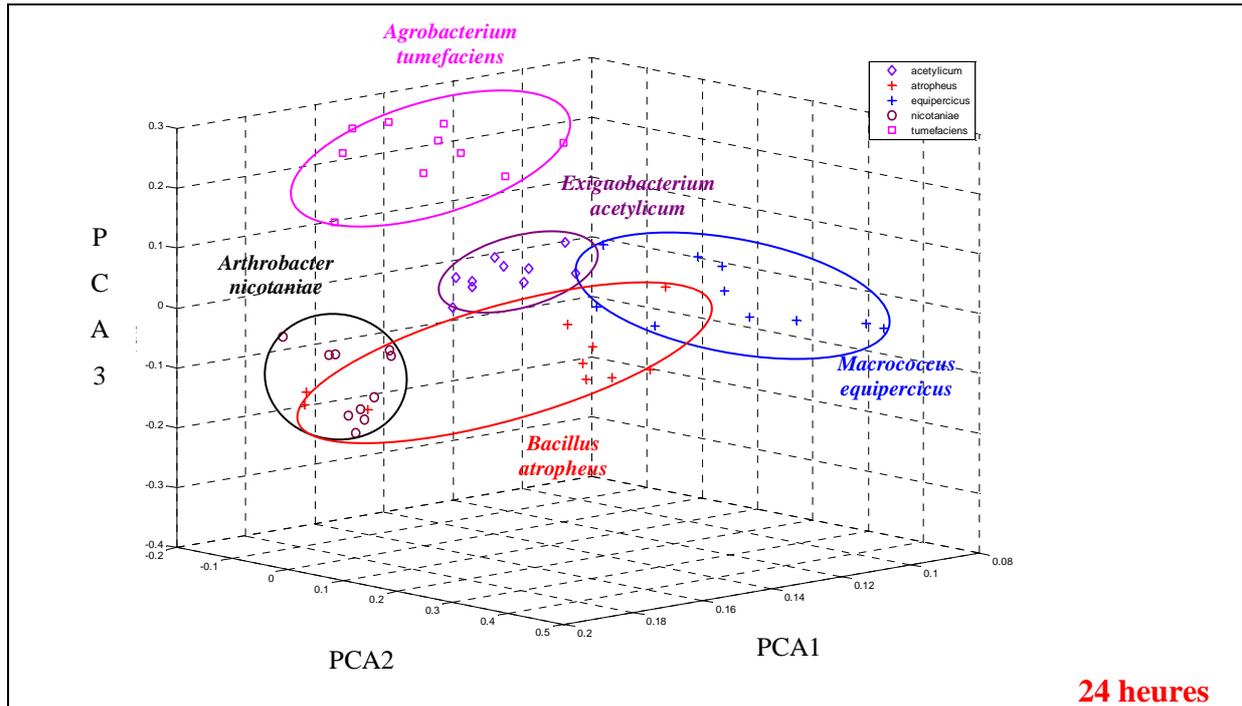


figure V-12 : Représentation en ACP de 5 bactéries cultivées sur gélose TSA pendant 24 heures avant analyses LIBS. Chaque point désigne la position des informations spectrales (sélectionnées pour chaque type d'échantillon et basées sur Ca, Na, Mg, K, C, P) dans l'espace des trois principales composantes (notée PCA1 à PCA3). Pour chaque type de bactérie, une série de 10 tirs avec un plasma/position/spectre est réalisée.

Le traitement statistique des raies d'émissions sélectionnées permet de positionner les différents échantillons dans l'espace des composantes principales selon leur nature. Des zones clairement délimitées sont formées et globalement – à l'exception de *Bacillus atropheus* – les différentes bactéries peuvent être identifiées. Pour une meilleure visibilité, ces zones sont colorées selon la nature de l'échantillon.

Les fluctuations dans la position de chaque point – représentatif d'un tir laser sur une nappe de bactérie sur gélose – sont imputables au manque de planéité des nappes bactériennes dont la croissance ne peut être contrôlée contrairement aux nappes homogènes générées dans le chapitre IV. Ces fluctuations entraînent dans certains cas – comme *Bacillus atropheus* – une difficulté pour classifier certains tirs. Ce problème d'identifications peut être contourné en multipliant les analyses LIBS, voire à terme en améliorant les traitements statistiques. Le fait que les plasmas induits par laser sont reproductibles en termes de volume ablaté et de température explique les classifications correctes des échantillons selon la nature des bactéries analysées.

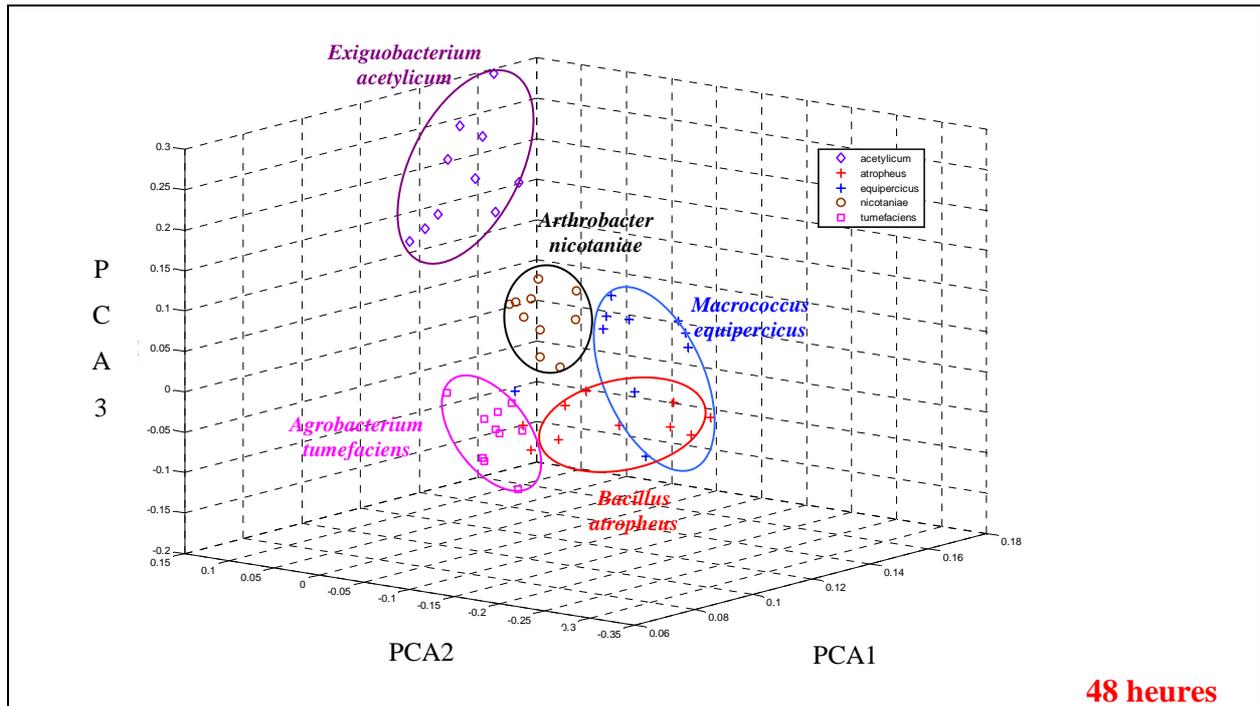
V.5.4.2. Influence du vieillissement des bactéries (24h, 48h et 72h) sur leur classification par analyse en composantes principales

Après la première série d'analyses LIBS effectuées 24 heures suivant la mise à l'étuve pour croissance des cinq types de bactéries, les mêmes géloses avec les nappes bactériennes sont successivement nouvellement analysées selon les mêmes paramètres LIBS mais durant des laps de temps de 48 heures, puis 72 heures. De nouvelles représentations en ACP des données spectrales d'intérêt sont effectuées comme illustrées avec la figure V-13 et la figure V-14.

De nouveau, les représentations en ACP effectuées sur les analyses LIBS après 48 heures et 72 heures de croissance bactérienne font apparaître une classification des données spectrales exploitées statistiquement selon la nature des échantillons. Les données spectrales sélectionnées pour chaque bactérie se positionnent dans des zones géographiquement limitées dans l'espace des composantes principales elles-mêmes obtenues depuis les raies sélectionnées **(Ca, Na, K, Mg, C, P)**.

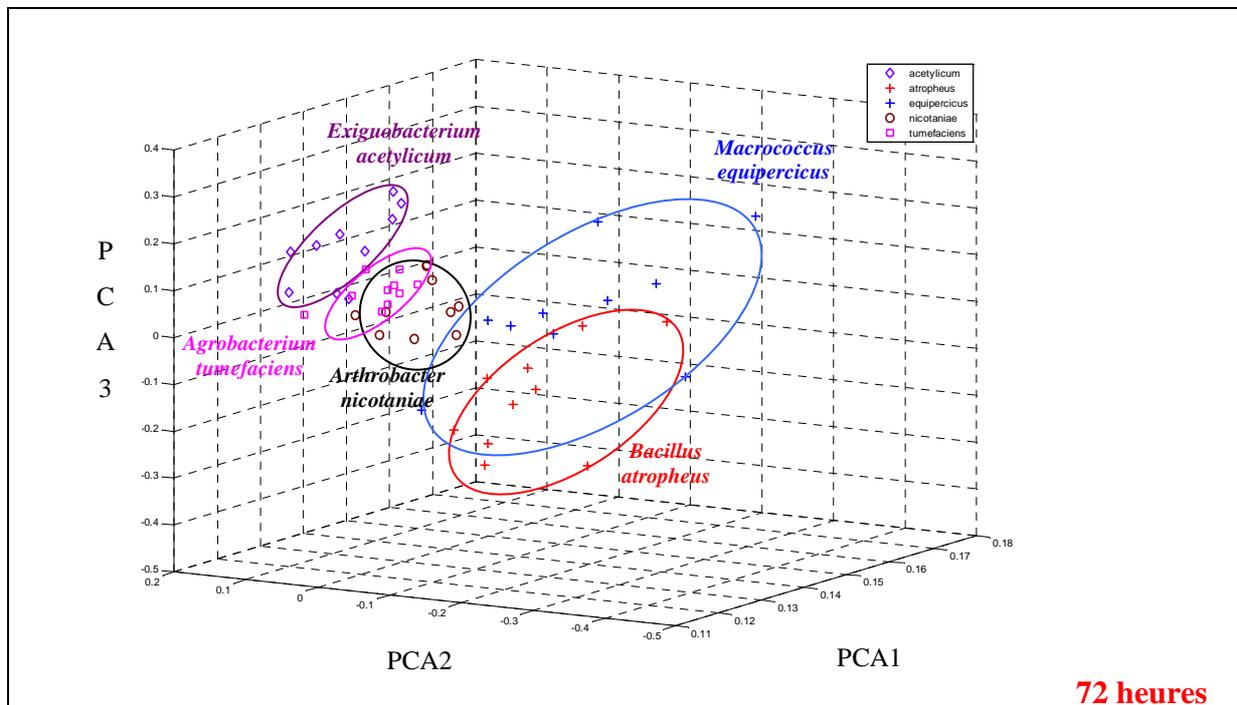
Nous notons que certaines bactéries – telles que *Bacillus atropheus* et ici *Arthrobacter nicotaniae* – sont difficiles à classer, avec un risque d'erreur dans l'identification. Le recours à des analyses LIBS supplémentaires peut aider à améliorer la classification. Le vieillissement des bactéries est à considérer dans une méthode d'analyse de différentes croissances bactériennes.

La création d'une base de données, but ultime d'une méthode de classification, semble cependant possible. Bien entendu, il sera intéressant d'analyser à l'avenir davantage de nappes bactériennes pour appréhender la gestion de multiples zones sur les représentations des composantes principales. L'essentiel est la détection des identifiants compatibles avec la structure de bactéries.



48 heures

figure V-13 : Représentations en ACP de 5 bactéries cultivées sur gélose TSA pendant 48 heures avant analyses LIBS. Chaque point désigne la position des informations spectrales (sélectionnées pour chaque type d'échantillon et basées sur Ca, Na, Mg, K, C, P) dans l'espace des trois principales composantes (notées PCA1 à PCA3). Pour chaque type de bactérie, une série de 10 tirs avec un plasma/position/spectre est réalisée.



72 heures

figure V-14 : Représentation en ACP de 5 bactéries cultivées sur gélose TSA pendant 72 heures avant analyses LIBS. Chaque point désigne la position des informations spectrales (sélectionnées pour chaque type d'échantillon et basée sur Ca, Na, Mg, K, C, P) dans l'espace des trois principales composantes (notées PCA1 à PCA3). Pour chaque type de bactérie, une série de 10 tirs avec un plasma/position/spectre est réalisée.

V.5.4.3. Influence du milieu de culture

Lors de l'analyse des pastilles bactériennes comprimées du précédent chapitre, l'influence des milieux de cultures des bactéries – milieu organique ou minéral – a été mise en évidence (cf. partie IV.4.7, page 168) : les bactéries assimilent sélectivement les éléments disponibles dans leur milieu environnant pour se développer. Ces éléments sont ensuite intégrés dans la structure bactérienne en quantités variables détectées par LIBS.

Afin d'étudier l'influence des milieux de croissance sur la classification des croissances bactériennes, nous avons analysé la bactérie *Bacillus flexus* après sa culture sur deux différents milieux de culture (fournies par la société Biomérieux, France) :

Gélose Triptica-Soja-Agar ou TSA et gélose Chocolat

Les analyses ont été réalisées le même jour et avec les mêmes paramètres (cf. partie V.5.3.3, page 227). Les données sélectionnées et basées sur les raies **Ca, Na, K, Mg, P, C** pour chaque échantillon (géluses vierges ou avec des nappes bactériennes de *Bacillus flexus*) sont représentées sur les deux principales composantes de l'ACP :

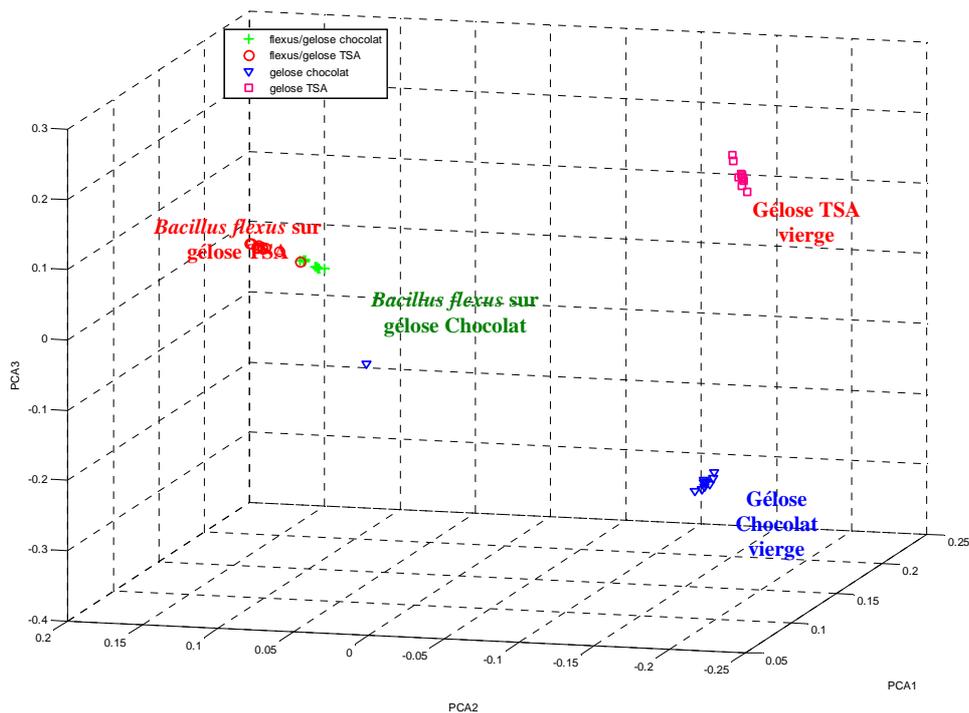


figure V-15 : Représentation en ACP de deux différentes géloses nutritives vierges (TSA et Chocolat), ainsi que ces deux mêmes géloses avec des nappes de *Bacillus flexus* après 24 heures de croissance. Chaque point désigne la position de données spectrales d'intérêt (basées sur Ca, Na, Mg, K, P, C) dans l'espace des trois principales composantes (PCA1 à PCA3). Pour chaque type d'échantillon, une série de 10 tirs avec un plasma/position/spectre est effectuée.

On constate que les différents échantillons sont représentés spécifiquement selon leur nature :

- **Les géloses vierges de nappes bactériennes (TSA et Chocolat) sont visualisées de façon séparée dans l'espace des trois composantes principales** : la composition différente des nutriments constituant chaque type de gélose est mise en évidence à cause des diverses teneurs élémentaires intrinsèques des deux géloses. L'analyse des plasmas générés de manière reproductible sur les géloses parfaitement planes en l'absence de nappes bactériennes explique le regroupement prononcé des données représentées en ACP sur la figure V-15.

- **Les nappes de *Bacillus flexus* sont toujours localisées de façons différentes par rapport aux cas des géloses vierges**. Nous rappelons que le plasma est généré de manière à n'ablater que les nappes de *Bacillus flexus* : les analyses LIBS ne rendent donc compte que des seules bactéries et non des géloses nutritives. De plus, nous avons précédemment mis en évidence que l'évolution de certains marqueurs spectraux (tels que P/C, cf. partie IV.4.7, page 168) était indépendante du milieu de culture employé. L'exploitation statistique des données multivariées de la LIBS de nappes bactériennes prend en compte la nature première des *Bacillus flexus* quelque soit le milieu de culture employé. Un agrandissement des positions des tirs montre cependant une légère différenciation entre les bactéries cultivées sur gélose TSA et celles développées sur gélose « cœur-cervelle ».

V.5.5. Conclusions sur l'analyse de géloses bactériennes hétérogènes

Ces essais ont permis d'évaluer les possibilités d'applications de la LIBS sur des milieux biologiques en conditions opérationnelles (prélèvements par impaction de bactéries sur boîtes de Pétri, mise ensuite en culture) :

- Le traitement statistique des données multivariées issues de la LIBS présente une aptitude à discriminer, voire à classifier différentes espèces bactériennes à partir de marqueurs spectraux intrinsèques d'une classe d'échantillons (biologique ou non biologique).
- Les influences du vieillissement et des conditions de cultures (nature des milieux nutritifs, etc.) doivent cependant être prises en compte dans l'élaboration de bases de données de référence permettant la classification d'échantillon en utilisant des conditions précises et reproductibles de plasma.

V.6. VALIDATION DU DEMONSTRATEUR SUR CIBLES CHIMIQUES

V.6.1. Expertises LIBS de surfaces peintes de types polyuréthane et glycérophthalique vierges ou contaminées par des molécules simulant la présence de toxiques

Nous avons testé les capacités de discrimination du démonstrateur en analysant des surfaces peintes contaminées ou non par des molécules simulant des toxiques chimiques et biologiques. La détection des contaminations chimiques sur cibles par LIBS s'effectue principalement sur des substrats de type géologique (terres, sables...) et des matériels de terrain (abris, véhicules). Pour les véhicules militaires par exemple, l'analyse s'opère essentiellement sur la couche de peinture protectrice.

Les surfaces à analyser sont des plaques planes en aluminium (dimensions 10x10 cm², 2 mm d'épaisseur) recouvertes de deux peintures différentes de qualité militaire :

- 1. Une peinture de standard OTAN polyuréthane, commune à tout équipement militaire utilisé dans le cadre de missions OTAN.**
- 2. Une peinture française glycérophthalique, revêtement de plusieurs systèmes de l'Armée française.**

V.6.2. Choix des paramètres LIBS

Le choix du protocole d'analyse LIBS et en particulier de la quantité ablatée de peinture – autrement dit le nombre de tirs accumulés sur une même position de l'échantillon – s'appuie sur les précédents travaux de Dudragne [2] effectués au CEB sur une surface revêtue de peinture **OTAN polyuréthane**. La qualification des éléments de la peinture susceptibles de venir interférer avec la détection des principaux hétéroatomes de toxiques chimiques a alors été menée. Des séries de mesures dans des conditions identiques de formation du plasma et d'acquisition de spectre avaient été effectuées selon trois configurations : accumulation de spectres, respectivement sur un, deux et cinq tirs laser.

L. Dudragne [2] concluait que l'analyse qualitative de la peinture **OTAN polyuréthane**, pour 1,2 et 5 tirs laser sur une même position, c'est à dire pour des profondeurs d'ablation croissantes, ne révèle pas la présence des éléments fluor, chlore, soufre et phosphore. Nous choisissons d'effectuer un seul tir par position de façon à analyser en majorité l'éventuelle

présence de contamination déposée en surface. L'ensemble des analyses a été effectué avec les paramètres suivants :

- Energie de pulse (tension lampe Flash) : 110 mJ (6V)
- Distance focale : 65 mm
- Distance plan focal/surface de la peinture : fixée par le cône à -1 mm
- Refroidissement de la caméra : -30°C – Gain de l'intensificateur : 150
- Délai avant acquisition d'un plasma : 1 μ s – Durée d'acquisition : 20 μ s
- Tirs accumulés par spectres : 1 – Nombre de spectre par série : 10

V.6.3. Analyse de peintures vierges OTAN polyuréthane et Française glycérophtalique

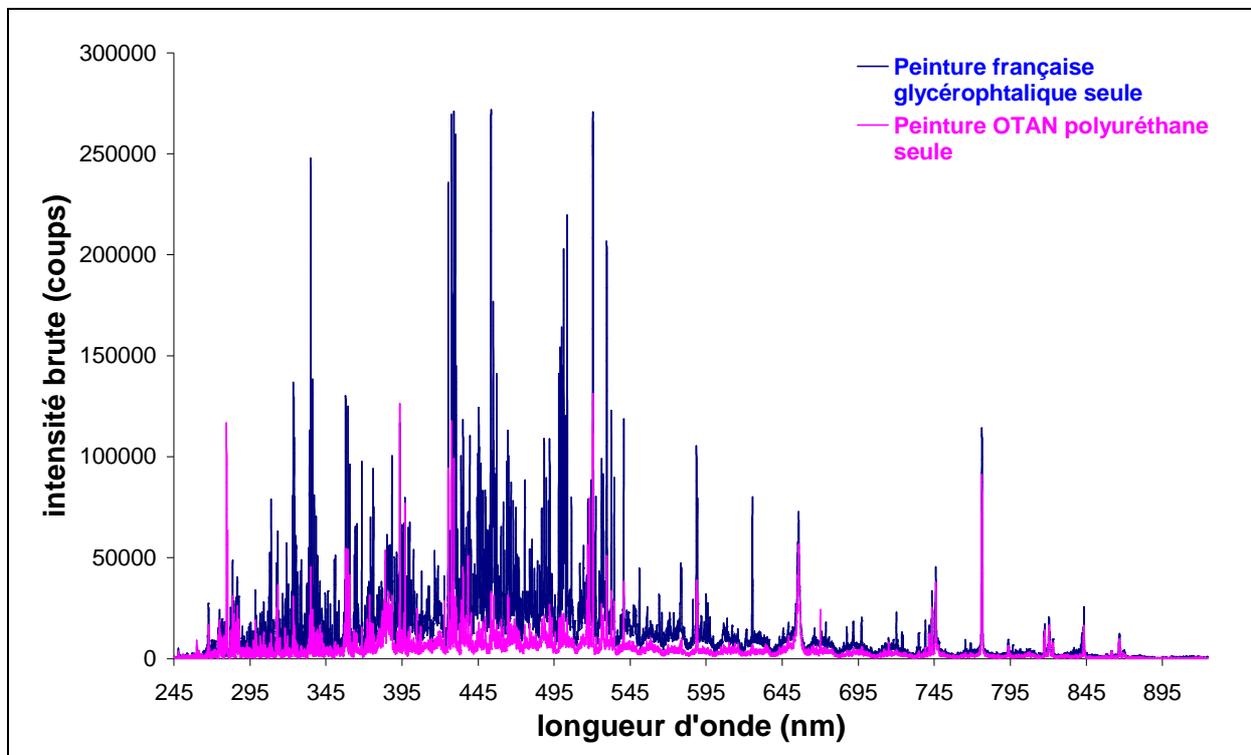


figure V-16 : Spectrogrammes large bande spectrale illustrant la richesse des éléments constituant les peintures (système de pigments liés par liants de type polyuréthane ou glycérophtalique). Paramètres LIBS : un pulse d'énergie 110 mJ par spectre ; Délai avant acquisition = 1 μ s, durée de l'acquisition : 20 μ s

Comme illustré sur la figure V-16 et précisé dans le tableau V-6, les peintures présentent une structure alliant des espèces liantes (exemples : polyuréthane, glycérophtalique, etc.) et des pigments (exemples : chrome, fer, silicium, sodium, carbone, oxygène, azote, etc.) que l'on détecte.

Elément	Longueur d'onde d'émission (nm) les plus importantes (liste non exhaustive)	Peinture OTAN polyuréthane	Peinture « française » glycérophtalique
Al	308,215 ; 309,271 ; 394,401 ; 396,452	=	=
Cr	425,435, 427,480, 428,972	=	=
Ca	393,366 ; 396,847	=	=
Fe	248,327 ; 344,061 ; 371,993	=	=
Mg	279,553, 285,213	=	=
Ba	553,555	Traces	Traces
Δ Cu	324,754 ; 327,396	- : absence	Traces
Ti	370,229, 503,840	=	=
Na	588,995, 589,552	=	=
Si	250,690, 251,432	=	=
Sr	460,733	Traces	Traces
C	247,856	=	=
N	410,995 ; 742,364	=	=
O	615818 ; 777,194	=	=

tableau V-6 : Liste des éléments détectés dans les peintures. Légende : « = » quantité voisine d'un composé dans un échantillon par rapport au second échantillon (en terme de rapport d'intensité du composé par rapport à la raie du carbone pris en référence à cause de son importance dans les formules des peintures)

Les compositions précises des peintures de finition **polyuréthane** et **glycérophtalique** telle que la nature des éléments constitutifs des liants et des pigments ne nous ont pas été indiquées. Les compositions sont très proches à l'exception remarquable du **cuivre présent dans la peinture glycérophtalique et totalement absent dans la peinture polyuréthane.**

Pour la peinture de type polyuréthane, le monomère d'un polyuréthane ou poly(oxyalkyleneoxycarbonyl-iminoalkyleneiminocarbonyl) a la formule chimique suivante :



Il contient donc les atomes de carbone, hydrogène, oxygène et azote, comme observé. Ces mêmes atomes se retrouvent dans les composés glycérophtaliques.

En conclusion, l'analyse qualitative des peintures OTAN polyuréthane et française glycérophtalique, pour un seul tir d'ablation, ne révèle pas la présence des éléments fluor, chlore, soufre ou phosphore, marqueurs hétéroatomiques d'intérêts pour la détection de toxiques chimiques. L'absence de ces atomes, dans la composition de la peinture, est un facteur indispensable, qui permet d'envisager la détection de toxiques chimiques, par spectroscopie de plasma induit par laser, sur du matériel militaire.

V.6.4. Détection de contaminations chimiques des peintures par molécules simulant des toxiques

Pour simuler une contamination par agents chimiques adsorbés – voire absorbés – en surface des peintures, nous avons déposé sur chaque type de peinture des gouttes de deux agents simulants :

- Le triéthylphosphate ou TEP, $(C_2H_5)_3PO_4$, est une liquide simulant les toxiques organophosphorés tels que l'agent neurotoxique sarin $C_4H_{10}O_2FP$
- Le diméthylsulfoxyde ou DMSO, $(CH_3)_2SO$, simule la présence de dérivés soufrés comme l'agent vésicant ypérite $C_4H_8Cl_2S$

Ces deux produits simulants ont été déposés sur les plaques peintes sous forme de gouttelettes de volume 100 μ L. Ces dépôts sont ensuite laissés durant 1 heure dans un caisson propre pour évaporer les surplus de ces liquides peu volatils. Des empreintes adsorbées et persistantes sont alors obtenus sur les peintures. Les analyses LIBS sont effectuées de la même façon que sur les surfaces vierges de conatmination.

V.6.4.1. Détection du marqueur phosphore sur peintures contaminées par TEP

Etant donnée l'absence de **phosphore** dans la composition intrinsèque des peintures considérées, la recherche de cet élément qui est un marqueur du **TEP** est privilégiée.

La figure V-17 illustre les détails des spectrogrammes large bande (cf. figure V-16) réduits à la zone 247-257 nm. Globalement, les compositions des peintures polyuréthane vierge ou contaminées par **TEP** ou **DMSO** sont voisines sauf pour la raie du phosphore apparaissant uniquement sur la peinture contaminée par TEP.

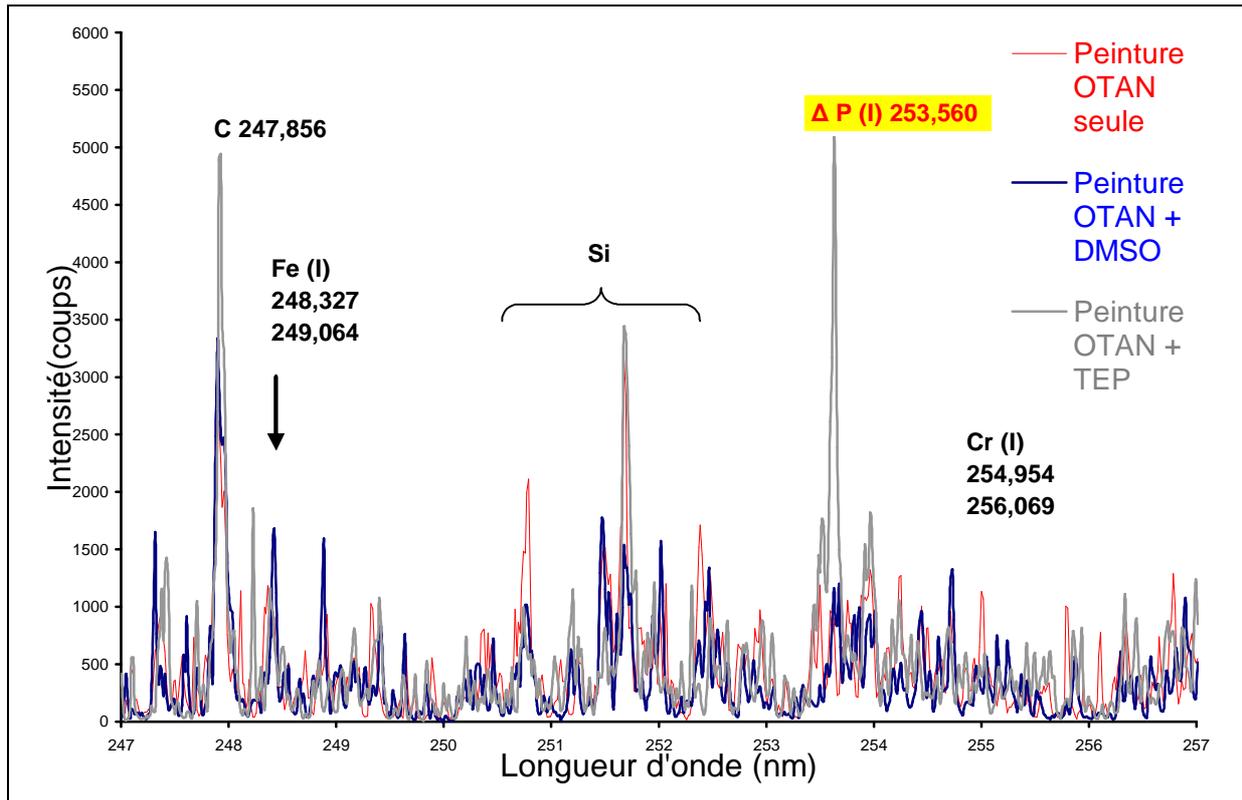


figure V-17 : Région 247-257 nm issue du spectrogramme large bande spectrale Echelle d'analyse LIBS de peinture OTAN polyuréthane avec ou sans contamination (TEP ou DMSO). Mise en évidence de la raie du phosphore à 253,560 nm en présence de TEP seulement. Paramètres LIBS : Energie de pulse = 110 mJ ; Délai avant acquisition = 1 μ s, durée de l'acquisition : 20 μ s

V.6.4.2. Détection du marqueur soufre sur peintures contaminées par DMSO

De même, la figure V-18 illustre l'apparition de la raie du **soufre** uniquement lorsque la peinture est contaminée par du **DMSO**.

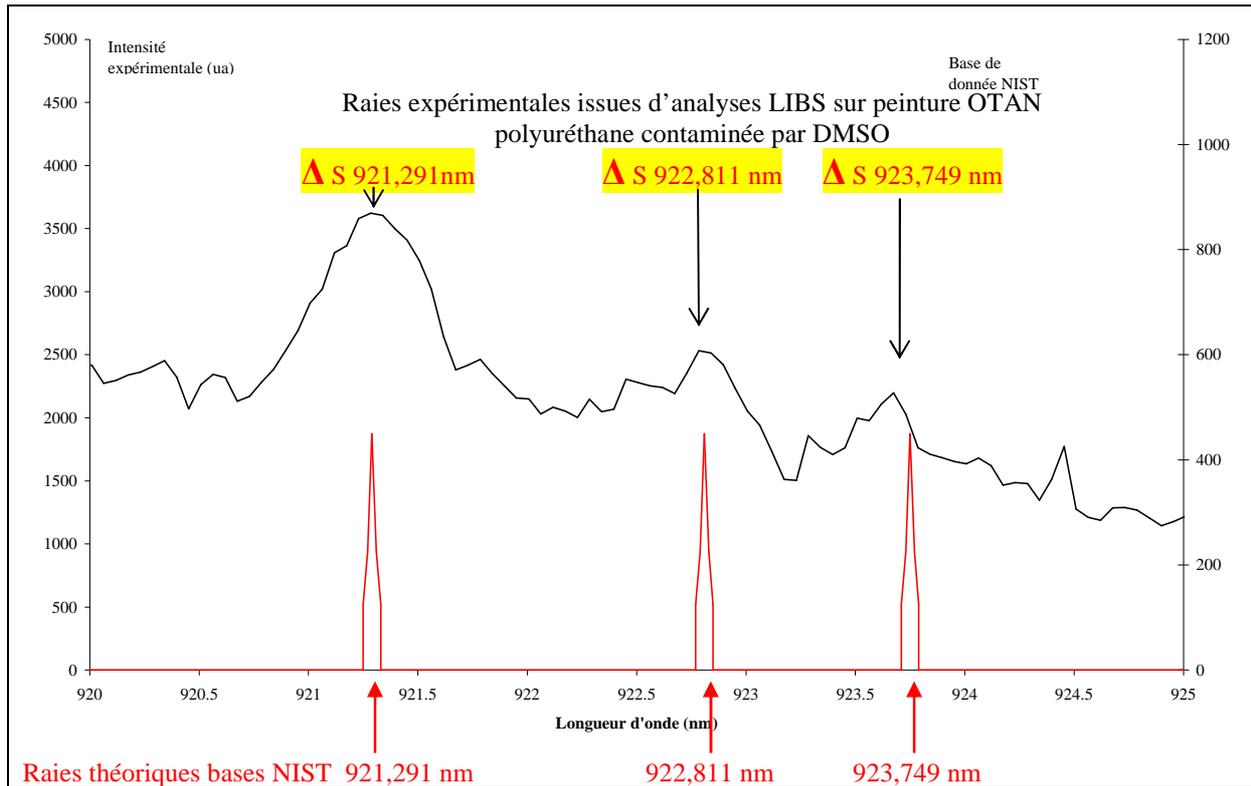


figure V-18 : Région 920-925 nm issue du spectrogramme large bande spectrale Echelle d'analyse LIBS de peinture OTAN polyuréthane contaminée avec du DMSO. Mise en évidence des raies expérimentales du soufre à 921,291, 922,811 et 923,749 nm et comparaison avec les raies théoriques correspondantes de la base NIST. Paramètres LIBS : Energie de pulse = 110 mJ ; Délai avant acquisition = 1 μ s, durée de l'acquisition : 20 μ s

V.6.5. Classification des contaminations de surfaces par analyse multivariée des données spectrales (ACP)

La méthode LIBS permet d'établir les compositions élémentaires intrinsèques à la fois des différents supports peints et de leur potentiel contamination. La détection de marqueurs hétéroatomiques (soufre, phosphore mais aussi chlore ou fluor, etc.) spécifiques d'agents chimiques constitue un atout pour identifier une classe d'agents chimique. L'exploitation de la richesse des données multivariées à notre disposition avec les spectrogrammes à large bande spectrale par des méthodes statistiques telle que l'analyse en composante en principales (ACP) ouvre un champ pour classifier des contaminations de surface.

L'analyse statistique des spectres est utilisée pour valider les capacités de discrimination de la LIBS. Préalablement chaque spectrogramme large bande est analysé par le logiciel de reconnaissance des raies intégré dans le logiciel du démonstrateur. Le logiciel liste toutes les longueurs d'onde et tente d'attribuer aux raies présentes l'élément présent par comparaison avec la base NIST. Nous ne retenons que des zones comprenant les raies les plus intenses et

significatives des marqueurs spectraux intrinsèques des peintures et ceux typiques des contaminants chimiques ou biologiques (cf. tableau V-7) :

	<i>Elément</i>	<i>Longueurs d'onde d'intérêt (nm)</i>
Marqueurs spectraux intrinsèques des peintures de type OTAN et français	Al	308,215 ; 309,271 ; 394,401 ; 396,452
	Cr	425,435, 427,480, 428,972
	Fe	248,327 ; 344,061 ; 371,993
	Ba	553,555
	Cu	324,754 ; 327,396
	Ti	370,229, 503,840
	Si	250,690, 251,432
	Sr	460,733
	C	247,856
	N	410,995 ; 742,364
	O	615818 ; 777,194
Liste non exhaustive de marqueurs spectraux intrinsèques de composés biologiques	Ca	393,366 ; 396,847
	Mg	279,553, 285,213
	Na	588,995, 589,552
	K	766,490 ; 769,896
	P	253,560 ; 255,326
Marqueurs spectraux hétéroatomiques spécifiques des agents simulant des toxiques organohalogénés, organosoufrés et organophosphorés	Cl	833,331 ; 837,594 ; 842,825
	S	921,291 ; 922,811 ; 923,749
	F	683,426 ; 685,602 ; 687,022 ; 690,246
	P	253,560 ; 255,326

tableau V-7 : Liste des marqueurs spectraux retenus pour construire les composantes principales de la méthode ACP

V.6.5.1. Classification de peintures contaminées par des agents chimiques

L'ACP est appliquée aux données spectrales issues de l'analyse LIBS de différents types de contaminations (peintures polyuréthane et glycérophtalique avec **DMSO** ou **TEP**), ainsi qu'aux peintures seules. Chaque spectrogramme fournit un ensemble de données sous la forme de couples (longueur d'onde λ_i , intensité nette I_i) automatiquement reconnus et extraits des données brutes issues du spectrogramme initial. Ces ensembles de données sélectionnées propres à chaque échantillon analysé sont alors représentés dans le nouvel espace des composantes principales basées sur les combinaisons linéaires des raies issues du tableau V-7.

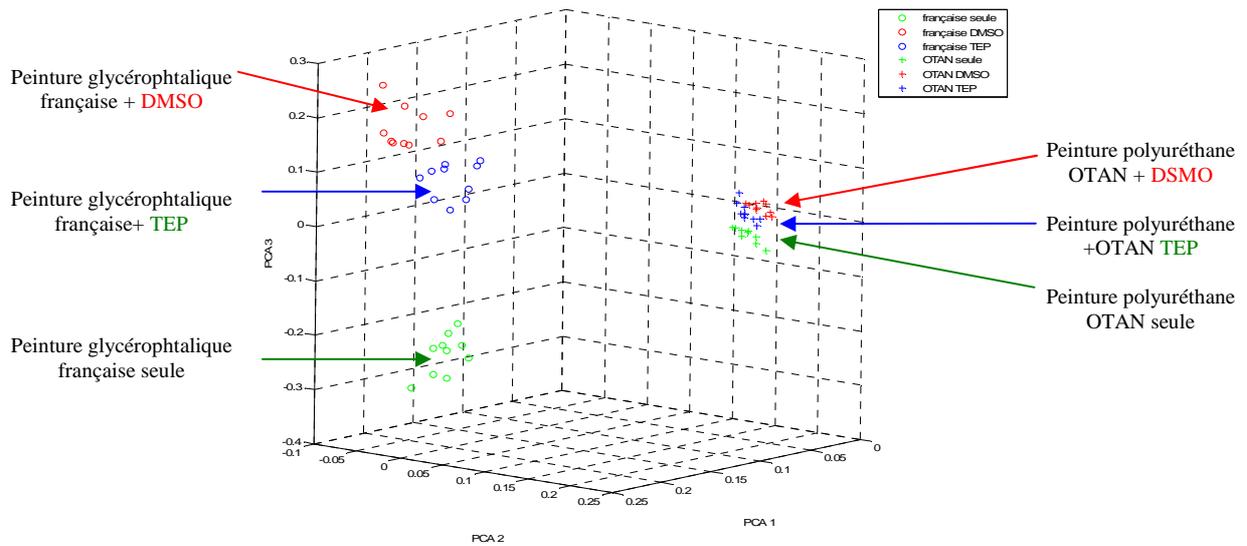


figure V-19 : Représentations en ACP de contaminations chimiques sur peintures de types polyuréthane (OTAN) et glycérophtalique (française)

On remarque que les données spectrales issues des analyses LIBS de chaque type d'échantillon (peinture vierge ou contaminée par **DMSO** ou **TEP**) se positionnent dans une région localisée de l'espace établie sur les trois principales composantes :

- Les deux matrices constituées par la peinture OTAN polyuréthane ou française glycérophtalique sont, dans tous les cas, séparées par la représentation ACP des données.
- Selon la peinture considérée, la nature des contaminations par DMSO ou TEP est facilement établie pour la peinture française glycérophtalique mais très difficilement pour la peinture OTAN polyuréthane. Ces observations peuvent s'expliquer par les différentes natures des surfaces contenant des liants glycérophtaliques ou polyuréthane. L'état de surface semble différent entre les deux peintures : en effet, le modèle français glycérophtalique semble retenir davantage de liquides DMSO et TEP partiellement volatilisés au bout d'une heure, contrairement au support OTAN polyuréthane retenant beaucoup moins de liquides. Il est nécessaire dans ce cas de modifier les conditions expérimentales pour ablater moins violemment : nous analysons sinon essentiellement la matrice, preuve de l'importance des paramètres contrôlant l'ablation.

V.6.5.2. Classification de peintures contaminées par des agents biologiques modèles et des interférents

V.6.5.2.1. Choix d'échantillons biologiques et minéraux déposés sur les peintures

Nous poursuivons les essais sur une peinture française glycérophtalique sur laquelle ont été déposées des suspensions modèles d'agents pathogènes bactériologiques :

➤ Contaminations de type bactériologique

- Suspension à 10^9 bactéries.mL⁻¹ de *Bacillus globigii*, (souche **CEB 93/0029**, forme sporulée choisie pour sa grande résistance) dans deux milieux tamponnés de conservation (eau et trihydroxyméthylaminométhane ou TRIS)
- Suspension à 10^9 bactéries.mL⁻¹ de *Bacillus thurengiensis* (souche **CEB 97/0027**, forme sporulée).

→ Ces différentes solutions sont déposées sous la forme de gouttelettes de 100 µL à l'aide d'une pipette. Pendant 1 heure, les solvants sont évaporés naturellement avant l'analyse des dépôts secs résultants.

➤ Contaminations de type biologique : pollen

Pollen d'orme sec fourni par la société Sigma (référence **Sigma P-8020, lot 59C0597**) sont également testés avec les mêmes paramètres LIBS pour feindre quelques particules du bruit de fond ambiant.

→ Les grains de pollens sont déposés proprement avec une spatule sur les plaques de peintures, puis le surplus est éliminé par rotation des plaques de façon à ne laisser qu'une faible quantité de grains adhérant en surface

➤ Contamination inerte de type chimique pour tester la présence d'interférents

Solution multiélémentaire (eau minérale naturelle) : on dépose des gouttelettes de volume 100 µL sur les peintures et on laisse évaporée pendant 1 heure avant analyses LIBS du dépôt sec résultant.

V.6.5.2.2. Analyses LIBS de peintures contaminées par des dépôts biologiques ou minéraux

➤ Paramètre LIBS

Etant donnée la faible quantité de matière biologique ou minérale déposée sur les peintures, le même protocole d'analyse LIBS précédemment développé (séries d'un tir laser par position) est ici employé pour ablater les surfaces et détecter des marqueurs :

- Energie de pulse (tension lampe Flash) : 110 mJ (6V)
- Distance focale : 65 mm
- Distance plan focal/surface de la peinture : fixée par le cône à -1 mm
- Refroidissement de la caméra : -30°C – Gain de l'intensificateur : 150
- Délai avant acquisition d'un plasma : 1 μ s – Durée d'acquisition : 20 μ s
- Tirs accumulés par spectres : 1 – Nombre de spectre par série : 10

➤ Spectrogramme large bande obtenus

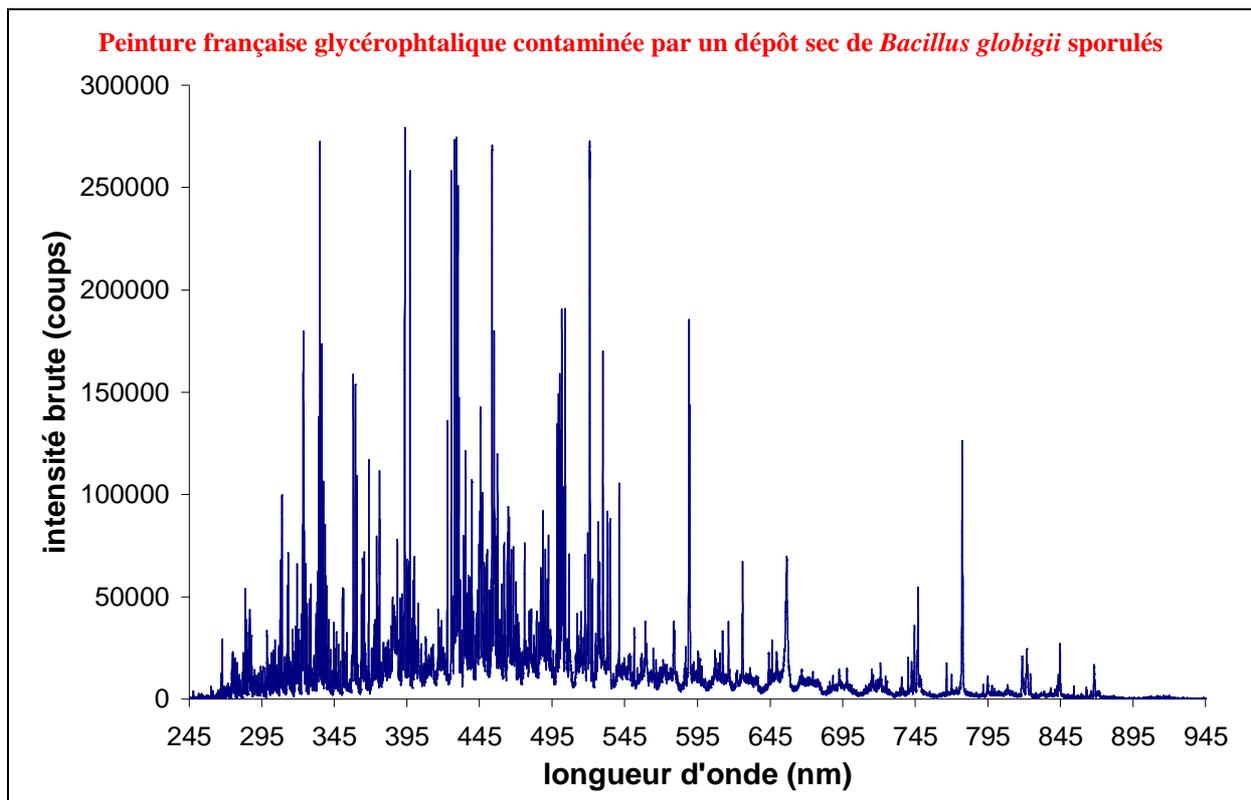


figure V-20 : Spectrogramme large bande de la peinture française glycérophtalique contaminée par un dépôt sec de *Bacillus globigii* sporulé initialement conservé dans de l'eau. Paramètres LIBS : un tir d'énergie 110 mJ par spectre, délai avant acquisition du spectre : 1 μ s, délai d'acquisition : 20 μ s.

➤ **Liste des éléments détectés**

Elément	Longueur d'onde d'émission (nm) des raies les plus importantes (liste non exhaustive)	Peinture « française » glycérophtalique contaminée par :		
		<i>Bacillus globigii</i> sporulé	Pollen	Solution multiélémentaire (eau minérale)
Al	308,215 ; 309,271 ; 394,401 ; 396,452	=	=	=
Cr	425,435 ; 427,480 ; 428,972	=	=	=
Ca	393,366 ; 396,847	++	+	-
Fe	248,327 ; 344,061 ; 371,993	=	=	=
Mg	279,553 ; 285,213	+	+	-
Ba	553,555	=	=	=
Cu	324,754 ; 327,396	=	=	=
Ti	370,229 ; 503,840	=	=	=
Na	588,995 ; 589,552	++	+	+
Si	250,690 ; 251,432	=	=	=
Sr	460,733	=	=	=
C	247,856	+	+	-
P	253,560 ; 255,326	+	+	absence
N	410,995 ; 742,364	=	=	=
O	615818 ; 777,194	=	=	=
CN	388,34 ; 387,14 ; 386,17	Traces	Traces	Absence
S	921,291 ; 922,811 ; 923,749	Absence	Absence	Absence

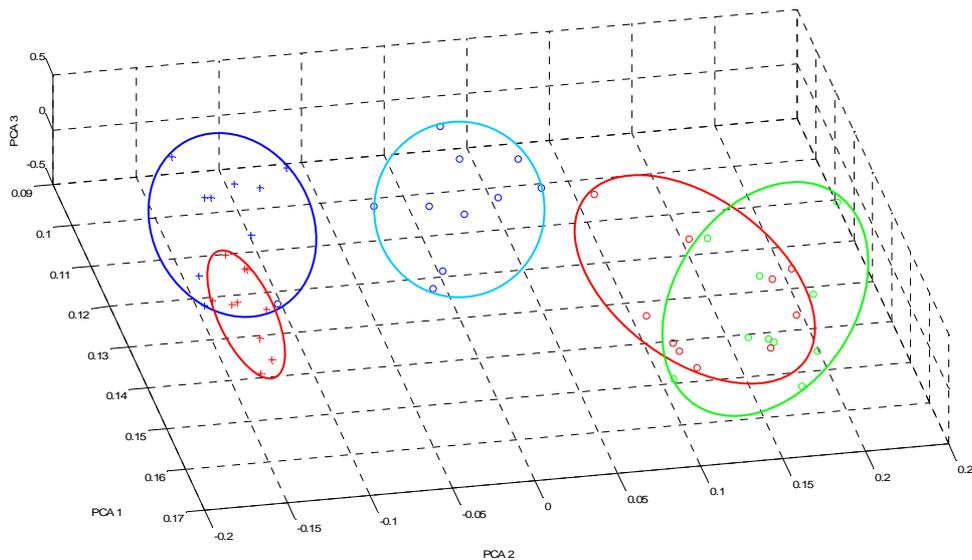
tableau V-8 : Liste non exhaustive des raies d'émission détectées pour les différentes contaminations par dépôts secs sur peinture française glycérophtalique. Légende « ++ » et « + » : quantité très importantes ou notable du composé ; « = » : quantité stable ; « - » : faible quantité du composé dans un échantillon par rapport à l'échantillon sans contamination. (en terme de rapports d'intensité du composé par rapport à la raie du carbone pris en référence à cause de son importance dans les formules des peintures)

Comme illustré dans le tableau V-8, les éléments détectés correspondent aux constituants intrinsèques de la peinture française glycérophtalique sans contamination (Cr, Cu, Ti par exemples), mais également à la nature des entités contaminantes :

- **Les composés biologiques** (**bactérie**, **pollen**) sont identifiés par la présence importante d'éléments comme **Ca**, **Mg**, **Na**, **C** et **P** mais aussi de traces de raies **CN** issues de la recombinaison en périphérie du plasma entre le carbone des structures organiques composant les matériaux biologiques et l'azote de l'air. La distinction entre bactérie et pollen va être entreprise par l'analyse multivariée des teneurs différentes des éléments détectés.
- **La présence des teneurs élémentaires de l'eau minérale** est mise en évidence par la détection de fortes quantités de **Na** complétées avec des teneurs plus faibles d'éléments comme **Ca**, **Mg**, **C**. P est absent contrairement au cas des matériaux biologiques.

V.6.5.2.3. Analyse en composantes principales pour classifier des dépôts biologiques ou minéraux contaminant des peintures

Comme effectuée précédemment, chacun des spectrogrammes à large bande fournit une multitude de données spectrales. Le logiciel intégré dans l'interface Homme-Machine attribue les raies détectées en les comparant à la base NIST. Une liste de raies est alors obtenue. Seules les raies du tableau V-6 et du tableau V-7.



FigureV-21 : Représentation sur les trois composantes principales des données spectrales traitées par ACP et issues d'analyses LIBS de peintures françaises glycérophthaliques polluées par des dépôts de bactéries ou d'interférents biologiques (pollen) et salins ($MgSO_4$). Légendes : *o Bacillus thuringiensis* (BT, eau), *o Bacillus globigii* (BG, eau) dans l'eau, *o Bacillus globigii* (BG, TRIS) dans TRIS, + Pollen d'Orme, + $MgSO_4$

Une nouvelle fois, les données spectrales propres à chaque échantillon sont représentées dans l'espace des composantes principales de façon regroupée selon leur nature :

- Les deux souches de bactéries BG et BT sont toujours bien discriminées par rapport aux deux interférents $MgSO_4$ et le pollen d'Orme. Cela ouvre la voie à la classification d'échantillons bactériologiques parmi un ensemble d'entités à analyser dans un environnement.
- En revanche le milieu de conservation ne semble pas constituer pas une caractéristique significative de discrimination. En effet les clusters des BG dans l'eau et des BG dans le TRIS ne sont pas clairement dissociés.

V.6.6. Conclusion sur la classification de contaminations de surfaces peintes

- La LIBS constitue une méthode de détection multiélémentaire suffisamment sensible permettant d'établir la composition atomique de tout échantillon à des teneurs compatibles avec la présence de traces de contaminations.
- Le spectromètre large bande spectrale de type Echelle utilisé dans le démonstrateur permet de résoudre et d'acquérir simultanément sur des spectrogrammes l'intégralité des raies d'émission constituant alors une base de marqueurs intrinsèques de la nature de l'échantillon. Les informations obtenues présentent un caractère reproductible directement issu des plasmas robustes. La rapidité d'obtention et d'analyse des plasma permet de répéter les mesures à des fins de fiabilité.
- L'exploitation statistique des données multivariées ouvre la voie à la classification plus ou moins fine des échantillons selon leur famille : composés bactériologiques, autres matériaux biologiques, interférents chimiques, etc.

V.7. APPLICATIONS A L'ANALYSE DE PARTICULES SUSPENDUES

V.7.1. Préambule

Les précédents chapitres III et IV ont mis en évidence les difficultés du couplage de la LIBS pour détecter au vol des particules d'aérosols suspendues. Outre la faible probabilité qu'un pulse laser interagisse avec des particules isolées et diluées dans l'atmosphère, les limites de détection élémentaire sont souvent supérieures aux teneurs atomiques constituant des particules de diamètre de quelques microns telles que les bactéries (cf. résultats obtenus pour le calcium, sodium et magnésium dans les chapitres III et IV). L'utilisation de filtres accumulant une certaine quantité de matière particulaire a d'ailleurs été recommandée.

Des essais ont cependant été menés avec le dispositif de prélèvement et de concentration des particules pour évaluer les capacités du démonstrateur à détecter certains marqueurs spectraux de particules d'aérosols de taille micrométriques compatibles avec des modèles d'aérosols biologiques agglomérés.

V.7.2. Liste des échantillons particuliers

Le générateur d'aérosol par orifice vibrant (VOAG) est utilisé pour générer des particules multiélémentaires à partir de gouttelettes de diamètres 38 μm contenant des solutions

multiélémentaire calibrées en compositions. L'évaporation du solvant (eau) induit l'apparition de particules asséchées présentant un diamètre aérodynamique de quelques microns mesurés par le granulomètre APS.

	Eau 1	eau 2	eau 3	Eau 4
Diamètre moyen des particules (μm)	5	4	2	6
masse Ca particulaire (en pg ou 10^{-12} g)	13,45	5,06	2,24	15,77
masse Mg particulaire (en pg)	2,14	1,32	0,69	3,42
masse Na particulaire (en pg)	0,27	0,80	0,14	0,40
Concentration moyenne particulaire en sortie de générateur VOAG couplé à l'entrée de la veine de prélèvement (en cm^{-3})	10,2	9,9	10,1	9,4

tableau V-9 : Liste de quatre eaux minérales (solutions multiélémentaires calibrées en composition pour Ca, Mg et Na) utilisées pour générer des particules calibrées en diamètre aérodynamique et composition.

Le tableau IV-4 de la page 143 nous renseigne sur les teneurs en Ca, Mg et Na présentes dans une unique bactérie de type *Bacillus globigii* (BG) Nous pouvons donc convertir les masses d'éléments Ca, Mg et Na en nombre de bactéries de type BG correspondantes.

	<i>Bacillus globigii</i> BG 1	<i>Bacillus globigii</i> BG 2	<i>Bacillus globigii</i> BG 3
masse de Ca d'une seule bactérie (en pg)	0,023	0,021	0,204
Nombre de bactéries correspondantes en terme de quantité de Ca dans une unique particule issue de l'eau 1	580	634	66
masse Mg d'une seule bactérie (en pg)	0,006	0,007	0,056
Nombre de bactéries correspondantes en terme de quantité de Mg dans une unique particule issue de l'eau 1	357	289	38
masse Na d'une seule bactérie (en pg)	0,009	0,008	0,116
Nombre de bactéries correspondantes en terme de quantité de Na dans une unique particule issue de l'eau 1	30	36	3

tableau V-10 : Quantités de bactéries de type *Bacillus globigii* en termes d'éléments Ca, Mg et Na contenues dans une seule particule asséchée issue de l'eau 1

Le tableau V-10 indique qu'une seule particule multiélémentaire issu de l'eau 1 peut représenter jusqu'à plusieurs centaines de bactéries en termes de masses élémentaires équivalentes en Ca, Mg et Na.

Ces particules asséchées pénètrent dans la veine de prélèvement et subissent le cycle de sélection granulométrique à travers les différents étages d'impaction réelle et virtuelle. Du fait de leur diamètre aérodynamique compris entre 1,5 et 6 μm , on suppose que les particules du

tableau V-9 aboutissent en sortie de la veine, concentrées d'un facteur 10 et dirigées vers la position de formation du plasma pour y interagir statistiquement.

V.7.3. Paramètres LIBS

- Pulse : Energie du pulse = 110 mJ (voltage de la lampe flash = 6 V)
- Réacteur utilisé : chambre pour particules en aval de la veine de prélèvement – Distance focale de la lentille de la sonde portable : 65,0 mm
- Délai avant acquisition : 2 μ s – Durée d'acquisition : 20 μ s
- Nombre de tirs par série : 150 – Nombre de plasma par spectre : 1
- Nombre de séries par type d'échantillon : 3

V.7.4. Résultats et Discussion

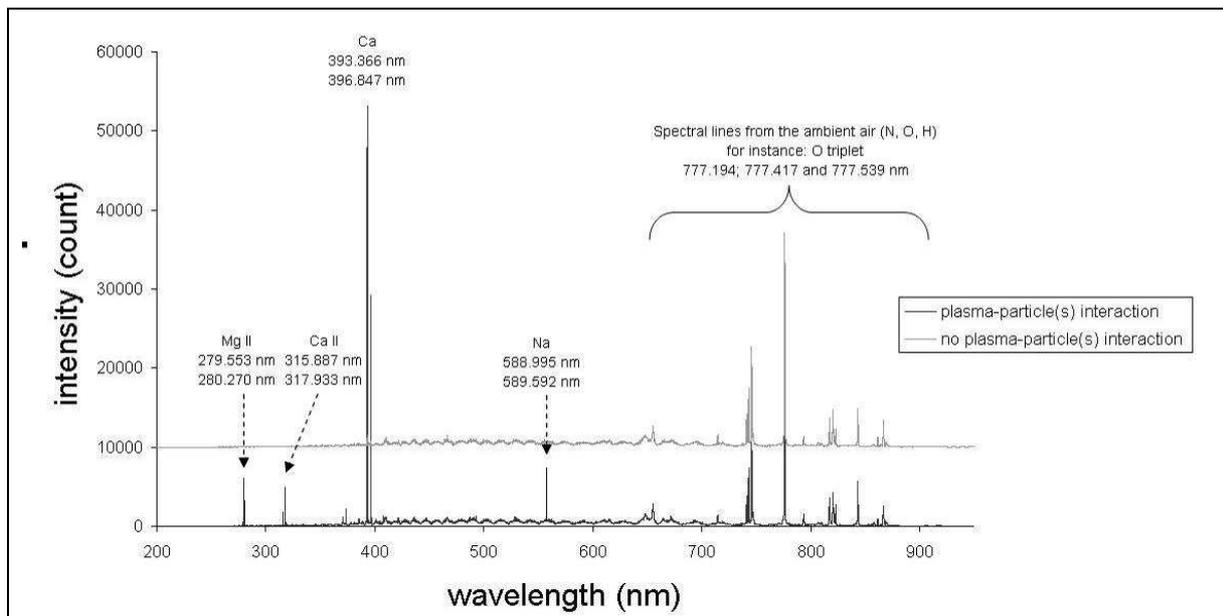


figure V-22 : Types de spectres « large bande » obtenus lors d'analyses LIBS de courants de particules monodispersées asséchées (diamètre aérodynamique final : 5 μ m) issue de la solution « eau 1 ». Le spectre en position inférieure réfère à la présence de particule(s) analysée(s) par le plasma. Celui en position supérieure a trait à un plasma n'interagissant avec aucune particule si ce n'est l'air ambiant. Le spectre supérieur est juste décalé en ordonnée pour une meilleure distinction. Paramètres LIBS : simple tir laser d'énergie 110 mJ, délai et durée avant acquisition = 2 et 20 μ s respectivement

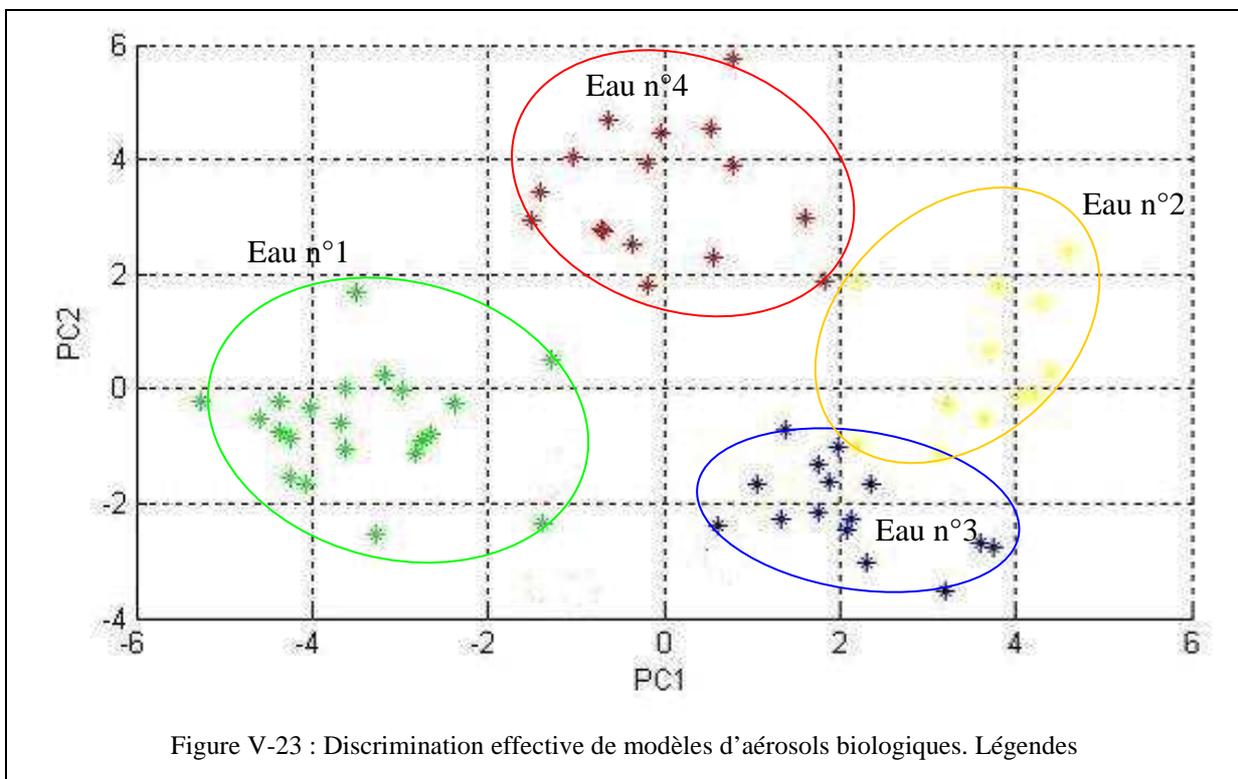
A l'instar des expériences menées sur les aérosols suspendus, les taux de rencontre plasma-particule(s) sont faibles. Les spectrogrammes sont de deux types : ils témoignent ou non de l'interaction.

Lors d'une interaction plasma-particule(s), les raies d'émissions sont directement liées aux composants des solutions multiélémentaires utilisées pour générer les particules asséchées : magnésium, calcium, sodium. Lors d'une interaction, la détection des particules est effective,

ce qui valide l'efficacité de transport et de sélection de la veine pour sélectionner et focaliser des particules prélevées dans l'environnement. Cependant, l'obtention des raies d'émission est possible uniquement en détectant une quantité importante de matière particulaire comme montré par le tableau V-10. Cette remarque valide encore une fois la nécessité d'accumuler une certaine quantité de bactéries pour permettre une détection effective compatible avec les limites de détection de la LIBS.

V.7.5. Classification par analyse multivariée en composantes principales

L'ensemble des marqueurs spectraux constitue une base pour élaborer les composantes principales du traitement ACP.



Les quelques marqueurs (Ca, Mg, Na et P choisi comme discriminant bactérien) permettent de classifier les différentes particules selon leur nature.

V.8. CONCLUSIONS SUR L'APPORT DU DEMONSTRATEUR LIBS

Les qualités intrinsèques de la technique LIBS (sensibilité, fiabilité, répétitivité) ont été combinées aux dernières technologies disponibles en termes de matériels et de procédés de traitements de l'information spectrale (laser miniaturisé, spectromètre compact à large bande spectrale de 200 à 1000 nm simultanément, systèmes informatiques rapides, logiciels de reconnaissance automatiques de marqueurs, algorithmes de traitement multidimensionnel des

données spectrales). Cela a permis de développer un démonstrateur LIBS opérationnel inédit pour détecter potentiellement tout type d'échantillon en laboratoire, voire sur le terrain. En ce sens, le démonstrateur opérationnel LIBS répond à toutes les fonctions requises par la DGA pour en faire un outil d'alerte.

La méthodologie LIBS ne prétend pas se substituer aux méthodes complexes d'analyses éprouvées en laboratoire et spécifiques permettant l'identification précise d'échantillons aussi complexe qu'une souche pathogène de bactérie par exemple. Cependant, la LIBS permet de détecter rapidement, quasiment sans préparation la base des marqueurs spectraux d'un échantillon inconnu. L'étape suivante est l'élaboration d'une intelligence artificielle laquelle associerait les marqueurs spectraux détectés à des classes d'échantillons : métaux majorants et minorants des alliages métalliques ou des liants et pigments d'une peinture, atomes hétéroatomiques des toxiques chimiques de type organohalogénés par exemples, constituants de base de la matière organique inerte (suies diesel, poussières, etc.) ou vivante (bactéries potentiellement pathogènes ou non).

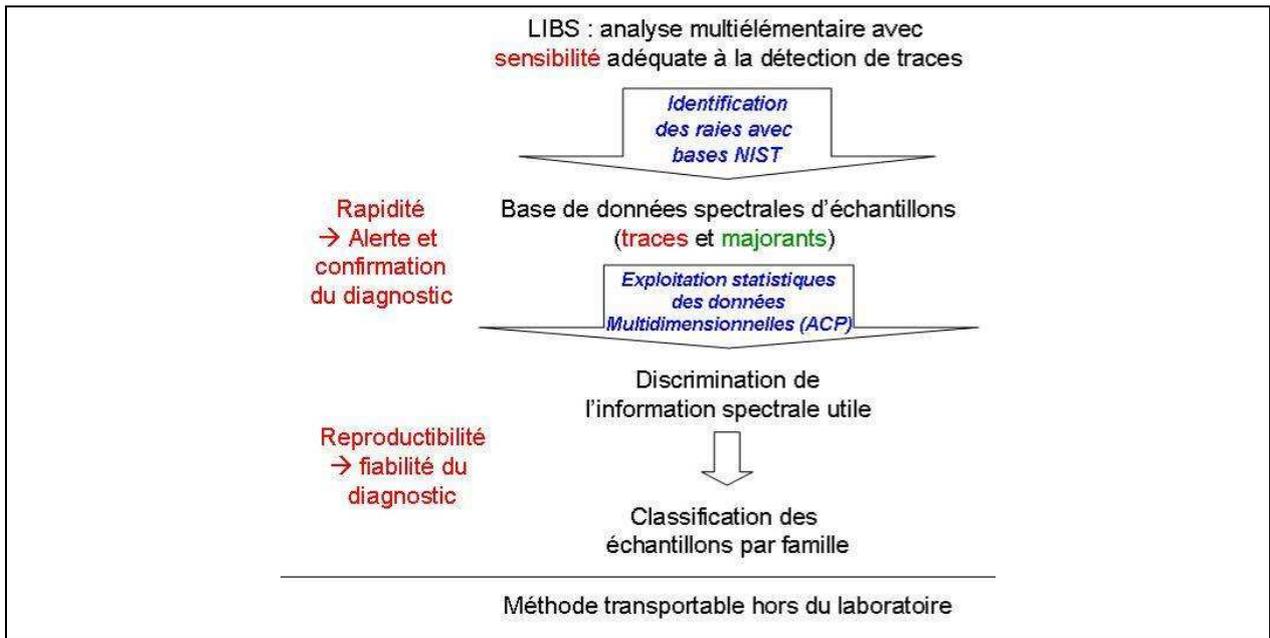


figure V-24 : organigramme pour concevoir une intelligence artificielle d'identification d'échantillons

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce rapport a présenté le couplage d'un milieu plasma – induit par laser et caractérisé en termes de volume d'échantillonnage et de densité de puissance – avec des matériaux hétérogènes dans un environnement ambiant (déposés en surface ou suspendus dans un gaz).

La première étape de l'étude a consisté à la mise au point d'une méthode de travail sur une gamme d'aérosols calibrés en concentrations (microgouttelettes générées à partir d'eaux minérales de compositions connues et reproductibles) et étalonnés en taille pour modéliser des particules de volume micrométrique contenant quelques parties par million d'éléments comme le calcium (Ca), le magnésium (Mg) ou le sodium (Na). Une chaîne d'analyses par spectroscopie de plasma induit par laser (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy ou LIBS) a été développée pour qualifier les composants élémentaires intrinsèques des aérosols modèles par l'intermédiaire de volumes plasmas induits et observés de façons optimisées et reproductibles. Les intensités des raies d'émissions caractéristiques des éléments Ca (393,366 nm et 396,847 nm), Mg (279,553 nm) et Na (588,995 et 589, 552 nm) ont été exploitées pour établir leur courbe de calibration (exprimée en intensité d'émission selon le nombre d'élément par unité de volume échantillonné par le plasma).

Le traitement des données spectrales multiélémentaire par une méthode d'analyse multivariée telle que l'analyse en composantes principales (ACP) a permis de dépasser le cadre du simple dosage élémentaire pour aboutir à la classification des microgouttelettes d'aérosols selon la nature de l'eau minérale de référence employée. La voie de la classification, voire de l'identification a alors été résolue.

Grâce à ce protocole, l'objectif a alors été d'avoir un modèle de référence pour discrétiser le rôle d'une bactérie à la fois par rapport à une microgouttelette aqueuse modèle ; et par rapport à un environnement (substrat nutritif sur lequel les bactéries se développent, présence d'interférents constituant des leurres, etc.).

Fort des modèles calibrés initialement, nous avons pu établir les signatures élémentaires, voire moléculaires, précises et intrinsèques de micro-organismes bactériens dotés d'un métabolisme mis en évidence avec la détection du phosphore lié à l'adénosine triphosphate (ATP). Un rapport reproductible de raies élémentaires telles que P/C a ainsi été sélectionné dans le cadre de spores lyophilisées.

L'étape suivante nous a permis de différencier les bactéries sous formes végétatives par rapport à leur gélose nutritive. Une différenciation des bactéries a été entreprise par rapport à des échantillons potentiellement interférents tels que des sels minéraux et des pollens employés en guise de leurres chimiques et biologiques. Pour cela, un traitement statistique a été développé pour exploiter les identifiants spectraux établis sur les raies d'émissions détectées pour cinq éléments (Ca, Mg, Ca, K et P). En utilisant les courbes de calibration préalablement établies sur les aérosols modèles et dans le but d'avoir une certitude de mesure, nous avons corrélé les niveaux d'intensité des raies détectées par l'analyse LIBS d'un volume connu de bactéries cultivées sur gélose. Nous avons établi que des quantités analysées par LIBS comprenant environ au moins environ 200 bactéries de type *Bacillus* étaient nécessaires pour obtenir des raies d'émission exploitables en tant qu'identifiants spectraux. A défaut de gain dans la sensibilité de la technique actuelle, il est actuellement nécessaire d'accumuler suffisamment de matière biologique (agglomération de particules ou filtration sur membrane connue pour analyses LIBS différées, par exemples).

La détection *in situ*, reproductible, rapide et sensible par LIBS d'identifiants spectraux pour chaque échantillon ainsi que leur exploitation par analyse statistique multivariée ont permis de classifier les bactéries cultivées dans des conditions connues. Les bactéries apparaissent tout de même comme des milieux vivants fluctuants et très dépendants des conditions environnantes et du vieillissement, ce qui dégrade parfois la classification des échantillons. Toutefois, nous avons pu identifier les bactéries dans les cas étudiés, les distinguer des leurres et souligner dans plusieurs cas la possibilité de différencier plusieurs souches.

La mise au point d'une méthodologie d'analyse calibrée et validée au niveau du laboratoire pour détecter et exploiter des identifiants spectraux a été transposée pour concevoir un outil transportable basé sur le principe de la LIBS. Les évolutions technologiques ont permis la diminution des dimensions des composants de la chaîne d'acquisition par LIBS tout en conservant les performances en termes de sensibilité, de rapidité et de reproductibilité. Une tête laser Nd :YAG portable délivre des pulses ns d'énergie atteignant 200 mJ (avec des qualités optiques conservées en termes de divergence, profil et diamètre de faisceau) et avec une répétitivité élevée (15 Hz) permettant de multiplier les mesures et de confirmer les identifiants. L'introduction de spectromètres compacts de type Echelle sans aucun réseau mobile fournit des spectrogrammes à large bande spectrale (de 200 à 1000 nm). Le détecteur iCCD – accolé au plan de focalisation en fente de sortie du spectromètre – intensifie et numérise l'ensemble des raies d'émission en une seule acquisition. Un spectrogramme global est obtenu chaque seconde. Le spectromètre Echelle est apparu comme un compromis analytique pouvant être

amélioré dans le futur : l'ensemble des raies compatibles avec la gamme d'identifiants des familles de risques (gaz toxiques, agents bactériologiques, espèces métalliques, etc.) est détectée simultanément mais de manière lente (1 s par spectre) par rapport à la fréquence de tir du laser (15 Hz ou plus selon les modèles). De même, les différentes zones composant le spectrogramme présentent des rendements optiques différents selon les longueurs d'ondes considérées : la sensibilité des identifiants spectraux détectés n'est donc pas optimale et peut être améliorée.

Un dépouillement méthodique des identifiants spectraux a été développé. Le traitement statistique de ces données multivariées a permis de classifier de façon reproductible les échantillons selon leur nature. Les bases d'une intelligence artificielle ont ainsi été jetées pour corréler automatiquement les raies d'émissions qualifiées et quantifiées à une famille de risques : agents de combats, cibles métalliques (peinture, munitions, etc.) pour identifier l'identité du manufacturier, surfaces contaminées par des agents chimiques ou bactériologiques. Selon le type d'échantillon, le choix d'une méthode d'analyse LIBS optimisée en terme de volume échantillonné a été rendu nécessaire (cf. Tableau conclusion- 1). Le résultat des analyses a abouti à une liste d'identifiants spectraux permettant de classer les échantillons par famille de risques (cf. tableau conclusion- 2). Des méthodes d'analyses plus spécifiques (microbiologie, spectrométrie de masse, etc.) mais complexes et souvent chronophages pourront être employées pour confirmer et préciser la nature des échantillons, tels que le caractère pathogène de certaines bactéries.

Tableau conclusion- 1 : Méthodes analytiques à employer selon la famille de risques considérée

Familles de risques	Gaz de combat dans l'air	Projectiles, munitions, mines métalliques	Contamination chimique déposée	Aérosols aqueux chargés ou non de particules sèches ou salines	Matériaux biologiques
Méthode analytique	1000 tirs accumulés par spectre	1 ou 2 tirs de nettoyage sur une position + série de 10 tirs laser sur la position avec 1 tir par spectre	Séries de 1 à 2 tirs par spectre si aérosols déposés	<u>Si particules déposées</u> : 1 à 10 tirs en surface	
				<u>Si particules en suspension</u> : séries de 100 à 1000 tirs pour obtenir une statistique acceptable (1 tir/spectre) après concentrations des particules	
Durée d'obtention des spectres	20 s ou 60 s selon la fréquence de tir du laser (respectivement 50 et 15 Hz)	De quelques ms à 10 s selon la fréquence d'acquisition du spectromètre	De 100 ms à 5 s, selon le nombre de tirs laser et le type de spectromètres	<u>Si particules déposées</u> : de 100 ms à quelques s, selon le spectromètre	
				<u>Si particules en suspension</u> : de 1 à 10 min pour augmenter les chances d'interaction laser-particule(s)	

tableau conclusion- 2 : Développement d'une combinatoire analytique appliquée aux risques militaires et civils à l'air ambiant. « X » et cases colorées désignent les identifiants spectraux à considérer pour chaque famille de risques. Les sensibilités acquises en laboratoire sont indiquées.

Familles de risques	Gaz de combat dans l'air	Projectiles, munitions, mines métalliques	Contamination chimique déposée	Aérosols aqueux avec ou non des particules sèches ou salines	Matériaux biologiques
Identifiant	Sensibilité (en ppm m/m) correspondante en LIBS selon raies d'émission indiquées				
Ca				0,03 ppm (393,366 nm)	X (393,366 nm)
Na				2,00 ppm (588,995 nm)	X (588,995 nm)
Mg				0,50 ppm (279,553 nm)	X (279,553 nm)
K				X (766,449 nm)	X (766,449 nm)
Si		15 ppm (288,158 nm, bronze NIST SS555) [1]			
C	3 ppm (247,856 nm) [2]	X (247,856 nm)	X (247,856 nm)	X (247,856 nm)	X (247,856 nm)
S	500 ppm (921,291 nm) [3]		X (921,291 nm)		
Cl	55 ppm (837,594 nm) [2]		X (837,594 nm)		
F	20 ppm (685,604 nm) [2]		X (685,604 nm)		
P	1 ppm (253,560 nm) [4]	38 ppm (253,560 nm, bronze NIST SS-555) [1]	X (253,560 nm)	X (253,560 nm)	X (253,560 nm)
As	X (278,020 nm)		X (278,020 nm)		
Hg	X (253,652 nm)		X (253,652 nm)		
Fe		67 ppm (251,083 nm, bronze NIST SS555) [1]			X (251,083 nm)
Cu		6 ppm (324,754 nm) [5]			X (324,754 nm)
Al		27 ppm(308,215 nm,Si photovoltaïque purifié) [6]			
Pb		140 ppm (280,199nm, bronze NIST SS-555) [1]			
Zn		X (330,294 nm)			X (330,294 nm)
N			X (715 nm) [7]		
H et O			X (H _α : 656,279nm, O : 777,194 nm) [7]		

1 MOREL, Stéphane, *Analyse des surfaces contaminées par spectroscopie de plasma induit par laser : Applications à la détection et à l'identification chimique et biologique*, Th : Paris 6 : 2002, 304 p.

2 LEONE N., FATH G., Note technique DGA/CEB, 2006

3 DUDRAGNE L., ADAM P., AMOUROUX J., *Time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy: applications for qualitative and quantitative detection of F, Cl, S and C in air*, *Appl. Spectrosc.*, 52, 1998, pp.1321-1327

4 RADZIEMSKI L. J., CREMERS D.A., HOFFMAN N.M., *Time-resolved laser-induced breakdown spectrometry of aerosols*, *Anal. Chem.*, 1983, 55, pp. 1246-1252

5 ISMAIL M.A., IMAM H., ELHASSAN A. *et al.*, *LIBS limits of detection and plasma parameters of some elements in two different metallic matrices*, *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 2004, pp. 489-494

6 SORIC A., MORVAN D., AMOUROUX J.,LEONE N., ADAM P., *LIBS analysis of photovoltaic material including wafer and raw material*, *J. High Temp. Mat. Proc.*, 2006, 10, 4, pp. 583-590

7 **Nota Bene** : *Identifiants potentiels de molécules organiques telles que les explosifs*

A l'avenir, les performances analytiques du système LIBS transportable pourront être notablement améliorées en considérant plusieurs niveaux :

1. le rapport (RSB) du signal (S) émis par les espèces échantillonnées respectivement par rapport au bruit spectral (B) peut être augmenté pour diminuer davantage les limites de détections élémentaires de la LIBS,
2. le compromis analytique offert par le spectromètre à large bande spectrale de type Echelle peut être appréhendé différemment. La largeur spectrale permettant l'acquisition simultanée sur un domaine allant de 200 à 1000 nm est obtenue au détriment des rendements optiques qui dépendent justement de la longueur d'onde d'intérêt : la conséquence est que les identifiants spectraux mesurés ne présentent pas une sensibilité optimale. Le spectromètre Echelle couplé au détecteur CCD intensifié pourrait être remplacé par une série de spectromètres miniaturisés, chaque module couvrant alors une largeur spectrale limitée mais selon une réponse optimisée et sensible. Le couplage en série de ces détecteurs miniatures permettrait la détection simultanée de tous les identifiants d'intérêt.

L'analyse multiélémentaire *in situ*, sensible, rapide, reproductible ouvre la voie à la détection élargie de familles d'échantillons liées aux domaines militaires mais aussi civils : détection des métaux lourds dans un fluide pour des applications relatives à la qualité de l'environnement, suivi en ligne de procédés de fabrication de matériaux ultra purs (photovoltaïques par exemple) ou expertise de surface à couches multiples (matériaux microélectroniques). Le rôle de l'outil transportable est alors de déclencher rapidement la mise en œuvre d'actions supplémentaire pour confirmer la présence d'une famille de risques et décider des réponses (protection, décontamination, modification d'un procédé de fabrication, etc.).

Ces perspectives ont été validées sur de nombreux exemples applicatifs dépassant le cadre du domaine militaire. L'expertise LIBS de cartilages articulaires ouvre-t-elle le champ de l'analyse *in situ* par fibroscopie des teneurs élémentaires des fluides et des structures osseuses composant le corps humain. De façon analogue à une pollution environnementale, la détection en temps réel d'une anomalie dans les teneurs d'identifiants spectraux est un signe d'alerte d'un dysfonctionnement.

Enfin, nous notons que les performances en hausse des nouveaux détecteurs de type iCCD et du traitement du signal par le rapport du signal émis par rapport au bruit spectral (RSB) envisagé laisse entrevoir moult améliorations de la sensibilité vers des niveaux de l'ordre de

0,1 à 0,001 ppm pour les composés à très forte émissivité dans le domaine des systèmes spectrométriques à multi détecteurs optimisés. Une détection de l'ordre de quelques ppm est envisageable pour les composés les plus difficiles à exciter et présentant une faible émissivité et des raies d'émissions avec des longueurs d'onde λ éloignées vers le domaine de l'Ultra Violet ($\lambda < 300$ nm). Rappelons cependant que la vitesse d'acquisition et la multiplication possible de l'analyse par accumulation sur un même spectrogramme permettent également de contourner bien des obstacles restants.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

figure I-1 : Schémas de principe et effets d'interactions entre un faisceau laser pulsé et une cible (surfaces, gaz, liquide, aérosols).....	23
figure I-2 : Schémas de principe des différentes interactions possibles entre un pulse laser focalisé et la phase physique d'un échantillon	25
figure I-3 : Photographie de la chaîne optique permettant l'induction d'un plasma dans l'air ambiant par une pulse laser Nd : YAG (Quantel CFR200) d'énergie 100 mJ et de durée 7 ns focalisé par une lentille plan-convexe de longueur focale 65 mm	26
figure I-4 : Schéma de principe et photographie de l'interaction laser-surface. Photographie d'un pulse laser d'énergie 100 mJ et de longueur d'onde 1064 nm, focalisé par une lentille de longueur focale de 65 mm	33
figure I-5 : Phénomènes se produisant lors de l'interaction laser-matière	33
figure I-6 : Etapes de la formation d'un plasma induit par laser d'une durée de pulse de 6 ns	34
figure I-7 : profils des cratères d'ablation obtenus selon la durée du pulse laser focalisé [] ...	37
figure I-8 : Evolution temporelle des émissions radiatives d'un plasma induit par laser	39
figure I-9 : Spectrogramme obtenu avec un monochromateur doté d'un réseau 1200 traits.mm ⁻¹ et couplé à un détecteur iCCD. Région spectrale 917-927 nm d'émission LIBS d'un gaz SF ₆ pur détecté par un pulse laser Nd :YAG d'énergie 100 mJ et de durée 6 ns focalisé par une lentille plan-convexe de longueur focale 65 mm. Autres paramètres : accumulation de 100 tirs sur un spectre, délai et durée d'acquisition d'un tir : 1 µs et 20 µs.	41
figure I-10 : Diagramme illustrant la composition des espèces dans un plasma généré dans l'air selon la température du milieu plasma à l'équilibre thermodynamique et à la pression de 1 bar []	43
figure I-11 : Focalisation d'un faisceau laser par une lentille convergente.....	45
figure I-12 : Schéma de principe sur la défocalisation (FTSD)	45
figure I-13 : Image MEB d'un impact sur cible métallique (λ_{laser} :1064nm ; E _{pulse} :100mJ, FTSD : 0mm)	47
figure I-14 : Forme et dimensions d'un plasma ellipsoïdal induit dans l'air par laser ns, de longueur d'onde $\lambda = 1064$ nm, de diamètre 5 mm et focalisé par une lentille de focale 65 mm selon des énergies variables	48

figure I-15 : Evolution de l'intensité des raies d'émissions (ici S) selon les zones du plasma résolues spatialement par observation par fibre optique – Méthode développée au CEB pour estimer la taille du plasma [1] [2]	49
figure I-16 : Images de plasma induit sur cible de PVC en fonction de la défocalisation du laser	50
figure I-17 : Evolution des intensités selon les distances FTSD et fibre/cible dans le cas de la lentille de focale 65 mm	50
figure I-18 : Evolution des intensités selon les distances FTSD et fibre/cible dans le cas de la lentille de focale 130 mm	50
figure I-19 : Images d'impact obtenues sur une peinture OTAN à l'aide d'un profilomètre pour différentes énergies laser (Nombre de tir : 1 ; Distance focale : 130 mm ; FTSD : -2 mm).	52
figure I-20 : Images d'impact obtenues sur une peinture OTAN à l'aide d'un profilomètre pour différents nombres de tirs laser (Energie de pulse : 100 mJ ; Distance focale : 130 mm ; FTSD : -2 mm).	52
figure I-21 : Evolution de l'intensité de la raie de l'or à 751,073 nm en fonction de l'énergie de pulse laser – Cible PTFE recouverte de 30 nm d'or	53
figure I-22 Evolution de l'intensité de la raie du fluor à 755,224 nm en fonction de l'épaisseur de la couche d'or déposée sur la cible de PTFE – Energie de pulse = 100 mJ – Défocalisation négative = -2 mm.	53
figure I-23 : Evolution du diamètre théorique et expérimental de l'impact en fonction de la FTSD.	53
figure I-24 : Schéma du système de génération d'aérosol couplé avec une chambre d'analyse LIBS	56
figure I-25 : Schéma du système d'échantillonnage de l'air ambiant via un PM10	58
Figure I-26 : Dispositif expérimental pour l'analyse LIBS d'aérosols de métaux lourds sur filtres.....	58
figure II-1 : Schéma de principe du montage LIBS de laboratoire avec laser, réacteurs, fibre optique, spectromètre, détecteur.....	63
figure II-2 : Photographie des composants de base du dispositif d'analyse LIBS de référence. A gauche, les dispositifs de laboratoire ; à droite, les nouveaux appareillages compacts pour appréhender les analyses sur un dispositif transportable	64
figure II-3 : Tête laser Quantel Brilliant.....	65
figure II-4 : Tête laser Quantel Big Sky CFR 200	65

figure II-5 : Reproductibilité mesurée pour le laser Quantel Big Sky selon l'énergie délivrée et mesurée par calorimétrie sur 10 séries de 10 tirs pour chaque valeur d'énergie.....	67
figure II-6 : Zone de l'impact laser dans le montage LIBS.....	68
figure II-7 : Schéma du réacteur gaz/aérosols.....	69
figure II-8 : Réacteur gaz/aérosol ouvert avec buse d'entrées et sortie des gaz ou aérosols selon un axe au centre duquel est généré le plasma résolu spatialement par fibre optique mobile par vis micrométrique	69
figure II-9 : Réacteur gaz/aérosols clos avec le porte-lentille plan convexe positionnée sur le chemin optique du faisceau laser	69
figure II-10 : Détail d'une fibre optique HCG M1000T	70
figure II-11 : Atténuation de la fibre optique HCG en fonction de la longueur d'onde (données constructeur).....	71
figure II-12 : Photographies et caractéristiques du détecteur Roper iCCD couplé à la fente de sortie du monochromateur THR1000.....	72
figure II-13 : Courbe d'efficacité quantique du tube intensificateur identiques des deux détecteurs iCCD Roper et Andor	73
figure II-14 : Photographie et schéma de principe du spectromètre à réseau Echelle Andor Mechelle5000	75
figure II-15 : Spectre brut d'un plasma formé dans un mélange air/SF ₆ obtenu avec le banc. 79	
figure II-16 : Droite de concentration du chlore – Mélanges CF ₂ Cl ₂ /Air – Délai = 4,2 µs – Temps d'obturation de l'intensificateur = 20 µs – Energie de pulse laser = 100 mJ – Accumulation sur 1000 tirs.	81
figure II-17 : Droites de concentration du fluor pour différents CFCs et tableaux des comparaison entre les rapports stœchiométriques et les rapports de pente des droites de concentration de l'élément fluor.....	82
figure II-18 : Pourcentage d'erreur du rapport Sn/Cu non-cumulé et du même rapport pour des mesures cumulées sur 10 tirs sur une même position, en fonction du nombre de tirs en enlevant les 3 premiers tirs (E _{pulse} : 100 mJ, FTSD : 0 mm)	83
figure II-19 : Rapport d'intensité cumulé de Sn à 286,332 sur Cu à 282,437 pour trois séries de 10 tirs sur un même bronze (E _{pulse} : 100 mJ, FTSD : 0 mm) – Applications : dosage de bronzes étalonnés avec Droite de concentration de Pb à 280,199 nm à l'aide de 6 matrices de bronze NIST (SS551 à SS556, Cu à 87 %) (réseau 1200 traits/mm, E _{pulse} : 100 mJ, FTSD : 0 mm) ; rapport cumulé du 4 ^{ème} tir au 10 ^{ème} tir et rapport du dernier tir	84

figure III-1 : Gammas de tailles caractéristique de particules d'aérosols bactériens isolé ou agglomérés	90
figure III-2 : Fraction inhalable des aérosols biologiques par le système respiratoire.....	90
figure III-3 : Diamètres statistiques principaux utilisés pour représenter une particule réelle	91
figure III-4 : Représentation granulométrique d'un aérosol monodispersé de particules NaCl de diamètre théorique 3 μm , mode principal mesuré 3,28 μm . Les particules sont dispersées dans l'air ambiant de mode granulométrique principal égal à environ 0,9 μm (logiciel <i>Aerosol Particle Manager</i> , TSI)	92
figure III-5 : Principe de fonctionnement de l'Aerodynamic Particle Sizer (APS, modèle 3320, société TSI Inc.)	93
figure III-6 : Surface observée par une fibre optique mobile placée à 3 mm de l'axe du plasma	95
figure III-7 : Schéma illustrant le couplage d'une particule micrométrique vaporisée et excitée par un plasma typiquement généré avec les dispositifs LIBS possédés et imagé partiellement par fibre optique	98
figure III-8 : Schéma de principe et photographie du générateur d'aérosols à orifice vibrant ou VOAG (marque TSI, modèle 3450).....	100
figure III-9 : Schéma du couplage plasma-courant linéaire de microgouttelettes séparées ...	103
figure III-10 : Visualisation de l'interaction entre le plasma et le jet linéaire de microgouttelettes séparées. NB : les dimensions du plasma et des microgouttelettes sont déformées et étirées par rapport à la réalité du fait de la lenteur de l'obturateur de l'appareil photographique utilisé.....	106
figure III-11 : Spectre sur la région 246-286 nm significatif d'une rencontre plasma-microgouttelettes issues de l'eau n°1 – Masse totale analysée de magnésium sous la forme $\text{Mg}^{2+} = 857,5 \cdot 10^{-15} \text{ g}$ et quantité d'atomes correspondantes par unité de volume du plasma = 1,58 10^{10} mm^{-3} – Paramètres temporels LIBS : énergie de pulse = 100 mJ, délai d'acquisition = 1 μs ; durée d'acquisition = 20 μs	107
figure III-12 : Spectre sur la région 385-425 nm significatif d'une rencontre plasma-microgouttelettes issues de l'eau n°1 – Masse totale analysée de calcium sous la forme $\text{Ca}^{2+} = 2065 \text{ fg}$ et quantité d'atomes correspondantes par unité de volume du plasma = 3,80 10^{10} mm^{-3} – Paramètres temporels LIBS : énergie de pulse = 100 mJ, délai d'acquisition = 1 μs ; durée d'acquisition = 20 μs	108
figure III-13 : Spectre sur la région 570-610 nm significatif d'une rencontre plasma-microgouttelettes issues de l'eau n°1 – Masse totale analysée de sodium sous la forme	

Na ⁺ = 1365 fg et quantité d'atomes correspondantes par unité de volume du plasma = 2,50 10 ¹⁰ mm ⁻³ – Paramètres temporels LIBS : énergie de pulse = 100mJ, délai d'acquisition = 1µs ; durée d'acquisition = 20µs	108
figure III-14 : Courbes de calibrage basées sur les raies du Ca (II) à 393,366 nm (courbe en position haute) et à 396,847 nm (courbe en position basse) après sélection des raies d'intensité nette maximale. Pour chaque courbe est indiquée la relation linéaire.	109
figure III-15 : Courbe de calibrage basée sur les raies du Mg (II) à 279,553 nm après sélection des raies d'intensité nette maximale. La relation linéaire liant les mesures est indiquée.	110
figure III-16 : Courbes de calibrage basées sur les raies du Na (I) à 588,995 nm (courbe en position haute) et à 589,552 nm (courbe en position basse) après sélection des raies d'intensité nette maximale. Pour chaque courbe est indiquée la relation linéaire.	111
figure III-17 : Exemples de représentations en ACP des spectres de 3 sols différents analysés par LIBS (Sirven et al.)	114
figure III-18 : Classification des types de microgouttelettes selon leur nature sur la fenêtre du calcium. Légende : Rouge = eau 1, Vert = eau 2, Bleu= eau 3, jaune = eau 4, Violet = eau 5, Bleu ciel= eau 6, Blanc = eau 7, Orange = eau 8, Gris clair = eau 9, Gris foncé = eau 10	116
figure III-19 : Classification des types de microgouttelettes selon leur nature sur la fenêtre du sodium Légende : Rouge = eau 1, Vert = eau 2, Bleu= eau 3, jaune = eau 4, Violet = eau 5, Bleu ciel= eau 6, Blanc = eau 7, Orange = eau 8, Gris clair = eau 9, Gris foncé = eau 10.....	116
figure III-20 : Classification des types de microgouttelettes selon leur nature sur la fenêtre du magnésium. Légende : Rouge = eau 1, Vert = eau 2, Bleu= eau 3, jaune = eau 4, Violet = eau 5, Bleu ciel= eau 6, Blanc = eau 7, Orange = eau 8, Gris clair = eau 9, Gris foncé = eau 10	117
figure III-21 : Classification des échantillons par ACP en rassemblant les données disponibles sur les trois fenêtres spectrales (246-286 nm : C, P, Mg, 385-425 nm : Ca, K et 570-610 nm : Na))	118
figure III-22 : Principe de sélection des bandes spectrales d'intérêt pour augmenter le pouvoir de discrimination de l'analyse en composante principale	119
figure III-23 : Spectres large bande obtenus par analyses LIBS de courants de particules monodispersées asséchées (diamètre aérodynamique final : 5,1 µm) d'une solution d'eau minérale multiélémentaire. Le spectre en position inférieure réfère à la présence de	

particule(s) dans le plasma. Celui en position supérieure a trait à un plasma n'interagissant avec aucune particule si ce n'est l'air ambiant. Le spectre supérieur est juste décalé en ordonnée pour une meilleure distinction. Paramètres LIBS : un tir laser d'énergie 100 mJ, délai et durée avant acquisition = 2 et 20 μs respectivement.	122
figure III-24 : Evolution de l'intensité nette de la raie du calcium Ca (II) à 393,366 nm en fonction du numéro de tir laser sur l'air de dispersion sans ou avec la présence de particules multiélémentaires. Paramètres LIBS : un simple tir laser d'énergie 100 mJ, délai et durée avant acquisition = 2 et 20 μs respectivement. Tracé d'un seuil basé sur la moyenne de la ligne de base du continuum additionnée de trois fois la valeur d'intensité du bruit de fond spectral. 18 spectres répondent à ce critère. $N=0,150 \text{ cm}^{-3}$, diamètre aérodynamique : 5,10 μm ($\pm 0,05$).....	124
figure III-25 : Evolution du taux d'interaction plasma-particule(s) en fonction de la concentration particulaire N au voisinage du plasma.....	125
figure III-26 : Détermination du volume V statistique d'observation des interactions plasma-particule(s).....	127
figure III-27 : Comparaison des taux de rencontre plasma/particule(s) théoriques et expérimentaux	128
figure IV-1 : Schéma et photographie par microscopie électronique d'une bactérie – ici un <i>Bacillus</i> – sous sa forme végétative	132
figure IV-2 : Schéma général d'une bactérie avec ses constituants constants et optionnels selon la nature et l'environnement de la bactérie []	133
figure IV-3 : Description et structure en double feuillet des phospholipides de membrane cytoplasmique [88].....	135
figure IV-4 : Structure de la molécule de peptidoglycane, constituant principal des parois bactériennes [88]	135
figure IV-5 : Composition des deux types de parois bactériennes « Gram-positive » [90] ..	136
figure IV-6 : Composition des deux types de parois bactériennes « Gram-négative » [90] ..	137
figure IV-7 : Spore de <i>Bacillus anthracis</i> sous microscope électronique. CR : ribosomes, N : protoplasma et nucléoïde, CW : paroi sporale, CX : cortex fait de peptidoglycane, SC : manteau protéique riche en ponts disulfures, EX : exospore lipoprotéique contenant 20% d'hydrates de carbone [88].....	137
figure IV-8 : <i>Clostridium pectinovorum</i> émergeant de la spore en germination (cliché établi par microscopie électronique) [88].....	137

figure IV-9 : Synoptique du système doublement hétérogène à considérer dans le cadre de l'expertise par LIBS d'un ensemble bactérien – édifice aqueux et carboné compartimenté selon des contenants (parois, voire capsule) et des contenus (éléments du cytoplasme, etc.) – présent dans un environnement (atmosphère, surface, etc.).....	140
figure IV-10 : Modélisation de bactéries de type <i>Bacillus</i> sous la forme d'un cylindre et de sa sphère équivalente de dimensions micrométriques	141
figure IV-11 : Histogramme comparant les teneurs en atomes Ca, Mg et Na composant une bactérie unique de <i>Bacillus globigii</i> de types BG-1, BG-2 et BG-3 présentes dans un plasma de volume de référence par rapport aux limites de détection exprimées en quantité d'atomes de Ca, Mg et Na présentes dans ce même plasma	146
figure IV-12 : Composition en espèces microbiennes de l'air	150
figure IV-13 : Exemple de pastilles de diamètre 13 mm et d'épaisseur 2 mm (bactéries et pollen).....	152
Figure IV-14 : Spectre à large bande (200 nm à 900 nm) obtenue simultanément par le réseau Echelle après analyse LIBS d'une pastille homogène de <i>Bacillus globigii</i> (souche BG-1) – Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s	153
figure IV-15 : Fenêtre spectrale 246 à 264 nm présentant les raies du carbone C et du phosphore P pour <i>Bacillus globigii</i> (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s.....	154
figure IV-16 : Fenêtre 275-295nm des raies ioniques et atomiques du Mg pour <i>Bacillus globigii</i> (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s	154
figure IV-17 : Fenêtre spectrale 372 à 392 nm présentant les raies du fer Fe, du magnésium Mg et les fragments moléculaires des bandes violettes CN pour <i>Bacillus globigii</i> (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s	155
figure IV-18 : Fenêtre spectrale 393 à 423 nm présentant les raies ioniques (II) et atomiques (I) du calcium Ca et les raies atomiques du potassium K pour <i>Bacillus globigii</i> (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s	155
figure IV-19 : Fenêtre spectrale 403 à 423 nm présentant les raies du potassium K et de nouveau le calcium Ca pour <i>Bacillus globigii</i> (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s.....	156

figure IV-20 : Fenêtre spectrale 555 à 590 nm présentant les raies du sodium Na et de nouveau les raies à l'ordre n°2 du magnésium Mg pour <i>Bacillus globigii</i> (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse : 100 mJ, délai avant acquisition : 1 μ S, durée d'acquisition : 20 μ s	156
figure IV-21 : Moyenne sur 5 séries de la différence d'intensité des bandes CN à 387,140 nm et 386,170 nm, cumulée après 10 tirs sur des pastilles d'amidon pur, d'amidon enrichi à 10% en acide benzoïque et d'amidon enrichi à 10% en naphthalène	160
figure IV-22 : Moyenne sur 5 séries de la différence d'intensité des bandes CN à 387,140 nm et 386,170 nm, cumulée après 10 tirs sur des pastilles d'amidon pur et d'amidon enrichi à 10% en glycine	160
figure IV-23 : Evolution des rapports d'intensités de P/C (RIC P/C) cumulés sur 10 tirs sur une même position (un rapport par tir) pour 4 différentes positions d'une pastille de <i>Bacillus globigii</i> n°1. Paramètres LIBS : énergie de pulse=100 mJ, délai avant acquisition=1 μ s, durée d'acquisition=20 μ s	163
figure IV-24 : Visualisation des têtes de bandes des bandes violettes moléculaires CN. Spectre issu de la formation d'un seul plasma (tir n°4 parmi une série de 10 tirs effectués sur une même position) sur une pastille de <i>Bacillus globigii</i> (souche n°1). Paramètres LIBS : énergie de pulse = 100 mJ, délai avant acquisition = 1 μ s, durée d'acquisition = 20 μ s	164
figure IV-25 : Evolution des rapports d'intensités cumulés basés sur les raies CN et Na (RIC CN/Na) obtenues après 10 tirs sur <i>Bacillus globigii</i> souche n°1. Paramètres LIBS : énergie du pulse laser = 100 mJ, délai avant acquisition = 1 μ s, durée de l'acquisition = 20 μ s	166
figure IV-26 : Fenêtre spectrale 246 à 264 nm présentant les raies du carbone C et du phosphore P pour <i>Bacillus globigii</i> (souche BG-1). Paramètres LIBS : énergie de pulse = 100 mJ, délai avant acquisition = 1 μ S, durée d'acquisition = 20 μ s.....	167
figure IV-27 : Histogramme des RIC des raies P(253,560nm) par rapport à C(247,856nm) entre deux pastilles de BG-1	167
figure IV-28 : Histogramme des RIC des raies P(253,560 nm) par rapport à Mg(285,213 nm) entre deux pastilles de BG-1	167
figure IV-29 : Histogramme des RIC des raies C(247,856 nm) par rapport à Mg(285,213nm) entre deux pastilles de BG-1	167
figure IV-30 : Histogramme des RIC des raies P(253,560nm) par rapport à C(247,856nm) pour des cultures d'un même <i>Bacillus globigii</i> dans un milieu organique et dans un milieu minéral	169

- figure IV-31 : Histogramme des RIC des raies Mg(285,213nm) par rapport à C(247,856nm) pour des cultures d'un même *Bacillus globigii* dans un milieu organique et dans un milieu minéral 169
- figure IV-32 : Comparaison des rapports d'intensités cumulés de la raie du phosphore à 253,560 nm par rapport à celle du carbone à 247,856 nm pour différentes bactéries dont deux souches de BG. Paramètres LIBS : pulse de 100 mJ. Paramètres temporels : délai avant acquisition = 1 μ s et durée de l'acquisition = 20 μ s 170
- figure IV-33 : Comparaison de deux rapports d'intensités cumulés (RIC) des raies du phosphore à 253,560 nm et du potassium à 404,414 nm par rapport à celle du carbone à 247,856 nm pour différentes bactéries dont deux souches de BG. Sauf indication tous les échantillons bactériens ont été cultivés dans un milieu identique. Paramètres LIBS : 10 pulses de 100 mJ. Paramètres temporels : délai avant acquisition = 1 μ s et durée de l'acquisition = 20 μ s 171
- figure IV-34 : Analyse en composantes principales (ACP) illustrant la richesse des informations multivariées (ici 14 longueurs d'onde) issues de spectres LIBS de 4 types de bastilles bactériennes et de 2 pollens. Chaque point représente les 14 longueurs d'onde dans le nouvel espace établi sur les 3 principales composantes (PC1, PC2 et PC3) elles-mêmes combinaisons linéaires des 14 longueurs d'onde. 174
- figure IV-35 : Boîte de Pétri sur laquelle ont été cultivées pendant 24 heures à 37°C des colonies de *Bacillus globigii* initialement déposées sur une gélose de type triptica-soja (TSA)..... 176
- figure IV-36 : Photographie prise 24 heures après la culture de bactéries de type *Bacillus atropheus* initialement réparties sur une gélose de type TSA. A titre illustratif, un grattoir en plastique est utilisé pour ôter la fine couche de bactéries développées sur la gélose nutritive. 178
- figure IV-37 : Observation d'une coupe de gélose TSA recouverte par une couche de *Bacillus atropheus* imagée par caméra haute résolution et comparaison par rapport à un réglet 179
- figure IV-38 : Superposition de spectrogrammes large bande illustrant les compositions globales de la gélose seule et d'une couche de *Bacillus atropheus* sur gélose TSA. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 100 mJ et densité d'énergie de $4,7 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μ s et durée d'acquisition égale à 20 μ s 181
- figure IV-39 : Détails du spectrogramme de la figure IV-38 illustrant l'intensité des raies du calcium à 393,366 nm et à 396,847 nm entre la couche bactérienne de *Bacillus atropheus* et sa gélose de culture. Paramètres LIBS : LIBS : pulse d'énergie 100 mJ et densité

- d'énergie de $4,7 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$ 183
- figure IV-40 : Evolution de l'intensité de la raie de Ca à 393,366 nm selon la distance entre la longueur focale de la lentille et la surface de boîte de Pétri couverte ou non d'une couche de *Bacillus atropheus* d'épaisseur égale à $100 \mu\text{m}$. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ avec diverses valeurs de densités énergétiques de $1,2$ à $6 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$ 183
- figure IV-41 : Evolution de l'intensité de la raie du Ca à 393,366 nm selon le numéro du tir sur une même position de gélose couverte ou non par une couche bactérienne de *Bacillus atropheus*. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ densité énergétique de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$ 184
- figure IV-42 : Photographies du cratère issu de l'interaction entre un plasma et la couche bactérienne de *Bacillus atropheus* d'épaisseur $100 \mu\text{m}$. (a) aspect de cratère non optimisé terme de profondeur ablatée – (b) diamètre de $200 \mu\text{m}$ d'un cratère avec un contrôle de l'ablation de toute la couche épaisse de $100 \mu\text{m}$ 185
- figure IV-43 : Détails d'un spectrogramme Echelle sur la zone spectrale 283 à 423 nm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$ 186
- figure IV-44 : Détails de raies CN issues d'un spectrogramme Echelle sur la zone spectrale 383 à 393 nm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$ 187
- figure IV-45 : Agrandissement du spectrogramme Echelle sur la zone spectrale 762 à 772 nm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$ 188
- figure IV-46 : Spectrogramme bande réduite 246 à 286 nm obtenue avec le monochromateur THR1000 doté du réseau à 300 traits/mm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$ 189
- figure IV-47 : Schéma du profil d'ablation en calotte de révolution sphérique de la gélose recouverte de la fine couche de croissance bactérienne d'épaisseur d'environ $100 \mu\text{m}$ 190
- figure IV-48 : Schéma illustrant le diamètre expérimentalement observé et celui correspondant à la tâche focale du laser. Les quantités de bactéries contenues dans chacun des plasmas sont également indiquées. 193

figure IV-49 : Spectrogramme bande réduite 246 à 286 nm obtenue avec le monochromateur THR1000 doté du réseau à 300 traits/mm. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs , gain maximal (255)	194
figure IV-50 : Analyse en composantes principales (ACP) illustrant la richesse des informations dans un spectre LIBS non limitée à quelques longueurs d'onde. Ici, l'ACP est appliquée à tout le spectre. Chaque point désigne un spectrogramme. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à 1 μs et durée d'acquisition égale à 20 μs , gain maximal (255).....	197
figure IV-51 : Spectre d'un tir laser sur l'air environnant les particules. Paramètres LIBS : pulse d'énergie = 100 mJ, spectromètre large bande de type Echelle avec délai avant acquisition = 1 μs et durée d'acquisition = 20 μs . Nombre de tirs par série = 100, nombre de plasma par spectre = 1, nombre de séries par type d'échantillon = 1	201
figure IV-52 : Spectre d'un tir laser sur une dispersion de <i>Bacillus globigii</i> n°1. Paramètres LIBS : pulse d'énergie = 100 mJ, spectromètre large bande de type Echelle avec délai avant acquisition = 1 μs et durée d'acquisition = 20 μs . Nombre de tirs par série = 100, nombre de plasma par spectre = 1, nombre de séries par type d'échantillon =1	202
figure IV-53 : Discrimination par analyse en composantes principales des différents courants de bactéries et des sels interférents. Bases des composantes principales : C, P, Mg, Ca, K, Na	205
figure IV-54 : Diagramme récapitulatif des acquis dans l'expertise de matériaux biologiques par LIBS	208
figure V-1 : Photographie du système LIBS portable développée pour l'Armée Américaine [111]	212
figure V-2 : Démonstrateur LIBS [112] NASA/CEA – Schéma de principe pour sols martiens (pression 7 torr)	213
figure V-3 : Démonstrateur LIBS Ecco pour l'analyse de pastilles médicamenteuses [114]	213
figure V-4 : Concept schématisé d'utilisation du démonstrateur opérationnel LIBS	216
figure V-5 : Schéma de principe de fonctionnement du système optique de télescope collectant des raies du plasma et les focalisant sur une fibre optique reliée à la fente d'entrée du spectromètre	218
figure V-6 : Détails et schéma de principe de fonctionnement du spectromètre équipant le démonstrateur	218

figure V-7 : Schéma de fonctionnement du système de prélèvement sélectif des tailles de particules présentant un risque respiratoire (bactéries, poussières, etc.).....	219
figure V-8 : Photographies des composants et des configurations du démonstrateur opérationnel LIBS	222
figure V-9 : Photographies de nappes bactériennes de <i>Bacillus flexus</i> et d' <i>Arthrobacter nicotaniae</i> (zones de couleur beige foncé des boîtes de Pétri) développées de façon aléatoire sur une gélose Triptica-Soja-Agar (zone beige claire des boîtes de Pétri).....	225
figure V-10 : Schéma et photographie du porte échantillon adapté à l'analyse de boîte de Pétri et couplé à la sonde laser du démonstrateur LIBS	226
figure V-11 : Spectrogramme large bande illustrant la composition globale d'amas de <i>Bacillus flexus</i> sur gélose TSA. Paramètres LIBS : pulse d'énergie 135 mJ et densité d'énergie de $2,3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$, délai avant acquisition égal à $1 \mu\text{s}$ et durée d'acquisition égale à $20 \mu\text{s}$	228
figure V-12 : Représentation en ACP de 5 bactéries cultivées sur gélose TSA pendant 24 heures avant analyses LIBS. Chaque point désigne la position des informations spectrales (sélectionnées pour chaque type d'échantillon et basées sur Ca, Na, Mg, K, C, P) dans l'espace des trois principales composantes (notée PCA1 à PCA3). Pour chaque type de bactérie, une série de 10 tirs avec un plasma/position/spectre est réalisée.....	230
figure V-13 : Représentations en ACP de 5 bactéries cultivées sur gélose TSA pendant 48 heures avant analyses LIBS. Chaque point désigne la position des informations spectrales (sélectionnées pour chaque type d'échantillon et basées sur Ca, Na, Mg, K, C, P) dans l'espace des trois principales composantes (notées PCA1 à PCA3). Pour chaque type de bactérie, une série de 10 tirs avec un plasma/position/spectre est réalisée.....	232
figure V-14 : Représentation en ACP de 5 bactéries cultivées sur gélose TSA pendant 72 heures avant analyses LIBS. Chaque point désigne la position des informations spectrales (sélectionnées pour chaque type d'échantillon et basée sur Ca, Na, Mg, K, C, P) dans l'espace des trois principales composantes (notées PCA1 à PCA3). Pour chaque type de bactérie, une série de 10 tirs avec un plasma/position/spectre est réalisée.....	232
figure V-15 : Représentation en ACP de deux différentes géloses nutritives vierges (TSA et Chocolat), ainsi que ces deux mêmes géloses avec des nappes de <i>Bacillus flexus</i> après 24 heures de croissance. Chaque point désigne la position de données spectrales d'intérêt (basées sur Ca, Na, Mg, K, P, C) dans l'espace des trois principales composantes (PCA1 à PCA3). Pour chaque type d'échantillon, une série de 10 tirs avec un plasma/position/spectre est effectuée.	233

- figure V-16 : Spectrogrammes large bande spectrale illustrant la richesse des éléments constituant les peintures (système de pigments liés par liants de type polyuréthane ou glycérophthalique). Paramètres LIBS : un pulse d'énergie 110 mJ par spectre ; Délai avant acquisition = 1 μ s, durée de l'acquisition : 20 μ s..... 236
- figure V-17 : Région 247-257 nm issue du spectrogramme large bande spectrale Echelle d'analyse LIBS de peinture OTAN polyuréthane avec ou sans contamination (TEP ou DMSO). Mise en évidence de la raie du phosphore à 253,560 nm en présence de TEP seulement. Paramètres LIBS : Energie de pulse = 110 mJ ; Délai avant acquisition = 1 μ s, durée de l'acquisition : 20 μ s 239
- figure V-18 : Région 920-925 nm issue du spectrogramme large bande spectrale Echelle d'analyse LIBS de peinture OTAN polyuréthane contaminée avec du DMSO. Mise en évidence des raies expérimentales du soufre à 921,291, 922,811 et 923,749 nm et comparaison avec les raies théoriques correspondantes de la base NIST. Paramètres LIBS : Energie de pulse = 110 mJ ; Délai avant acquisition = 1 μ s, durée de l'acquisition : 20 μ s..... 240
- figure V-19 : Représentations en ACP de contaminations chimiques sur peintures de types polyuréthane (OTAN) et glycérophthalique (française) 242
- figure V-20 : Spectrogramme large bande de la peinture française glycérophthalique contaminée par un dépôt sec de *Bacillus globigii* sporulé initialement conservé dans de l'eau. Paramètres LIBS : un tir d'énergie 110 mJ par spectre, délai avant acquisition du spectre : 1 μ s, délai d'acquisition : 20 μ s..... 244
- Figure V-21 : Représentation sur les trois composantes principales des données spectrales traitées par ACP et issues d'analyses LIBS de peintures françaises glycérophthaliques polluées par des dépôts de bactéries ou d'interférents biologiques (pollen) et salins ($MgSO_4$). Légendes : o *Bacillus thuringiensis* (BT, eau), o *Bacillus globigii* (BG, eau) dans l'eau, o *Bacillus globigii* (BG, TRIS) dans TRIS, + Pollen d'Orme, + $MgSO_4$ 246
- figure V-22 : Types de spectres « large bande » obtenus lors d'analyses LIBS de courants de particules monodispersées asséchées (diamètre aérodynamique final : 5 μ m) issue de la solution « eau 1 ». Le spectre en position inférieure réfère à la présence de particule(s) analysée(s) par le plasma. Celui en position supérieure a trait à un plasma n'interagissant avec aucune particule si ce n'est l'air ambiant. Le spectre supérieur est juste décalé en ordonnée pour une meilleure distinction. Paramètres LIBS : simple tir laser d'énergie 110 mJ, délai et durée avant acquisition = 2 et 20 μ s respectivement 249
- Figure V-23 : Discrimination effective de modèles d'aérosols biologiques. Légendes..... 250

figure V-24 : organigramme pour concevoir une intelligence artificielle d'identification
d'échantillons 251

LISTE DES TABLEAUX

tableau I-1 : Exemples d'éléments recherchés par LIBS dans un échantillon dans l'air.....	42
tableau I-2 : Diamètre du faisceau laser à l'endroit de l'impact en fonction de la FTSD.....	47
tableau II-1 : Principales caractéristiques des lasers Brillant (Nd :YAG à $\lambda=1064$ nm)	66
tableau II-2 : Pourcentages de transmission des fibres optiques HCG aux longueurs d'onde étudiées.....	71
tableau II-3 : Caractéristiques de l'ensemble spectromètre Mechelle et du détecteur iCCD iStar	75
tableau II-4 : Eléments détectés par LIBS.....	76
tableau II-5 : Raies d'émission atomiques et ioniques des éléments observés dans un plasma (I : élément atomique, II : atome simplement ionisé, Int. Rel. : intensité relative d'après bibliographie, A_{ki} : probabilité de transition ($10^8 s^{-1}$), $E_{exc.}$: potentiel d'excitation en eV).	78
tableau II-6 : Longueurs d'onde des raies moléculaires de C_2 et CN avec en gras les principales têtes de bandes (détail de toutes les raies pour les bandes violettes CN).	79
tableau II-7 : Limites de détection obtenues sur des atomes de molécules gazeuses de type Fréon et SF_6 avec le dispositif actuel doté du monochromateur THR1000 couplé au détecteur iCCD PIMAX	81
tableau III-1 : Gammas de tailles caractéristiques de diverses particules atmosphériques.....	89
tableau III-2 : Informations granulométriques accessibles par le logiciel de l'APS : nombres, surfaces et masse des particules. Pour chaque catégorie sont indiquées en μm : valeurs médianes (<i>median</i>) – moyennes arithmétiques (<i>mean</i>) – moyennes géométriques (<i>geometric mean</i>) – mode en μm -écart type géométrique (<i>geometric standard deviation</i>). La concentration numérique totale (<i>total concentration</i>) est en particules par cm^3 ($\#/cm^3$). Des informations surfaciques et massiques sont extraites de ces premières mesures expérimentales.....	94
tableau III-3 : Limites de détection pour les éléments Cl, C, S et F exprimées en nombre d'atomes détectables dans le volume du plasma induit par un pulse laser d'énergie 100 mJ, de longueur d'onde 1064 nm, de diamètre initial égal à 5 mm et focalisé par une lentille de distance focale égale à 65 mm. Deux types de spectromètres ont été utilisés comme indiqués.....	97
tableau III-4 : Concentrations cationiques des eaux de source et minérales utilisées (données présentes sur les étiquettes des bouteilles)	102

tableau III-5 : Masses et quantités en nombre d'atomes pour chaque élément constituant les gouttelettes générées	102
tableau III-6 : Quantités atomiques contenues dans l'ensemble des 17,5 microgouttelettes analysées par plasma	105
tableau III-7 : Bilan des limites de sensibilité exprimées en masses élémentaires, en ppm et en nombre d'atomes détectables par unité de volume élémentaire pour Ca, Mg et Na.....	112
tableau III-8 : Composition massiques des microgouttelettes de solutions multiélémentaires analysées par LIBS	115
tableau III-9 : Liste des concentrations particulaire obtenues au voisinage de la position de formation du plasma.....	122
tableau III-10 : Liste des principales raies d'émission détectées dans la majorité des spectres et une minorité représentative d'interactions plasma-particule(s)	123
tableau III-11 : Comptage des interactions effectives plasma-particule(s) selon la concentration particulaire initiale.....	124
tableau III-12 : Durée d'obtention d'un spectre selon la fréquence d'acquisition des spectromètres utilisés	126
tableau III-13 : Calculs des durées nécessaires à l'obtention d'un spectre significatif d'une interaction effective plasma-particule(s) selon le type de spectromètre utilisé.....	126
tableau III-14 : Comparaison entre les taux théoriques et expérimentaux des rencontres plasma-particule(s)	128
tableau IV-1 : Composition massique de la matière sèche d'une bactérie <i>Escherichia coli</i> d'après []	139
tableau IV-2 : Ions inorganiques présents dans une cellule bactérienne croissant en milieu minimal en glucose et fonctions associées d'après []	139
tableau IV-3 : Composition élémentaire de la matière pour 3 espèces de <i>Bacillus globigii</i> (notées BG-1, BG-2 et BG-3) et pour 3 exemples d'interférents biologiques (spores fongiques végétales).....	142
tableau IV-4 : Masses élémentaires des composés minéraux contenues dans une seule bactérie de masse égale à 2 pg : valeurs pour trois différentes particules de <i>Bacillus globigii</i> (BG-1, BG-2 et BG-3) – Comparaison entre les masses élémentaires de Ca, Mg et Na présents dans une bactérie BG et les limites de détection de référence en LIBS pour les mêmes éléments contenus dans des particules calibrées et analysées par LIBS.....	143

tableau IV-5 : Comparaison des teneurs élémentaires (Ca, Mg et Na notamment) typiquement présentes dans une seule bactérie de type <i>Bacillus</i> avec les performances analytiques de notre banc expérimental LIBS.....	145
tableau IV-6 : Principaux agents pathogènes et organismes simulants correspondants. La classification de type Gram positive et négative est indiquée pour chacune des bactéries à des fins d'appréhension du type de paroi – épaisse ou fine – considérée. Une bactérie naturellement présente dans l'air ambiant est également considérée.....	151
tableau IV-7 : Liste non exhaustive des raies des éléments minéraux et organiques typiquement détectées dans les bactéries telles que <i>Bacillus globigii</i> par LIBS.....	157
tableau IV-8 : Calculs des rapports d'intensités de raies CN après 1 μ s de relaxation pour démontrer la reproductibilité de la température des plasmas induit par laser.....	165
tableau IV-9 : Composition des deux milieux de cultures utilisés pour une même culture initiale de <i>Bacillus globigii</i> souche 1 avant lyophilisation et pastillage.....	168
tableau IV-10 : Liste des observables spectrales sélectionnées pour les calculs des composantes principales de l'analyse en composantes principales (ACP).....	173
tableau IV-11 : Composants des couches de <i>Bacillus atropheus</i> cultivées sur gélose TSA. Légende : ++ et + = quantité très importantes ou notable du composé ; - = faible quantité du composé dans un échantillon par rapport au second échantillon	189
tableau IV-12 : Extrapolation des quantité minimale de bactérie de type <i>Bacillus</i> détectable par notre système LIBS selon un modèle d'équivalence linéaire des intensités de la raie de P à 255,560 nm.....	196
tableau IV-13 : Référence des deux bactéries utilisées sous forme de courants particulières issus de nébulisation ultrasonique et photographies des suspensions liquides contenant 10^9 bactéries de <i>Bacillus globigii</i> (souche CEB 93/29 à droite) ou de <i>Bacillus thurengiensis</i> (souche CEB 97/89 à gauche).....	200
tableau IV-14 : Eléments détectés par LIBS sur les courants de particules bactériennes.....	202
tableau V-1 : Liste des gaz de combat avec formules chimiques et effets.....	210
Tableau V-2 : Méthodes analytiques employées selon l'échantillon d'intérêt pour dimensionner les matériels du démonstrateur opérationnel LIBS.....	215
tableau V-3 : Caractéristiques du laser CFR 200 embraqué dans la sonde portative.....	217
tableau V-4 : Liste des bactéries analysées – en couleur noire = les espèces bactériennes issues et représentatives du bruit de fond synthétique – en rouge = une espèce simulant un agent pathogène	224

tableau V-5 : Liste des éléments détectés par LIBS de nappes hétérogènes de <i>Bacillus flexus</i> sur gélose TSA.	228
tableau V-6 : Liste des éléments détectés dans les peintures. Légende : « = » quantité voisine d'un composé dans un échantillon par rapport au second échantillon (en terme de rapport d'intensité du composé par rapport à la raie du carbone pris en référence à cause de son importance dans les formules des peintures).....	237
tableau V-7 : Liste des marqueurs spectraux retenus pour construire les composantes principales de la méthode ACP	241
tableau V-8 : Liste non exhaustive des raies d'émission détectées pour les différentes contaminations par dépôts secs sur peinture française glycérophthalique. Légende « ++ » et « + » : quantité très importantes ou notable du composé ; « = » : quantité stable ; « - » : faible quantité du composé dans un échantillon par rapport à l'échantillon sans contamination. (en terme de rapports d'intensité du composé par rapport à la raie du carbone pris en référence à cause de son importance dans les formules des peintures)	245
tableau V-9 : Liste de quatre eaux minérales (solutions multiélémentaires calibrées en composition pour Ca, Mg et Na) utilisées pour générer des particules calibrées en diamètre aérodynamique et composition.....	248
tableau V-10 : Quantités de bactéries de type <i>Bacillus globigii</i> en termes d'éléments Ca, Mg et Na contenues dans une seule particule asséchée issue de l'eau 1	248

ANNEXE I – ELEMENTS MATHEMATIQUES ET INFORMATIQUES DE TRAITEMENTS MULTIVARIÉS DES DONNEES : ANALYSES EN COMPOSANTES PRINCIPALES

Les méthodes multifactorielles permettent d'obtenir des représentations graphiques qui constituent le meilleur résumé possible de l'information contenue dans un grand tableau de données. Pour cela, il faut consentir à une perte d'information afin de gagner en lisibilité.

Dans nos traitements de données, l'Analyse en Composante principale (ACP) a été automatisé grâce aux modules informatiques préprogrammés sur le logiciel Matlab version 7.14. Dans la suite nous résumerons les idées et concepts de base de l'ACP pour représenter facilement des individus présentant des caractéristiques similaires. De nombreux ouvrages présentent de façon exhaustive les méthodes de multivariées. [8] [9] [10]

Dans la plupart des situations, on dispose de plusieurs observations sur chaque individu (échantillon) constituant la population d'étude : p variables (ici les raies de diffusion associées à une longueur d'onde) par individu, p étant strictement supérieur à 1. L'étude séparée de chacune de ces variables donne quelques informations mais est insuffisante car elle laisse de côté les liaisons entre elles, ce qui est pourtant souvent ce que l'on veut étudier. C'est le rôle de la statistique multifactorielle que d'analyser les données dans leur ensemble, en prenant en compte toutes les variables. L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode pour étudier les données multidimensionnelles, lorsque toutes les variables observées sont de type numérique, et que l'on veut voir si il y a des liens entre ces variables. L'ACP représente des données initiales à l'aide de nuage de points dans un espace géométrique. L'objectif est alors de trouver des sous-espaces (droite, plan,...) qui représentent au mieux le nuage initial. L'analyse en composantes principales (ACP) consiste à représenter les spectres de données multivariées (plusieurs centaines, voire milliers d'intensités de raies associées à une longueur d'onde ici) dans un nouvel espace de dimensions bien moindre et conservant l'information contenue dans les données initiales.

8 GEORGIN J-P., *Analyse interactive des données (ACP,AFC) avec Excel 2000 – Théorie et pratique* / ed. Presse Universitaire, Rennes, 2002, 267 p.

9 BOUROCHE J.-M., SAPORTA G., *L'analyse des données* / ed. Presses Universitaires de France, 8^{ème} édition, coll. Que Sais-je, Paris, 127 p.

¹⁰ SAPORTA G., *Probabilités Analyse des données et statistique* / ed. Technip, 2^{ème} édition, Paris 2006, 622p.

Les données initiales sont sous la forme d'une matrice S des p spectres en ligne pour chaque échantillon observé. La matrice S correspond aux coordonnées des spectres dans la base initiale des n longueurs d'onde.

Les vecteurs propres de la matrice de covariance $S'S$ – avec S' la matrice transposée de S – constituent les composantes principales (CP). Les CP forment une nouvelle base laquelle présente les propriétés suivantes :

- Chaque composante principale définit un axe de variance maximale de l'ensemble de données initiales,
- Ces axes sont orthogonaux : l'information contenue dans une composante principale n'est pas corrélée à celle contenue dans une autre composante principale,
- The valeurs propres associées avec à chaque composante principale caractérise la quantité d'information qu'elle contient.

Classiquement, quelques composantes principales, au lieu des centaines ou milliers de longueurs d'onde initiales, vont représenter la quasi-totalité de l'information spectrale. A partir de la base définie par les composantes principales, nous pouvons calculer les coordonnées des spectres dans le nouvel espace de représentation. Les spectres sont alors projetés sur le plan des 1^{ère} et 2^{ème} composantes principales contenant la majeure partie de l'information.

L'ACP est une technique de réduction des données initiales (n spectres avec p longueurs d'ondes chacun) dont l'objectif est de trouver les combinaisons des variables initiales (appelées composantes principales) qui décrivent les tendances à l'intérieur des données initiales.

Un programme a été développé sous Matlab 4.2 avec l'aide de Philippe ADAM du CEB, puis nous l'avons converti sous Matlab 7.14.

Annexe I – Éléments mathématiques de traitements multivariés des données : Analyses en Composantes Principales

```

% =====
%                               Acp.m
% =====
% Programme d'analyse PCA pour des données expérimentales (d'après GEORGIN)
% =====
% Le tableau doit être chargé automatiquement en rentrant son nom

clf
clear all

Nomfic=uigetfile('*.txt','Fichier à relire');
Nom=Nomfic(1:length(Nomfic)-4);
% Nom=input('Nom du fichier à relire (.txt) : ','s'); % / 'exemple'
% Nomfic=[Nom,'.txt']; % / 'exemple.txt'
load(Nomfic); % / Chargement
R=eval(Nom); % / Transfert vers R
clear(Nom); % / Efface 'exemple'
clear Nomfic; % / Efface variable intermédiaire

N=size(R,1); % / Nombre de lignes (individus=observations)
P=size(R,2); % / Nombre de colonnes (variables)

A=ones(N,1)*mean(R); % / Le coefficient permet de passer de
S=ones(N,1)*std(R)*sqrt((N-1)/N); % / l'écart-type standard (N-1) à
% / l'écart-type empirique (N)

% Choix de la matrice de travail

X=(R-A)./S/sqrt(N); % /Matrice de travail : Normée réduite => corrélation
X=(R-A)/sqrt(N); % /Matrice de travail : Covariances
X=R; % /Matrice de travail : Analyse générale

clear R ;
clear A ;
clear S ;

% =====
% Espace des variables
% =====

disp('=====')
disp('Calcul des coordonnées des individus dans les axes factoriels')

[U L]=eig(X'*X,'nobalance'); % /Vecteur propres (U); valeurs propres (L)

% Remise en ordre de U par valeur propre décroissante

E=sum(L); % /Valeurs propres non triées
E2=flipr(sort(E)); % /Valeurs propres décroissantes
U2=[];

for k=1:P % /Détermine les anciennes positions des valeurs propres
Place=find(E2(k)==E); % / avant remise en ordre
U2(:,k)=U(:,Place)*(-1)^(Place-k); % /Permutation avec signe (-) si permutation impaire
end

E=E2;
U=U2; % /On remplace U initial par U permuté. A faire AVANT projection

clear E2
clear U2

Z=X*U; % /Projection pour coordonnées des points dans les axes factoriels
% /Car on en n'a plus besoin

eval(['save ' Nom ' E Z']) % /Sauvegarde de la matrice projetée pour rechargement ultérieur sans refaire les calculs
disp('Sauvegarde théoriquement effectuée !')
disp(' ')
% Affichage des valeurs propres triées de la matrice 'X'
disp('Valeurs propres : ');E

% =====
% Espace des individus
% =====

disp('Calcul des coordonnées des variables dans les axes factoriels')

% On utilise la propriété GEORGIN (page 49) pour les vecteurs propres : V(i)=(XU)(i)/sqrt(L[i]).
% Pratique car XU a déjà été calculé (Z). On évite ainsi de créer la
% matrice X*X' qui a pour dimension N*N où N est le nombre de points (>1000 !!!)

V=Z./sqrt((E'\ones(1,N)')); % /Traduction de la formule GEORGIN
W=X'*V; % /Projection directement dans le sous-espace dimension P
clear V; % /Car on en n'a plus besoin.

% =====
% Tracés
% =====

disp('Tracé')
rep='y';

while (rep ~= 'n' & rep ~= 'N' ); % /Début de boucle 1

% Choix du plan factoriel à représenter

i=1; % /Sélection par défaut dans le cas où il n'y a
j=2; % /que deux variables ce qui évite de poser la question
k3=j; % /Force la 3ème composante quand il n'y en a que 2. Utile pour TraceNL

disp(' ')
disp('=====')
disp(' ')

if P>2;
i=min(P,input('PC n°1 : ')); % /Empêche de dépasser malencontreusement la dimension
j=min(P,input('PC n°2 : ')); % /ce qui entraînerait une 'plante' du logiciel
k3=min(P,input('PC n°3 : ')); % /k3 parce que k est utilisé par ailleurs
end

figure(1)
clf

subplot(2,1,1)
plot(R(:,i),R(:,j),'r+') % /Tracé des points initiaux
title('Points initiaux')
grid

```

Annexe I – Eléments mathématiques de traitements multivariés des données : Analyses en Composantes Principales

```

subplot(2,1,1)
plot(Z(:,i),Z(:,j),'yo',W(:,i),W(:,j),'+g') % /Tracé des individus et variables dans les axes factoriels
for k=1:P
text(W(k,i),W(k,j)+1,num2str(k),'FontSize',8); % /Labels sur les variables
end

texte=['Individus (o) et Variables (+) dans plan (' ,num2str(i),' ',' ,num2str(j),' ')'];
title(texte)
ti=['PC' num2str(i) ' ' : VP(' num2str(i) ')=' num2str(E(i)) ' - Inertie =' num2str(E(i)/sum(E)*100) ' %'];
tj=['PC' num2str(j) ' ' : VP(' num2str(j) ')=' num2str(E(j)) ' - Inertie =' num2str(E(j)/sum(E)*100) ' %'];
tk=['PC' num2str(k3) ' ' : VP(' num2str(j) ')=' num2str(E(k3)) ' - Inertie =' num2str(E(k3)/sum(E)*100) ' %'];
xlabel(ti)
ylabel(tj)
xlabel(tk)
grid

% =====
% Cercle des corrélations
% =====

% disp('Cercle de corrélation et calcul de l''angle')
WR=W; % /On ne garde qu'une sous-matrice de dimension P
Norme=[]; % /Réinitialisation car ces deux variables changent à chaque boucle

for k=1:P;
Norme=[Norme;norm(WR(k,:))];
end;
Norme=Norme*ones(1,P); % /Calcul des coordonnées sur le cercle "corrélations"
WR=WR./Norme;

subplot(2,1,2)
t=0:1:2*pi;
plot(cos(t),sin(t)) % Tracé du cercle des corrélations
axis('square')
texte=['Cercle des corrélations (' , num2str(i),' ',' , num2str(j) , ')'];
Title(texte)
grid
hold on

for k=1:P;
plot(WR(k,i),WR(k,j),'g*')
text(WR(k,i)+0.1,WR(k,j),num2str(k))
end
hold off

% =====
% Tracé en couleur
% =====

% TraceNL : Pour fichier TOTAL (Nicolas LEONE)
% TraceDD : pour fichier BACT (Damien DESCROIX)
% souches bactériennes en TRELIBS sur boîte de Petri

figure(2)
traceNL(Z,E,i,j,k3)
traceDD(Z,E,i,j,k3)
% h=legend('ob','EC','or','BT','og','PM','oy','ST','om','BG');
% axes(h)
% refresh(gcf)

hold off

if P==2
rep='n';
else
rep=input('Nouvelles composantes (y/Y or n/N) ? :','s'); % /Fin de 'if'
end
end % /Fin de boucle 1

end % /Fin du programme

```

Listing informatique du programme développé pour l'Analyse en Composante Principale sous Matlab

ANNEXE II – COUPLAGE DE LA LIBS AU SUIVI D'UN PROCÉDE DE PURIFICATION DU SILICIUM DE QUALITE PHOTOVOLTAÏQUE

I- Préambule et Contexte de l'étude

Le travail, résumé ici, a été réalisé en collaboration [11] avec l'équipe du professeur Daniel MORVAN du Laboratoire de Génie des Procédés Plasmas et Traitement de Surfaces de l'Université Paris 6, avec la participation active de mademoiselle Audrey SORIC. [12]

L'industrie des énergies photovoltaïques présente des perspectives prometteuses des générateurs électriques écologiques plus performants et moins chers. La fabrication des panneaux photovoltaïque met en jeu des blocs de silicium métallurgique. Ces matériaux présentent l'inconvénient de posséder des impuretés - naturelles ou issues de pollution – telles que les métaux de transition de la couche 3d (titane à cuivre), certains de la couche 4d (molybdène, palladium, argent) et 5d (platine,or), ainsi que des métaux alcalins, lesquels constituent des centres de recombinaisons des électrons produits par la mécanisme photovoltaïque. Une méthode originale a été développée pour purifier le silicium de type métallurgique pour obtenir une qualité ultra pure : un plasma thermique radiofréquence fond le silicium sous forme d'un bain soumis à une différence de potentiels pour faire migrer sélectivement et concentrer les impuretés en périphérie à éliminer. L'objectif est de coupler la LIBS en ligne sur le bain de silicium fondu. Des analyses *ex situ* ont été faites pour appréhender la faisabilité du couplage. La LIBS est adaptée à l'analyse des matériaux ultrapurs comme le Si photovoltaïque pour la recherche d'impuretés (Cu, Ca, Al, Si, P, Si, etc.). [13] [14] [15]

¹¹ SORIC A., MORVAN D., AMOUROUX J., LEONE N., ADAM P., LIBS analysis of photovoltaic material including wafer and raw material, *High Temp. Mat. Proc.*, 2006, 10, 4, pp. 583-590

¹² SORIC, Audrey, *Influence de la polarisation du silicium fondu par plasma thermique. Etude du transfert de matière et contrôle du procédé en ligne par OES et de la pureté par LIBS*, Th : Sciences : Paris 6 : 2006

¹³ ROMERO D., FERNANDEZ ROMERO J.M., J.J. LASERNA, Distribution of metal impurities in silicon wafers using imaging-mode multi-elemental laser-induced breakdown spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, pp. 199-204

¹⁴ ROMERO D., J.J. LASERNA, A microanalytical study of aluminium diffusion in photovoltaic cells using imaging-mode laser-induced breakdown spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B*, 2000, 55, pp. 1241-1248

¹⁵ MILAN M., LUCENA P., CABALIN L.M., LASERNA J.J., Depth profiling of phosphorus in photonic-grade silicon using laser-induced breakdown spectrometry, *Appl. Spectrosc.*, 1998, 52, 3, pp.444-448

II- Descriptif du procédé de purification par torche plasma RF polarisée

La torche plasma est composée de 14 doigts de cuivre refroidis à l'eau. Le plasma est généré par 4 spires inductives enroulées autour de la torche et reliées au générateur RF de fréquence 4,5 MHz. L'enceinte de traitement est composée d'un réacteur cylindrique en acier refroidi à l'eau et d'un porte substrat amovible en cuivre refroidi. Un générateur d'une puissance de 1,2 kW et de gamme de tension de -600V à +600V pour une intensité de courant maximale de 2A est utilisé. Le Si est fondu selon des durées et conditions optimisées par Audrey SORIC [12]

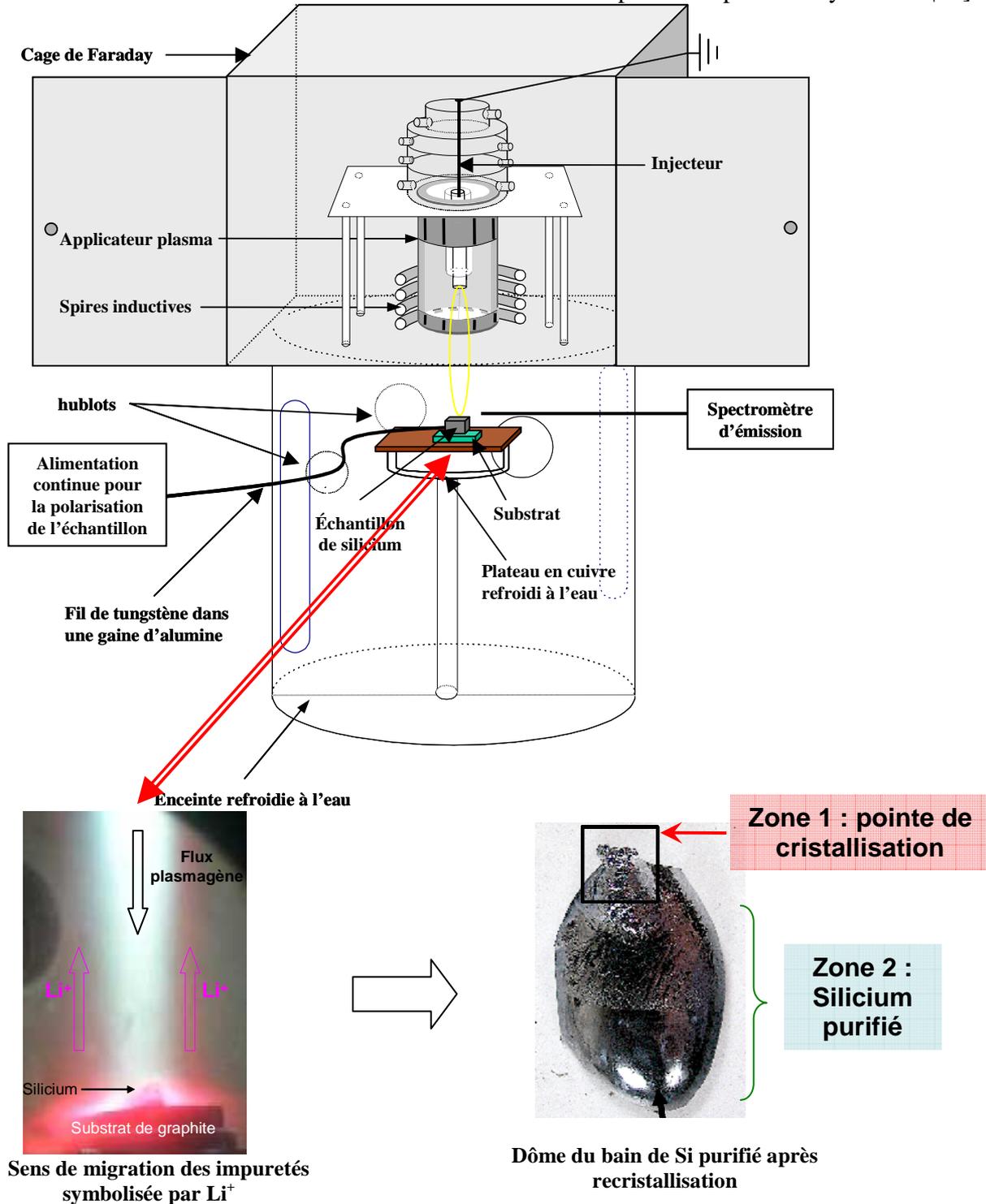


Figure A2-1 : schéma de principe du réacteur avec détails sur le Si fondu par torche plasma et soumis à un champ électrique pour faire migrer les impuretés – Photographies du dôme de bain de Si cristallisé

A l'issu du traitement par la torche plasma d'argon et le champ électrique couplé, le silicium cristallise en présentant une pointe différente de la base (cf. photographie du dôme du bain).

III- Analyse ex situ des régions du Si cristallisé pour valider les paramètres et le résultats des migrations d'impuretés

III-1 Paramètres LIBS

- pulse du laser Nd:YAG, $\lambda = 1064$ nm, durée de 6 ns et d'énergie à 80 mJ (Quantel Brilliant)
- lentille de focalisation de focale 130 mm
- FTSD (focus to sample distance) : 0

III-2 Mode opératoire pour une semi quantification des impuretés

Pour chaque zone de l'échantillon analysé, on exécute cinquante tirs répartis en deux séries :

1. Trente tirs donnant lieu chacun à l'enregistrement d'un spectre : la surface du matériau est décapée pour éliminer toute impureté de surfaces susceptibles d'être déposées au cours de la manipulation de l'échantillon, du transport, etc.
2. Accumulation de vingt tirs sur un même spectre pour connaître la composition de l'échantillon. L'accumulation permet de mieux différencier les raies des éléments présents en faible quantité et de moyennner les intensités sur plusieurs tirs. Plusieurs points de mesure pour chaque zone

Un rapport est choisi pour sa reproductibilité : avec en référent interne une raie du silicium.

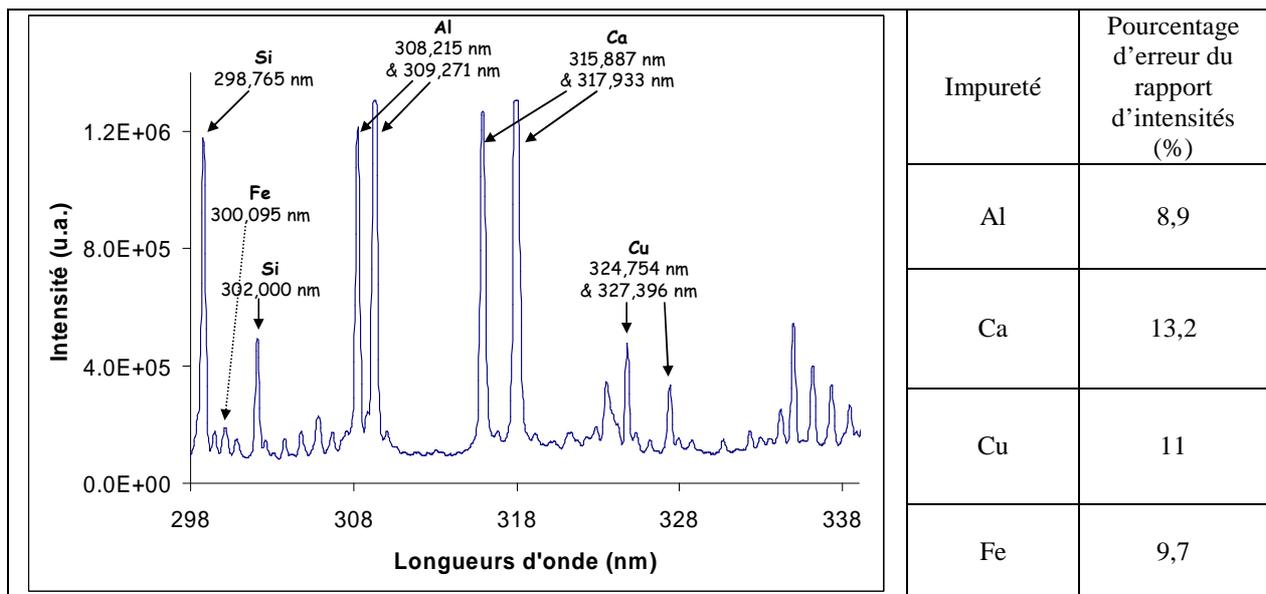


Figure A2-2 : Analyse LIBS d'un échantillon de silicium métallurgique de qualité Pechiney dans la fenêtre spectrale 298 - 338 nm - Pourcentage d'erreur sur les valeurs des rapports d'intensités calculé pour la fenêtre spectrale 298-338 nm

Les dômes de bains de Si purifié présentent : un cœur avec des impuretés en quantités diminuées après traitement et ayant migrer vers l'interface qui concentre les impuretés non évaporées.

Tableau A2-1 : Longueurs d'onde des raies significatives relevées sur le spectre de la Figure A2-2

Elément	Longueurs d'onde (nm)
Si	245,213 ; 250,690 ; 251,433 ; 251,612 ; 251,921 ; 252,412 ; 252,851 ; 253,238
Fe	244,387 ; 248,327 ; 249,064 ; 249,115 ; 253,899
C	247,857
B	249,678 & 249,773
P	253,565
Si	298,765 & 302,000
Al	308,215 & 309,271
Ca	315,887 & 317,933

III-3 Analyses quantitatives étalonnées par ICP

Pour calibrer les rapports d'intensités de raies liés à la concentrations de l'élément d'intérêt par rapport au Si, les échantillons bruts (métallurgiques), traités par le procédés et ceux de déjà qualité photovoltaïque sont analysés par ICP pour doser en valeurs absolues les teneurs en impuretés. Les valeurs sont reportées dans les tableaux suivants et exprimées en ppm :

Tableau A2-2 : Tableau récapitulatif des concentrations de départ et après trente minutes de traitement (par un plasma d'argon pur de puissance = 17 kW) des impuretés du silicium (ppm)

Impureté	Métallurgique (ppm)	Echantillon traité à $\eta=0V$ (ppm)	Echantillon traité à $\eta=+21V$ (ppm)
Al	4944	2390	309
Ca	2772	1121	225
Cu	156	74	16
Fe	4300	1529	764
Mg	60	8	8
B	80	64	64
total	12312	5186	1386
Efficacité de la purification		2,4	8,9

Les niveaux de sensibilités élémentaires de la LIBS sont en adéquations avec ceux de l'ICP. Le choix d'un potentiel de +21V contribue à réduire de près d'un facteur 9 la quantité des impuretés initialement présentes.

L'analyse LIBS permet ainsi de mieux comprendre la migration des impuretés dans le bain fondu en fonction des conditions de du traitement. Audrey SORIC propose le modèle d'interprétation suivant.

Au cours du traitement plasma d'argon, l'application d'une surtension anodique à l'échantillon favorise l'élimination des impuretés métalliques et ce quelque soit le silicium de départ ; le phénomène responsable est de type électrochimique. A ce titre, on peut proposer un mode opératoire analogue à celui d'une cellule électrochimique où le plasma se comporterait

comme une « solution électrolytique » permettant le transfert des ions et des électrons tandis que l'échantillon joue le rôle d'électrode

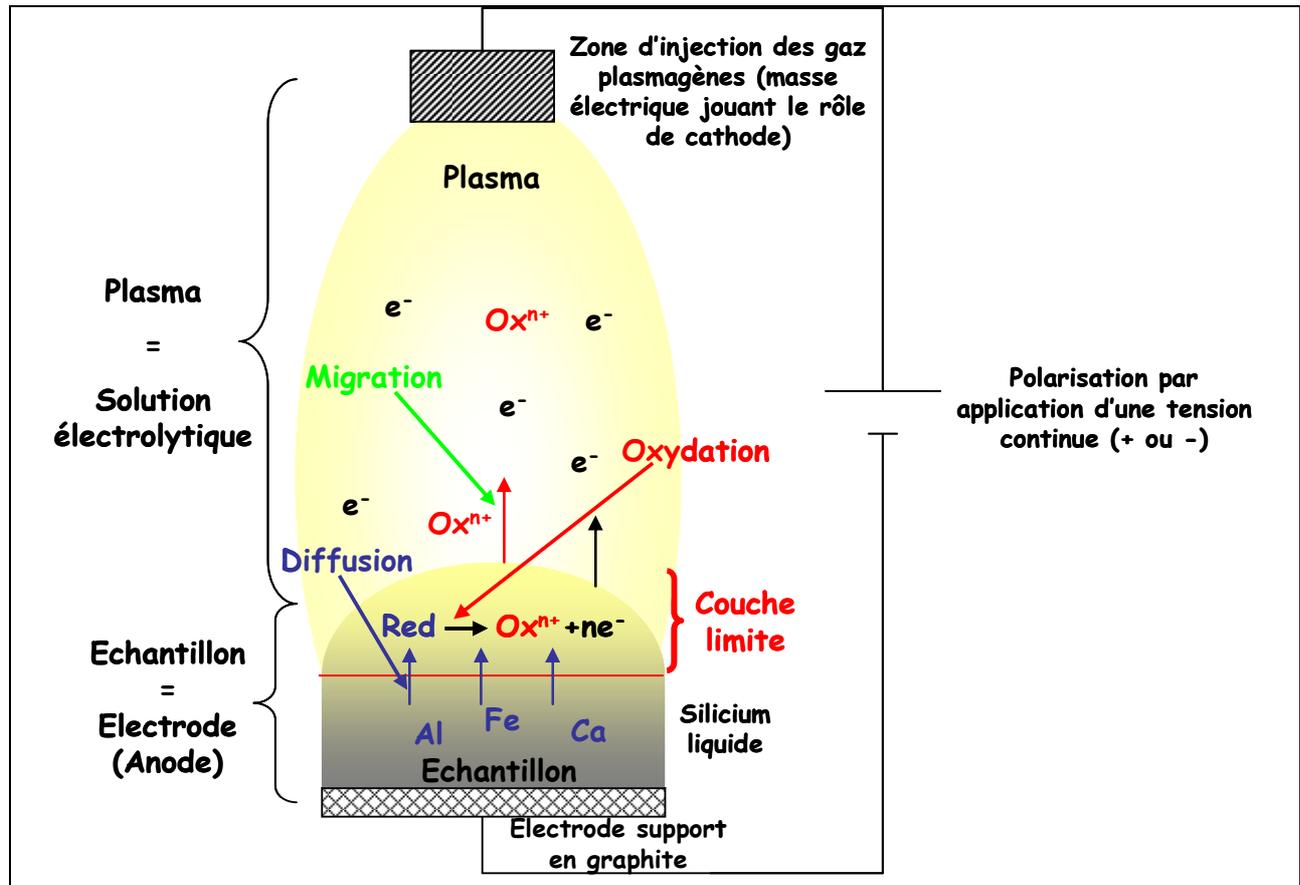


Figure A2-3 : Résumé des phénomènes responsables du transfert de matière à l'interface plasma - échantillon de silicium liquide

Le LIBS permet de valider en temps réel les conditions la qualité de la purification. Les industriels français du secteur (sociétés EMIX et Photowatt France) sont intéressés par la méthode. A partir du début de l'année 2008 un dispositif LIBS sera installé sur une chaîne de production industrielle de Si métallurgique fondu et soumis au traitement : le couplage serait cette fois-ci direct pour des analyses in situ pour des diagnostics immédiats : le couplage de la LIBS est fait pour l'analyse à distance de bain d'acier en fusion, ce qui prouve la faisabilité du projet. [16]. L'étude se poursuit actuellement sur les facteurs permettant d'améliorer la qualité de purification (gaz environnant, augmentation de la tension appliquée, etc.)

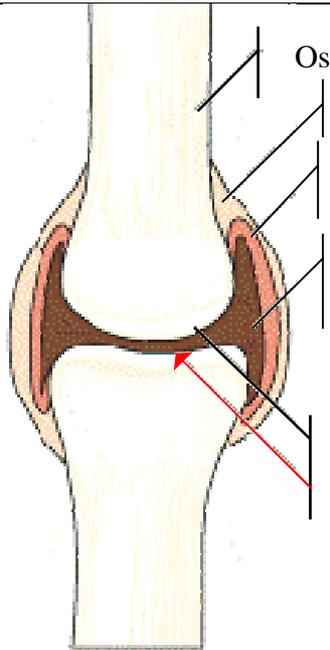
¹⁶ PALANCO S. ET AL., Analytical control of liquid steel in an induction melting furnace using a remote plasma spectrometer, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, pp. 462-467

ANNEXE III – ANALYSES PAR LIBS DE TISSUS ORGANIQUES POUR DIAGNOSTICS BIOMEDICAUX

I- Préambule et contexte de l'étude

Ces analyses ont été menées suite à une collaboration avec le professeur Francis BERENBAUM, spécialiste en pathologie articulaire de la Faculté de Médecine de Pierre et Marie Curie et dont l'équipe de recherche nous a fourni des biopsies de cartilages articulaires animaux.

Le cartilage articulaire présent à l'extrémité de chacune de nos articulations (« joint » entre deux os) assure la fonction de mobilité grâce à ses capacités viscoélastiques. La mesure *ex vivo* de la teneur en éléments métalliques ou métalloïdiques dans les cartilages murins de genou (Zn, Ca, Fe, P) permet d'aborder la notion de composition et d'échanges dans les tissus riches en collagène (protéine fibreuse très résistante aux tractions) dont les transferts de matière dépendent des phénomènes de compression articulaire responsables de l'hydrodynamique de transfert cartilage-liquide synovial. La texture spécifique des fibres de collagène à forte propriété polaire, le collagène de type II, explique la rétention de molécules d'eau, base du liquide de percolation. Les espèces métalliques tel que le Zinc pourraient être responsables d'une partie des propriétés viscoélastiques des molécules constituant l'architecture du cartilage.

 <p>Os</p> <p>Capsule articulaire</p> <p>Membrane synoviale</p> <p>Cavité synoviale</p> <p>Cartilage</p>	<p>Eau (70 %)</p> <p>Collagène</p> <p>Protéoglycanes (molécules volumineuses très hydrophiles assurant la tonicité du cartilage)</p> <p>Éléments et oligo-éléments :</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Calcium, magnésium, phosphate (sels) : participent à la synthèse du cartilage, confèrent à ce tissu sa dureté et sa rigidité ➤ Cuivre, élément primordial pour la production de collagène, ➤ Zinc, activant plus de 200 enzymes dans l'organisme et ralentissant les phénomènes d'usure des articulations, ➤ Sodium, présent en grande quantité dans le liquide synovial, ➤ Manganèse, Sélénium, Silicium, Soufre... <p>Capsule articulaire : ensemble tissu synovial et cartilage</p> <p>Synovie ou liquide synovial : sécrété par la membrane, il lubrifie et nourrit le cartilage.</p>
<p>figure A3-1 : Schéma descriptif d'un cartilage articulaire et liste des composants moléculaires et chimiques</p>	

L'analyse LIBS (analyse spectroscopique des raies d'émission atomique par flash laser nanoseconde Nd :Yag à 1064 nm) de la composition atomique permettrait d'identifier les éléments métalliques et métalloïdiques présents dans le cartilage articulaire. La technique permet sans préparation préalable une mesure directe sur le fragment prélevé (ici des biopsies de souriceaux) et assure une non contamination par des éléments extérieurs. La durée d'analyse (10^{-6} s) et sa sensibilité (10^{-6} g/g) permet d'aborder avec la LIBS des études statistiques qui ouvrent la voie à une compréhension des éléments métalliques sur l'évolution des propriétés des tissus cartilagineux.

L'idée de base est de détecter par LIBS d'éventuels marqueurs de cartilages pouvant être liés à des maladies articulaires (arthrose, etc.) à des fins de diagnostics.

II- Analyses LIBS de Biopsies de Souriceaux

II-1 – Paramètres

Les deux biopsies fournies par l'équipe du professeur Francis BERENBAUM se présentent sous la forme de fragments de surface 1 mm^2 . Pour faciliter l'interaction avec le pulse laser et éviter son éjection par l'onde de choc du plasma, les biopsies sont déposées sur un scotch double face propre. A l'aide du monochromateur doté du réseau à $300 \text{ traits.mm}^{-1}$ (largeur spectrale de 40 nm) et du détecteur iCCD, un balayage spectral est effectué sur le scotch chargé ou non de biopsies. Les paramètres suivants sont utilisés :

- Energie de pulse : 100 mJ - Lentille de distance focale 130 mm
- Résolution temporelle : délai avant acquisition des radiations : 6 μs – Durée : 20 μs
- Mode d'acquisition : plusieurs spectres sur une même position du cartilage, chaque plasma est numérisé individuellement : cela est utile pour explorer diverses zones.

Les spectres présentés ci-après ont été obtenus après analyse de la « zone supérieure » du cartilage (zone en contact direct avec l'épiphyse). Des séries de 10 tirs laser sont effectuées pour chaque fenêtre spectrale avec l'intégration d'un spectre par tir (mode « spectre séparé »). Ces spectres rendent compte du troisième tir laser.

II-2 – Résultats - Discussions

Deux spectrogrammes sont reproduits. Ils permettent de distinguer des éléments propres aux biopsies et regroupés dans le tableau suivant.

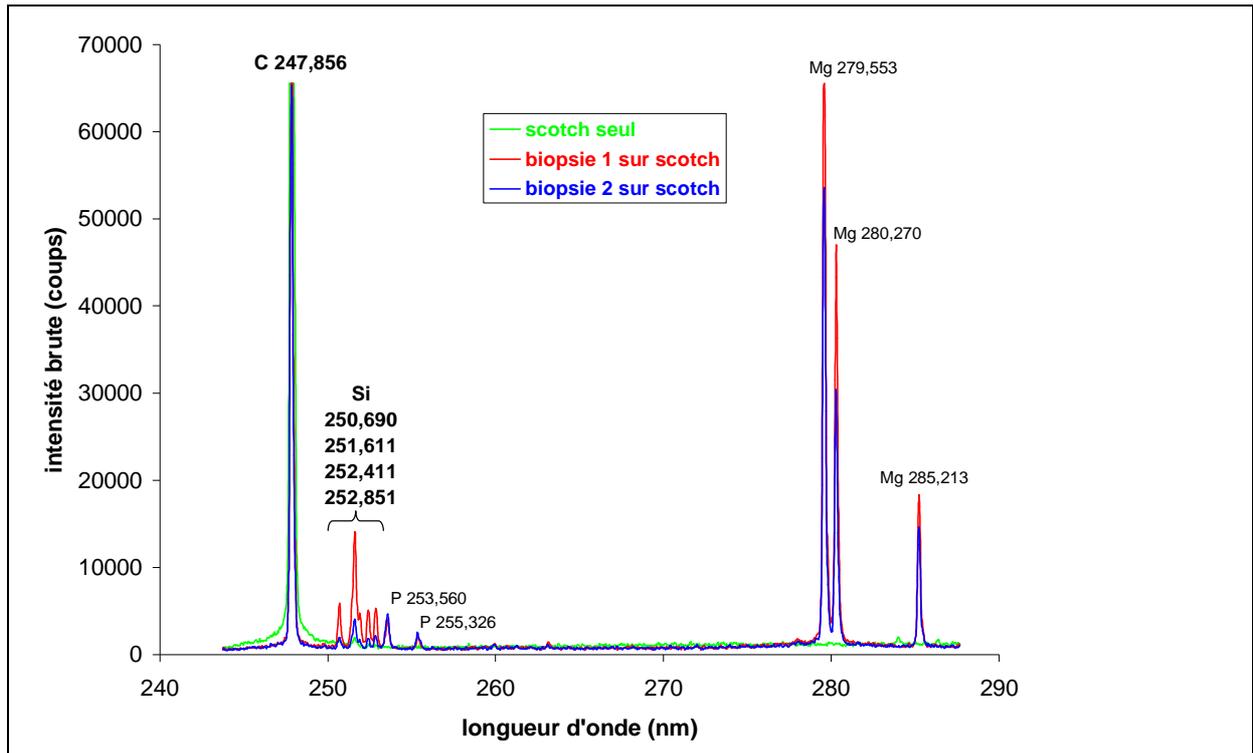


figure A3-2 : Spectre région 246-286 nm d'analyse LIBS de 2 biopsies de souriceaux déposées sur scotch double face-Paramètres LIBS : Energie pulse : 1 tir à 100 mJ, délai et durée avant et de l'acquisition : 6 et 20 μ s

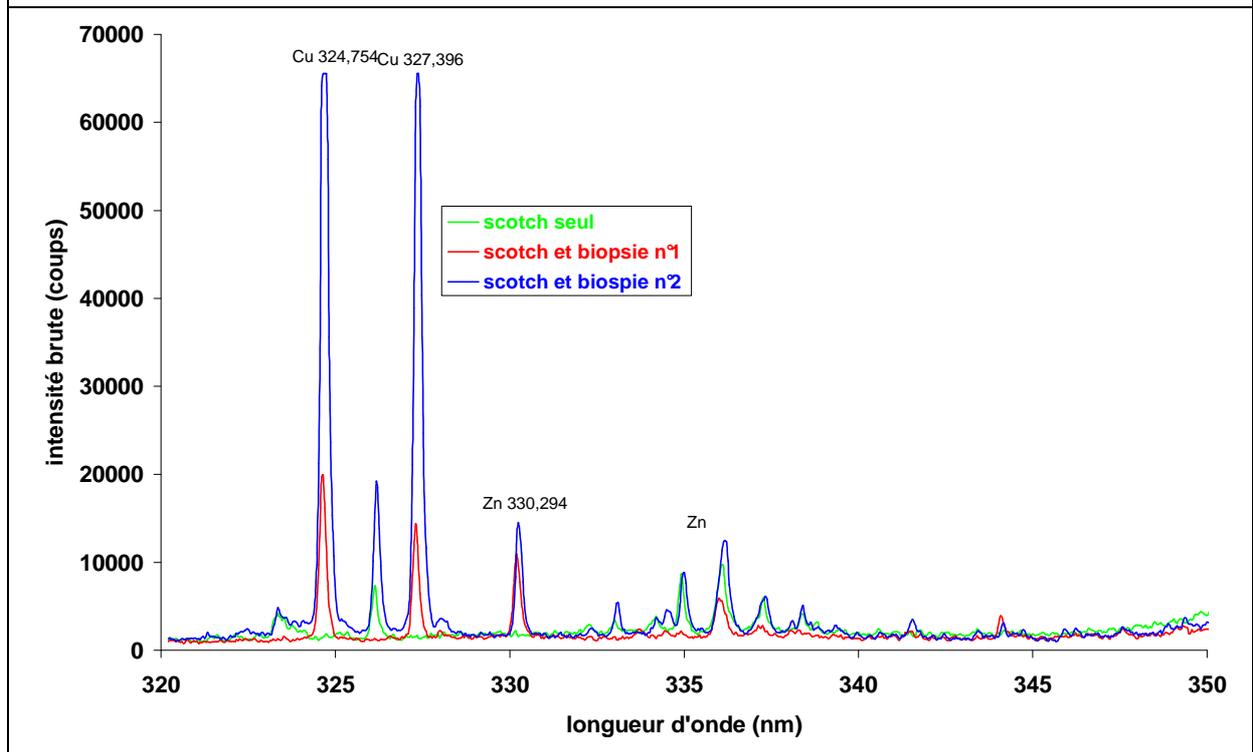


Figure A3-3 : Spectre région 320-350 nm d'analyse LIBS de 2 biopsies de souriceaux déposées sur scotch double face-Paramètres LIBS : Energie pulse : 1 tir à 100 mJ, délai et durée avant et de l'acquisition : 6 et 20 μ s

Elément	Raies d'émissions (nm)
Carbone C (provenant du scotch et des biopsies)	247,856
Silicium Si (provenant uniquement des biopsies)	250,690 ; 251,611 ; 252,411 ; 252,851
Phosphore P (provenant uniquement des biopsies)	253,560 ; 255,326
Magnésium (provenant uniquement des biopsies)	279,553 ; 280,270 ; 285,213
Cuivre Cu (provenant uniquement des biopsies)	324,754 ; 327,396 ; 510,554 ; 515,324 ; 521,820
Zinc Zn (provenant uniquement des biopsies)	330,294 ; 472,216 ; 481,053
Calcium Ca (provenant du scotch et des biopsies)	336,192 ;
Hydrogène H (provenant du scotch et des biopsies)	486,133

Tableau A3-1 : liste des éléments provenant des biopsies et du scotch support

La présence de zinc est particulièrement intéressante car cet élément intervient au sein de notre organisme dans plus de 200 réactions enzymatiques. De plus, le zinc est suspecté de jouer un rôle dans les mécanismes de certaines pathologies articulaires (arthrose...).

Les autres éléments (C, Si, P, Mg, Ca) sont directement aux composants de la structures des cartilages articulaires (cf. tableau A3-1). L'existence de raies d'hydrogène témoigne de l'eau présente dans les cartilages

III- Analyses LIBS de Cartilages Articulaires d'Aile de Poulet

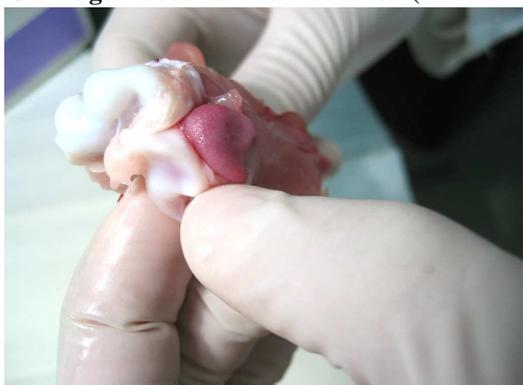
Parallèlement et pour confirmer ces observations, nous avons prélevé et analysé *ex vivo* des cartilages d'ailes de poulet. Visuellement, le cartilage articulaire est blanc, lisse, rigide, élastique, brillant et humide. Après diverses manipulations visant à dégager l'articulation de la chair du poulet, le cartilage est prélevé soigneusement sur des articulations d'ailes de poulet (cf. Figure A3-4).



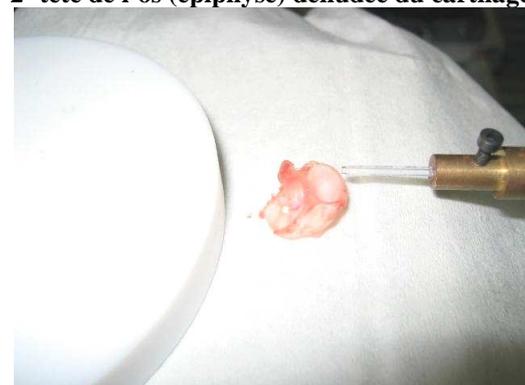
1- Cartilage recouvrant l'articulation (tête de l'os)



2- tête de l'os (épiphyse) dénudée du cartilage



3- Détails du cartilage et de l'os



4- Positionnement du cartilage (avec quelques gouttes de sang) sur le porte-échantillon du dispositif LIBS et par rapport à la fibre optique

Figure A3-4 : Photographies du prélèvement d'un cartilage sur une aile de poulet pour analyses LIBS

Les mêmes paramètres LIBS sont employés. Un spectre est reproduit pour la région 455-500 nm (cf. figure A3-5). Nous compilons les résultats dans le tableau ci-dessus :

Elément	Raies d'émissions (nm)
Carbone C	247,856
Silicium Si	250,690 ; 251,611 ; 252,411 ; 252,851
Phosphore P	253 ;560 ; 255,326
Magnésium Mg	279,553 ; 280,270 ; 285,213
Fer Fe	347,545 ; 495,761
Zinc Zn	330,294 ; 472,216 ; 481,053
Manganèse Mn	460,762
Calcium Ca	336,192 ;
Hydrogène H	486,133

Tableau A3-1 : liste des éléments provenant des biopsies et du scotch support

Nous détectons les mêmes éléments (C, Si, P, Mg, Zn, Ca, H) que dans les cartilages articulaires de souris, à l'exception du cuivre qui n'est plus mis en évidence. Nous notons la présence de fer directement issu de la présence de sang présent et donc de l'hémoglobine. De même, la présence de traces de manganèse est détectée.

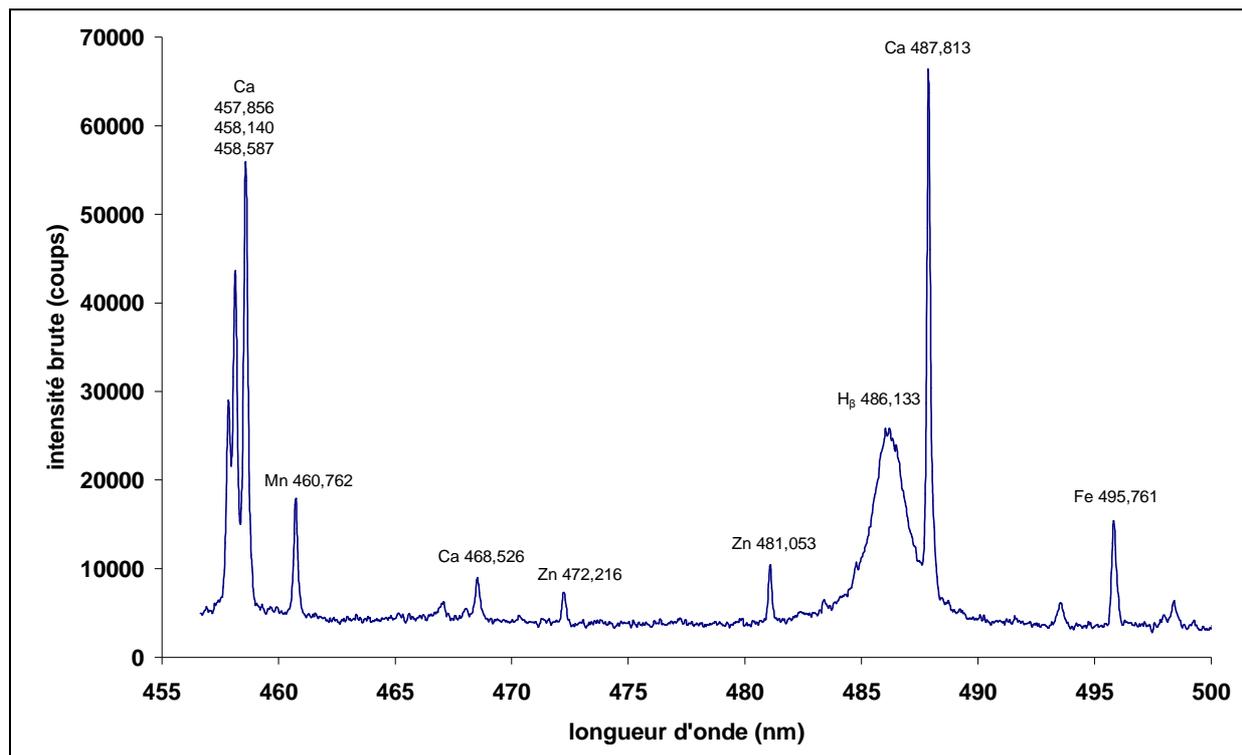


Figure A3-5 : Spectre région 455-500 nm d'analyse LIBS d'un cartilage d'aile de poulet-Paramètres LIBS :
Energie pulse : 1 tir à 100 mJ, délai et durée avant et de l'acquisition : 6 et 20 μ s

IV- Conclusions sur le couplage de la LIBS pour l'analyse de cartilages articulaires animaux

L'analyse LIBS du cartilage articulaire démontre l'adaptation de la technique à l'identification en particulier des éléments Zn, Ca, Fe, P, C dans les différents essais. La sensibilité de la technique vis à vis des mesures effectuées directement sur cible prélevée sans préparation préalable constitue une démonstration probante de l'analyse de tissu vivant et de son adaptation au secteur médical.

La détermination des rapports d'intensité de raie d'émission tel que Zn, Ca, Fe, P, C permet d'envisager son application à la notion de diagnostic et/ou de pronostic pour un certain nombre de pathologies articulaires. La mise en évidence récente d'un déficit en sélénium chez les patients atteints d'arthrose confirme l'intérêt de ce type de recherche.

Une autre application pourrait intéresser le domaine orthopédique. En effet, la vitesse d'usure des pièces métalliques présentes dans les prothèses articulaires est très variable d'un patient à un autre et difficile à mesurer. Ce type de technique, qui permet d'évaluer avec une très grande précision la concentration en ions métalliques dans les tissus et les liquides adjacents (liquide synovial par exemple), pourrait aider à cette mesure.

Cette application confirme le rôle d'une méthode d'analyse *ex vivo*, voire *in situ*, de tissus animaux tels que les cartilages pour des diagnostics rapides et fiables étant donnée la reproductibilité de la méthode LIBS.

La littérature rapporte de nombreuses applications biomédicales par LIBS :

- Détection de débris de prothèses orthopédiques en cobalt et chrome par analyse du liquide synovial prélevé sur un individu équipé [17]
- Analyse de dents humaines et animales en tant que marqueurs des conditions de vie et de nutrition [18]
- Expertise des cheveux de différents individus et corrélation de leur composition élémentaire par rapport à l'état de santé des personnes atteinte ou non de maladies génétiques [19]

¹⁷ MOKHBAT E.A., HAHN D.W., Laser-induced breakdown spectroscopy for the analysis of cobalt-chromium orthopaedic wear debris particles, *Appl. Spectroscopy*, 2002, 56, 8, pp. 984-993

¹⁸ SAMEK O., BEDOWS D.C.S., TELLE H.H., MORRIS G.W. *et al.*, Quantitative analysis of trace metal accumulation in teeth using laser-induced breakdown spectroscopy, *Appl. Phys. A*, 1999, 69, pp. S179-S182

¹⁹ CORSI M., CRISTOFORETTI G., HIDALGO M., *et al.*, Applications of laser-induced breakdown spectroscopy technique to hair tissue mineral analysis, *Appl. Optics*, 2003, 42, 30, pp. 6133-6137

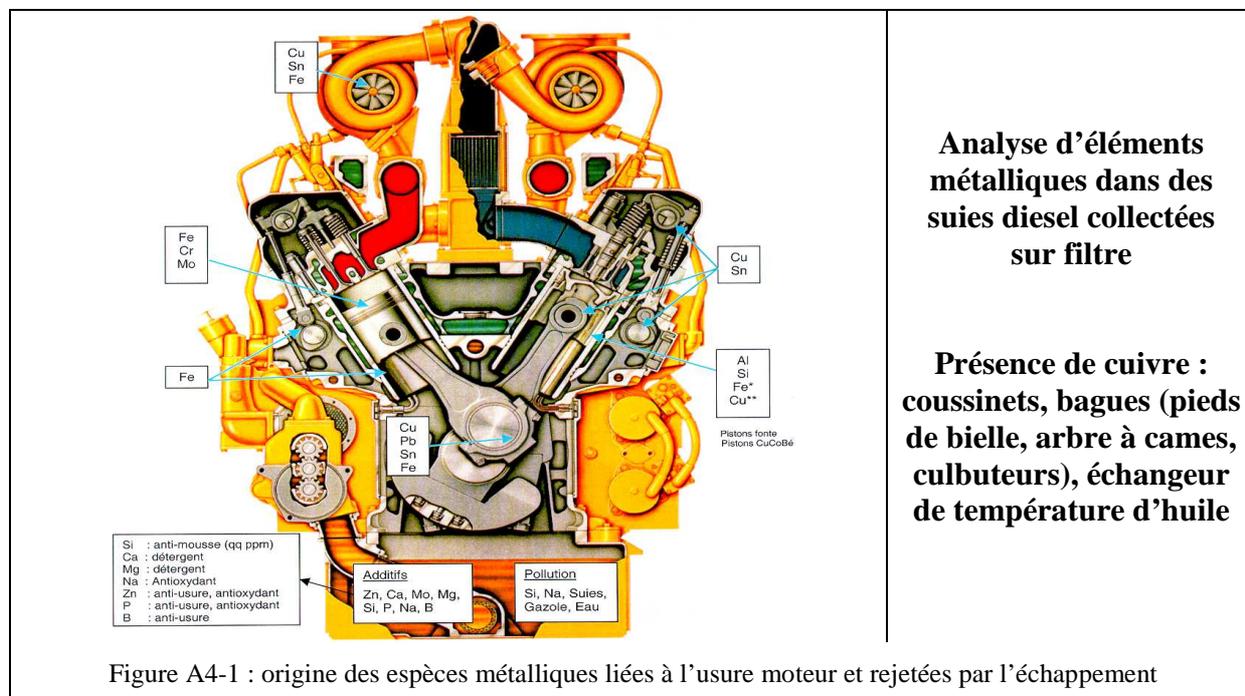
ANNEXE IV – ANALYSE PAR LIBS DES ELEMENTS METALLIQUES DES SUIES DIESEL COLLECTEES SUR FILTRES

Pour illustration, un résumé d'une étude faite au CEB sur l'analyse LIBS de particules en sortie d'échappement moteur pour caractériser le fonctionnement et l'usure moteur. [20] L'extrapolation de cette application pour l'analyse d'aérosols atmosphériques accumulés sur filtre pour analyse différée est illustrée.

Les principales méthodes d'identification et de quantification des espèces métalliques dans les suies diesel sont destructives (solubilisation, destruction des échantillons solides avec tous les problèmes associés). De plus, les échantillons sont prélevés et perdus pour d'autres analyses. La méthode LIBS a été envisagée pour une analyse directe des suies sur filtre.

I - Introduction

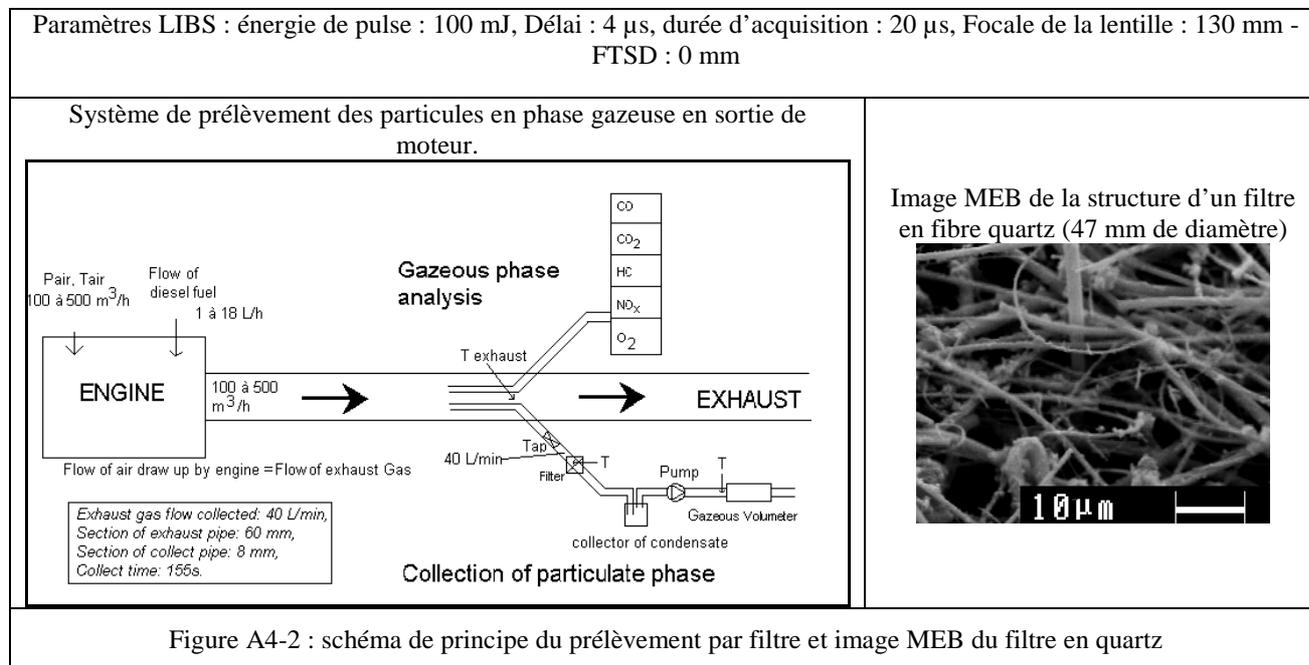
La pollution de l'air inclut des composés organiques volatils, les NO_x, les SO_x, les HAP (hydrocarbure aromatique polycyclique) et des particules microniques métalliques qui proviennent principalement de la combustion automobile et qui sont nocives pour la santé.



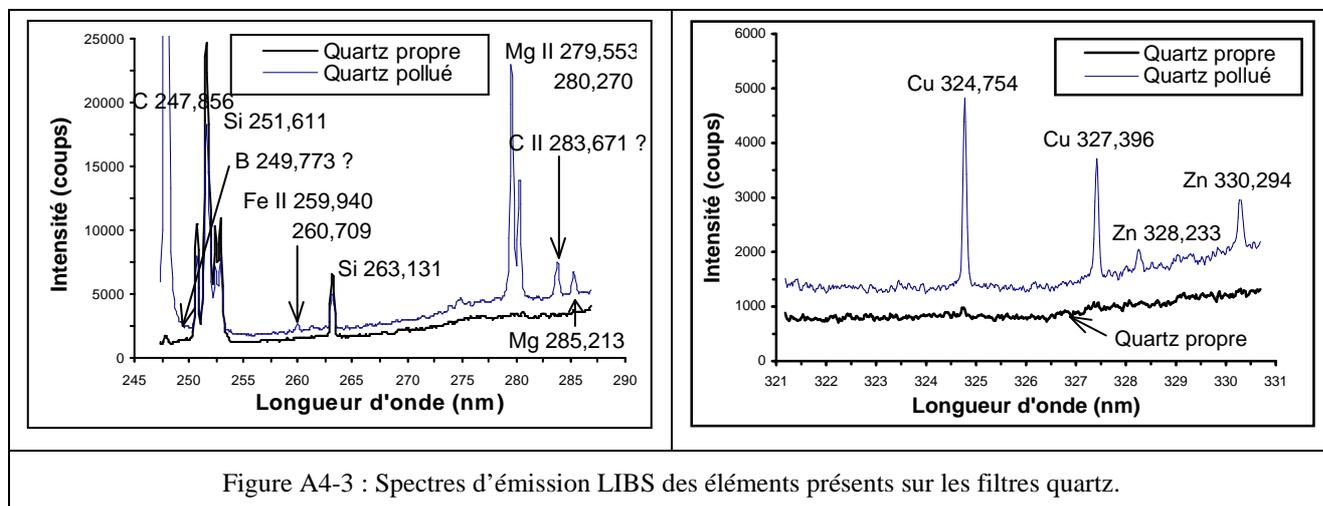
²⁰ LOMBAERT K., MOREL S., LE MOYNE L., ADAM P., TARDIEU DE MALEISSYE J., AMOUROUX J., Non destructive analysis of metallic elements in diesel soot collected on filters : benefits of laser Induced Breakdown Spectroscopy, *Plasma Chem. and Plasma Process.*, 2004, 24, 1, pp. 41-56

II – Analyses LIBS de filtres de collection des particules en sortie d'échappement moteur

II-1- Conditions expérimentales



II-2- Analyses LIBS des filtres vierges et chargés



III Analyse qualitative

La Figure A4-3 montre la comparaison des spectres entre un filtre propre et un filtre pollué par des suies diesel. La différence d'intensité d'émission obtenue entre ces deux filtres permet d'identifier les éléments minéraux spécifiques présents dans les suies diesel : Mg, Fe, Cu, Ca, Zn sont les espèces métalliques principales contenues dans les suies.

IV Analyse quantitative

La bonne sensibilité de la méthode LIBS pour l'analyse quantitative permet de mesurer les éléments métalliques inclus dans les agrégats polycycliques (méthode d'analyse atomique). Pour évaluer leur évolution avec les paramètres de fonctionnement du moteur, une mesure semi-quantitative est développée en utilisant l'émission atomique de Si comme un élément de référence pour chaque émission : nous sommes capables d'observer par LIBS les éléments dans les suies et leur concentration relative par rapport à Si (cf. Figure A4-4). D'autres espèces à concentration plus faible telles que Ca, Cu, Zn, Mg et Fe sont présentes dans les suies diesel.

Ensuite, le rapport air/gazole dans le moteur est corrélé à la concentration des espèces métalliques spécifiques dans les suies diesel Figure A4-4). Il semble que ces concentrations diminuent avec l'augmentation du rapport air/gazole (à l'exception de Cu et Zn).

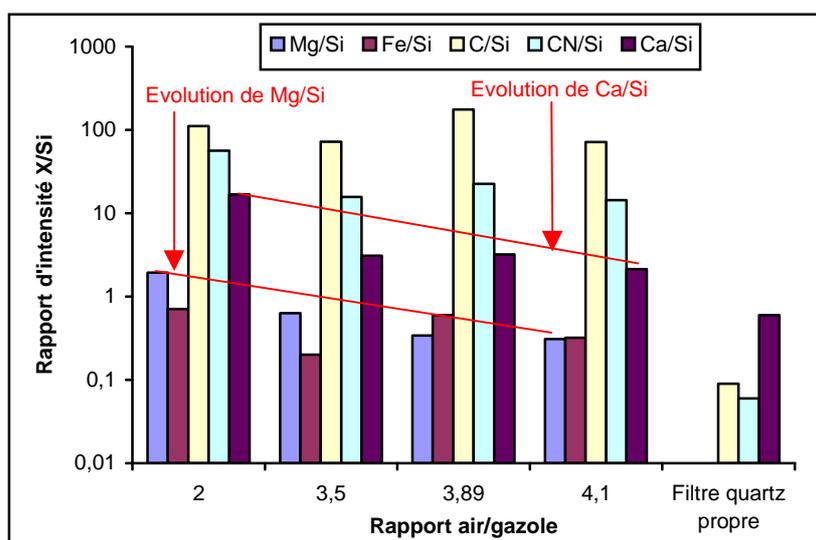


Figure A4-4 : Influence du rapport air/gazole sur la composition des suies diesel

Une étude sur l'huile moteur et le gazole est aussi effectuée pour connaître leur participation dans la composition des suies diesel (voir Tableau 1). En comparant l'huile neuve avant utilisation et l'huile usagée, nous observons la présence de Cu, Fe et un peu plus de Zn dans l'huile usagée. Or, l'huile, qui sert notamment à lubrifier les parois des pistons, est aussi présente lors de la combustion (en redescendant, le piston recouvert d'huile aspire de l'air pour créer la combustion avec le gazole). Ainsi, si l'on retrouve des éléments dans les suies et dans l'huile usagée, on peut admettre que ces éléments proviennent de l'usure du moteur. La LIBS permet donc de réaliser un suivi de l'usure du moteur à l'aide de l'huile usagée.

Eléments détectés dans :	Technique	
	LIBS	MEB/EDS
Filtre fluorocarbone propre	Al, B, Ba, C, Ca, Cu, Fe, Mg, Si, Sr, Ti, Zn, Zr	Al, Ba, C, Ca, Si, Zn
Filtre quartz propre	B, C, Mg, Si, Sr	C, Si
Suies diesel	B, C, Ca, Cu, Fe, Mg, Zn	C, Ca, Cu, Fe, Mg, Zn
Huile neuve	B, Ca, Mg, Sr, Zn	
Huile usagée	Ca, Cu, Fe, Mg, Sr, Zn	

Tableau A4-1 : Comparaison de la LIBS et la MEB/EDS sur la composition métallique de la suie, de 2 filtres, et de l'huile neuve et usagée

VI Conclusion

La technique LIBS permet donc l'analyse simultanée de plusieurs éléments et peut donner une composition relative des particules de suies diesel. Les analyses montrent que les principales espèces métalliques déposées avec les suies sur les filtres de référence sont : Fe, Cu, Ca, Zn, Mg. Ainsi, il est possible d'affirmer que ces atomes métalliques sont présents dans les particules hydrocarbonées des suies.

La prochaine étape sera de relier ces métaux avec la nature de carburant diesel, du lubrifiant, et de leurs additifs, mais aussi avec les composants métalliques du moteur dans le but d'identifier l'origine exacte des espèces métalliques présentes dans les suies diesel. A l'avenir, cette méthode qui devrait être adaptable à un système portatif LIBS, permettrait la mesure directe dans les gaz d'échappement, pour le contrôle des métaux présents dans les gaz, permettant un diagnostic direct du moteur.

ANNEXE V – METHODES DE CALCUL POUR ESTIMER LA TEMPERATURE ELECTRONIQUE DU PLASMA

Le concept de température pour un plasma dont la durée de vie est limitée n'a de sens qu'en faisant l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique local (ETL). Deux méthodes sont utilisées pour calculer la température électronique du plasma à l'ETL :

I – Simulation informatique du profil des bandes des raies CN expérimentales

Dans le chapitre IV, les raies CN sont facilement détectées pour les échantillons organiques tels que les bactéries *Bacillus globigii* :

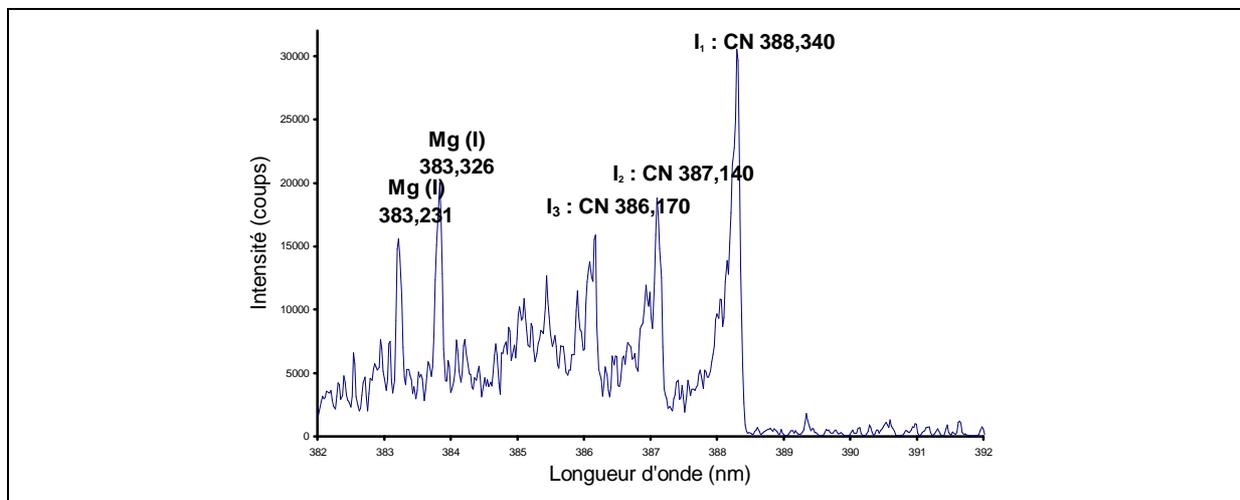


Figure A5-1 : Spectre issu de la formation d'un seul plasma (tir n°4 parmi une série de 10 tirs effectués sur une même position) sur une pastille de *Bacillus globigii* (souche n°1). Paramètres LIBS : énergie de pulse = 100 mJ (densité de puissance $3 \cdot 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$), délai avant acquisition = 1 μs , durée d'acquisition = 20 μs

Un logiciel est alors utilisé pour simuler le profil expérimentalement obtenu pour les têtes de bandes CN : LIFBASE 2.0 [21]. Des bases de données y sont intégrées pour calculer le spectre théorique selon les paramètres expérimentaux utilisés :

- **Système de bandes d'émission simulées : CN (B-X)**
- **Domaine de λ en Å (dans l'air) : 3861 – 3884**
- **Résolution en Å (dans l'air) : 0.8 (résolution du spectromètre Echelle utilisé)**
- **Profil de convolution : Voigt**
- **Pression : 1 atmosphère (conditions expérimentales)**

La courbe théorique est tracée et l'on y superpose la courbe expérimentale pour extrapoler la température associée aux raies d'émission CN :

²¹ Logiciel téléchargeable sur <http://www.sri.com.cem/lifbase>

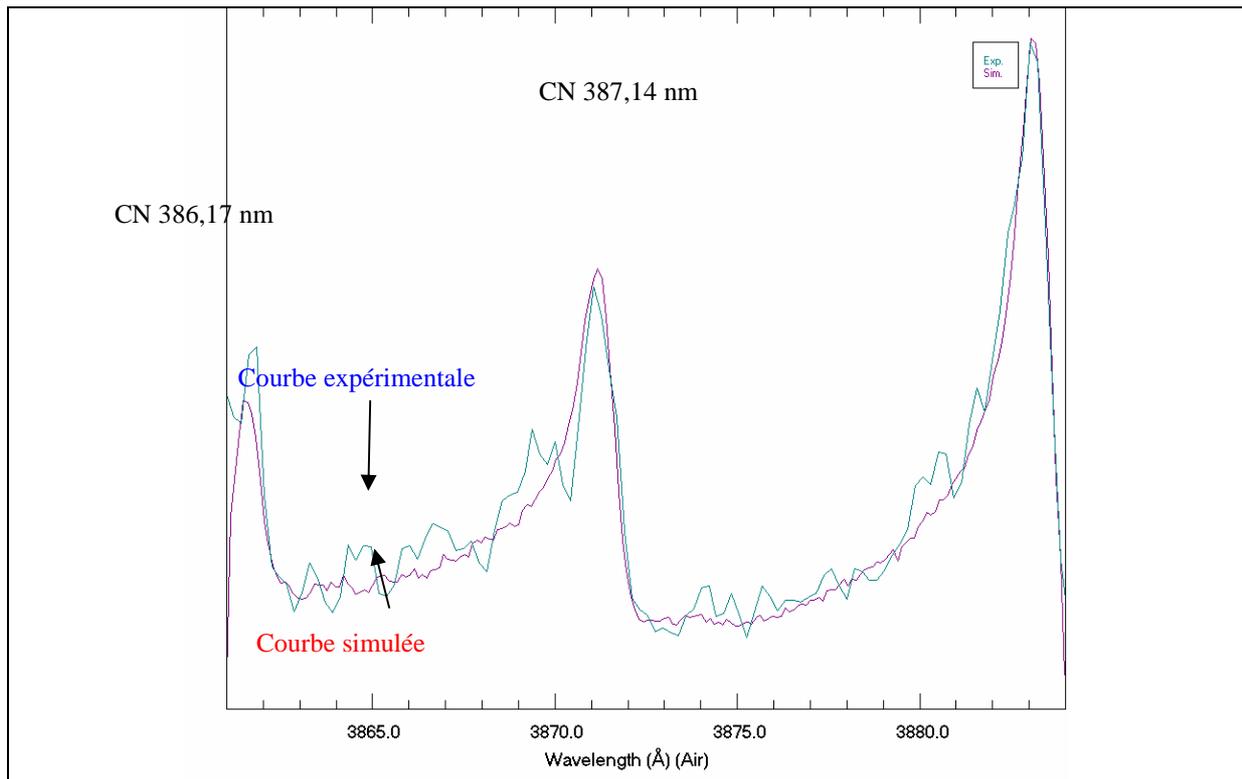


Figure A5-2 : Superposition des courbes théoriques et expérimentales des têtes de bande des raies CN

La simulation informatique effectuée avec le logiciel LIFBASE permet l'obtention des résultats suivants :

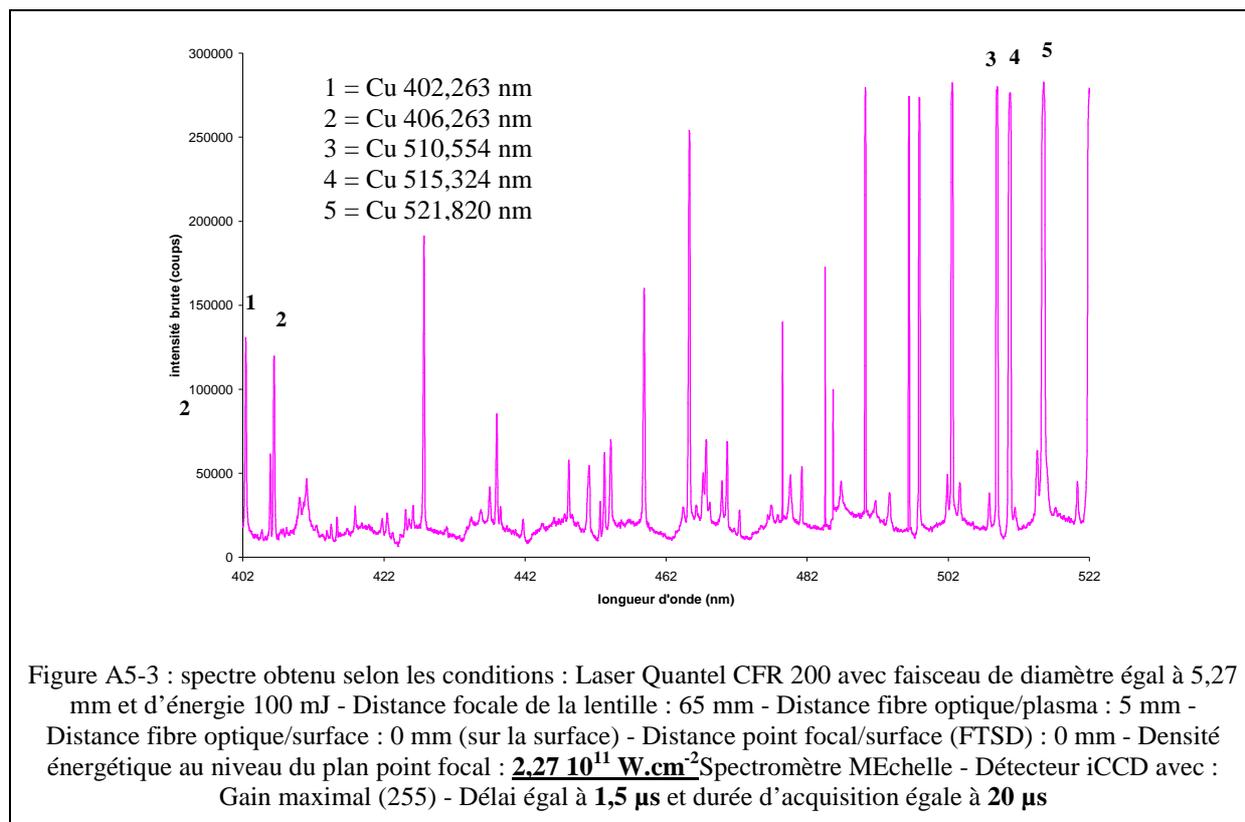
Température vibrationnelle/rotationnelle présentant la corrélation maximale entre la courbe expérimentale et celle simulée par le logiciel LIFBASE : 6950K
Corrélation associée entre courbes théorique et expérimentale : 97,45%

Il est à noter qu'une corrélation supérieure à 95 % entre la courbe expérimentale et la courbe simulée existe toujours pour des températures de plasma entre 5000K et 10000K. La valeur de température maximale d'environ 7000K calculée depuis les raies CN issues des zones périphériques froides du plasma confirme la robustesse thermique et la reproductibilité du plasma à partir d'un délai de 1 μ s après croissance et début de relaxation du plasma.

II - Calculs de la température électronique du plasma par la méthode de Boltzmann : applications pour les analyses LIBS d'un bronze certifié NIST (référence SS551)

A des fins de comparaison, la température d'un plasma effectué sur un bronze certifié NIST SS-551 est calculée selon la méthode basée sur la loi de Boltzmann.

➤ **Spectrogramme LIBS sur un bronze certifié NIST SS551 obtenus avec les conditions**



➤ **Estimation de la température du plasma par la méthode de Boltzmann**

Sur un bronze certifié NIST, en se basant sur les raies atomiques du cuivre, l'expression de Boltzmann est utilisée pour calculer la température du plasma avec l'hypothèse de l'équilibre

thermodynamique local : $I = g_i A_i \lambda_i \exp\left(-\frac{E_i}{k_b T_{\text{exc}}}\right)$, avec g_i le facteur de dégénérescence, A_i

la probabilité de transition, λ_i la longueur d'onde de transition, E_i l'énergie de l'état supérieur, k_b la constante de Boltzmann ($k_b = 8,62 \cdot 10^{-5} \text{ eV.K}^{-1}$) et T_{exc} la température du plasma donnée à un certain délai.

Le tracé de la courbe $\ln(I \cdot \lambda_i / g_i A_i) = -E_{\text{exc}} / k_b T_{\text{exc}} = f(E_{\text{exc}} / k_b)$ issue de l'expression de la loi de Boltzmann permet d'obtenir une droite dans la pente $-1/T_{\text{exc}}$ fournit la valeur de la température du plasma.

λ_i Raies du Cu en nm	I_{brute} : Intensité brute de la raie d'intérêt (coups)	I_{bruit} : Intensité moyenne du bruit spectral (coups)	I_{nette} : intensité nette de la raie d'intérêt (coups)	$Y = \ln(I_{nette} \lambda / g_i A_i)$	g_i	A_i (10^8 s^{-1})	E_{exc} c (eV)	$X = E_{exc} / k_b$
510,554	2,74E+05	10826,5385	262863,462	-17,9033315	4	0,02	3,8	46528,71311
515,324	2,78E+05	41851,8421	236438,158	-21,4011775	4	0,60	6,2	75915,26876
402,263	94453	14686,9545	79766,0455	-21,5855504	4	0,19	6,87	84082,28236
406,263	86804	20417,8889	66386,1111	-22,2648144	6	0,21	6,87	84088,40455
521,820	277270	20755	256515	-21,9357589	6	0,75	6,2	75915,26876

Tableau A5-1 : Calculs pour estimer la température d'excitation du plasma T_{exc} à partir de la pente de valeur - $1/k_b T_{exc}$

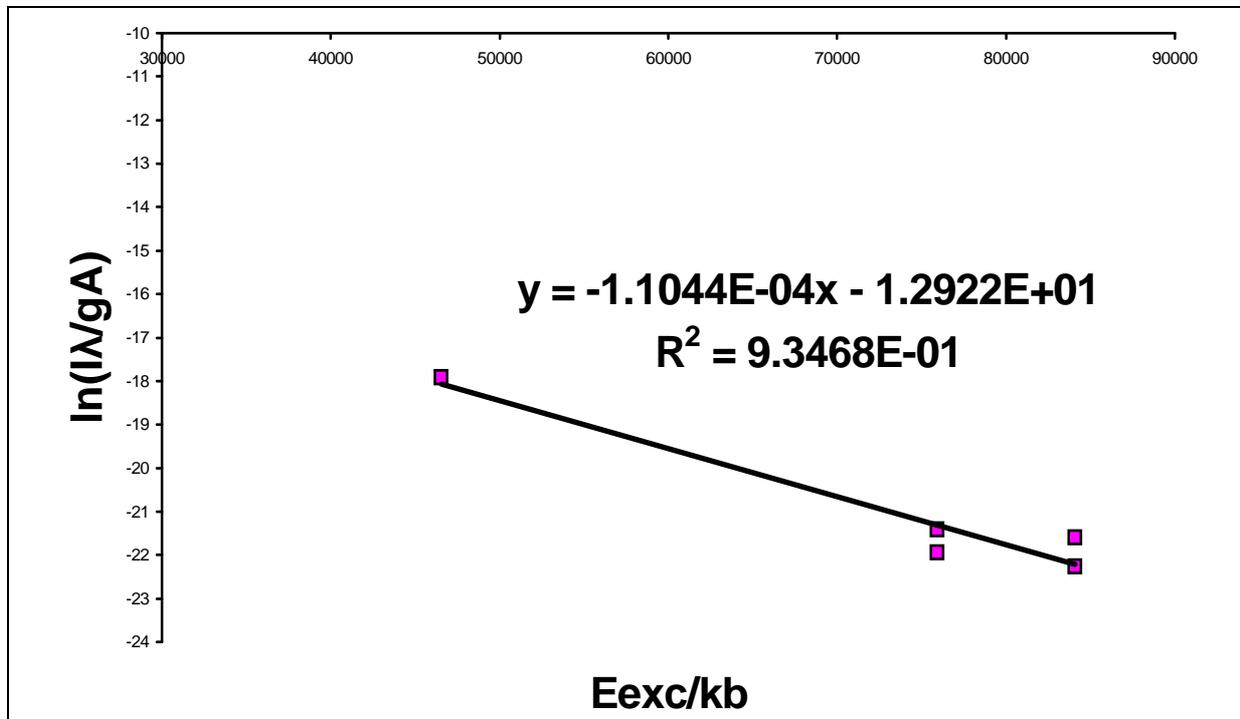


Figure A5-3 : Tracé de $\ln(I\lambda/g_i A_i) = f(E_{exc}/k_b)$

La pente $-1/T_{exc}$ est égale à $-1,1044 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$, d'où une valeur de la température d'excitation **$T_{exc} = 9054 \text{ K}$** .

La valeur de la température d'un plasma généré sur un bronze ($T_{exc} = 9054 \text{ K}$ après $1,5 \mu s$ de relaxation du plasma) à partir des raies atomiques issues des zones les chaudes du plasma est cohérente avec celle calculée sur les raies moléculaires CN issues des zones périphériques d'un plasma généré sur pastille de *Bacillus globigii* dans des conditions similaires d'énergie. La valeur optimale calculée pour T_{exc} est égale à 6950 K pour une corrélation de $97,45 \%$ entre les données théoriques et l'expérience. Une corrélation de 95% est encore obtenue pour une température incluse entre 5000 et 10000 K environ.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-
- 1 LANCELIN, Henri
Développement d'une méthode instrumentale d'analyse de composés chlorofluorocarbonés sous forme vapeur dans l'air par spectroscopie résolue dans le temps de plasma induit par laser, Th : Sciences : Paris 6 : 1995
 - 2 DUDRAGNE, Laurens
Procédé d'identification et d'analyse de polluants en milieu gazeux et sur cible par Spectroscopie de Plasma Induit par Laser, Th : Sciences : Paris 6, 1998, 251 p.
 - 3 MOREL, Stéphane
Analyse des surfaces contaminées par spectroscopie de plasma induit par laser : Applications à la détection et à l'identification chimique et biologique, Th : Sciences : Paris 6 : 2002, 311 p.
 - 4 RADZIEMSKI L.J., CREMERS D.A.
Spectrochemical Analysis using laser plasma excitation, *Laser-Induced Plasmas and Applications* / ed. Marcel Dekker, New York, 1989
 - 5 PALANCO S., BAENA J.M.; LASERNA J.J.
Open-path laser-induced plasma spectrometry for remote analytical measurements on solid surfaces, *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, 57, pp.591-599
 - 6 RADZIEMSKI L.J., CREMERS D.A.
Laser induced plasma and applications, *Laser-Induced Plasmas and Applications* / ed. Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 70
 - 7 CONFERENCE ON OPTICS : congrès (1991 : Los Alamos)
Laser induced breakdown spectroscopy: a technique for atomic detection and molecular, *SPIE*, 1991, 288, p. 241
 - 8 LANCELIN H., VALTEAU A.
Détection de toxiques par spectroscopie de plasma induit par laser, objectifs et résultats expérimentaux, *Note technique n° 90*, CEB/DED/PH/92, 1992
 - 9 RADZIEMSKI L.J., LOREE T.R., CREMERS D.A., HOFFMAN D.F.
Time-resolved laser-induced breakdown spectrometry of aerosols, *Anal. Chem.*, 1983, 55, pp. 1246-1252
 - 10 NIEMAX K.
Diode Laser Spectrometry and Analytical Applications of Laser Ablation at the Institute for Spectrochemistry and Applied Spectroscopy
Seminar, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, 1997
 - 11 WEYL G.M.
Laser induced plasma and applications
Léon J. Radziemski and David A. Cremers
Eds. Marcel Dekker, New York, 1989, p. 8
 - 12 SMITH D.C., MEYERAND R.G.
Laser Radiation Induced Gas Breakdown, Chap. 11, pp.459-471
 - 13 CANAVAN G.H., PROCTOR W.A., IELSEN P.E., ROCKWOOD S.D.
CO₂ Laser Air Breakdown Calculations, *IEEE J. Quantum Electron*, 8, pp.564
 - 14 HUGHES T.P.
Cascade Theory of Breakdown; *Plasma and Laser Light* / ed. Wiley, New York, 1975, p. 168
 - 15 BUNKIN V.F., SAVRANSKII V.V.
Sovietic Physics JETP, 1974, 38, 1, pp. 91-96
 - 16 BETTIS J.R.
Appl. Optics, 1992, 31, 3, pp. 448-452
 - 17 SACCHI C.A.
J. of Optical Soc. of Am., 1991, 8, p. 337
 - 18 SMITH D.C.
Gas-Breakdown Dependence on Beam Size and Pulse Duration with 10.6- μ Wavelength Radiation, *Appl. Phys. Letters*, 1971, 19, 10, pp. 405
 - 19 YABLONOVICH E.
Self phase modulation and short pulse generation from laser breakdown plasmas, *Phys. Rev.*, 1975, 10, pp. 1888
 - 20 CHYLEK P., JARZEMBSKI A., CHOU N.Y.

- 21 *Appl. Phys. Lett.*, 1986, 49, pp. 1475
GODDARD B.J.
Materials analysis using laser-based spectroscopic techniques
Trans Inst MC, 1991, 13, p. 3
- 22 BISWAS A., LATIFI H., RADZIEMSKI L. J., ARMSTRONG R.L.
Irradiance and laser wavelength dependence of plasma spectra from single levitated aerosol droplets,
Appl. Optics, 1988, 27, 12, pp. 2386
- 23 LEE Y.-I., SONG K., CHA H.-K., LEE J.-M., PARK M.-C., LEE G.-H., SNEDDON J.
Influence of Atmosphere and Irradiation Wavelength on Copper Plasma Emission Induced by Excimer
and Q-switched Nd:YAG Laser Ablation, *Appl. Spectroscopy*, 1997, 51, 7, pp.959
- 24 CREMERS D.A., RADZIEMSKI L.J., LOREE T.R.
Spectrochemical analysis of liquids using the laser spark, *Appl. Spectrosc.*, 1984, 38, pp. 721-729
- 25 GAUTIER, Céline
*Développement de la technique de la double impulsion laser pour améliorer les performances
analytiques de l'Ablation Laser couplée à la Spectrométrie d'Emission Optique (AL/SEO) sur solides.
Applications nucléaires et géologiques*, Th : Sciences : Université Nancy I : **2005**, 197 p.
- 26 MOENKE-BLANKEBURG
Laser Micro Analysis /ed. John Wiley & Sons Inc., New York, p.25
- 27 CREMERS D.A., RADZIEMSKI L.J.
Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy/ ed. John Wiley & Sons, Chichester, 2006, 283 p.
- 28 ASSION A., WOLLENHAUPT M., HAAG L., *et al.*
Femtosecond laser-induced-breakdown spectrometry for Ca²⁺ analysis of biological samples with high
spatial resolution, *Appl. Phys.B*, 2003, 77, pp.391-397
- 29 MENUT D., FICHET P., LACOUR J.L., RIVOALLAN A., MAUCHIEN P.
Micro-laser-induced breakdown spectroscopy technique: a powerful method for performing quantitative
surface mapping on conductive and nonconductive samples, *Appli. Optics*, 2003, 42, 30, pp. 6063-6071
- 30 *M.I.T Wavelength Tables*
M.I.T Press, 1991, volume 1 et 2
- 31 LEE W.-B., WU J., LEE Y.-I., SNEDDON J.
Recent applications of laser-induced breakdown spectrometry: a review of material approaches, *Applied
spectroscopy reviews*, 2004, 39, 1, pp. 27-97
- 32 KHATER M.A., COSTELLO J.T., MOSNIER J.-P., KENNEDY E.T.
Optimization of the emission characteristics of laser-produced steel plasmas in the vacuum ultraviolet:
significant improvements in carbon detection limits, *Appl. Spectroscopy*, 2002, 56, pp. 970-983
- 33 GAUTIER C., FICHET P., MENUT D., LACOUR J.-L., L'HERMITE D., DUBESSY J.
Study of the double-pulse setup with an orthogonal beam geometry for laser-induced breakdown
spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B*, 2004, 59, pp. 975-986
- 34 JANZEN C, FLEIGE R., NOLL R. *et al.*
Analysis of small droplets with a new detector for liquid chromatography based on laser-induced
breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B*, 2005, 60, pp. 993-1001
- 35 WALLIS F.J., CHADWICK B.L., MORRISON R.J.S.
Analysis of lignite using laser-induced breakdown spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 2000, 54, pp. 1231-
1235
- 36 CAPITELLI F., COLAO F., PROVENZANO M.R., FANTONI R., BRUNETTI G, SENSI N.
Determination of heavy metals in solids by laser-induced breakdown spectroscopy, *Geoderma*, 2002,
106, pp. 45-62
- 37 ISMAIL M.A., IMAM H., ELHASSAN A, YOUNISS W.T., HATITH M.A.
LIBS limits of detection and plasma parameters of some elements in two different metallic matrices, *J.
Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, pp. 489-494
- 38 ST-ONGE L., SABSABI M., CIELO P.
Quantitative analysis of additives in solid zinc alloys by laser-induced plasma spectrometry, *J. Anal. At.
Spectrom.*, 1997, 12, pp. 997-1004
- 39 UHL A., LOEBE K., KREUCHWIG L.
Fast analysis of wood preservers using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part
B*, 2001, 56, pp. 795-806
- 40 FISHER B.T., JOHNSEN H.A., BUCKLEY S.G., HAHN D.W.
Temporal gating for the optimization of laser-induced breakdown spectroscopy detection and analysis
of toxic metals, *Appl. Spectrosc.*, 2001, 55, pp. 1312-1319

- LAZIC V., BARBINI R., COLAO F.; FANTONI R., PALUCCI A., Self-absorption model in quantitative laser induced breakdown spectroscopy measurements on soils and sediments, *Spectrochim. Acta Part B*, 2001, 56, pp. 807-820
- 42 KROELPELIN H., NEUMANN K.-K., HOFFMANN K.-U., KUTHE R.
Thermodynamics diagrams for high temperature plasmas of air, air-carbon, carbon-hydrogen mixtures, and argon / ed. Pergamon Press – Vieweg, Braunschweig, 1971, p. 29
- 43 MOREL S., ADAM Ph., AMOUROUX J.
Analysis of polluted surfaces by time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy, *TPP6 Proceeding, Progress in Plasma Process. of Mat.*, 2001, pp.11-22
- 44 FABBRO R., FABRE E., AMINAROFF F., *et al.*
Appl. Phys. Lett., 1982, 41, 3, pp. 261-264
- 45 MARTIN M.A., CHENG M.-D.? MARTIN R.C.
Aerosol measurement by laser-induced plasma technique: a review, *Aero. Sc. Tech.*, 1999, 31, pp. 409-421
- 46 CARRANZA J.E., IIDA K., HAHN D.W.
Conditional data processing for single-shot spectral analysis by use of laser-induced breakdown spectroscopy, *Appl. Optics*, 2003, 42, 30, pp. 6022-6028
- 47 CARRANZA J.E., HAHN D.W.
Sampling statistics and considerations for single-shot analysis using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, 57, pp. 779-790
- 48 HAHN D.W., LUNDEN M.M.
Detection and Analysis of Aerosol Particles by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, *Aero. Sci. Technol.*, 2000, 33, pp. 30-48
- 49 HETTINGER B., HOHREITER V., SWINGLE M., HAHN D.W.
Laser-induced breakdown spectroscopy for ambient air particulate monitoring : correlation of total and speciated aerosol particle counts, *Appl. Spectrosc.*, 2006, 60, 3, pp. 237-245
- 50 CARRANZA J.E., FIS YODER G.D., HAHN D.W.
On-line analysis of ambient air aerosols using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B*, 2001, 56, 851-864
- 51 LITHGOW G.A., ROBINSON A.L.
Ambient measurements of metal-containing PM2.5 in an urban environment using laser-induced breakdown spectroscopy, *Atmosph. Env.*, 2004, 38, pp. 3319-3328
- 52 LITHGOW G.A., BUCKLEY S.G.
Influence of Particle Location Within Plasma Volume on Precision of Single-Particle LIBS Measurements, *Spectrochim. Acta Part B*, 2005, 60, 7-8, pp. 1060-1069
- 53 PANNE U., NEUHAUSER R.E., THEISEN M., FINK H., NIESSNER R.
Analysis of heavy metal aerosols on filters by laser-induced plasma spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B*, 2001, 56, pp 839-850
- 54 LUSHNIKOV A.A., NEGIN A.E.
Aerosols in strong laser beams, *J. Aerosol Sci.*, 1993, 24, 6, pp.707-735
- 55 PFENDER E.
Heat and momentum transfer to particles in thermal plasma flows, *Pure & Appl. Chem.*, 1985, 57, 9, pp. 1179-1195
- 56 CARRANZA J.E., HAHN D.W.
Assessment of the upper particle size limit for quantitative analysis of aerosols using laser-induced breakdown spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 21, pp.5450-5454
- 57 HOHREITER V., HAHN D.W.
Calibration effects for laser-induced breakdown spectroscopy of gaseous sample streams: analyte response of gas-phase species versus solid-phase species, *Anal. Chem.*, 2005, 77, pp. 1118-1124
- 58 HOHREITER V., HAHN D.W.
Plasma-particle interactions in a laser-induced plasma: implications for laser-induced breakdown spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 5, pp. 1509-1514
- 59 HOHREITER V., CARRANZA J.E., HAHN D.W.
Temporal analysis of laser-induced plasma properties as related to laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B*, 2004, 59, pp. 327-333
- 60 LUSHINOKOV A.A., NEGI A.E.
J. of Aerosols Sc., 1993, 24, pp. 707-770
- 61 VAN DE HULST H.C.
Light Scattering by Small Particles / ed. Dovers, New York, 1981

- 62 BORHEN C.F., HUFFMAN D.R.
Absorption and Scattering of Light by Small Particles / ed. Wiley, New York, 1983
- 63 ARMASTRONG R.L.
Applied Optics, 1984, 23, pp. 148-155
- 64 J.H. EICKMANS, W.F. HSIEH, R.K. CHANG
Plasma spectroscopy of H, Li, and Na in plumes resulting from laser-induced breakdown droplet explosion, *Appl. Optics*, 1987, 26, 17, pp.3721-3725
- 65 CHANG R.K., EICKMANS J.H., HSIEH W.F., *et al.*
Laser-induced breakdown in large transparent water droplets, *Appl. Optics*, 1988, 27, 12, pp. 2377-2385
- 66 CARRANZA J.E., GIBB E., SMITH B.W., HAHN D.W., WINEFORDNER J.D.
Comparison of non intensified and intensified CCD detectors for laser-induced breakdown spectroscopy, *Appl. Optics*, 2003, 42, 30, pp. 6016-6021
- 67 LINDBLOM P.
New Compact Echelle Spectrographs with Multichannel Time-resolved recording capabilities, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 380, pp. 353-361
- 68 NIST Atomic Spectra Database
http://physics.nist.gov/cgi-bin/AtData/main_asd
- 69 ALKEMADE C., SNELLEMAN J., BOUTILLER G. D., *et al.*
Spectrochim. Acta, 1978, , 33B, pp. 383
- 70 RENOUX A., BOULAUD D.
Les Aérosols : Physique et Métrologie / ed. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 1998
- 71 FRIDELANDER S.K.
Smoke, dust and haze: Fundamentals of aerosol behaviour / ed. John Wiley & Sons, New York, 1976, 317 p.
- 72 SULLIVAN R.C., PRATHER K.A.
Recent advances in our understanding of atmospheric chemistry and climate made possible by on-line aerosol analysis instrumentation, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 12, pp. 3861-3886
- 73 LEONE N., D'ARTHUR G., ADAM P., AMOUROUX J.
Detection of bacterial deposits and bioaerosols by Time-Resolved Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), *High Temp. Mat. Proc.*, 2004, 8, 1, pp. 1-22
- 74 BERGLUND R.N., LIU B.Y.H.
Generation of monodisperse aerosol standards, *Env., Sci. Tech.*, 1973, 7, pp. 147-153
- 75 <http://www.tsi.com/documents/1933450L-3450.pdf>
- 76 GEORGIN J-P.
Analyse interactive des données (ACP,AFC) avec Excel 2000 – Théorie et pratique / ed. Presse Universitaire, Rennes, 2002, 267 p.
- 77 FINK H., PANNE U., NIESSNER R.
Process analysis of recycled thermoplasts from consumer electronics by laser-induced plasma spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2002, 74, pp. 4334-4342
- 78 GOODE S.R., MORGAN S.L., HOSKINS R., OXSHER A.
Identifying alloys by laser-induced breakdown spectroscopy with a time-resolved high resolution Echelle spectrometer, *J. of Anal. Spectrom.*, 2000, 15, pp.1133-1138
- 79 MUNSON C.A., DE LUCIA F.C., PIEHLER T., McNESBY K.L., MIZIOLEK A.W.
Investigation of statistics strategies for improving the discriminating power of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for chemical and biological agent simulants, *Spect. Chim Acta Part B-Atomic Spec.*, 2005, 60, pp.1217-1224
- 80 SIRVEN J.-B., BOUSQUET B., CANIONI L., *et al.*
Qualitative and quantitative investigation of chromium-polluted soils by laser-induced breakdown spectroscopy combined with neural networks analysis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 385, pp. 256-262
- 81 <http://subaru2.univ-lemans.fr/enseignements/physique/02/divers/poisson.pdf>
- 82 HAHN D.W., FLOWER W.L., HENKEN K.R.
Discrete particle detection and metal emissions monitoring using laser-induced breakdown spectroscopy, *Appl. Spectroscopy*, 1997, 51, pp 1836-1844
- 83 CARRANZA J.E., HAHN D.W.
Plasma volume considerations for analysis of gaseous and aerosols samples using laser-induced breakdown spectroscopy, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, pp. 1534-1539
- 84 VORS E., SALMON L.
Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for carbon single shot analysis of micrometer-sized particles, *Anal. Bio. Chem.*, 2006, 385, pp.281-286

- 85 HYBL J. D, TYSK S. M., BERRY S. R., JORDAN M. P.
Laser-induced fluorescence-cued, laser-induced breakdown (LIF-LIBS) biological-agent detection, *Appl. Optics*, 2006, 45, 34, pp. 8806-8814
- 86 CHENG M.-D.
Field measurement comparison of aerosol metals using aerosol beam focused laser-induced plasma spectrometer and reference methods, *Talanta*, 2003, 61, pp. 127-137
- 87 LOMBAERT K., MOREL S., LE MOYNE L., ADAM P., TARDIEU DE
MALEISSY J., AMOUROUX J.
Non destructive analysis of metallic elements in diesel soot collected on filters : benefits of laser Induced Breakdown Spectroscopy, *Plasma Chem. and Plasma Process.*, 2004, 24, 1, pp. 41-56
- 88 BROCK T. D., MADIGAN M. T.
Biology of Microorganisms / Sixth edition, ed. Prentice-Hall International, London, 1991
- 89 LECLERC H., IZAR D., HUSSON M.-O., WATTRE P., JAKUBCZAK E.
Microbiologie Générale / ed. Doin, Paris, 1983
- 90 GOULD G., HURST A.
The bacterial spore / ed. Academic Press, London, 1969
- 91 J. SZPUNAR, LOBINSKI R., PRANGE A.
Hyphenated techniques for elemental speciations in biological systems, *Appl. Spectroscopy*, 2003, 57, 3, p.102A-112A
- 92 STANIER *et al.*
Approximate elementary composition of a single microbial cell, *General Microbiology*, Macmillan Press
- 93 NEIDHARDT F.C., INGRAHAM J.L.? SCHAECHTER M.
Physiologie de la cellule bactérienne / ed. Masson, Paris
- 94 CARRANZA J.E., FISHER B.T., YODER G.D., HAHN D.W.
On-line analysis of ambient air aerosols using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B*, 2001, 56, pp. 851-864
- 95 MOREL S., LEONE N; ADAM Ph., AMOUROUX J.
Detection of bacteria by Time Resolved Laser Induced Breakdown Spectroscopy, *Appl. Optics*, 2003, 42, 30, pp. 6184-6191
- 96 SAMUELS A.C., DE LUCIA F.C., MCNESBY K.L., MIZIOLEK A. W.
Laser-induced breakdown spectroscopy of bacterial spores, molds, pollens, and proteins: initial studies of discrimination potential, *Appl. Optics*, 2003, 42, 30, pp.6205-6209
- 97 KIM T., SPRECHT Z.G., VARY P.S., LIN C.T.
Spectral Fingerprints of Bacterial Strains by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, *J. of Phys. Chem.*, 2004, 108, pp. 5477-5482
- 98 GIBB-SNYDER E., GULLETT B., RYAN S., OUDEJANS L., TOUATI A.
Development of size-selective sampling of *Bacillus anthracis* surrogate spores from simulated building air intake mixtures for analysis via laser-induced breakdown spectroscopy, *Appl. Spectroscopy*, 2006, 60, 8, pp.860-870
- 99 BAUDELET M., GUON L., YU J., WOLF J-P., *et al.*
Femtosecond time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy for detection and identification of bacteria : A comparison to the nanosecond regime, *J. of Appl. Phys.*, 2006, 99
- 100 BOYAIN-GOITA A.R., BEDDOWS D.C.S., GRIFFITHS B.C., TELLE H.H.
Single-pollen analysis by laser-induced breakdown spectroscopy and Raman Spectroscopy, *Appl. Opt.*, 2003, 42, 30, pp. 6119-6132
- 101 HYBL J.D., LITHGOW G.A., BUCKLEY S.G.
Laser-induced breakdown spectroscopy detection and classification of biological aerosols, *Appl. Spectroscopy*, 2003, 57, 10, pp. 1207-1215
- 102 DIXON P.B. HAHN D.W.
Feasibility of detection and identification of individual bioaerosols using laser-induced breakdown spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2005, 77, pp.631-638
- 103 PORTNOV A., ROSEWAKS S., BAR I.
Emission following laser-induced breakdown spectroscopy of organic compounds in ambient air, *Appl. Optics*, 2003, 42, 30, pp. 2835-2842
- 104 PORTNOV A., ROSEWAKS S., BAR I.
Identification of organic compounds in ambient air via characteristic emissions following laser ablation, *J. of Luminesc.*, 2003, 102-103, pp.408-413
- 105 ST-ONGE L., SING R., BECHARD S., SABSABI

-
- Carbon emission following 1.064 μm ablation of graphite and organic samples in ambient air, *Appl. Phys.*, 1999, 69, pp. S913-S916
- 106 LEONE N., FATH G., ADAM P., AMOUROUX J.
Advances in the detection of chemical and biological aerosolized pollutants by means of a field-transportable laser-induced breakdown spectroscopy-based detector, *High Temp. Mat. Proc.*, 2007, 11, 1, pp. 125-148
- 107 Lien Internet : http://www.uma.es/libs_2004/
- 108 DE LUCIA F., HARMON R.S., MCNESBY K.L., WINKEL R.J., MIZIOLEK A. W.
Laser-induced breakdown spectroscopy analysis of energetic material, *Appl. Opt.*, 2003, 42, pp. 6148-6152
- 109 LOPEZ-MORENO C., PALANCO S., LASERNA J.J., DELUCIA F. *et al.*
J. Anal. At. Spectrom. 2006, 21, pp. 55-60
- 110 DOCKERY C.R., GOODE S.R.
Laser-induced breakdown spectroscopy for the detection of gunshot residues on the hand of a shooter, *Appl. Opt.*, 2003, 42, 30, pp. 6153-6158
- 111 Lien Internet : <http://www.oceanoptics.com/homepage.asp>
- 112 Liens Internet : http://www.stellarnet-inc.com/pressrel_2004.htm
<http://www.kigre.com/NDYAG18.pdf>
- 113 YAMAMOTO K.Y., CREMERS D.A., FERRIS M.J., FOSTER L.E.
Detection of metals in environment using a portable laser-induced breakdown spectroscopy instrument, *Appl. Spectroscopy*, 1996, 50, 2
- 114 Lien Internet : <http://www.xtek.net/downloads/Ecco%5B1%5D%20brochure.pdf>
- 115 DESCROIX, Damien
Application de la spectrophotométrie de flamme à la détection des aérosols biologiques dans l'air ambiant par analyse multivariée, Th : Sciences : Paris 12 : 2005, 272 p.
- 116 MADALINSKI, Geoffrey
Désorption/ionisations en spectrométrie de masse appliquées à l'étude structurale de composés liposaccharidiques pour la mise en évidence de biomarqueurs de bactéries, Th : Sciences : Paris : 2005, 185 p.
- 117 PINNICK R.G., HILL S.C., NACHMAN, *et al.*
Aerosol fluorescence spectrum analyzer for rapid measurement of single micrometer-sized airborne biological particles, *Aerosol Sci and Tech.*, 1998, 28, pp. 95-104