



HAL
open science

Spectroscopies femtosecondes de molécules biologiques : vers une détection optique des bactéries

Laurent Guyon

► **To cite this version:**

Laurent Guyon. Spectroscopies femtosecondes de molécules biologiques : vers une détection optique des bactéries. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT: . tel-00195925

HAL Id: tel-00195925

<https://theses.hal.science/tel-00195925>

Submitted on 11 Dec 2007

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.

THÈSE

présentée

devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

pour l'obtention

du **DIPLÔME de DOCTORAT**

(arrêté du 30 mars 1992)

soutenue publiquement le

6 juillet 2007

par

Laurent GUYON

**Spectroscopies femtosecondes de molécules biologiques :
vers une détection optique des bactéries**

Directeur de thèse : Professeur Jean-Pierre Wolf

Jury :

Président : M. Michel BROYER

Rapporteurs : M. Christoph MEIER

M. Marten VOS

Examineurs : M. Herschel RABITZ

M. Jean-Pierre WOLF

Résumé

Dans le cadre général de la détection optique de bactéries, nous mettons en œuvre deux méthodes originales pour distinguer des molécules dont les propriétés optiques sont similaires : la LIBS femtoseconde pour les bactéries, et le contrôle cohérent pour les flavines.

La distinction des flavines par contrôle cohérent consiste à façonner une impulsion excitatrice à 400 nm, et à contrôler l'état excité des molécules en phase liquide par une deuxième impulsion infrarouge qui en diminue la fluorescence. Nous mettons en évidence le rôle du solvant dans ce processus bi-impulsionnel de déplétion, pour le tryptophane. Les études spectroscopiques en phase liquide, qui utilisent des impulsions intenses, engendrent des effets non-linéaires parfois inattendus, qu'il est important de connaître : c'est pourquoi nous étudions la filamentation dans un milieu liquide absorbant.

La photofragmentation des chromophores biologiques ionisés, flavines et tryptophanes, est examinée en phase gazeuse à l'aide d'un dispositif "pompe-pompe" similaire à celui de la déplétion. Nous montrons, avec la flavine mononucléotide, que la seconde impulsion diminue certaines voies de fragmentation au profit des autres. Enfin, nous révélons les potentialités de la LIBS femtoseconde pour l'analyse foliaire et la discrimination de bactéries.

Mots clefs : femtoseconde, spectroscopie, bactérie, flavine, tryptophane, filamentation, contrôle cohérent, plasma, LIBS, photodissociation

Abstract

Within the general framework of the optical detection of bacteria, we implement two original methods to distinguish molecules which optical properties are similar: femtosecond LIBS for bacteria, and coherent control for flavins.

Coherent control distinction of flavins consists in 400 nm pulse shaping, then controlling the excited state of molecules in the liquid phase by a second infrared pulse which decreases fluorescence. We bring to the fore solvent role for this two pulses process of depletion with tryptophan. Spectroscopic studies in liquid phase with intense pulses sometimes generate unexpected non-linear effects, which is at the origin of the study of the filamentation in an absorbing liquid medium.

Photofragmentation of ionized biological chromophores, flavins and tryptophan, are examined in gas phase using similar “pump-pump” scheme to the one used for depletion. We show, with flavin mononucleotide, that the second pulse decreases certain ways of fragmentation to the benefit of the others. Lastly, we reveal the potentialities of femtosecond LIBS for bacteria discrimination and foliar analysis.

Key words: femtosecond, spectroscopy, bacterium, flavin, tryptophan, filamentation, coherent control, plasma, LIBS, photodissociation

Remerciements

Mes premiers remerciements vont bien sûr à mon directeur de thèse. Jean-Pierre, tu auras été l'un de mes meilleurs enseignants lors de ma scolarité à l'ENS de Lyon, et un excellent directeur de thèse. Je garderai notamment en mémoire ton enthousiasme et ton inventivité, qui m'ont permis, même lors de moments difficiles, d'avoir envie de continuer à être acteur avec un metteur en scène comme toi. Je me souviendrai aussi de tes explications claires et limpides, sur un tableau blanc ou sur un bout de papier ; elles m'ont un peu manqué, il est vrai, lors de ton départ à Genève. Mais même à distance, j'ai profité de tes corrections rapides et efficaces !

Je souhaite aussi remercier les membres de mon jury : Michel Broyer pour avoir présidé mon jury, Chris Meier et Marten Vos pour leur lecture détaillée et attentive, and Hersch Rabitz who crossed the Ocean to assist my defense.

Durant ma thèse, j'ai pu échanger avec de nombreuses personnes, au sein de mon équipe ou de collaborations. "La bonne science est-elle un produit collectif?" interroge le magazine Sciences Humaines [1] ; dans le cas de ma thèse la réponse est naturellement positive. Je remercie donc tous mes collaborateurs, nombreux, et plus particulièrement :

- Véronique qui m'a notamment appris les techniques expérimentales utilisées à Lyon, des lasers femtosecondes aux gouttelettes... pour vaincre les problèmes de stabilité associés !
- Les doctorants et post-doctorants avec qui j'ai partagé la salle d'expérience. A Lyon et chronologiquement : François Courvoisier, Christophe Bonnet et Benoît Thuillier. I also thank Kim, our great Australian student.
- Jin et Estelle, les autres spécialistes du laser, pour la Libs et pour leurs réglages femtosecondes.
- A special thank for Hersch Rabitz for his welcome in his laboratory, and for Matthias Roth for nice scientific interactions in the lab and numerous email exchanges. I also thank Wolfgang and the Princeton table tennis club, including Volker and Steve, for their friendships.
- Vincent, bien sûr, mon cher collègue de bureau, qui m'a appris, entre autres, les rudiments des bobines de fils de Labview ! Et Benoît qui a partagé cette dernière année et à qui je souhaite bonne chance pour la suite.

- Les deux Jérôme, spécialistes des cavités ou de Labview, pour les discussions scientifiques sur des sujets très variés.
- Les Genevois : Jérôme Exterman (merci pour ton accueil chaleureux), Pierre(s), Luigi, Ariana.
- Tous les nombreux collaborateurs avec qui j’ai eu de passionnantes interactions scientifiques : Eric Vauthey, Thibault Tabarin, Philippe Dugourd, Michel Broyer, Rodolphe Antoine, Francis Talbot, Luc Bergé, Rachel Nuter, Antoine Vinçotte,...
- Les autres membres de l’équipe et du labo, dont nos dynamiques informaticiens, Francisco et Sad.
- Mes amis, dont les plus courageux sont venus (parfois de loin!) jusqu’à ma soutenance (Fabien, Yannick, Bertrand, Baptiste, Mihail, Emmanuel), pour les échanges de science... comme d’articles! Et un petit clin d’oeil à Yannick qui reprendra peut-être, à Genève, la suite de certaines de mes expériences!
- Ma famille, particulièrement mes parents qui ont traversé la France pour organiser mon pot de thèse aux spécialités poitevines très appréciées, et pour assister à ma soutenance, malgré les difficultés de compréhension de la langue (la soutenance était en anglais)!

Je souhaiterais finir en te remerciant Aurélie, toi qui a supporté un doctorant pendant trois ans, ce qui inclut quelques week-ends à préparer des cours, des corrections de manuscrit jusque dans le train, etc... Et pour la rédaction de thèse justement, je te remercie pour ton exigence qui m’a fait progresser tout au long de la rédaction, afin de faire des phrases qui ”coulent” et facilitent la compréhension; tu auras relu avec pertinence et en entier mon manuscrit sans en comprendre la physique : BRAVO!

J’arrête ici mes remerciements qui pourraient cependant noircir de nombreuses pages...

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Remerciements	vii
Table des matières	ix
Introduction	1
I Techniques et outils expérimentaux	3
1 Génération d'impulsions femtosecondes	3
1.1 Chaîne laser femtoseconde, amplifiée	3
1.2 Génération d'autres longueurs d'onde	6
2 Mise en forme et caractérisation temporelles des impulsions	8
2.1 Ligne à dispersion nulle	8
2.2 Mise en forme des impulsions visibles et proche-infrarouges	8
2.3 Mise en forme des impulsions ultra-violettes	10
2.4 Ligne pompe-sonde	10
2.5 (Auto)-corrélation	12
II Déplétion de fluorescence en phase liquide	13
1 Introduction	13
1.1 Distinction optique par déplétion	13
1.2 Déplétion des flavines	16
1.3 Contrôle cohérent de l'impulsion sonde	16
1.4 Implication personnelle	19
2 Déplétion du tryptophane	20
2.1 Dispositif expérimental de type pompe-sonde	20

2.2	Influence du solvant	21
2.3	Discussion	24
2.4	Influence du solvant : errata	28
3	Contrôle cohérent de la déplétion de fluorescence	28
3.1	Distinction optique de deux molécules quasi-identiques	28
3.2	Dispositif expérimental	29
3.3	Optimisation de la déplétion	32
3.4	Interprétation des résultats	34
4	Conclusions du chapitre et perspectives	38
III Filaments lasants		41
1	Introduction	41
1.1	Emission stimulée : étude dans les chromophores biologiques	41
1.2	Schéma de type “pump-dump” dans la coumarine	42
1.3	Implication personnelle	42
2	La Filamentation	43
2.1	Description simplifiée	43
2.2	Indice non-linéaire	43
2.3	Divergence par le plasma	44
2.4	Faisceau auto-guidé	45
2.5	Multifilamentation et organisation des filaments	45
3	Présentation de l’expérience	45
3.1	Dispositif expérimental général	46
3.2	Profil du faisceau	48
3.3	Champ en sortie de cellule	49
4	Simulation de la propagation	49
4.1	Le modèle utilisé	50
4.2	Impulsion incidente	51
4.3	Choix du \mathbf{n}_2	51
4.4	Prise en compte des molécules de colorants excitées	53
5	Propagation : expérience et simulation	54
5.1	Observations générales	54
5.2	Etude avec un diaphragme circulaire	54
5.3	Etude en fonction de la concentration de coumarine	56
5.4	Stabilité coup par coup	57

5.5	Etude en fonction de la distance de propagation dans la cellule	59
5.6	Propagation d'un faisceau rectangulaire	60
5.7	Origine de la grande stabilité de position des filaments	61
6	Filaments lasants	62
6.1	Dispositif expérimental	62
6.2	Fluorescence en champ lointain	63
6.3	Diaphragme rectangulaire en entrée de cellule : fente source	65
6.4	Cohérence des filaments	66
7	Conclusions du chapitre	66
IV Spectroscopie de molécules biologiques en phase gazeuse		69
1	Introduction	69
1.1	Fragmentation de biomolécules en phase gazeuse	69
1.2	Dynamique et cohérence en phase gazeuse	70
1.3	Implication personnelle	71
2	Dispositif expérimental	71
2.1	Trappe optique	71
2.2	Dispositif pompe-sonde	72
3	Photodissociation du tryptophane	73
3.1	Fragmentation avec une seule impulsion	73
3.2	Dynamique de photodissociation	74
3.3	Conclusions de l'expérience	76
4	Photodissociation des flavines	78
4.1	Expériences préliminaires	78
4.2	Etude pompe-sonde femtoseconde de la photofragmentation de FMN	81
4.3	Interprétation des résultats	83
4.4	Fragmentation de FAD et autres formes chargées de FMN	86
4.5	Corrélation des spectres	87
5	Conclusions du chapitre	88
V Spectroscopie de Plasma Induit par Laser (LIBS)		89
1	Introduction	89
1.1	La technique LIBS	89
1.2	Implication personnelle	92
2	Dispositif expérimental et traitement des données	92

2.1	Montage	92
2.2	Paramètres d'acquisition et barre d'erreur	94
2.3	Identification des raies	95
3	Etude de bactéries par LIBS	96
3.1	Echantillons étudiés	96
3.2	Comparaison nanoseconde/femtoseconde	99
3.3	Bandes CN : un marqueur pour les milieux biologiques	102
4	Analyse foliaire par LIBS, en régime femtoseconde	104
4.1	Composition des plantes	104
4.2	Les avantages potentiels pour l'analyse foliaire	105
4.3	Echantillons analysés	106
4.4	Éléments observés par LIBS dans les feuilles	107
5	Effet de la face et de la saison	112
5.1	Motivations	112
5.2	Corrélations entre les différents spectres	112
5.3	Comparaison élément par élément	114
5.4	Analyse des feuilles recto-verso	115
5.5	Effet de la saison	116
6	Conclusions du chapitre	118
Conclusion et perspectives		121
A Impulsion femtoseconde : génération et propagation		125
1	Génération d'une impulsion femtoseconde	125
2	Propagation du paquet d'onde	127
2.1	Temps de propagation	127
2.2	Propagation, déphasage et forme temporelle de l'impulsion	128
2.3	Déphasages constants, linéaires et quadratiques	130
2.4	Propagation dans du verre	131
B Propriétés des chromophores utilisés		133
1	Le tryptophane	133
1.1	Fluorescence et solubilité	133
1.2	Propriétés acido-basiques	133
1.3	Potentiels d'ionisation et potentiels d'oxydoréduction	133
1.4	L'indole	135

2	Les flavines	135
2.1	Fluorescence	135
2.2	Solubilité	136
3	Le naphthalène	137
3.1	Propriétés optiques	137
3.2	Solubilité	138
3.3	Potentiels d'ionisation et potentiels d'oxydoréduction	138
C	Programme d'identification des raies	141
1	Fichiers fournis	141
2	Description du programme	142
3	Fichier créé	143
	Bibliographie	145
	Liste de publications	163

Introduction

Les microorganismes de l'air, présents à la fois dans des environnements confinés ou en extérieur, peuvent produire chez l'homme des effets indésirables, qui vont de la simple irritation aux maladies graves. Parmi les bioaérosols, les champignons ($2 - 10 \mu m$), les bactéries ($1 - 5 \mu m$), et les virus ($20 - 300 nm$) constituent les principales menaces [2]. Être capable de mesurer la concentration de bioaérosols dans des environnements variés représente donc un enjeu majeur de santé publique. Pouvoir les détecter en temps réel devient un besoin civil et militaire croissant. Les approches conventionnelles, très sélectives, sont des méthodes de microbiologie qui nécessitent la mise en culture des échantillons sur plusieurs jours. De nombreuses autres techniques ont été développées pour effectuer des mesures plus rapides : la spectroscopie de masse de bioaérosols, la réaction en chaîne par polymérase quantitative^a (qui requiert néanmoins plus de 4h de préparation et analyse), ou la cytométrie en flux associée à des méthodes de fluorescence [2]. Cette dernière technique nécessite une mise en solution des aérosols avant une analyse par fluorescence, dans un flux liquide. Des colorants peuvent être préalablement fixés sur les particules. La même technique a été récemment appliquée pour la détection de légionelles, mais en remplaçant les traditionnels colorants par une méthode spécifique de marqueur biologique : l'hybridation fluorescente in-situ^b [3].

Une approche sans préparation d'échantillons consiste à faire circuler un flux d'air laminaire et à illuminer les particules à l'aide de lasers. Lorsqu'une particule solide croise le premier faisceau laser, elle diffuse. La mesure de cette diffusion permet non seulement de connaître la taille de la particule, mais aussi de déclencher un second laser pour exciter la fluorescence intrinsèque des molécules. Les principaux chromophores (ou fluorophores) des bioaérosols, molécules responsables de leurs propriétés de fluorescence, sont le tryptophane (excitation vers 270 nm et fluorescence vers 350 nm), la NADH (excitation autour de 350 nm et fluorescence autour de 450 nm), et les flavines (excitation autour de 400 nm et fluorescence vers 540 nm). Pour détecter en temps réel les bioaérosols, des prototypes ont été construits, qui utilisent la fluorescence du

^aou qPCR pour quantitative Polymerase Chain Reaction en anglais.

^bou FISH pour Fluorescent In Situ Hybridization en anglais.

tryptophane [4] ou de la NADH [5] contenus dans les bioaérosols, ou bien la fluorescence des deux à la fois [6]. L'avantage majeur de cette approche, - sa capacité à effectuer des mesures en temps réel, sans préparation d'échantillon, ni utilisation de matériaux biologiques coûteux -, s'est confirmé lors de mesures in-situ avec des prototypes nécessitant peu de maintenance et ayant une basse consommation électrique. Son principal inconvénient est sa faible sélectivité, notamment due aux interférences avec d'autres aérosols organiques dont le spectre de fluorescence est similaire à celui des bioaérosols [4].

Pour différencier les aérosols biologiques des autres, notre équipe a proposé une méthode originale de déplétion de fluorescence à l'aide de deux impulsions [7], qui pourrait être utilisée pour une détection à distance de type LIDAR [8]. D'autres améliorations visaient à augmenter la sélectivité des mesures : illuminer les aérosols par deux excitations distinctes (266 et 355 nm) des chromophores [9], coupler la mesure de fluorescence avec la LIBS^c [10] ou avec la CRDS^d [11]. Des méthodes plus fines de spectroscopie ont aussi été récemment développées, comme les spectroscopies Raman [12] et CARS^e [13]. Bien qu'elles aient montré des capacités intéressantes de discrimination, elles requièrent néanmoins soit des préparations d'échantillons (impacts), soit un appareillage qui, actuellement, empêche des mesures de terrain en temps réel.

Ce travail de thèse est destiné à améliorer la détection optique des bactéries, et notamment leur distinction. Pour plus de souplesse, l'étude est souvent restreinte à deux types de fluorophores biologiques : les flavines et le tryptophane. Notre approche consiste à utiliser des lasers femtosecondes amplifiés. Ces impulsions présentent l'avantage d'être courtes (ce qui permet l'étude des dynamiques rapides des molécules après excitation), d'être larges spectralement (ce qui permet de façonner les impulsions), et d'être intenses (ce qui permet la génération aisée d'un florilège d'effets non-linéaires).

Le chapitre I décrit le laser amplifié et les techniques expérimentales utilisées au cours de ma thèse. Les propriétés des chromophores, flavines et tryptophane sont aussi données.

Toutes les caractéristiques des impulsions femtosecondes énoncées ci-dessus sont mises à profit dans le chapitre II, qui décrit la dynamique moléculaire du tryptophane et des flavines en solution, à l'aide d'une excitation de type "pompe-pompe". L'influence du solvant et du pH pour le tryptophane est discutée, ainsi que le contrôle cohérent des flavines dans l'eau.

La dynamique moléculaire peut aussi être sondée à l'aide d'un schéma de type "pompe-

^cLIBS : Laser Induced Breakdown Spectroscopy, i.e. spectroscopie de plasma induit par laser.

^dCRDS : Cavity Ring-Down Spectroscopy, consiste à mesurer le temps de décroissance d'une impulsion dans une cavité.

^eCARS : Coherent Anti-stokes Raman Scattering.

dump". L'utilisation d'un colorant comme simulant optique des flavines montre que ce système, excité à deux photons, présente une amplification par émission stimulée, mais aussi, de façon inattendue, une émission structurée en champ lointain. Le chapitre III décrit et étudie ce phénomène.

La perte de la phase d'un paquet d'ondes est rapide en phase liquide, du fait de la décohérence liée aux interactions avec le solvant. Le contrôle cohérent en phase liquide est ainsi rendu plus difficile en raison des molécules du solvant. Afin de s'affranchir de ces effets, nous étudions en phase gazeuse la dynamique de photofragmentation des flavines et du tryptophane, piégés dans une trappe électrique quadrupolaire (chapitre IV).

Enfin, une approche originale est développée pour la discrimination de bactéries : à l'aide de la technique LIBS femtoseconde, nous étudions les bactéries sur une couche solide. Les résultats positifs nous ont encouragés à continuer les expériences pour l'analyse foliaire (chapitre V).

Chapitre I

Techniques et outils expérimentaux

1 Génération d'impulsions femtosecondes

1.1 Chaîne laser femtoseconde, amplifiée

Le laser femtoseconde utilisé au laboratoire pendant ma thèse est amplifié grâce à une chaîne à dérive de fréquence^a. Je ne décrirai ici que le principe général dans la mesure où ce système, commercial, est maintenant couramment employé dans les laboratoires de recherche.

Le schéma de principe d'une telle chaîne est décrit figure I.1 : l'impulsion femtoseconde est créée par un oscillateur, puis amplifiée au sein d'un amplificateur. Chaque partie nécessite de l'énergie qui est apportée par des lasers commerciaux, l'un continu pour l'oscillateur, et l'autre impulsionnel pour l'amplificateur ; ce dernier impose son taux de répétition aux impulsions amplifiées.

L'ensemble de la chaîne est accordé aux longueurs d'onde d'émission du saphir dopé titane^b, à 810 nm dans notre cas. Les lasers *Ti : Sa* sont désormais largement utilisés : "large bande", pratiques avec leur matrice solide, ils permettent actuellement d'atteindre les impulsions visibles les plus courtes [14]. Le néodyme, dans une matrice *YAG* ou *YVO₄*, présente une émission, qui, lorsqu'elle est doublée, est bien adaptée à la bande d'absorption du *Ti : Sa*.

Les impulsions femtosecondes sont générées par un oscillateur Femtosource[®][15], pompé par un laser continu *Nd : YVO₄* Millenia[®], doublé à 532 nm, et de puissance 5W. Les spécifications annoncées de l'oscillateur sont les suivantes : un spectre d'émission centré à 810 nm, une bande passante de 75 nm, une largeur temporelle de 12 fs, un taux de répétition de 90 MHz, et une

^aen anglais, CPA pour Chirp Pulse Amplification.

^bPar convention, le nom des cristaux lasers commence par le dopant responsable de l'effet laser, suivi par la matrice. *Ti : Sa* correspond à une matrice de saphir dopée au titane.

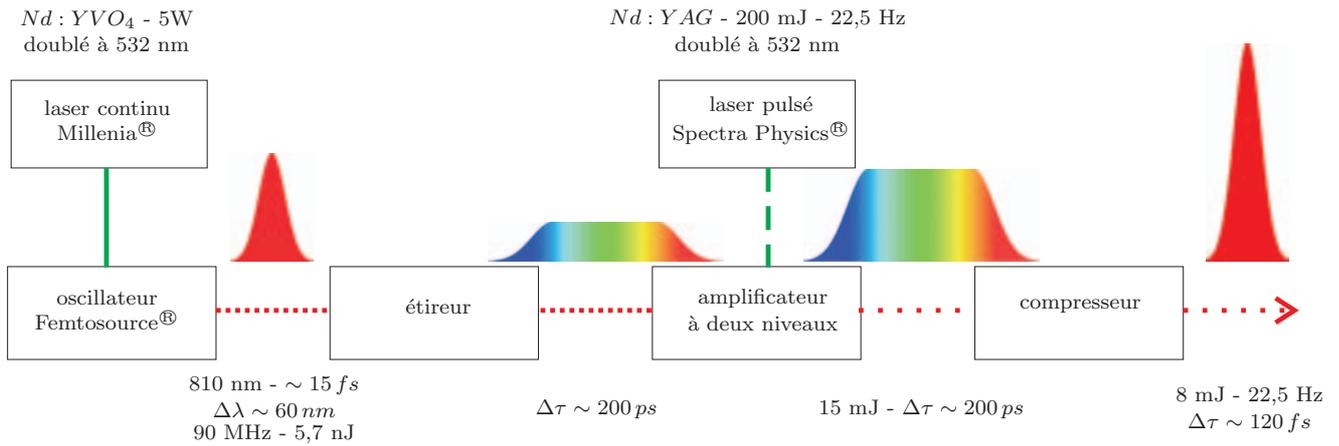


FIG. I.1 – **Schéma de principe d'une chaîne femtoseconde amplifiée à dérive de fréquence.** $\Delta\tau$ est la largeur temporelle, et $\Delta\lambda$ la largeur spectrale à mi-hauteur.

énergie par impulsion de quelques nanojoules. Les impulsions se construisent dans la cavité de façon passive, par un blocage de modes par effet Kerr dans le cristal $Ti : Sa$: la cavité est construite de façon à minimiser les pertes du régime impulsionnel (modes en phase) par rapport au régime continu (phase des modes aléatoire). Grâce à un matériau dont l'indice optique n dans le cristal dépend de l'intensité lumineuse, la trajectoire des faisceaux est liée à la nature du régime (c'est l'effet Kerr, dont la description est donnée au paragraphe 2.2 page 43).

La chaîne d'amplification, de marque BMI, à dérive de fréquence, permet d'accroître l'énergie des impulsions délivrées par l'oscillateur. Par contre, elle rétrécit beaucoup le spectre et génère donc des impulsions bien plus longues que celles de l'oscillateur, car elle était initialement adaptée à un autre oscillateur (voir figure I.2). La première étape de la chaîne consiste à étirer temporellement les impulsions en imposant une phase quadratique (en première approximation) aux modes de l'impulsion, à l'aide d'un étireur à réseau qui fait parcourir aux différentes longueurs d'onde un trajet différent, dans un montage proche d'une ligne 4-f à dispersion nulle^c (voir figure I.4). En réalité, dans notre chaîne, un étireur d'Öffner [16] est utilisé pour augmenter de quatre ordres de grandeur la durée des impulsions, des miroirs sphériques remplaçant les lentilles afin de diminuer les aberrations. Cette étape d'allongement est nécessaire, car les impulsions courtes et énergétiques, très intenses, pourraient endommager les optiques suite à la génération d'effets non-linéaires comme l'effet Kerr.

L'amplification s'effectue en deux étapes : par un amplificateur régénératif (appelé "Regen") qui multiplie l'énergie des impulsions par un facteur 10^6 pour atteindre 1 mJ, puis par un amplificateur multipassage ou "papillon"^d pour atteindre 15 mJ par impulsion. L'énergie provient

^cIci, la distance réseau-lentille d est différente de f , distance focale de la lentille : la dispersion n'est plus nulle.

^dLes faisceaux passent 6 fois dans le cristal (dans le cas de notre chaîne), et forment l'image d'un papillon.

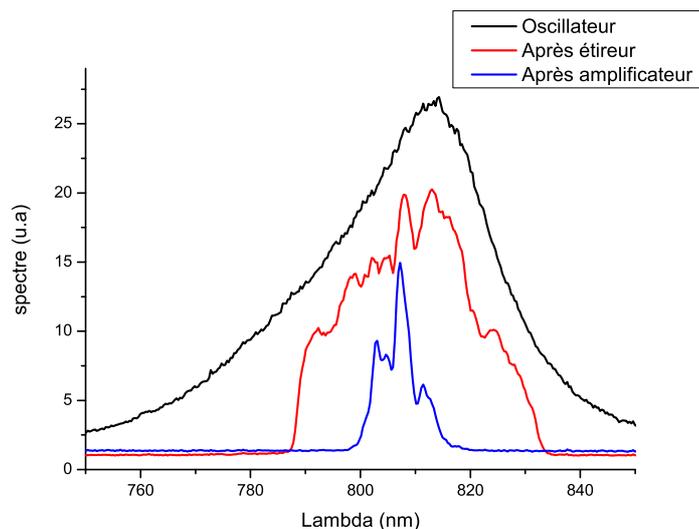


FIG. I.2 – *Spectres à plusieurs positions de la chaîne.* On constate que l'étireur et l'amplificateur rétrécissent le spectre.

d'un laser impulsionnel, qui délivre des impulsions nanosecondes de 200 mJ, partagés entre les deux étages d'amplification : il reste 30 mJ au niveau du cristal $Ti : Sa$ du Regen, et 90 mJ au niveau de celui du papillon. Dans une cavité laser, le champ intracavité est supérieur de plusieurs dizaines de fois celui qui sort (en fonction de la transmission du miroir de sortie) [14], alors que l'amplificateur régénératif a un fonctionnement particulier. Afin de tirer parti du champ intracavité, intense, une cellule de Pockels^e est en effet insérée dans la cavité : elle permet de changer la polarisation de l'impulsion pour l'éjecter de la cavité lorsqu'elle a atteint son maximum d'intensité, via un cube polariseur. L'impulsion est ensuite amplifiée dans l'amplificateur "papillon", par des passages successifs dans le milieu à gain.

La dernière étape s'occupe de compresser les impulsions, c'est-à-dire à compenser la phase imposée dans l'étireur, ainsi que les dispersions dans les optiques de l'étage d'amplification, à l'aide d'un compresseur à réseaux. La distance entre les deux réseaux^f doit être réglée chaque jour pour compenser au mieux la phase des modes et raccourcir ainsi l'impulsion. Comme il n'existe pas de détecteur avec un temps de réponse aussi court que la dizaine de femtosecondes, l'observable de la largeur temporelle de l'impulsion est son intensité, que l'on cherche à accroître via l'augmentation des effets non-linéaires. A Lyon, nous cherchons à optimiser la génération de

^eL'effet Pockels, est un effet de biréfringence contrôlé par une haute tension.

^fAu laboratoire, un jeu de miroir permet de n'avoir qu'un seul réseau, sur lequel on effectue plusieurs réflexions. La distance entre les "deux" réseaux est virtuelle.

couleurs (lumière blanche) en focalisant l'impulsion avec une lentille de courte focale, soit dans l'air, soit dans une plaque de plexiglas; à l'avenir, cette optimisation devrait être réalisée en optimisant le signal d'une photodiode à deux photons.

Le tableau I.1 résume les caractéristiques de notre laser.

Longueur d'onde centrale	810 nm
Largeur spectrale à mi-hauteur	8 nm
Durée d'impulsion à mi-hauteur	120 fs
Taux de répétition	22,5 Hz
Energie maximale par impulsion	8 mJ
Diamètre du faisceau ($1/e^2$)	12 mm
Stabilité coup à coup	$\sim 5\%$

TAB. I.1 – **Performance du laser femtoseconde amplifié.** D'après F. Courvoisier [17]. L'énergie caractéristique utilisée pour nos expériences est plutôt de l'ordre de 5 à 6 mJ; le maximum délivré par la chaîne est utilisé pour les expériences de filamentation dans l'air.

1.2 Génération d'autres longueurs d'onde

Les impulsions femtosecondes intenses présentent comme grand avantage de générer facilement d'autres longueurs d'ondes, à l'aide de nombreux effets non-linéaires : génération d'harmoniques ($2\omega_0$, $3\omega_0$, où ω_0 est la pulsation de notre laser), automodulation de phase (SPM^g), somme et différence de fréquences, etc.

Génération d'harmoniques

Les expériences "pompe-sonde" réalisées dans ma thèse sont à deux couleurs : la longueur d'onde fondamentale du laser et une autre longueur d'onde, soit une harmonique, soit une partie d'un continuum de lumière blanche. Pour générer les harmoniques, nous utilisons des cristaux doubleurs et "tripleurs"^h en β -Barium-Borate (BBO), dans une configuration colinéaire. Ces cristaux sont taillés différemment par rapport à leur axe cristallin de façon à réaliser l'accord de phase en s'aidant de la biréfringence du cristal. Nous utilisons un cristal doubleur de 0,1 mm ou de

^gSPM pour Self Phase Modulation en anglais.

^hCes cristaux sont appelés "tripleurs" par abus de langage : ce sont en fait des cristaux "somme de fréquence" car il s'agit de cristaux $\chi^{(2)}$ pour sommer les fréquences fondamentale ω_0 et double $2\omega_0$, pour générer la troisième harmonique $3\omega_0$.

1 mm d'épaisseur pour générer les impulsions "bleues", dont la polarisation est perpendiculaire aux impulsions à 810 nm ; le cristal le plus épais, acquis récemment, permet d'atteindre des énergies par impulsion de 1 mJ, mais présente l'inconvénient de raccourcir le spectre et donc d'allonger le temps de l'impulsion d'une centaine de femtosecondes [14]. Le cristal "tripleur" est quant à lui utilisé pour générer les impulsions à 270 nm, et faire la différence de fréquence "270 nm moins 810 nm" pour générer des impulsions à 405 nm lors des corrélations 270/810. Dans toute la suite de la thèse, on qualifiera de violettes ou ultraviolettes (UV) les impulsions à 270 nm, et bleues les impulsions à 405 nm, bien que toutes deux sont dans l'ultraviolet ; on prend en effet en compte la couleur perçue par l'œil sur une feuille de papier, qui vient de la fluorescence des azurants (colorants). De même, on qualifiera indifféremment de rouge ou infrarouge (IR) les impulsions à 810 nm.

	BBO doubleur	BBO "tripleur"
$\theta(^{\circ})$	29,2	44,3
$\phi(^{\circ})$	0	0
Epaisseur (mm)	0,1 ou 1	0,2
Dimensions transverse (mm)	8×8	8×8 ou 5×5
Traitements anti-reflets (nm)	800/400	800/400/270

TAB. I.2 – *Caractéristiques des cristaux non-linéaires utilisés dans nos expériences.*

D'après F. Courvoisier [17].

Génération de continuum

En focalisant l'impulsion dans une lame de saphir, on génère un continuum de lumière blanche. Le phénomène physique principal de cette génération est l'automodulation de phase (SPM). Lorsque l'intensité de l'onde devient très grande, l'indice du milieu est modifié en $n(I) = n_0 + n_2 I$: c'est l'effet Kerr. Cet effet est responsable d'une modification spatiale de la propagation de l'impulsion (suivant O_z), mais aussi d'un déphasage temporel, appelé automodulation de phase. La fréquence instantanée étant proportionnelle à la dérivée de la phase φ , cela se traduit par la génération de nouvelles fréquences ν sur le front montant ($\Delta\nu < 0$) et sur le front descendant ($\Delta\nu > 0$) de l'impulsion, comme le montrent les équations ci-dessous écrites dans le référentiel attaché à l'impulsion.

$$\varphi(t) = \omega_0 t - \frac{\omega_0 z}{c} n(t) = \omega_0 t - \frac{\omega_0 z}{c} (n_0 - n_2 I(t)) \quad (\text{I.1})$$

$$\omega(t) = \frac{d\varphi}{dt} = \omega_0 - \frac{\omega_0 n_2 z}{c} \frac{dI}{dt} \quad (\text{I.2})$$

Dans le domaine temporel, l’enveloppe et la pulsation de l’impulsion sont modifiées, comme sur la figure I.3. Comme le continuum est superposé temporellement à l’impulsion incidente, l’avantage est qu’il n’y a pas de synchronisation à réaliser. De plus, le continuum ainsi créé est spatialement cohérent, comme on le verra au chapitre III. En revanche, le manque de stabilité du continuum représente un inconvénient important ; la stabilité aurait pu être améliorée si l’on avait choisi une lame de saphir dont l’axe de biréfringence est perpendiculaire à sa surfaceⁱ.

2 Mise en forme et caractérisation temporelles des impulsions

2.1 Ligne à dispersion nulle

Pour mettre en forme temporellement les impulsions, on se sert, en femtoseconde, de la dualité temps-fréquence, car il n’existe aucun dispositif de manipulation des impulsions qui ait des temps de réponse de l’ordre de la femtoseconde ou même de la centaine de femtosecondes. La ligne à dispersion nulle présente l’avantage de découpler spatialement les modes de l’impulsion dans un plan appelé “plan de Fourier”, puis de recombinaison ces modes pour reconstruire l’impulsion initiale sans modification. La figure I.4 présente le principe de cette ligne ; les lentilles sont souvent remplacées par des miroirs cylindriques afin de diminuer les aberrations et la dispersion dans les lentilles. En plaçant un masque au plan de Fourier, on peut modifier la phase, l’amplitude, et même la polarisation [19, 20] de chacun des modes.

2.2 Mise en forme des impulsions visibles et proche-infrarouges

Pour façonner les impulsions visibles et proche-infrarouges, la matrice linéaire de cristaux liquides est un masque couramment utilisé. Chaque pixel comprend une cellule de cristaux liquides, qui joue le rôle d’une lame biréfringente dont les axes neutres sont à 45° de la polarisation incidente ; en appliquant une tension U à la cellule, on contrôle le déphasage $\Delta\phi$ introduit. Le dispositif utilisé au laboratoire comprend deux matrices de 128 pixels l’une en face de l’autre

ⁱD’après une discussion privée avec Eric Freysz.

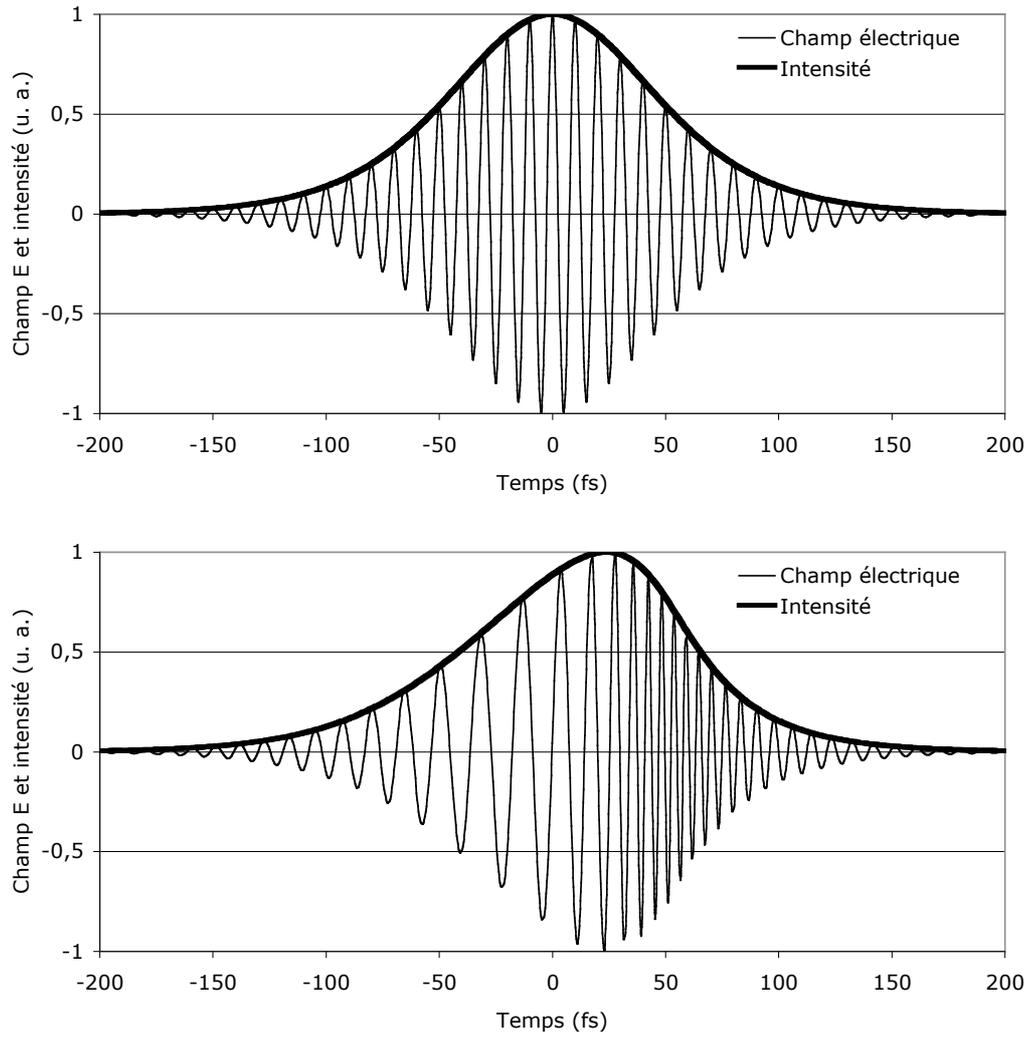


FIG. I.3 – *Automodulation de phase : génération de basses et hautes fréquences, respectivement sur les fronts montant et descendant de l'impulsion. D'après G. Méjean [18].*

(CRI SLM256) : les lignes neutres des deux cellules en vis-à-vis sont confondues, mais comme les axes rapides et lents sont perpendiculaires, cela permet de façonner à la fois la phase et l'amplitude du mode. En effet, on peut montrer [21, 22] que la transmission complexe T_n pour le double pixel n est alors :

$$T_n = e^{i\left(\frac{\Delta\phi_1 + \Delta\phi_2}{2}\right)} \cdot \cos\left(\frac{\Delta\phi_1 - \Delta\phi_2}{2}\right) \quad (I.3)$$

où $\Delta\phi_1$ est le déphasage induit par la première cellule de cristaux liquides. La phase et l'amplitude sont imposées par les tensions U_1 et U_2 sur chacune des cellules de cristaux liquides.

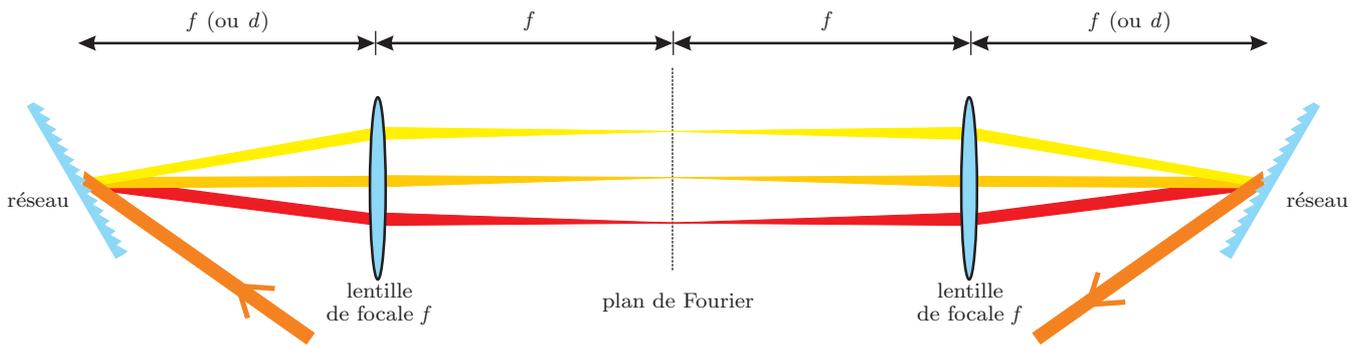


FIG. I.4 – **Ligne à dispersion nulle (cas $d=f$)**. Lorsque $d \neq f$, le trajet parcouru par les différentes longueurs d'onde est tel qu'il apparaît une phase quadratique entre les différents modes. Ce principe est utilisé dans l'étireur des chaînes CPA ; le chromatisme latéral induit par cette géométrie (non montré ici) est compensé par le retour inverse de la lumière à l'aide d'un miroir.

2.3 Mise en forme des impulsions ultra-violettes

Un inconvénient important des matrices à cristaux liquides est qu'elles ne transmettent pas les longueurs d'onde inférieures à 450 nm. Afin de les façonner, nous avons collaboré avec le groupe d'Herschel Rabitz à Princeton, dans lequel Matthias Roth venait de développer un façonneur UV basé sur le principe de la diffraction des modes par une onde acoustique [23]. Le principe de ce façonneur, donné figure I.5, consiste à créer un réseau d'indice n dans un matériau, ici de la silice fondue (pour transmettre efficacement l'UV), à l'aide d'une onde radio-fréquence ; l'impulsion diffractée est façonnée en phase et en amplitude. La faible efficacité de diffraction implique une transmission du façonneur de 10%, ligne 4-f comprise : c'est le désagrément majeur de ce type de façonneur^j.

2.4 Ligne pompe-sonde

Un des dispositifs clés des expériences de dynamique femtoseconde, qui a été utilisé largement durant toute ma thèse, est la ligne pompe-sonde, qui permet de contrôler le délai entre deux impulsions. La figure I.6(a) présente le principe d'une ligne pompe-sonde. A Lyon, elle était déjà montée lorsque je suis arrivé ; par contre j'ai contribué à aligner celle de Princeton (figure I.6(b)), c'est-à-dire à aligner parfaitement les faisceaux incidents et sortants avec l'axe du banc de translation motorisé. Pour cela, nous avons d'abord aligné précisément le faisceau incident le long des trous de la table optique, puis placé le miroir M_1 sur le banc à 45° en alignant à nouveau le faisceau réfléchi le long des trous, et en effectuant de même pour le miroir M_2 . A chacune des

^jC'est cependant le premier à être capable de façonner phase et amplitude dans l'UV.

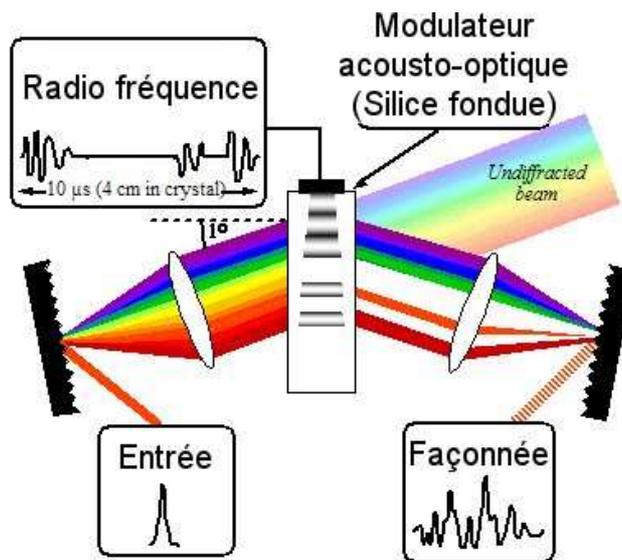


FIG. I.5 – *Principe du façonneur acousto-optique*. D'après R. Trebino [14]

étapes, l'horizontalité est aussi vérifiée, et la précision augmentée en regardant l'alignement sur de longues distances. Le réglage fin des miroirs est réalisé en ajoutant deux diaphragmes, D_1 sur le banc de translation, et D_2 en sortie du dispositif : les faisceaux doivent passer parfaitement au centre des diaphragmes lorsque la ligne à translation est à ses deux extrémités.

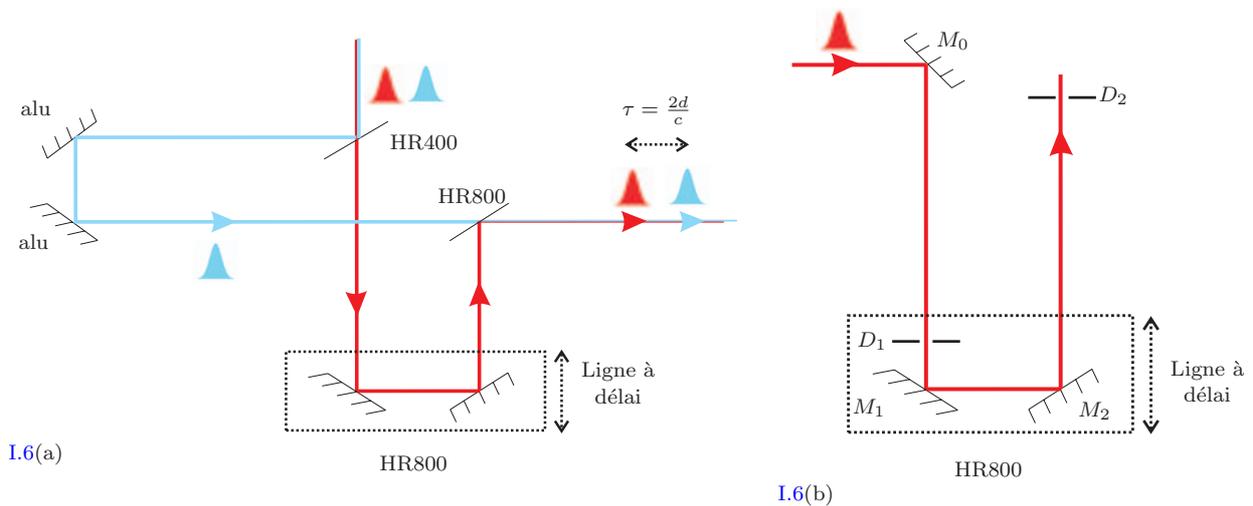


FIG. I.6 – *Ligne pompe-sonde (a) et alignement de la ligne à retard (b)*.

Le banc de translation utilisé à Lyon a une résolution de $2,5 \mu m$ et une amplitude de translation de $5 cm$, ce qui correspond à $16 fs$ de résolution temporelle et à un délai maximum de $300 ps$ entre les impulsions.

2.5 (Auto)-corrélation

Le fait qu'il n'existe pas de détecteur suffisamment rapide impose d'utiliser des moyens détournés pour mesurer les caractéristiques de l'impulsion, comme des moyens interférométriques. L'autocorrélation à 810 nm est ainsi utilisée pour connaître la forme de l'enveloppe de l'impulsion infrarouge, notamment sa largeur temporelle.

Lorsque l'expérience requiert des impulsions à 405 nm et à 810 nm , la corrélation entre les deux impulsions permet de connaître l'origine des temps, qui correspond à un recouvrement spatial des deux. Pour cela, après avoir aligné parfaitement les deux impulsions, on enregistre l'intensité I_{270} des impulsions à 270 nm créées dans un cristal "tripleur". Celle-ci est donnée par la convolution :

$$I_{270}(\tau) \propto \int_{-\infty}^{\infty} I_{810}(t)I_{405}(t - \tau)dt$$

où τ est le délai entre les deux impulsions.

Pour réaliser la corrélation 270/810, on utilise le même principe en mesurant la différence de fréquences dans le même cristal "tripleur" pour générer un faisceau à 405 nm . Le phénomène étant peu lumineux, la démarche est rendue délicate, et je décris dans la suite quelques précautions à prendre pour effectuer la corrélation.

Tout d'abord pour réaliser l'accord de phase du "tripleur", on effectue les actions suivantes :

1. On coupe la ligne à 270 nm .
2. On met un doubleur devant le "tripleur" pour générer des impulsions à 405 nm .
3. On augmente la génération de 270 nm en tournant le cristal "tripleur" pour réaliser l'accord de phase. Celui-ci sera le même que pour effectuer la différence de fréquence.

Une fois l'accord de phase accompli, on enlève le cristal doubleur et on remet la ligne à 270 nm . Avant d'effectuer la corrélation, il faut s'assurer que la longueur des lignes est équivalente, soit par une mesure directe, soit plus finement par l'emploi de photodiodes rapides et d'un oscilloscope à mémoire. Enfin, on retrouve la superposition temporelle entre les deux impulsions en observant l'apparition de la tache lumineuse à 405 nm grâce à une translation suffisamment lente du banc de translation (rotation de 200 Hz ou moins des moteurs).

Chapitre II

Déplétion de fluorescence en phase liquide

1 Introduction

1.1 La déplétion de fluorescence pour une distinction optique entre molécules biologiques et organiques

Principe de la déplétion

Durant la thèse de François Courvoisier [17], un mécanisme basé sur la déplétion de fluorescence a été proposé pour distinguer optiquement les chromophores biologiques des autres molécules organiques, comme par exemple le tryptophane du naphthalène. Ce mécanisme, schématisé figure II.1 et qualifié de “pompe-pompe”, consiste à exciter les molécules de tryptophane par une première impulsion à 270 nm, suivie d’une seconde impulsion à 800 nm [7]. La première impulsion excite les molécules dans le premier niveau excité $S_1(\nu')$, et après relaxation vibrationnelle dans le niveau $S_1(\nu = 0)$, une partie des molécules se désexcitent par fluorescence (centrée autour de 360 nm). La seconde impulsion excite les molécules depuis S_1 vers des niveaux supérieurs S_n [24]; à partir de S_n , les molécules peuvent soit se désexciter en passant par S_1 (état susceptible de fluorescer), soit s’ioniser ou se désexciter par une autre voie sans émission de fluorescence. La présence de cette deuxième voie de désexcitation est responsable de la diminution de fluorescence observée pour le tryptophane dilué dans l’eau. Le naphthalène, dilué dans du cyclohexane^a, ne présente pas de diminution de fluorescence après ajout de la seconde impulsion. La différence

^aLe naphthalène est très peu soluble dans l’eau.

entre les deux molécules proviendrait de l'ionisation plus basse du tryptophane par rapport aux hydrocarbures polycycliques aromatiques [7].

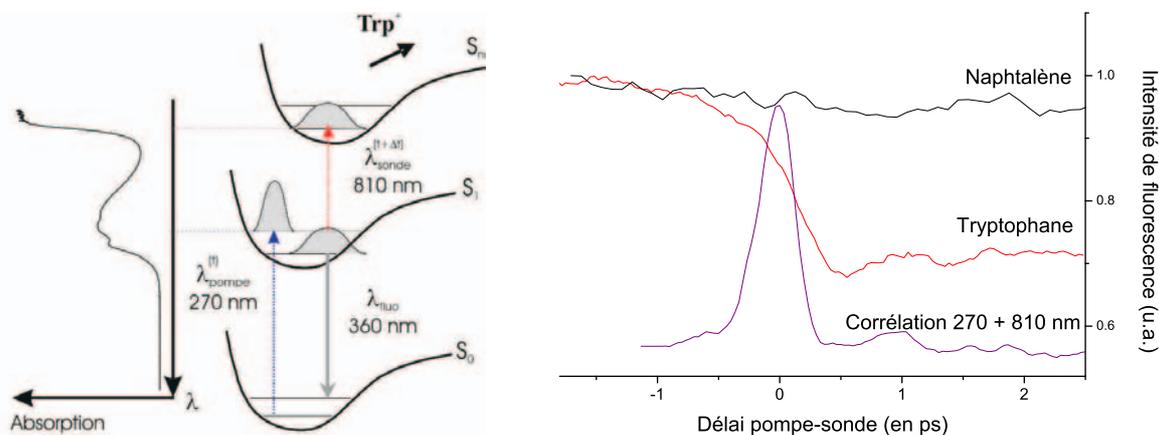


FIG. II.1 – Schéma d'excitation du tryptophane à l'aide de deux impulsions (à gauche) et évolution de la fluorescence en fonction du délai entre les deux impulsions (d'après Courvoisier et al. [7]). La seconde impulsion excite les molécules vers les états S_n supérieurs, états qui ne se désexcitent pas tous en passant par S_1 : d'où la diminution de fluorescence. La courbe noire correspond à la corrélation 270-810 et donne l'origine des temps. Le dispositif expérimental est similaire à celui de la figure II.6 page 20.

Iketaki et al. [25] ont aussi étudié la déplétion du tryptophane, à l'aide d'un laser picoseconde, dans le but de l'appliquer à la microscopie de super-résolution [26–30].

Déplétion de bactéries

Le tryptophane est principalement responsable des propriétés optiques des bactéries, qui contiennent en grande quantité cet acide aminé : il constitue par exemple 5% de la masse sèche de *Bacillus subtilis* [31]. La figure II.2 présente la déplétion de fluorescence dans les bactéries, comparée à celle du tryptophane et du gasoil^b. De façon surprenante, le tryptophane des bactéries, bien qu'ayant un environnement moléculaire très différent de la molécule en solution aqueuse, présente aussi une déplétion importante. Le gasoil, quant à lui, ne présente pas de diminution de fluorescence avec la seconde impulsion. Ces résultats ont permis de proposer un mécanisme de discrimination des particules biologiques par rapport aux autres particules organiques : bactéries contre aérosols produits par les moteurs diesels.

^bLe naphtalène est l'un des fluorophores du gasoil.

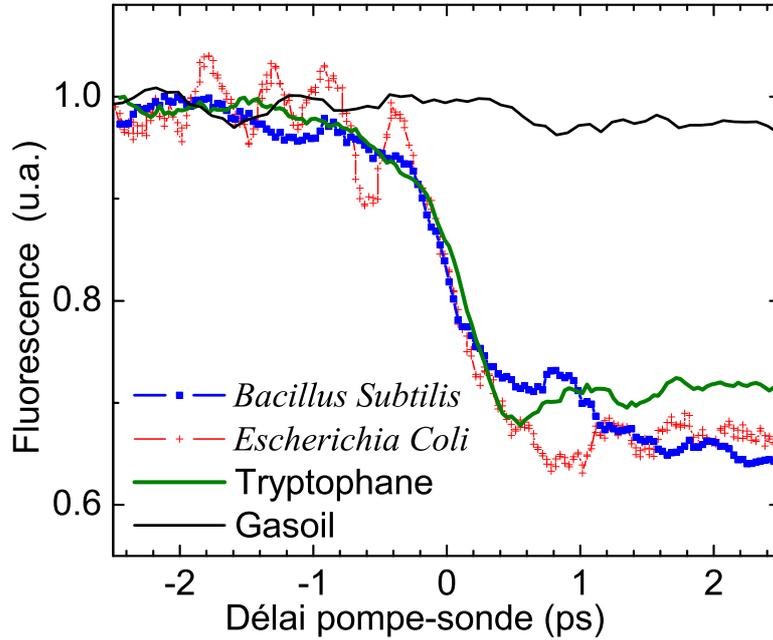


FIG. II.2 – **Déplétion de fluorescence : bactéries et tryptophane comparés au gasoil.** La déplétion de fluorescence des bactéries est semblable à celle de leur chromophore, bien que l'environnement moléculaire de celui-ci soit modifié par la présence d'autres acides aminés. Le gasoil ne présente pas de déplétion.

Caractérisation de la déplétion

La déplétion est quantifiée par le taux de déplétion δ défini par :

$$\delta = \frac{F_{non-depl} - F_{depl}}{F_{non-depl}} \quad (\text{II.1})$$

où $F_{non-depl}$ est la fluorescence obtenue lorsque seule l'impulsion excitatrice est présente, et où F_{depl} est la fluorescence après déplétion. Par définition, δ ne dépend pas de l'intensité de l'impulsion pompe ($F_{non-depl}$ et F_{depl} étant tous deux proportionnels à I_{pompe} à condition que l'on soit loin de la saturation), mais augmente avec l'intensité I_{IR} , jusqu'à atteindre plus de 35% pour des impulsions infrarouge de l'ordre de $4 \cdot 10^{11} W \cdot cm^{-2}$. Vérifier que la déplétion ne dépend pas de l'intensité du bleu, permet de s'assurer que la transition $S_0 \rightarrow S_1$ n'est pas saturée. En mesurant l'extinction de fluorescence pour plusieurs énergies de l'infrarouge et en analysant ces résultats à l'aide d'un modèle à trois niveaux, on montre que ces résultats sont compatibles avec une excitation à un photon infrarouge de S_1 vers S_n [17].

1.2 Déplétion des flavines

Le phénomène de déplétion de fluorescence a aussi été observé dans d'autres chromophores biologiques comme les flavines, mais avec une excitation à 405 nm, et toujours une seconde impulsion à 810 nm (figure II.3). La diminution de fluorescence atteint des taux de déplétion de 25%, plus faibles qu'avec le tryptophane. On montre que cette déplétion s'effectue principalement par absorption de deux photons infrarouges : l'effet est non-linéaire en fonction de l'intensité de la seconde impulsion [17]. Pour les flavines, on peut donc proposer le schéma d'excitation donné figure II.4. Enfin, la polarisation entre les deux impulsions, parallèles ou perpendiculaires, n'a pas d'effet sur la déplétion à la précision des mesures près, contrairement à ce qui a été mesuré dans une matrice solide (PMMA), pour la rhodamine-6G [32].

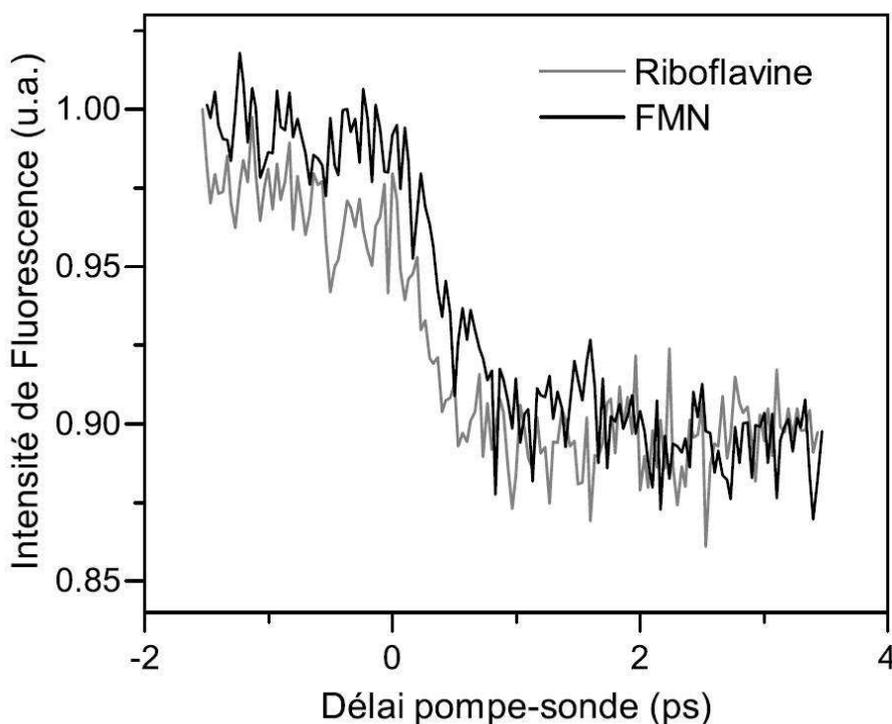


FIG. II.3 – *Déplétion de la flavine mononucléotide et de la riboflavine*. Les déplétions, pour ces deux molécules très proches, sont les mêmes (d'après [17]).

1.3 Contrôle cohérent de l'impulsion sonde

Les travaux théoriques pionniers de *H. Rabitz* [33, 34] ont montré la possibilité “d'apprendre aux lasers à contrôler les molécules”, à l'aide d'un processus en boucle fermée et d'un algorithme d'optimisation (souvent un algorithme génétique [35]). Depuis, de nombreuses réalisations

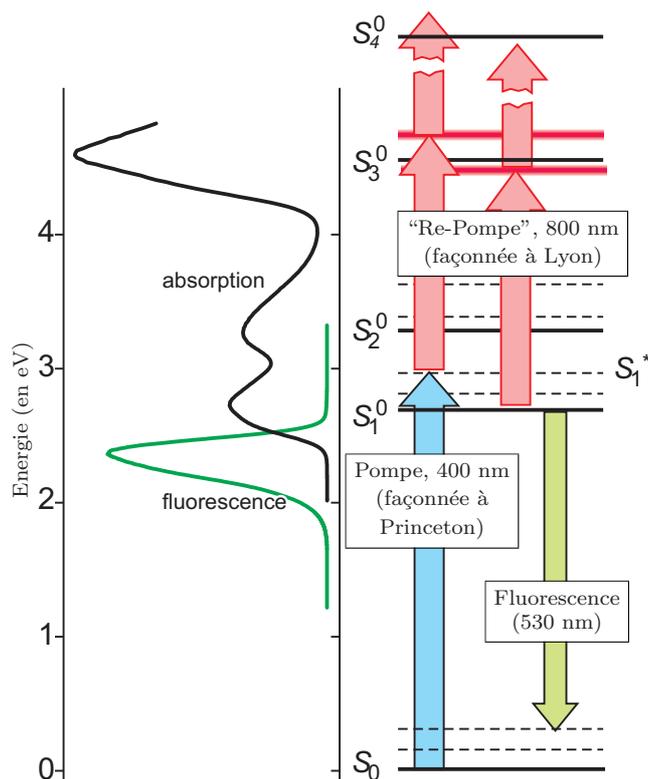


FIG. II.4 – **Schéma d'excitation pour les flavines.** Ce schéma est qualifié de “pompe-pompe”, dans la mesure où les deux impulsions excitent la molécule vers des états supérieurs.

expérimentales ont été effectuées [36] : contrôle de la forme du paquet d'onde dans les molécules [37], génération d'harmoniques élevées [38–40]. Elles s'appliquent à la fois en phase gazeuse pour la photodissociation sélective [41–44] ou l'ionisation multiphotonique [36, 43], en phase liquide pour le contrôle de la fluorescence [45], et enfin en phase solide avec l'optimisation d'effets non-linéaires (comme la somme de fréquence dans les cristaux).

Nous avons voulu utiliser ces principes pour augmenter le taux de déplétion en adaptant la forme de l'impulsion infrarouge, de façon à ce que celle-ci excite plus efficacement les molécules vers les états singulets supérieurs S_n , en s'adaptant à la forme du paysage énergétique de la molécule. Pour cela, un “façonneur d'impulsions” (“pulse shaper”) à cristaux liquides (voir chapitre I) a été inséré sur le trajet de l'infrarouge (voir figure II.5). Un algorithme génétique, programmé en Labview, relie la mesure de l'intensité de fluorescence à l'adressage de la tension des pixels de la matrice à cristaux liquides. Dans ces expériences, le critère d'optimisation était l'augmentation de la déplétion, ou plus exactement la minimisation de la fluorescence par la seconde impulsion dans le cas de la FMN. Pour le tryptophane, celle-ci était comparée au gasoil.

Je ne décrirai pas plus ces expériences de contrôle cohérent de l'impulsion infrarouge, dont le détail est à lire dans la thèse de *F. Courvoisier* [17], pour m'attacher à leurs conclusions.

fonctionner dans le régime de saturation : en pompant les cristaux des deux côtés, et avec plus d'énergie, on peut saturer le gain de l'amplificateur, qui devient alors moins sensible aux fluctuations du laser de pompe. Les effets non-linéaires, nécessaires pour générer les impulsions à 405 ou à 270 nm, amplifient les fluctuations d'intensité et donc de la fluorescence mesurée. D'autre part, le bas taux de répétition de notre laser (20 Hz) impose des optimisations qui durent plusieurs heures, pendant lesquelles les propriétés du laser sont soumises à des dérives lentes : le même masque imposé par le façonneur produira donc des impulsions différentes, rendant toute optimisation délicate.

Une chaîne amplifiée avec un meilleur taux de répétition (kHz), permettrait de s'affranchir de ce problème, d'autant plus que l'amplification des chaînes kHz s'effectue avec un laser $Nd : YAG$ pompé par des diodes, qui procure de surcroît une stabilité d'intensité bien meilleure. Enfin, il est probable que l'extinction de fluorescence dépende de la trajectoire du paquet d'ondes de façon plus importante dans le premier niveau excité S_1 , que dans les états excités supérieurs S_n . Façonner l'impulsion à 405 nm pour les flavines serait donc plus favorable [17].

1.4 Implication personnelle

Cette thématique importante de ma thèse s'effectue dans la continuité de celle de François Courvoisier. Lorsque je suis arrivé, le principe de déplétion pour la distinction entre aérosols biologiques et organiques avait été réalisé, ainsi que celui des flavines ; la variation de la déplétion en fonction de l'intensité de la seconde impulsion avait aussi été caractérisée. L'étape naturelle suivante, en lien avec les compétences de l'équipe, était l'application du contrôle cohérent à l'augmentation de la déplétion. J'ai participé à ces premières expériences avec François Courvoisier et Véronique Boutou (paragraphe 1.3). Afin de répondre aux difficultés présentées précédemment, j'ai activement participé à la collaboration avec le groupe d'Herschel Rabitz qui venait de développer un façonneur d'impulsions ultraviolettes, en effectuant trois séjours dans leur laboratoire, à Princeton (New Jersey, Etats-Unis). Là-bas, j'ai travaillé avec Matthias Roth au montage de l'expérience, et notamment à la réalisation de la ligne pompe-sonde.

Pour améliorer la compréhension du phénomène de déplétion, nous avons effectué des expériences avec différents solvants et pH, avec Christophe Bonnet et Véronique Boutou. Enfin, comme la déplétion augmente avec l'intensité de la seconde impulsion, nous avons effectué des expériences de déplétion dans les gouttes qui jouent le rôle de microlentilles (avec Benoît Thuillier, Christophe Bonnet et Véronique Boutou). Ces expériences sont d'ailleurs plus proches des applications, par exemple de la détection de gouttelettes de bactéries dans l'atmosphère (les aérosols d'eau contaminés par *Legionella* constituent le seul mode d'exposition des humains à la bactérie [3]).

2 Déplétion du tryptophane

2.1 Dispositif expérimental de type pompe-sonde

L'impulsion infrarouge amplifiée est doublée, puis triplée, avec des cristaux de BBO. Les impulsions sont ensuite séparées par des miroirs de haute réflectivité à 270 nm (HR270). La longueur de la voie à 810 nm est variable (ligne à délai) afin de décaler l'impulsion infrarouge par rapport à l'impulsion ultraviolette. Les photons à 405 nm sont quant à eux perdus à chaque réflexion sur les miroirs de haute réflectivité, et un filtre permet de diminuer encore leur énergie. Les deux impulsions sont ensuite recombinaées avant d'être alignées finement, puis focalisées (lentille UV de 50 cm de focale) : la cellule de tryptophane ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$) est positionnée au plus près du point focal, juste avant l'apparition de lumière blanche dans les parois de la cellule. La fluorescence émise est sélectionnée à l'aide d'un filtre interférentiel à $360 \pm 10 \text{ nm}$, et enregistrée à l'aide d'un photomultiplicateur (PM). Une boxcar (Stanford Research) acquiert le signal avec une porte temporelle nanoseconde (temps de réponse du circuit avec PM), puis convertit numériquement le signal. Un programme Labview permet ensuite de tracer la fluorescence en fonction du délai entre les deux impulsions ; la superposition temporelle, qui détermine le délai nul, est définie par une expérience d'autocorrélation. Ce délai doit être corrigé de la dispersion dans les optiques, notamment dans la première paroi de la cellule et dans la lentille de focalisation. Le décalage temporel entre les impulsions à 270 nm et 800 nm, dû à la dispersion de vitesse de groupe dans les optiques, est typiquement de 2 ps (voir annexe). Ce délai est important en raison de la valeur élevée de la dérivée de l'indice de réfraction par rapport à la longueur d'onde dans l'ultraviolet ; entre les impulsions à 800 nm et 400 nm, ce délai n'est que d'une centaine de femtoseconde.

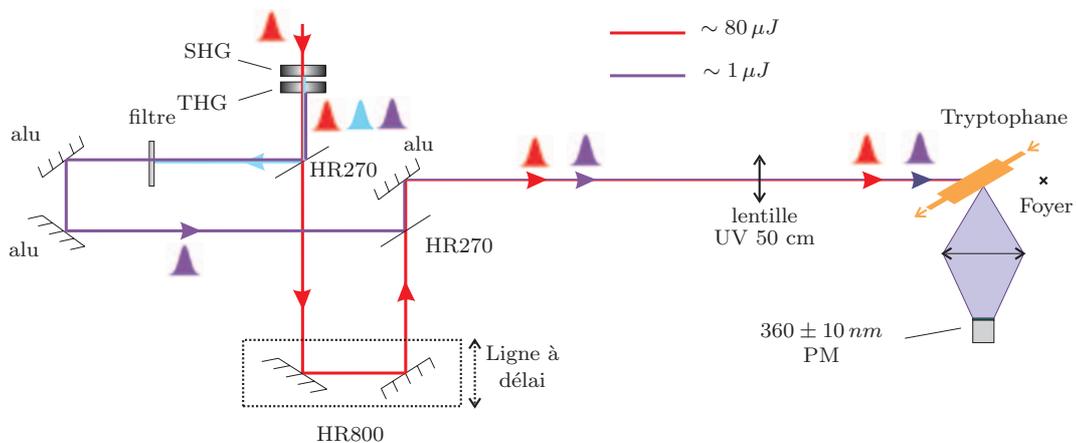


FIG. II.6 – *Déplétion du tryptophane : dispositif expérimental.*

2.2 Influence du solvant

Le solvant abaisse le potentiel d'ionisation des solutés, en fonction de sa nature et de celle du soluté^d. Ainsi, bien que l'ionisation soit supposée jouer un rôle important, le mécanisme expliquant la déplétion de fluorescence n'est pas encore bien compris [48]. L'étude en fonction du solvant doit permettre d'améliorer notre compréhension du phénomène.

Effet du pH

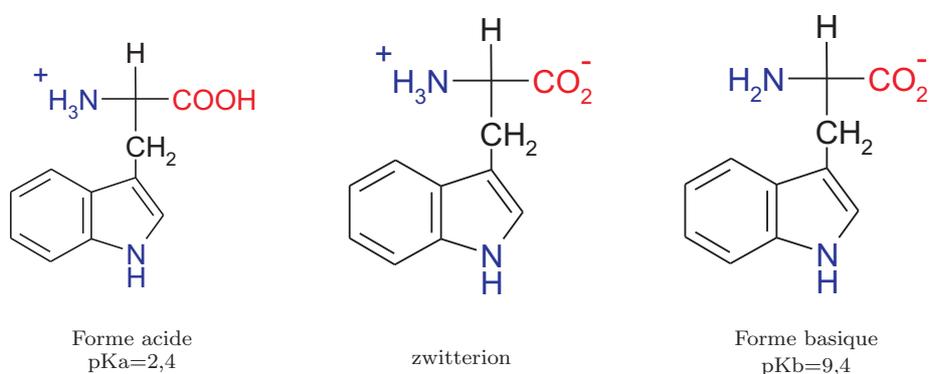


FIG. II.7 – *Différentes formes du tryptophane dans l'eau, en fonction du pH.*

Nous avons mesuré la déplétion à de nombreux pH, de 0.1 à 12, de façon à ce que les trois formes puissent être respectivement majoritaires dans les solutions^e : forme acide à pH 0.1, forme zwitterionique à pH 7, et forme basique à pH 12 (voir figure B.2). Les solutions ont été préparées en dissolvant $\sim 0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de tryptophane dans de l'eau distillée, mélangée soit avec de l'acide chlorhydrique, soit avec de la soude pour atteindre le pH désiré, contrôlé à l'aide d'un pH-mètre. La solution de pH 1 a quant à elle été obtenue après dilution de la solution à pH 0,1.

A pH=0.1, environ 99,5 % des molécules de tryptophane sont sous forme acide^f. Or, il est connu que les fortes concentrations d'acide font fortement diminuer ("quenchent") la fluorescence du premier état excité S_1 [49–51]. La protonation du cycle excité, suivie par un croisement rapide avec l'état triplet protoné, est responsable de cette diminution. A pH=0.1, ce processus est le principal canal de désexcitation de S_1 . Dans ces conditions, la durée de vie de S_1 est de plus diminuée à 1 ns , contre $3,2 \text{ ns}$ en solution neutre [50, 52]. Dans nos expériences, une très

^dLe moment dipolaire du solvant, son pouvoir dispersant par l'intermédiaire de sa constante diélectrique, tout comme le rayon du soluté, modifient le potentiel d'ionisation de ce dernier [46, 47].

^eA pH 1,4 par exemple, 90% du tryptophane est sous forme acide.

^f $pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$, où $[AH]$ et $[A^-]$ correspondent respectivement aux concentrations des formes acide et neutre d'une molécule A.

forte baisse de la fluorescence a été observée, et le gain du PM a dû être augmenté de deux ordres de grandeur. On peut en déduire que la fluorescence vient en grande partie des formes zwitterioniques du tryptophane, y compris à un si faible pH. D'ailleurs, la dilution (par ~ 10) effectuée pour passer de pH 0.1 à 1, bien que diminuant la concentration en tryptophane, a augmenté sa fluorescence. Cela pourrait donc expliquer le fait que la déplétion mesurée soit similaire pour différents pH (figure II.8). Il est cependant surprenant que le taux d'ionisation[§] du second état excité ne change pas avec le solvant, à moins d'imaginer que la protonation de S_n ne soit plus lente que son temps de vie.

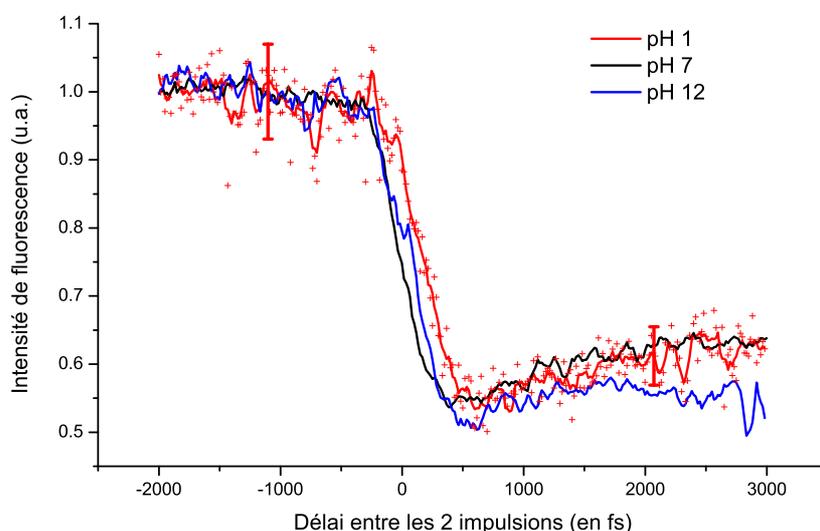


FIG. II.8 – **Effet du pH sur la déplétion.** Les données présentées ici sont lissées sur 5 points pour diminuer les fluctuations. Les croix rouges correspondent aux données à pH 1, et les barres d'erreur correspondent à une estimation de la dispersion de ces points. On ne voit pas de différence de déplétion en fonction du pH, à la précision des mesures près (seules 3 mesures sont présentées ici).

A pH=12, 99.7% des tryptophanes ont la forme basique ; à ce pH la fluorescence est du même ordre de grandeur qu'à pH 7, et la déplétion est similaire, à la précision des mesures près.

[§]Plus exactement, dans la thèse de François Courvoisier [17], la baisse de fluorescence est interprétée par une désexcitation des niveaux excités supérieur S_n via tout ce qui ne revient pas dans S_1 , ce qui inclut aussi bien l'ionisation qu'un transfert vers un état triplet ou toute désexcitation non radiative. Ce taux a été estimé à 70% grâce à l'ajustement des données "déplétion en fonction de l'intensité" par un modèle à 3 niveaux.

Dynamique de la déplétion

Les mesures prises ici ont été réalisées avec beaucoup de points (eux-mêmes moyennés par la boxcar), puis chaque mesure de déplétion a été effectuée 5 fois. Les courbes ont ensuite été lissées sur 5 points ; l'ensemble de ces opérations permet de s'affranchir au mieux des dérives d'intensité de notre laser. Cela a permis de voir une variation d'intensité sur une échelle de l'ordre de la picoseconde (figure II.9), compatible avec des temps de relaxation vibrationnelle. Des expériences récentes, appuyées par des simulations [53], ont montré des déplétions de fluorescence, avec une pompe à 800 nm qui stimule l'émission de fluorescence dans une direction perpendiculaire à la mesure, mais avec une excitation à 400 nm. Les molécules considérées dans cette expérience sont des colorants lasers dissous dans l'acétone. La dynamique de désexcitation vibrationnelle est du même ordre de grandeur temporel que celle mesurée ici. Refaire nos expériences à diverses températures (de 1°C à 80°C pour l'eau par exemple), serait intéressant ; on s'attend à ce que la relaxation soit plus rapide à haute température. *Sherin et al.* [50] proposent une dépendance de la relaxation vibrationnelle dans l'état S_1 en fonction de la température, qui permettrait d'analyser les futurs résultats. Plus pertinent encore, une étude de la dynamique mesurée en fonction de la longueur d'onde de fluorescence permettrait de trancher sur l'existence ou non d'un mécanisme de type relaxation vibrationnelle : une dynamique plus rapide pour les hautes longueurs d'onde (vers 380 nm) irait dans le sens de cette explication. Si on suivait cette hypothèse, on constaterait certainement que la déplétion de fluorescence serait plus importante lorsque la seconde impulsion excite les molécules qui sont dans un état vibrationnel excité ($\nu > 0$).

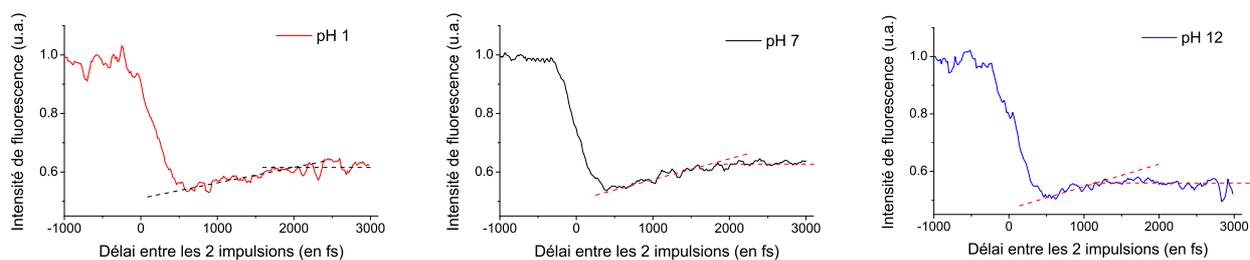


FIG. II.9 – *Mise en évidence de la dynamique dans les expériences de déplétion de fluorescence du tryptophane.* On observe une légère augmentation de fluorescence sur une échelle picoseconde. Ce temps paraît diminuer avec l'augmentation du pH, mais il manque quelques expériences complémentaires pour tirer une conclusion définitive. Des expériences effectuées très récemment ont montré le même comportement en fonction du pH.

Influence de la nature du solvant

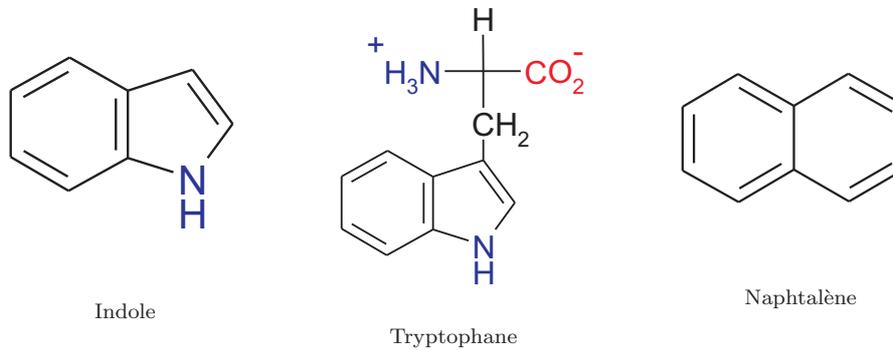


FIG. II.10 – **Indole, tryptophane et naphtalène**. L'indole est le chromophore du tryptophane (c'est-à-dire la partie de la molécule qui fluoresce).

Nous avons mesuré la fluorescence du tryptophane, de l'indole (chromophore du tryptophane), et du naphtalène dans divers solvants : eau, éthanol, propanol (pour le tryptophane seulement). Le cas du cyclohexane (pour le naphtalène seulement), solvant organique, avait été étudié dans la thèse de F. Courvoisier [17]. Entre deux mesures, nous avons pris soin de bien rincer, d'abord avec le solvant précédent, puis avec le solvant à venir, avant de vérifier qu'avec le nouveau solvant seul, il n'y avait plus de fluorescence. C'est ainsi que nous avons utilisé de l'éthanol pur, car l'alcool dénaturé fluoresce et présente même une déplétion ! Le naphtalène étant extrêmement peu soluble dans l'eau, le rinçage n'avait pas été suffisant (la fluorescence du naphtalène est alors trop faible pour tirer des conclusions) ; de récentes expériences ont invalidé les premiers résultats qui montraient une déplétion identique du naphtalène dans l'eau par rapport au tryptophane.

Une déplétion a été observée pour tous les solvants testés avec le tryptophane et l'indole. Par contre, une déplétion de la fluorescence du naphtalène a été mesurée dans l'acétonitrile (bon solvant organique polaire), mais pas dans l'éthanol ni dans le cyclohexane (figure II.11).

2.3 Discussion

Steen *et al.* [54, 55] ont montré, à l'aide d'une excitation à un photon dans les niveaux S_1 ou S_2 de l'indole, du tryptophane et du phénol dans l'eau, que la fluorescence diminue avec la longueur d'onde, de façon parallèle à une augmentation de l'ionisation. Ainsi, en notant φ_f et φ_{e^-} les taux de fluorescence et d'ionisation, ils constatent que $\frac{\varphi_f(260nm)}{\varphi_f(230nm)} = 1,46$, tandis que $\varphi_{e^-}(260) = 0,01$ et $\varphi_{e^-}(230) = 0,10$ pour le tryptophane dans l'eau [54]. Ils concluent ainsi que la photoionisation depuis les états excités supérieurs (S_n) est en compétition avec la relaxation

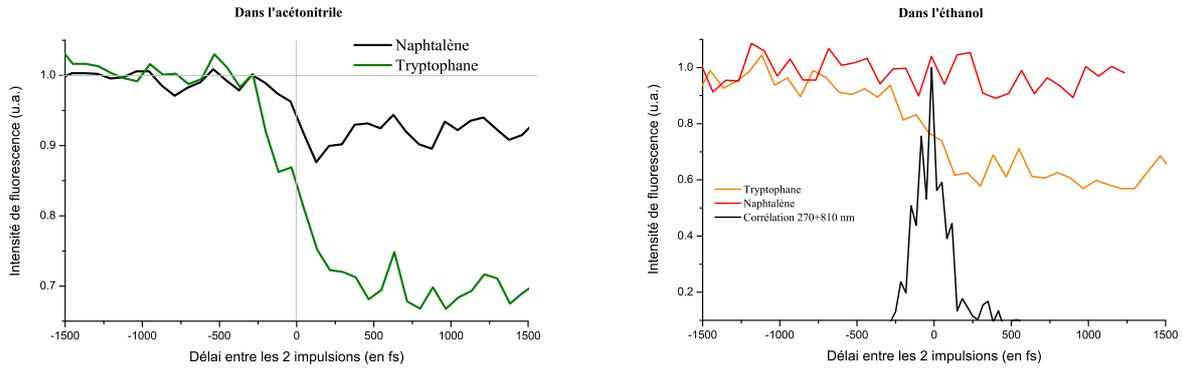


FIG. II.11 – *Déplétion du tryptophane et du naphthalène dans l'acétonitrile et l'éthanol. Le naphthalène présente une déplétion seulement dans l'acétonitrile.*

vers le plus bas niveau excité (S_1) qui fluoresce. On peut alors donner une interprétation de la présence ou non de déplétion, grâce au potentiel d'ionisation, que l'on compare avec l'énergie apportée par les photons des deux couleurs, 6 eV (voir tableau II.1). On constate que le potentiel d'ionisation est atteint pour l'indole et le tryptophane, à la fois dans l'eau et l'éthanol.

λ	Energie
810	1.5 eV
405	3 eV
270	4.5 eV
270 + 800 (~ 200 nm)	6 eV

Soluté (solvant)	Potentiel d'ionisation
Naphtalène (gaz)	8,13 eV [56]
Indole (gaz)	7,9 eV [47]
Tryptophane (gaz)	7,8 eV [46]
Tryptophane (éthanol)	4,9 eV [52]
Indole (éthanol)	4,85 eV [47]
Tryptophane (eau)	4,5 eV [46, 52]
Indole (eau)	4,35 eV [47]

TAB. II.1 – *Energie des photons en parallèle avec le potentiel d'ionisation.*

Pour le naphthalène, et de façon générale pour les solutés aromatiques, le potentiel d'ionisation en phase liquide, IP_{liq} , n'est pas connu [46]. On peut seulement l'évaluer à partir de son potentiel en phase gazeuse, IP_{gaz} , par la formule

$$IP_{liq} = IP_{gaz} + P_+ + V_0 \quad (\text{II.2})$$

où P_+ est l'énergie de solvatation du cation créé, et V_0 l'énergie de la bande de conduction du solvant (toutes deux négatives). V_0 devient plus négative quand la polarité augmente [57], et P_+ devient plus négative quand le rayon effectif du cation r_+ diminue, et que le pouvoir dispersant

du solvant augmente (i.e. que sa constante diélectrique ϵ_r augmente). Le potentiel d'ionisation est donc moins abaissé par le cyclohexane que par l'éthanol ou l'eau, ce qui expliquerait l'absence de déplétion du naphthalène dans le cyclohexane. On remarque aussi que l'eau abaisse plus que l'éthanol le potentiel d'ionisation du tryptophane et de l'indole, en raison de son plus grand pouvoir dispersant (tableau II.2). Pour le naphthalène, on s'attend alors à ce que le potentiel d'ionisation soit supérieur dans l'éthanol par rapport à dans l'eau, ce qui expliquerait l'absence de déplétion dans le premier cas et sa présence dans le deuxième cas.

Solvant	Moment dipolaire p (en Debye)	Permittivité relative statique ϵ_r
Eau	1,85	80
Méthanol	1,7	32,6
Ethanol	1,7	24,3
Cyclohexane	0	2,015 [58]
Benzène	0	2,3
Ether	1,15	4,4
Acétone	2,9	20,7
Acétonitrile	3,44	37

TAB. II.2 – **Propriétés électriques des solvants.** La permittivité relative du solvant est responsable de son pouvoir dispersant : les forces électrostatiques étant d'autant plus faibles dans le solvant que cette constante est grande.

On peut aussi estimer l'énergie d'ionisation du cation à l'aide de la formule de Born

$$P_+ = \frac{-e^2}{8\pi\epsilon_0 r_+} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right)$$

mais cette formule est utilisée soit avec ϵ_r , permittivité relative statique [56], soit avec $\epsilon_{opt} = n^2$, permittivité relative optique [46, 47], mais en adaptant le rayon effectif r_+ pour rester compatible ! Afin de réaliser les estimations de I_{liq} , j'ai choisi la formule avec ϵ_r , car cette quantité est responsable du pouvoir dispersant du solvant. Avec $r_+ = 3 \text{ \AA}$ pour le rayon du naphthalène ionisé [56] qui donne $P_+ = -1,21$, et avec $V_0 = -0,17$ pour le cyclohexane [59], il vient $IP_{liq} = 6,75 \text{ eV}$ pour le naphthalène dans le cyclohexane, ce qui est inférieur à l'énergie des deux photons : le naphthalène n'est pas ionisé, sa fluorescence ne diminue pas avec la seconde impulsion. Ce calcul donne la même conclusion que précédemment et montre bien le rôle que joue le faible pouvoir dispersant du solvant dans l'absence de déplétion.

Le cas du naphthalène dans l'eau et l'éthanol est plus délicat. Si l'on calcule IP_{liq} de la même façon, on trouve respectivement 4,46 eV (eau) et 4,83 eV, en prenant $V_0(eau) = -1,3 eV$, $V_0(éthanol) = -0,65 eV$ [47], et le même rayon pour le naphthalène. Comme précédemment, l'eau abaisse davantage le potentiel d'ionisation que l'éthanol, mais ces calculs indiquent que le naphthalène devrait aussi présenter une déplétion avec l'éthanol. Cependant, l'ion naphthalène, tout comme la molécule, ont un moment dipolaire nul, leurs électrons étant délocalisés. On peut donc supposer que son rayon effectif ne sera pas le même dans un solvant polaire (comme l'eau ou l'éthanol) que dans un solvant apolaire (cyclohexane). On pourrait donc conclure que la présence ou l'absence de déplétion dépend du potentiel d'ionisation, ce potentiel restant à définir dans le cas du naphthalène dans l'eau (que l'on peut donc supposer inférieur à 6 eV) et dans l'éthanol (supérieur à 6 eV).

Enfin, *Amouyal et al.* [52] relatent une augmentation de l'ionisation avec l'énergie du photon pour l'indole et le tryptophane, à la fois dans l'eau et dans l'éthanol (figure II.12). Ces résultats concordent avec nos expériences de déplétion.

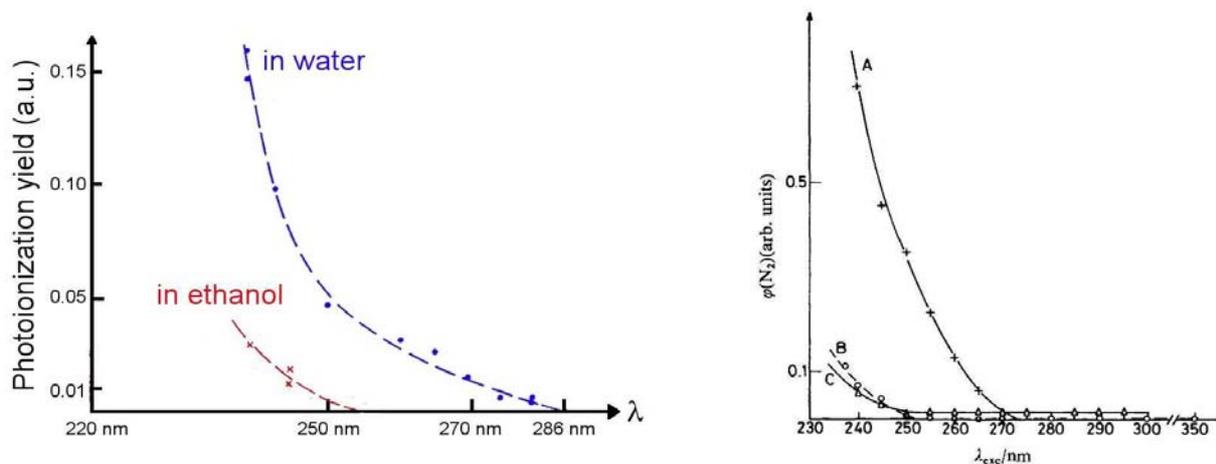


FIG. II.12 – *Taux d'ionisation de l'indole (à gauche) et du tryptophane en fonction de l'énergie du photon, pour divers solvants. D'après [52]. Pour le tryptophane, φ_{N_2} est une mesure de φ_{e^-} .*

Pour présenter un schéma détaillé de mécanisme, il manque cependant des expériences complémentaires. Je propose notamment de refaire les expériences de déplétion avec l'indole dans le cyclohexane, mais aussi avec les différents chromophores dans le benzène, l'éther et l'acétone, afin d'identifier les rôles du pouvoir dissociant et/ou de la polarité du solvant.

Il a également été observé que la différence de fluorescence entre une excitation à 220 et à 270 nm est d'autant plus grande que la température est élevée [55] : il serait intéressant d'étudier l'effet de la température sur la déplétion. On s'attend à ce qu'une solution d'indole dans l'eau

fluoresce moins à température plus élevée [60, 61]; l'effet de ce "quenching" sur la déplétion est encore inconnu.

Enfin, une interrogation subsiste : pourquoi, bien que le taux d'ionisation diffère fortement en fonction des chromophores et du solvant, la déplétion ne varie-t-elle pas (ou peu) ? Par exemple, la déplétion du tryptophane et celle du naphthalène sont les mêmes dans l'eau avec des configurations expérimentales identiques (figure II.11).

2.4 Influence du solvant : errata

Des expériences très récentes (courbe de gauche de la figure II.11) ont invalidé la déplétion du naphthalène dans l'eau : le signal de fluorescence est si faible (du fait de la solubilité très petite) que l'on ne peut pas tirer de conclusion. Par contre, nous avons mesuré une déplétion du naphthalène dans l'acétonitrile, déplétion plus faible que pour le tryptophane dans les mêmes conditions expérimentales. On peut s'attendre à ce que l'acétonitrile, solvant très polaire, abaisse plus le potentiel d'ionisation que l'éthanol. Pour analyser les résultats en évaluant le potentiel d'ionisation, il est courant d'utiliser, pour les solvants polaires, la formule suivante^h :

$$IP_{liq} = E_{ox} + C + V_0$$

où E_{ox} est le potentiel d'oxydation (par rapport à une électrode de référence) du composé en solution et C est le potentiel de l'électrode de référence. Pour l'électrode de calomel saturée (SCE), on a $C=4.67$ V.

3 Contrôle cohérent de la déplétion de fluorescence

3.1 Distinction optique de deux molécules quasi-identiques

Le but fixé par cette expérience est extrêmement ambitieux : distinguer optiquement deux molécules très proches optiquement. Nous avons choisi la flavine mononucléotide (FMN) et la riboflavine (RbF) car ces deux flavines ont une structure extrêmement similaire (figure B.4). Les spectres d'absorption et de fluorescence de ces deux molécules sont identiques, aux incertitudes de mesures près (figure II.14), car les propriétés optiques de ces molécules sont dues à leur cycle aromatique. La différence structurelle provient du groupement phosphate HPO_3 , présent uniquement sur la FMN. Le but visé par cette expérience est de jouer sur les propriétés optiques fines - décalages de niveaux, modification de la forme de potentiels de liaison,... - induites par ce groupement, pour exciter les deux molécules de manière différente.

^hD'après une discussion privée avec Eric Vauthey.

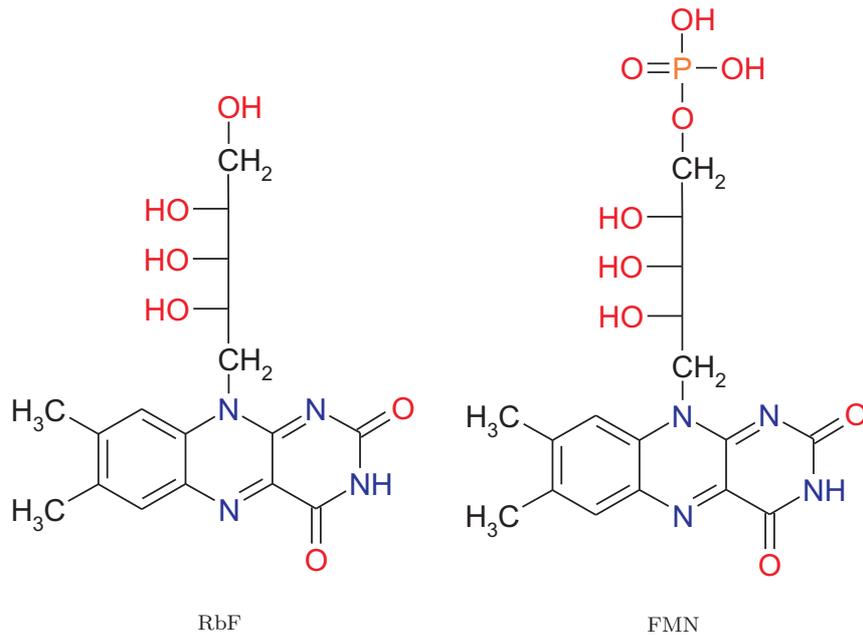


FIG. II.13 – **Représentation de Fisher de FMN et RbF**. Seul le groupe phosphate différencie les molécules.

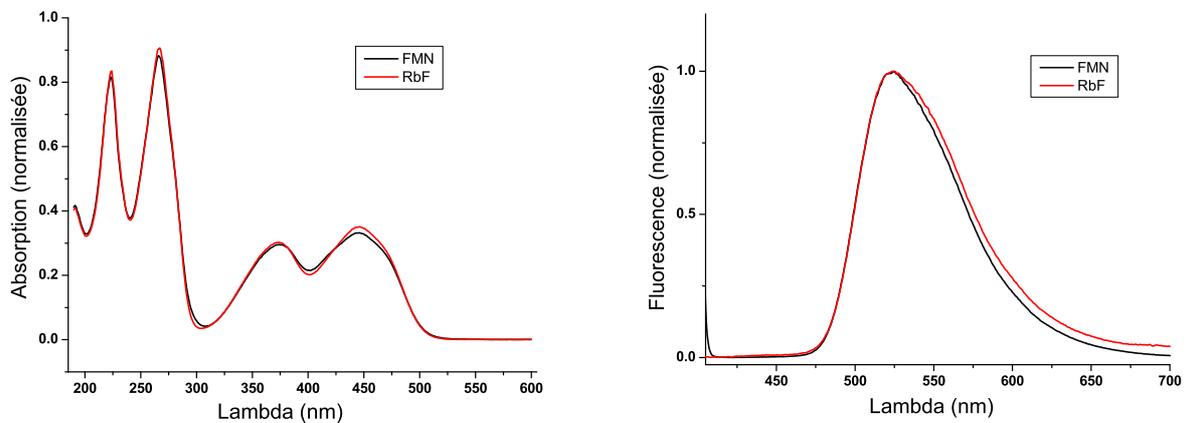


FIG. II.14 – **Absorption et émission de fluorescence**. FMN : Flavine mononucléotide, RbF : Riboflavine.

3.2 Dispositif expérimental

L'expérience, réalisée au laboratoire de chimie de Princeton dans l'équipe du Professeur H. Rabitz, est décrite par le schéma II.15. Cette collaboration a notamment permis d'utiliser le façonneur d'impulsion UV monté dans ce laboratoire. Le laser utilisé là-bas a de plus bénéficié de gros efforts pour améliorer sa stabilité [62].

Le laser a un taux de répétition de 1 kHz et délivre pour cette expérience une énergie par

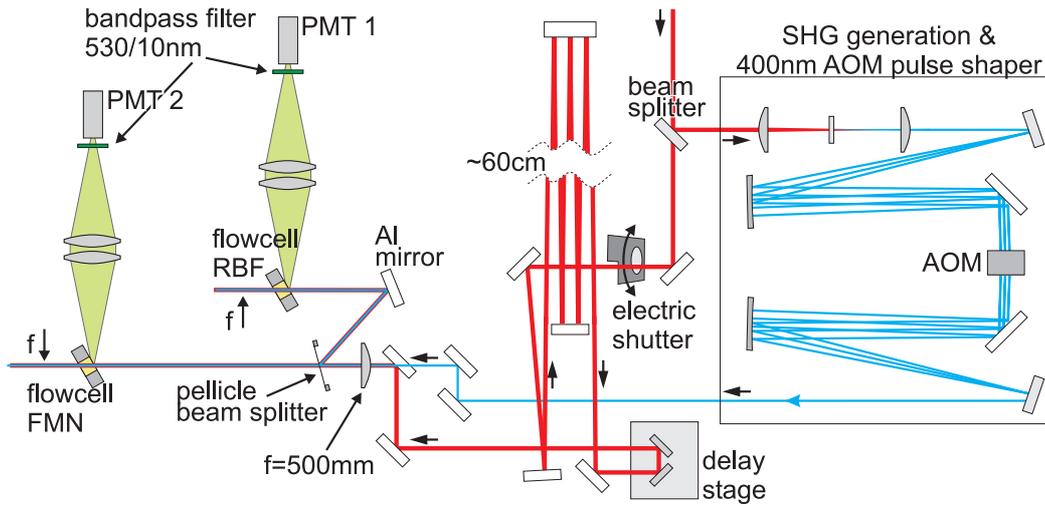


FIG. II.15 – **Discrimination optique des flavines : dispositif expérimental.** Le trajet de l'infrarouge est artificiellement allongé pour compenser le trajet du bleu dans le façonneur.

impulsion de $600 \mu\text{J}$, centrée à 797 nm . Cette impulsion est limitée par transformée de Fourier (TF) : largeur temporelle de 100 fs , bande passante de 10 nm . Une fraction de l'énergie, $160 \mu\text{J}$, est doublée par un cristal de BBO de type I ($300 \mu\text{m}$ d'épaisseur) à 400 nm , puis façonnée. Le façonneur impose une phase contrôlée, $\phi(\omega)$, aux différentes composantes spectrales de l'impulsion, à l'aide d'une onde radio-fréquence (voir chapitre I). En sortie, on obtient $6 \mu\text{J}$ d'impulsion bleue centrée à $399,5 \text{ nm}$ avec une bande passante de $3,5 \text{ nm}$ de largeur à mi-hauteur. La voie infrarouge suit un chemin différent, suffisamment long pour compenser le trajet effectué par le trajet bleu dans le façonneur ; le délai entre les impulsions est ensuite contrôlé à l'aide d'une ligne à retard. Les deux impulsions sont alors recombinaées et soigneusement alignées, avant d'être focalisées vers les cellules de flavines dissoutes dans l'eau distillée ($\sim 0,1 \text{ g.L}^{-1}$), grâce à une lentille de 50 cm de focale. Un "beamsplitter" très fin ($2 \mu\text{m}$, Thorlabs, BP145B1) - finesse qui permet de négliger la dispersion dans le matériau - est placé juste après la lentille et éclaire de façon équivalente les deux cellules. Les cellules sont placées au plus près du point focal de la lentille de façon à éviter la création de continuum dans les fenêtres par les impulsions infrarouges. On recueille la fluorescence filtrée à $530 \pm 10 \text{ nm}$ dans un tube photomultiplicateur (PM), à l'aide de deux lentilles collimatrices de 10 cm de focale. Afin de réduire la sensibilité à la stabilité de pointé entre les deux impulsions, l'impulsion rouge est agrandie à l'aide d'un télescope. Le tableau II.3 récapitule l'énergie et le diamètre de chaque impulsion au niveau de la cellule.

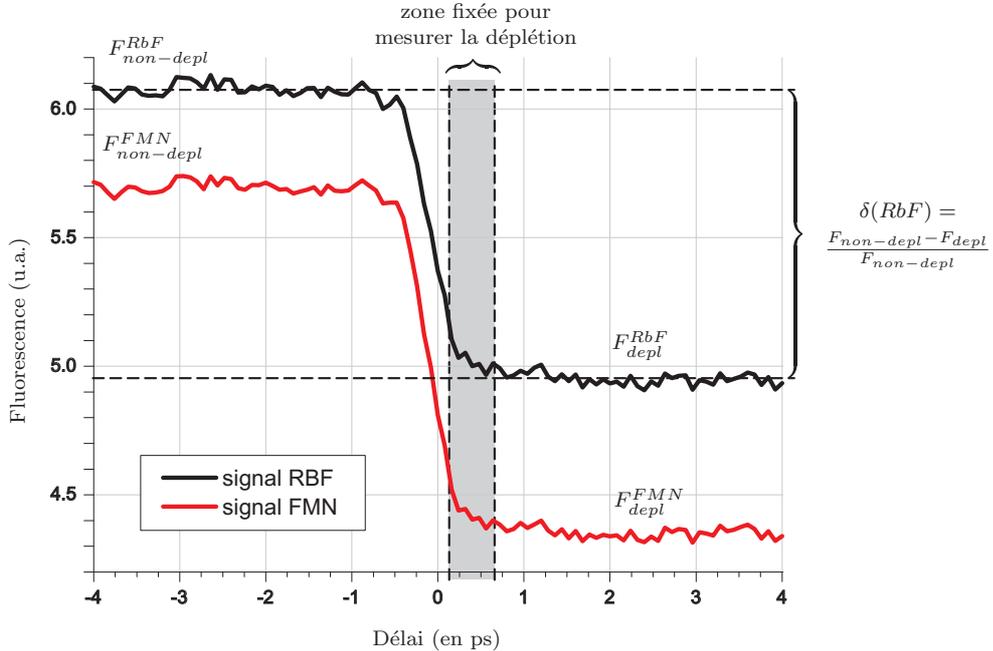
Des courbes de déplétion, mesurées simultanément pour la FMN et la RbF, sont obtenues avec ce dispositif et présentées figure II.16. On caractérise toujours la déplétion selon la formule

$$\delta = \frac{F_{\text{non-depl}} - F_{\text{depl}}}{F_{\text{non-depl}}}, \text{ que l'on cherche à optimiser pour l'une des flavines aux dépens de l'autre}$$

	Energie	Diamètre
Bleu (400 nm)	$3 \mu J$	$50 \mu m$
IR (800 nm)	$210 \mu J$	$330 \mu m$

TAB. II.3 – *Caractéristiques des impulsions au niveau de la cellule.*

(i.e. augmenter le rapport $\mathcal{R} = \frac{\delta(FMN)}{\delta(RbF)}$). Pour cela, enregistrer une courbe de déplétion à chaque forme d'impulsion testée impliquerait de trop longues acquisitions. Nous avons donc ajouté un obturateur électro-mécanique sur la ligne infrarouge afin d'enregistrer deux signaux : avec l'infrarouge (signal "déplété"), et sans l'infrarouge ("non-déplété"). Cette technique néglige la (faible) fluorescence à deux photons due à l'infrarouge seul, qui reste constante au cours de l'optimisation. Une courbe de déplétion complète est néanmoins enregistrée à la fin de chaque optimisation. Avant l'expérience, il faut aussi définir un délai entre les deux impulsions. Celui-ci doit être supérieur à 0 pour avoir effectivement une déplétion, et inférieur à la picoseconde : en effet, seules les optimisations respectant ce critère ont fonctionné. Les meilleures optimisations ont été réalisées avec un délai fixé entre 100 et 600 fs (figure II.16).

FIG. II.16 – *Choix du délai initial.*

Optimiser le rapport $\mathcal{R} = \frac{\delta(FMN)}{\delta(RbF)}$ permet au système de décaler temporellement l'impulsion bleue de telle sorte qu'elle arrive après l'impulsion rouge : la déplétion de chacune des solutions devient alors très faible (jusqu'à s'annuler), et la moindre fluctuation peut rendre \mathcal{R} très

grand. Pour éviter ce biais, nous rajoutons un paramètre b , fixé à $b = 0,05$ dans les expériences présentées, qui empêche l'algorithme d'aller vers une diminution trop forte de la déplétion : $\mathcal{F} = \frac{\delta(FMN)}{\delta(RbF)} + b.\delta(RbF)$. Le système d'optimisation fonctionne en boucle fermée, à l'aide d'un algorithme génétique [35]. Pour commencer, l'algorithme génétique prépare, via le façonneur, une série d'impulsions (la population), et pour chacune, on enregistre la quantité \mathcal{F} . Ensuite, l'algorithme utilise les meilleures impulsions (i.e. \mathcal{F} le plus grand) pour créer la génération suivante, et ainsi de suite.

3.3 Optimisation de la déplétion

Les premières générations effectuées ne présentaient aucune optimisation. Il a donc fallu, d'une part augmenter au mieux la déplétion en alignant parfaitement les impulsions, et d'autre part diminuer fortement les fluctuations du laser. Une photodiode à deux photons reliée à un programme adapté permet de mesurer en temps réel la stabilité du laser : lorsque ce signal n'est pas assez stable, l'algorithme ne converge pas. Contrôler l'intensité à deux photons présente un double avantage : c'est un effet non-linéaire, donc plus sensible aux fluctuations d'intensité, et qui dépend aussi des fluctuations de phase des différentes composantes spectrales. En effet, ces déphasages produiront un élargissement temporel de l'impulsion et donc une baisse du signal à deux photons. Que la phase de l'impulsion initiale soit stable est crucial pour ensuite pouvoir la modifier avec le façonneur. L'algorithme d'optimisation d'une flavine par rapport à l'autre converge d'autant plus vite que le signal sur bruit (SNR^i) à deux photons du laser est grand (typiquement $SNR \sim 100 - 250$ pour le signal à deux photons [62] est nécessaire) ; avec $SNR \sim 30$, ça ne fonctionne pas !

La figure II.17 présente une optimisation, qui dure typiquement deux heures, de la déplétion de FMN par rapport à RbF, et décrit la fonction \mathcal{F} pour le meilleur, et pour le moins bon individu de la population de chaque génération. Une moyenne de \mathcal{R} sur tous les individus de la population est aussi présentée sur le même graphique. On constate que l'optimisation a été réalisée au bout d'une cinquantaine de générations pour atteindre $\mathcal{F} = 1,7$; cette valeur élevée de \mathcal{F} est conservée par le meilleur individu jusqu'à la fin de l'expérience.

Afin de vérifier que l'optimisation obtenue n'est pas due à une dérive du laser, il est important de comparer le résultat du meilleur individu à celui obtenu par une impulsion limitée par transformée de Fourier (i.e. $\phi(\omega) = 0$). La figure II.18-(a) présente ainsi deux optimisations, l'une pour maximiser la déplétion de FMN par rapport à la riboflavine, et l'autre pour la minimiser (ou, pour des raisons pratiques, maximiser la fonction "inverse" $\mathcal{F}^* = \frac{\delta(RbF)}{\delta(FMN)} + b.\delta(FMN)$).

ⁱSNR pour Signal to Noise Ratio en anglais. Il est calculé ici sur 150 s.

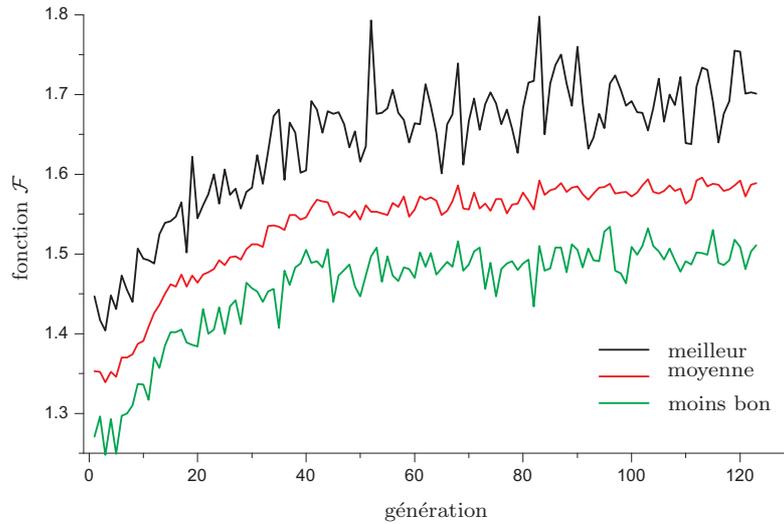


FIG. II.17 – *Signature d'une optimisation : augmentation puis stagnation de \mathcal{F} .*

Lorsqu'on décide d'arrêter l'optimisation, c'est-à-dire lorsque \mathcal{F} n'évolue plus, on enregistre un histogramme pour la meilleure impulsion et pour l'impulsion limitée par transformée de Fourier (TF). Pour construire cet histogramme, on effectue 100 mesures de $\mathcal{R} = \frac{\delta(FMN)}{\delta(RbF)}$ avec l'impulsion optimisée, chaque mesure étant moyennée sur 1000 impulsions, à 1 kHz (figure II.18-(b)). La largeur des courbes obtenues montre une dispersion des données autour de leur valeur moyenne. Celle-ci est suffisamment faible pour que les courbes obtenues lors des deux optimisations soient bien séparées. Nous avons ainsi réussi à distinguer optiquement deux molécules dont les spectres linéaires d'absorption et d'émission sont identiques, à l'aide d'un dispositif à deux impulsions.

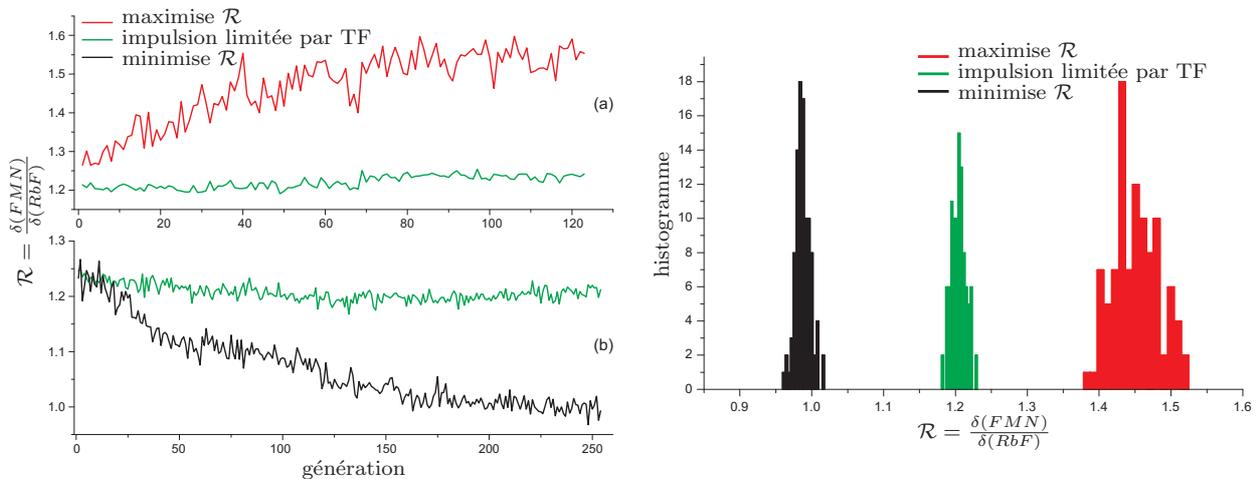


FIG. II.18 – *Optimisations et histogrammes associés.* En notant $\Delta\mathcal{R}$ la largeur à mi-hauteur des données, la dispersion relative est $\frac{\Delta\mathcal{R}}{\mathcal{R}} \sim 0,4$ pour les 2 courbes optimisées, légèrement moins pour l'impulsion limitée par transformée de Fourier (TF), qui semble être moins sensible au bruit.

Un autre succès provient du fait que, trois mois après avoir réalisé une optimisation, la meilleure phase imposée par le façonneur permet toujours de distinguer optiquement les deux solutions, bien que l'histogramme reconstruit soit moins significatif que celui présenté figure II.18. Cela permet de comparer les phases imposées par le façonneur pour un grand nombre d'expériences, réalisées sur plusieurs semaines. La figure II.19 présente les phases imposées par le façonneur lors de quatre optimisations de la déplétion de FMN par rapport à RbF, et de quatre optimisations inverses.

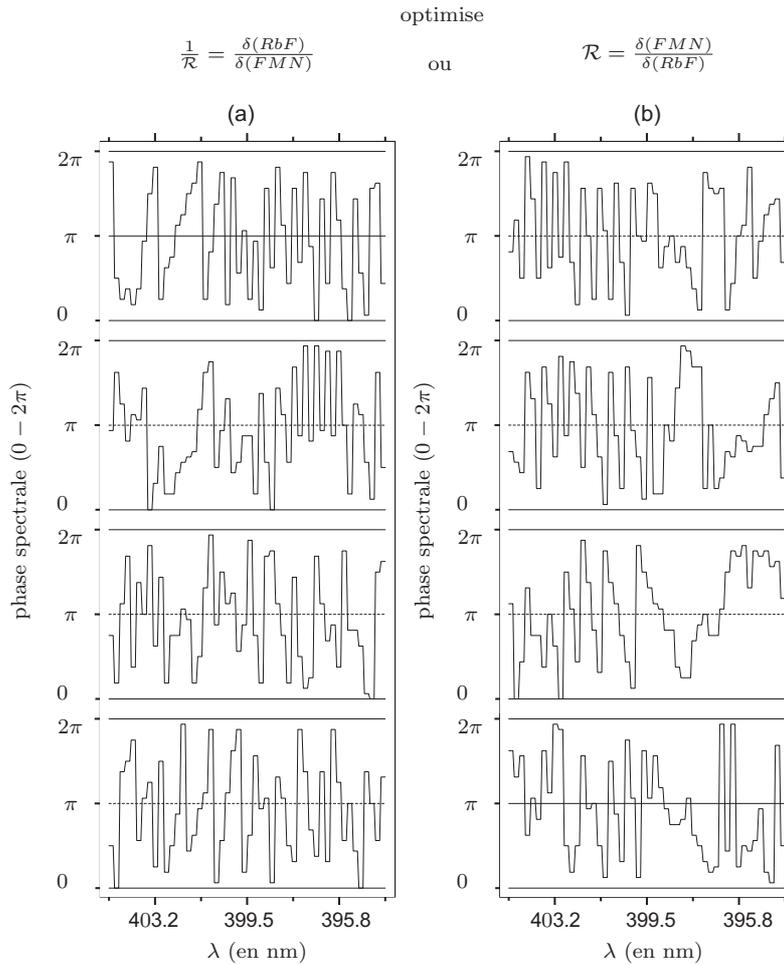


FIG. II.19 – Phase $\phi(\omega)$ imposée par le façonneur pour obtenir les meilleures optimisations lors de 8 expériences.

3.4 Interprétation des résultats

La figure II.20 montre que la déplétion n'est ni améliorée, ni diminuée par l'optimisation, avec $\delta \sim 17\%$ pour la RbF dans les deux cas. Par contre, on constate une décroissance plus lente de la fluorescence pour l'impulsion optimisée, avec une décroissance en 2 picosecondes, contre 200

femtosecondes pour l'impulsion limitée par transformée de Fourier. Les 200 fs de décroissance correspondent à la convolution entre les impulsions à 400 et à 800 nm, qui sont les plus courtes accessibles avec notre bande passante; l'allongement de la décroissance est simplement dû à un allongement de l'impulsion façonnée, du fait du déphasage introduit entre ses différentes composantes spectrales.

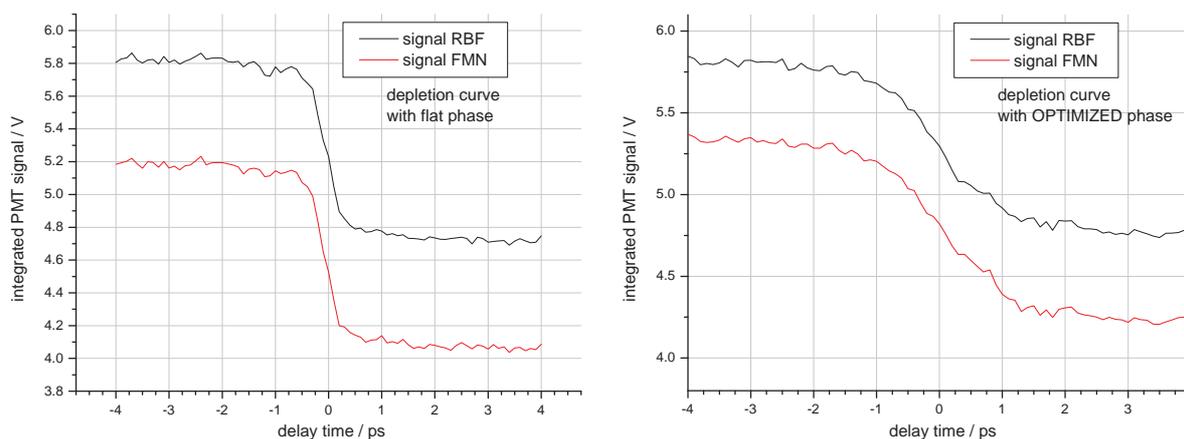


FIG. II.20 – *Courbes de déplétion avant et après optimisation.* On constate l'allongement de la déplétion dans le cas optimisé.

Interpréter les impulsions obtenues par contrôle cohérent dans les grosses molécules est en général compliqué, les calculs à faire étant actuellement hors de portée des plus gros simulateurs. Judson et Rabitz [33] ont d'ailleurs proposé que ce type d'expériences de contrôle cohérent viennent en remplacement des ordinateurs, le laser "résolvant l'équation de Schrödinger" en trouvant la meilleure voie d'excitation des molécules - ici d'excitation dans le niveau S_4 pour une flavine aux dépens d'une autre. Afin de mieux comprendre le rôle de l'impulsion optimisée, on peut représenter la forme de l'impulsion en traçant ses composantes spectrales en fonction de leur temps d'arrivée (figure II.21), grâce à une transformée de Fourier aux temps courts¹. Ces spectrogrammes sont construits à partir de la phase imposée par le façonneur; il a été vérifié que le résultat est compatible avec une mesure "frog".

Chaque expérience réalisée optimise la déplétion de la FMN (ou de la RbF) à l'aide de trains d'impulsions, tous différents (figure II.22). Cela n'est pas surprenant dans la mesure où, pour de telles molécules, le paysage énergétique est très complexe, avec de nombreux minima locaux : à chaque optimisation, l'algorithme suit des chemins particuliers dans ce paysage, et arrive à des solutions multiples pour un problème de contrôle cohérent donné [63]. Une tendance générale se dessine cependant, qui est mise en valeur sur la figure II.22 à l'aide de deux droites (toujours

¹Il s'agit d'une transformée de Fourier avec une porte temporelle assez courte, ici une gaussienne de 70 fs qui correspond à la largeur temporelle de l'impulsion bleue.

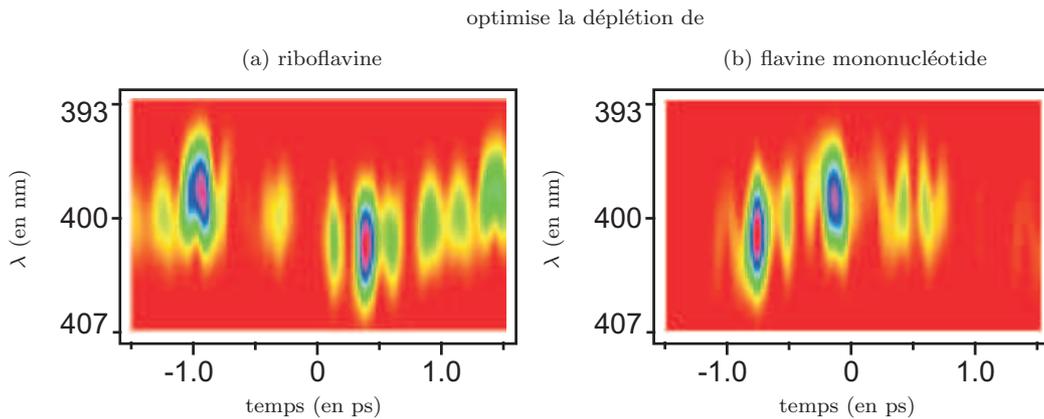


FIG. II.21 – **Forme de l’impulsion optimisée pour RbF et FMN : spectrogrammes.** Ces deux figures correspondent au premier masque $\phi(\omega)$ présenté, de chaque colonne, figure II.19.

les mêmes pour la RbF, avec une symétrie par rapport à l’horizontal pour la FMN). Il apparaît donc favorable, pour discriminer les deux flavines, d’avoir des impulsions à dérive de fréquence (ou “chirp”^k) : imposer une pré-impulsion dont les longueurs d’onde se décalent vers le rouge (“anti-chirp”), avant de faire subir la tendance inverse (“chirp positif”) semble ainsi propice pour optimiser la déplétion de riboflavine. L’effet inverse permet d’optimiser la FMN, comme l’atteste la figure II.22. Enfin, le décalage temporel entre les pics varie entre 200 et 1500 fs, et pourrait correspondre à des temps de relaxation vibrationnelle [53] dans le premier niveau excité S_1 des flavines.

On retrouve des temps de l’ordre de la picoseconde si l’on trace la déplétion en fonction du délai entre les deux impulsions^l (figure II.23) : au bout d’environ 1 ps, il n’y a plus de différence entre impulsions optimisée et limitée par transformée de Fourier. Une première interprétation consiste à dire que le paquet d’onde perd sa cohérence du fait des interactions avec l’environnement : la fonction d’onde du premier état excité se “mélange” à celle de l’environnement, et les faibles différences de structure des deux molécules ne sont alors plus suffisantes pour que l’impulsion rouge excite différemment les flavines vers les niveaux excités supérieurs. Une seconde interprétation implique la relaxation des molécules vers le niveau le plus bas, $S_1(\nu = 0)$, pour lequel le couplage avec les états excités par l’impulsion infrarouge serait alors similaire pour les deux flavines. Regarder le rôle de la température serait là encore intéressant, mais nécessiterait

^kOn parle de “chirp” (“gazouillis” en français) pour des impulsions dont le front est décalé vers les hautes longueurs d’onde, ce qui correspond à la propagation d’une onde dans un milieu à dispersion positive ; on parle d’anti-chirp dans le cas contraire.

^lA 400 nm, il y a en fait plusieurs impulsions ; la référence du délai nul est déterminée avant l’expérience par l’impulsion limitée par transformée de Fourier.

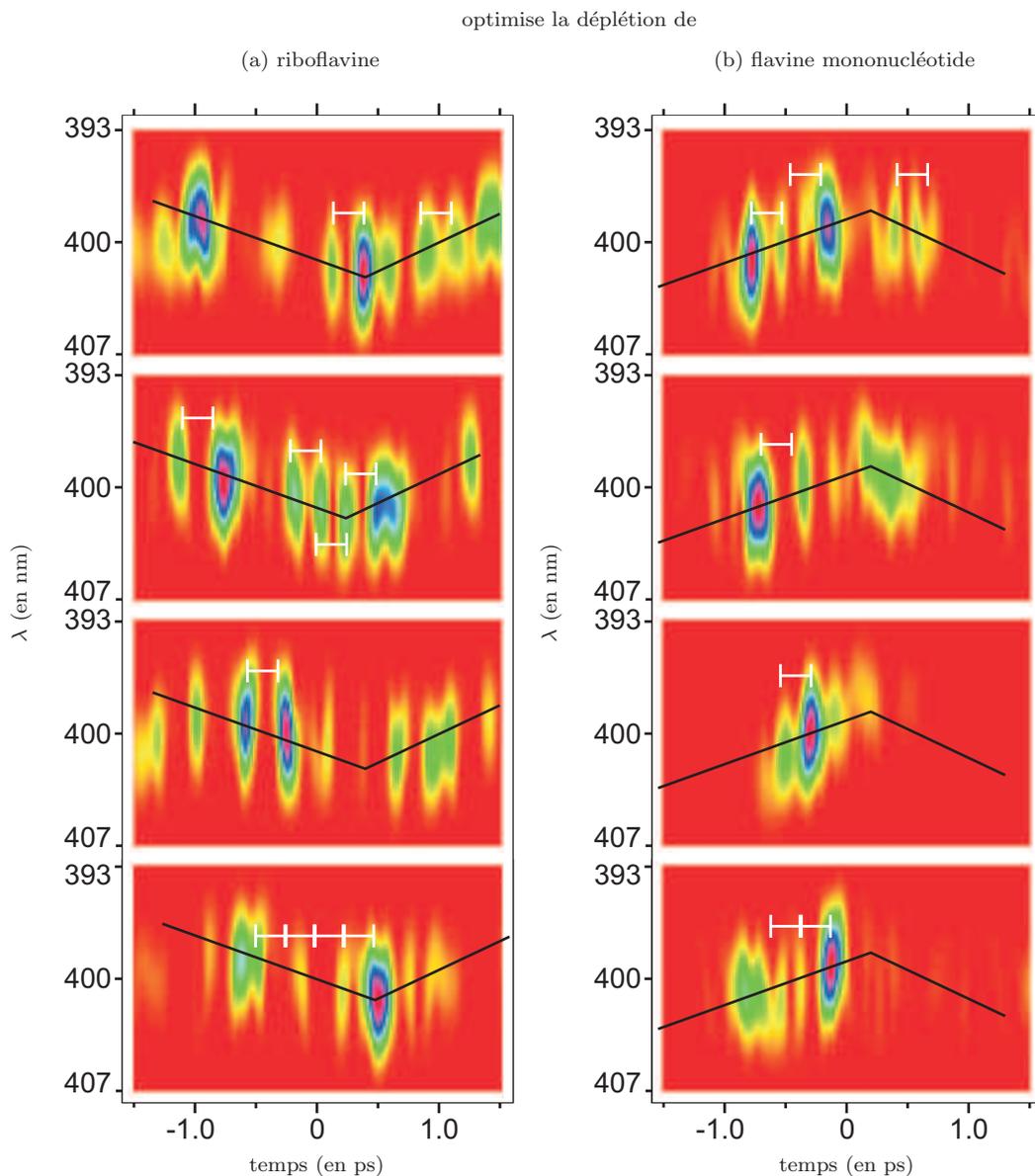


FIG. II.22 – **Spectrogrammes des impulsions optimisées : tendance générale.** Les droites noires ont été traduites sur chaque figure de (a), et retournées (transformation miroir) pour (b). Pour plus de lisibilité, des repères de 250 fs ont été ajoutés sur les figures.

une étude préalable de son influence sur la déplétion. On pourrait par contre regarder l'influence de la longueur d'onde de fluorescence sur la distinction des molécules en fonction du temps, i.e. refaire la figure II.23 pour différentes longueurs d'onde de fluorescence. Remarquons enfin que le délai d'une picoseconde au-delà duquel il n'y a plus de différence entre les flavines, correspond au moment où la déplétion devient totale (figure II.20) : l'algorithme, pour augmenter le rapport des déplétions \mathcal{R} , doit faire diminuer les deux déplétions, mais l'une plus que l'autre.

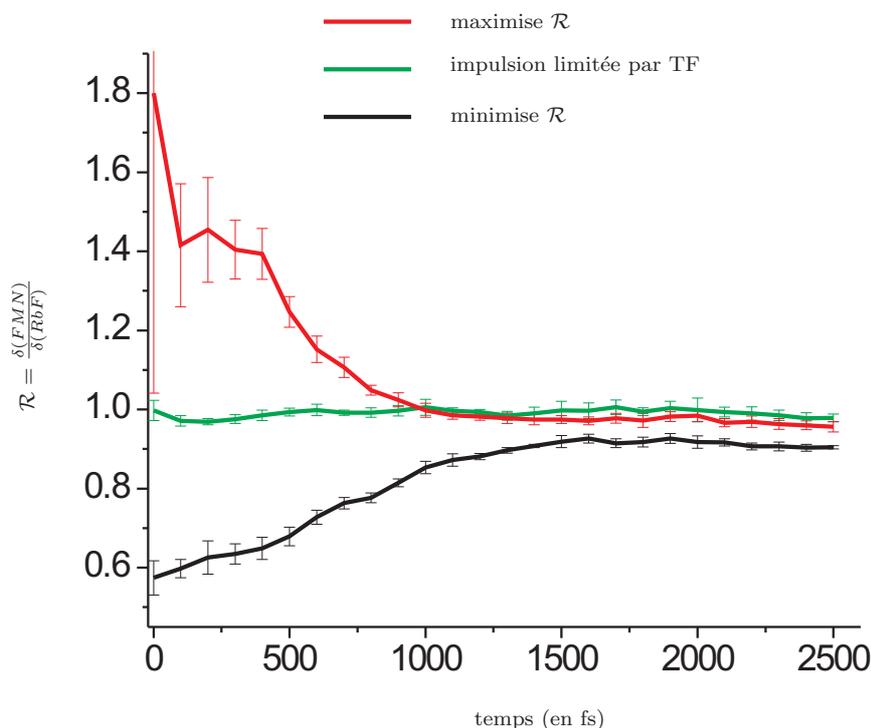


FIG. II.23 – *Variation du rapport de déplétion \mathcal{R} en fonction du délai entre les deux impulsions.*

4 Conclusions du chapitre et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons étudié la diminution de fluorescence (ou déplétion) du tryptophane et des flavines en solution, lors de l'ajout d'une seconde impulsion résonante avec la transition vers les niveaux excités supérieurs des molécules. Une dynamique sur une échelle de l'ordre de la picoseconde a été mise en évidence ; son interprétation en terme de relaxation vibrationnelle a été proposée, qui mérite des expériences complémentaires. Par ailleurs, les effets du solvant sur différents chromophores ont été étudiés et ont montré que l'existence de la déplétion de fluorescence dépend bien de l'environnement moléculaire des chromophores.

Enfin, nous avons réalisé une expérience très délicate de distinction tout optique de molécules quasi-identiques : la flavine mononucléotide et la riboflavine. Cette expérience est à ce jour la première à avoir pu différencier la fluorescence de deux molécules en phase liquide, aux cycles aromatiques identiques, par un façonnage de l'impulsion excitatrice. Ce succès est ainsi prometteur pour la distinction tout optique de molécules présentant jusqu'ici des propriétés d'absorption et de fluorescence très similaires.

Il sera intéressant de faire le même type d'expérience sur les bactéries ; les premiers essais ont

montré la nécessité d'améliorer encore le signal sur bruit et/ou d'éliminer les quelques signaux parasites qui sont apparus. Toutefois, il serait plus favorable d'exciter les bactéries à 270 nm, mais des expériences préalables de contrôle cohérent du tryptophane seront alors nécessaires (par exemple diminuer la déplétion de l'indole au profit du tryptophane). On peut aussi se demander si un façonnage en amplitude ou en polarisation des composantes spectrales de l'impulsion bleue ne pourrait pas améliorer encore les optimisations.

Finalement, nous avons réalisé des expériences de déplétion dans des gouttes (de 20 à 30 μm de rayon) de tryptophane, de flavines et de bactéries. Toutes ont présenté une très forte déplétion, qui peut s'expliquer par un meilleur recouvrement des deux impulsions au niveau de la goutte, ou/et par un effet géométrique : la goutte focalise les impulsions en son sein [64]. Ces déplétions peuvent atteindre 80 % pour le tryptophane (figure II.24), alors que 50% de diminution n'ont pu être dépassés en cellule.

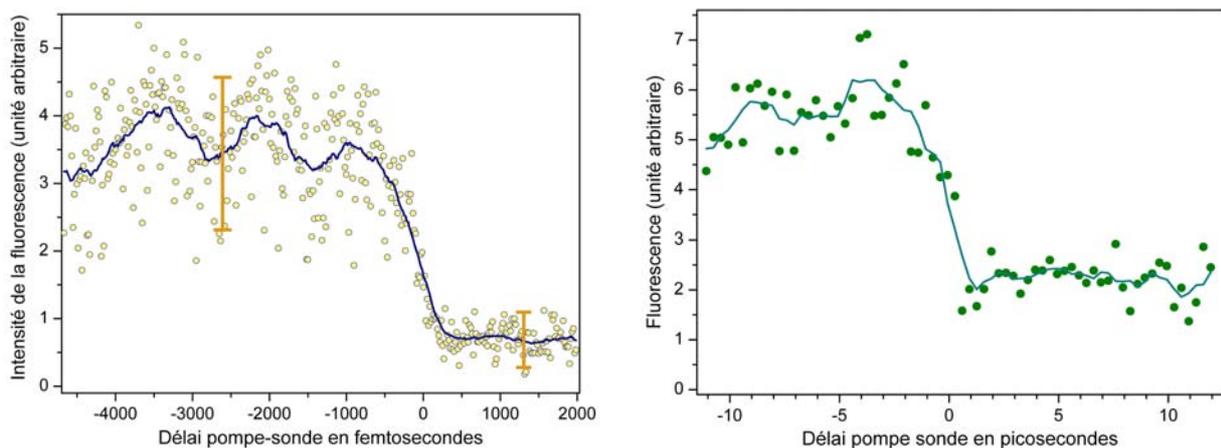


FIG. II.24 – *Déplétion dans une goutte de tryptophane (à gauche) et de bactéries *E. coli* (à droite)*. La fluorescence est mesurée à 90° par rapport à l'excitation. A droite, les gouttes contiennent une centaine de bactéries.

La déplétion dans les gouttes, prometteuse et plus proche d'applications potentielles (détection de bactéries dans les postillons par exemple), nécessite néanmoins des expériences complémentaires pour en comprendre les caractéristiques. La dépendance angulaire de la déplétion (non présentée ici) mérite des interprétations, tout comme le rôle du plasma créé dans les zones intenses de la goutte pour des intensités élevées d'infrarouge. Clarifier l'impact du solvant et de la température dans les déplétions en cellule permettrait certainement d'apporter des réponses aux questions posées précédemment. L'influence de la relaxation vibrationnelle pourrait être élucidé par une étude de la déplétion avec des mesures de fluorescence à diverses longueurs d'onde.

Chapitre III

Filaments lasants : étude de la propagation d’impulsions femtosecondes intenses dans un milieu dense absorbant

1 Introduction

1.1 Emission stimulée : étude dans les chromophores biologiques

Dans le chapitre précédent, la distinction optique de chromophores biologiques en phase liquide s’effectuait à l’aide d’un processus “pompe-pompe” original mis en place dans l’équipe. Suite à ces résultats encourageants, un nouveau processus a été imaginé pour essayer de distinguer les molécules biologiques entre elles. La première étape du projet était d’observer l’émission stimulée dans les chromophores biologiques après une excitation, non linéaire, à deux photons (voir figure III.1). Puisque les phénomènes non-linéaires sont plus susceptibles d’être contrôlés [65], l’excitation à deux photons aurait été favorable pour la seconde étape du projet qui aurait consisté à façonner l’impulsion infrarouge afin de peupler sélectivement les niveaux excités des molécules à distinguer.

Ces expériences très délicates ont eu lieu avant mon arrivée. Le signal d’émission stimulée n’a d’abord pas été observé [17], en raison de la faible section efficace d’absorption des molécules biologiques et de leur petit rendement quantique de fluorescence. Des expériences ont donc été réalisées avec un colorant laser, la coumarine 153, simulant les flavines par ses spectres d’absorption et d’émission, mais avec une section efficace d’absorption plus élevée.

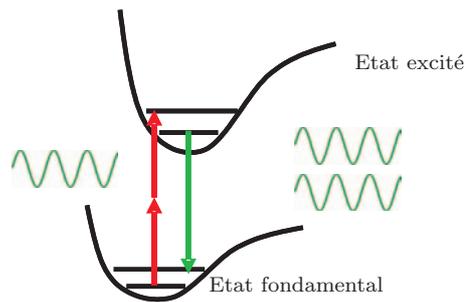


FIG. III.1 – *Absorption à deux photons et émission stimulée*. Le photon émis a les mêmes propriétés que le photon incident.

1.2 Schéma de type “pump-dump” dans la coumarine

Le dispositif expérimental est proche de celui présenté au chapitre II, à la différence que la longueur d’onde de l’impulsion sonde doit être proche du maximum d’émission du chromophore (figure III.3 page 46). Cette impulsion sonde sera appelée “dump”^a par la suite, car elle dépeuple les niveaux excités en augmentant la probabilité d’émission des molécules.

Les premières expériences avec un colorant laser ont bien révélé une augmentation du signal de fluorescence, mais aussi la présence inattendue d’une figure auto-organisée en champ lointain. Nous allons montrer que la filamentation est à l’origine de ce phénomène, et que le diaphragme avant la cellule est important pour créer un réseau stable de filaments.

1.3 Implication personnelle

C’est pour comprendre l’apparition de ce type de motif en champ lointain qu’a été initiée cette étude. Je n’ai pas participé aux expériences préliminaires qui ont permis la découverte de cette singularité, mais j’ai activement participé à l’étude qui a été menée pour la comprendre. Ainsi, l’expérience a été réalisée avec François Courvoisier et Véronique Boutou, et j’ai dépouillé et analysé les résultats.

Cette expérience a fait naître une problématique nouvelle : l’étude de la propagation de filaments en milieu dense et fortement absorbant. Afin de mieux appréhender cette physique, nous avons fait appel à l’équipe de Luc Bergé du CEA de Bruyères-le-Châtel pour réaliser les simulations.

^a “dump” signifie littéralement déverser - je n’ai pas trouvé d’équivalent français élégant pour “pump-dump”.

2 La Filamentation

2.1 Description simplifiée

Dès lors que les puissances en jeu sont suffisamment élevées, les impulsions femtosecondes peuvent se propager sous la forme d'un canal de lumière auto-guidé, résultant principalement de la compétition entre deux effets non-linéaires : une focalisation due à l'effet Kerr et une défocalisation due à la création de plasma [66]. Une structure autoguidée est ainsi créée, appelée "filament", dont une visualisation est présentée figure III.2.



FIG. III.2 – *Image de filament dans du méthanol avec colorant.* Image réalisée par Schroeder et al. [67], grâce à une technique empruntée à la microscopie à deux photons, dont l'intérêt est de mettre en évidence les zones de très fortes intensités (voire paragraphe 5.5 page 59). La zone entourée correspond à la zone de filamentation dans laquelle la défocalisation due au plasma compense l'effet Kerr.

2.2 Indice non-linéaire

Divergence naturelle

Dans le cadre de l'optique classique, on ne peut propager un faisceau collimaté que sur des distances de l'ordre de la longueur de Rayleigh $L_R = \frac{kr_0^2}{2}$, où k est le nombre d'onde et r_0 le rayon minimum du faisceau. Au-delà, la diffraction élargit significativement le faisceau.

Effet Kerr

Lorsqu'un champ électrique se propage dans un milieu matériel, il polarise de façon linéaire les molécules du milieu, et celles-ci émettent à leur tour un champ électromagnétique qui se superpose au champ incident. Au niveau macroscopique, cela se traduit par un indice linéaire n_0 du milieu, qui dépend de la polarisabilité des molécules et donc du tenseur de susceptibilité linéaire $\chi^{(1)}$. Si le champ électrique devient plus intense, des effets non-linéaires, dus à des susceptibilités d'ordre supérieur $\chi^{(n)}$, apparaissent. Pour les milieux isotropes ou centro-symétriques, les ordres pairs sont nuls (notamment $\chi^{(2)} = 0$), si bien que les effets non-linéaires les plus importants sont des effets d'ordre 3.

On obtient l'indice du milieu par un développement limité d'ordre 2 du champ électrique E , (i.e. d'ordre 1 en intensité I de l'onde). Le fait que l'indice dépende de l'intensité de l'onde est appelé effet Kerr optique :

$$n = n_0 + n_2 I$$

où $n_2 = \frac{3\text{Re}(\chi^{(3)})}{4\epsilon_0 c n_0^2}$ est appelé indice non-linéaire du milieu.

Puissance critique

Le profil spatial de l'impulsion modifie donc les propriétés optiques du milieu. Notamment, un faisceau gaussien intense qui se propage crée un profil gaussien d'indice de réfraction, c'est-à-dire une lentille convergente : le faisceau s'auto-focalise. Cette auto-focalisation peut compenser la diffraction, si elle atteint une puissance critique P_{crit} , donnée par :

$$P_{crit} = \frac{3,7\lambda^2}{8\pi n_0 n_2}$$

Elle est d'autant plus facilement atteinte que les indices linéaires et non-linéaires sont élevés. Dans l'éthanol pur, à 800 nm , on trouve $P_{crit} = 3\text{ MW}$.

Si la puissance de l'impulsion dépasse cette valeur, alors l'onde se focalise : on parle de lentille Kerr. Lorsque le faisceau se focalise, l'intensité s'élève et la lentille Kerr s'accroît. On aurait donc affaire à un effondrement du faisceau si aucun autre phénomène n'intervenait.

2.3 Divergence par le plasma

A des intensités plus élevées, on va créer un plasma par ionisation multiphotonique. Dans le cas d'un liquide comme l'éthanol, six photons à 800 nm sont nécessaires pour ioniser la molécule, le potentiel d'ionisation de l'éthanol étant $U_i = 8.4\text{ eV}$ [68, 69]. Dans la limite d'un plasma peu dense, on peut montrer que la modification de l'indice du milieu est donnée par [18, 70] :

$$\Delta n = \left(-1 + i \frac{\nu}{\nu_e} \right) \cdot \frac{\rho_e}{2\rho_{crit}} \quad (\text{III.1})$$

où

- ν est la fréquence de l'impulsion laser ;
- ν_e est la fréquence de collisions électrons-ions ;
- ρ_e est la densité d'électrons libres ;
- m_e est la masse des électrons

- et $\rho_{crit} = \epsilon_0 m_e 4\pi^2 \nu^2 / e^2$ représente la densité critique d'électrons libres au-delà de laquelle se produit une augmentation drastique du coefficient d'absorption. À 800 nm, $\rho_{crit} \approx 1,7 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$.

Dans la formule III.1, le signe négatif signifie que le plasma défocalise l'impulsion. Effet Kerr et plasma ont donc une action contraire. Le terme imaginaire pur traduit quant à lui une absorption d'énergie.

2.4 Faisceau auto-guidé

Lorsque la puissance d'une impulsion dépasse la puissance critique P_{crit} , l'impulsion se focalise par effet Kerr jusqu'à ce que l'ionisation du milieu ait lieu à des puissances supérieures. Dès lors, il y a principalement une compétition entre ces deux phénomènes non-linéaires, et l'on atteint un équilibre dynamique. L'impulsion se propage sans diverger, de façon auto-guidée : c'est ce qu'on appelle un filament.

2.5 Multifilamentation et organisation des filaments

Si la puissance de l'impulsion est bien plus grande que la puissance critique P_{crit} , il se crée de multiples filaments, déclenchés par des instabilités modulationnelles [71]. Dans ce processus, les inhomogénéités locales de l'intensité croissent de façon exponentielle et entraînent la rupture du faisceau à la fois dans l'espace et dans le temps [72]. De nombreuses cellules de petite taille apparaissent sur le profil spatial du faisceau, parmi lesquelles certaines atteignent la puissance critique d'autofocalisation engendrant la filamentation. Avec cette explication, on comprend que l'organisation transverse des filaments en sortie du milieu non-linéaire soit aléatoire, dans la mesure où les instabilités le sont aussi. Au contraire, l'introduction d'éléments optiques variés dans le trajet du faisceau rend reproductible la distribution des filaments [73–76]. Parmi les effets connus pour surmonter l'instabilité modulationnelle, citons l'ellipticité du faisceau [74, 75], et la modulation de phase du faisceau, obtenue avec une lentille pivotée [73]. Modifier le profil d'intensité (avec, soit un simple diaphragme circulaire [73], soit une grille [76], soit un réseau de microlentilles [77]) entraîne aussi la création d'un ensemble stable de filaments à partir des forts gradients d'intensité ainsi créés.

3 Présentation de l'expérience

Dans notre expérience, nous étudions la filamentation dans un milieu dense, l'éthanol, en présence de pertes supplémentaires dues à l'absorption à deux photons par un colorant. Nous

études aussi l'effet d'une seconde impulsion dont la longueur d'onde centrale correspond au maximum de l'émission de fluorescence du colorant, afin de stimuler l'émission de fluorescence du colorant. Cette seconde partie de l'expérience est présentée dans le paragraphe 6.

3.1 Dispositif expérimental général

Le principe général d'une ligne pompe-sonde, et de la génération de lumière blanche a été expliqué dans le premier chapitre (page 3).

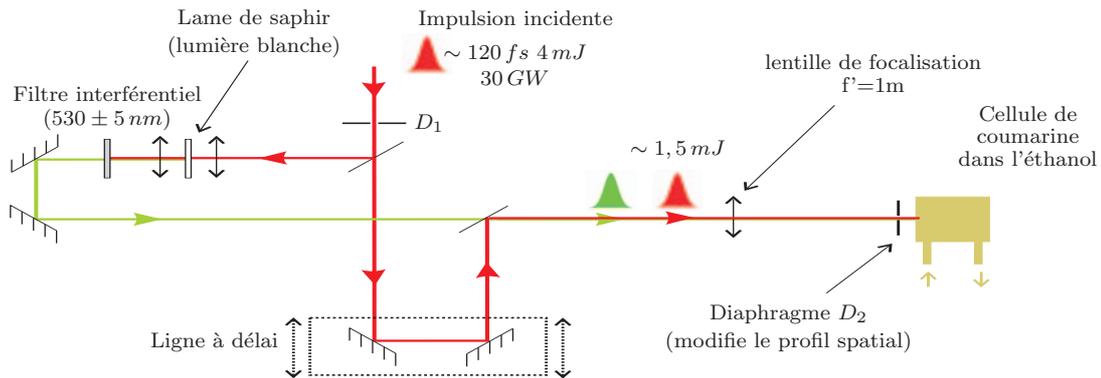


FIG. III.3 – **Schéma expérimental général.** Il s'agit d'un schéma de type "pump-dump". Dans toute la première phase de l'expérience (partie 5), on n'utilise que la pompe, car l'impulsion "dump" est coupée. Les deux impulsions sont utilisées dans la partie 6.

En sortie du laser, on sépare l'impulsion en deux. 30% de l'énergie sont utilisés pour créer l'impulsion "dump", et les 70% restant constituent l'impulsion pompe, qui peut être retardée ou avancée à l'aide de la ligne à délai. L'impulsion "dump" est créée en générant de la lumière blanche dans une lame de saphir. Elle est ensuite filtrée en coupant le reste d'infra-rouge (filtre BG40), et en ajoutant un filtre interférentiel dont la longueur d'onde se situe dans la bande d'émission de la coumarine utilisée ($530\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ pour la coumarine 153). Avec la ligne à retard, on peut imposer un délai Δ entre les deux impulsions, $\Delta > 0$ signifiant que l'impulsion "dump" arrive après l'impulsion pompe. Après recombinaison, les deux impulsions, préalablement alignées avec soin, sont focalisées avec une lentille de 1 m. On place la cellule avant le point focal, afin d'éviter de générer de la lumière blanche dans ses faces.

Colorant laser : la coumarine 153

Dans notre expérience, nous utilisons la coumarine 153 diluée dans de l'éthanol, à une concentration de 4 g/L qui correspond à la concentration caractéristique utilisée dans les lasers à colorants [78]. Son absorption linéaire dans l'éthanol présente un maximum à 423 nm , son

émission maximale étant à 530 nm . La section efficace d'absorption à deux photons à 800 nm est $\sigma_{abs}^{(2)} = 6.76 \cdot 10^{-31} \text{ cm}^4 \cdot \text{W}^{-1}$ [79, 80].

Un autre colorant laser a été utilisé dans notre expérience avec des résultats similaires : la coumarine 510, diluée à 1 g/L . Seule la couleur des figures observées en champ lointain diffère, du fait de l'émission du colorant, décalée dans le bleu. Nous avons dans ce cas utilisé un filtre à $500 \pm 5\text{ nm}$ pour l'impulsion "dump".

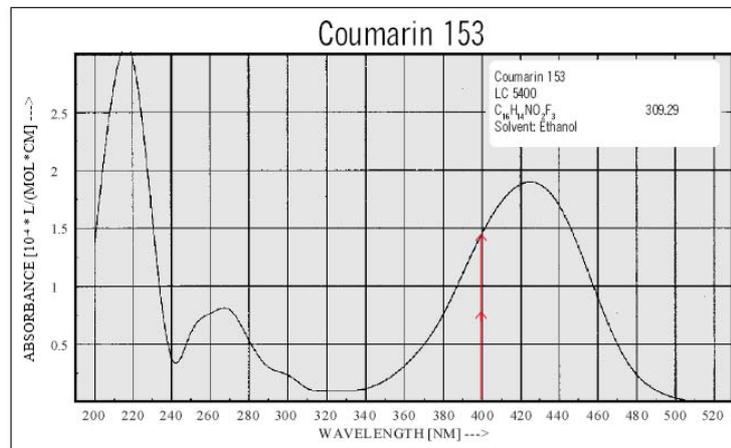
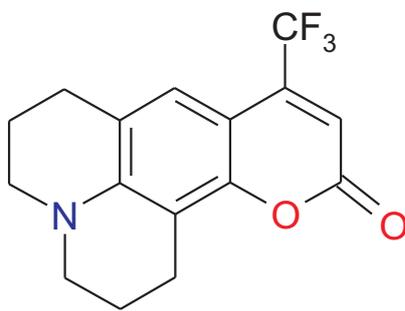


FIG. III.4 – **Coumarine 153**. Schéma de la molécule et spectre d'absorption (linéaire) de la coumarine diluée dans l'éthanol [78]. La forte délocalisation électronique des cycles est responsable du taux élevé de l'absorption linéaire présentée ici.

La solution est insérée dans une cuve en quartz de 10 mm de long, branchée sur une circulation afin d'éviter le blanchiment des molécules de colorant.

Caractéristique des impulsions à l'entrée de la cellule

Nous avons testé différentes configurations expérimentales. Dans une configuration représentative, l'énergie par impulsion est de $1,5\text{ mJ}$ avant le diaphragme circulaire D_2 . Après ce diaphragme, on ne mesure plus que $0,34\text{ mJ}$: plus de 75% de l'énergie a donc été coupée par le diaphragme. Le profil spatial de l'impulsion est ainsi fortement modifié par le diaphragme qui crée des bords francs. Le passage dans la cellule, quant à lui, fait perdre entre 10% et 35% de l'énergie (suivant les mesures), pour des concentrations allant de $0,5$ à 4 g/L . Pour calculer la puissance moyenne par impulsion P_i , il faut mesurer la largeur temporelle de l'impulsion : une autocorrélation donne, après déconvolution, $\tau_i = 120\text{ fs}$. La taille de l'impulsion est nécessaire pour calculer l'intensité moyenne I_i^b . Un diaphragme D_1 , situé juste avant les deux bras, coupe une partie de l'impulsion :

^bIl s'agit ici d'une moyenne spatiale et temporelle.

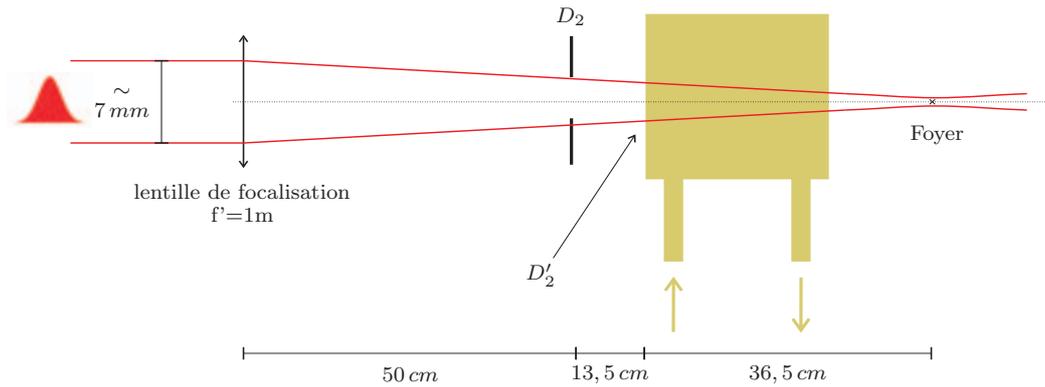


FIG. III.5 – **Géométrie au voisinage de la cellule.** Pour $\lambda = 810nm$, et avec un faisceau gaussien (ce qui est loin d'être le cas), on aurait un "waist" $\omega_0 \sim 90 \mu m$, et une longueur de Rayleigh $L_R \sim 3 cm$.

c'est donc lui qui définit la taille de l'impulsion avant la lentille. On constate expérimentalement que ce diaphragme améliore aussi le profil spatial du faisceau, bien qu'il ne soit pas dans le plan de Fourier. Le diaphragme D_2 (situé $50 cm$ en amont du point focal de la lentille) détermine la taille caractéristique du faisceau à l'entrée de la cellule D'_2 (située $36,5 cm$ du point focal de la lentille, voir figure III.5) : $D'_2 = \frac{36,5 cm}{50 cm} D_2$. Les mesures sont récapitulées dans la table III.1.

$D_1 = 6,8 mm$	$D_2 = 1,1 mm$	$D'_2 = 0,8 mm$
----------------	----------------	-----------------

	Avant la lentille	Avant la cellule
Energie E_i	$1,5 mJ$	$0,34 mJ$
Puissance P_i	$1,25 \cdot 10^{10} W$	$2,8 \cdot 10^9 W$
Intensité I_i	$3,4 \cdot 10^{10} W \cdot cm^{-2}$	$5,6 \cdot 10^{11} W \cdot cm^{-2}$

TAB. III.1 – **Caractéristiques des impulsions utilisées.** Notons que le profil spatial des impulsions est très perturbé (voir paragraphe 3.2), du fait du mode du laser. Ces grandeurs moyennes donnent donc un ordre de grandeur, les valeurs pics étant plus importantes.

3.2 Profil du faisceau

Lorsque l'on modifie l'ouverture du diaphragme D_2 , la figure obtenue en champ lointain change fortement. Afin d'analyser l'influence du profil spatial de l'impulsion d'entrée, nous l'avons enregistré avec le dispositif d'imagerie présenté figure III.6. Nous nous sommes mis dans les

configurations suivantes : pas de diaphragme, diaphragmes circulaires de différents diamètres, fentes de différentes largeurs ou cheveux qui jouent le rôle d'objets diffractants.

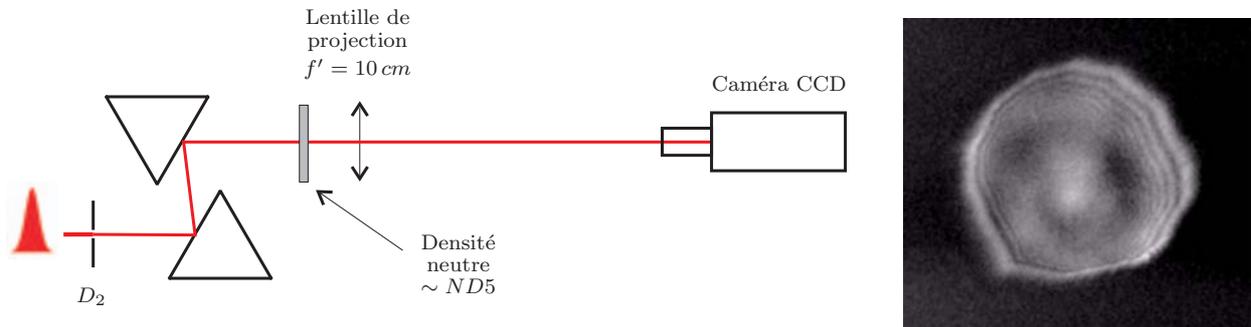


FIG. III.6 – *Mesure du profil spatial au niveau de D_2 . A gauche, dispositif expérimental. A droite, une image obtenue diaphragme fermé. En supposant 4% de réflexion sur les prismes, il faut atténuer le faisceau de 7 à 8 ordres de grandeur pour ne pas saturer la caméra.*

3.3 Champ en sortie de cellule

Nous enregistrons le champ en sortie de cellule afin de visualiser les filaments créés. Du fait des énergies en jeu, nous avons dû ajouter des filtres de densité neutre $ND \sim 3.5$ devant la caméra, ainsi qu'un filtre de densité supérieure à 6 pour l'infra-rouge. Suivant la concentration de coumarine, ce sont les longueurs d'onde infra-rouge ou/et verte (i.e. la fluorescence) qui sont enregistrées et comparées au champ à l'entrée. Les prismes de la figure III.6 sont en effet montés sur des platines de translation de façon à passer facilement d'une situation à l'autre.

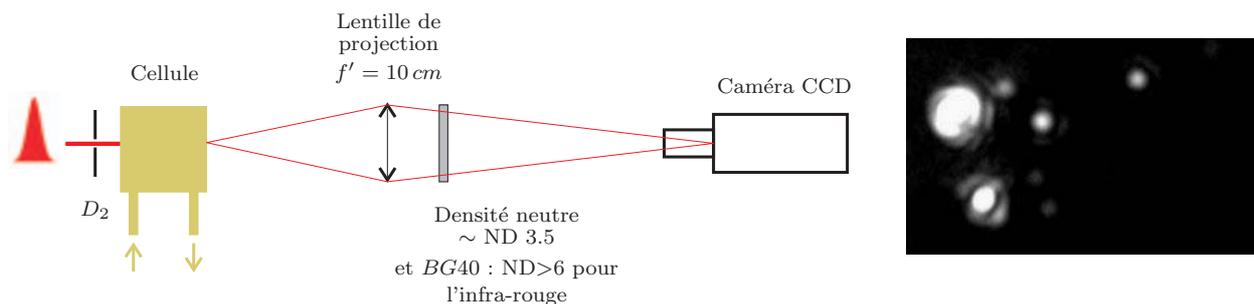


FIG. III.7 – *Mesure du profil d'intensité en sortie de cellule.*

4 Simulation de la propagation

Afin de mieux comprendre la propagation dans la cellule, des simulations ont été réalisées par l'équipe de Luc Bergé au CEA de Bruyères-le-Châtel. Je ne présente ici que les principaux

résultats et caractéristiques des simulations pour les comparer avec nos expériences. Pour plus de détails sur la partie simulation, je renvoie à la thèse d'Antoine Vinçotte [81].

4.1 Le modèle utilisé

La propagation de l'impulsion dans la cellule a été modélisée par l'équation de Schrödinger non-linéaire (III.2), couplée avec le modèle de Drude (III.3) pour la densité électronique.

$$\begin{aligned} \frac{\partial \mathcal{E}}{\partial z} = & \frac{i}{2k} \nabla_{\perp}^2 \mathcal{E} - i \frac{k''}{2} \partial_t^2 \mathcal{E} + ik_0 n_2 |\mathcal{E}|^2 \mathcal{E} - \left(\frac{\sigma}{2} + i \frac{k_0}{2n_0 \rho_{crit}} \right) \rho_e \mathcal{E} \\ & - \frac{\beta^{(K)}}{2} |\mathcal{E}|^{2K-2} \mathcal{E} - \frac{\sigma_{abs}^{(n)}}{2} \rho_{abs} |\mathcal{E}|^{2n-2} \mathcal{E}, \end{aligned} \quad (\text{III.2})$$

$$\partial_t \rho_e = \sigma_K \rho_{nt} |\mathcal{E}|^{2K} + \frac{\sigma}{U_i} \rho_e |\mathcal{E}|^2 - \frac{\rho_e}{\tau_r}. \quad (\text{III.3})$$

où

- $\mathcal{E}(x, y, z, t)$ est l'enveloppe de l'impulsion ;
- $\nabla_{\perp}^2 \mathcal{E} = \frac{\partial^2 \mathcal{E}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \mathcal{E}}{\partial y^2}$
- $k = n_0 k_0$ avec $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_0}$ et $\lambda_0 = 810 \text{ nm}$. L'indice de réfraction linéaire de l'éthanol est $n_0 = 1,36$;
- $k'' \simeq 403 \text{ fs}^2 \cdot \text{cm}^{-1}$ [82] est la dispersion de vitesse de groupe dans l'éthanol ;
- $n_2 = 2.6 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1}$ [83] est l'indice non-linéaire de l'éthanol pur ;
- $\sigma = 1.22 \times 10^{-17} \text{ cm}^2$ est la section efficace pour le Bremstrahlung inverse, et dépend notamment de la fréquence de collisions électrons-ions et de la fréquence du laser ;
- $\rho_{crit} = 1.7 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ est la densité critique de plasma, $\rho_{nt} = 1.03 \times 10^{22} \text{ cm}^{-3}$ est la densité de molécules neutres ;
- $\beta^{(K=6)} = 8.53 \times 10^{-65} \text{ cm}^9 / \text{W}^5$ et $\sigma_{K=6} = 5.63 \times 10^{-69} \text{ s}^{-1} \text{ cm}^{12} / \text{W}^6$ sont le coefficient et la section efficace d'absorption multiphotonique ;
- $U_i = 8.4 \text{ eV}$ est le potentiel d'ionisation de l'éthanol [68, 69] ;
- $\sigma_{abs}^{(n)} = 6.76 \times 10^{-31} \text{ cm}^4 / \text{W}$ est la section efficace d'absorption à 2 photons de la coumarine 153 [79, 80] ;
- ρ_{abs} est la densité de molécules de coumarine et dépend de la concentration. $\rho_{abs} = 7.8 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$ pour une concentration de $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;
- $\tau_r = 450 \text{ ps}$ est le temps de recombinaison électronique [84].

Dans l'équation (III.2), le premier terme prend en compte la diffraction, le second la dispersion de vitesse de groupe ; ce sont les termes linéaires. Le terme suivant, $ik_0 n_2 |\mathcal{E}|^2 \mathcal{E}$, représente la

focalisation par effet Kerr. $-(\frac{\sigma}{2} + i\frac{k_0}{2n_0\rho_{crit}})\rho_e\mathcal{E}$ est le terme de plasma, qui comprend une partie d'absorption du champ dû au Bremsstrahlung inverse (accélération des électrons par le champ) et une partie de défocalisation. Les deux derniers termes concernent l'absorption multiphotonique :

- $-\frac{\beta^{(K)}}{2}|\mathcal{E}|^{2K-2}\mathcal{E}$: pour l'éthanol, il faut six photons ($K = 6$) à 810 nm pour ioniser la molécule.
- $-\frac{\sigma_{abs}^{(n)}}{2}\rho_{abs}\mathcal{E}^{2n-2}\mathcal{E}$: pour la coumarine 153, l'absorption à deux photons de 810 nm ($n = 2$) est résonante.

Le modèle de Drude (III.3) est couplé avec l'équation précédente et régit la densité électronique ρ_e . Il prend en compte un terme de création par absorption multiphotonique de l'éthanol, un terme d'avalanche et un terme de recombinaison électronique.

4.2 Impulsion incidente

Pour se rapprocher du dispositif expérimental, la taille du faisceau incident est millimétrique, et son intensité pic de l'ordre de $4 \times 10^{11} \text{ W.cm}^{-2}$. On modélise la configuration "diaphragme D_2 ouvert" par une impulsion gaussienne, perturbée par 15% de bruit^c :

$$\mathcal{E}(x, y, t, z = 0) = \sqrt{\frac{2P_{in}}{\pi w_0^2}} \times (1 + 0.15 \times \text{bruit}) \times e^{-\frac{x^2+y^2}{w_0^2} - \frac{t^2}{t_p^2}}, \quad (\text{III.4})$$

avec $t_p = 102$ fs (soit une largeur à mi-hauteur de 120 fs), $w_0 = 1 \text{ mm}$ et $P_{in} \simeq 6.3 \text{ GW}$.

Pour le cas où l'on ferme le diaphragme, un profil super-gaussien est utilisé :

$$\mathcal{E}(x, y, t, z = 0) = \sqrt{\frac{2^{\frac{1}{N}} P_{in}}{\Gamma(1 + \frac{1}{N}) \pi w_0^2}} \times (1 + 0.15 \times \text{bruit}) \times e^{-\left(\frac{x^2+y^2}{w_0^2}\right)^N - \frac{t^2}{t_p^2}}, \quad (\text{III.5})$$

avec $\Gamma(x)$ la fonction d'Euler, $w_0 = 0.5 \text{ mm}$, $t_p = 102$ fs et $P_{in} \simeq 2.8 \text{ GW}$ et $N = 10$. Le cas de la fente est modélisé par une supergaussienne asymétrique : $N = 1$ suivant y et $N = 10$ suivant z .

Les effets non-linéaires amplifient, par instabilité modulationnelle, les fluctuations qui aident au déclenchement de la filamentation ; l'ajout de bruit sur le profil initial est donc important pour modéliser ces phénomènes.

4.3 Choix du n_2

Les premières simulations ne traduisaient pas la réalité expérimentale de filamentation (voir figures III.8), car la coumarine, en absorbant fortement l'énergie, empêche la création des filaments. De façon plus détaillée, l'augmentation de l'énergie que l'on observe à partir de 4 mm

^cOn appelle "bruit", un bruit blanc aléatoire compris entre 0 et 1.

de propagation, est due à la focalisation par effet Kerr, focalisation qui n'est ici pas suffisante pour induire la création de filaments. Afin de rendre compte des résultats expérimentaux, on doit modifier la valeur du n_2 pour prendre en compte l'effet de la coumarine. Différentes études, que ce soit avec un colorant dans l'eau [85] ou avec des guides d'onde [86], montrent qu'avec un colorant, cette valeur peut augmenter significativement. De façon beaucoup plus générale, He et Liu [87] indiquent que proche d'une résonance (transitions à un photon, deux photons, Raman, etc...), l'indice non-linéaire peut être augmenté significativement ; le $\chi^{(3)}$ de la coumarine contribue à l'indice non-linéaire du milieu. En l'absence de mesure précise, nous avons multiplié la valeur dans l'éthanol pur, $n_2 = 2.6 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 \cdot \text{W}^{-1}$ [83], un facteur 10, soit $n_2 = 2.6 \times 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{W}$.

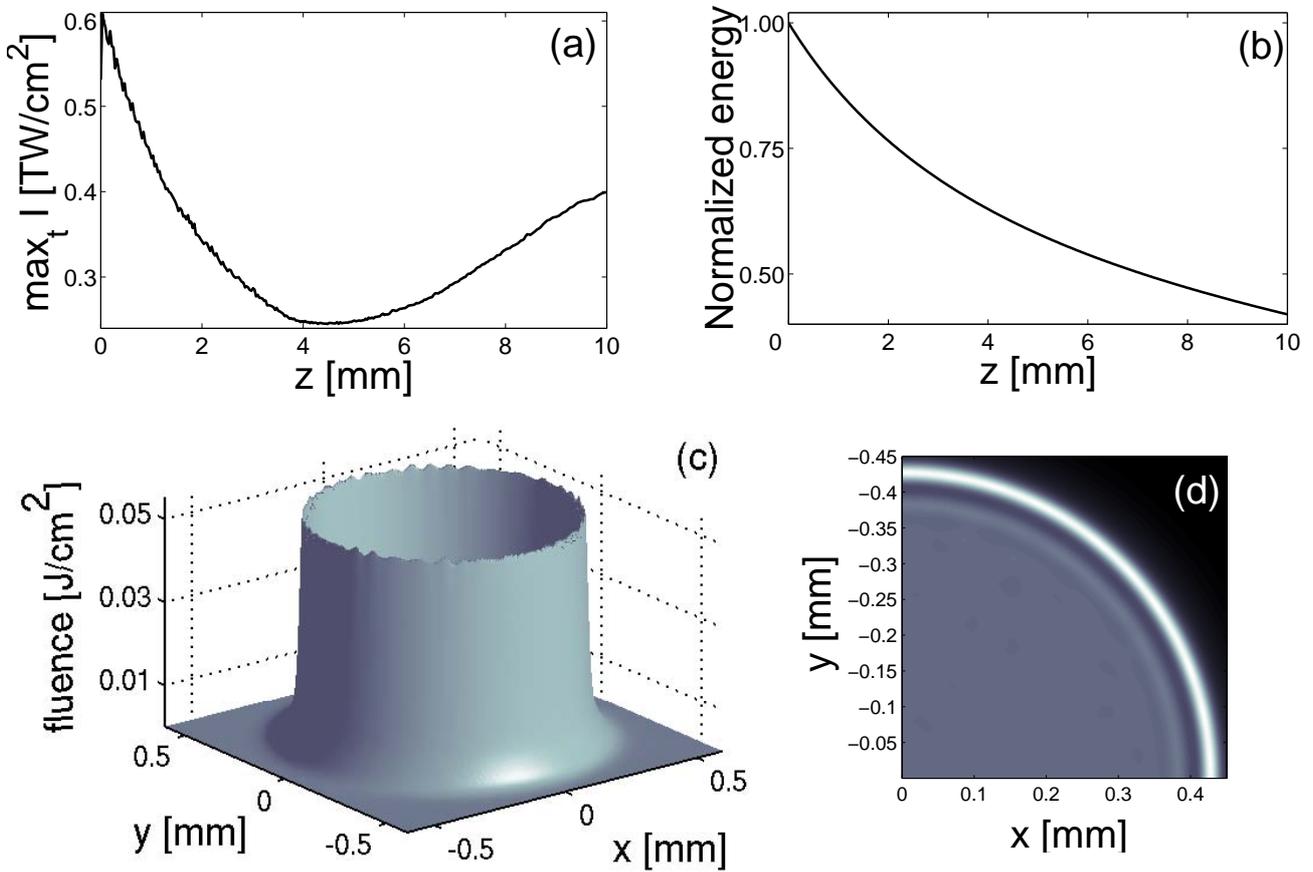


FIG. III.8 – *Résultats des simulations avec le n_2 de l'éthanol pur.* L'intensité maximale (a) et l'énergie de l'impulsion normalisée sont tracées en fonction de la distance z de propagation dans la cellule. Le profil 3D de l'intensité (c) en sortie de cellule, comme la coupe transverse (d) de ce profil en zoomant sur un bord, ne montrent pas de filamentation, contrairement aux expériences.

Une étude comparable, réalisée par les équipes de Chin et de Kandidov [88], concerne la propagation d'impulsions femtosecondes très courtes (38 fs), dans une solution très diluée de colorant dans du méthanol. Ce colorant, la coumarine 440, donne lieu à une absorption de 3

photons à 810 nm, l'absorption à 2 photons étant négligeable. Dans cette étude, *Liu et al.* ont pu évaluer le n_2 du milieu en mesurant la puissance critique de création des filaments, $P_{crit} = 8MW$. L'apparition des filaments coïncide avec l'apparition de lumière blanche que l'on peut observer expérimentalement. Ils trouvent, avec une concentration de colorant inférieure à la nôtre, est $n_2 \simeq 10^{-16} cm^2.W^{-1}$ à 38 fs dans leur milieu, valeur très voisine de celle mesurée à 100 fs dans le méthanol pur [83]. Dans notre cas, l'absorption linéaire de la coumarine 153 rend difficile la détection de lumière blanche, et donc la mesure du n_2 comme mentionnée ci-dessus. Notons aussi que l'absorption de colorant est beaucoup plus forte, d'une part car notre solution est plus concentrée d'un facteur 5, et d'autre part car ici l'absorption est à 2 photons.

On peut aussi noter que dispersion et absorption sont liées par les relations de Kramers-Krönig, relations de cause à effet au niveau microscopique [89]. Pour des intensités suffisamment faibles pour ne pas avoir d'effet non-linéaire, un milieu absorbant a une dispersion de vitesse de groupe négative, ce qui a pour effet de comprimer temporellement l'impulsion. Pour des intensités plus élevées, les effets non-linéaires ne sont pas négligeables ; il faudrait a priori prendre en compte les relations de Kramers-Krönig non-linéaires, particulièrement compliquées. Les simulations actuelles de filament dans un milieu avec pertes à 2 ou 3 photons [81, 83, 90] ne prennent pas en compte ce terme. Cependant, si l'absorption de la coumarine implique une dispersion négative et donc une compression temporelle de l'impulsion, alors les effets non-linéaires seront favorisés, ce qui va dans le même sens qu'une augmentation de n_2 .

4.4 Prise en compte des molécules de colorants excitées

Lorsque les molécules de coumarine sont excitées par le front de l'impulsion, elles ne sont plus disponibles pour absorber la fin de l'impulsion. Cet effet n'est pas pris en compte dans l'équation de propagation III.2 ; l'absorption devrait en fait être inférieure à celle ainsi calculée. Après les premières simulations dans ces conditions, seules 25% des molécules de colorant sont excitées après passage de l'impulsion ; on s'attend à ce qu'une correction prenant en compte ces effets soit faible. Pour le vérifier, l'équation III.2 a été modifiée de la façon suivante, en ajoutant l'équation des molécules excitées :

$$-\frac{\sigma_{abs}^{(n)}}{2}\rho_{abs}|\mathcal{E}|^{2n-2}\mathcal{E} \text{ remplacé par } -\frac{\sigma_{abs}^{(n)}}{2}(\rho_{abs} - \rho_{exc})|\mathcal{E}|^{2n-2}\mathcal{E} \quad (\text{III.6})$$

$$\partial_t \rho_{exc} = \frac{\sigma_{abs}^{(n)}}{n\hbar\omega}(\rho_{abs} - \rho_{exc})|\mathcal{E}|^{2n}. \quad (\text{III.7})$$

Une simulation a été effectuée avec ces nouvelles équations pour prendre en compte cette

baisse d'absorption, sans changement notable de comportement pour la propagation. Les résultats, précédemment calculés avec les équations couplées III.2 et III.3, restent donc valides.

5 Propagation de l'impulsion infra-rouge seule : expérience et simulation

5.1 Observations générales

La visualisation du champ en sortie de cellule montre des zones particulièrement lumineuses, que l'on interprète comme des filaments. En effet, différents indices forts vont dans ce sens (voir figure III.9) :

- Zones très intenses en sortie de cellule : les filaments ;
- Apparition de lumière blanche due à l'automodulation de phase dans les filaments ;
- Bruit/claquage caractéristique dans la cellule d'éthanol pur, dû au fait que le champ a dépassé le champ disruptif du milieu ;
- Observation, dans la cellule, de bulles qui diffusent la lumière, signes d'un chauffage local qui provoque l'ébullition de l'éthanol.

Dans le cas d'un milieu concentré en coumarine, ces signes sont moins évidents ; seules les zones de forte intensité en sortie de cellule restent bien visibles mais moins intenses (l'observation s'effectue avec un filtre gris de plus faible densité). Il faut noter que l'opacité de la solution empêche de visualiser d'éventuelles bulles ou lumière blanche.

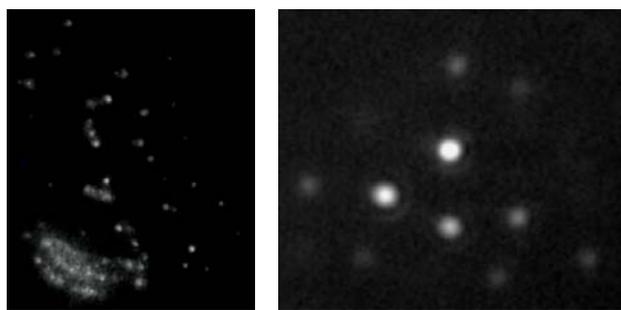


FIG. III.9 – **Filamentation avec et sans coumarine**. A gauche, la myriade de filaments enregistrés à la sortie d'une cellule d'éthanol pur (densité neutre ND 4.7 devant la caméra) ; à droite dans le cas d'une cellule de coumarine concentrée (densité ND 3) - à différentes échelles.

5.2 Etude avec un diaphragme circulaire

éthanol pur : comparaison diaphragmes ouvert et fermé

La figure III.10 montre l'image des filaments en sortie d'une cellule d'éthanol pur avec diaphragme ouvert, en comparaison avec la simulation pour la propagation d'un faisceau gaussien. Un paramètre important est la mesure du diamètre des filaments, $\Phi \sim 8-10 \mu m$, que l'on mesure en sortie de cellule. La simulation et les mesures réalisées par le groupe de Chin dans l'eau [91] donnent un diamètre comparable. Lorsque l'on ferme le diaphragme, figure III.11, le diamètre des filaments reste semblable. Par contre, bien que l'impulsion incidente soit moins intense car coupée par le diaphragme, on observe plus de filaments en sortie de cellule, et la lumière blanche créée par automodulation de phase est plus intense.

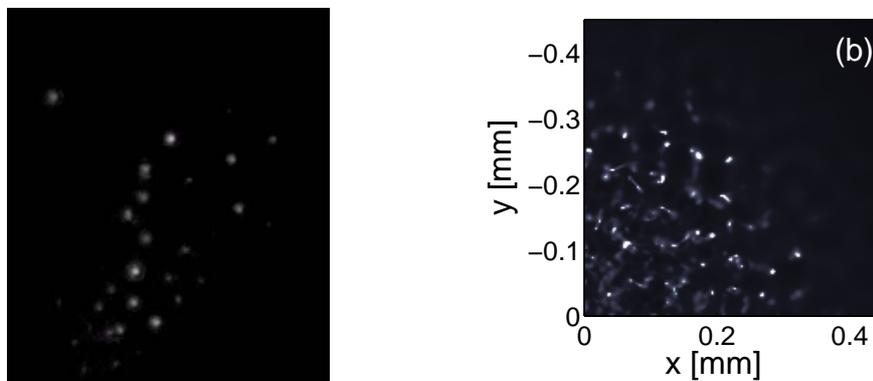


FIG. III.10 – *Filaments en sortie de cellule d'éthanol pur : diaphragme ouvert.* Expérience et simulation, lorsque le diaphragme est grand ouvert, modélisé par un faisceau gaussien en entrée.

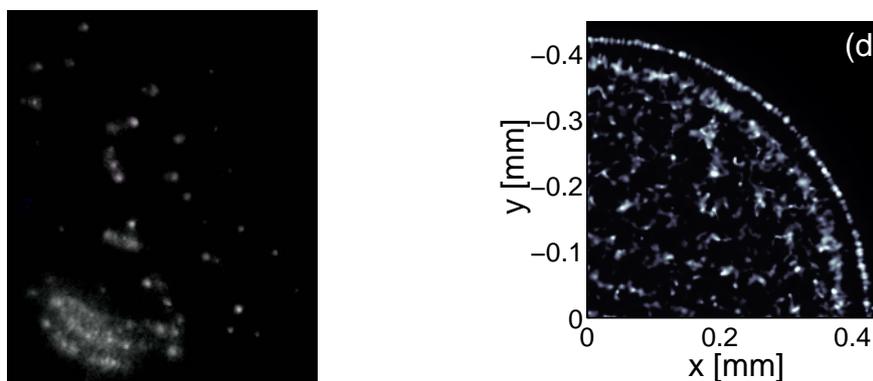


FIG. III.11 – *Filaments en sortie de cellule d'éthanol pur : diaphragme fermé.* Expérience et simulation, lorsque le diaphragme est fermé, modélisé par un faisceau supergaussien en entrée. Dans l'expérience, seule une partie du faisceau est coupée par le diaphragme, ce qui explique qu'il n'y ait pas de symétrie visible.

On remarque, figure III.11, un système d’anneaux qui provient des bords francs du diaphragme. Ces bords francs créent des anneaux de diffraction, c’est-à-dire des gradients locaux du champ, qui seront amplifiés par effet Kerr ; les processus de filamentation apparaissent principalement dans les zones de forts gradients d’intensité [92]. Ces anneaux se brisent ensuite en taches lumineuses par instabilité modulationnelle azimutale. Cela donne naissance à de nombreux filaments qui se développent vers le centre au cours de la propagation.

5.3 Etude en fonction de la concentration de coumarine

Coumarine concentrée contre éthanol pur

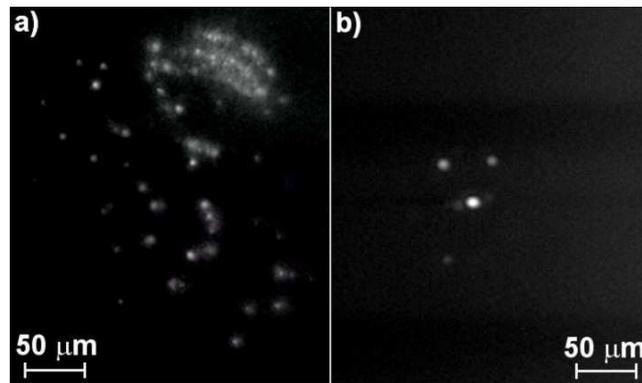


FIG. III.12 – *Intensité mesurée en sortie de cellule, (a) éthanol pur comparé à (b) coumarine*. La concentration de la coumarine est de 4 g/L , et le diaphragme D_2 est fermé.

La figure III.12 montre que l’ajout d’une forte concentration de coumarine, par absorption à 2 photons de l’énergie incidente, détruit la plupart des filaments. Leur diamètre caractéristique, toujours de quelques microns, se trouve élargi : on passe de $8 - 10\ \mu\text{m}$ dans le cas de l’éthanol pur, à $15 - 20\ \mu\text{m}$ avec la coumarine concentrée. On peut expliquer cela par le fait que l’absorption non-linéaire de la coumarine stoppe l’effondrement du faisceau à des intensités inférieures à celle atteinte dans l’éthanol pur.

On note de plus une organisation des filaments en une sorte de réseau, avec une distance entre filaments de l’ordre de $50 - 100\ \mu\text{m}$. L’existence d’une distance caractéristique entre filaments a déjà été rencontrée dans d’autres études. Cyril Cambournac, durant sa thèse, a observé des filaments équidistants (de l’ordre de $100\ \mu\text{m}$), avec une géométrie à une dimension, dans une solution de CS_2 [93, 94]. Cette équidistance est rendue possible par l’existence d’interactions entre les filaments, comme l’attraction, la fusion ou la répulsion [71]. On peut interpréter ce

même résultat avec le point de vue suivant : chaque filament, parfois dénommé “pilier optique”, a besoin d’un bain de photons pour s’alimenter, phénomène responsable d’une distance minimum entre filaments [95].

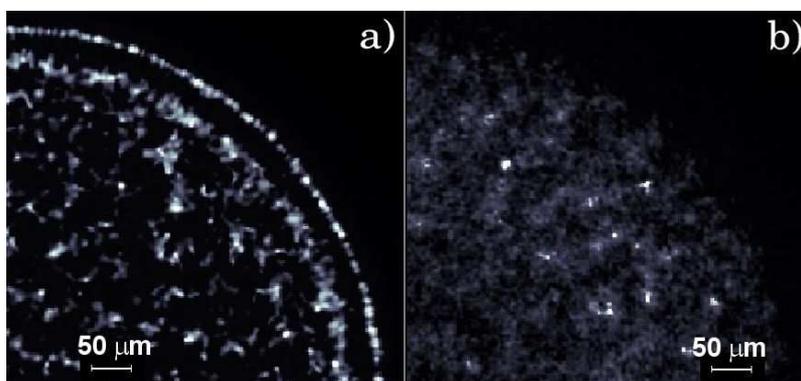


FIG. III.13 – *Simulation de l’intensité en sortie de cellule : (a) éthanol pur comparé à (b) coumarine.* Simulation de l’intensité en sortie de cellule après propagation d’un faisceau super-gaussien. Pour comparer à la figure III.12, la concentration de la coumarine est 4 g/L.

La modélisation de la propagation par une impulsion supergaussienne dans une cellule d’éthanol, puis de coumarine concentrée, est présentée figure III.13. On retrouve les principaux faits expérimentaux, à savoir que le nombre de filaments diminue, diminution directement due à l’absorption non-linéaire de la coumarine qui empêche la filamentation pour de “faibles” intensités. Le diamètre caractéristique des filaments est compatible dans les deux configurations, et la distance inter-filaments aussi.

Etude en fonction de la concentration

Quand la concentration en coumarine diminue, l’intensité et le nombre de filaments augmentent. Les filaments sont positionnés au même endroit, et de façon particulièrement spectaculaire lorsqu’on superpose les clichés. Certains filaments se “divisent” en plusieurs petits les uns à côté des autres.

5.4 Stabilité coup par coup

Un des problèmes rencontrés lors de ma thèse a été la mauvaise stabilité temporelle du laser, due, entre autres, au système 20 Hz pompé par flash^d. Or malgré cette instabilité temporelle de

^di.e. les amplificateurs régénératif et papillon sont pompés par un laser Yag lui-même pompé par lampes flash, installation beaucoup moins stable qu’un système kHz pompé par diode.

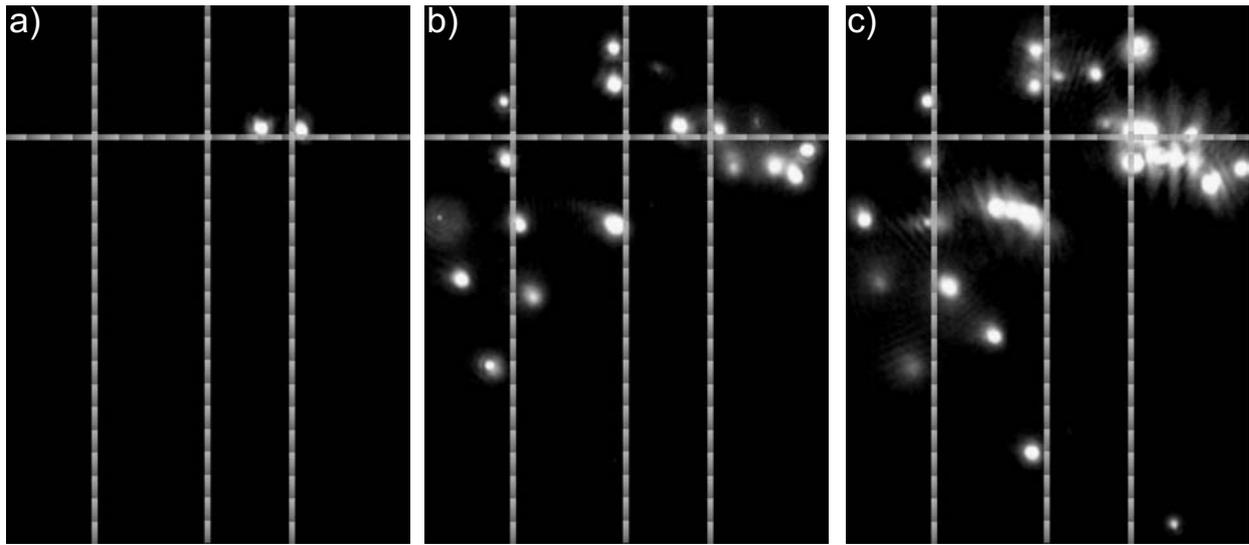


FIG. III.14 – *Etude en fonction de la concentration.* De gauche à droite : concentrations de $2,8\text{ g/L}$, $1,3\text{ g/L}$ et $0,7\text{ g/L}$. Afin de faciliter la comparaison, la même densité a été utilisée pour chaque enregistrement. L'image de droite est donc saturée. La grille est ajoutée pour plus de lisibilité.

la source, la position des filaments reste très stable, comme on peut le voir sur la figure III.15. Ce qui change d'une impulsion à l'autre, c'est l'énergie des filaments, voire le fait qu'ils "s'éteignent ou s'allument", et non leur position. Cette propriété remarquable reste vraie sur des temps longs, puisque la figure en champ lointain est stable lorsqu'on la moyenne sur plus de 30 secondes, soit plus de 600 impulsions femtosecondes (voir partie 6).

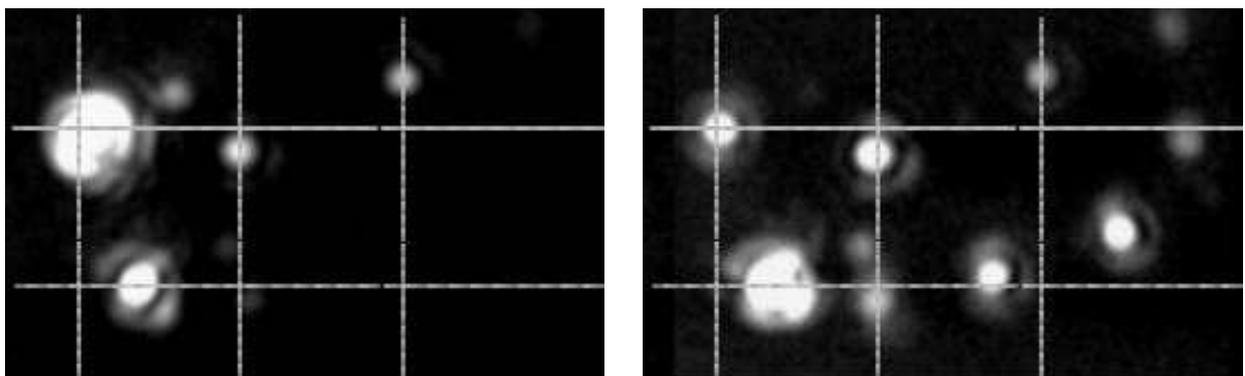


FIG. III.15 – *Stabilité coup par coup.* Deux enregistrements pris à 30 secondes d'intervalle, sans aucune moyenne. La cellule contenait de la coumarine concentrée ($\simeq 4\text{ g/L}$), diaphragme fermé. Le système de double anneaux dû au bord franc du diaphragme est ici bien visible. La grille est ajoutée pour plus de lisibilité.

5.5 Etude en fonction de la distance de propagation dans la cellule

Au sein d'un filament, l'intensité est très importante. Dans un milieu transparent auquel on ajoute un peu de colorant, la fluorescence proviendra donc principalement des filaments. On accentue la visibilité des filaments si le colorant absorbe à deux ou trois photons, l'effet devenant alors non-linéaire. Cette technique a été empruntée à la microscopie à plusieurs photons, pour laquelle l'effet non-linéaire ne rend visibles que les zones de fortes intensités, avec un grand contraste. Cette méthode permet ainsi de visualiser transversalement des filaments dans un liquide transparent [67, 76, 96, 97]. Cette mesure aurait été rendue délicate par la largeur de la cellule et par le nombre de filaments en jeu : on ne peut donc pas comparer de résultats expérimentaux avec la simulation pour le profil longitudinal.

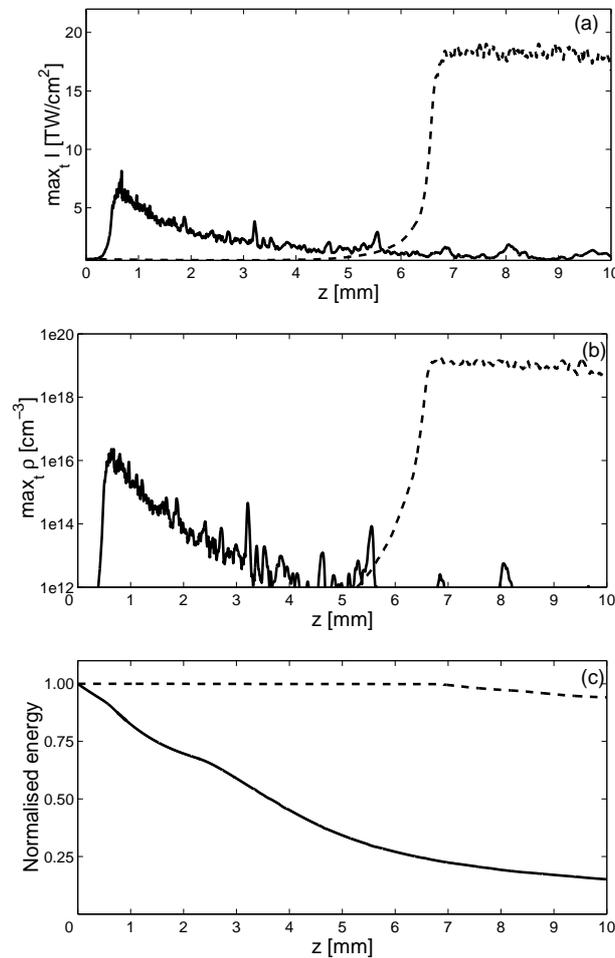


FIG. III.16 – *Intensité maximale, densité électronique et énergie dans la cellule en fonction de la distance de propagation dans la cellule. En pointillés, simulation dans l'éthanol pur, et en trait plein, simulation dans la solution de coumarine concentrée. Il s'agit de la propagation d'un faisceau entrant supergaussien. D'après A. Vinçotte [81].*

Les résultats des simulations (figure III.16), montrent que dans l'éthanol pur, le faisceau

auto-focalise jusqu'à atteindre des intensités crêtes de l'ordre de $18 TW.cm^{-2}$ au voisinage du foyer non-linéaire situé à $z \simeq 7 mm$ de l'entrée de la cellule. L'effondrement est stoppé par la génération d'un plasma, dont la densité électronique atteint $10^{19} W.cm^{-2}$. On visualise ensuite très bien la balance entre la focalisation due à l'effet Kerr et la défocalisation du plasma, avec une intensité maximale et une densité de plasma alors quasi-constantes. La création de plasma engendre de faibles pertes, de l'ordre de 6%, par ionisation multiphotonique.

Dans la solution de coumarine, l'absorption à deux photons est responsable d'une perte énergétique beaucoup plus importante (de l'ordre de 80%), et commence dès le début de la propagation. Ce phénomène dépendant de l'intensité, la perte est plus marquée au maximum de l'intensité, i.e. au foyer non-linéaire. Ce foyer est d'ailleurs nettement rapproché, $z \simeq 0,8 mm$, principalement en raison de la plus forte valeur de n_2 , due au fort $\chi^{(3)}$ de la coumarine. Ensuite, densité de plasma et intensité laser diminuent. L'effet Kerr est ici en compétition avec deux phénomènes non-linéaires : absorption à deux photons et création de plasma. Aucun équilibre dynamique n'est atteint, et les "filaments" divergent à partir de ce foyer non-linéaire. Cela peut aussi expliquer le fait que les "filaments" apparaissent plus larges en sortie de cellule.

5.6 Propagation d'un faisceau rectangulaire

Lorsqu'on remplace le diaphragme circulaire par une fente verticale, on crée deux lignes de gradients d'intensité, qui vont être le lieu privilégié de la filamentation. Cela s'observe très bien sur la simulation de la propagation d'une fente, figure III.17. Dans ce cas, la fente est modélisée par un faisceau supergaussien dans la direction x (1 mm de large), et gaussien dans la direction y . Expérimentalement, on observe aussi deux lignes verticales de filaments. Par contre, celles-ci sont séparées de $210 \mu m$, alors que dans la simulation la séparation est voisine de la largeur de la fente d'entrée. Cela n'est pas dû à la focalisation, mais au fait que l'impulsion est fortement coupée par l'un seulement des deux bords du diaphragme (figure III.17). Ce bord diffracte donc l'intensité lumineuse et crée des gradients d'intensité pour chaque pic de diffraction. Dans la théorie de Fresnel, ces pics sont séparés d'environ $\sqrt{\lambda d} \sim 300 \mu m$, avec $d = 11 cm$. Cet ordre de grandeur, qui ne prend pas en compte la convergence du faisceau, est bien compatible avec notre expérience. Le phénomène de diffraction est aussi visible sur la simulation ; afin de faciliter la comparaison, des ellipses ont été ajoutées pour faire la correspondance entre théorie et expérience.

Les gradients d'intensités linéaires ainsi créés sont responsables de la création d'un réseau unidimensionnel de filaments. La mesure de la position des filaments donne une distance moyenne inter-filaments de $55 \mu m$ avec une dispersion des données $\sigma = 7 \mu m$ (voir tableau III.2). Ces résultats sont comparables à ce que l'on avait obtenu à deux dimensions, aux barres d'erreur

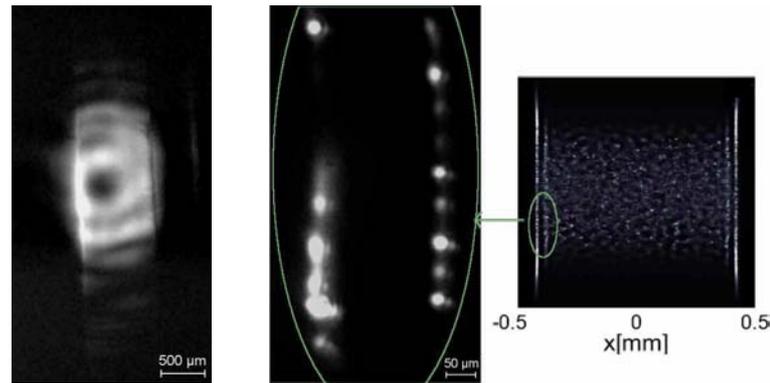


FIG. III.17 – **Filaments dans une solution de coumarine.** A gauche, profil du faisceau au niveau d'une fente verticale de 0,85 mm de large, située 11 cm avant la cellule dans cette configuration. Au centre, les filaments engendrés par ce profil d'entrée. A droite, simulation de propagation dans une cellule d'éthanol pur, pour un faisceau supergaussien de 1 mm de large.

près : 50 – 100 μm avec un diaphragme circulaire (voir paragraphe 5.3 page 56).

Filament n^0	1	2	3	4
Position en μm	505.35549	457.05389	409.95983	341.13005
Distance en μm	-	48.3016	47.09406	68.82978
Filament n^0	5	6	7	8
Position en μm	288.60206	234.26276	174.48953	119.54646
Distance en μm	52.52799	54.3393	59.77323	54.94307

TAB. III.2 – **Position des filaments et distance entre eux, le long de la seconde ligne.** On trouve une distance moyenne de 55 μm avec une dispersion des données de 7 μm .

5.7 Origine de la grande stabilité de position des filaments

Il est important d'insister sur le fait que la position des filaments est très stable, comme on l'a montré au paragraphe 5.4, mais que leur intensité respective varie d'une impulsion à l'autre. La grande stabilité des figures observées en champ lointain, comme on le montrera dans la partie 6, la rend d'autant plus remarquable. Une partie de l'explication a déjà été donnée : les filaments sont quasi-équidistants [95]. Il se forme donc un réseau de filaments qui ont une distance bien définie entre eux. Cette explication n'est cependant pas suffisante, car elle n'interdit pas que les filaments tournent les uns autour des autres. On a montré (au paragraphe 5.6) que la figure de diffraction imposée par un bord d'une fente est responsable des deux lignes de filaments. Dans le cas circulaire, c'est aussi la diffraction par un bord du diaphragme qui impose la position des

filaments. On le voit bien sur la figure III.18, où la diffraction par les bords du diaphragme est bien visible et engendre deux anneaux de filaments. Les autres zones intenses du faisceau ne sont pas capables de créer des filaments visibles : soit parce que les gradients d'intensité sont trop faibles, soit en raison d'une intensité trop faible. Dans ces deux cas, l'absorption non-linéaire de la coumarine est trop importante et empêche la filamentation.

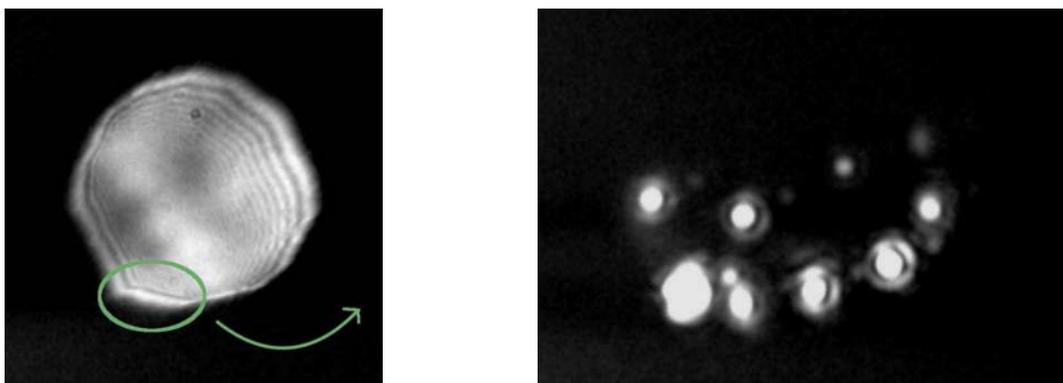


FIG. III.18 – *Mise en valeur du rôle de la diffraction.* Profil d'entrée et filaments en sortie de cellule. La partie entourée dans le profil d'entrée correspond au maximum d'intensité. C'est vraisemblablement la zone qui sera responsable de la création des filaments observés en sortie.

On peut d'ailleurs, en imposant des gradients d'intensité via une figure de diffraction, contrôler la position des filaments. C'est ce qu'a réalisé l'équipe de Chin [76, 98] à l'aide d'une grille, avec comme moyen de contrôle un déplacement de la cellule selon l'axe de propagation, ce qui change la figure de diffraction.

6 Filaments lasants

6.1 Dispositif expérimental

Pour cette seconde partie de l'expérience, le même dispositif expérimental (voir paragraphe 3.1) est utilisé, avec les modifications suivantes :

- Tout d'abord, on utilise les deux impulsions de la ligne pompe-sonde, afin de stimuler l'émission de fluorescence par l'impulsion "dump", dont l'énergie n'excède pas quelques dizaines de picojoules. Afin de ne visualiser que la fluorescence ($\lambda \simeq 530 \text{ nm}$), on coupe l'infrarouge par un filtre BG40 après la cellule.
- Ensuite, on visualise le champ lointain de cette fluorescence sur un écran situé à 2 m de la cellule (figure III.19), que l'on photographie avec un réflex numérique, le Nikon D70, équipé d'un objectif de focale 200 mm et situé à 96 cm de l'écran (avec une parallaxe négligeable).

Les photos sont prises avec un temps de pose proche d'une dizaine de secondes et avec une ouverture f5.6.

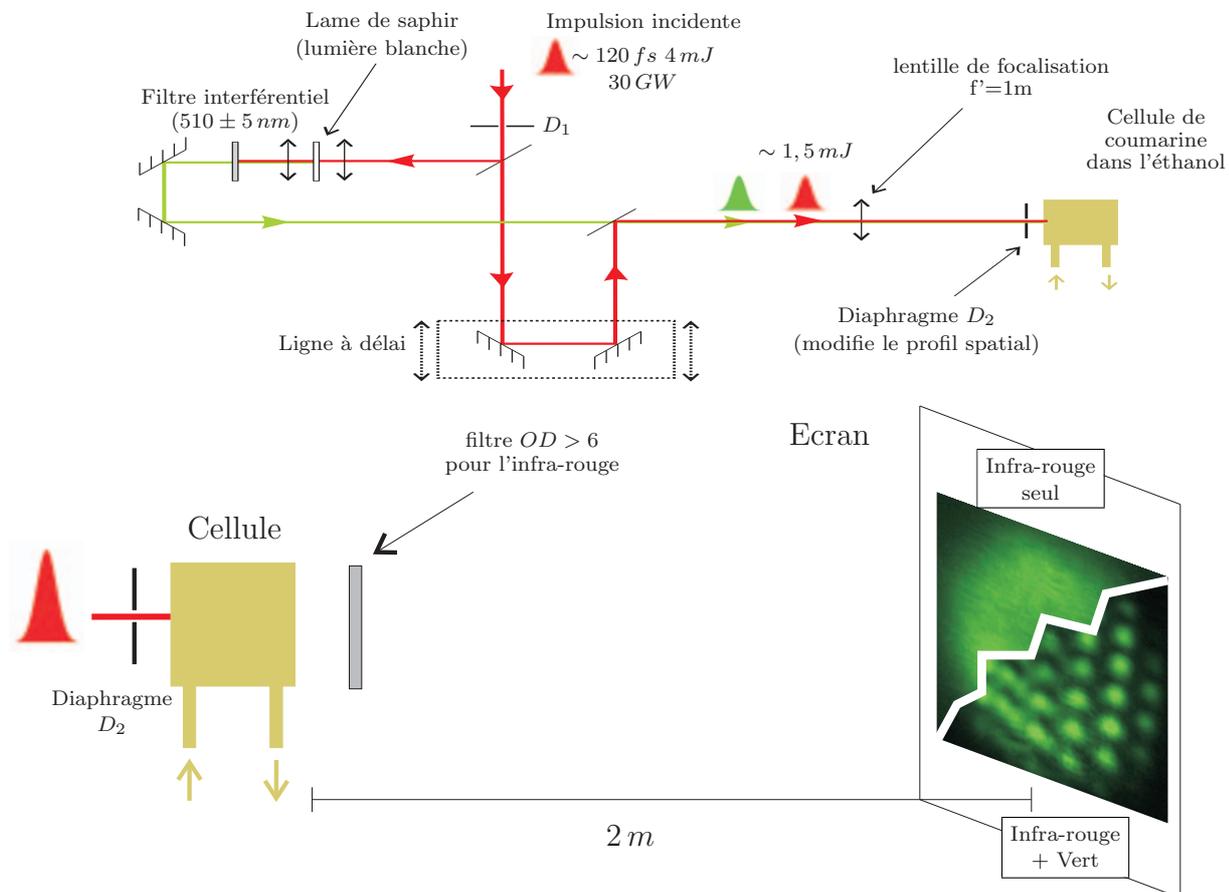


FIG. III.19 – **Dispositif expérimental et visualisation du champ lointain.** On observe en champ lointain la fluorescence émise par les molécules de coumarine, excitées par deux photons à 800 nm . La figure en champ lointain est photographiée en coupant l'impulsion “dump” (Infra-rouge seul) d'une part, et avec les deux impulsions d'autre part (Infra-rouge + Vert).

6.2 Fluorescence en champ lointain

La forte intensité des filaments permet une excitation non-linéaire efficace des molécules de coumarine. Chaque filament constitue donc un milieu à gain au voisinage de 530 nm , maximum de fluorescence des molécules. Lorsqu'une molécule émet un photon, par émission spontanée, celui-ci déclenche l'émission stimulée d'autres molécules. Du fait de la présence de ces “canaux de gain”, la fluorescence est principalement émise vers l'avant ou vers l'arrière : c'est le phénomène d'émission spontanée amplifiée appelé ASE^e. Nous nous intéressons ici à l'émission vers

^eASE : Amplified Spontaneous Emission.

l'avant. Avec l'impulsion pompe seule, on observe une tache d'une dizaine de centimètres sur l'écran. Lorsqu'on rajoute l'impulsion "dump", qui stimule l'émission de fluorescence, on observe une tache de même taille, mais avec des modulations d'intensité qui font penser à une figure d'interférence (voir figure III.20).

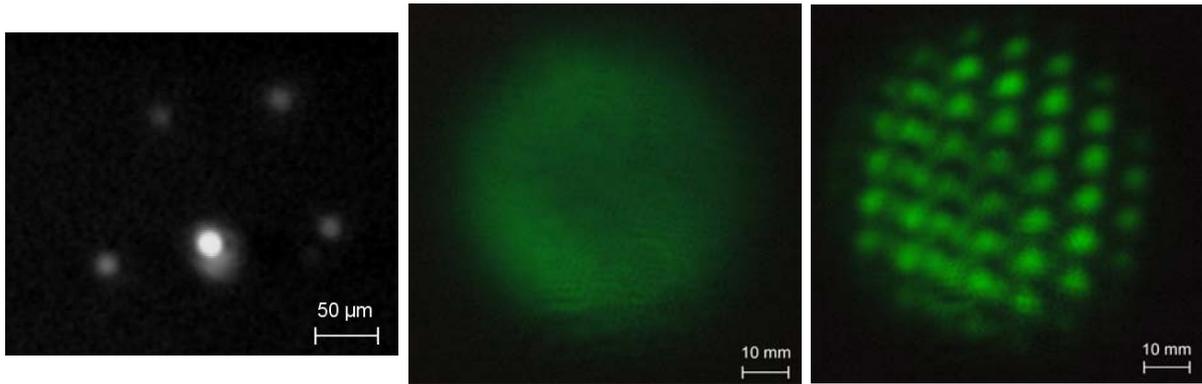


FIG. III.20 – **Filaments et champ lointain sans, puis avec l'impulsion "dump"**. L'image du centre a été prise avec un temps de pose de 25 s. Celle de droite a un temps de pose de 10 s, soit une intégration sur 225 impulsions.

L'interfrange, distance entre deux maxima du champ, est de 11 mm. On peut comparer cette distance à $\frac{\lambda D}{a} = 13 \text{ mm}$, ordre de grandeur du motif de diffraction de Fraunhofer que l'on obtient avec un objet diffractant de taille $a = 83 \mu\text{m}$ à une distance $D = 2 \text{ m}$ d'un écran, pour $\lambda = 530 \text{ nm}$. On peut aussi relier la taille caractéristique des filaments, $18 \mu\text{m}$, qui correspond à la largeur de la tache, $60 \pm 2 \text{ mm}$. Pour comparer, j'ai ensuite simulé la figure de diffraction des filaments (figure III.21). Etant donné les distances en jeu, il s'agit de la diffraction de Fraunhofer : la "simulation" n'est donc qu'une transformée de Fourier (TF) de la figure des filaments. Cette figure est cependant un peu saturée et l'on observe une réflexion qui élargit la tache du filament principal. Il s'agit d'un artefact de l'expérience et j'ai donc dû gommer ces pixels. La figure III.21 présente ces résultats ; on remarque un excellent accord entre la figure d'interférence en champ lointain et la TF des filaments.

Il faut ajouter que l'image des filaments ne correspond qu'à une impulsion laser, alors que la figure d'interférence est une moyenne sur plus de 200 impulsions. Cela prouve une très grande stabilité de la position des filaments. Dans certains cas, quelques filaments s'éteignent (voir partie 5), ce qui se traduit par une baisse du contraste de la figure d'interférence.

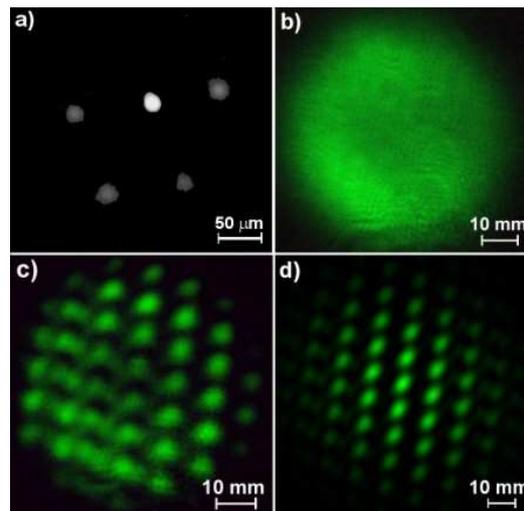


FIG. III.21 – *Configuration complète : Filaments en sortie de cellule, champ lointain et TF des filaments.* La figure des filaments (a) a été retournée pour prendre en compte le grandissement du montage. Le reflet parasite a été gommé pour effectuer la TF (d). On remarque un excellent accord entre théorie et expérience. La luminosité des figures en champ lointain (b) et (c) a été rehaussée.

6.3 Diaphragme rectangulaire en entrée de cellule : fente source

La configuration décrite dans le paragraphe 5.6, lorsque le faisceau est légèrement focalisé sur l'un des bords d'une fente, donne en champ lointain une figure d'interférence présentée figure III.22. On reconnaît la figure obtenue avec deux fentes d'Young. La taille caractéristique de la figure en champ lointain (50 mm) correspond bien, par diffraction, à la taille d'un filament ($20\text{ }\mu\text{m}$). De même, l'interfrange de 5 mm sur la figure d'interférence, correspond à la distance de $210\text{ }\mu\text{m}$ entre les deux lignes de filaments. Par contre, il n'y a pas de rapport direct entre la largeur de la fente utilisée en amont de la cellule, $850\text{ }\mu\text{m}$, et la distance entre les deux lignes de filaments. Ces dernières sont en effet dues, comme pour la figure III.17, à la diffraction par le bord de la fente sur lequel est focalisée l'impulsion.

D'autres expériences, non présentées ici, montrent qu'en fermant la fente, on trouve une interfrange plus petite, contrairement aux lois de la diffraction. Cela s'explique par le fait que lorsque la fente diaphragme complètement le faisceau, et qu'aucun des deux bords n'est alors privilégié : les deux plus forts gradients d'intensité correspondent à chacun des deux bords de la fente, et non plus aux premiers maxima de la diffraction par l'un des bords de la fente ; la distance est alors plus importante qu'avec l'interfrange de la diffraction par un bord.

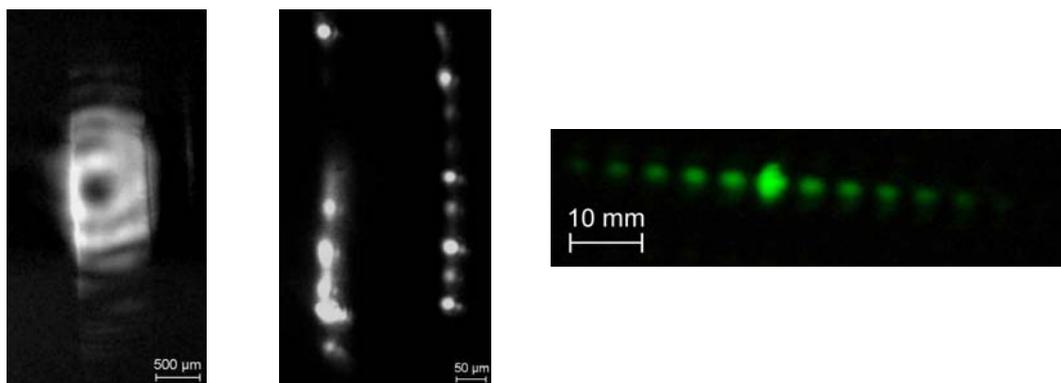


FIG. III.22 – *Profil spatial, filaments et champ lointain.* La figure d'interférence est celle que l'on obtiendrait avec deux fentes d'Young.

6.4 Cohérence des filaments

De nombreuses études ont montré la cohérence de la lumière blanche créée dans plusieurs filaments (couple de filaments, réseau à une ou deux dimensions), en les faisant interférer [77, 99, 100]. Ce n'est pas notre cas ici car la lumière blanche due au filament seul n'est pas observée, elle est absorbée. Dans notre étude, on montre que la phase de la fluorescence émise par chaque filament est aléatoire lorsque l'impulsion "pompe" seule est émise : la figure en champ lointain n'a pas d'interférence. Cela s'explique par le processus d'émission, qui commence par une émission spontanée (donc de phase aléatoire), ensuite amplifiée. Lorsque l'on rajoute l'impulsion "dump", on impose sa phase par émission stimulée ; on observe alors une figure d'interférence en champ lointain. Cela prouve d'ailleurs la cohérence spatiale de l'impulsion "dump", qui provient du continuum créé dans la lame de saphir. La cohérence spatiale d'un continuum de lumière blanche avait déjà été mise en évidence, notamment par M. Bellini et TW Hänsch [101], en regardant directement la figure d'interférence entre deux sources de continuum.

7 Conclusions du chapitre

Lors de cette étude sur la propagation de filaments dans un milieu fortement absorbant, nous avons pu mettre en évidence que seuls quelques filaments survivent. En excitant efficacement les molécules de coumarine, un milieu à gain est créé dans ces zones très intenses. Nous observons la fluorescence en champ lointain. Lorsque l'on rajoute une impulsion "dump", spatialement cohérente et dont la longueur d'onde est accordée à l'émission du colorant, on stimule l'émission au sein de chaque filament avec une phase constante ; ce qui a pour conséquence l'apparition d'une figure d'interférence. Cette figure, observée en champ lointain, est ainsi la transformée

de Fourier de l'image des filaments, enregistrée en sortie de cellule. Sans cette impulsion, la fluorescence démarre aléatoirement dans chaque filament, ce qui brouille la figure d'interférence.

Nous avons remarqué une grande stabilité sur la position des filaments et donc des figures observées en champ lointain. Les deux ingrédients physiques indispensables sont : équidistance des filaments, et gradients d'intensité imposés par la figure de diffraction créée par le diaphragme en entrée.

Chapitre IV

Spectroscopie de molécules biologiques en phase gazeuse

1 Introduction

Dans le chapitre II, nous avons étudié les propriétés photo-physiques du tryptophane et des flavines en phase liquide, et distingué optiquement les flavines par contrôle cohérent. Afin de mieux comprendre la photo-physique des flavines, l'étude en phase gazeuse présente l'avantage de s'affranchir des effets du solvant et permet ainsi une comparaison plus aisée avec les simulations, dont les calculs pour de si grosses molécules nécessitent déjà des simplifications.

1.1 Fragmentation de biomolécules en phase gazeuse

Spectroscopie de masse

En 1985, la première étude spectroscopique en phase gazeuse de molécules biologiques a été réalisée, sur un jet de tryptophane, par le groupe de Levy [102]. Depuis, les nombreuses études spectroscopiques qui ont été réalisées sur des jets refroidis de biomolécules ont apporté de précieuses informations sur leur structure [103, 104]. Les difficultés à créer un jet refroidi de grosses molécules ont cependant restreint ce type d'étude aux petits systèmes. Le développement de sources électrospray et de trappes d'ions (c'est-à-dire de pièges électriques multipolaires), comme le "piège de Paul", ont ouvert la voie à l'étude de systèmes plus complexes. En effet, à l'aide de champs électriques qui permettent de piéger les ions pendant des temps qui peuvent dépasser la seconde, il est bien plus facile de manipuler des ions que des molécules neutres. Ces avantages ont fait le succès de ce type de système, maintenant proposé commercialement, comme

le LCQ-DUO de Thermo-Finnigan. La chimie analytique utilise à profit la spectroscopie de masse pour l'identification des peptides issus de la dissociation des protéines. Une centaine d'articles a ainsi été publiée sur le sujet pour les applications pharmacologiques [105], par exemple pour la caractérisation de drogues [106].

Photofragmentation

La plupart de ces études présente des spectres de masse issus de la fragmentation de molécules par des collisions qui entraînent la cassure des liaisons les plus faibles. La distribution d'énergie apportée aux ions par ces collisions inélastiques est très large. Au contraire, une excitation résonante par laser apporte une énergie bien déterminée par la longueur d'onde des photons : c'est un atout indéniable dans la compréhension et le calcul des phénomènes de dissociation [107]. De surcroît, il est possible de photodissocier sélectivement les biomolécules [108] afin de choisir certains fragments. Des études s'attachent aussi à la photodissociation de conformation particulière de molécules [109].

1.2 Dynamique et cohérence en phase gazeuse

Les chromophores biologiques fortement absorbants, comme le tryptophane et les flavines, présentent des fragmentations en phase liquide lorsqu'ils sont éclairés : ils sont dits photosensibles. La photo-dégradation de la riboflavine ou vitamine B2 pose d'ailleurs de nombreux problèmes, que ce soit en contribuant à l'effet photo-toxique du rayonnement UV sur les cellules [110], ou encore à la dégradation de la bière^a ou du lait de soja [111, 112]. Ces problèmes ont initié de nombreux travaux fondamentaux sur la fragmentation de ces molécules, principalement en phase liquide [113–115]. Mais la compréhension des effets observés est très difficile, en raison de la grosseur des molécules mais aussi des interactions avec le solvant. Etudier expérimentalement la photofragmentation en phase gazeuse permet donc de confronter plus facilement les mesures à d'éventuelles simulations ou calculs quantiques ; en s'affranchissant des interactions avec le solvant, la puissance de calcul requises pour les simulations est en effet inférieure. Enfin, les produits de fragmentation sont moins variés, puisque seules des réactions intramoléculaires peuvent se produire.

La diminution de la décohérence en phase gazeuse, par rapport au liquide, constitue un autre bienfait de l'absence d'interaction avec le solvant. C'est de bon augure pour observer la dynamique moléculaire après une première excitation, voire pour faire du contrôle cohérent sur

^aLa bière contient quelques centaines de ppb de riboflavine.

la fragmentation de biomolécules [65]. Plusieurs expériences ont ainsi mesuré les dynamiques de fragmentation de biomolécules, comme le tryptophane ou la tryptamine, dans des jets ioniques [116, 117]. En outre, *Levis et al.* ont démontré expérimentalement la possibilité de briser sélectivement certaines liaisons à l'aide de champs électriques intenses fournis par des impulsions femtosecondes façonnées [41, 42]. Dans ces dernières expériences, ces champs excitent de façon non-linéaire les molécules, tout en perturbant leurs niveaux électroniques par effet Stark.

1.3 Implication personnelle

La motivation de notre étude consistait précisément dans le contrôle cohérent de la fragmentation des biomolécules, en s'affranchissant de la décohérence liée au solvant comme dans les expériences évoquées précédemment (chapitre II). Une première étape s'est donc attachée à reproduire les expériences de dynamique de la fragmentation du tryptophane ionisé, Trp-H⁺, déjà réalisées sur des jets ioniques [117], mais en piégeant les ions dans une trappe. Cette expérience a été planifiée, en collaboration avec l'équipe "Dipôle Electrique, Biomolécules et Agrégat" (DEBA) du LASIM, avant mon arrivée; j'ai participé à sa réalisation et au dépouillement des données.

J'ai ensuite obtenu, avec Thibault Tabarin, des résultats préliminaires intéressants sur la photodissociation des flavines en régime nanoseconde. Ces résultats encourageants ont inauguré une campagne de mesures en femtoseconde, sur laquelle ont notamment travaillé Benoît Thuillier, Thibault Tabarin, Véronique Boutou et moi-même. D'un point de vue expérimental, l'interprétation des résultats a été discutée de façon collégiale entre les membres des deux équipes.

2 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est constitué de deux parties principales : d'une part la trappe optique apportée par l'équipe DEBA, d'autre part le laser femtoseconde et sa ligne pompe-sonde, toutes deux apportées par notre équipe. Je ne décrirai que partiellement la trappe ; pour plus de détails, je renvoie aux travaux de *Talbot et al.* [118].

2.1 Trappe optique

La trappe optique que nous avons utilisée est un dispositif commercial LCQ-DUO de Thermo-Finnigan, adaptée pour permettre une excitation par laser. La figure IV.1 schématise ce piège électrique quadripolaire particulier. On remarque la présence d'un second laser (coupé pendant l'acquisition) qui permet d'aligner correctement le faisceau incident dans la trappe. Un

alignement fin du faisceau sur le nuage d'ions est ensuite effectué en optimisant le taux de fragmentation.

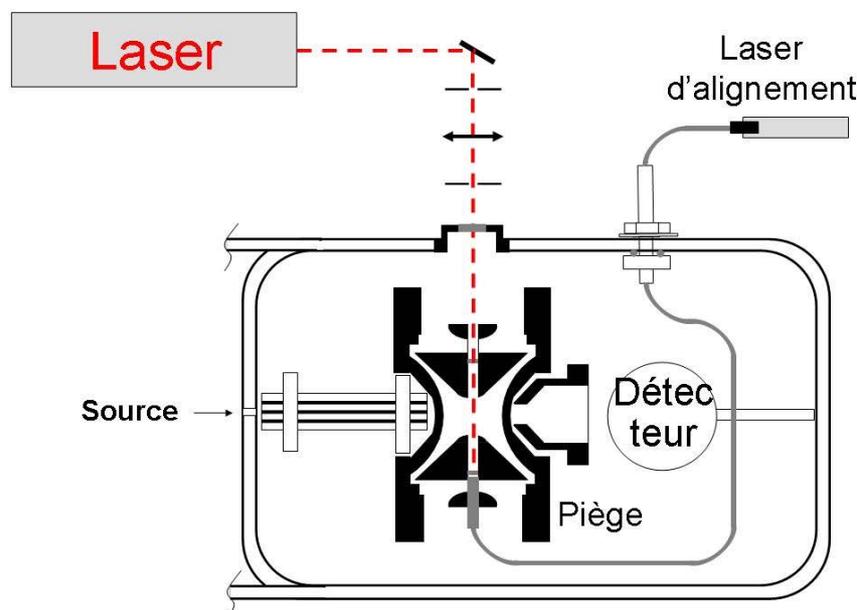


FIG. IV.1 – *Trappe optique*. Le laser est focalisé avant le centre de la trappe, pour illuminer au mieux le nuage d'ions.

L'ionisation des biomolécules, préalablement dissoutes dans une solution acide pour faciliter la protonation, s'effectue à l'aide d'une source à électrospray (ESI) dont l'invention a valu le prix Nobel de Chimie à John Fenn en 2002 [119]. Les ions créés sont guidés par des octapôles jusqu'à un piège quadripolaire, à l'aide de potentiels électrostatiques bien contrôlés. De plus, on peut isoler les ions qui ont une masse bien déterminée (ou plus exactement un rapport masse sur charge bien déterminé). Dans le piège, les ions peuvent être accélérés pour subir des collisions avec les molécules d'hélium environnantes, qui entraînent leur fragmentation : on parle de dissociation induite par collision (CID). Ils peuvent aussi subir une dissociation induite par laser (LID). En ajustant ensuite progressivement les tensions des pôles, on peut éjecter successivement les fragments ioniques de masse croissante, puis les détecter [120]. On obtient alors un spectre de masse, qui montre le nombre de fragments ioniques en fonction de leur masse divisée par leur charge (m/z).

2.2 Dispositif pompe-sonde

Le dispositif expérimental pompe-sonde est similaire à celui de l'excitation des flavines ou du tryptophane en phase liquide présenté au chapitre II. Les ions flavines (respectivement try-

trophanes) sont excités par une impulsion à 405 nm (respectivement à 270 nm) suivie d'une impulsion à 810 nm. Ces deux impulsions sont alignées avec soin et focalisées par une lentille de 50 cm de focale au niveau du nuage d'ions. Un obturateur, commandé par le logiciel du spectromètre de masse, permet d'éclairer le nuage d'ions avec le faisceau laser pendant un temps bien contrôlé, avant d'analyser les fragments. Nous avons choisi d'illuminer le paquet d'ions flavines pendant 50 ms (i.e. une impulsion laser), afin de s'assurer que chaque ion ne soit irradié que par une seule impulsion, tout en constatant que les résultats ne changent pas qualitativement pour une illumination plus longue (jusqu'à une seconde)^b. La photofragmentation du tryptophane étant beaucoup plus faible que celle des flavines, nous avons illuminé le paquet d'ions Trp-H⁺ pendant plus d'une seconde.

Les expériences ont aussi été réalisées avec un laser nanoseconde par l'équipe DEBA, en utilisant le même principe expérimental, mais avec une excitation à une seule impulsion.

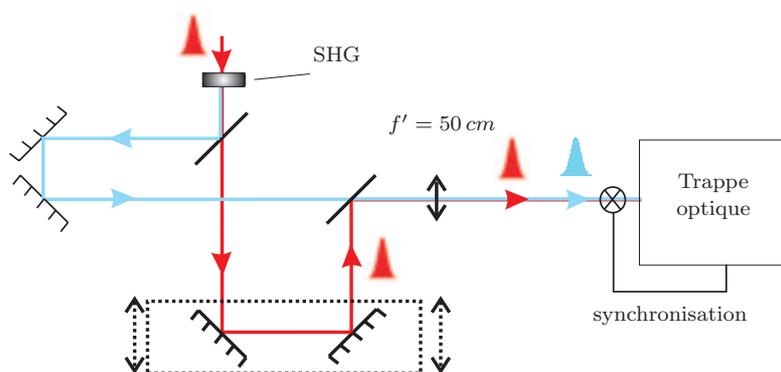


FIG. IV.2 – *Dispositif pompe-sonde pour la dissociation des flavines.* Pour le tryptophane, un cristal tripleur est ajouté de façon à exciter à 270 nm, et non à 405 nm comme pour les flavines.

3 Photodissociation du tryptophane

3.1 Fragmentation avec une seule impulsion

La fragmentation en phase gazeuse des peptides présente un intérêt accru depuis les développements d'algorithmes qui utilisent les bases de données d'ADN et de protéines pour identifier les protéines [121]. Comprendre la fragmentation des acides aminés, briques élémentaires des peptides et des protéines, permet de mieux appréhender la dissociation des plus grosses molécules.

^bCette constatation prouve que peu d'ions sont excités par impulsion, ou que les ions excités n'absorbent pas à la même longueur d'onde.

Le spectre de masse du tryptophane (figure IV.3), moyenné sur 100 acquisitions, a été effectué en irradiant les ions pendant 2 secondes par des impulsions femtosecondes à 270 nm, de $30 \mu J$ d'énergie par impulsion. 270 nm correspond à la première bande d'absorption du tryptophane neutre, mais *Nolting et al.* [122] ont montré que la protonation change peu les propriétés électroniques de la molécule pour les premiers niveaux excités. Pour comparaison, je présente aussi le spectre de masse, effectué par *Talbot et al.* [118], avec des impulsions nanosecondes irradiant les ions pendant une seconde, avec le même taux de répétition de 20 Hz, la même longueur d'onde, et une énergie par impulsion de l'ordre de $100 \mu J$. Il n'y a pas de différence qualitative avec les spectres effectués après une excitation nanoseconde : les fragments $m/z=146$, 144, 188 et 159 sont les principaux fragments. On constate cependant une fragmentation bien plus importante dans l'expérience réalisée en régime nanoseconde.

Nous n'observons pas, comme *Weinkauf et al.* [123], de voies de fragmentation différentes entre les régimes femtosecondes et nanosecondes, notre excitation étant à un photon à 270 nm et non multiphotonique.

Les schémas de la figure IV.4, proposés par *El Aribi et al.* [124], présentent la structure probable des fragments. Le mécanisme qui donne lieu à la fragmentation consiste d'abord en une répartition interne de l'énergie absorbée, puis en une coupure de certaines liaisons qui se traduit par une perte de fragments, comme $-NH_3$ pour obtenir la masse 188. L'interprétation donnée fait intervenir soit des transferts d'électrons représentés à l'aide de schémas réactionnels [124], soit des croisements vers des orbitales non-liantes représentées à l'aide de courbes de potentiels [121, 125].

La perte d'hydrogène, qui donne lieu au fragment Trp^+ , de masse 204, est spécifique de la LID^c [121]. A l'aide d'une excitation nanoseconde et de la même trappe optique que nous avons utilisée, ce photo-fragment est bien détecté [118]. Par contre, dans nos conditions expérimentales, ce fragment important n'est pas visible (figure IV.5), en raison d'une trop faible fragmentation et d'un pic parent ($m/z=205$) large.

3.2 Dynamique de photodissociation

Nous avons aussi cherché à observer la dynamique de fragmentation à l'aide d'une seconde impulsion, infrarouge, que l'on peut décaler temporellement par rapport à la première. Les premières expériences de ce type, dans le groupe de Juvet, ont montré une dynamique de frag-

^cLID : Dissociation Induite par Laser

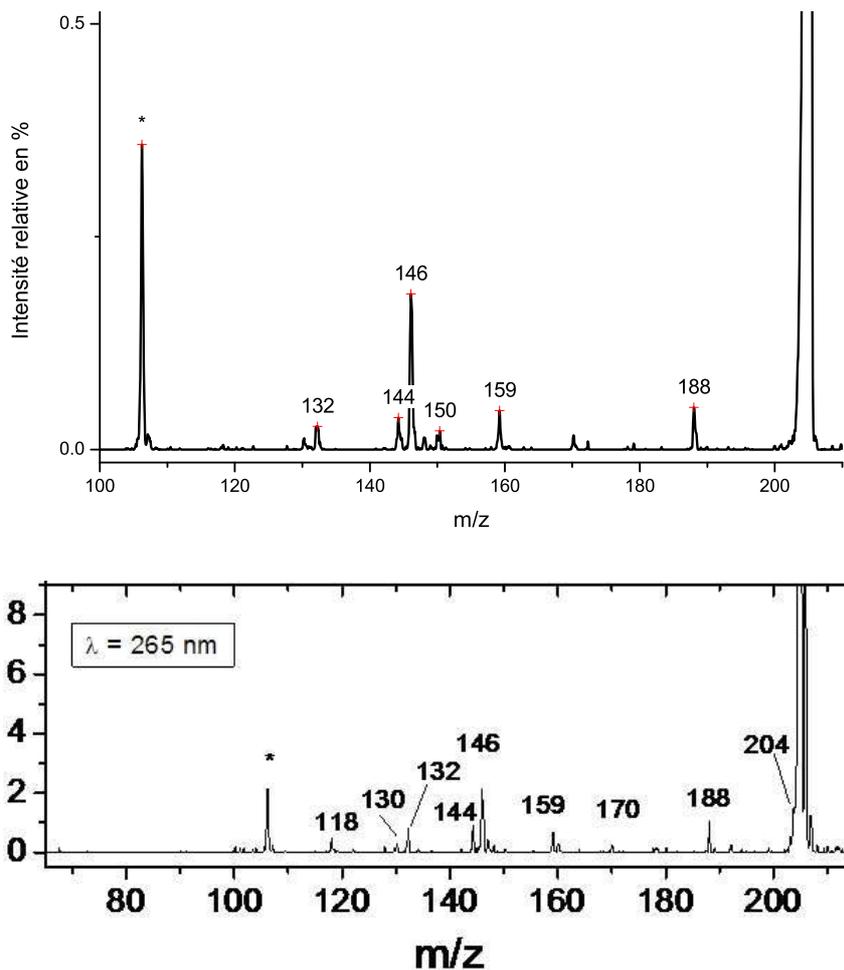


FIG. IV.3 – *Photofragmentation du tryptophane avec des impulsions femtosecondes (à gauche) et nanosecondes (à droite)*. Le pic marqué d'un astérisque provient de la colle qui fixe les fenêtres de la trappe optique; ce n'est donc pas un fragment du tryptophane. La deuxième figure provient de Talbot et al. [118].

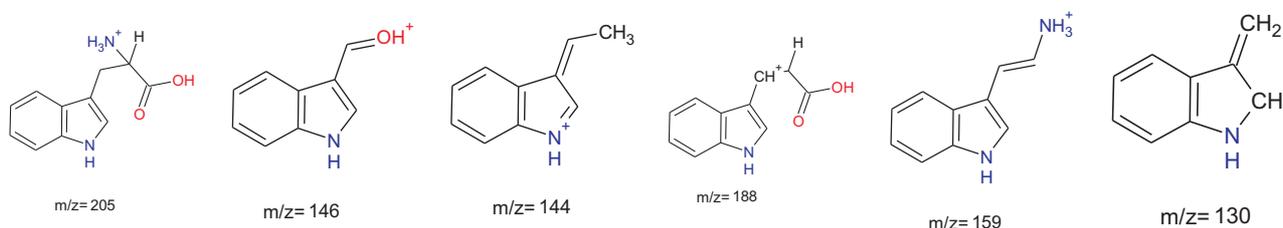


FIG. IV.4 – *Tryptophane protoné et principaux fragments induits par laser*. L'intensité de 100% est donnée pour le pic parent, $m/z=205$.

mentation avec une variation de l'intensité du fragment $m/z=130^d$, sur des échelles de l'ordre

^dLe fragment $m/z=204$ (perte de H) se fragmente à nouveau pour former $m/z=130$; ce dernier étant plus facile à observer, il est un "traceur" de la perte de H.

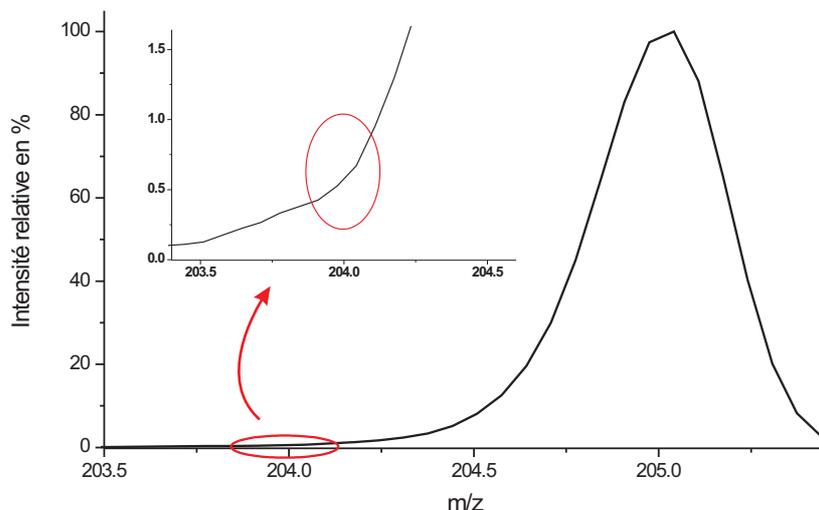


FIG. IV.5 – **Fragments 204 et 205.** La perte d'hydrogène n'est pas visible avec nos conditions expérimentales. Ce schéma met l'accent sur la largeur du pic parent $m/z=205$.

de la picoseconde (figure IV.6) [117]. De plus, lorsque leur seconde impulsion arrive suffisamment longtemps après la première, l'intensité du pic reste constante mais est supérieure à la fragmentation due à l'impulsion UV seule^e : cela s'explique par le surplus d'énergie apportée par la seconde impulsion dans le système. Ces premières expériences, pionnières dans le domaine de la dynamique femtoseconde, ont été récemment reproduites par le groupe de Weinkauff, non plus sur un jet ionique, mais sur des ions piégés en trappe, ici des dipeptides (Tryptophane-Leucine), avec un piège de Paul similaire au nôtre [126]. Néanmoins, dans nos expériences, nous n'avons pas observé de dynamique particulière, ni même d'effet de la seconde impulsion : les expériences étaient trop peu reproductibles pour voir une variation de l'intensité des fragments lorsqu'on ajoutait la seconde impulsion.

3.3 Conclusions de l'expérience

La plus grosse difficulté rencontrée lors de cette expérience est le très faible taux de fragmentation (fragmentation inférieure à 0.5%), ce que l'on voit déjà en comparant nos résultats avec ceux obtenus dans des conditions voisines en régime nanoseconde (fragmentation de l'ordre de 5%). La différence d'énergie étant du même ordre de grandeur dans les deux expériences, 100 μJ en nanoseconde et 30 μJ en femtoseconde, on peut supposer que le couplage du laser avec le pa-

^eL'impulsion infrarouge seule n'est pas assez intense pour provoquer la dissociation de Trp-H^+ ; l'infrarouge qui arrive avant l'impulsion pompe est donc équivalent à une excitation UV seule.

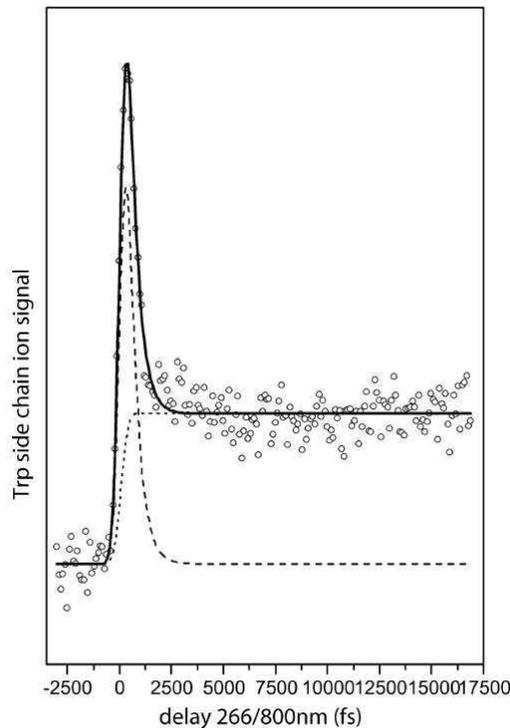


FIG. IV.6 – *Intensité du fragment $m/z=130$ en fonction du délai entre les 2 impulsions*. D'après Kang et al. [117].

quet d'ions est moins bon en régime femtoseconde ; le mode spatial de notre laser femtoseconde, loin d'être gaussien, expliquerait ce mauvais couplage.

Comparons nos résultats avec ceux de l'équipe de Jovet, à Paris, qui observent une dynamique de fragmentation. La première différence concerne le nombre d'ions irradiés par le laser, qui est plus important dans l'équipe parisienne grâce à l'utilisation de paquets d'ions^f. Un second inconvénient de nos conditions expérimentales provient de la difficulté de moyenner beaucoup, en raison du faible taux de répétition de notre laser, 20 Hz - cet inconvénient est absent des expériences du groupe de Weinkauff, leur laser a un taux de répétition de 1 kHz [126]. Le tableau IV.1 récapitule les différences entre les deux expériences.

Face au faible taux de fragmentation, nous avons effectué des calculs d'ordre de grandeur sur le nombre N_{abs} d'ions, qui absorbent un photon par impulsion. Dans l'eau, la section efficace d'absorption à un photon à 292 nm est $\sigma = 1,0 \cdot 10^{-21} m^2$ [24], valeur d'absorption que l'on garde à 270 nm pour Trp-H⁺ en phase gazeuse afin de faire un calcul d'ordre de grandeur. Le nombre d'ions qui absorbent une impulsion d'énergie $E_{imp} = 30 \mu J$ est :

^fL'utilisation d'une trappe d'ions présente cependant d'autres avantages que l'on aurait pu exploiter si l'on avait observé une dynamique, comme la possibilité d'isoler des fragments afin de leur faire subir une seconde dissociation.

	LASIM	<i>Jouvet et al.</i>
Nombres d'ions	~ 600	100 fois plus
Taux de répétition	20 Hz	50 fois plus
Energie par impulsion UV	$30 \mu J$	3 fois plus

TAB. IV.1 – **Comparaison des caractéristiques expérimentales** [118, 121]. Il manquait globalement 4 ordres de grandeur afin d'avoir assez de fragmentation pour espérer voir la dynamique de fragmentation.

$$N_{abs} = \frac{E_{imp} \cdot \lambda}{h \cdot c} \frac{1}{S} \sigma N_{ions} \sim 0,04 N_{ions} \quad (IV.1)$$

avec N_{ions} le nombre d'ions dans la trappe, $S \sim 1 \text{ mm}^2$ la surface caractéristique du piège que l'on suppose égale à la section du faisceau au niveau du nuage d'ions.

Ainsi, dans le cas idéalisé d'une configuration où tous les ions seraient irradiés par tous les photons, seuls 4% des ions seraient excités par une impulsion UV. Dans ces conditions pourtant irréalisables, moins de 25 ions seraient excités par impulsion, en prenant un nombre d'ions dans la trappe de l'ordre de 600. Les ions excités ne se fragmentent pas tous (une partie se désexcite par fluorescence notamment), ce qui explique le faible nombre de fragments observés et la faible reproductibilité des expériences.

4 Photodissociation des flavines

4.1 Expériences préliminaires

Suite à la première campagne d'expériences, l'équipe a fait l'acquisition d'un cristal doubleur plus épais (1 mm) qui permet, dans nos conditions expérimentales, d'atteindre jusqu'à 1 mJ par impulsion bleue à 405 nm, et plus de $100 \mu J$ d'UV à 270 nm^g. Avec ces données, et en choisissant les flavines comme molécules cibles, les mêmes calculs sont bien plus encourageants (voir tableau IV.2), grâce notamment à une section efficace d'absorption plus grande, et une bande d'absorption à la fois à 405 nm et à 270 nm. On atteint alors une absorption de tous les ions, car l'effet de saturation de la transition n'est pas pris en compte.

Fragmentation en régime nanoseconde

^gCes énergies sont mesurées avant l'entrée dans la trappe, juste après les cristaux. Seule une partie pourra illuminer le nuage d'ions.

	Excitation à 270 nm	Excitation à 405 nm
σ en $(mol.L^{-1})^{-1}.cm^{-1}$ [127]	31600	7600
σ en m^2	$5, 2.10^{-21}$	$1, 3.10^{-21}$
Energie en μJ	100	1000
Pourcentage d'ions excités ($\sim \sigma I$)	70%	Tous (saturation négligée)

TAB. IV.2 – **Ordre de grandeur des taux de dissociation attendus, par impulsion.** Ce calcul élémentaire ne prend pas en compte la saturation de la transition et confond donc le pourcentage d'ions excités et $\sim \sigma I$; il suffit cependant à encourager les expériences préliminaires menées en nanoseconde.

Nous avons donc décidé d'effectuer quelques expériences préliminaires avec irradiation des ions par des impulsions nanosecondes. Le dispositif expérimental a été monté par l'équipe DEBA, et Thibault Tabarin a réalisé les expériences préliminaires que nous avons ensuite analysées ensemble. Je ne vais donc présenter ici que deux figures importantes qui nous ont encouragés à planifier une campagne femtoseconde.

L'excitation est réalisée à l'aide d'un OPO pompé par un laser Nd :YAG nanoseconde qui permet de faire varier la longueur d'onde. L'OPO présente par contre un "trou d'émission" autour de 400 nm qui rend difficile les comparaisons avec la seconde harmonique de notre laser femtoseconde *Titane : Saphir*. Par contre, la longueur d'onde 270 nm est facilement accessible, et correspond à la troisième harmonique de notre laser.

Afin de piéger efficacement les ions FMN-H⁺ dans la trappe, la poudre de FMN sodiatée, achetée chez Sigma-Aldrich [128], a été dissoute avec une concentration de $2.10^{-4} mol.L^{-1}$ dans un mélange eau-éthanol (50-50 en volume), avec l'ajout d'1% d'acide éthanoïque. Les ions présents dans la trappe, que l'on peut ensuite isoler sélectivement par masse avant irradiation, sont présentés figure IV.7.

Lorsqu'on irradie en régime nanoseconde les ions FMN-H⁺, de masse 457, on obtient une fragmentation très importante, avec des fragments dont l'intensité atteint 40% du pic parent (figure IV.8). Dans les mêmes conditions, avec le tryptophane, le pic principal atteint 4%. On s'attend donc à une fragmentation bien plus importante que pour le tryptophane avec une excitation femtoseconde, d'autant plus que l'excitation aura lieu à 405 nm.

Identification des fragments

L'identification des fragments est relativement aisée pour la FMN puisqu'on retrouve les masses observées en réalisant une simple coupure de liaison covalente. La figure IV.9 présente

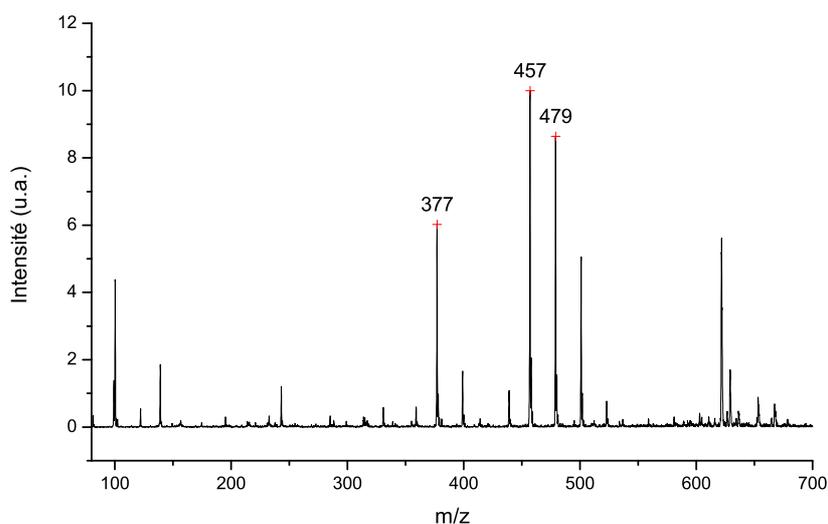


FIG. IV.7 – **Ions présents dans la trappe sans isolation (“full scan”)**. 457 correspond à FMN protonée, 479 à FMN sodiatée, 377 à RbF protonée. Dans la suite, c’est le fragment FMN-H⁺ qui sera isolé et irradié.

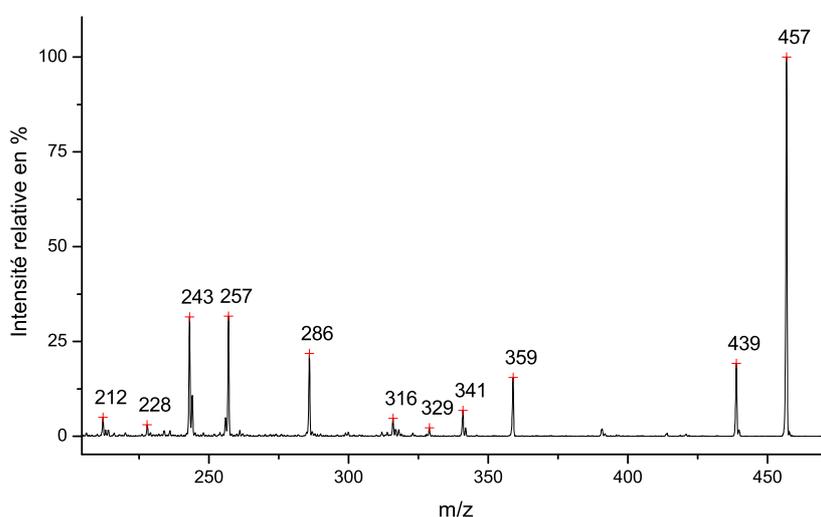


FIG. IV.8 – **Photofragmentation de FMN-H⁺ à 260 nm en nanoseconde**. 500 ms d’irradiation avec des impulsions nanosecondes d’une dizaine de microjoules.

ces cassures pour les principaux fragments obtenus, qui contiennent tous les cycles aromatiques. On peut en déduire que la charge, H⁺, est sur le cycle.

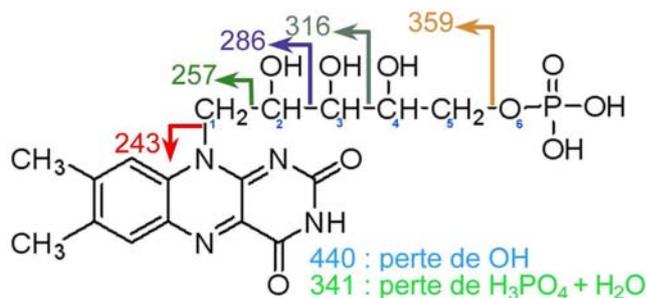


FIG. IV.9 – **FMN : principaux fragments observés**. La flèche indique le fragment détecté, c'est-à-dire celui qui porte la charge positive. Tous ces fragments contiennent le cycle aromatique, c'est pourquoi on suppose que la charge est placée sur celui-ci, plus précisément au niveau de l'azote entre les deux oxygènes, car c'est le site le plus basique.

4.2 Etude pompe-sonde femtoseconde de la photofragmentation de FMN

Comparaison CID-LID

La perte de H_2O ($m/z=439$) constitue la principale dissociation induite par collision, avec, dans une bien moindre mesure, la perte du groupe phosphate H_3PO_4 pour former le fragment $m/z=359$ qui correspond à la perte de H_3PO_4 , c'est-à-dire à la riboflavine moins H_2O (RbF^0). Les spectres LID sont très différents (figure IV.10), avec notamment une forte augmentation du fragment 359, et l'apparition du lumichrome (LC, 243), de la lumiflavine (LF, 256) et de la formylumiflavine, plus un ou deux atomes d'hydrogène (FLF^H , 286 et 287). Quant à la voie de fragmentation qui correspond à la perte d'eau, elle est quasiment supprimée.

Ces résultats ne sont pas surprenants, car les différences entre les spectres de masse CID et LID s'observent sur de nombreuses espèces. En effet, l'énergie déposée dans les ions est bien déterminée par l'énergie des photons [107] et excite sélectivement le cycle aromatique, avant que l'énergie ne soit redistribuée plus largement dans les différents niveaux. En CID, suite aux chocs inélastiques, l'énergie déposée a principalement pour effet de casser la ou les liaisons les plus faibles [129]. Remarquons que d'autres types de dissociation, comme la dégradation thermique des flavines, engendrent des fragmentations encore différentes [130], bien que les deux fragments principaux soient le lumichrome (243) et la lumiflavine (256) : le photofragment $m/z=359$ (perte de H_3PO_4) n'apparaît pas par thermodégradation, à l'inverse du fragment $m/z=377$ (perte de H_3PO_3), qui n'est pas un photofragment.

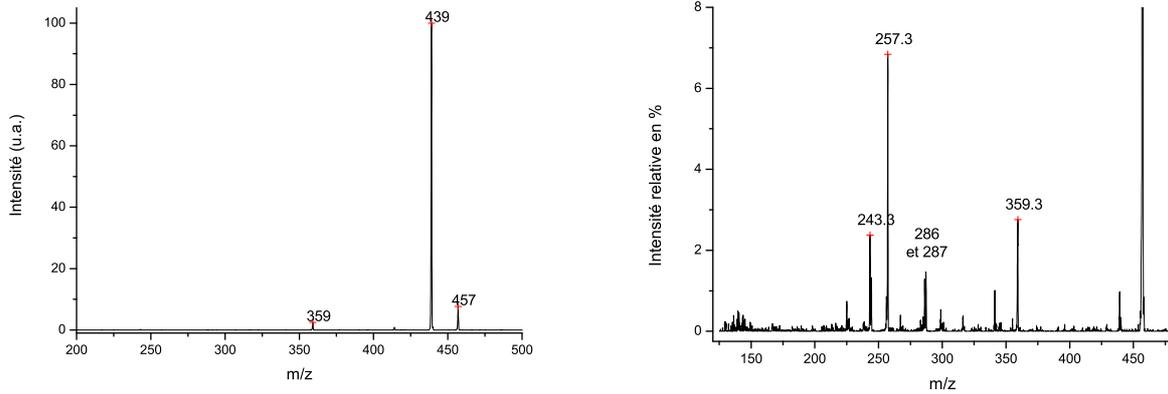


FIG. IV.10 – **Fragmentation de $FMN-H^+$: CID (à gauche) et LID.** La fragmentation par collision, très efficace, entraîne essentiellement une perte d'eau H_2O . La LID a été réalisée avec des impulsions de $100 \mu J$ correspondant à une intensité caractéristique de l'ordre de $5.10^{10} W.cm^{-2}$ au niveau du nuage d'ions.

Action de la seconde impulsion

Lorsqu'on ajoute, après l'impulsion pompe, la seconde impulsion à 810 nm et avec une intensité caractéristique de $2,8.10^{11} W.cm^{-2}$, les voies de fragmentation diffèrent (figure IV.11). Pour quantifier ces variations, on définit, pour un fragment X , le taux de branchement T_X , quantité qui permet de s'affranchir de la fragmentation totale pour s'intéresser plus particulièrement aux voies de fragmentation.

$$T_X = \frac{\text{Intensité du fragment } X}{\sum \text{Intensité de tous les fragments}} \quad (\text{IV.2})$$

Ainsi, la seconde impulsion diminue la production de lumiflavine (257) et de RbF^0 (359) au profit de lumichrome (243) notamment. De plus, FLF^H 286 augmente alors que, de façon surprenante, l'autre forme contenant un hydrogène supplémentaire, FLF^H 287, diminue. Ces différents effets ne dépendent pas du délai entre la pompe et la sonde, dès lors que la sonde arrive après la pompe (délais positifs), sur des temps compris entre 0 et 100 ps. Nous n'observons donc pas de dynamique particulière, comme le mouvement du paquet d'ondes dans l'état intermédiaire. Notons aussi que l'impulsion infrarouge seule n'engendre pas de fragmentation particulière.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons enregistré la variation des taux de fragmentation de LF, LC et RbF^0 en fonction de l'intensité de l'impulsion sonde (figure IV.12). Les observations sont compatibles avec les résultats ci-dessus, et montrent une augmentation de LC et une diminution de LF et RbF^0 avec l'intensité de l'infrarouge. A faible intensité, ces données

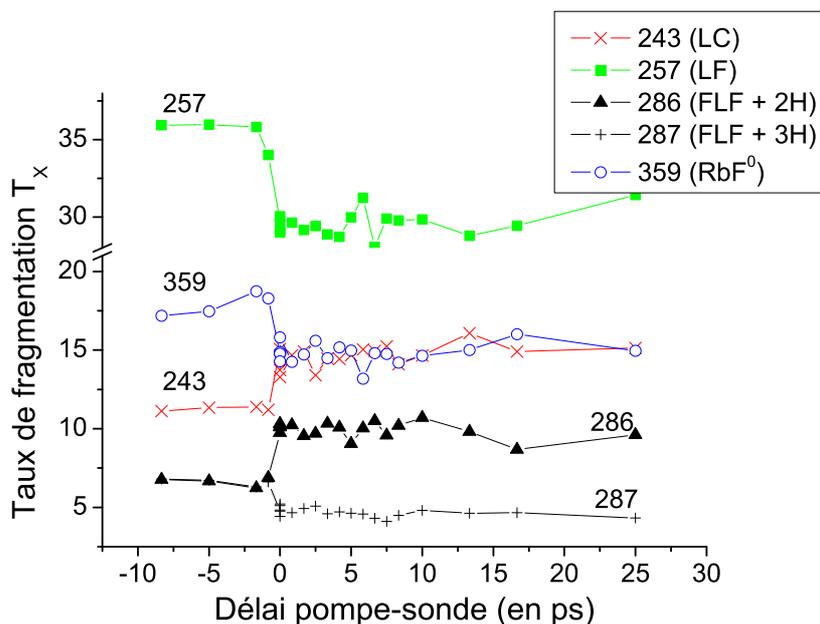


FIG. IV.11 – *Evolution des rapports de branchement en fonction du délai entre les deux impulsions, pompe et sonde.*

sont compatibles avec un processus linéaire, tandis qu'une saturation est observée à plus haute intensité.

4.3 Interprétation des résultats

Le résultat principal de ces expériences est la possibilité de changer les rapports de branchement de la photofragmentation de FMN à l'aide d'une seconde impulsion sonde à 810 nm. Comme on le voit figure IV.13, l'énergie des photons de l'impulsion pompe à 405 nm (24700 cm^{-1}) correspond à la première bande d'absorption de la FMN, c'est-à-dire à la transition $S_0 - S_1$ ($\pi - \pi^*$). La seconde impulsion va amener les molécules excitées vers des états singulets supérieurs, dans la deuxième bande d'absorption (autour de 270 nm). Certaines voies de dissociation sont ainsi favorisées par la transition vers des états excités supérieurs, au profit de la création de lumichrome et au détriment de la formation de lumiflavine.

Il est par ailleurs important de remarquer que ni la fragmentation induite par collision, ni la photo-fragmentation de lumiflavine^h (non présentées ici) ne donnent lieu à la création de lumichrome. De plus, les photo-fragments du lumichrome et de la lumiflavine diffèrent. Ces deux

^hLa trappe permet d'isoler les fragments afin de les photo-dissocier à nouveau ; le spectre des sous-fragments est appelé MS^3 .

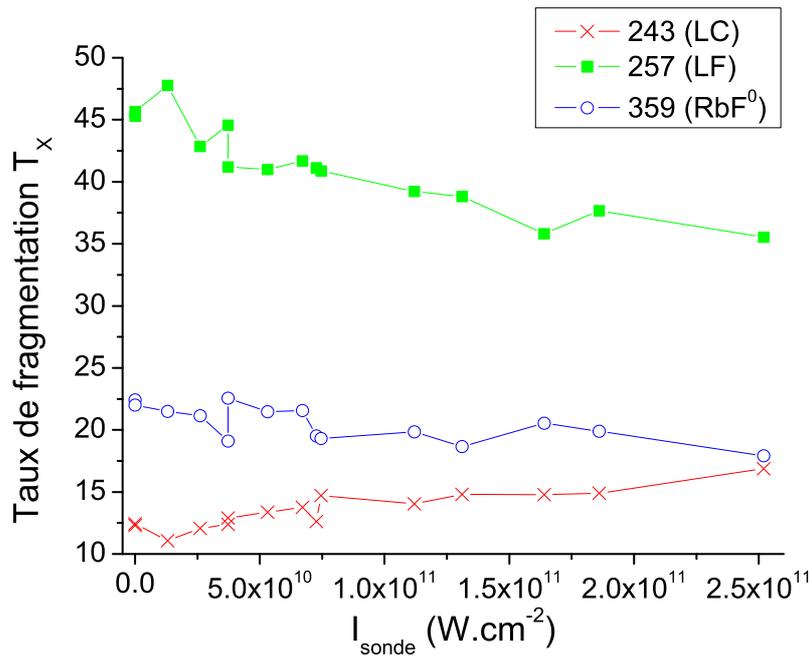


FIG. IV.12 – *Evolution des taux de branchement en fonction de l'intensité de la seconde impulsion.*

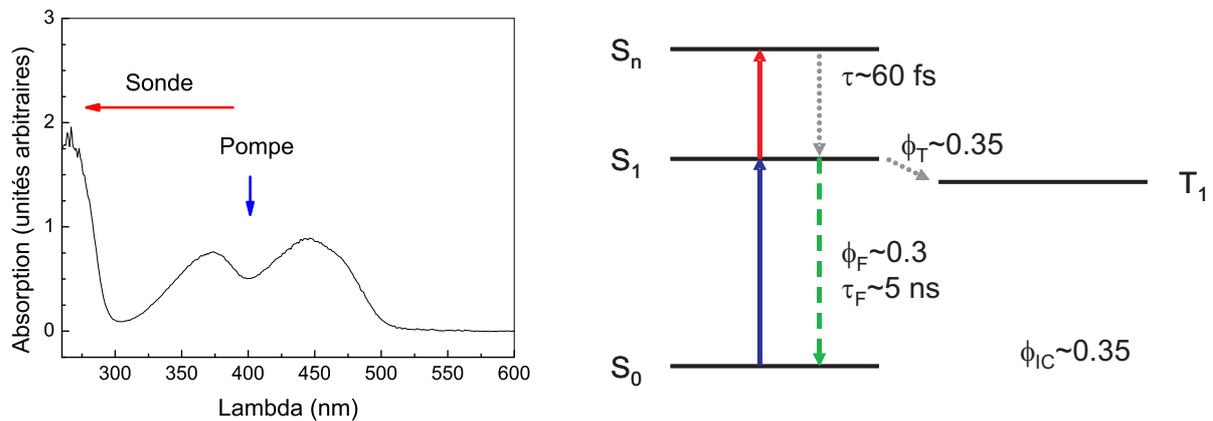


FIG. IV.13 – *Spectre d'absorption en phase liquide de la FMN et schéma de niveaux simplifié associé.* L'impulsion pompe, à 405 nm, excite la molécule dans le premier niveau excité S_1 . La sonde à 810 nm va amener la molécule vers des niveaux excités supérieurs. Le schéma de niveaux simplifié et les taux de branchement sont donnés par Islam et al. [131].

observations prouvent que la création de lumichrome est directe, sans passer par la lumiflavine comme photo-fragment intermédiaire : il n'y a pas de fragmentation en cascade pour former le

lumichrome.

Dans la suite, nous allons plutôt nous focaliser sur les photofragments lumichrome (LC) et lumiflavine (LF) qui sont principalement étudiés en phase liquide [113, 114, 132, 133], ainsi que sur FLF^H en raison du comportement opposé des deux fragments 286 et 287.

Comparaison avec les mécanismes proposés en phase liquide

Les mécanismes de photodissociation sont assez complexes. Les mécanismes proposés par les premières études, résumés par Heelis [134], sont schématisés figure IV.14 .

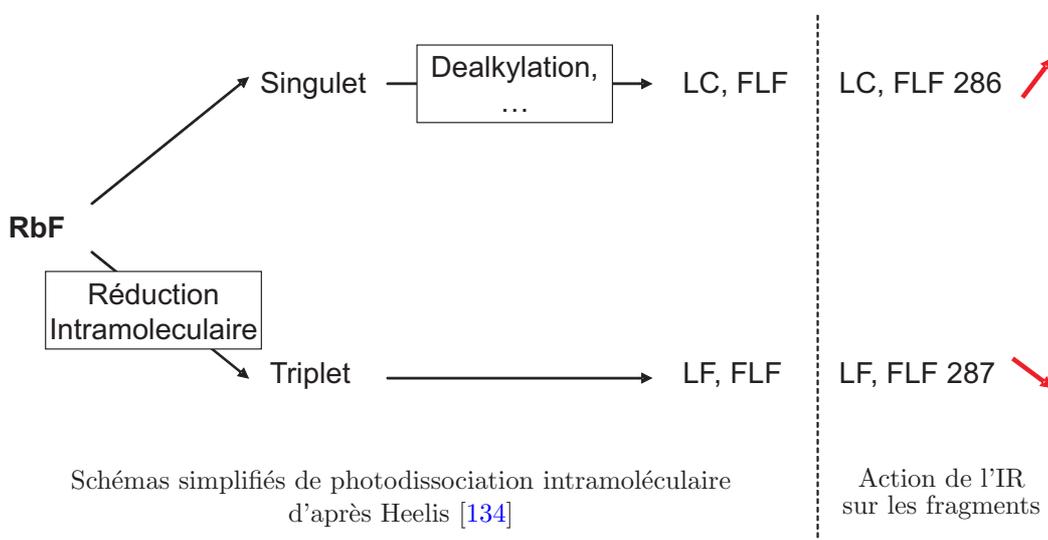


FIG. IV.14 – **Principales voies de dissociation et action de l'impulsion infrarouge sur les taux de fragmentation.** Ces premières interprétations de la photofragmentation intramoléculaire de la riboflavine en phase liquide montrent des similitudes frappantes avec nos résultats, qui nous ont encouragés à proposer deux grandes voies de photodissociation pour $FMN-H^+$ en phase gazeuse.

Ces études vont dans le sens d'une création de LC par le mécanisme de photodéalkylation (c'est-à-dire la perte de la chaîne carbonée) via l'état singulet excité. FLF^H pourrait être formé à la fois par photoréduction et par photodéalkylation [134, 135], ce qui expliquerait le comportement opposé des deux formes de l'ion. De plus, la photoréduction fait intervenir l'état triplet des flavines [136]. Enfin, l'augmentation de la réactivité avec le pH est attribuée à un pKa de 6.5 pour le triplet [135] : cela est compatible avec le fait que la lumiflavine est créée à partir du triplet - la lumiflavine étant le principal fragment en pH alcalin, alors que le lumichrome est majoritaire en milieu acide. Fort de ces conclusions, on peut tenter d'interpréter les comportements que l'on observe de la façon suivante : la seconde impulsion à 810 nm favorise la dissociation par la voie

singulet au détriment de la voie triplet. Ainsi, le lumichrome et une forme de FLF^H (dont les intermédiaires seraient les états singulets excités) sont favorisés par la seconde impulsion, alors que la lumiflavine et l'autre forme de FLF^H sont défavorisées. La seconde impulsion joue donc un rôle similaire au pH dans les milieux liquides en favorisant une des voies de dissociation.

Néanmoins, les résultats avec lesquels on compare nos expériences sont réalisés en phase liquide, et avec la forme neutre de FMN (son pKa étant voisin de 0, en phase aqueuse c'est la forme neutre qui domine). Or le proton peut changer significativement les niveaux électroniques de la molécule, et par suite sa photophysique. Ainsi, la forme protonée du triplet est supposée réagir différemment de la forme neutre, comme le suggèrent les études faisant varier le pH [134].

Par ailleurs, une expérience récente de fluorescence résolue en temps exclut la transformation directe du singulet vers le lumichrome, au profit d'un passage par un état triplet [113]. Les premières expériences, mentionnées par Heelis [134], s'appuyaient sur le fait que des quenchers d'état triplet, comme KI (iodure de potassium), n'influencent pas la production de lumichrome. Ces expériences plus anciennes ne sont cependant pas remises en cause et l'utilisation de KI permet ainsi de classer la photofragmentation en deux grandes voies qui sont similaires à celles que l'on observe en phase gazeuse, et qui sont ici mises en évidence par la seconde impulsion.

Interprétation avec deux états triplets

Après excitation photonique, l'évolution du premier état excité S_1 le long de la relaxation mène finalement au premier état triplet T_1 . Des calculs récents menés par *Climent et al.* [137] ont montré que ce passage se fait par l'intermédiaire d'un état triplet supérieur, T_N , via croisement des énergies potentielles. On peut alors imaginer que les deux voies de dissociation observées proviennent des deux états triplets mis en évidence par cette étude. Des calculs théoriques, s'intéressant à la photodissociation des flavines, devraient être entrepris pour confirmer ou non cette hypothèse.

4.4 Fragmentation de FAD et autres formes chargées de FMN

Nous avons réalisé des expériences sur la fragmentation de la flavine-adénine-dinucléotide protonée (FAD), ainsi que sur les formes sodiées ($FMN-Na^+$) et négatives de la FMN. De façon surprenante, les fragments sont notablement différents de ceux observés avec $FMN-H^+$. Ainsi, les fragments majoritaires de la FMN, lumichrome et lumiflavine, n'apparaissent pas avec la FAD. Pourtant, les propriétés optiques des molécules, dues à leur partie aromatique, sont similaires pour une absorption à 405 nm (l'énergie à 270 nm pouvant par contre être absorbée par les

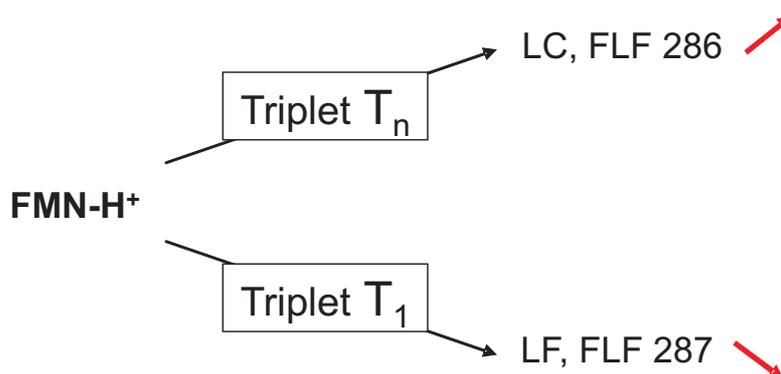


FIG. IV.15 – *Interprétation possible des deux voies de dissociation faisant intervenir deux états triplets.* L'état triplet T_N , plus énergétique que T_1 , est favorisé par l'ajout de l'impulsion infrarouge. Ces conclusions nécessitent des calculs supplémentaires pour approuver ou non cette hypothèse.

deux parties aromatiques de la FAD). Je ne présente, figure IV.16, que le spectre de masse de la fragmentation de FAD avec une identification des fragments majoritaires, sans plus de détails, dans la mesure où l'on s'est focalisé sur la photofragmentation de FMN pour l'interprétation (paragraphe 4.3).

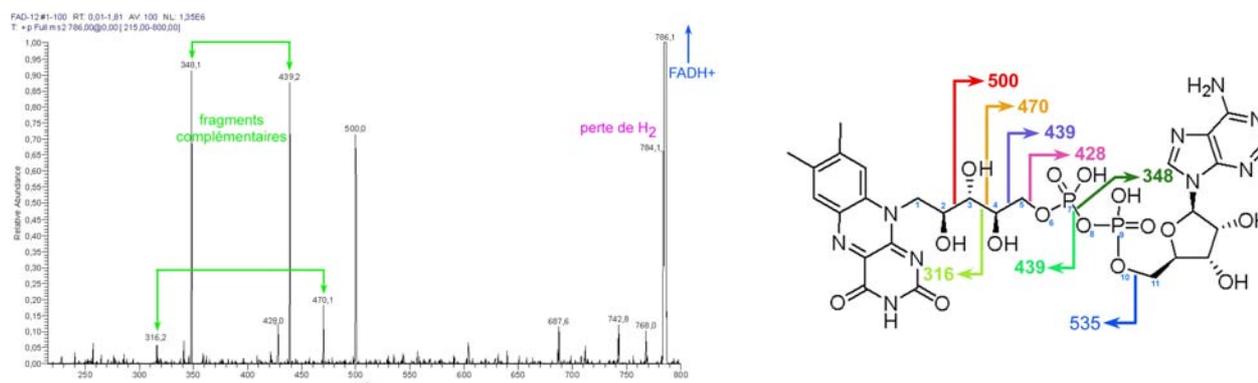


FIG. IV.16 – *Photofragments de FAD avec une irradiation à 405 nm.* La flèche indique le fragment portant la charge, qui peut être sur l'un des deux cycles. Cela explique la présence de fragments complémentaires, pour lesquels la coupure a lieu au même endroit, mais dont la charge est sur l'un ou l'autre cycle.

4.5 Corrélation des spectres

Chaque spectre présenté dans ce chapitre est une moyenne sur 100 acquisitions, afin de réduire l'influence des diverses sources de bruit. Il devrait être possible de tirer parti de tous ces

spectres pour trouver des informations plus fines. Par exemple, une source de bruit peut venir des fluctuations d'intensité du laser ; lorsque l'intensité des impulsions à 405 nm augmente, on peut s'attendre à une augmentation des photofragments, et à une diminution du pic parent. Toutefois, nous n'avons mesuré aucune corrélation entre les différents photofragments, ni entre les photofragments et le pic parent, ce qui signifie que la principale source de fluctuations n'est ni due à l'énergie du laser, ni au nombre d'ions dans la trappe - ce qui se traduirait par une corrélation positive entre le pic parent et les fragments. La principale source de bruit serait due à la répartition des ions dans la trappe, et donc au recouvrement entre le laser et le paquet d'ions, qui varie.

5 Conclusions du chapitre

Dans ce chapitre nous avons montré, à l'aide de l'exemple du tryptophane, que l'étude de la photofragmentation en trappe nécessite un flux suffisant et un grand nombre d'événements pour s'affranchir des différentes sources de fluctuations.

L'étude des flavines a permis de réunir ces prérequis grâce à une section efficace plus élevée et une excitation à 405 nm qui permet d'avoir plus d'énergie par impulsion. La fragmentation de FMN-H⁺ en trappe met en évidence la formation de lumichrome et de lumiflavine, qui sont observés et largement étudiés en phase liquide. L'excitation des ions par une seconde impulsion sonde à 810 nm favorise certaines voies de fragmentation (création de lumichrome et d'une forme de FLF^H) au profit de certaines autres (formation de lumiflavine et de l'autre forme de FLF^H contenant un hydrogène supplémentaire). Deux voies de fragmentations, pour ces mêmes fragments, ont aussi été décrites dans la littérature, mais en phase liquide et avec la forme neutre. Cette similarité nous a encouragés à proposer un mécanisme faisant intervenir les deux états triplets différents mentionnés dans de récents calculs. Cependant, cette hypothèse devra être vérifiée par d'autres calculs qui s'intéressent spécifiquement à la dissociation.

Chapitre V

Spectroscopie de Plasma Induit par Laser (LIBS) : une approche atomiste de la détection

1 Introduction

Nous avons étudié la détection de bactéries, via leurs chromophores comme le tryptophane, en s'intéressant à leur fluorescence (chapitre II). Le spectre large des lasers femtosecondes a permis de distinguer optiquement d'autres chromophores biologiques : les flavines (chapitre II). Leur intensité a permis à la fois d'observer des effets inattendus faisant intervenir la filamentation en phase liquide (chapitre III), et d'étudier la fragmentation des molécules en phase gazeuse, qui présente l'avantage de s'affranchir des effets du solvant (chapitre IV). Ici, nous utilisons la puissance des impulsions femtosecondes pour l'étude des bactéries par LIBS, puissance qui ne requiert que peu d'énergie du fait de la faible largeur temporelle des impulsions.

1.1 La technique LIBS

La LIBS (ou LIPS) pour "Laser Induced Breakdown (ou Plasma) Spectroscopy" signifie littéralement "spectroscopie de plasma induit par laser". C'est une technique d'analyse qui consiste à focaliser fortement, sur un échantillon, une impulsion laser intense pour créer un plasma, puis à mesurer la lumière émise. Pour connaître la composition atomique de cet échantillon, on détecte et analyse, à l'aide d'un spectromètre, la désexcitation radiative des atomes et des ions fortement excités au sein du plasma [138, 139]. La LIBS, qui a beaucoup progressé depuis son apparition peu après l'invention du laser, a suivi les développements de ce dernier

[140]. Le récent engouement pour la technique (le nombre de publications a augmenté de 400 % en 5 ans) est donc lié à la disponibilité de sources fiables, plus petites et moins coûteuses, mais aussi et surtout à l'apparition de détecteurs d'imagerie très sensibles : les caméras intensifiées (ICCD) [141]. Ces détecteurs permettent également une détection dans une fenêtre temporelle contrôlable, avec une précision de l'ordre de la nanoseconde.

Avantages et inconvénients de la technique

Cette méthode présente de nombreux avantages [139] :

- simplicité,
- rapidité,
- sensibilité,
- préparation d'échantillon non nécessaire,
- possibilité d'une analyse in-situ,
- analyse possible pour tous les états de la matière (gaz, solide, liquide, aérosols),
- méthode de spectroscopie d'émission atomique, assurant à ce titre l'observation de l'ensemble des éléments de la classification périodique,
- détection simultanée de plusieurs éléments.

Par contre, la détection des raies atomiques est fortement gênée par un fort continuum de type corps noir, qui provient de la température élevée du plasma, dépassant fréquemment les 4000 K [138]. Cette émission décroît rapidement : après un temps de l'ordre de la centaine de ns (temps qui dépend de la durée de l'impulsion et de son énergie), les raies atomiques ne sont plus masquées. Cependant, le problème est en partie résolu par les caméras intensifiées qui, en plus d'avoir une grande sensibilité, permettent aussi de s'affranchir du continuum en n'acquérant le signal émis par le plasma qu'une fois ce continuum suffisamment faible. Les véritables inconvénients de la LIBS sont [139] :

- difficulté d'analyse des matériaux inhomogènes (les signaux recueillis ne sont pas nécessairement représentatifs de l'échantillon analysé),
- faible reproductibilité spectre à spectre qui impose de moyennner sur de nombreux spectres,
- et principalement, effet de matrice.

Ce dernier effet limite fortement les potentialités de la technique : le signal d'un élément dépend de la concentration des autres éléments dans le matériau alors même que sa concentration est constante. Il est donc impossible d'effectuer une calibration adaptée à tous les matériaux pour en mesurer les concentrations élémentaires. De plus en plus de travaux sont menés pour

comprendre la génération de plasma afin d'effectuer des modèles qui permettraient de remonter aux concentrations des éléments.

Enfin, il s'agit d'une méthode de surface [142], puisque la matière ablatée provient d'un petit volume, inférieur à 10^{-4} mm^3 . Cet avantage fait de la LIBS une méthode complémentaire des méthodes classiques d'analyse. Néanmoins, la géométrie de l'échantillon doit être suffisamment plate pour que le plasma créé ait les mêmes caractéristiques à chaque impulsion. Notons qu'il est quand même possible d'analyser un matériau dans son épaisseur (sur des échelles de l'ordre du mm) en retirant progressivement la matière par des ablations successives.

Ablations femtosecondes et nanosecondes

La création de plasma résulte d'une ablation de matière qui provoque la formation de trous. La forme de ces trous créés par le laser dans une matrice solide dépend de la largeur temporelle de l'impulsion : les effets sont complètement différents selon si l'impulsion est femtoseconde ou nanoseconde [143–145].

Si la durée de l'impulsion est plus faible que le temps τ d'interaction électron-phonons ($\tau \sim 1 \text{ ps}$), la matière absorbe l'énergie de l'impulsion par ionisation multiphotonique et chauffage des électrons. Notons que les électrons ne sont pas thermalisés avec la matrice ; on doit définir deux températures pour décrire le système. Dans le matériau, les forces d'interactions de type électromagnétique sont très fortes : il se produit une explosion coulombienne qui forme un trou aux bords très nets. Les impulsions femtosecondes sont ainsi de plus en plus utilisées pour la découpe au laser qui nécessite une grande finesse de précision, comme en microchirurgie [146].

Si la durée de l'impulsion est nanoseconde, l'énergie absorbée par les électrons est transférée progressivement aux phonons tout au long de l'impulsion. Les électrons sont thermalisés avec le réseau, et la température très élevée ainsi atteinte provoque une ébullition locale puis l'explosion de la matière : les trous formés présentent des bords très inhomogènes.

L'ablation femtoseconde a aussi pour avantage de créer un plasma moins chaud. Cela se traduit par un continuum moins intense et qui décroît plus rapidement [147, 148]. Certaines études montrent au contraire que la décroissance est aussi rapide dans les deux régimes [149], même s'il est généralement admis que le continuum est environ trois fois plus faible en régime femtoseconde.

Tous les avantages que nous venons d'évoquer font que la LIBS admet de nombreuses applications [150]. On peut citer notamment l'application industrielle pour le contrôle des concentrations de métaux dans les alliages [151, 152], l'archéologie pour l'identification de poteries [153], ou encore l'exploration martienne [154]. De plus, la LIBS peut se réaliser à distance, comme l'a montré l'équipe TéraMobile [155], y compris sur des échantillons biologiques [156].

1.2 Implication personnelle

La LIBS fait, depuis quelques années, l'objet d'une recherche active dans l'équipe "Processus Ultrabrefs et Lasers Intenses" du LASIM. Elle est née au sein du projet TéraMobile avant de s'en séparer pour devenir une thématique spécifique il y a deux ans. J'ai ainsi participé activement à la mise en place du dispositif expérimental et à la réalisation des premières expériences sur les bactéries et les feuilles. J'ai effectué le gros travail de dépouillement des données sur les feuilles. En revanche, je n'ai pas participé aux expériences réalisées avec le laser nanoseconde, ni au dépouillement des données sur les bactéries, réalisé par Matthieu Baudalet, doctorant sur la thématique. Je présenterai donc le travail effectué sur l'analyse foliaire de façon plus exhaustive que celui réalisé sur les bactéries.

2 Dispositif expérimental et traitement des données

2.1 Montage

Un montage expérimental LIBS comprend trois parties : une source laser impulsionnelle, une plate-forme d'ablation et la détection/analyse de l'émission du plasma. Le montage général est présenté figure V.1.

Source laser

La source utilisée est soit le laser femtoseconde présenté chapitre I, soit un laser nanoseconde Nd :YAG commercial (Brilliant de Quantel). Les impulsions femtosecondes ont une énergie caractéristique de 4.5 mJ, une largeur temporelle de 120 fs, un taux de répétition de 20 Hz, et une longueur d'onde centrale de 810 nm. Pour faciliter la comparaison, les impulsions nanosecondes ont une énergie et un taux de répétition identiques, mais une largeur temporelle de 5 ns et une longueur d'onde de 1064 nm.

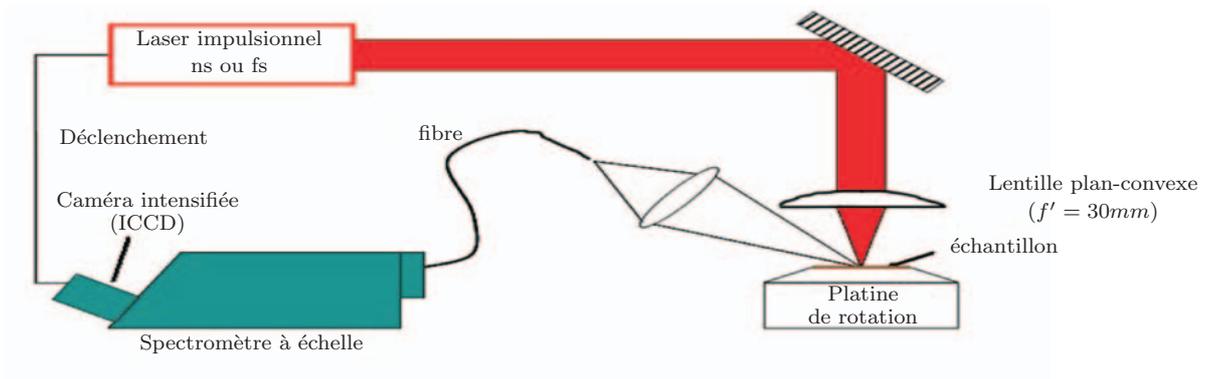


FIG. V.1 – **Dispositif expérimental LIBS**. Le déclenchement permet ici d’acquérir le spectre avec une fenêtre temporelle bien contrôlée après l’impulsion laser.

Plate-forme d’ablation

Les impulsions sont focalisées sur la surface à l’aide d’une lentille plan-convexe de 30 mm de focale ; le côté plan est placé au plus proche du foyer pour minimiser les aberrations géométriques. Néanmoins, le profil spatial du faisceau incident étant loin d’un profil gaussien, la taille du foyer est légèrement inférieure à $100\ \mu\text{m}$ (i.e. loin de la limite de diffraction de l’ordre du micromètre), ce qui implique un flux de l’ordre de $50\ \text{J}/\text{cm}^2$ pour les deux régimes. Pour renouveler la surface après chaque impulsion, l’échantillon est posé sur une platine de rotation. L’émission du plasma est collectée à l’aide d’une lentille en quartz de 50 mm de focale et de 25 mm de diamètre, située à 45° par rapport à l’axe vertical créé par le faisceau incident (voir figures V.1 et V.2). La lentille de collection projette l’image du plasma sur la fibre afin de mieux collecter son émission.

Détection/analyse de l’émission du plasma

La lumière collectée est transmise à un spectromètre échelle (Mechelle, Andor Technology) couplé à une caméra intensifiée (iStar, Andor Technology). Cela permet d’obtenir un spectre bien résolu avec une grande sensibilité sur une large gamme spectrale (de 200 à 950 nm). La résolution est de 0.02 nm à 200 nm, et de 0.04 nm à 950 nm. Le principe d’un spectromètre échelle est de disperser la lumière, avec un prisme dans une dimension, et avec un réseau dans l’autre. Le spectre est ainsi dispersé sur deux dimensions, ce qui constitue une image que l’on peut enregistrer grâce à un capteur CCD. Les différents ordres du réseau sont alors séparés en lignes horizontales sur l’image^a, et on reconstruit le spectre grâce à un logiciel fourni par la

^aCes lignes ressemblent à une échelle lorsqu’on enregistre de la lumière blanche, d’où le nom de “spectromètre à échelle”.

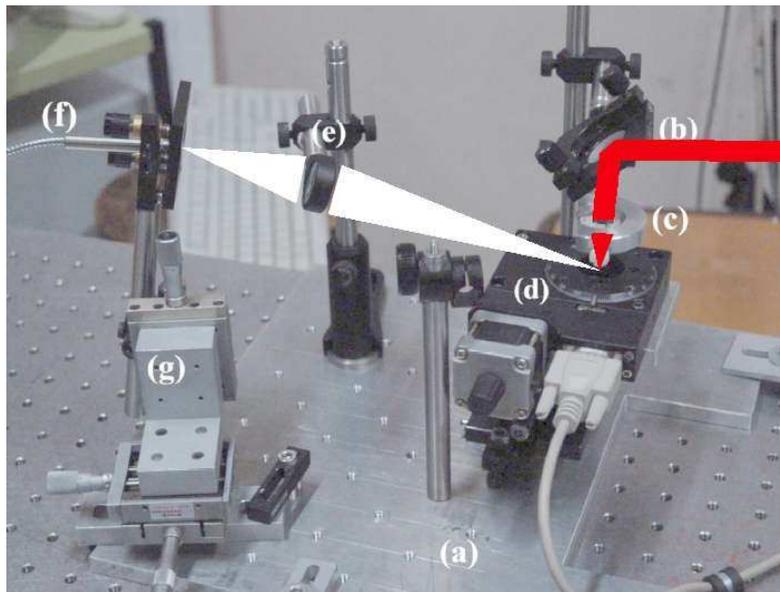


FIG. V.2 – **Plate-forme d’ablation.** le montage est placé sur une plaque carrée (a) de 30 cm de côté pour améliorer la portabilité du dispositif. (b) miroir. (c) lentille plan-convexe de focalisation. (d) platine de rotation motorisée. (e) lentille de collection. (f) fibre optique. (g) positionnement micrométrique de la fibre.

société Andor. La caméra intensifiée permet d’augmenter la sensibilité du dispositif. Ce type de caméra très utilisé pour la vision nocturne, fonctionne sur le même principe d’amplification que les tubes photomultiplicateurs : une photocathode transforme les photons en électrons (effet photoélectrique), électrons qui sont multipliés par des plaques de micro-canaux (effet d’avalanche), et à nouveau transformés en photons par une plaque de phosphore. Les photons sont ensuite guidés par fibre vers une CCD classique. En contrôlant les hautes tensions utilisées pour l’effet d’avalanche des électrons, on peut modifier la sensibilité et aussi paramétrer une fenêtre temporelle de détection, avec une précision inférieure à 2 ns. La calibration en longueur d’onde est effectuée avec une lampe à vapeur de mercure. Calibrer en intensité nécessite d’avoir un corps noir ou une lampe dont l’intensité spectrale est connue. Nous ne disposons pas d’un tel dispositif lorsque les expériences ont été réalisées ; l’équipe vient tout récemment d’en faire l’acquisition. Afin de diminuer les erreurs, chaque spectre est ensuite normalisé par l’intensité de la raie 247.8 du carbone (sauf cas particuliers qui seront précisés).

2.2 Paramètres d’acquisition et barre d’erreur

Chaque spectre consiste en une accumulation de 1000 coups laser, avec une fenêtre temporelle d’acquisition qui commence 100 ns après l’impulsion et qui dure 5 μ s. Cette accumulation est

effectuée en illuminant la CCD pendant une seconde (ce qui correspond à une moyenne sur 20 impulsions), et en répétant 50 fois l'accumulation, afin d'accroître la reproductibilité des mesures. Les moyennes sont donc réalisées sur l'image, et le spectre n'est calculé qu'à la fin. En régime nanoseconde, on doit attendre 200 ns après l'impulsion pour s'affranchir suffisamment du continuum (voir paragraphe 3.2 page 99).

Séries cinétiques

Le logiciel livré avec la caméra permet aussi de faire des séries cinétiques, c'est-à-dire de prendre des spectres avec une fenêtre temporelle que l'on peut décaler à chaque fois. La largeur des fenêtres est choisie à 50 ns, et le pas temporel entre ces fenêtres à 50 ns (de 60 ns à 910 ns après l'impulsion laser). Au-delà, on acquiert toujours sur 50 ns mais avec des pas de 500 ns, jusqu'à 4410 ns. Cela permet de suivre l'évolution temporelle d'émissions atomiques, ioniques et moléculaires.

Barres d'erreur

Une astuce consiste à effectuer des séries cinétiques avec un pas de 0 ns, donc à prendre une dizaine de spectres présentant des conditions expérimentales identiques, afin d'en apprécier la reproductibilité. On estime ainsi les barres d'erreur pour chaque raie, à l'aide de la dispersion des mesures. Les raies les plus faibles, plus sensibles au bruit, présentent donc une dispersion relative plus grande. La barre d'erreur est relativement constante lorsque l'on analyse des échantillons de propriétés physico-chimiques voisines (différentes bactéries par exemple). Nous avons donc effectué une série d'expériences, avec chaque type d'échantillons, pour déterminer les barres d'erreur. Cela dit, elle peut quand même varier un peu en fonction des conditions expérimentales ou de la matrice, et il aurait été préférable de faire ce type de mesures pour chaque échantillon. Lorsque la mesure n'avait pas été réalisée sur un échantillon spécifique, nous avons ainsi été contraints à surestimer ses barres d'erreur, évaluées à partir d'un échantillon similaire.

2.3 Identification des raies

Les raies observées dans un spectre LIBS correspondent à des émissions atomiques ou moléculaires, ou d'espèces ionisées (le plus souvent simplement chargées). Pour identifier les pics, on compare la longueur d'onde mesurée avec la base de données du NIST [157]. La société Applied Photonics présente aussi sur Internet une sélection bibliographique des principales raies reportées dans la littérature pour un grand nombre d'éléments de la classification périodique [158]. Empiriquement,

on a remarqué que les raies observées peuvent être éloignées de 0.08 nm au plus par rapport à la raie tabulée dans la base de données du NIST, ce qui est dû à la précision de calibration du spectromètre. Dans cet intervalle, lorsque plusieurs éléments différents sont susceptibles d'avoir une raie d'émission, on regarde si les autres raies intenses de l'élément ont été enregistrées ou non dans le spectre, pour lever l'ambiguïté. Identifier toutes les raies du spectre de cette façon est un travail fastidieux : j'ai donc réalisé un programme semi-automatique d'identification (voir annexe) qui, à partir d'une détection automatique des pics, fait le lien avec la base de données du NIST.

Fausse raies

Certains pics observés n'ont pas de réalité physique, mais sont des artefacts du spectromètre échelle. En effet, si un pic intense fait une tache large sur la caméra CCD, les ordres inférieurs et supérieurs auront un signal non négligeable qui se traduira par des pics secondaires (ghosts) dans la reconstruction du spectre (figure V.3). La distance entre le pic principal et les ghosts est de l'ordre d'une vingtaine de nanomètres et peut se calculer. Il faut prendre en compte ce phénomène pour éviter des identifications erronées de raies.

3 Etude de bactéries par LIBS

Depuis 2003, les premières études de détection d'échantillons biologiques par LIBS ont été menées [159, 160], en particulier sur les bactéries [161]. Ces études sont encourageantes mais montrent la difficulté de distinguer les échantillons organiques [162], qui sont tous principalement constitués des éléments suivants : le carbone, l'oxygène et l'hydrogène. Notre étude, la première qui étudie la détection LIBS de bactéries avec un laser femtoseconde, montre l'importance des éléments de trace dans la détection.

3.1 Echantillons étudiés

Choix des bactéries

Nous avons choisi d'étudier *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (figure V.4) pour plusieurs raisons. Ces bactéries avaient déjà été étudiées par l'équipe via des méthodes de déplétion de fluorescence (voir paragraphe 1.1 page 13), et présentent l'avantage d'être bien connues, faciles à cultiver, et non-pathogènes pour les souches étudiées. *Escherichia coli* est par ailleurs une

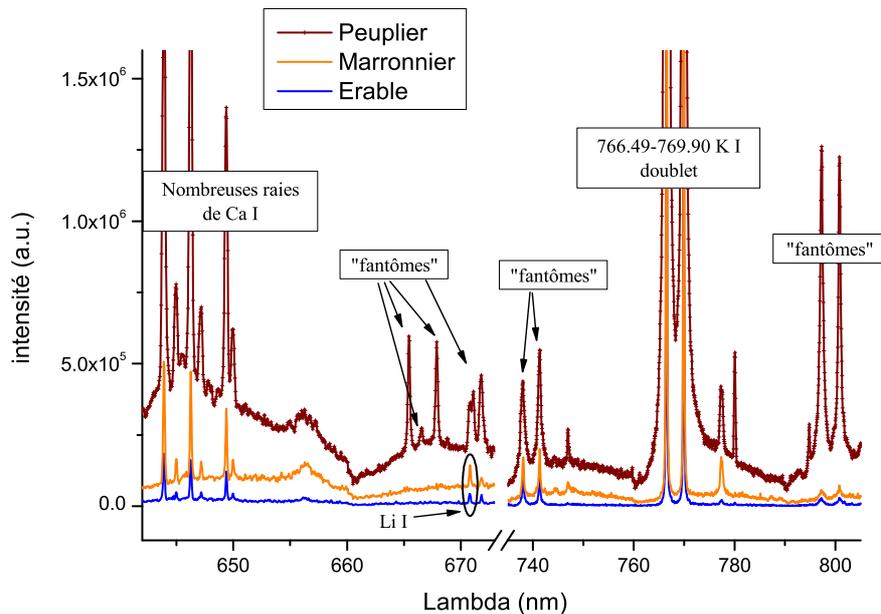


FIG. V.3 – **Présence de raies “fantômes” ou “ghosts”**. On visualise ici les raies “fantômes” du calcium et du doublet du potassium. Le peuplier présente ici bien plus de raies fantômes, car la caméra avait un gain trop important pour cette acquisition.

bactérie commune chez l’homme, puisqu’elle fait partie de sa microflore intestinale. De plus, *E. coli* est souvent utilisée pour simuler *Yersinia pestis* [161], bactérie de la peste, en raison des similarités biologiques des deux bactéries.

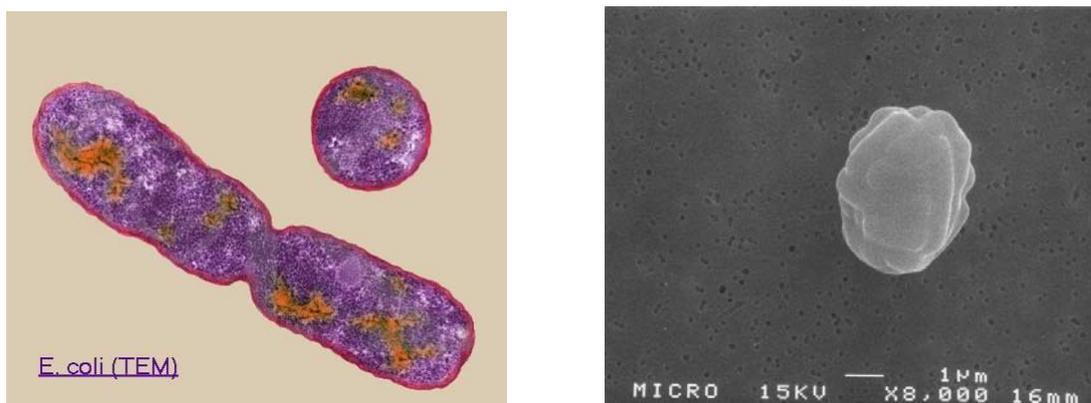


FIG. V.4 – **Images de microscopie électronique de *Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis***. *E. coli* (à gauche) a une taille caractéristique de $2\mu\text{m} \times 0.7\mu\text{m}$.

La préparation des échantillons a été réalisée en collaboration avec Patrick Laloi, du laboratoire "Unité de Microbiologie et Génétique" de l'Université Lyon 1. La reproduction des bactéries est efficace lorsqu'elles sont laissées pendant une nuit à 37°C dans un bouillon de culture. Dit "Bouillon de Luria", c'est un milieu contenant les nutriments nécessaires à la reproduction des bactéries : des acides aminés, de la levure, du chlorure de sodium et de la soude (pour équilibrer le pH). Tous les éléments de la classification périodique nécessaires à leur développement sont ainsi réunis, pour que ce bouillon, à la fin de la nuit, devienne un liquide riche en bactéries.

Le protocole expérimental consistait ensuite à filtrer 20 mL de cette solution, puis à rincer le filtre avec 20 mL d'eau distillée, avant de sécher le filtre chargé au frais. Le rinçage permet d'éliminer au mieux le bouillon de culture riche en minéraux. L'échantillon analysé est donc un filtre, de 4 cm de diamètre, sur lequel est déposée une fine couche de bactéries, d'une centaine de μm d'épaisseur (voir figure V.5). Pour améliorer la tenue mécanique des échantillons, nous avons fixé les filtres sur des plaques de plexiglas avec du scotch double face.

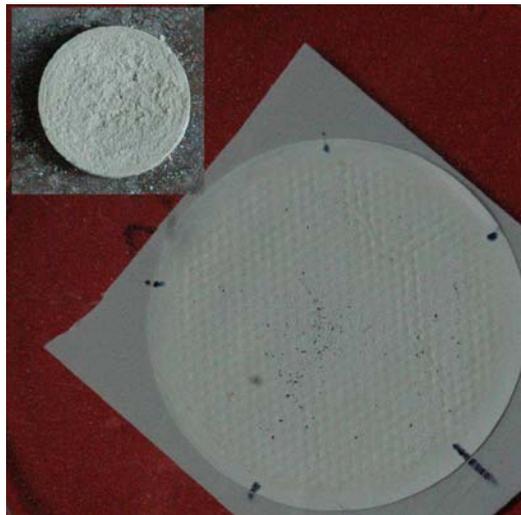


FIG. V.5 – **Filtre contenant les bactéries après ablation.** La pastille en haut à gauche correspond à un nouveau protocole qui consiste à compacter les bactéries pour améliorer les signaux LIBS. N'ayant pas participé à la réalisation des expériences avec pastille, je ne développe pas le sujet.

Les filtres utilisés sont des filtres organiques en cellulose avec des pores de $0.45 \mu\text{m}$, bien adaptés pour retenir les bactéries. Initialement, pour éliminer plus facilement les composantes spectrales qui provenaient du filtre, nous avons utilisé des filtres en argent. Mais le plasmon de l'argent était excité à deux photons par les impulsions à 810 nm, provoquant un signal parasite beaucoup trop important.

Nous avons aussi enregistré les spectres des filtres seuls ainsi que des filtres ayant subi le même protocole expérimental que les bactéries, mais avec le bouillon seul (sans bactérie). Ces spectres ont permis de s'affranchir de la signature spectrale du milieu dans les spectres de bactéries.

3.2 Comparaison entre les régimes nanoseconde et femtoseconde

Régime nanoseconde infrarouge : un continuum plus important

Si on utilise les mêmes paramètres d'acquisition qu'en régime nanoseconde infrarouge, c'est-à-dire un gain maximal de la caméra, et une fenêtre d'acquisition comprise entre 100 ns et 5 μ s, le signal obtenu est saturé, comme le montre la figure V.6. Le fort continuum du régime nanoseconde infrarouge est responsable de cette saturation.

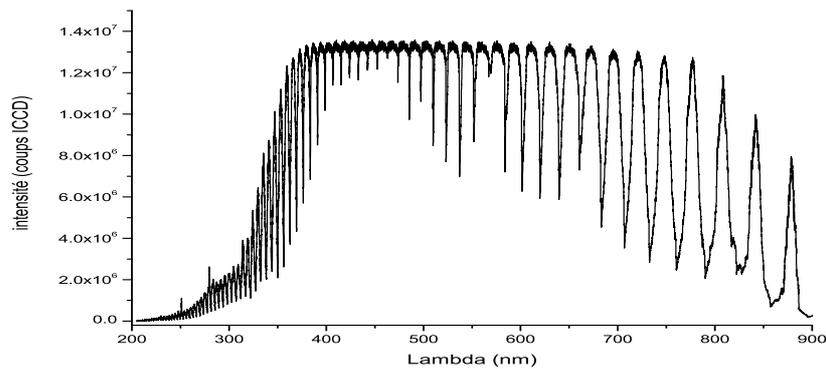


FIG. V.6 – *Spectre saturé en régime nanoseconde infrarouge*. Ce spectre a été obtenu dans les mêmes conditions que les acquisitions en régime femtoseconde.

Pour éviter ce problème et avoir un bon rapport entre pics et continuum, on doit attendre 200 ns et mettre le gain de la caméra au minimum. Ces paramètres constituent les conditions les meilleures pour le régime nanoseconde et seront gardés par la suite. Pour le régime femtoseconde, les meilleures conditions ont été obtenues avec une fenêtre temporelle commençant 100 ns après l'impulsion, et avec un gain de la caméra de 255 (voir figure V.7).

Le spectre intégral des deux régimes est présenté figure V.8. Le régime femtoseconde présente comme caractéristique importante l'absence de fortes raies de l'oxygène et de l'azote. Ces raies proviennent en partie, en régime nanoseconde, d'interactions du plasma avec l'air ambiant [162], la température plus élevée du plasma favorisant cette interaction.

Détection d'éléments de trace

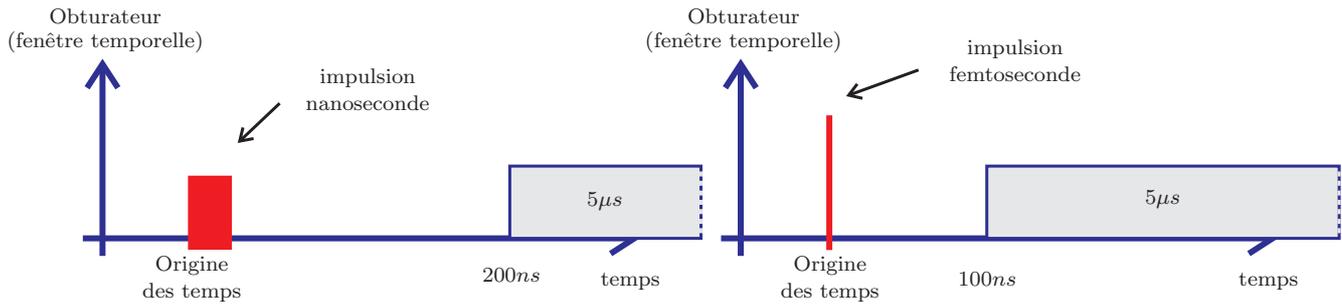


FIG. V.7 – Fenêtre temporelle pour les régimes nanoseconde et femtoseconde.

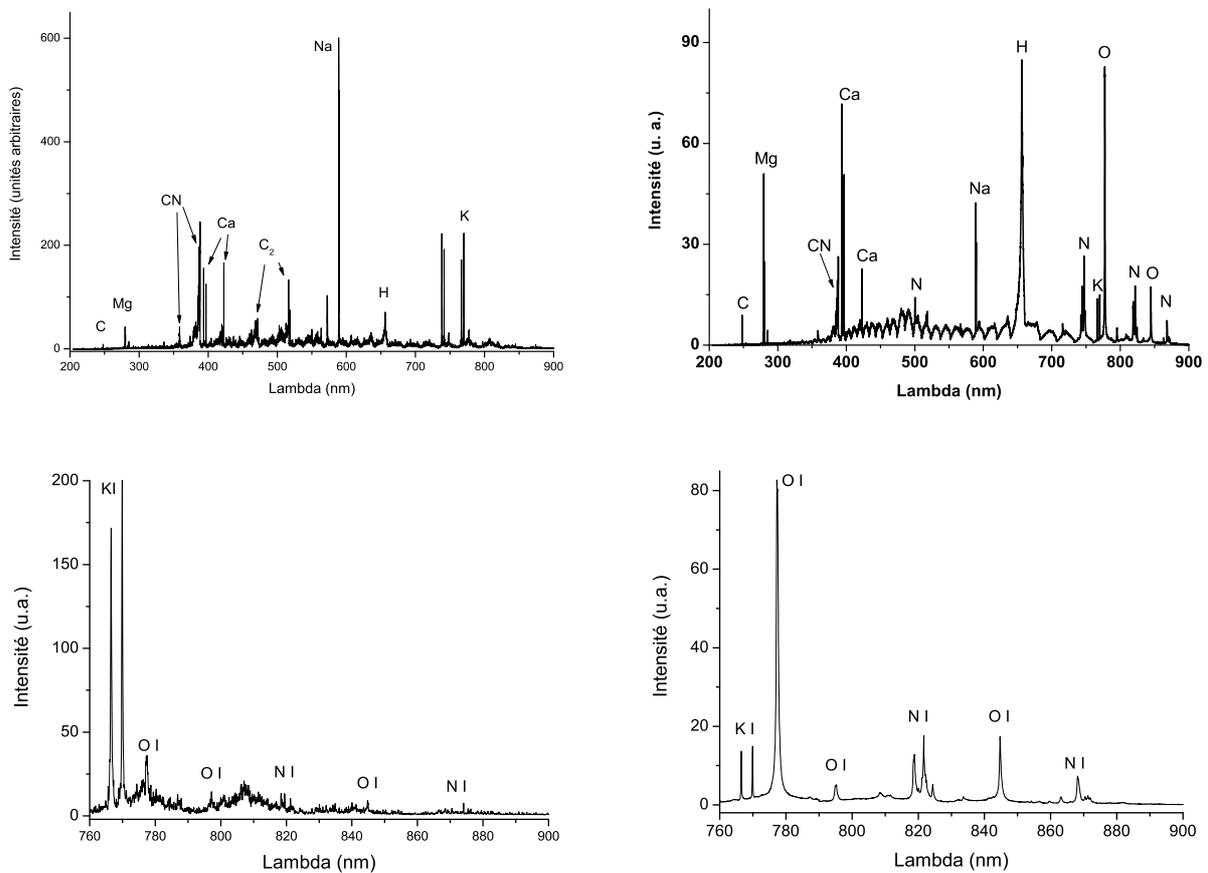


FIG. V.8 – Spectres complets en régimes femtoseconde (à gauche) et nanoseconde.

En régime femtoseconde, les bandes moléculaires sont bien plus présentes, de même que les raies des éléments O et N sont moins fortes.

Le continuum, plus faible en régime femtoseconde, a aussi comme conséquence importante d'améliorer la détection des éléments de trace, grâce à une détection plus précoce et un gain plus important, sans saturer la caméra. Ainsi, la raie très peu intense du potassium, K I 404.41 nm, est parfaitement visible en femtoseconde, alors qu'elle ne peut pas être distinguée en nanoseconde. De plus, des raies plus intenses détectées dans les deux régimes, comme les pics 421.03 et 421.36

nm du fer ou le pic 422.67 nm du calcium, présentent de bien meilleurs contraste et résolution avec une excitation femtoseconde (figure V.9). Or, il est connu que les éléments de trace sont très importants et spécifiques pour les micro-organismes, dont les bactéries, dans la mesure où ils participent activement à leur métabolisme et influencent leur structure [163]. La détection des signatures spectrales des minéraux donne donc des informations pertinentes pour distinguer différentes bactéries.

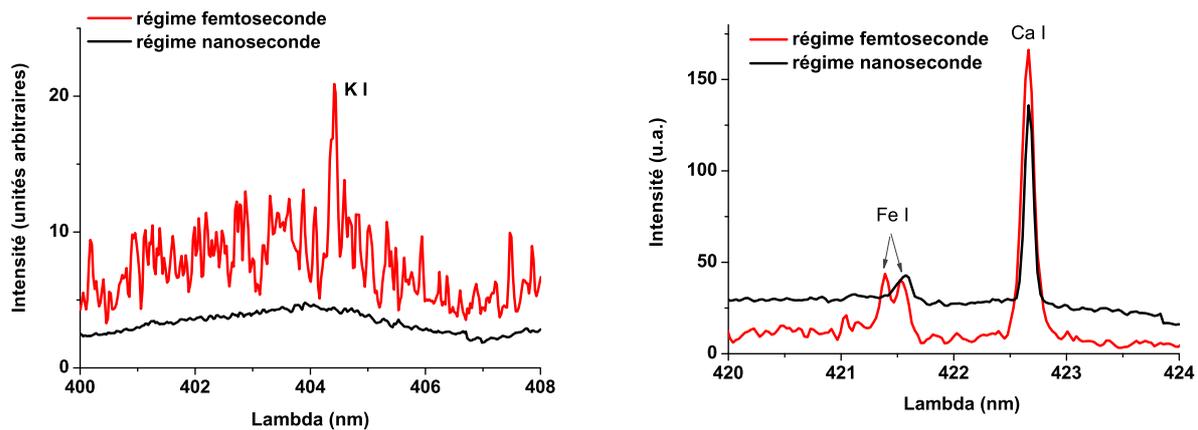


FIG. V.9 – **Détection des éléments de trace dans les deux régimes.** Grâce à la température plus faible du plasma, le régime femtoseconde permet une acquisition plus précoce et avec un gain plus grand qu'en régime nanoseconde, d'où une détection plus efficace des éléments de trace.

L'importance de la fenêtre temporelle s'explique par la décroissance rapide de l'émission spectrale du plasma, comme on le voit figure V.10. L'excitation femtoseconde permet donc une détection précoce, et avec un meilleur gain, qui sont cruciaux pour la détection de trace.

Distinction des bactéries

La figure V.11 présente un exemple de corrélation entre l'émission d'un élément minéral dans un spectre LIBS et les propriétés biologiques des bactéries. Alors que les deux bactéries ont été préparées dans les mêmes conditions expérimentales, l'émission de magnésium est plus forte pour *E. coli* que pour *B. subtilis*. Notons que cette différence est plus grande que la dispersion des mesures qui est de l'ordre de 16% du signal.

E. coli, qualifiée par les biologistes de bactérie "Gram-négative"^b, possède une membrane extérieure spécifique contenant différentes protéines maintenues entre elles par des cations divalents, notamment Mg^{2+} et Ca^{2+} . Au contraire, *B. subtilis*, bactérie "Gram-positive", n'a pas une

^bLe test de Gram, du nom d'un biologiste danois de la fin du XIX^{ème} siècle, permet de classer les bactéries en deux catégories en fonction de leur paroi bactérienne.

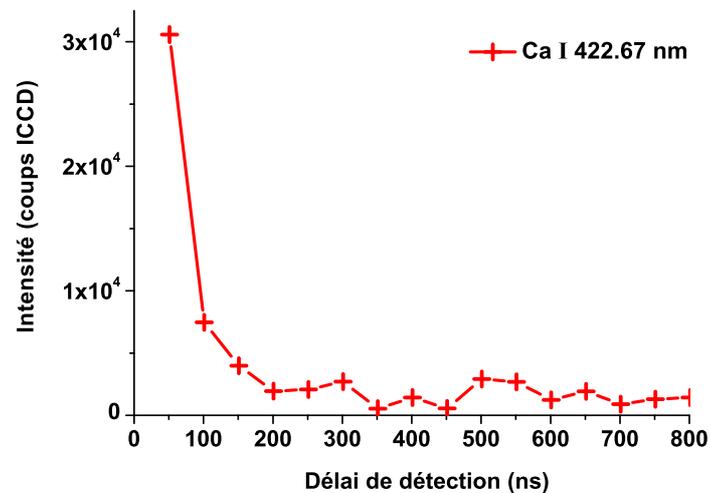


FIG. V.10 – *Evolution de l'émission du pic 422.67 nm du calcium.* Le délai 0 correspond à l'impulsion femtoseconde. On constate la décroissance rapide de l'émission.

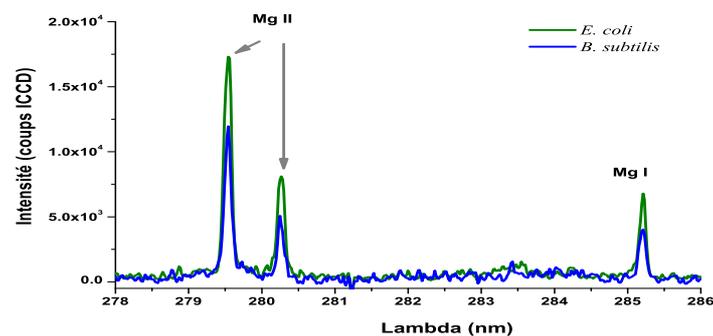


FIG. V.11 – *Spectre LIBS détaillé autour de raies du magnésium.* Les spectres, non normalisés, ont été pris dans les mêmes conditions expérimentales, et mettent en évidence les différences d'émission des raies 279.55 et 280.27 nm de Mg II et de la raie 285.17 nm de Mg I.

telle paroi et on s'attend donc à ce que l'émission de magnésium soit inférieure à une bactérie "Gram-négative" comme *E. coli*. Des études ultérieures de l'équipe ont montré qu'en choisissant convenablement quelques éléments pertinents, dont le magnésium, on peut distinguer plusieurs bactéries entre elles (cinq bactéries ont été distinguées à l'aide de six éléments) [164].

3.3 Bandes CN : un marqueur pour les milieux biologiques

Raies moléculaires favorisées en régime femtoseconde

Le rapport entre les émissions moléculaires et atomiques différencie également les deux régimes. Pour le carbone, par exemple, élément constitutif des squelettes organiques, les rapports CN/C et C_2/C sont beaucoup plus faibles dans le cas d'une impulsion nanoseconde (figure V.12 pour le rapport CN/C). Cela prouve que l'ablation femtoseconde produit plus d'espèces moléculaires que le régime nanoseconde infrarouge; ce comportement a aussi été observé sur des cibles organiques pour l'ablation nanoseconde UV [165–167]. Cette propriété est intéressante pour l'analyse d'échantillons organiques et biologiques, dans la mesure où ces matériaux sont caractérisés par des groupes fonctionnels formés de quelques liaisons moléculaires spécifiques. Par exemple, la liaison CN est caractéristique du groupement amine $-NH_2$, présent dans tous les acides aminés^c.

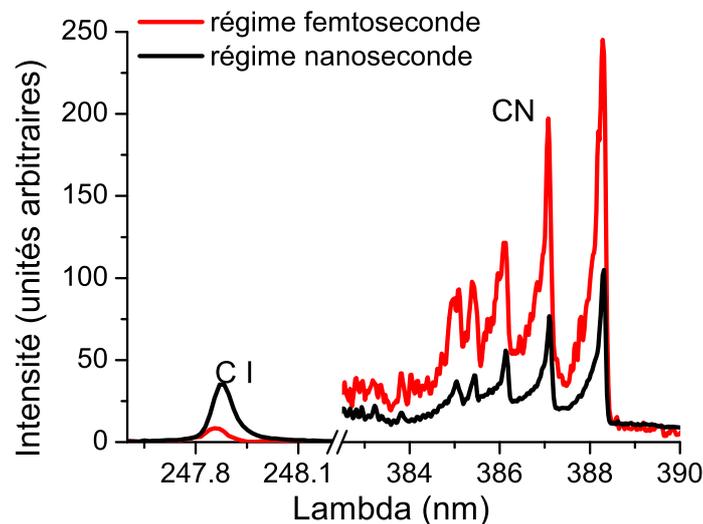


FIG. V.12 – *Bandes CN comparées à l'émission de carbone dans les deux régimes.*

Origine des bandes CN

Cependant, il a déjà été montré que des radicaux CN peuvent être formés lors de l'interaction du plasma avec l'air ambiant, par recombinaison du carbone avec l'azote de l'air. Une telle recombinaison est observée en régime nanoseconde IR [162] et UV [168]. L'origine des bandes CN dans un spectre LIBS doit donc être analysée avec attention. Pour cela, nous avons enregistré la variation temporelle de l'émission d'une bande pour différents échantillons :

- des bactéries qui contiennent des liaisons CN ,

^cLes acides aminés sont les briques élémentaires des protéines et donc des organismes biologiques en général.

- de la nitrocellulose qui contient les atomes C et N mais pas de liaison CN ,
- du graphite qui ne contient que du carbone.

La série cinétique est présentée figure V.13, et montre un comportement très différent pour le graphite qui ne contient pas d'azote natif. L'augmentation initiale du signal dans les 500 premières nanosecondes prouve la recombinaison selon la réaction $C_2 + N_2 \rightarrow 2 CN$, étudiée ici en régime femtoseconde. Cette recombinaison est négligeable pour les échantillons contenant de l'azote, d'où une décroissance monotone de l'émission CN . Les séries cinétiques, en permettant d'identifier l'origine des bandes CN (air ambiant ou matrice), évitent d'effectuer l'ablation sous atmosphère contrôlée.

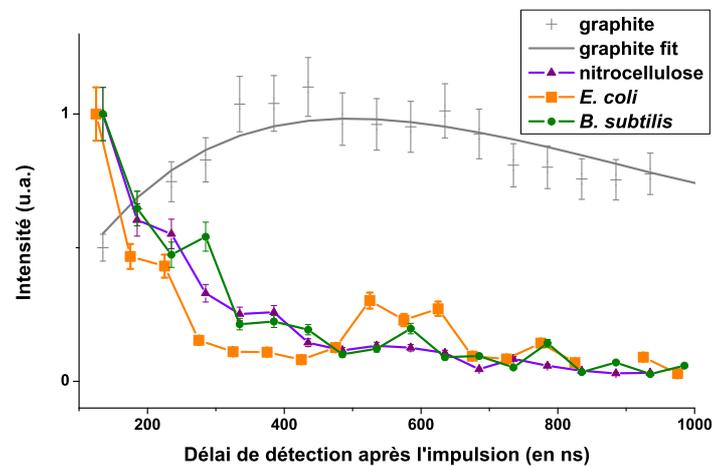


FIG. V.13 – *Evolution des bandes CN en fonction du temps en régime femtoseconde.*

4 Analyse foliaire par LIBS, en régime femtoseconde

4.1 Composition des plantes

L'étude réalisée avec des bactéries étant encourageante, nous avons souhaité utiliser les potentiels de la LIBS pour l'étude de feuilles d'arbres. Ce travail est le premier à effectuer une analyse foliaire systématique en LIBS femtoseconde.

Composition élémentaire

Dans une plante, plus de 90% de la masse sèche est constituée par les trois éléments caractéristiques des substances organiques (C, H, O). La masse sèche restante est constituée de

minéraux classés en macroéléments ou oligoéléments en fonction de leur présence dans la plante [169]. Les macroéléments, relativement abondants, sont présents à des taux de l'ordre de 0,1 à 1% de la masse sèche. Ce sont l'azote N, le potassium K, le calcium Ca, le magnésium Mg, le soufre S et le phosphore P. Certains végétaux contiennent aussi du sodium Na, du chlore Cl, et du silicium Si dans des proportions comparables. La masse sèche des oligoéléments ne dépasse pas, quant à elle, le pour-mille. Les oligoéléments sont le fer Fe et le manganèse Mn (de 10 à 1000 ppm), ainsi que le zinc Zn, le cuivre Cu et le bore B (environ 10 ppm). A des taux plus faibles encore, inférieurs au ppm, on trouve : Al, Ni, Co, Mo, I, Br, F. Enfin, toujours en faible quantité mais à des taux variables, la plupart des autres éléments présents dans les sols et dans l'eau peuvent contaminer les végétaux : Li, Pb, Ti, Rb,... La constitution moyenne des végétaux est rappelée dans le tableau V.1.

Principaux (> 5%)	Macroéléments (> 1 ‰)	Oligoéléments (< 1 ‰)
C, H, O	N, K, Ca, Mg, S, P	Fe, Mn (10 à 1000 ppm)
	Na, Cl, Si (selon les végétaux)	Zn, Cu, B (\simeq 10 ppm)
		Al, Ni, Co, Mo, I, Br, F (< 1ppm)
		éléments du sol (très faible)

TAB. V.1 – *Eléments présents dans les plantes* [169].

4.2 Les avantages potentiels de la LIBS pour l'analyse foliaire

La capacité à détecter les éléments atomiques de trace, ainsi que sa rapidité d'acquisition, font de la LIBS une méthode particulièrement adaptée à l'analyse de végétaux.

Le diagnostic foliaire, surtout pour les plantes pérennes, est une technique couramment utilisée en agronomie pour évaluer les besoins nutritifs des plantes et adapter l'engrais ajouté [170]. Cette technique consiste à analyser les minéraux contenus dans les feuilles, après ramassage et séchage. Les méthodes traditionnelles, proposées commercialement [171], sont complexes, lentes, et polluantes du fait de l'utilisation d'acides forts et de réactifs toxiques [172]. De nouvelles méthodes ont depuis été développées grâce à la spectroscopie de réflectivité dans les domaines du visible à l'infrarouge moyen [172, 173]. Non destructives, rapides, ces méthodes sont très intéressantes et permettent notamment de détecter quelques minéraux ainsi que des fibres. Elles nécessitent cependant une petite préparation des échantillons et ne sont pas adaptées pour la détection de trace. La LIBS, au contraire, ne requiert pas de préparation, peut être utilisée in

situ, et s'avère très puissante dans la détection de certains éléments de trace (voir paragraphe 3.2 page 99). Mais comme elle ne permet pas de détecter des molécules complexes, ou encore moins des tissus, elle pourrait être utilisée avec profit en complémentarité des autres techniques.

Le diagnostic foliaire n'est pas restreint au domaine agricole, mais sert aussi à diagnostiquer l'état d'un écosystème dans les forêts [174], la pollution de l'air [175], ou encore la pollution des sols via des plantes qui stockent particulièrement certains éléments [176],... Être capable, à l'aide de la LIBS, de détecter facilement ces derniers éléments dans les plantes ouvre donc de nombreuses perspectives à cette technique.

A titre d'exemple, citons les travaux d'*Elless et al.* [177], dans lesquels les auteurs s'intéressent à certaines plantes pour leur capacité à stocker quelques minéraux utiles à l'homme afin d'en faire des compléments alimentaires. L'analyse des éléments a nécessité une longue préparation des échantillons (séchage, dissolution dans une solution acide, etc.), et aurait pu être avantageusement remplacée par la LIBS.

Cependant, avant toute application, il est nécessaire, pour apprécier les potentialités de la méthode, d'identifier les raies pertinentes et de trouver quels sont les éléments détectables par LIBS.

4.3 Echantillons analysés

Nous avons fait plusieurs campagnes de mesures LIBS avec les feuilles. La première, à laquelle j'ai activement participé, a eu lieu en juillet 2005. Nous avons analysé les feuilles de différentes essences, dont le laurier, le marronnier, le sureau, le rosier, l'érable, le tilleul. Ces feuilles, ramassées le matin de l'expérience, sont scotchées bien à plat sur un support de plexiglas en prenant soin de ne pas toucher les parties à analyser. Ces mesures ont été faites avec des feuilles de provenances différentes avec l'hypothèse de trouver une signature de l'origine des plantes, mais les résultats n'ont pas été satisfaisants. Nous n'avons donc gardé de cette campagne que les résultats provenant de feuilles ramassées sur le campus de l'Université Lyon 1, et sur lesquelles les expériences ont été faites avec plus de précaution. C'est particulièrement le spectre des feuilles de marronnier qui nous a servi de référence pour l'analyse exhaustive des raies observées (paragraphe 4.4).

Deux autres campagnes de mesure, auxquelles je n'ai pas participé, ont été réalisées l'une en octobre 2005 et l'autre en juillet 2006. Ces expériences, étudiant les mêmes essences (en ajoutant bouleau et ginkgo biloba), à la fois sur le recto et le verso des feuilles, étaient motivées par la mise en évidence des signatures spectrales de la saison et de la face des feuilles. Bien que n'ayant pas participé aux expériences, l'analyse de leurs données constitue une part importante de mon

travail de thèse, qui comprend la détection exhaustive des pics intéressants dans les feuilles.

4.4 Éléments observés par LIBS dans les feuilles

Raies principales

De la même façon que pour les bactéries, le spectre LIBS contient une kyrielle de raies. Les raies les plus importantes, bien visibles, sont présentées dans le tableau V.2. Dans l'exemple donné figure V.14, certaines essences contiennent des éléments en trop faible quantité pour être visibles dans le spectre : on peut ainsi conclure que l'aluminium n'est pas contenu en quantité suffisante pour être détecté, dans la feuille de tilleul analysée. Cet exemple montre combien la LIBS est une méthode intéressante pour analyser l'aluminium absorbé par les plantes.

Parmi les éléments facilement détectés, on trouve essentiellement des macroéléments, mais pas uniquement. La présence importante d'aluminium, notamment, peut paraître surprenante, ainsi que l'absence de soufre, de phosphore. La faiblesse des pics d'azote peut, quant à elle, s'expliquer par la faiblesse des liaisons organo-métalliques comparées aux liaisons organiques $C - N$.

Z	éléments	raies les plus pertinentes (en nm)
6	C I	247.86
11	Na I	589.00, 589.59
11	Na II	300.74, 300.91
12	Mg I	518.36, 383.23, 517.27, 285.21
12	Mg II	279.55, 280.27, 279.8, 279.08
13	Al I	396.15, 394.40, 309.27, 308.22
14	Si I	288.16, 390.55, 251.61, 250.69
19	K I	766.49, 769.90, 404.41, 404.72
20	Ca I	422.67, 430.25, 616.22, 445.48
20	Ca II	393.37, 396.85, 317.93, 373.69

TAB. V.2 – *Pics principaux des éléments les plus visibles*. Les raies les plus intenses du spectre sont représentées ici de façon non-exhaustive, et par importance décroissante pour chaque élément.

Pics secondaires

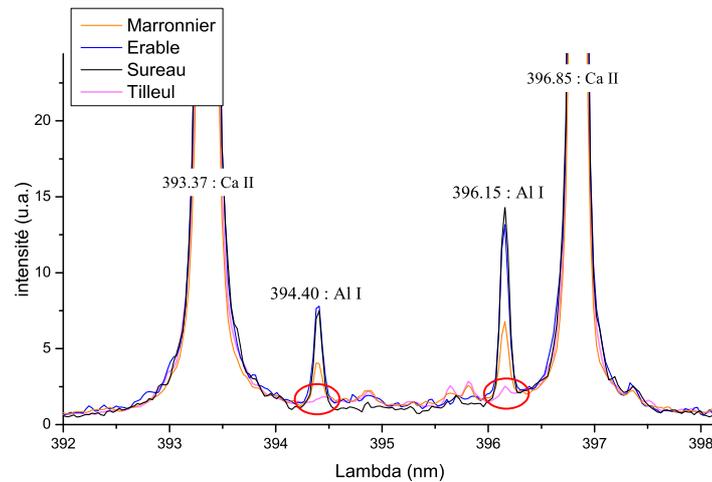


FIG. V.14 – **Aluminium**. Les raies de l'aluminium sont bien visibles dans toutes les feuilles sauf dans celles de tilleul.

D'autres pics, présentés dans le tableau V.3, sont bien moins visibles, mais cependant décelables sans ambiguïté. Parmi eux, l'hydrogène et l'oxygène qui sont les principaux constituants de la feuille. La figure V.15 présente les doublets de ces deux éléments, bien sûr contenus dans toutes les feuilles (sous forme d'eau notamment), mais dont les pics ne sont pas toujours visibles. On constate d'ailleurs que les deux pics fonctionnent de manière concomitante quelle que soit l'essence : aucun des deux n'est visible pour le sureau, alors que les deux sont visibles pour le laurier ou le marronnier. Cette constatation indique que ces pics proviendraient des molécules d'eau présentes dans les feuilles plutôt que des atomes d'hydrogène et d'oxygène de la masse sèche de la feuille. Elle est appuyée par le fait que les pics des autres éléments ne présentent pas de corrélation avec les deux éléments : il ne s'agit pas d'une meilleure ou moins bonne efficacité d'ablation.

Les autres pics secondaires correspondent soit à des oligoéléments, soit à d'autres éléments qui proviennent de l'environnement de l'arbre comme l'eau ou le sol [169]. Ainsi, le lithium, le titane (voir figure V.16) et le strontium sont détectés par LIBS grâce à la grande sensibilité de la méthode. L'analyse de feuilles par la LIBS peut assurément être utilisée avec profit pour une étude de la pollution au lithium, strontium et titane, des eaux ou du sol.

Pics très faibles

En analysant très minutieusement les spectres, on arrive à déceler encore trois éléments - azote, rubidium et baryum - dont les pics sont récapitulés dans le tableau V.4. Pour leur

éléments	raies les plus pertinentes (en nm)
H I	656.27, 656.29 (doublet non résolu)
Li I	670.79
O I	777.2, 777.4
Ti I	428.27, 428.91, 501.42, 502.56
Ti II	334.94, 336.12, 337.28
Mn I	403.08, 403.31, 403.45
Fe I	371.99, 302.06, 299.44
Fe II	275.57, 274.93
Cu I	324.75
Sr I	460.73
Sr II	407.77, 421.55

TAB. V.3 – *Pics moins intenses mais bien visibles dans les feuilles. Certains pics ne sont pas visibles avec toutes les essences. Les raies sont classées par importance décroissante.*

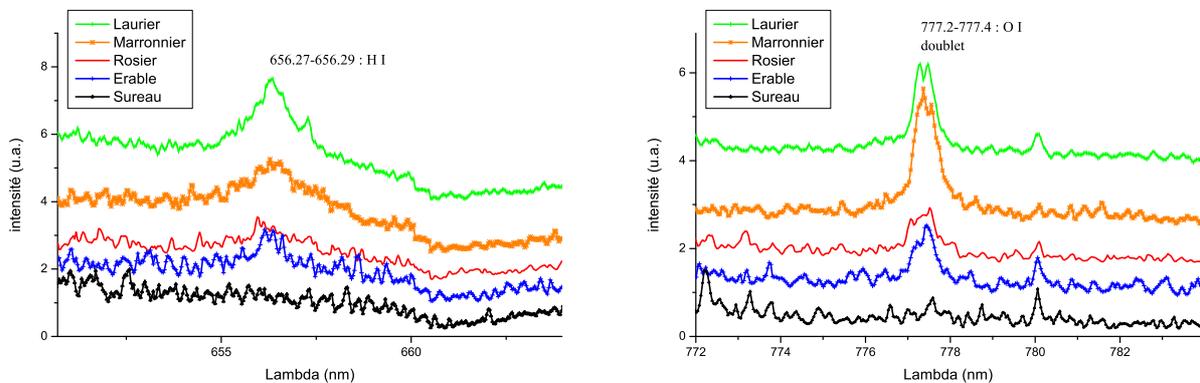


FIG. V.15 – *Hydrogène et Oxygène. Les doublets (ici non ou peu résolus) de l'oxygène et de l'hydrogène ne sont pas visibles sur toutes les feuilles. Ces pics ont une importance variable en fonction des essences.*

détection, il est indispensable de moyenner longtemps afin d'avoir un bon rapport signal sur bruit. La probabilité d'une identification erronée de ces raies étant plus élevée que pour les autres, j'ai scrupuleusement vérifié qu'il ne s'agissait pas de raies fantômes (voir paragraphe 2) ou de raies appartenant à d'autres éléments. L'azote, un macroélément, n'est visible que dans le spectre des feuilles d'érable, et avec un très faible rapport signal sur bruit (voir figure V.17). Cela prouve que N est difficile à détacher d'une molécule. L'élément est cependant visible dans

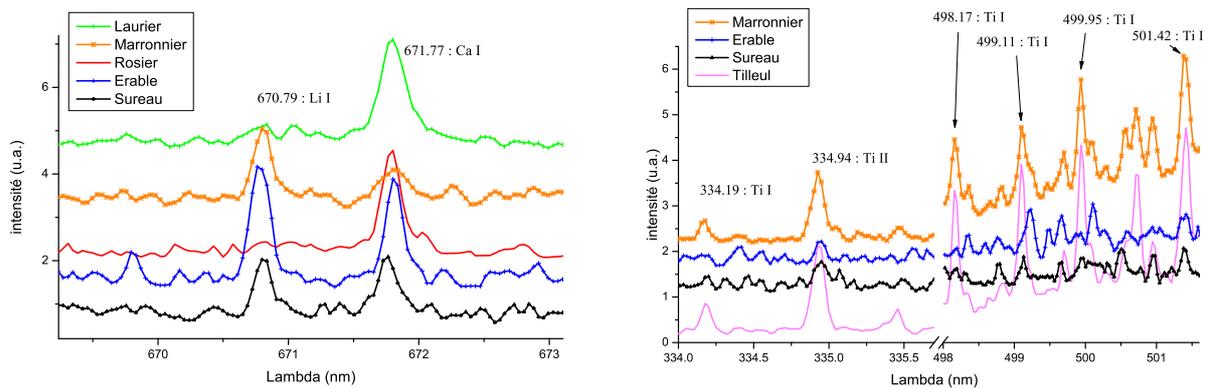


FIG. V.16 – **Lithium et Titane.** Sur la figure de gauche, la seule raie visible du Lithium dans le spectre. Le Lithium n'est pas visible pour toutes les essences. A droite, extrait des spectres avec les raies du titane. Au contraire du lithium, de nombreuses raies sont visibles dans le spectre, rendant faciles leurs identifications.

les spectres LIBS d'autres échantillons organiques que nous avons analysés précédemment, telles les bactéries (partie 3). La présence de plusieurs raies du même élément permet d'en confirmer la présence comme ici avec l'azote et le baryum. Ce pic a de plus été observé de nombreuses fois, comme en témoignent *Eppler et al.* [178], qui détectent le baryum dans les sols dès 42 ppm en masse ; Ba I n'est pas détecté car l'intensité de ses pics d'émission est bien plus faible [157]. Le cas du rubidium (figure V.17) est plus délicat et j'ai redoublé de précautions avant d'affirmer sa présence. Ce pic est visible sur toutes les feuilles analysées, ce qui indique qu'il ne s'agit pas de bruit : la présence de ce pic très faible est bien reproductible.

éléments	raies les plus pertinentes (en nm)
N I	746.83, 744.33
Rb I	780.03
Ba II	455.4, 493.41

TAB. V.4 – **Pics très faibles.** Ces pics ont un très faible rapport signal sur bruit et ne sont pas visibles avec toutes les essences. Il est indispensable, pour les détecter, de moyennner sur de nombreux spectres.

Bilan : éléments détectables par LIBS dans les feuilles

La figure V.18 présente le tableau périodique avec tous les éléments qui ont été détectés en LIBS dans les feuilles d'arbre ramassées dans notre campagne de mesure de juillet 2005. Il

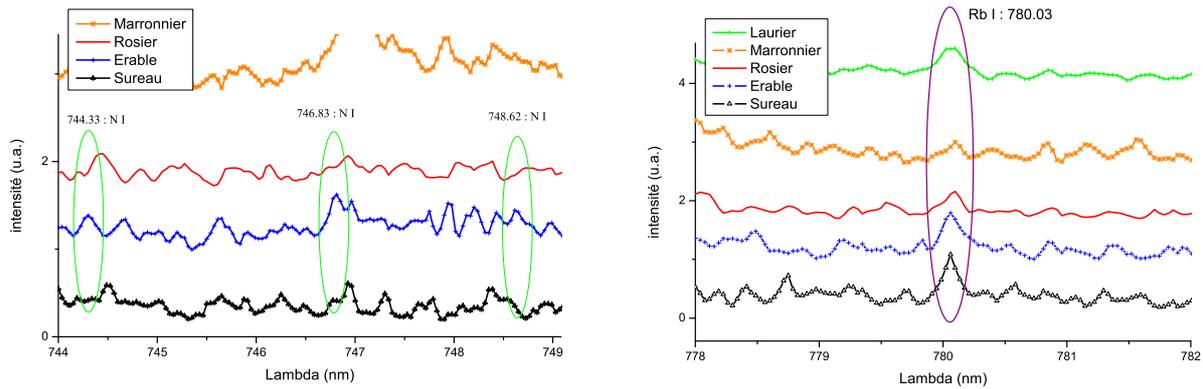


FIG. V.17 – **Azote et Rubidium.** Seul l’érable présente des raies d’azote, cependant à peine visibles. La présence de plusieurs raies dans le spectre aide à l’identification de l’élément comme dans le cas du baryum (non présenté ici). Le rubidium ne présente qu’une raie visible dans le spectre : sa présence a été vérifiée avec précaution.

pourra être utile aux applications potentielles, dans la mesure où tous ces éléments peuvent être détectés par LIBS dans des conditions équivalentes.

Légende :																	
1 H Hydrogen 1.00794															2 He Helium 4.003		
3 Li Lithium 6.941	4 Be Beryllium 9.012182															10 Ne Neon 20.1797	
11 Na Sodium 22.989770	12 Mg Magnesium 24.3050															18 Ar Argon 39.948	
19 K Potassium 39.0983	20 Ca Calcium 40.078	21 Sc Scandium 44.955910	22 Ti Titium 47.867	23 V Vanadium 50.9415	24 Cr Chromium 51.9961	25 Mn Manganese 54.938049	26 Fe Iron 55.845	27 Co Cobalt 58.933200	28 Ni Nickel 58.6934	29 Cu Copper 63.546	30 Zn Zinc 65.39	31 Ga Gallium 69.723	32 Ge Germanium 72.61	33 As Arsenic 74.92160	34 Se Selenium 78.96	35 Br Bromine 79.904	36 Kr Krypton 83.80
37 Rb Rubidium 85.4678	38 Sr Strontium 87.62	39 Y Yttrium 88.90585	40 Zr Zirconium 91.224	41 Nb Niobium 92.90638	42 Mo Molybdenum 95.94	43 Tc Technetium (98)	44 Ru Ruthenium 101.07	45 Rh Rhodium 102.90550	46 Pd Palladium 106.42	47 Ag Silver 107.8682	48 Cd Cadmium 112.411	49 In Indium 114.818	50 Sn Tin 118.710	51 Sb Antimony 121.760	52 Te Tellurium 127.60	53 I Iodine 126.90447	54 Xe Xenon 131.29
55 Cs Cesium 132.90545	56 Ba Barium 137.327	57 La Lanthanum 138.9055	72 Hf Hafnium 178.49	73 Ta Tantalum 180.9479	74 W Tungsten 183.84	75 Re Rhenium 186.207	76 Os Osmium 190.23	77 Ir Iridium 192.217	78 Pt Platinum 195.078	79 Au Gold 196.96655	80 Hg Mercury 200.59	81 Tl Thallium 204.3833	82 Pb Lead 207.2	83 Bi Bismuth 208.98038	84 Po Polonium (209)	85 At Astatine (210)	86 Rn Radon (222)

FIG. V.18 – **Tableau périodique avec mise en évidence des éléments que l’on détecte par LIBS sur les feuilles.** Les cases grisées correspondent aux éléments dont les raies principales LIBS observées dans d’autres études sont absentes de nos spectres. Les éléments des cases laissées blanches n’ont pas été recherchés spécifiquement. Leurs raies, si elles existent, sont très faibles dans nos spectres.

5 Analyse de feuilles par LIBS : effet de la face et de la saison

5.1 Motivations

La LIBS présente l'avantage d'être une méthode de surface : avec une impulsion laser femtoseconde de l'ordre du milliJoule, les trous sur les feuilles font quelques dizaines de microns en largeur et une centaine de nanomètres en profondeur [179]. Cette caractéristique a permis à *Samek et al.* [180] d'effectuer une mesure spatiale de la concentration en fer dans les feuilles, mesure qui a pu être corrélée avec succès à une mesure RMN. Ils montrent que le fer est plus concentré sur les nervures et donc qu'il est possible de cartographier, par LIBS, la concentration de différents éléments sur une feuille. Dans notre équipe, nous avons choisi d'analyser spécifiquement les deux faces d'une même feuille, en moyennant les points d'ablation sur toute sa surface. C'est un objectif difficile car il n'existe que de faibles différences biologiques entre faces supérieure et inférieure des feuilles d'arbres. Parmi ces différences, on peut noter la présence de stomates, cellules nécessaires à la transpiration, en quantité plus importante sur la face inférieure [83, 181]. Le parenchyme, un type de tissu contenant les chloroplastes^d, est quant à lui bien plus dense au niveau de la face supérieure. Chercher des différences spectrales entre les deux faces de la feuille, en moyennant sur toute la feuille, est donc un problème délicat que nous avons résolu. L'avoir dépassé fait espérer que la LIBS aura un avenir florissant dans l'analyse foliaire ! Dans la suite, on appellera recto la face supérieure de la feuille, et verso l'autre côté.

Nous nous sommes aussi intéressés aux effets de saison avec des campagnes de mesures en juillet 2005, octobre 2005, et juillet 2006. Des effets saisonniers ont déjà été reportés à l'aide des méthodes classiques d'analyse foliaire [174], et nous allons montrer ici que la LIBS peut aussi faire ce type d'analyse. Signalons aussi que les changements entre les saisons dépendent des essences analysées.

5.2 Corrélations entre les différents spectres

Pour être capable de trouver les points communs entre faces supérieure et inférieure des feuilles de différentes essences, j'ai calculé les coefficients de corrélation entre les différents spectres, recto et verso. Le coefficient de corrélation entre deux spectres X et Y, s'écrit :

^dLes chloroplastes sont des organelles de couleur verte participant à la photosynthèse. La forte densité de ces cellules sur la face supérieure explique la teinte foncée du recto.

$$R(X, Y) = \frac{Cov(X, Y)}{var(X).var(Y)} = \frac{\sum_{i=0}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=0}^N (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=0}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad (V.1)$$

où chaque spectre est considéré comme un vecteur $X = \begin{pmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_N \end{pmatrix}$, avec x_i l'intensité pour la $i^{\text{ème}}$ longueur d'onde, et \bar{x} la moyenne de tous les points du vecteur. $var(X)$ et $Cov(X, Y)$ sont respectivement la variance de X et la covariance de X et Y et sont définis dans la formule.

Il s'agit d'une méthode statistique qui permet d'identifier des échantillons en comparant leur spectre LIBS à une librairie de spectres. Son efficacité a été démontrée avec des alliages par l'équipe de Winefordner [182]. Elle a depuis été utilisée avec succès pour de nombreuses applications comme l'identification de poteries [183], d'échantillons biologiques [184], de polymères [185], etc... Il s'agit d'ailleurs, avec la PCA^e, de la principale méthode d'identification utilisée en LIBS.

	Era-Dos	Era-Face	Laur-Dos	Laur-Face	Ros-Dos	Ros-Face
Erable-Dos	1	0.91	0.83	0.81	0.92	0.90
Erable-Face	0.91	1	0.91	0.94	0.93	0.95
Laurier-Dos	0.83	0.91	1	0.97	0.94	0.98
Laurier-Face	0.81	0.94	0.97	1	0.91	0.96
Rosier-Dos	0.92	0.93	0.94	0.91	1	0.98
Rosier-Face	0.90	0.95	0.98	0.96	0.98	1

FIG. V.19 – *Corrélations entre différentes essences, recto-verso (extrait)*. Les cases colorées en rouge correspondent à des coefficients supérieurs à 0.95, en orange supérieurs à 0.9, et en jaune inférieurs.

L'utilisation de la méthode sur les feuilles n'est cependant pas convaincante (voir figure V.19) : il n'y a pas de corrélation spécifique entre recto et verso des différentes essences, ni entre deux feuilles différentes de laurier (non présenté ici). On tire la même conclusion avec une autre série d'expériences faites en octobre 2005. La méthode d'identification de feuilles par LIBS ne fonctionne donc pas ici, car cette méthode est généralement utilisée avec un spectre plus petit qui ne contient que quelques raies de deux ou trois éléments pertinents. Ainsi la méthode s'améliore

^ela PCA, pour "Principle Components Analysis (Analyse par Composantes Principales), est une méthode statistique qui identifie les coordonnées (ici une combinaison linéaire des longueurs d'onde) les plus pertinentes pour l'identification d'un échantillon au sein d'un ensemble d'échantillons (comme différents alliages similaires). Mathématiquement, on réalise un changement de base pour diagonaliser une matrice.

si l'on restreint les corrélations sur la partie du spectre entre 392 et 398 nm qui comprend deux raies de calcium et deux raies d'aluminium. Cependant, les spectres LIBS des échantillons biologiques demeurent très semblables entre eux.

Les corrélations entre spectres ne sont donc pas adaptées à l'étude des feuilles d'arbres par LIBS, c'est pourquoi il est préférable de ne s'intéresser qu'à quelques pics particuliers.

5.3 Comparaison élément par élément

Notre équipe a démontré la pertinence de ne s'intéresser qu'à quelques éléments bien choisis pour la discrimination de bactéries [164]. Pour un biologiste, les résultats sont alors plus faciles à interpréter qu'avec des méthodes d'analyse purement statistiques, et ressemblent plus à ceux de l'analyse foliaire traditionnelle. Le gros travail de dépouillement effectué (partie 4) a été un préliminaire indispensable à la sélection des pics nécessaires à cette étude.

Normalisation des spectres

Malheureusement, l'analyse quantitative des essences par LIBS présente d'importantes limitations. Les plus importantes sont d'une part la faible reproductibilité (dispersion des données de l'ordre de 10%) qui impose de moyennner sur beaucoup de spectres, d'autre part l'effet important de la matrice sur les signaux LIBS [182]. Normaliser le spectre par rapport à une raie particulière, en général la raie 247.86 du Carbone, permet de s'affranchir en partie des effets de matrice et d'améliorer la précision des mesures [186]. C'est pour cette raison que l'on compare les feuilles en s'intéressant aux pics d'un élément, normalisés soit par des raies du calcium, soit par la raie 247.86 du carbone.

Choix des éléments pertinents

L'étude différentielle entre recto et verso des feuilles présente une signature bien visible des raies de l'aluminium. J'ai donc comparé les rapports Al/Ca pour les différentes essences, recto et verso. Pour s'affranchir au mieux du rayonnement de type corps noir, j'ai choisi de normaliser par les raies 393.4 et 396.9 nm du calcium, car celles-ci sont très proches des raies d'aluminium. J'ai aussi normalisé par la raie 247.86 du carbone, dans les cas où le calcium varie beaucoup. Les éléments choisis pour effectuer les comparaisons sont l'aluminium, le carbone, le calcium, le magnésium, la silice, le potassium, le titane et le fer, dont les raies correspondantes sont répertoriées dans le tableau V.5.

éléments	raies utilisées
Al	394.40, 396.15
Mg	279.8, 280.27
Si	250.69, 251.61
K	766.49, 769.9
Ti	428.27, 428.91
Fe	371.99
Ca	393.37, 396.85 (normalisation)
C	247.86 (normalisation)

TAB. V.5 – *Pics utilisés pour les comparaisons des spectres.*

5.4 Analyse des feuilles recto-verso

L'analyse globale des spectres, qui montre la plus forte présence d'aluminium dans les faces supérieures des feuilles, est confirmée de façon claire en comparant les rapports Al/Ca et Al/C des recto et verso des feuilles de la campagne d'octobre 2005. De plus, toutes les essences analysées (érable, laurier, rosier, platane, bouleau, ginkgo) présentent un rapport plus important pour le recto que pour le verso (tableau V.6). Le résultat le plus spectaculaire étant obtenu avec l'érable (figure V.20), pour lequel les raies d'aluminium sont plus de dix fois supérieures pour le recto, quelle que soit la normalisation choisie. Ce résultat intéressant montre à nouveau que la LIBS est une bonne méthode pour les agronomes, sa capacité à analyser de façon différentielle certaines surfaces étant un atout supplémentaire.

Aluminium (recto/verso)	érable	laurier	rosier	platane	bouleau	ginkgo
normalisé par Ca, Octobre 05	16.9	2.8	1.7	1.8	3.9	3.0
normalisé par C, Octobre 05	12.4	1.6	1.6	2.5	3.7	2.7
normalisé par Ca, Juillet 06	2.85	1.07	5.16	2.32	1.30	5.08

TAB. V.6 – **Aluminium des feuilles : analyse recto/verso.** Il s'agit du rapport recto sur verso de l'intensité des raies d'aluminium, normalisées soit par celles du calcium, soit par celle du carbone. La barre d'erreur estimée pour ces différents rapport est asymétrique (-20% et +60%); les rapports restant toujours supérieurs à 1 pour la campagne d'octobre 2005.

Le silicium présente aussi le même type de comportement bien marqué, bien que les raies observées soient plus faibles, et donc plus sensibles au bruit. Pour chaque essence, les raies de

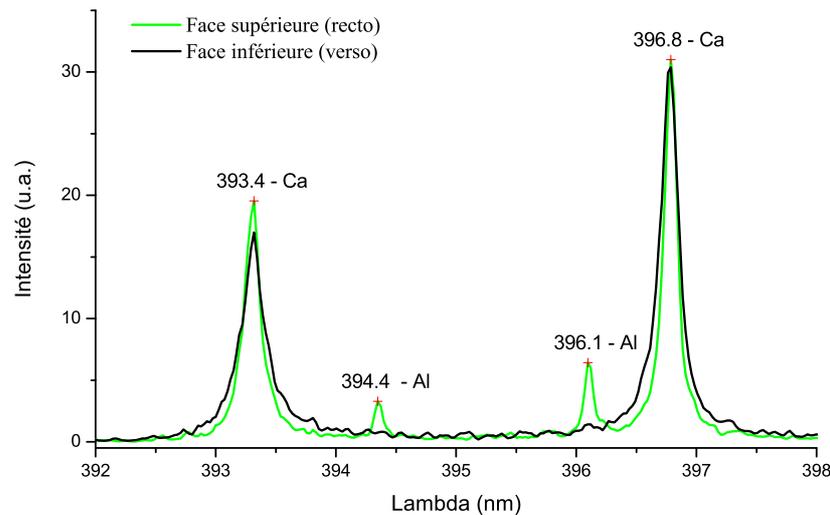


FIG. V.20 – *Aluminium des feuilles, recto/verso pour l’érable*. Le cas de l’érable est sans ambiguïté : la teneur en aluminium est bien plus importante sur la face supérieure.

silice, normalisées soit par le calcium, soit par le carbone, sont plus importantes pour le recto que pour le verso. Pour les autres éléments observés, il n’y a pas de comportement commun à toutes les essences : citons le fer, avec une concentration bien plus grande sur la face supérieure pour l’érable. Il est très difficile de comparer ces résultats avec la littérature, car les méthodes classiques analysent la feuille entière. Enfin, en juillet, les résultats mesurés diffèrent de la campagne d’octobre : nous avons alors étudié l’effet de la saison.

5.5 Effet de la saison

Variation du calcium : contradiction avec la littérature

On divise l’intensité des raies normalisées d’octobre 2005 par rapport à celles de juillet 2006, pour les deux faces. Le tableau V.7 montre que nous détectons beaucoup plus de calcium en juillet qu’en octobre. Cela est contraire à ce qui est reporté dans la littérature, puisque le calcium est connu pour se déplacer préférentiellement vers les feuilles en automne [174]. Il faut cependant noter que cette conclusion n’est vraie qu’en moyenne et que certaines études mesurent d’importantes variations sur quelques jours. Citons notamment *Coleman et al.* [187], dont l’ajustement des données montre une variation croissante de calcium dans la saison, mais avec certaines mesures de concentration du calcium en automne inférieures à celles juillet. La concentration foliaire en calcium peut ainsi augmenter rapidement suite à des pluies importantes ou à une

température moyenne élevée [174]. Cela pourrait expliquer nos résultats^f - une concentration plus élevée en calcium pour la campagne d'automne - dont la reproductibilité est spectaculaire entre les différentes essences (seul le ginkgo biloba se distingue). Notons que les variations annuelles peuvent aussi jouer un rôle - les deux campagnes visant à observer des effets saisonniers ayant été réalisées en 2005 puis 2006. Bien qu'en général le taux de calcium est connu pour ne pas varier beaucoup d'une année sur l'autre, quelques études trouvent des variations significatives [188].

Calcium (octobre/juillet)	érable	laurier	rosier	platane	bouleau	ginkgo
normalisé par C	0.24	0.60	0.26	0.52	0.19	1.36

TAB. V.7 – **Calcium : analyse saisonnière**. Chaque quantité est la moyenne des rapports saisonniers pour les deux faces.

Interférence avec l'atmosphère ambiante

Cependant, l'interférence avec le calcium de l'air qui, comme le sodium, présente une concentration importante dans l'atmosphère [161, 189], expliquerait aussi ce résultat surprenant. La grande reproductibilité serait alors due à un artefact de l'expérience, puisque tous les échantillons ont été analysés le même jour. Une méthode usuelle pour limiter les interactions du plasma avec l'atmosphère est de faire l'expérience avec une atmosphère contrôlée de gaz neutre, l'argon étant admis comme le meilleur candidat [190]. Dans le cas contraire, pour garder un montage expérimental simple et donc plus facilement applicable, je préconiserais de faire un spectre LIBS de deux plaques de référence (un métal et un matériau organique par exemple) avant chaque série d'expériences. Un taux plus élevé de calcium ou/et de sodium dans l'atmosphère serait ainsi repéré, et aiderait l'interprétation des spectres.

Augmentation de silice et de fer en automne

Il n'est donc pas raisonnable pour cette étude saisonnière de choisir les raies du calcium pour normaliser ; pour cela, on choisit la raie habituelle du carbone.

En normalisant par le carbone, on repère une augmentation du fer à l'automne (figure V.21), ce qui est compatible avec les autres études [174] qui tendent à montrer que le fer s'accumule dans

^fPar contre, les rapports obtenus, jusqu'à cinq fois plus de calcium en juillet, semblent peu compatibles avec les variations journalières.

les feuilles au cours de la saison. L'augmentation, variable selon les essences, est spectaculaire avec le ginkgo biloba. Cette conclusion reste vraie malgré une très grande dispersion des mesures qui peut s'expliquer par l'inhomogénéité des concentrations de fer sur la feuille [180]. Enfin, pour certaines essences, le silicium est quasi absent des spectres pris en juillet : c'est le cas du laurier, du bouleau et du ginkgo biloba.

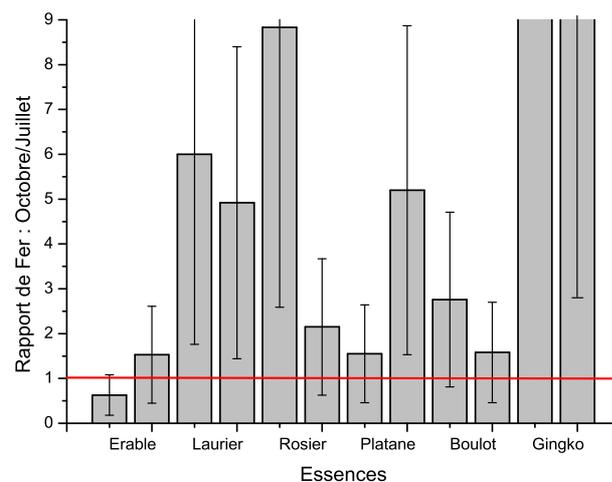


FIG. V.21 – **Rapport de la quantité de fer entre automne et juillet.** On mesure une quantité bien plus grande de fer à l'automne qu'en été. La première barre correspond à la face inférieure, la seconde à la face supérieure de la feuille de l'essence considérée. Certains rapports dépassent largement l'échelle choisie.

6 Conclusions du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons signifié les avantages d'une excitation femtoseconde pour l'étude de bactéries par LIBS. La comparaison avec le régime nanoseconde a notamment indiqué une plus grande sensibilité de détection des éléments de trace, grâce à la création d'un plasma moins chaud et donc d'un continuum moins important qui permet une détection plus précoce. Il a aussi été montré que le plasma créé par impulsion femtoseconde présente moins d'interactions avec l'air ambiant, et que la technique des séries cinétiques permet d'identifier l'origine des bandes CN observées, atout indéniable pour la détection de matériau biologique. Ces succès nous ont encouragés à poursuivre l'étude LIBS pour l'analyse foliaire, étude qui s'est révélée prometteuse. La LIBS pourrait devenir une méthode analytique d'avenir pour les feuilles : sensible

pour détecter un grand nombre de minéraux des feuilles, elle peut être utilisée à distance sans préparation d'échantillon. Nous avons aussi signalé ses potentialités pour l'analyse foliaire en terme d'analyse de surface ou pour l'étude des effets de saison. Cette mise en évidence encourageante mérite de continuer les études LIBS pour l'analyse foliaire, en collaboration avec des chercheurs agronomes.

Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans ma thèse concernent les apports des spectroscopies femtosecondes pour la détection de bactéries ; les expériences ont été réalisées dans les différentes phases physiques de la matière : liquide, gaz, solide, et même aérosol pour les gouttes. Deux approches nouvelles pour la discrimination de molécules ayant des signatures optiques très similaires ont été proposées : la LIBS et le contrôle cohérent, qui présentent tous deux des premiers résultats très encourageants.

La distinction optique entre aérosols biologiques et non-biologiques avait été rendue possible par une double excitation ; la seconde impulsion, en excitant les molécules vers des états supérieurs, diminue la fluorescence des chromophores biologiques, flavines et tryptophane, mais pas celle du naphthalène dans le cyclohexane. Pendant ma thèse, nous avons montré le rôle du solvant sur l'existence d'une déplétion, et proposé une interprétation en terme de potentiel d'ionisation. Une dynamique, faible, a été observée sur la déplétion du tryptophane, sur une échelle de l'ordre de la picoseconde. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour interpréter cette dynamique et pour comprendre complètement l'effet de la déplétion. Ce mécanisme a aussi été utilisé pour discriminer optiquement deux flavines, la riboflavine et la flavine mononucléotide, à l'aide du contrôle cohérent de la première impulsion. Cette expérience, menée en collaboration étroite avec le groupe d'Herschel Rabitz à Princeton, a nécessité un gros travail préalable sur la stabilité du laser. Son succès tient à la grande difficulté de la tâche, que même des expériences de spectroscopie fine de type Raman seraient incapables de surmonter[§] : distinguer des molécules contenant les mêmes cycles aromatiques. Ce résultat ouvre de nombreuses perspectives : le façonnage en amplitude et en phase de l'impulsion excitatrice à 400 nm pour les flavines, la discrimination avec une excitation façonnée à 270 nm pour le tryptophane et l'indole, et par suite, pour les bactéries.

Lorsque l'on travaille avec des impulsions femtosecondes intenses en phase liquide, des effets non-linéaires inattendus peuvent se produire. C'est le cas des filaments lasants, qu'il a été im-

[§]D'après une discussion privée avec le professeur Spiro à Princeton.

portant de caractériser pour éviter leur apparition lors d'éventuelles expériences "pump-dump". Nous avons ici mis en évidence le rôle des filaments, et une collaboration avec le groupe de simulation de Luc Bergé au CEA de Bruyères-le-Châtel a permis de comprendre l'influence de la forte absorption à deux photons sur la taille des filaments. Ils sont de plus autoorganisés en un réseau, à une distance caractéristique d'une centaine de microns les uns des autres. La diffraction imposée par un diaphragme avant la cellule déclenche la naissance des filaments sur les pics d'intensité présentant de forts gradients, ce qui est responsable d'une grande stabilité du réseau de filaments. La coumarine utilisée est efficacement excitée à deux photons au sein des filaments, qui forment ainsi plusieurs canaux à gain. L'émission de fluorescence s'effectue de façon spontanée au sein de chaque canal, sans rapport de phase entre les différentes émissions : la fluorescence en champ lointain est homogène. Une seconde impulsion "dump", spatialement cohérente, accordée à la bande de fluorescence de la coumarine, impose sa phase (par émission stimulée) à la fluorescence de chacun des canaux de gain : on obtient une figure d'interférence en champ lointain.

En phase gazeuse, on s'affranchit des interactions avec le solvant. Pour cela, nous avons étudié la photodissociation des flavines et du tryptophane ionisés dans une trappe électrique quadripolaire, dans l'espoir de voir une dynamique moléculaire. Avec le tryptophane, les mesures n'ont pas été suffisamment reproductibles pour observer l'effet de l'excitation par une seconde impulsion sur la photodissociation, selon le même principe que les expériences de déplétion. Le trop petit taux de dissociation, dû à la faible énergie de l'impulsion à 270 nm et à la faible section efficace d'absorption du tryptophane en phase gazeuse, est un problème qui a été résolu pour les flavines, par le choix d'une excitation plus intense, à 400 nm. Ainsi, la fragmentation de la FMN présente plusieurs voies de dissociation, et l'ajout de la seconde impulsion permet de les contrôler : l'importance de certains fragments augmente avec l'intensité de l'infrarouge au détriment des autres. Cependant, des calculs sont nécessaires pour comprendre comment la seconde impulsion agit pour favoriser certaines voies de dissociation aux dépens d'autres : une collaboration avec le groupe de Serrano-Andrés à Valence (Espagne), spécialiste des calculs pour les flavines, est ainsi envisagée.

Enfin, nous avons montré que la technique LIBS femtoseconde est prometteuse pour la discrimination rapide des bactéries. Une excitation très courte présente l'avantage de créer un plasma bien moins chaud qu'avec une excitation nanoseconde, et donc de s'affranchir plus tôt de l'effet du continuum. Cela nous a permis de valoriser la méthode pour la détection d'éléments de trace, nécessaires à la discrimination des bactéries. De plus, l'excitation femtoseconde donne naissance à un important signal des bandes $C - N$; une étude cinétique détermine si elle provient du

matériau, ou d'une interaction avec l'air ambiant, aidant ainsi la caractérisation de matériau biologique. Ces succès nous ont encouragés à répéter l'expérience pour l'analyse foliaire, qui a obtenu des résultats très favorables pour l'étude de la surface des feuilles, et pour celle des variations saisonnières des concentrations en minéraux. Une collaboration avec des agronomes serait profitable pour adapter la technique aux besoins de l'agronomie.

Nous avons utilisé plusieurs méthodes de spectroscopie femtoseconde dans le but d'améliorer la détection optique de bactéries : spectroscopies de fluorescence, de masse, et de plasma. Ces techniques, aux avantages et inconvénients spécifiques, sont bien complémentaires. Leur étude simultanée est d'autant plus intéressante que des travaux exploitent déjà l'intérêt d'utiliser ces méthodes de façon couplée [10], pour une détection qui puisse devenir précise, spécifique et quantitative.

Annexe A

Impulsion femtoseconde : génération et propagation

Le but de cette annexe est de montrer comment sont générées les impulsions femtosecondes et comment elles se propagent ; une application à cet exposé volontairement descriptif et pédagogique est la correction de la dispersion dans une expérience pompe-sonde à deux couleurs, compensation prise en compte dans les expériences de déplétion présentées ici. Elle se veut pédagogique, afin de servir aux futurs doctorants notamment.

1 Génération d'une impulsion femtoseconde

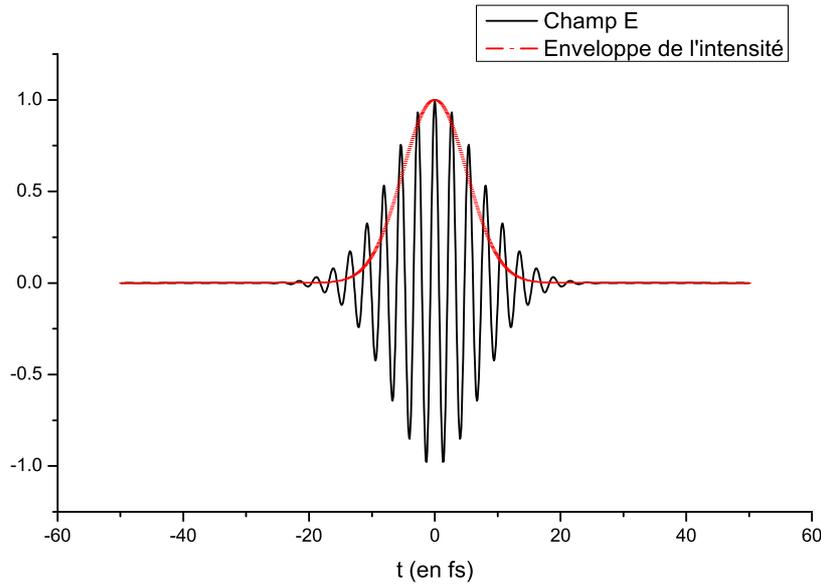
On peut décrire le champ électrique $E(t)$ d'une impulsion brève gaussienne^a, sa représentation complexe $\mathcal{E}(t)$, et son intensité $I(t)$, de la façon suivante :

$$\begin{aligned} E(t) &= E_0 \exp\left(-\frac{t^2}{2\tau^2}\right) \cos(\omega_0 t) \\ \mathcal{E}(t) &= E_0 \exp\left(-\frac{t^2}{2\tau^2}\right) \exp(j.\omega_0 t) \\ I(t) &= I_0 \exp\left(-\frac{t^2}{\tau^2}\right) \end{aligned} \tag{A.1}$$

L'oscillateur femtoseconde que nous utilisons au laboratoire^b délivre des impulsions de 12 fs (de largeur à mi-hauteur de l'intensité, i.e. $\tau \sim 7,2$ fs), à une longueur centrale de 810 nm ($\omega_0 \simeq 2,3.10^{15}$ Hz), ce qui ne correspond qu'à quelques cycles optiques (figure [A.1](#)).

^aLe choix de l'enveloppe gaussienne permet de faciliter les calculs. Les principes généraux obtenus restent valables pour d'autres formes d'impulsions, sécante hyperbolique par exemple.

^bLa largeur temporelle de l'impulsion amplifiée est bien plus importante (de l'ordre de 120 fs).


 FIG. A.1 – *Impulsion de 12 fs à 810 nm.*

Dans l'espace réciproque, par Transformée de Fourier, le champ électrique s'écrit :

$$\widehat{\mathcal{E}}(\omega) = \sqrt{2\pi} \tau \exp\left(-\frac{(\omega - \omega_0)^2 \tau^2}{2}\right) \quad (\text{A.2})$$

D'après l'équation A.2, il est clair que pour générer une impulsion courte (τ petit), il faut un spectre large : il s'agit d'une propriété générale de la Transformée de Fourier, quelle que soit la forme de l'enveloppe. De façon opposée, le spectre des lasers continus est fin. Plus précisément, l'inégalité d'Heisenberg relie les largeurs temporelles et spectrales par :

$$\Delta t \Delta \omega \geq \frac{1}{2} \quad (\text{A.3})$$

avec $\Delta t = \sqrt{\frac{\int_{-\infty}^{\infty} t^2 I(t) dt}{\int_{-\infty}^{\infty} I(t) dt}}$ *l'écart quadratique moyen (temporel)*

et $\Delta \omega = \sqrt{\frac{\int_{-\infty}^{\infty} (\omega - \omega_0)^2 \widehat{I}(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{\infty} \widehat{I}(\omega) d\omega}}$ *l'écart quadratique moyen (fréquentiel)*

l'égalité n'étant réalisée que pour un profil d'impulsion gaussien, lorsque la phase répond à certaines propriétés, i.e. qu'elle soit nulle, comme dans l'équation A.2, ou qu'elle dépende linéairement de la longueur d'onde.

Pour répondre à ces exigences (spectre large, phase nulle), l'oscillateur du laboratoire utilise le spectre d'émission large d'une matrice de saphir dopée au titane, et bloque la phase des modes à l'aide d'une lentille à effet Kerr (voir paragraphe 1.1 page 3). Dans une cavité laser, ces

modes sont séparés spectralement par “l'intervalle spectral libre”^c, c'est-à-dire par $\frac{c}{2L}$, où L est la longueur de la cavité. On peut ainsi décrire l'impulsion par un paquet d'ondes de la forme^d :

$$E(t) = \sum_{n=1}^N A_n \cos \left[\left(\omega_i + n \cdot 2\pi \cdot \frac{c}{2L} \right) t + \phi_n \right] \quad (\text{A.4})$$

Supposons constante la phase ϕ_l des différents modes. A $t = 0$, tous les modes n présentent un maximum, et interfèrent de façon constructive; à un temps légèrement ultérieur, du fait de la différence de fréquence des différents modes, ils sont ensuite déphasés et interfèrent destructivement. La figure A.2 illustre ce phénomène d'interférence avec quatre modes ($N = 4$) où l'on remarque que l'intensité maximale est obtenue lorsque tous les modes sont en phase. L'interférence constructive de tous les modes se répète au bout de chaque temps $T = \frac{2L}{c}$, correspondant à un aller-retour de l'impulsion dans la cavité, ce qui fixe le taux de répétition du laser $\frac{c}{2L}$. Et, par Transformée de Fourier, dans l'espace des fréquences, la séparation entre les modes est $\Delta\nu_n = \frac{c}{2L}$. La figure A.2 a été construite avec des modes de même amplitude A_n . En réalité, comme pour le gain de la cavité, l'amplitude des modes n'est pas constante : la figure A.3 montre ce cas avec 19 modes. Le laser a deux régimes de fonctionnement : la phase des modes est soit aléatoire (figure A.3(b), fonctionnement “continu” du laser), soit constante (figure A.3(c), fonctionnement “mode-locké”). Pour les impulsions de 12 fs délivrées par notre oscillateur, la largeur spectrale de 75 nm et le taux de répétition de 90 MHz correspondent à quelques centaines de milliers de modes.

2 Propagation du paquet d'onde

2.1 Temps de propagation

Lorsqu'une onde se propage dans un milieu d'indice de réfraction n constant, toutes les fréquences se déplacent à la vitesse $\frac{c}{n}$ avec un vecteur d'onde $k(\omega) = \frac{n\omega}{c}$. La propagation de l'impulsion sur une distance x engendre alors un déphasage pour le mode l de $\phi_l = -k_l \cdot x = \frac{n \cdot x}{c} \omega_l$, ce qui correspond pour chacun des modes à un même retard de $\tau = \frac{n \cdot x}{c}$ par rapport à l'origine temporelle : le paquet d'ondes se déplace sans se déformer. Ainsi, un déphasage linéaire en ω , $\phi(\omega) = t_0 \cdot \omega$, est responsable du décalage temporel de l'impulsion de t_0 , sans déformation. Il s'agit d'une propriété de la Transformée de Fourier, car en notant $\widehat{f(\omega)}$ la Transformée de Fourier inverse (TF^{-1}) de $f(t)$, il vient :

$$TF^{-1} \left(\widehat{f(\omega)} \cdot \exp(j \cdot \omega t_0) \right) = f(t - t_0) \quad (\text{A.5})$$

^cFSR en anglais, pour “Free Spectral Range”.

^dRemarque : ω_i n'est pas la pulsation centrale ω_0 .

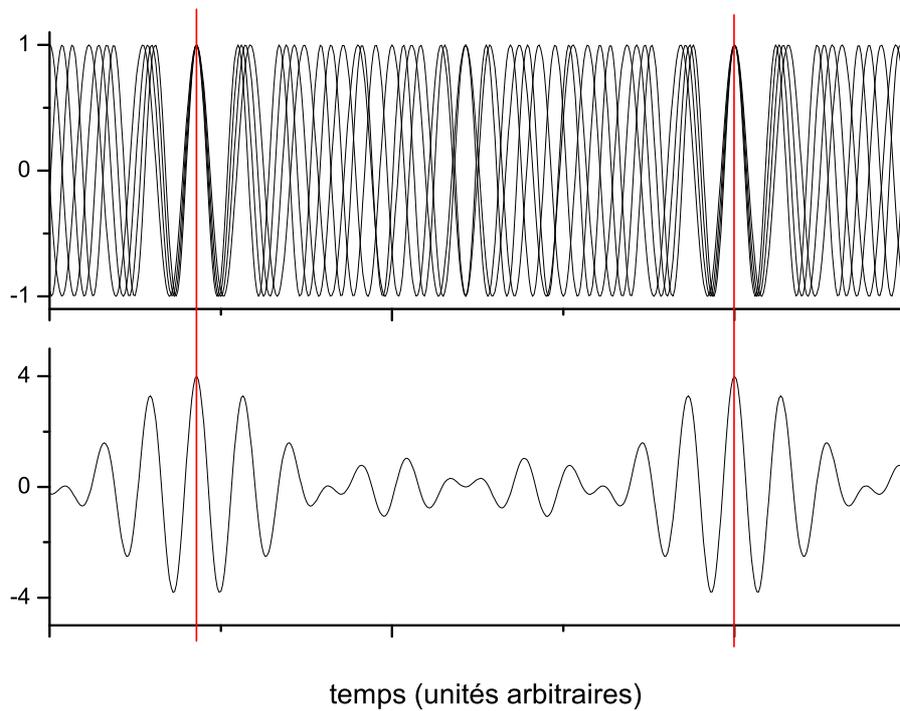


FIG. A.2 – *Illustration du phénomène d'interférences avec quatre modes de même amplitude.*

Il est donc naturel de définir, quel que soit le déphasage des différents modes, le retard de groupe τ de la façon suivante :

$$\tau \hat{=} \frac{\partial \phi}{\partial \omega} \quad (\text{A.6})$$

2.2 Propagation, déphasage et forme temporelle de l'impulsion

Dès lors que la propagation s'effectue dans un milieu dispersif (i.e. tel que l'indice de réfraction dépend de la longueur d'onde), les modes ne se propagent plus à la même vitesse - la vitesse de phase dépend de la fréquence. Pour cette raison, l'impulsion femtoseconde (i.e. le paquet d'onde, qui correspond à l'interférence constructive des différents modes) va elle aussi se propager à une vitesse différente qui est en général la vitesse de groupe v_g ^e. Dans la suite, on ne parlera plus de vitesse de groupe, mais du retard τ du paquet d'ondes, les deux quantités étant reliées dans le cas général de la propagation sur une distance x , mais τ est plus pratique à utiliser lorsque l'on

^eLa vitesse de groupe v_g est la vitesse de propagation de l'énergie, sauf dans des cas bien particuliers pour lesquels l'absorption est forte. La vitesse de groupe peut notamment dépasser c dans ces cas, sans que ne soit remise en cause la théorie de la relativité - la vitesse de l'impulsion restant inférieure à c .

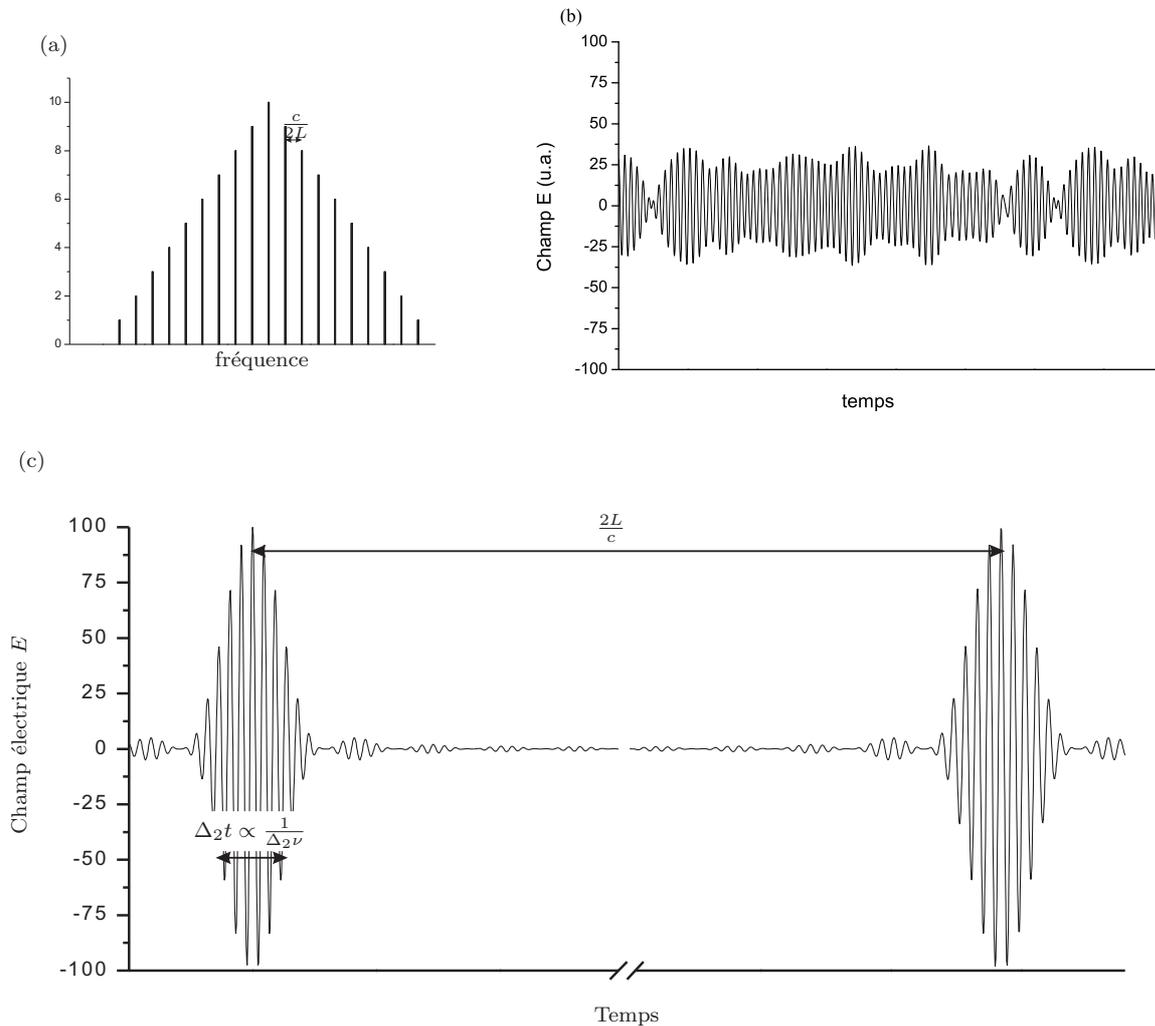


FIG. A.3 – **19 modes**. Δ_2 correspond à la largeur à mi-hauteur, et non à l'écart quadratique moyen. Le coefficient de proportionnalité, K , entre $\Delta_2 t$ et $\frac{1}{\Delta_2 \nu}$ dépend de la forme de l'impulsion : $K=0,441$ pour une enveloppe gaussienne, et $K=0,135$ pour une sécante hyperbolique.

manipule les composantes spectrales de l'impulsion dans un façonneur.

Dans un milieu dispersif, les différentes vitesses de phase imposent un déphasage $\phi(\omega)$ qui n'est pas linéaire. Dans l'exemple d'un déphasage quadratique, $\phi(\omega) = \frac{A}{2}(\omega - \omega_0)^2$, le retard de groupe varie de façon linéaire $\tau(\omega) = A(\omega - \omega_0)$. Il s'agit ici d'un glissement de fréquence linéaire : les différentes composantes spectrales arrivent les unes après les autres. Ce glissement de fréquence est appelé "chirp" en anglais, ce qui signifie "gazouillis", par analogie aux chants des oiseaux dont la fréquence varie. Dans cet exemple, si A est positif, les composantes rouges du spectre^f (i.e. les composantes de plus faible pulsation ω) sont moins retardées et donc arrivent

^fLes composantes "rouges" correspondent aux longueurs d'onde les plus élevées du spectre, car on choisit implicitement comme référence un spectre visible.

avant les autres, dans le front de l'impulsion. C'est ce qui se passe dans le cas d'une dispersion dite positive (cas le plus courant), où le front avant de l'impulsion est décalé vers le "rouge" par rapport à la longueur d'onde centrale, et le front arrière est décalé vers le "bleu". On parle alors de glissement de fréquence (ou "chirp") positif. Au contraire, si A est négatif, on parle de glissement de fréquence linéaire négatif (ou "chirp" linéaire négatif). Pour représenter une impulsion, plutôt que de tracer sa phase et son amplitude en fonction de la fréquence, il est usuel et pratique d'utiliser un spectrogramme qui représente les longueurs d'onde de l'impulsion en fonction du temps (figure A.4). Une impulsion limitée par Transformée de Fourier, c'est-à-dire de phase constante (et donc la plus courte possible étant donné son spectre), est représentée par une ellipse horizontale ou verticale. Le glissement de fréquence se visualise par l'inclinaison des axes. Notons qu'un spectrogramme représente la fréquence en fonction du temps ; bien que très pratique, cette représentation n'est pas totalement rigoureuse, car temps et fréquence sont deux variables conjuguées qui permettent d'exprimer l'amplitude soit dans l'espace direct, soit dans l'espace de Fourier [191]. Techniquement, pour obtenir la Transformée de Fourier de l'intensité correspondant à un temps donné, on multiplie préalablement l'intensité par une fenêtre temporelle finie, ce qui va donc diminuer la résolution spectrale. Pour limiter cet effet, on prend en général une largeur temporelle de l'ordre de l'inverse de la largeur spectrale.

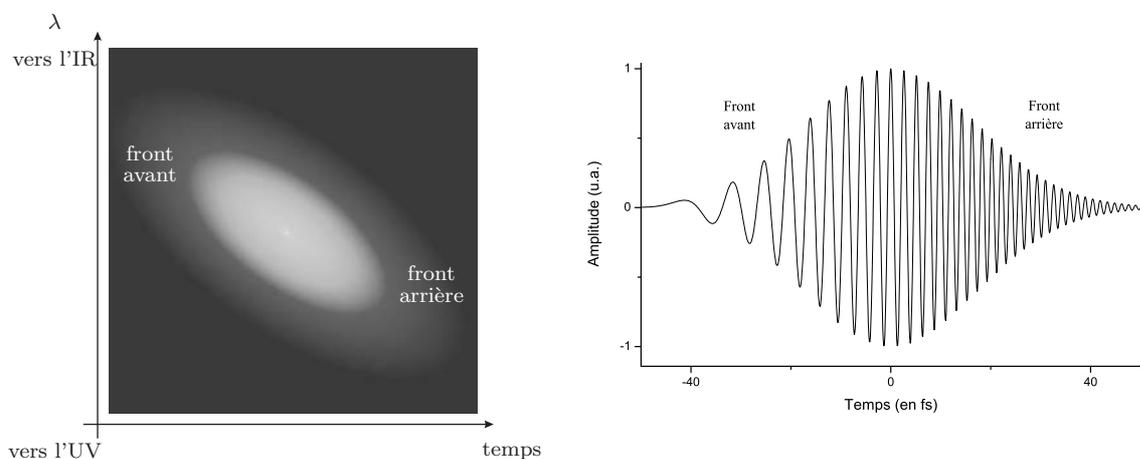


FIG. A.4 – **Glissement de fréquence linéaire positif**. Appelé aussi "chirp" positif : les hautes longueurs (i.e. les basses fréquences) arrivent en premier. À gauche le spectrogramme, à droite la représentation temporelle.

2.3 Déphasages constants, linéaires et quadratiques

Nous avons vu au paragraphe 2 (page 8) que l'on peut imposer un masque de phase (et aussi d'amplitude voire de polarisation) aux différents modes de l'impulsion, afin de façonner

sa forme. Un déphasage identique de tous les modes n'a aucun effet visible sur les impulsions de plusieurs dizaines de femtosecondes (à 800 nm). Par contre, pour les impulsions très courtes, de quelques cycles, ce décalage est loin d'être négligeable (figure A.5) et peut avoir des effets physiques importants. De façon plus générale, le tableau A.1 résume l'effet sur l'impulsion de plusieurs types de déphasage.

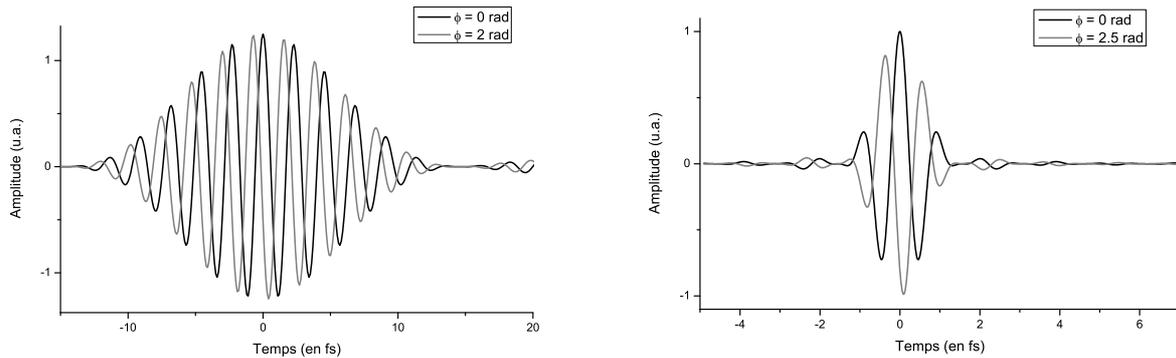


FIG. A.5 – **Déphasage constant des différents modes.** Ce déphasage a pour effet de faire glisser la porteuse à l'intérieur de l'enveloppe. Cet effet est négligeable en pratique, sauf pour des impulsions ne contenant que quelques cycles (à droite).

Déphasage	Effet sur l'impulsion
Constant : $\phi(\omega) = cst$	Glissement de l'onde dans la porteuse (figure A.5)
Linéaire : $\phi(\omega) = t_0\omega$	Retard de l'impulsion sans déformation de t_0
Quadratique : $\phi(\omega) = \frac{A}{2}(\omega - \omega_0)^2$	Glissement de fréquence ("chirp") linéaire (figure A.4)

TAB. A.1 – **Déphasage et effet sur l'impulsion.**

2.4 Propagation dans du verre

La dispersion dans le verre n'est pas négligeable pour les impulsions femtosecondes, larges spectralement (focalisation avec une lentille par exemple). L'effet est d'induire un retard, et d'élargir les impulsions - ce dernier effet étant négligeable pour des impulsions d'une centaine de femtosecondes. Lors d'expériences pompe-sonde, le retard induit est différent si les deux impulsions sont de couleurs différentes, et il faut corriger cet effet pour déterminer l'origine des temps.

Pour calculer la dispersion dans la silice fondue (transparent à l’ultra-violet), on utilise l’équation de Sellmeier qui modélise l’indice de réfraction n en fonction de λ [192] :

$$n^2 = 1 + \frac{B_1\lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2\lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3\lambda^2}{\lambda^2 - C_3}$$

avec λ en μm , et les coefficients $B_{i,i=1\grave{a}3}$ et $C_{i,i=1\grave{a}3}$ donnés dans le tableau A.2.

Matériau	B_1	B_2	B_3	C_1	C_2	C_3
Silice fondue	$6.96166.10^{-01}$	$4.07942.10^{-01}$	$8.9749.10^{-01}$	$4.67914.10^{-03}$	$1.35120.10^{-02}$	$9.79340.10^{01}$

TAB. A.2 – **Constantes $B_{i,i=1\grave{a}3}$ et $C_{i,i=1\grave{a}3}$ pour la silice fondue.** D’après [192], le nombre de chiffres significatifs a ici été diminué pour l’affichage.

Le déphasage ϕ induit par la traversée d’un morceau de verre d’épaisseur e est $\phi = \frac{n(\omega).\omega.e}{c}$, ce qui induit un retard τ donné par :

$$\tau = \frac{e}{c} \left[n(\omega) + \omega \frac{\delta n}{\delta \omega} \right] \tag{A.7}$$

où l’on distingue aisément les contributions des vitesses de phase (d’abord) et de groupe (ensuite). La grandeur d’intérêt est la différence $\Delta\tau$ entre les deux ondes. Dans notre expérience, après recombinaison, les impulsions traversent la lentille en silice fondue (épaisseur $e = 2,4\text{ mm}$ au centre) et la première paroi de la cellule, à 45° (épaisseur $e = 1,77\text{ mm}$ à 45°). En utilisant l’équation A.7, on trouve un retard voisin de la picoseconde entre impulsions de longueur d’onde centrale distincte, induits par la propagation dans le milieu dispersif qu’est la silice fondue (tableau A.3). Entre les impulsions ultra-violettes et infrarouges notamment, il se crée un retard de 2 ps suite au passage dans le verre : les courbes de déplétion sont corrigées de cet effet.

$\Delta\tau$	Lentille UV (en ps)	Paroi de cellule (en ps)	Total (en ps)
270-800	1,14	0,84	1,97
270-400	0,76	0,56	1,32
400-800	0,37	0,28	0,65

TAB. A.3 – **Délais entre impulsions dus à la dispersion.** Ces délais sont maximaux avec l’impulsion à 270 nm, du fait de la forte augmentation de l’indice vers les basses longueurs d’onde.

Annexe B

Propriétés des chromophores utilisés

Cette annexe a pour objectif de rassembler quelques propriétés des chromophores que j'ai utilisés pendant ma thèse, et particulièrement du tryptophane et des flavines.

1 Le tryptophane

1.1 Fluorescence et solubilité

Le tryptophane est l'un des trois acides aminés qui fluorescent dans le proche ultraviolet. Le spectre d'absorption du tryptophane dans l'eau, dû aux électrons π de ses cycles aromatiques, présente une bande d'absorption autour de 270 nm, et autour 200 nm ; sa fluorescence se situe vers 360 nm. Son coefficient d'absorption est $5\,580\text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 278 nm [127].

C'est une molécule soluble dans l'eau dont la solubilité dépasse 10 g/L à température ambiante (figure B.1). Sa masse molaire est $M = 204,23\text{ g.mol}^{-1}$.

1.2 Propriétés acido-basiques

Le tryptophane présente trois formes en fonction du pH, ses pKa étant 2,4 et 9,4 (figure B.2). La forme acide est connue pour avoir une fluorescence très faible ; le quenching est dû au transfert d'un proton vers le cycle.

1.3 Potentiels d'ionisation et potentiels d'oxydoréduction

Le potentiel d'ionisation ainsi que le potentiel rédox dépendent du pH et du solvant. Le tableau B.1 rassemble quelques valeurs. Les potentiels rédox sont donnés par rapport à NHE^a ;

^aNHE (pour Normal Hydrogen Electrode) est l'électrode normale à hydrogène (couple H^+/H_2).

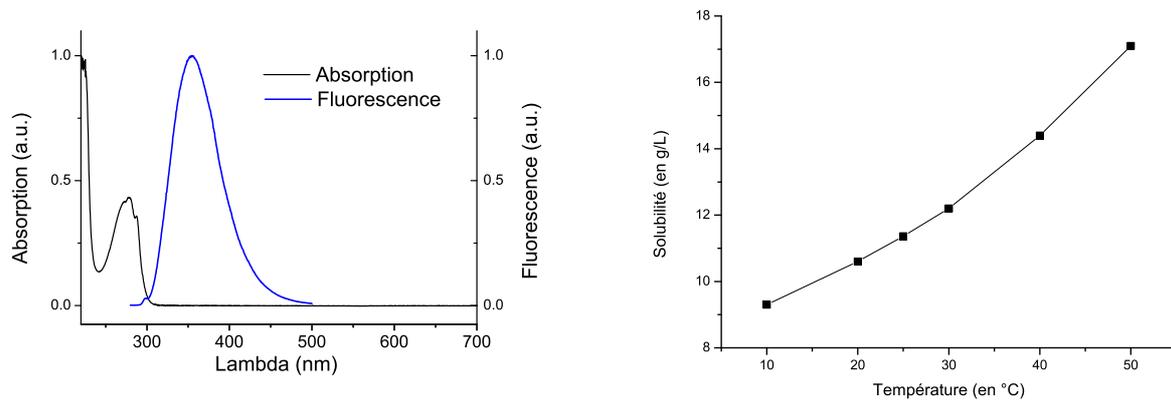


FIG. B.1 – **Tryptophane**. Spectres d'absorption et de fluorescence dans l'eau [127], et solubilité dans l'eau en fonction de la température [193].

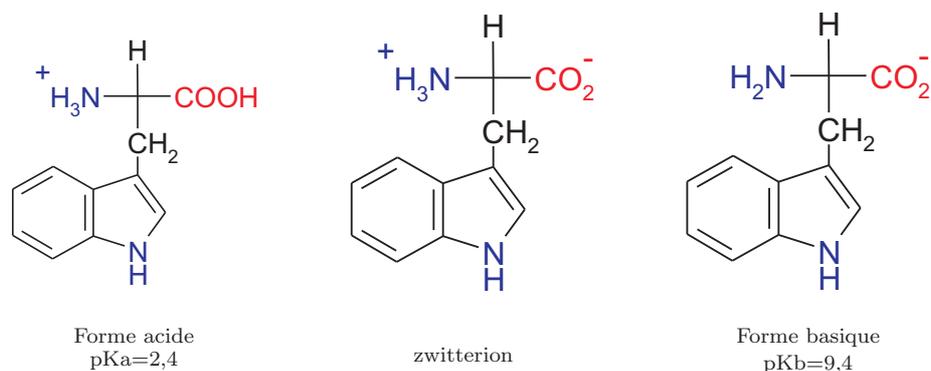


FIG. B.2 – **Différentes formes du tryptophane dans l'eau, en fonction du pH.**

pour avoir les valeurs par rapport à SCE^b, il suffit de retrancher 0,23 V aux valeurs tabulées.

Solvant	gaz	pH 2	pH 7	pH 12	Ethanol	Acétonitrile
IP	7,8 [46]		4,5 [46, 52]		4,9 [52]	
E_{ox}		1,15 [194]	1,015 [194]	0,65 [194]		1,07 [195]

TAB. B.1 – **Propriétés électroniques du tryptophane**. IP est le potentiel d'ionisation en eV, et E_{ox} est le potentiel rédox en V par rapport à NHE, du tryptophane en fonction de différents solvants. Pour l'eau, on remarque la diminution du potentiel rédox, et donc aussi du potentiel d'ionisation, avec le pH.

^bSCE (pour Saturated Calomel Electrode) est l'électrode de calomel saturée (couple $\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$).

1.4 L'indole

Cette molécule, semblable au tryptophane (figure B.3), a des propriétés optiques et électroniques voisines de ce dernier : potentiel d'ionisation de 7.9 eV [47] en phase gazeuse, 4.35 eV dans l'eau [47] et 4.85 eV dans l'éthanol [47].

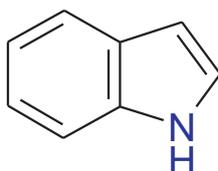


FIG. B.3 – *L'indole*.

2 Les flavines

La famille des flavines est constituée de la riboflavine ou vitamine B2 (RbF), la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) (voir figure B.4 pour les structures). La FMN et la FAD sont des coenzymes^c (aussi appelées groupement prosthétique); elles sont synthétisées par la plupart des organismes à partir de la riboflavine, qui constitue la source biochimique de ces molécules. Les enzymes contenant des flavines, appelées flavoprotéines, sont souvent des enzymes d'oxydoréduction, c'est-à-dire qui facilitent le transfert d'électrons.

La masse molaire de la riboflavine est $376,4 \text{ g.mol}^{-1}$, celle de la FMN est $456,3 \text{ g.mol}^{-1}$, et celle de la FAD est $785,6 \text{ g.mol}^{-1}$.

2.1 Fluorescence

Les spectres d'absorption des flavines dans l'eau sont très similaires; ils présentent une double bande d'absorption autour de 400 nm, une bande autour de 270 nm, et une bande autour de 200 nm environ. La fluorescence des flavines se situe autour de 520 nm (figure B.5). Le coefficient d'absorption de la riboflavine dans l'eau est $33\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 266 nm [127].

^cLes enzymes, catalyseurs biologiques, sont constituées d'une protéine (appelée apoenzyme) et d'une molécule organique de petite taille appelée coenzyme.

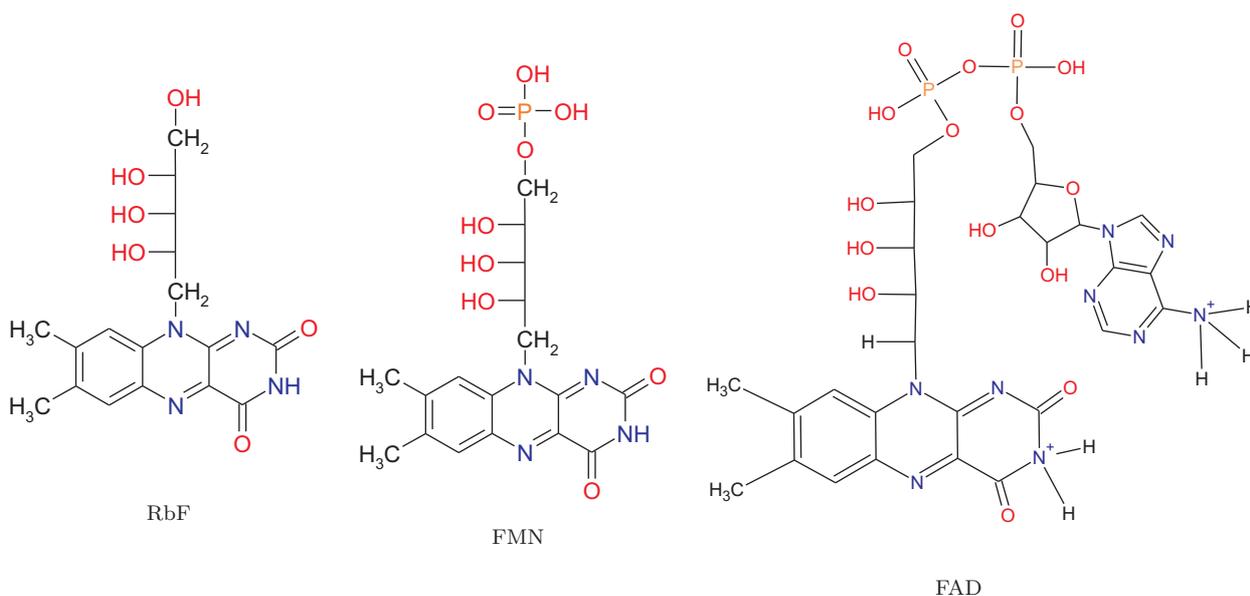


FIG. B.4 – **Représentation de Fisher des flavines.** Ces cycles hétéronucléaires organiques caractérisent cette classe de molécules, et sont responsables de leurs propriétés optiques.

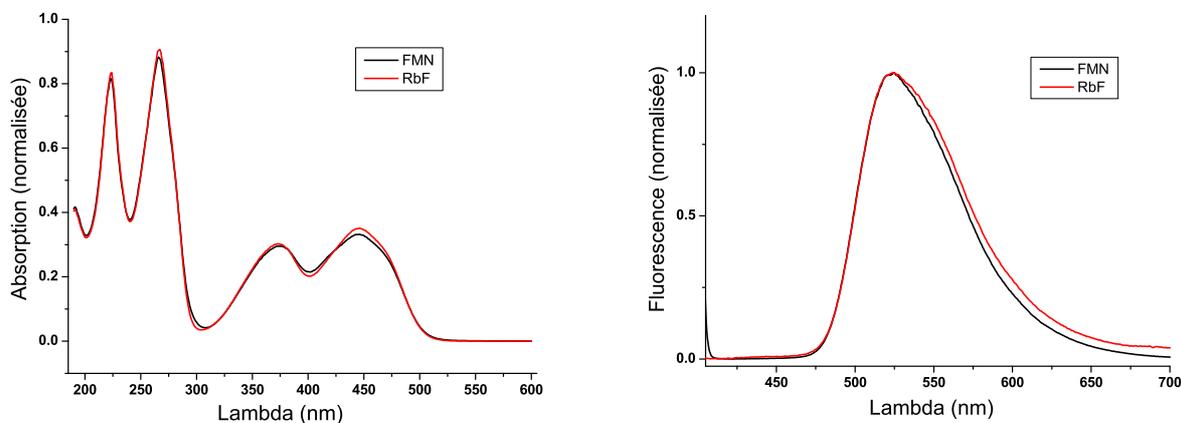


FIG. B.5 – **Absorption et Fluorescence de la riboflavine et de la flavine mononucléotide.** Les spectres sont quasi-identiques. FMN : Flavine mononucléotide, RbF : Riboflavine.

2.2 Solubilité

La solubilité de la riboflavine est faible (tableau B.2), et il est souvent nécessaire de chauffer la solution et de la mettre dans un bain à ultrasons afin de dissoudre efficacement la poudre.

Riboflavine	0,1 $g.L^{-1}$ (0,13 $g.L^{-1}$ à 13°C, 0,05 $g.L^{-1}$ à 7°C)
FMN	50 $g.L^{-1}$ (attention : création de dimère à plus haute concentration ^d)
FAD	5 $g.L^{-1}$

TAB. B.2 – **Solubilité dans l'eau et à 20°C des flavines.** La présence du groupement phosphate est responsable de la forte solubilité pour FMN.

3 Le naphthalène

Le naphthalène est une molécule organique non-biologique. Cette molécule a été utilisée dans nos travaux pour simuler les suies de combustion. Nous avons notamment comparé, aux résultats obtenus avec le tryptophane, les propriétés optiques et de déplétion, elles-mêmes liées aux propriétés d'ionisation et donc d'oxydo-réduction.

Le naphthalène (voir figure B.6) a une masse molaire de 128,2 $g.L^{-1}$.

3.1 Propriétés optiques

Les positions des bandes d'absorption et d'émission du naphthalène sont très voisines de celles du tryptophane (voir figure B.6). Le coefficient d'absorption du naphthalène dans le cyclohexane est 6 000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ à 275 nm, le taux de fluorescence étant de 0,23 [127].

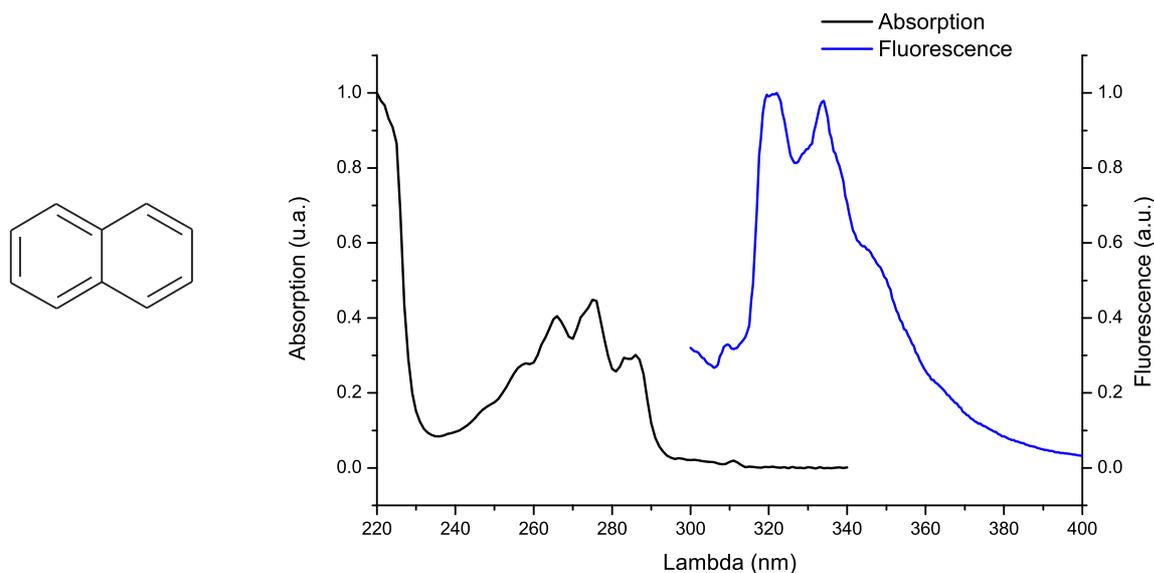


FIG. B.6 – **Naphtalène : structure et propriétés optiques dans le cyclohexane** [127].

3.2 Solubilité

La solubilité du naphthalène dans l'eau est très faible, de l'ordre de $0,03g.L^{-1}$ à $25^{\circ}C$ (voir figure B.7) [196], solubilité qu'il est difficile d'atteindre même en chauffant : il ne nous a donc pas été possible de réaliser une courbe de déplétion du naphthalène dans l'eau dans de bonnes conditions, le signal de fluorescence étant trop faible. Par contre le naphthalène est soluble dans des solvants organiques comme le cyclohexane, l'acétonitrile et l'éthanol.

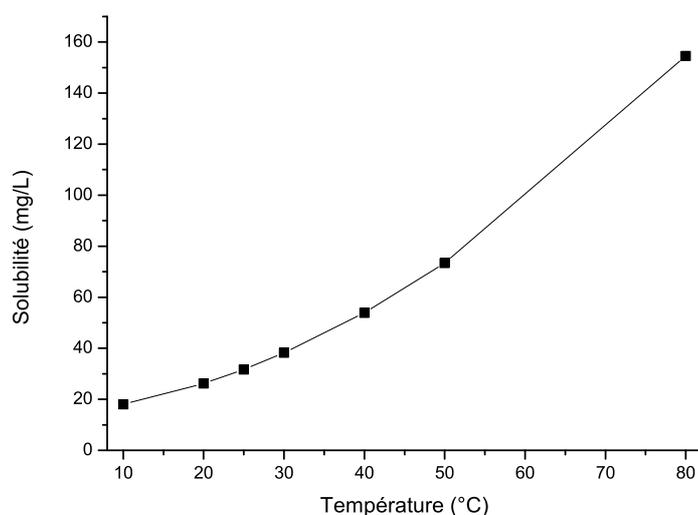


FIG. B.7 – **Solubilité du naphthalène dans l'eau** [196]. *Il ne nous a pas été possible d'atteindre ces solubilités, pourtant faibles.*

3.3 Potentiels d'ionisation et potentiels d'oxydoréduction

En phase gazeuse, le potentiel d'ionisation du naphthalène est légèrement supérieur à celui du tryptophane. Comme il s'agit d'une molécule apolaire, la solvatation, et donc aussi l'abaissement du potentiel d'ionisation par le solvant, sont différents de ce qu'il se passe pour le tryptophane.

Solvant	Gaz	Eau	Acétonitrile
IP	8,13 [56]		
E_{ox}		2,03	2,03 [197]

TAB. B.3 – **Propriétés électroniques du naphthalène.** *IP* est le potentiel d'ionisation en eV, et E_{ox} est le potentiel rédox en V par rapport à NHE du naphthalène en fonction de différents solvants. Les valeurs sont difficiles à trouver, notamment pour l'éthanol.

Annexe C

Programme d'identification des raies

Cette annexe a pour but d'expliquer le fonctionnement du programme de détection de raies que j'ai réalisé sous Labview, car il sera certainement utile pour d'autres analyses systématiques comme celle que j'ai réalisée en LIBS avec les feuilles d'arbre.

1 Fichiers fournis

La version du programme documentée ici est contenue dans le fichier "LIBS_peak_vf.zip", daté du 4 juillet 2007. Ce "package" contient les fichiers décrits dans le tableau C.1. La base de données du NIST [157] ne contient que les raies d'émission d'atomes neutres ou simplement ionisés : il est très rare d'observer des raies d'éléments doublement (ou plus) ionisés dans un spectre LIBS en raison des recombinaisons.

Fichier	Description
LIBS_peak_version_finale.vi	Fichier Labview (v 7.0) contenant tous les sous-programmes
Marronierext.asc	Extrait du spectre LIBS d'une feuille de marronnier
Nist_dual.csv	Base de données de raies extraite du NIST [157]
vide.csv	Base de données de départ ^a
resultats.csv	Fichier créé par le programme avec <i>Marronierext.asc</i> ^b

TAB. C.1 – *Fichiers contenus dans LIBS_peak_vf.zip.*

^aVide pour la première utilisation du programme, pour une autre utilisation, on peut utiliser le fichier *resultat.csv* précédent. Dans le cas des feuilles par exemple, on réutilise les résultats antérieurs pour comparer les pics des différentes essences (voir tableau C.3).

^bAjouter l'extension .csv pour utiliser facilement le fichier dans Excel par la suite.

2 Description du programme

La figure C.1 montre la face avant du programme; le tableau C.2 explique les parties entourées.

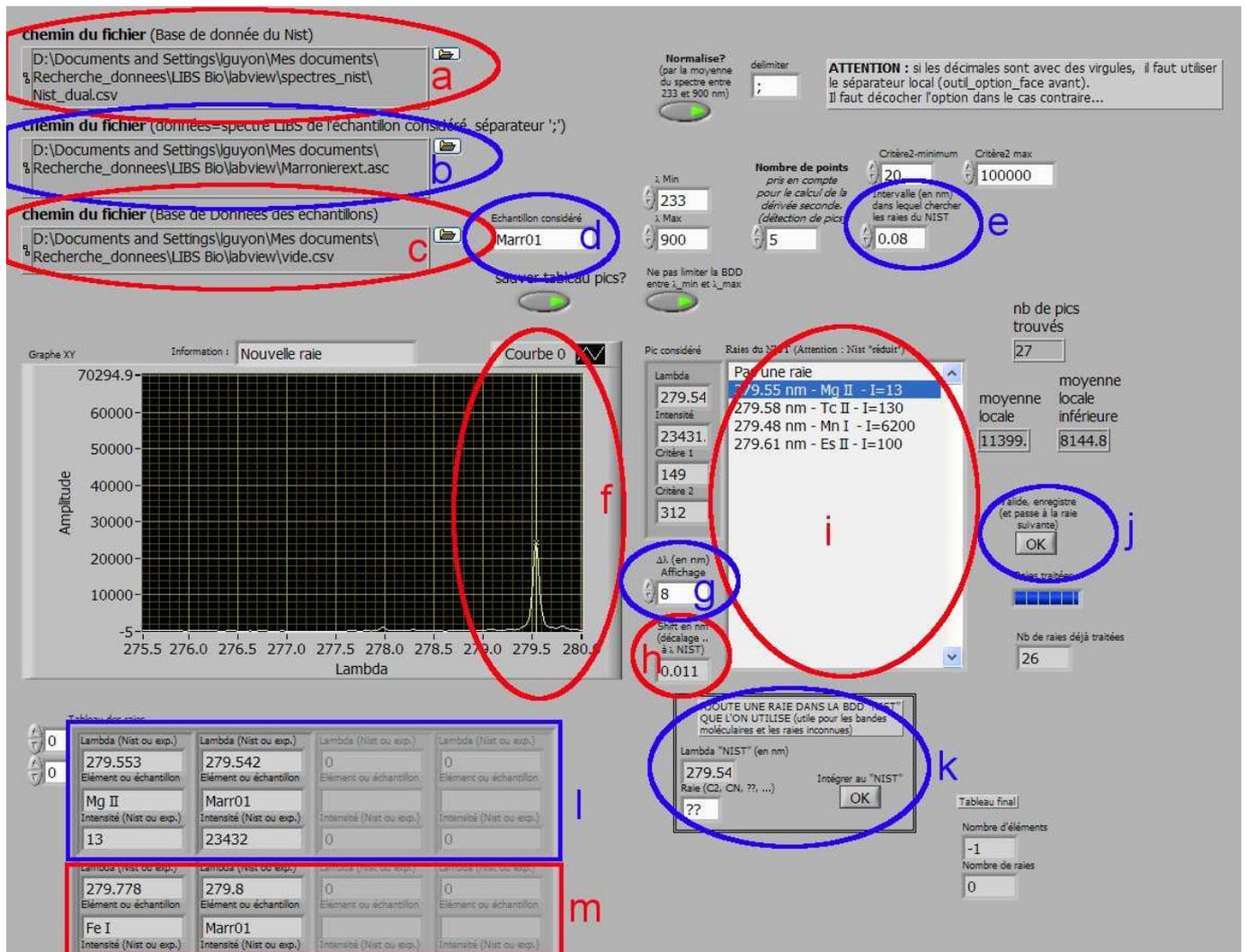


FIG. C.1 – Face avant du programme LIBS.

Lettre	Description
a	Choisir le fichier <i>Nist_dual.csv</i>
b	Choisir le spectre à traiter
c	Choisir la base de données de départ
d	Nom de l'échantillon
e	Ecart maximal entre la position du pic et la valeur mesurée ^c
f	Pic considéré
g	Largeur de la fenêtre d'affichage en nm
h	Décalage entre position mesurée et tabulée (en nm) ^d
i	Raies du NIST proche du pic sélectionnée ^e
j	Valider lorsque la raie est identifiée (après sélection en i)
k	Ajoute une raie dans la base de données (moléculaire par exemple)
l	Le tableau se remplit (ici la première raie)
m	La suite (deuxième raie)

TAB. C.2 – *Description du programme.*

3 Fichier créé

Le fichier créé est de la forme suivante (tableau C.3), après traitement de deux spectres (Marr et Ceri).

λ NIST	Elément	Int. NIST	Pic mesuré	Ess.	Int.	Pic mesuré	Ess.	Int.
278.297	Mg I	18	278.29	Marr	547	278.294	Ceri	312
278.81	Fe I	3000	278.788	Marr	292	278.816	Ceri	356

TAB. C.3 – *Exemple de fichier créé par le programme avec sa légende. Int. pour Intensité, Ess. pour Essence. Cette forme de fichier est facilement réalisable sous Excel dès que l'on a le fichier resultat.csv.*

^cCet écart est en général inférieur à 0,05 nm si le spectromètre est bien calibré.

^dCette valeur dépend bien sûr de la raie du NIST sélectionnée en i.

^eLe nombre de raies proposées dépend de la valeur en e, valeur qui peut être changée en cours d'utilisation du programme.

Bibliographie

- [1] D. Vinck. La bonne science est-elle un produit collectif? *Sciences Humaines*, (169) :50–53, Mars 2006.
- [2] P. S. Chen and C. S. Li. Real-time monitoring for bioaerosols - flow cytometry [\[Lien\]](#). *Analyst*, 132(1) :14–16, 2007.
- [3] M. Deloge-Abarkan, T. L. Ha, E. Robine, D. Zmirou-Navier, and L. Mathieu. Detection of airborne legionella while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (fish) [\[Lien\]](#). *Journal of Environmental Monitoring*, 9(1) :91–97, 2007.
- [4] S. C. Hill, R. G. Pinnick, S. Niles, Y. L. Pan, S. Holler, R. K. Chang, J. Bottiger, B. T. Chen, C. S. Orr, and G. Feather. Real-time measurement of fluorescence spectra from single airborne biological particles [\[Lien\]](#). *Field Analytical Chemistry and Technology*, 3(4-5) :221–239, 1999.
- [5] J. Ho. Future of biological aerosol detection [\[Lien\]](#). *Analytica Chimica Acta*, 457(1) : 125–148, 2002.
- [6] F. L. Reyes, T. H. Jeys, N. R. Newbury, C. A. Primmerman, G. S. Rowe, and A. Sanchez. Bio-aerosol fluorescence sensor [\[Lien\]](#). *Field Analytical Chemistry and Technology*, 3(4-5) : 240–248, 1999.
- [7] F. Courvoisier, V. Boutou, V. Wood, A. Bartelt, M. Roth, H. Rabitz, and J. P. Wolf. Femtosecond laser pulses distinguish bacteria from background urban aerosols [\[Lien\]](#). *Applied Physics Letters*, 87(6), 2005.
- [8] G. Mejean, J. Kasparian, J. Yu, S. Frey, E. Salmon, and J. P. Wolf. Remote detection and identification of biological aerosols using a femtosecond terawatt lidar system [\[Lien\]](#). *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 78(5) :535–537, 2004.
- [9] V. Sivaprakasam, A. L. Huston, C. Scotto, and J. D. Eversole. Multiple uv wavelength excitation and fluorescence of bioaerosols [\[Lien\]](#). *Optics Express*, 12(19) :4457–4466, 2004.

- [10] J. D. Hybl, S. M. Tysk, S. R. Berry, and M. P. Jordan. Laser-induced fluorescence-cued, laser-induced breakdown spectroscopy biological-agent detection [Lien]. *Applied Optics*, 45(34) :8806–8814, 2006.
- [11] B. A. Richman, A. A. Kachanov, B. A. Paldus, and A. W. Strawa. Novel detection of aerosols : combined cavity ring-down and fluorescence spectroscopy [Lien]. *Optics Express*, 13(9) :3376–3387, 2005.
- [12] P. Rosch, M. Harz, K. D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, A. Schule, G. Schmauz, M. Lankers, S. Hofer, H. Thiele, H. W. Motzkus, and J. Popp. On-line monitoring and identification of bioaerosols [Lien]. *Analytical Chemistry*, 78(7) :2163–2170, 2006.
- [13] M. O. Scully, G. W. Kattawar, R. P. Lucht, T. Opatrny, H. Pilloff, A. Rebane, A. V. Sokolov, and M. S. Zubairy. Fast cars : Engineering a laser spectroscopic technique for rapid identification of bacterial spores [Lien]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17) :10994–11001, 2002.
- [14] R. Trebino. [Lectures in Ultrafast Optics](#).
- [15] Femtolaser[®]. [Femtosource Scientific](#). Technical report.
- [16] G. Cheriaux, P. Rousseau, F. Salin, J. P. Chambaret, B. Walker, and L. F. Dimauuro. Aberration-free stretcher design for ultrashort-pulse amplification [Lien]. *Optics Letters*, 21(6) :414–416, 1996.
- [17] F. Courvoisier. *Spectroscopie ultra-brève de particules d'aérosols et microcavités*. PhD thesis, Université Lyon 1, 2005.
- [18] G. Mejean. *Propagation d'impulsions Térawatts femtosecondes dans l'atmosphère et applications*. PhD thesis, Université Lyon 1, 2005.
- [19] T. Brixner and G. Gerber. Femtosecond polarization pulse shaping [Lien]. *Optics Letters*, 26(8) :557–559, 2001.
- [20] T. Brixner, G. Krampert, P. Niklaus, and G. Gerber. Generation and characterization of polarization-shaped femtosecond laser pulses [Lien]. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 74 :S133–S144, 2002.
- [21] M. M. Wefers and K. A. Nelson. Generation of high-fidelity programmable ultrafast optical wave-forms [Lien]. *Optics Letters*, 20(9) :1047–1049, 1995.
- [22] A. Monmayrant. *Façonnage et caractérisation d'impulsions ultracourtes. Contrôle cohérent de systèmes simples*. PhD thesis, Université Toulouse III, 2005.
- [23] M. Roth, M. Mehendale, A. Bartelt, and H. Rabitz. Acousto-optical shaping of ultraviolet femtosecond pulses [Lien]. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 80(4-5) :441–444, 2005.

- [24] H. Kandori, R. F. Borkman, and K. Yoshihara. Picosecond transient absorption of aqueous tryptophan [\[Lien\]](#). *Journal of Physical Chemistry*, 97(38) :9664–9667, 1993.
- [25] Y. Iketaki, T. Watanabe, S. Ishiuchi, M. Sakai, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii. Investigation of the fluorescence depletion process in the condensed phase; application to a tryptophan aqueous solution [\[Lien\]](#). *Chemical Physics Letters*, 372(5-6) :773–778, 2003.
- [26] T. Watanabe, Y. Iketaki, T. Omatsu, K. Yamamoto, S. Ishiuchi, M. Sakai, and M. Fujii. Two-color far-field super-resolution microscope using a doughnut beam [\[Lien\]](#). *Chemical Physics Letters*, 371(5-6) :634–639, 2003.
- [27] T. Watanabe, Y. Iketaki, T. Omatsu, K. Yamamoto, M. Sakai, and M. Fujii. Two-point-separation in super-resolution fluorescence microscope based on up-conversion fluorescence depletion technique [\[Lien\]](#). *Optics Express*, 11(24) :3271–3276, 2003.
- [28] Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, T. Omatsu, T. Hiraga, K. Yamamoto, and M. Fujii. Measurement of contrast transfer function in super-resolution microscopy using two-color fluorescence dip spectroscopy [\[Lien\]](#). *Applied Spectroscopy*, 61(1) :6–10, 2007.
- [29] Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, and M. Fujii. Construction of super-resolution microscope based on cw laser light source [\[Lien\]](#). *Review of Scientific Instruments*, 77(6) :063112, 2006.
- [30] Y. Iketaki, T. Watanabe, S. I. M. Sakai, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii. Predicted spatial resolution of super-resolving fluorescence microscopy using two-color fluorescence dip spectroscopy [\[Lien\]](#). *Applied Spectroscopy*, 57(10) :1312–1316, 2003.
- [31] G. W. Faris, R. A. Copeland, K. Mortelmans, and B. V. Bronk. Spectrally resolved absolute fluorescence cross sections for bacillus spores [\[Lien\]](#). *Applied Optics*, 36(4) :958–967, 1997.
- [32] N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, K. Daigoku, N. Davidson, and M. Fujii. On polarization effects in fluorescence depletion microscopy [\[Lien\]](#). *Optics Communications*, 272(1) :263–268, 2007.
- [33] R. S. Judson and H. Rabitz. Teaching lasers to control molecules [\[Lien\]](#). *Physical Review Letters*, 68(10) :1500–1503, 1992.
- [34] W. S. Warren, H. Rabitz, and M. Dahleh. Coherent control of quantum dynamics - the dream is alive [\[Lien\]](#). *Science*, 259(5101) :1581–1589, 1993.
- [35] D. Zeidler, S. Frey, K. L. Kompa, and M. Motzkus. Evolutionary algorithms and their application to optimal control studies [\[Lien\]](#). *Physical Review A*, 64(2) :023420, 2001.
- [36] T. Brixner and G. Gerber. Quantum control of gas-phase and liquid-phase femtochemistry [\[Lien\]](#). *Chemphyschem*, 4(5) :418–438, 2003.

- [37] T. C. Weinacht, J. Ahn, and P. H. Bucksbaum. Controlling the shape of a quantum wavefunction [Lien]. *Nature*, 397(6716) :233–235, 1999.
- [38] R. Bartels, S. Backus, E. Zeek, L. Misoguti, G. Vdovin, I. P. Christov, M. M. Murnane, and H. C. Kapteyn. Shaped-pulse optimization of coherent emission of high-harmonic soft x-rays [Lien]. *Nature*, 406(6792) :164–166, 2000.
- [39] R. Bartels, S. Backus, I. Christov, H. Kapteyn, and M. Murnane. Attosecond time-scale feedback control of coherent x-ray generation [Lien]. *Chemical Physics*, 267(1-3) :277–289, 2001.
- [40] R. A. Bartels, M. M. Murnane, H. C. Kapteyn, I. Christov, and H. Rabitz. Learning from learning algorithms : Application to attosecond dynamics of high-harmonic generation [Lien]. *Physical Review A*, 70(4) :043404, 2004.
- [41] R. J. Levis, G. M. Menkir, and H. Rabitz. Selective bond dissociation and rearrangement with optimally tailored, strong-field laser pulses [Lien]. *Science*, 292(5517) :709–713, 2001.
- [42] R. J. Levis and H. A. Rabitz. Closing the loop on bond selective chemistry using tailored strong field laser pulses [Lien]. *Journal of Physical Chemistry A*, 106(27) :6427–6444, 2002.
- [43] A. Bartelt, A. Lindinger, C. Lupulescu, S. Vajda, and L. Woste. Optimal control of multi-photon dissociation and ionization processes in small namkn clusters [Lien]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(8) :1679–1686, 2004.
- [44] K. B. Moller, H. C. Westtoft, and N. E. Henriksen. Selective bond breakage in hod with shaped uv-femtosecond laser pulses [Lien]. *Chemical Physics Letters*, 419(1-3) :65–69, 2006.
- [45] T. Brixner, N. H. Damrauer, P. Niklaus, and G. Gerber. Photosensitive adaptive femtosecond quantum control in the liquid phase [Lien]. *Nature*, 414(6859) :57–60, 2001.
- [46] I. A. Shkrob, M. C. Sauer, A. D. Liu, R. A. Crowell, and A. D. Trifunac. Reactions of photoexcited aromatic radical cations with polar solvents [Lien]. *Journal of Physical Chemistry A*, 102(26) :4976–4989, 1998.
- [47] A. Bernas, D. Grand, and E. Amouyal. Photo-ionization of solutes and conduction-band edge of solvents - indole in water and alcohols [Lien]. *Journal of Physical Chemistry*, 84(10) :1259–1262, 1980.
- [48] V. Boutou, L. Guyon, C. Bonnet, M. Roth, H. Rabitz, F. Courvoisier, and J. P. Wolf. Femtosecond pump repump depletion to sort biological particles from background urban particles [Lien]. *SPIE Proceedings - Security and Defense*, To be published.

- [49] P. S. Sherin, O. A. Snytnikova, and Y. P. Tsentalovich. Tryptophan photoionization from prefluorescent and fluorescent states [Lien]. *Chemical Physics Letters*, 391(1-3) :44–49, 2004.
- [50] P. S. Sherin, O. A. Snytnikova, Y. P. Tsentalovich, and R. Z. Sagdeev. Competition between ultrafast relaxation and photoionization in excited prefluorescent states of tryptophan and indole [Lien]. *Journal of Chemical Physics*, 125(14), 2006.
- [51] Y. P. Tsentalovich, O. A. Snytnikova, and R. Z. Sagdeev. Properties of excited states of aqueous tryptophan [Lien]. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 162(2-3) :371–379, 2004.
- [52] E. Amouyal, A. Bernas, D. Grand, and J. C. Mialocq. Electron-transfer from indole and tryptophan [Lien]. *Faraday Discussions*, pages 147–159, 1982.
- [53] L. Q. Dong, K. Niu, and S. L. Cong. Theoretical analysis of femtosecond fluorescence depletion spectra and vibrational relaxations of dye oxazine 750 and rhodamine 700 molecules in acetone solution [Lien]. *International Journal of Quantum Chemistry*, 107(5) : 1205–1214, 2007.
- [54] H. B. Steen. Wavelength dependence of the quantum yield of fluorescence and photoionization of indoles [Lien]. *Journal of Chemical Physics*, 61(10) :3997–4002, 1974.
- [55] H. B. Steen, M. K. Bowman, and L. Kevan. Temperature-dependence of a process competing with s₂-s₁ internal-conversion in indole and phenol in aqueous-solutions [Lien]. *Journal of Physical Chemistry*, 80(5) :482–486, 1976.
- [56] N. Horimoto, F. Mafune, and T. Kondow. Cluster ion formation from a liquid surface of solutions of naphthalene. photosensitization effect of naphthalene [Lien]. *Journal of Physical Chemistry*, 100(24) :10046–10049, 1996.
- [57] L. Kevan and H. B. Steen. Polarity effects on wavelength dependence of fluorescence quantum yield for indole [Lien]. *Chemical Physics Letters*, 34(1) :184–188, 1975.
- [58] R. Tanaka and T. Yokoyama. Apparent dipole moments of 1-butanol, 1-propanol, and chlorobenzene in cyclohexane or benzene, and excess molar volumes of (1-propanol or chlorobenzene plus cyclohexane or benzene) at t=298.15 k [Lien]. *Journal of Solution Chemistry*, 33(9) :1061–1072, 2004.
- [59] J. Casanovas and J. P. Guelfucci. Conduction level and thermalization range parameter of electrons in liquid alkanes [Lien]. *Ieee Transactions on Electrical Insulation*, 23(4) : 515–528, 1988.

- [60] R. Klein and I. Tatischeff. Temperature fluorescence quenching of indole and water-structure [\[Lien\]](#). *Chemical Physics Letters*, 51(2) :333–338, 1977.
- [61] R. Klein, I. Tatischeff, M. Bazin, and R. Santus. Photophysics of indole - comparative-study of quenching, solvent, and temperature effects by laser flash-photolysis and fluorescence [\[Lien\]](#). *Journal of Physical Chemistry*, 85(6) :670–677, 1981.
- [62] M. Roth, J. Roslund, and H. Rabitz. Assessing and managing laser system stability for quantum control experiments [\[Lien\]](#). *Review of Scientific Instruments*, 77(8) :083107, 2006.
- [63] M. Demiralp and H. Rabitz. Optimally controlled quantum molecular-dynamics - a perturbation formulation and the existence of multiple solutions [\[Lien\]](#). *Physical Review A*, 47(2) :809–816, 1993.
- [64] C. Favre, V. Boutou, S. C. Hill, W. Zimmer, M. Krenz, H. Lambrecht, J. Yu, R. K. Chang, L. Woeste, and J. P. Wolf. White-light nanosource with directional emission [\[Lien\]](#). *Physical Review Letters*, 89(3), 2002.
- [65] M. Dantus and V. V. Lozovoy. Experimental coherent laser control of physicochemical processes [\[Lien\]](#). *Chemical Reviews*, 104(4) :1813–1859, 2004.
- [66] L. Berge, S. Skupin, R. Nuter, J. Kasparian, and J. P. Wolf. Ultrashort filaments of light in weakly-ionized, optically-transparent media [\[Lien\]](#). to be published.
- [67] H. Schroeder and S. L. Chin. Visualization of the evolution of multiple filaments in methanol [\[Lien\]](#). *Optics Communications*, 234(1-6) :399–406, 2004.
- [68] J. M. Jung and H. Gress. Single-photon absorption of liquid methanol and ethanol in the vacuum ultraviolet [\[Lien\]](#). *Chemical Physics Letters*, 359(1-2) :153–157, 2002.
- [69] J. M. Jung. Single-photon ionisation of liquid methanol and ethanol [\[Lien\]](#). *Chemical Physics Letters*, 366(1-2) :67–72, 2002.
- [70] W. L. Kruer. *The physics of the plasma interactions*. 1966.
- [71] A. Couairon and A. Mysyrowicz. Femtosecond filamentation in transparent media [\[Lien\]](#). *Physics Reports*, 441(2-4) :47–189, 2007.
- [72] J. Meier, G. I. Stegeman, D. N. Christodoulides, Y. Silberberg, R. Morandotti, H. Yang, G. Salamo, M. Sorel, and J. S. Aitchison. Experimental observation of discrete modulational instability [\[Lien\]](#). *Physical Review Letters*, 92(16), 2004.
- [73] G. Mechain, A. Couairon, M. Franco, B. Prade, and A. Mysyrowicz. Organizing multiple femtosecond filaments in air [\[Lien\]](#). *Physical Review Letters*, 93(3), 2004.
- [74] A. Dubietis, G. Tamogauskas, G. Fibich, and B. Ilan. Multiple filamentation induced by input-beam ellipticity [\[Lien\]](#). *Optics Letters*, 29(10) :1126–1128, 2004.

- [75] Z. Q. Hao, J. Zhang, X. Lu, T. T. Xi, Y. T. Li, X. H. Yuan, Z. Y. Zheng, Z. H. Wang, W. J. Ling, and Z. Y. Wei. Spatial evolution of multiple filaments in air induced by femtosecond laser pulses [Lien]. *Optics Express*, 14(2) :773–778, 2006.
- [76] H. Schroeder, J. Liu, and S. L. Chin. From random to controlled small-scale filamentation in water [Lien]. *Optics Express*, 12(20) :4768–4774, 2004.
- [77] K. Cook, R. McGeorge, A. K. Kar, M. R. Taghizadeh, and R. A. Lamb. Coherent array of white-light continuum filaments produced by diffractive microlenses [Lien]. *Applied Physics Letters*, 86(2), 2005.
- [78] U. Brackmann. *Lambdachrome laser dyes*. Goettingen : Lambda Physik GmbH, 1986.
- [79] A. Fischer, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer. Fluorescence of coumarins and xanthenes after 2-photon absorption with a pulsed titanium-sapphire laser [Lien]. *Applied Optics*, 34(12) :1989–2003, 1995.
- [80] B. Kovac and I. Novak. Electronic structure of coumarins [Lien]. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 58(7) :1483–1488, 2002.
- [81] A. Vincotte. *Propagation non-linéaire d'impulsions laser ultra-courtes dans les milieux transparents*. PhD thesis, 2006.
- [82] J. Rheims, J. Koser, and T. Wriedt. Refractive-index measurements in the near-ir using an abbe refractometer [Lien]. *Measurement Science and Technology*, 8(6) :601–605, 1997.
- [83] Q. H. Gong, J. L. Li, T. Q. Zhang, and H. Yang. Ultrafast third-order optical nonlinearity of organic solvents investigated by subpicosecond transient optical kerr effect [Lien]. *Chinese Physics Letters*, 15(1) :30–31, 1998.
- [84] Q. Feng, J. V. Moloney, A. C. Newell, E. M. Wright, K. Cook, P. K. Kennedy, D. X. Hammer, B. A. Rockwell, and C. R. Thompson. Theory and simulation on the threshold of water breakdown induced by focused ultrashort laser pulses [Lien]. *Ieee Journal of Quantum Electronics*, 33(2) :127–137, 1997.
- [85] R. A. Ganeev, M. Baba, M. Morita, A. I. Ryasnyansky, M. Suzuki, M. Turu, and H. Kuroda. Fifth-order optical nonlinearity of pseudoisocyanine solution at 529 nm [Lien]. *Journal of Optics a-Pure and Applied Optics*, 6(2) :282–287, 2004.
- [86] S. Yamakawa, K. Hamashima, T. Kinoshita, and K. Sasaki. Temporal solitary subpicosecond pulse propagation in a dye-doped polymer slab waveguide with a negative nonlinear refractive index [Lien]. *Applied Physics Letters*, 72(13) :1562–1564, 1998.
- [87] G.S. He and S.H. Liu. *Physics of Nonlinear Optics*. World scientific edition, 1999.

- [88] W. Liu, S. L. Chin, O. Kosareva, I. S. Golubtsov, and V. P. Kandidov. Multiple refocusing of a femtosecond laser pulse in a dispersive liquid (methanol) [Lien]. *Optics Communications*, 225(1-3) :193–209, 2003.
- [89] L. Dettwiller. *Qu'est-ce que l'optique géométrique ?* Bordas edition, 1990.
- [90] L. Guyon, F. Courvoisier, V. Boutou, R. Nuter, A. Vincotte, S. Champeaux, L. Berge, P. Glorieux, and J. P. Wolf. Self-organized bundle of lasing filaments in dense media [Lien]. *Physical Review A*, 73(5) :051802, 2006.
- [91] A. Brodeur, F. A. Ilkov, and S. L. Chin. Beam filamentation and the white light continuum divergence [Lien]. *Optics Communications*, 129(3-4) :193–198, 1996.
- [92] L. Berge, C. Gouedard, J. Schjodt-Eriksen, and H. Ward. Filamentation patterns in kerr media vs. beam shape robustness, nonlinear saturation and polarization states [Lien]. *Physica D-Nonlinear Phenomena*, 176(3-4) :181–211, 2003.
- [93] E. Lantz, C. Cambournac, and H. Maillotte. Spatiotemporal dynamics of soliton arrays generated from spatial noise in a planar waveguide with relaxing kerr nonlinearity [Lien]. *Optics Express*, 10(18) :942–948, 2002.
- [94] C. Cambournac. *Instabilités spatiales en milieu de Kerr : réseaux de solitons spatiaux et brisure de symétrie des solitons multimodes dans un guide plan.* PhD thesis, 2003.
- [95] S. Skupin, L. Berge, U. Peschel, F. Lederer, G. Mejean, J. Yu, J. Kasparian, E. Salmon, J. P. Wolf, M. Rodriguez, L. Woste, R. Bourayou, and R. Sauerbrey. Filamentation of femtosecond light pulses in the air : Turbulent cells versus long-range clusters [Lien]. *Physical Review E*, 70(4) :046602, 2004.
- [96] J. S. Liu, H. Schroeder, S. L. Chin, R. X. Li, and Z. Z. Xu. Ultrafast control of multiple filamentation by ultrafast laser pulses [Lien]. *Applied Physics Letters*, 87(16), 2005.
- [97] W. Liu, F. Theberge, E. Arevalo, J. F. Gravel, A. Becker, and S. L. Chin. Experiment and simulations on the energy reservoir effect in femtosecond light filaments [Lien]. *Optics Letters*, 30(19) :2602–2604, 2005.
- [98] V. P. Kandidov, N. Akozbek, M. Scalora, O. G. Kosareva, A. V. Nyakk, Q. Luo, S. A. Hosseini, and S. L. Chin. Towards a control of multiple filamentation by spatial regularization of a high-power femtosecond laser pulse [Lien]. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 80(2) :267–275, 2005.
- [99] K. Cook, A. K. Kar, and R. A. Lamb. White-light supercontinuum interference of self-focused filaments in water [Lien]. *Applied Physics Letters*, 83(19) :3861–3863, 2003.

- [100] W. Watanabe and K. Itoh. Spatial coherence of supercontinuum emitted from multiple filaments [Lien]. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes And Review Papers*, 40(2A) :592–595, 2001.
- [101] M. Bellini and T. W. Hansch. Phase-locked white-light continuum pulses : toward a universal optical frequency-comb synthesizer [Lien]. *Optics Letters*, 25(14) :1049–1051, 2000.
- [102] T. R. Rizzo, Y. D. Park, and D. H. Levy. A molecular-beam of tryptophan [Lien]. *Journal of the American Chemical Society*, 107(1) :277–278, 1985.
- [103] T. S. Zwier. Laser spectroscopy of jet-cooled biomolecules and their water-containing clusters : Water bridges and molecular conformation [Lien]. *Journal of Physical Chemistry A*, 105(39) :8827–8839, 2001.
- [104] E. G. Robertson and J. P. Simons. Getting into shape : Conformational and supramolecular landscapes in small biomolecules and their hydrated clusters [Lien]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3(1) :1–18, 2001.
- [105] Ltd. John Wiley & Sons. Current literature in mass spectrometry [Lien]. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(3) :407–418, 2007.
- [106] W. F. Smyth, S. McClean, C. J. Hack, V. N. Ramachandran, B. Doherty, C. Joyce, F. O'Donnell, T. J. Smyth, E. O'Kane, and P. Brooks. The characterisation of synthetic and natural-product pharmaceuticals by electrospray ionisation-mass spectrometry (esi-ms) and liquid chromatography (lc)-esi-ms [Lien]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 25(6) :572–582, 2006.
- [107] J. U. Andersen, H. Cederquist, J. S. Forster, et al. Photodissociation of protonated amino acids and peptides in an ion storage ring. determination of arrhenius parameters in the high-temperature limit [Lien]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(10) :2676–2681, 2004.
- [108] M. C. Crowe and J. S. Brodbelt. Infrared multiphoton dissociation (irmpd) and collisionally activated dissociation of peptides in a quadrupole ion trap with selective irmpd of phosphopeptides [Lien]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(11) : 1581–1592, 2004.
- [109] D. Zinger, N. E. Geacintov, and R. G. Harvey. Conformations and selective photodissociation of heterogeneous benzo(a)pyrene diol epoxide enantiomer-dna adducts [Lien]. *Biophysical Chemistry*, 27(2) :131–138, 1987.

- [110] D. W. Batey and C. D. Eckhert. Analysis of flavins in ocular-tissues of the rabbit [\[Lien\]](#). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(7) :1981–1985, 1991.
- [111] R. Huang, H. J. Kim, and D. B. Min. Photosensitizing effect of riboflavin, lumiflavin, and lumichrome on the generation of volatiles in soy milk [\[Lien\]](#). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6) :2359–2364, 2006.
- [112] A. Heyerick, K. Huvaere, D. De Keukeleire, and M. D. E. Forbes. Fate of flavins in sensitized photodegradation of isohumulones and reduced derivatives : studies on formation of radicals via epr combined with detailed product analyses [\[Lien\]](#). *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(5) :412–419, 2005.
- [113] Y. L. Pan, R. G. Pinnick, S. C. Hill, S. Niles, S. Holler, J. R. Bottiger, J. P. Wolf, and R. K. Chang. Dynamics of photon-induced degradation and fluorescence in riboflavin microparticles [\[Lien\]](#). *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 72(4) :449–454, 2001.
- [114] W. Holzer, J. Shirdel, P. Zirak, A. Penzkofer, P. Hegemann, R. Deutzmann, and E. Hochmuth. Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution [\[Lien\]](#). *Chemical Physics*, 308(1-2) :69–78, 2005.
- [115] I. Ahmad, Q. Fasiliullah, and F. H. M. Vaid. A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution [\[Lien\]](#). *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 75(1-2) :13–20, 2004.
- [116] H. Kang, C. Jouvét, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, C. Charrière, G. Grégoire, C. Desfrancois, J. P. Schermann, M. Barat, and J. A. Fayeton. Photoinduced processes in protonated tryptamine [\[Lien\]](#). *Journal of Chemical Physics*, 122(8) :084307, 2005.
- [117] H. Kang, C. Jouvét, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrancois, J. P. Schermann, M. Barat, and J. A. Fayeton. Ultrafast deactivation mechanisms of protonated aromatic amino acids following uv excitation [\[Lien\]](#). *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7(2) :394–398, 2005.
- [118] F. O. Talbot, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, and P. Dugourd. Photodissociation spectroscopy of trapped protonated tryptophan [\[Lien\]](#). *Journal of Chemical Physics*, 122(7), 2005.
- [119] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules [\[Lien\]](#). *Science*, 246(4926) :64–71, 1989.
- [120] T. Tabarin. Dynamique et conformation de biomolécules piégées en phase gazeuse. Technical report, Université Lyon 1, 2004.

- [121] H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J. P. Schermann, M. Barat, and J. A. Fayeton. Photo-induced dissociation of protonated tryptophan $\text{trph}(+)$: A direct dissociation channel in the excited states controls the hydrogen atom loss [Lien]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(10) :2628–2632, 2004.
- [122] D. Nolting, C. Marian, and R. Weinkauff. Protonation effect on the electronic spectrum of tryptophan in the gas phase [Lien]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(10) :2633–2640, 2004.
- [123] R. Weinkauff, P. Aicher, G. Wesley, J. Grotemeyer, and E. W. Schlag. Femtosecond versus nanosecond multiphoton ionization and dissociation of large molecules [Lien]. *Journal of Physical Chemistry*, 98(34) :8381–8391, 1994.
- [124] H. El Aribi, G. Orlova, A. C. Hopkinson, and K. W. M. Siu. Gas-phase fragmentation reactions of protonated aromatic amino acids : concomitant and consecutive neutral eliminations and radical cation formations [Lien]. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(17) : 3844–3853, 2004.
- [125] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux, and C. Jouvet. Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive $(1)\pi$ σ^* states : A new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules [Lien]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4(7) :1093–1100, 2002.
- [126] D. Nolting, T. Schultz, I. V. Hertel, and R. Weinkauff. Excited state dynamics and fragmentation channels of the protonated dipeptide h2n-leu-trp-cooh [Lien]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(44) :5247–5254, 2006.
- [127] OMLC. <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/>.
- [128] Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/F8399>.
- [129] W. Gabryelski and L. Li. Photo-induced dissociation of electrospray generated ions in an ion trap/time-of-flight mass spectrometer [Lien]. *Review of Scientific Instruments*, 70(11) : 4192–4199, 1999.
- [130] J. Abian, S. Susin, J. Abadia, and E. Gelpi. Thermospray and electrospray mass-spectrometry of flavoenzymes - analysis of riboflavin sulfates from sugar-beet [Lien]. *Analytica Chimica Acta*, 302(2-3) :215–223, 1995.
- [131] S. D. M. Islam, A. Penzkofer, and P. Hegemann. Quantum yield of triplet formation of riboflavin in aqueous solution and of flavin mononucleotide bound to the *lov1* domain of *phot1* from *chlamydomonas reinhardtii* [Lien]. *Chemical Physics*, 291(1) :97–114, 2003.

- [132] V. I. Birss, S. GuhaThakurta, C. E. McGarvey, S. Quach, and P. Vanysek. An electrochemical study of the photolysis of adsorbed flavins [Lien]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 423(1-2) :13–21, 1997.
- [133] I. Ahmad, Q. Fasihullah, and F. H. M. Vaid. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution [Lien]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 82(1) :21–27, 2006.
- [134] P. F. Heelis. The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines) [Lien]. *Chemical Society Reviews*, 11(1) :15–39, 1982.
- [135] WL Cairns and DE Metzler. Photochemical degradation of flavins. vi. a new photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism [Lien]. *Journal of the American Chemical Society*, 93(11), 1971.
- [136] M. Sakai and H. Takahashi. One-electron photoreduction of flavin mononucleotide : Time-resolved resonance raman and absorption study [Lien]. *Journal of Molecular Structure*, 379 :9–18, 1996.
- [137] T. Climent, R. Gonzalez-Luque, M. Merchan, and L. Serrano-Andres. Theoretical insight into the spectroscopy and photochemistry of isoalloxazine, the flavin core ring [Lien]. *Journal of Physical Chemistry A*, 110(50) :13584–13590, 2006.
- [138] C. Cremer and L. J. Radziemski. *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. 2006.
- [139] A. W. Miziolek, V. Palleschi, and I. Schechter. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) Fundamentals and Applications*. 2006.
- [140] L. J. Radziemski. From laser to libs, the path of technology development [Lien]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 57(7) :1109–1113, 2002.
- [141] D. A. Rusak, B. C. Castle, B. W. Smith, and J. D. Winefordner. Recent trends and the future of laser-induced plasma spectroscopy [Lien]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 17(8-9) :453–461, 1998.
- [142] J. M. Vadillo and J. J. Laserna. Laser-induced plasma spectrometry : truly a surface analytical tool [Lien]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 59(2) :147–161, 2004.
- [143] B. N. Chichkov, C. Momma, S. Nolte, F. vonAlvensleben, and A. Tunnermann. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids [Lien]. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 63(2) :109–115, 1996.

- [144] S. S. Mao, X. Mao, R. Greif, and R. E. Russo. Initiation of an early-stage plasma during picosecond laser ablation of solids [Lien]. *Applied Physics Letters*, 77(16) :2464–2466, 2000.
- [145] Q. M. Lu, S. S. Mao, X. L. Mao, and R. E. Russo. Delayed phase explosion during high-power nanosecond laser ablation of silicon [Lien]. *Applied Physics Letters*, 80(17) : 3072–3074, 2002.
- [146] H. Lubatschowski, G. Maatz, A. Heisterkamp, U. Hetzel, W. Drommer, H. Welling, and W. Ertmer. Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery [Lien]. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 238(1) :33–39, 2000.
- [147] B. Le Drogoff, J. Margot, M. Chaker, M. Sabsabi, O. Barthelemy, T. W. Johnston, S. Laville, F. Vidal, and Y. von Kaenel. Temporal characterization of femtosecond laser pulses induced plasma for spectrochemical analysis of aluminum alloys [Lien]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 56(6) :987–1002, 2001.
- [148] B. Le Drogoff, J. Margot, F. Vidal, S. Laville, M. Chaker, M. Sabsabi, T. W. Johnston, and O. Barthelemy. Influence of the laser pulse duration on laser-produced plasma properties [Lien]. *Plasma Sources Science and Technology*, 13(2) :223–230, 2004.
- [149] J. B. Sirven, B. Bousquet, L. Canioni, and L. Sarger. Time-resolved and time-integrated single-shot laser-induced plasma experiments using nanosecond and femtosecond laser pulses [Lien]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 59(7) :1033–1039, 2004.
- [150] W. B. Lee, J. Y. Wu, Y. I. Lee, and J. Sneddon. Recent applications of laser-induced breakdown spectrometry : A review of material approaches [Lien]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 39(1) :27–97, 2004.
- [151] Y. Deguchi, M. Noda, Y. Fukuda, Y. Ichinose, Y. Endo, M. Inada, Y. Abe, and S. Iwasaki. Industrial applications of temperature and species concentration monitoring using laser diagnostics [Lien]. *Measurement Science and Technology*, 13(10) :R103–R115, 2002.
- [152] A. S. Fisher, P. S. Goodall, M. W. Hinds, and D. M. Penny. Atomic spectrometry update. industrial analysis : metals, chemicals and advanced materials [Lien]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20(12) :1398–1424, 2005.
- [153] A. Giakoumaki, K. Melessanaki, and D. Anglos. Laser-induced breakdown spectroscopy (libs) in archaeological science-applications and prospects [Lien]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(3) :749–760, 2007.
- [154] Z. A. Arp, D. A. Cremers, R. C. Wiens, D. M. Wayne, B. A. Salle, and S. Maurice. Analysis of water ice and water ice/soil mixtures using laser-induced breakdown spectroscopy : Application to mars polar exploration [Lien]. *Applied Spectroscopy*, 58(8) :897–909, 2004.

- [155] K. Stelmaszczyk, P. Rohwetter, G. Mejean, J. Yu, E. Salmon, J. Kasparian, R. Ackermann, J. P. Wolf, and L. Woste. Long-distance remote laser-induced breakdown spectroscopy using filamentation in air [Lien]. *Applied Physics Letters*, 85(18) :3977–3979, 2004.
- [156] H. L. Xu, W. Liu, and S. L. Chin. Remote time-resolved filament-induced breakdown spectroscopy of biological materials [Lien]. *Optics Letters*, 31(10) :1540–1542, 2006.
- [157] NIST. http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html.
- [158] Applied-Photonics. http://www.appliedphotonics.co.uk/Libs/capabilities_libs.htm.
- [159] A. C. Samuels, F. C. DeLucia, K. L. McNesby, and A. W. Miziolek. Laser-induced breakdown spectroscopy of bacterial spores, molds, pollens, and protein : initial studies of discrimination potential [Lien]. *Applied Optics*, 42(30) :6205–6209, 2003.
- [160] A. R. Boyain-Goitia, D. C. S. Beddows, B. C. Griffiths, and H. H. Telle. Single-pollen analysis by laser-induced breakdown spectroscopy and raman microscopy [Lien]. *Applied Optics*, 42(30) :6119–6132, 2003.
- [161] S. Morel, N. Leone, P. Adam, and J. Amouroux. Detection of bacteria by time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy [Lien]. *Applied Optics*, 42(30) :6184–6191, 2003.
- [162] L. St-Onge, R. Sing, S. Bechard, and M. Sabsabi. Carbon emissions following 1.064 μm laser ablation of graphite and organic samples in ambient air [Lien]. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 69 :S913–S916, 1999.
- [163] P. Singleton. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine, 4^{ème} édition*. John Wiley & Sons, 1997.
- [164] M. Baudelet, J. Yu, M. Bossu, J. Jovelet, J. P. Wolf, T. Amodeo, E. Frejafon, and P. Laloï. Discrimination of microbiological samples using femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy [Lien]. *Applied Physics Letters*, 89(16) :163903, 2006.
- [165] B. D. Koplitz and J. K. McVey. Fragment power dependence in the laser-induced ionization of benzene-d₆ [Lien]. *Journal of Physical Chemistry*, 89(20) :4196–4200, 1985.
- [166] R. Srinivasan and B. Braren. Ultraviolet-laser ablation of organic polymers [Lien]. *Chemical Reviews*, 89(6) :1303–1316, 1989.
- [167] T. Lippert, A. Wokaun, S. C. Langford, and J. T. Dickinson. Emission of neutral molecules during uv laser ablation of a photolabile triazeno polymer [Lien]. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 69 :S655–S658, 1999.
- [168] C. Vivien, J. Hermann, A. Perrone, C. Boulmer-Leborgne, and A. Luches. A study of molecule formation during laser ablation of graphite in low-pressure nitrogen [Lien]. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 31(10) :1263–1272, 1998.

- [169] R. Heller, R. Esnault, and C. Lance. *Physiologie Vegetale - Tome 1, Nutrition - 6ème édition*. Dunod edition, 1998.
- [170] A. Daujat, J. Hebert, and J.C. Ignazim. Engrais - article de l'Encyclopédie Universalis.
- [171] Société-Cetiom. [Diagnostic foliaire http://www.cetiom.fr/index.php?id=3721](http://www.cetiom.fr/index.php?id=3721), 2006.
- [172] A. D. Richardson and J. B. Reeves. Quantitative reflectance spectroscopy as an alternative to traditional wet lab analysis of foliar chemistry : near-infrared and mid-infrared calibrations compared [Lien]. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere*, 35(5) :1122–1130, 2005.
- [173] C. A. Wessman, J. D. Aber, D. L. Peterson, and J. M. Melillo. Foliar analysis using near-infrared reflectance spectroscopy [Lien]. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere*, 18(1) :6–11, 1988.
- [174] S. Luysaert, H. Raitio, P. Vervaeke, J. Mertens, and N. Lust. Sampling procedure for the foliar analysis of deciduous trees [Lien]. *Journal of Environmental Monitoring*, 4(6) :858–864, 2002.
- [175] J. L. Innes. Influence of air-pollution on the foliar nutrition of conifers in great-britain [Lien]. *Environmental Pollution*, 88(2) :183–192, 1995.
- [176] A. Grauby, H. Augier, R. Lion, and O. Charlent. Neutron-activation analysis of elemental composition in a marine phanerogam, *posidonia-oceanica* (l) delile - a biological indicator of pollution [Lien]. *Environmental and Experimental Botany*, 31(3) :255–265, 1991.
- [177] M. P. Elless, M. J. Blaylock, J. W. Huang, and C. D. Gussman. Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements [Lien]. *Food Chemistry*, 71(2) :181–188, 2000.
- [178] A. S. Eppler, D. A. Cremers, D. D. Hickmott, M. J. Ferris, and A. C. Koskelo. Matrix effects in the detection of pb and ba in soils using laser-induced breakdown spectroscopy [Lien]. *Applied Spectroscopy*, 50(9) :1175–1181, 1996.
- [179] A. Assion, M. Wollenhaupt, L. Haag, F. Mayorov, C. Sarpe-Tudoran, M. Winter, U. Kutschera, and T. Baumert. Femtosecond laser-induced-breakdown spectrometry for ca^{2+} analysis of biological samples with high spatial resolution [Lien]. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 77(4) :391–397, 2003.
- [180] O. Samek, J. Lambert, R. Hergenroder, M. Liska, J. Kaiser, K. Novotny, and S. Kukhlevsky. Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples [Lien]. *Laser Physics Letters*, 3(1) :21–25, 2006.

- [181] J.L. Guignard. *Biochimie végétale*. Dunod edition, 2000.
- [182] I. B. Gornushkin, B. W. Smith, H. Nasajpour, and J. D. Winefordner. Identification of solid materials by correlation analysis using a microscopic laser-induced plasma spectrometer [Lien]. *Analytical Chemistry*, 71(22) :5157–5164, 1999.
- [183] A. J. Lopez, G. Nicolas, M. P. Mateo, A. Ramil, V. Pinon, and A. Yanez. Lips and linear correlation analysis applied to the classification of roman pottery terra sigillata [Lien]. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 83(4) :695–698, 2006.
- [184] C. A. Munson, F. C. De Lucia, T. Piehler, K. L. McNesby, and A. W. Miziolek. Investigation of statistics strategies for improving the discriminating power of laser-induced breakdown spectroscopy for chemical and biological warfare agent simulants [Lien]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 60(7-8) :1217–1224, 2005.
- [185] J. Anzano, M. E. Casanova, M. S. Bermudez, and R. J. Lasheras. Rapid characterization of plastics using laser-induced plasma spectroscopy (lips) [Lien]. *Polymer Testing*, 25(5) : 623–627, 2006.
- [186] L. St-Onge, E. Kwong, M. Sabsabi, and E. B. Vadas. Quantitative analysis of pharmaceutical products by laser-induced breakdown spectroscopy [Lien]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 57(7) :1131–1140, 2002.
- [187] M. D. Coleman, S. X. Chang, and D. J. Robison. Dris analysis identifies a common potassium imbalance in sweetgum plantations [Lien]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(13-14) :1919–1941, 2003.
- [188] M. Pestana, A. de Varennes, M. J. Goss, J. Abadia, and E. A. Faria. Floral analysis as a tool to diagnose iron chlorosis in orange trees [Lien]. *Plant and Soil*, 259(1-2) :287–295, 2004.
- [189] H. Bardouki, H. Liakakou, C. Economou, J. Sciare, J. Smolik, V. Zdimal, K. Eleftheriadis, M. Lazaridis, C. Dye, and N. Mihalopoulos. Chemical composition of size-resolved atmospheric aerosols in the eastern mediterranean during summer and winter [Lien]. *Atmospheric Environment*, 37(2) :195–208, 2003.
- [190] V. I. Babushok, F. C. DeLucia, P. J. Dagdigian, and A. W. Miziolek. Experimental and kinetic modeling study of the laser-induced breakdown spectroscopy plume from metallic lead in argon [Lien]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 60(7-8) :926–934, 2005.
- [191] M. Joffre. [Cours : Propagation linéaire et non-linéaire d’une impulsion ultrabrève](#).
- [192] CVI-Compagny. [Dispersion equation - technical notes](#).

- [193] Amino-Science. [L-tryptohan](#).
- [194] A. Harriman. Further comments on the redox potentials of tryptophan and tyrosine [\[Lien\]](#). *Journal of Physical Chemistry*, 91(24) :6102–6104, 1987.
- [195] A. Furstenberg and E. Vauthey. Excited-state dynamics of the fluorescent probe lucifer yellow in liquid solutions and in heterogeneous media [\[Lien\]](#). *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(3) :260–267, 2005.
- [196] W.E. May, S.P. Wasik, and D.H. Freeman. Determination of the solubility behavior of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water [\[Lien\]](#). *Analytical Chemistry*, 50(7) :997–1000, 1978.
- [197] E. Vauthey, C. Hoegemann, and X. Allonas. Direct investigation of the dynamics of charge recombination following the fluorescence quenching of 9,10-dicyanoanthracene by various electron donors in acetonitrile [\[Lien\]](#). *Journal of Physical Chemistry A*, 102(38) :7362–7369, 1998.

Liste de publications

Les résultats des travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont fait l'objet de diverses publications et présentations à des conférences internationales dont la liste est donnée ci-dessous :

1. L. Guyon, F. Courvoisier, V. Boutou, R. Nutter, S. Chameaux, A. Vincotte, L. Bergé, P. Glorieux, JP. Wolf, "Self-organized bundle of lasing filaments in dense media", p051802(R) **Physical Review A**, **73** (2006).
2. M. Baudelet, L. Guyon, J. Yu, J.-P. Wolf, T. Amodeo, E. Fréjafon, P. Laloi, "Femtosecond Laser Induced Breakdown Spectroscopy of Escherichia Coli : Atomic and Molecular Spectroscopic Markers of the Bacterium", p063901 **Appl. Phys. Lett.**, **88** (2006).
3. M. Baudelet, L. Guyon, J. Yu, J.-P. Wolf, T. Amodeo, E. Fréjafon, P. Laloi, "Femtosecond Time Resolved Laser-induced Breakdown Spectroscopy for Detection and Identification of Bacteria : a Comparison to the Nanosecond Regime", p084701 **J. App. Physics**, **99**(7) (2006).
4. F. Courvoisier, V. Boutou, L. Guyon, M. Roth, H. Rabitz, J-P. Wolf, "Discriminating bacteria from other atmospheric particles using femtosecond molecular dynamics", p300, **J. Photochemistry and Photobiology A**, **180** (2006).
5. F. Courvoisier, L. Bonacina, V. Boutou, L. Guyon, C. Bonnet, B. Thuillier, J. Extermann, M. Roth, H. Rabitz, JP. Wolf, "Identification of biological microparticles using ultrafast depletion spectroscopy", *accepté pour publication dans **Faraday Discussion**, volume 137.*
6. L. Guyon, T. Tabarin, B. Thuillier, R. Antoine, M. Broyer, V. Boutou, JP. Wolf, Ph. Dugourd, "Femtosecond pump-probe experiments on trapped flavin : optical control of dissociation", *soumis à **Physical Chemistry Chemical Physics**.*

7. L. Guyon, K.M. Hajek, F. Courvoisier, V. Boutou, R. Nutter, S. Chameaux, A. Vincotte, L. Bergé, P. Glorieux, JP. Wolf, “Control of lasing filament arrays in nonlinear liquid media”, *bientôt soumis à **Phys. Rev. A***.
8. L. Guyon, M. Baudalet, J. Yu, J.-P. Wolf, T. Amodeo, E. Fréjafon, “Foliar analysis using femtosecond Laser Induced Breakdown Spectroscopy”. *En cours de rédaction*.
9. M. Roth, L. Guyon, V. Boutou, F. Courvoisier, J. Roslund, J.-P. Wolf, and H. Rabitz. *En cours de rédaction sur le contrôle cohérent dans les flavines*.

Autres publications :

1. L. Guyon, F. Courvoisier, V. Wood, V. Boutou, A. Bartelt, M. Roth, H. Rabitz, and J.P. Wolf, “Spectroscopy pump-probe for the detection of bioaerosols” *J. Phys. IV France* 135, 185 (2006). Suite à la présentation d’un poster à la conférence Colloq 9.

Exposés oraux internationaux :

1. **XVth international conference on “Ultrafast Phenomena”** - Août 06, Pacific Grove, Californie “Interfering Lasing Filaments in Dense Absorbing Media”
2. **China-France Workshop on ultra-short and ultra-intense lasers** - Avril 06, Zhenjiang, Chine “Multiphoton Spectroscopy for Bioaerosol Detection and Identification”
3. **Séminaire à Princeton**, Juillet 06, Etats-Unis. “Amplified Femtosecond Pulses : From LIBS to Lasing Filaments”