

THÈSE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

PAR Guillaume Devès

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

ANALYSE CHIMIQUE QUANTITATIVE A HAUTE RESOLUTION SPATIALE PAR MICROSONDE ET NANOSONDE NUCLEAIRES

Directeur de recherche : Dr Richard Ortega

Soutenue le : 8 novembre 2010 devant la commission d'examen formée de :

PRESIDENT : M. MORETTO PHILIPPE, Professeur, Université de Bordeaux 1

RAPPORTEURS : M. GARCIA LOPEZ FRANCISCO JAVIER, Professeur, Université de Séville

M. JALLOT EDOUARD, Professeur, Université de Clermont-Ferrand

EXAMINATEURS : M. BARBERET PHILIPPE, Maître de conférences, Université de Bordeaux 1

M. GUERQUIN-KERN JEAN-LUC, Chargé de recherche INSERM, Institut Curie

M. ORTEGA RICHARD, Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux 1

Résumé : Etudier le rôle des éléments traces à l'échelle cellulaire requiert des outils analytiques de pointe. Nous avons développé une nouvelle *méthodologie* précise de la répartition des éléments chimiques cellulaires à partir d'une combinaison des méthodes d'analyse par faisceaux d'ions PIXE, RBS et STIM. Cette méthodologie s'appuie fortement sur le développement d'un logiciel (Paparamborde) pour le traitement quantitatif des expériences STIM. La validité de cette méthode ainsi que ses limites sont discutées. La méthode STIM-PIXE-RBS permet de quantifier la composition en éléments traces ($\mu\text{g/g}$) avec une incertitude de mesure évaluée à 19,8% dans des compartiments cellulaires de masse inférieure à 0,1 ng.

Une des limites de la méthode réside dans le faible nombre d'échantillons analysables en raison à la fois du temps minimum nécessaire pour réaliser une acquisition et de l'accès limité aux plateformes d'analyse par faisceaux d'ions. C'est pourquoi nous avons également développé une base de données pour la capitalisation des compositions chimiques cellulaires (BDC4). Cette base de données s'inscrit dans la logique de l'utilisation de la composition chimique cellulaire comme un traceur de l'activité biologique, et doit permettre à terme de définir des compositions chimiques de référence pour les différents types cellulaires analysés.

L'application de la méthodologie STIM-PIXE-RBS à l'étude de la toxicologie nucléaire du cobalt permet d'illustrer son intérêt en pratique. En particulier, l'analyse STIM s'avère indispensable dans le cas d'échantillons présentant une perte de masse organique au cours de l'analyse PIXE-RBS.

Mots-clefs: PIXE, STIM, quantification, analyse cellulaire, microsonde nucléaire, nanosonde nucléaire.

Title: Quantitative analysis of chemical elements in single cells using nuclear microprobe and nanoprobe

Abstract: The study of the role of trace elements at cellular level requires the use of state-of-the-art analytical tools that could achieve enough sensitivity and spatial resolution. We developed a new methodology for the accurate quantification of chemical element distribution in single cells based on a combination of ion beam analysis techniques STIM, PIXE and RBS. The quantification procedure relies on the development of a STIM data analysis software (Paparamborde). Validity of this methodology and limits are discussed here. The method allows the quantification of trace elements ($\mu\text{g/g}$) with a 19.8 % uncertainty in cellular compartments with mass below 0.1 ng.

The main limit of the method lies in the poor number of samples that can be analyzed, due to long irradiation times required and limited access to ion beam analysis facilities. This is the reason why we developed a database for cellular chemical composition capitalization (BDC4). BDC4 has been designed in order to use cellular chemical composition as a tracer for biological activities and is expected to provide in the future reference chemical compositions for any cellular type or compartment.

Application of the STIM-PIXE-RBS methodology to the study of nuclear toxicology of cobalt compounds is presented here showing that STIM analysis is absolutely needed when organic mass loss appears during PIXE-RBS irradiation.

Keywords: PIXE, STIM, quantification, cellular analysis, nuclear microprobe, nuclear nanoprobe

Cette thèse a été préparée au sein du laboratoire CNAB :

Laboratoire de Chimie Nucléaire Analytique et Bio-environnementale
Unité mixte de recherche 5084
Centre National de la Recherche Scientifique
Université de Bordeaux 1
Chemin du solarium
B.P. 120
33175 Gradignan cedex
Tel : +33 (0) 557 120 901
Fax : +33 (0) 557 120 900

REMERCIEMENTS

Le travail de thèse présenté ici a été effectué dans le cadre de mon activité d'ingénieur d'études au CNRS et, à ce titre, financé par les tutelles du laboratoire, CNRS et Université de Bordeaux 1, ainsi que par le bureau de la formation permanente du CNRS ayant pris en charges les frais d'inscription à l'Université.

Je ne me souviens plus comment m'est venue l'idée de m'engager dans ce projet de thèse, je ne saurais pas dire, même, si l'idée vient de moi, mais je me souviens que Richard Ortega a toujours été, et de manière désintéressée, mon plus fort soutien dans ce projet, et je tiens à lui exprimer ici ma gratitude pour m'avoir fait découvrir, avant même que ne commence cette thèse, ce qu'est la recherche et pour avoir su me faire partager son goût pour la Science.

Je voudrais remercier Alain Boudou, président de l'université de Bordeaux 1, Laurent Servant, directeur de l'école doctorale des sciences chimiques et Bernard Lavielle, directeur du laboratoire CNAB, pour avoir accepté que je consacre une partie de mon activité d'ingénieur d'études à ce projet de recherche.

Je voudrais une nouvelle fois remercier Richard Ortega, en sa qualité de directeur de thèse et responsable de groupe, pour savoir si bien choisir nos sujets de recherche, ceux pour lesquels les outils méthodologiques que nous utilisons et développons prennent tout leur sens. Je voudrais le remercier pour ses encouragements et sa confiance renouvelée, ainsi que pour les discussions concernant ce travail.

Je voudrais remercier les membres du groupe Imagerie Chimique Cellulaire et Spéciation, Asuncion Carmona, Stéphane Roudeau, Thomas Bacquart, Aurélien Fraysse et Sylvianne Chevreux pour leur aide pendant les expériences et pour contribuer à faire de ce groupe un espace de convivialité et d'échanges.

Certaines parties de ce document ont été aimablement corrigées par Philippe Barberet, Maître de conférences à l'université de Bordeaux 1, Laurent Serani, Ingénieur de recherches CNRS et responsable technique de la plateforme AIFIRA, Laurent Daudin, Ingénieur d'études CNRS.

Je voudrais remercier l'ensemble des personnels des laboratoires, CENBG et CNAB, en particulier les chercheurs du groupe Interface Physique Biologie, et les services Instrumentation, Mécanique, Informatique et le bureau d'études qui ont participé au développement de la plateforme AIFIRA.

Merci à Carmen Marcou, directrice de l'institut Goethe de Bordeaux, pour m'avoir « prêté » les salons XIX^e de la BIFA le temps de la rédaction de cette thèse.

Je ne veux pas remercier les inventeurs du mal de dos, du chiffre 2, du dénivelé positif, mais je dois rendre hommage à ceux de la Vierge d'Harriena, du Jerrican d'eau et de la clim' sur les pieds, ainsi qu'à l'heureux propriétaire de la souris la plus intelligente de l'ouest.

Merci à Veronika et à tous les amis : Jéré, Bibi, Bab, Fred, Béa et Medhi, Mathias & Aude, Nath., les David, P2P, mon Bubu, les Tropéziens, Pierrot, Ludo, Die Deutschen, et à P.I.T. II et Hector B. Shayne, à mes 5 ans et 171 jours, à Plastikää, Der Mimi und Die Mimie, à Yves, au DOB factor, à Richard Maire et tous les spéléos de l'ARSIP, Grégory Dandurand, V.V. encore et V.H, le gluon de la poule, Grégoire, Adrien et son rire de Géant, Iolanda et Costin, le grand Alex, mes frangins et tata Vava, Mamar, AA, Marion, Salomé et la petite Armelle, sans oublier un grand salut à la Belle Cour.

Merci enfin à Robert Paparemborde, « le meilleur pilier du monde », à la bande à Rives et au 14 juillet 1979.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	9
1 INTRODUCTION	15
1.1 Analyse des échantillons biologiques par spectrométrie d'émission X induite par particules chargées (PIXE)	16
1.2 Méthodes permettant la détection d'éléments chimiques en biologie	17
1.3 Méthodes de normalisation de l'intensité du signal d'émission X	20
1.4 Particularités de l'analyse cellulaire	24
2 METHODES D'ANALYSE PAR FAISCEAU D'IONS	29
2.1 Spectrométrie d'émission X induite par particules chargées (PIXE)	30
2.1.1 Interactions ion-matière	30
2.1.2 Modèles de description des sections efficaces d'ionisation	32
2.1.3 Modes de désexcitation	34
2.1.4 Sections efficaces totales de production X et quantification	36
2.2 Spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford (RBS)	37
2.2.1 Analyse qualitative de la composition chimique	38
2.2.2 Analyse quantitative de la composition chimique	40
2.2.3 Perte d'énergie linéaire et pouvoir d'arrêt	42
2.2.4 Formes des spectres de rétrodiffusion Rutherford	43
2.2.5 Ecarts par rapport à la formulation de Rutherford	44
2.2.6 Avantages et limites de la spectrométrie de diffusion Rutherford	45
2.3 Microscopie ionique en transmission et à balayage (STIM)	46
2.3.1 Pertes d'énergie des ions dans la matière	46
2.3.2 Principe de l'imagerie STIM	52
2.3.3 Formation des images	55

2.3.4	Analyse quantitative. Règle d'additivité des pouvoirs d'arrêt	57
3	DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	59
3.1	Principe de la génération de haute tension de type Cockcroft-Walton....	60
3.2	Fonctionnement de l'accélérateur AIFIRA.....	62
3.3	Ondulation résiduelle et régulation en énergie du terminal	65
3.4	Brillance de l'accélérateur et principe de focalisation	67
3.5	Description des lignes microsonde et nanosonde	68
3.6	Description des chambres d'analyse.....	71
4	RESULTATS – ASPECTS METHODOLOGIQUES	75
4.1	Logiciel d'analyse quantitative des données STIM.....	76
4.1.1	Paparamborde : programme d'analyse des données STIM	76
4.1.2	Principe du calcul de la masse surfacique	77
4.1.3	Calcul approché de la masse surfacique.....	78
4.1.4	Calcul exact de la masse surfacique par le logiciel Paparamborde....	80
4.1.5	Calcul d'incertitudes.....	83
4.1.6	Limite de détection	86
4.1.7	Résolution en masse	87
4.1.8	Validation du calcul	89
4.2	Analyse quantitative cellulaire par combinaison des méthodes STIM-PIXE-RBS.....	92
4.2.1	Principe.....	92
4.2.2	Incertitudes sur la détermination de la concentration des éléments chimiques.....	93
4.2.3	Incertitudes associées à l'étalonnage du détecteur PIXE	94
4.2.4	Estimation de l'incertitude totale de mesure pour un dispositif expérimental calibré	94
4.3	Développement d'une base de données de compositions chimiques.....	102

4.3.1	Démarche qualité.....	102
4.3.2	Actions prioritaires	104
4.3.3	Cartographie des processus	105
4.3.4	Description de la base de données BDC4.....	105
4.3.5	Tables principales	106
4.3.6	Tables secondaires	108
4.3.7	Utilisation de BDC4	108
4.3.8	Tests statistiques exacts	110
5	RESULTATS - ASPECTS EXPERIMENTAUX	115
5.1	Bilan du développement des lignes microsonde et nanosonde sur AIFIRA	116
5.2	Etalonnage des détecteurs PIXE utilisés sur les lignes microsonde et nanosonde.....	118
5.2.1	Conditions expérimentales et liste des échantillons de référence	118
5.2.2	Mesures de l'efficacité des détecteur PIXE.....	123
5.3	Application à l'étude des mécanismes de toxicité du cobalt.....	129
5.3.1	Préparation des échantillons et conditions d'analyse	129
5.3.2	Analyse de la concentration moyenne du cobalt intracellulaire.....	130
5.3.3	Observations de la distribution du cobalt intracellulaire.....	132
5.3.4	Analyse multi-élémentaire.....	137
6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	139
6.1	Points forts et limites de la méthodologie STIM-PIXE-RBS	140
6.1.1	Contraintes liées à l'analyse	140
6.2	Perspectives.....	142
6.2.1	Analyse STIM de nanoparticules	142
6.2.2	Préparation des échantillons et utilité de l'analyse cryogénique.....	144

6.3	Autres perspectives	146
7	BIBLIOGRAPHIE	150
8	ANNEXES.....	171
8.1	Fonctionnement du logiciel Paparamborde.....	172
8.2	Mesures de la taille du faisceau en configuration triplet et quintuplet..	175
8.3	Démarche qualité	176
8.3.1	Résultat du brainstorming silencieux	176
8.3.2	Cartographie des processus de fonctionnement de la base de données	177

1 INTRODUCTION

1.1 ANALYSE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES PAR SPECTROMETRIE D'EMISSION X INDUITE PAR PARTICULES CHARGEES (PIXE)

La spectrométrie d'émission X induite par particules chargées accélérées (PIXE) est une méthode permettant d'analyser les éléments chimiques dont la concentration est au moins supérieure à 1 à 10 µg/g (Johansson, et al., 1976). Son principe est basé sur l'ionisation des atomes de l'échantillon par le faisceau de particules chargées incidentes et la mesure du rayonnement X émis par les atomes ionisés lors de leur retour à l'état fondamental. La proportionnalité entre la concentration d'un élément chimique et l'intensité de l'émission X correspondante permet une analyse quantitative de la composition chimique de l'échantillon.

La spectrométrie PIXE occupe depuis toujours une place centrale dans l'analyse de la composition chimique des échantillons biologiques en raison de la concordance entre les éléments chimiques constitutifs du Vivant et ceux observables par la méthode PIXE. La méthode permet en général d'analyser tous les éléments chimiques de numéro atomique supérieur ou égal à celui sodium. Le principe de l'ionisation des atomes de la cible n'est pas en soi restrictif du point de vue du numéro atomique de l'élément chimique ionisé, même si la probabilité d'émission X présente une forte dépendance en Z, mais la méthode PIXE possède néanmoins cette limite basse concernant le numéro atomique des éléments analysables à cause de l'atténuation du rayonnement X de faible énergie par le système de détection, c'est à dire principalement à cause de la fenêtre d'entrée du détecteur, du contact ohmique, de la zone morte de surface et de tous les filtres éventuellement utilisés. La conjonction de ces deux facteurs, forte sensibilité et gamme de Z observables, donne à la méthode PIXE la possibilité d'analyser la concentration d'une part importante des éléments chimiques constitutifs de la matière biologique. Si on se réfère à la concentration moyenne des éléments chimiques dans le corps humain par exemple (Figure 1), on vérifie cette adéquation de la méthode à l'analyse d'échantillons biologiques.

La mesure de la composition chimique des échantillons biologiques avec une grande sensibilité a été rapidement mise à profit dans le cadre d'études du fonctionnement normal ou pathologique des organismes vivants. L'idée d'utiliser la composition chimique comme un marqueur de l'activité biologique s'est imposée rapidement (pour une vue synthétique voir le Tableau 1), avant même l'essor des lignes de micro-analyse PIXE, et constitue toujours le socle des études PIXE des échantillons biologiques.

L'adéquation de la méthode PIXE avec le domaine de la biologie s'est malgré tout renforcée grâce au développement de lignes d'analyse possédant une résolution

spatiale micrométrique¹. Le gain en résolution spatiale de la méthode PIXE correspond à une avancée majeure pour l'analyse en biologie car il permet d'étudier la *compartmentation* des éléments chimiques à l'échelle cellulaire dans les tissus, ou aux interfaces. Les domaines d'application en Biologie sont très variés (Tableau 1), et reflètent la volonté d'exploiter les nouvelles possibilités d'analyse offertes par ces techniques sensibles et spatialement résolues.

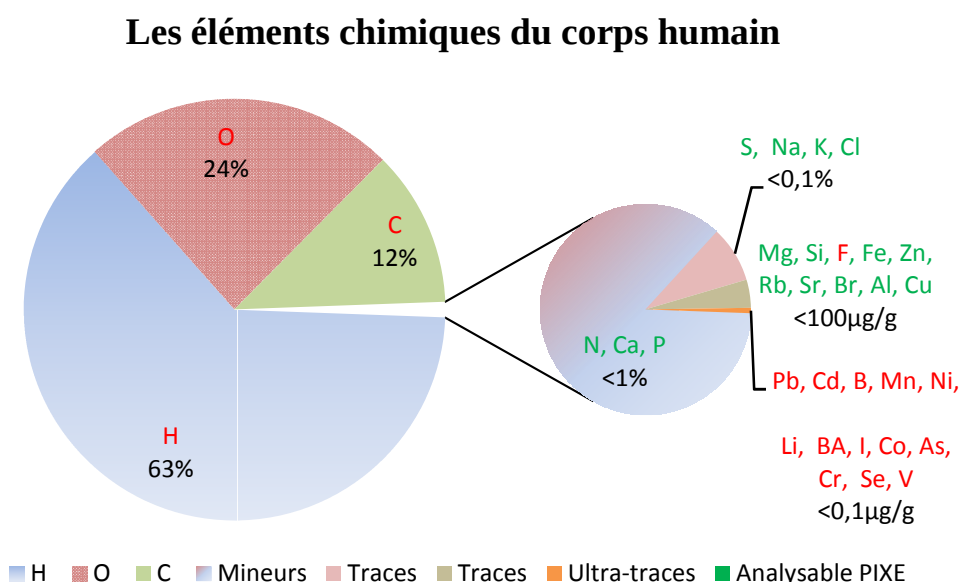


Figure 1 : Composition élémentaire moyenne du corps humain. Les éléments chimiques dont le symbole est écrit en vert sont analysables en PIXE au contraire des éléments trop légers (C, N, O, F) ou peu concentrés (<0.1 µg/g), en rouge. D'après Freitas (Freitas, 1999).

1.2 METHODES PERMETTANT LA DETECTION D'ELEMENTS CHIMIQUES EN BIOLOGIE

On peut illustrer le fait que la méthode PIXE est adaptée à l'analyse des éléments chimiques à l'échelle cellulaire à partir d'un diagramme représentant la limite de détection d'une méthode d'analyse en fonction de sa sensibilité (Figure 2). La méthode PIXE possède en effet une résolution spatiale de l'ordre du micromètre et une sensibilité de 1 à 10 µg/g lui permettant de

¹ Pour un historique, voir par exemple (Legge, 1997).

quantifier tous les éléments chimiques de la cellule à l'exception des ultra-traces et de la matrice organique. Parmi les méthodes de caractérisation permettant d'observer, directement ou indirectement, la distribution des éléments chimiques dans des échantillons biologiques, la méthode PIXE n'est ni la plus sensible ni la plus résolutive mais elle possède un atout majeur grâce à son caractère quantitatif (Lobinski, et al., 2006), un point qui sera développé, en particulier dans le cas de l'analyse cellulaire, tout au long de ce document. De manière similaire, on peut dire que les méthodes d'analyse des éléments chimiques, dont celles figurant dans le diagramme de la figure 2, possèdent toujours un domaine de prédilection, que ce soit du point de vue de leur sensibilité, de leur résolution spatiale, ou du type de préparation nécessaire à l'analyse, ou du fait qu'elles apportent des informations supplémentaires concernant l'isotopie ou la spéciation des éléments chimiques, et que seul l'aspect complémentaire des méthodes peut nous apporter une vision complète de la cellule (Mc Rae, et al., 2009).

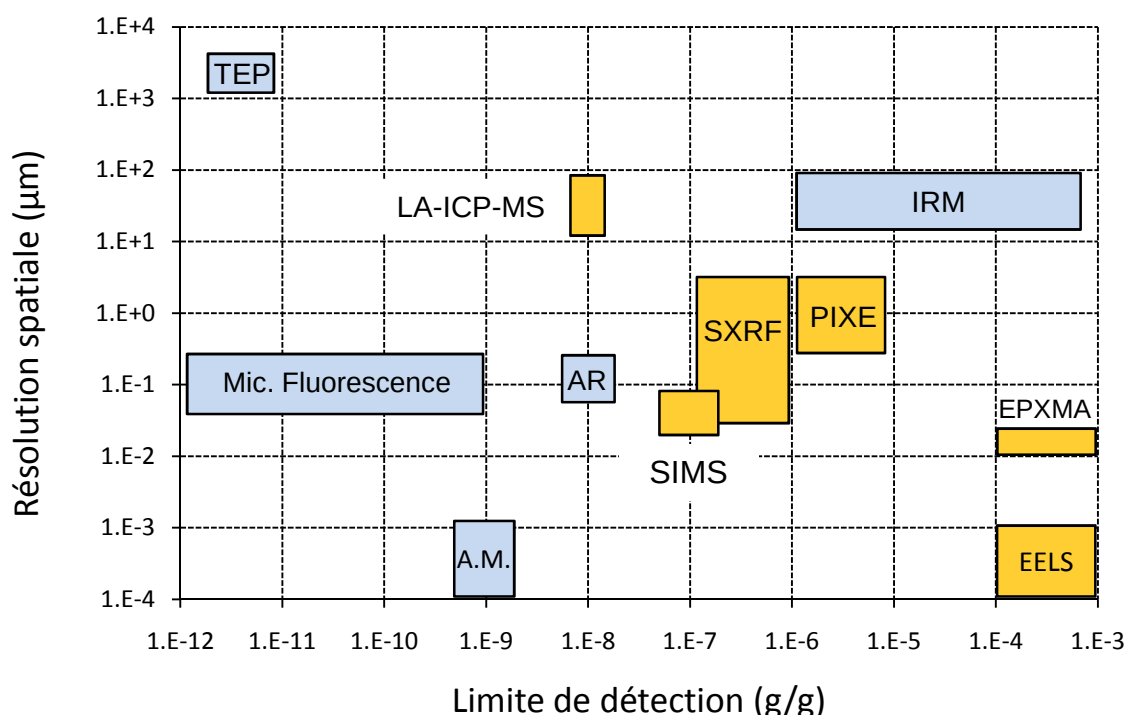


Figure 2 : Diagramme de classification des méthodes d'analyses sensibles aux éléments chimiques en fonction de leur résolution spatiale (µm) et de leur limite de détection (g/g). La distinction doit être faite entre les méthodes d'analyse directes (jaune) et indirectes (bleu) des éléments chimiques principalement parce que la limite de détection des méthodes indirectes est définie ici comme la plus petite quantité de matière détectable par gramme de matière marquée et non pas par gramme de matière totale. La sensibilité absolue des méthodes indirectes dépend du taux de marquage et est en réalité supérieure à la sensibilité des méthodes spectroscopiques directes. Abréviations : TEP : Tomographie par Emission de Positrons ; LA-ICP-MS : Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma- Mass spectrometry ; IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique ; SXRf : Synchrotron X-Ray Fluorescence ; PIXE : Particle Induced X-ray Emission ; Mic. Fluorescence : Microscopie de Fluorescence ; AR : Auto-Radiographie ; SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry ; EPXMA : Electron Probe X-ray Micro-Analysis ; A.M. : Auto-Métallographie. EELS : Electron Energy Loss Spectrometry. Diagramme en partie reconstruit

La Tomographie par Emission de Positrons (TEP) et l'Imagerie par Résonance Magnétique sont deux techniques non invasives qui permettent de faire de l'imagerie à l'échelle des organes et tissus de certains éléments chimiques : soit dans le cas de la TEP de l'image d'un traceur contenant un élément chimique émetteur β^+ , principalement le ^{18}F , soit dans le cas de l'IRM de la distribution des éléments chimiques qui possèdent un moment magnétique de spin non nul, comme les protons. Ces méthodes d'analyse ne possèdent pas la résolution spatiale suffisante pour déterminer la distribution des éléments chimiques à l'échelle cellulaire, mais possèdent cet atout unique de permettre de faire de l'imagerie *in vivo* et donnent une vision d'ensemble de l'organisme.

L'Auto-Radiographie (AR) est une méthode basée, comme la TEP, sur l'imagerie d'un traceur radioactif qui doit être utilisée sur des échantillons fixés ou congelés. La distribution des radioéléments est obtenue en juxtaposant l'échantillon et une plaque photosensible (film photographique, émulsion liquide) puis en observant la coloration de la plaque exposée. La résolution spatiale de la méthode dépend à la fois de l'homogénéité de la plaque et de la méthode d'observation (microscopie optique ou électronique).

L'autométallographie (AM) est une méthode d'amplification à l'argent de la taille de nano-cristaux métalliques lourds, principalement Au, Ag, Ag-S/Se, Hg-S/Se, Bi-S/Se et Zn-S/Se, l'augmentation de la taille des agrégats permettant leur visualisation à haute résolution par microscopie électronique en transmission. La réaction d'amplification correspond au dépôt sur la surface du cristal d'atomes d'Ag par réduction Ag^+ en présence d'un agent réducteur.

La microscopie de fluorescence est basée sur l'observation en microscopie optique de composés fluorescents, complétant sur le principe les méthodes d'observations histochimiques. L'apport des marqueurs fluorescent provient d'une part de la petite taille des marqueurs qui leur permet de diffuser librement à travers les membranes cellulaires et d'autre part de la sensibilité optique des marqueurs permettant l'observation de molécules uniques, le tout constituant une méthode d'analyse non invasive et dynamique de la plupart des cations métalliques (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}) et de certains métaux xénobiotiques lourds. Les principales limitations de cette méthode résident dans le fait que seuls les cations non liés aux molécules biologiques peuvent être observés ainsi que, dans certains cas, d'un manque de spécificité pour les métaux de transition.

De manière générale, les méthodes qui nécessitent l'utilisation de traceurs ou marqueurs, comme la TEP, l'IRM, l'auto-métallographie ou la microscopie de fluorescence sont dépendantes des phénomènes d'affinité chimique entre l'élément cible et le marqueur, ou de phénomènes de compétition avec les autres éléments chimiques de la cellule et sont limitées par la cinétique d'incorporation du traceur dans la cellule. Ces méthodes s'appliquent donc spécifiquement à certains éléments chimiques et ne ciblent généralement qu'une fraction d'entre eux. Elles offrent la possibilité unique de réaliser des études dynamiques de la répartition des éléments chimiques ou des molécules marquées.

La fluorescence X par rayonnement synchrotron (Synchrotron X-Ray Fluorescence) est basée sur l'ionisation des atomes de l'échantillon par un faisceau de photons X et la détection du rayonnement de fluorescence émis lors du retour à l'état fondamental des atomes ionisés. La méthode est dans son principe similaire aux méthodes PIXE et MEB-EDS, la source d'excitation (photons, particules chargées ou électrons) constituant la différence majeure. La sensibilité de la méthode SXRF, plus forte d'environ un ordre de grandeur par rapport à la méthode PIXE, provient de l'intensité du rayonnement synchrotron et des sections efficaces d'ionisation qui augmentent avec le numéro atomique de l'atome cible. Les méthodes d'analyse

par rayonnement synchrotron sont particulièrement intéressantes pour la possibilité qu'elles offrent de réaliser des expériences de spéciation des états de valence des éléments chimiques (XANES et EXAFS).

La spectrométrie de pertes d'énergie des électrons (EELS) est une méthode d'analyse mise en œuvre avec la microscopie électronique en transmission (MET) et qui permet d'identifier, quantifier et déterminer les espèces chimiques des atomes présents dans l'échantillon (Egerton, 2009). La méthode est basée sur la diffusion inélastique d'un faisceau d'électrons monoénergétiques sur les électrons des atomes de la cible et la mesure du transfert d'énergie de l'électron incident à l'électron cible. La méthode possède une résolution spatiale optimale atomique, qui dépend en partie de l'épaisseur de l'échantillon, et une sensibilité de l'ordre de 1 mg/g.

Les méthodes d'analyse LA-ICP-MS et SIMS sont basées sur l'abrasion de l'échantillon par un faisceau laser ou un faisceau d'ions puis par la détection par spectrométrie de masse des ions arrachés à l'échantillon. Du fait de la spécificité de la détection par spectrométrie de masse, ces techniques sont plus sensibles que les méthodes d'analyse atomiques (PIXE, SXRF et EPXMA) et permettent de différencier les différents isotopes d'un même élément chimique. Si la méthode LA-ICP-MS ne permet pas de réaliser de l'analyse cellulaire, la méthode étant limitée par la taille du faisceau abrasif, la méthode SIMS (nano-SIMS) permet de réaliser des cartographies chimiques de cellules avec une résolution spatiale de quelques dizaines de nanomètres.

Les méthodes d'analyse directe des éléments chimiques basées sur des phénomènes atomiques (transitions électroniques radiatives pour les méthodes PIXE, SXRF, MEB-EDS) ou sur la spectrométrie de masse permettent d'étudier la répartition des éléments chimiques dans des échantillons plus proches de leur état natif en termes de composition chimique. Ces méthodes représentent un bon compromis entre la résolution spatiale et la sensibilité permettant d'observer la répartition des éléments chimiques à l'échelle cellulaire et sont le plus souvent quantitatives (SIMS, PIXE) ou semi-quantitative (LA-ICP-MS, EPXMA). L'intérêt de ces méthodes directes est augmenté du fait que les phénomènes physiques mis en jeu apportent des informations complémentaires concernant l'isotopie des éléments chimiques (SIMS ou LA-ICP-MS) ou l'état d'oxydation (analyse par rayonnement synchrotron XANES et EXAFS ; spectroscopie de pertes d'énergie des électrons, EELS).

1.3 METHODES DE NORMALISATION DE L'INTENSITE DU SIGNAL D'EMISSION X

Pour pouvoir faire des comparaisons de compositions chimiques entre différents échantillons, ou différentes structures cellulaires, ou pour évaluer des résultats issus de campagnes de mesures différentes, il est capital de normaliser l'intensité du signal d'émission X par la quantité de matière irradiée. Ceci suppose que soient pris en compte les effets de matrice associés à la méthode PIXE, dus essentiellement à variation des sections efficaces d'ionisation avec l'énergie des particules incidentes et à l'atténuation du rayonnement X par l'échantillon (Johansson, et al., 1995). Dans la mesure où les interactions ions-matière sont assez bien connues, le problème des corrections de matrice se résume au problème de la détermination de l'ampleur de la correction à apporter, c'est à dire à la *détermination de la masse surfacique* de l'échantillon. Dans le cas général, ce problème se pose surtout pour des

échantillons d'épaisseur intermédiaire (typiquement quelques dizaines de microns) puisque pour un échantillon épais, on considère que l'épaisseur correspond au parcours maximal des ions dans la matière, et que l'on peut négliger les effets de matrice pour les échantillons fins.

Tableau 1 : Synthèse bibliographique des travaux à partir de la micro - analyse PIXE des échantillons biologiques.

Applications		Références
Tissu	Maladies neuro-dégénératives	(Johansson, et al., 1987), (Tapper, et al., 1987), (Pinheiro, et al., 1991), (Landsberg, et al., 1991), (He, et al., 1996), (Thong, et al., 1999), (He, et al., 2003), (Meinecke, et al., 2006), (Barapatre, et al., 2010)
	Cancérologie	(Deconninck, 1981), (Johansson, et al., 1984), (Johansson, et al., 1987), (Tapper, et al., 1987), (Meinecke, et al., 2006), (Ortega, et al., 2005), (Endo, et al., 2006)
	Athérosclérose	(Cichocki, et al., 1987), (Pallon, et al., 1995), (Watt, et al., 2006), (Ren, et al., 2007), (Magyar, et al., 2007), (Roijers, et al., 2008), (Lobbess, et al., 2009)
	Diagnostic médical à partir de l'analyse des cheveux ou de la formule sanguine	(Johansson, et al., 1984), (Lindh, 1987), (Johansson, et al., 1987), (Valkovic, 1989), (Ollerhead, et al., 1989), (Yin, et al., 1993), (Hosseini, et al., 1996), (Murao, et al., 2002), (Sera, et al., 2002), (Clemente, et al., 2004)
	Mécanismes cellulaires : peau, cheveux	(Mahrok, et al., 1984), (Bos, et al., 1984), (Kertész, et al., 2005), (Ynsa, et al., 2006), (Mavon, et al., 2007), (Simon, et al., 2009), (Szikszai, et al., 2010), (Lindh, 1982), (Bischof, et al., 1982), (Watt, et al., 1984), (Dikhoff, et al., 1985), (Heck, et al., 1987), (Bench, et al., 2001), (Verdier, et al., 2005), (Guinote, et al., 2006), (Kusakabe, et al., 2008), (Pinheiro, et al., 2009)
	Toxicité des métaux	(Doty, et al., 1981), (Tsuboi, et al., 1994), (Jallot, et al., 1998), (Ektessabi, et al., 2002), (Barbotteau, et al., 2004), (Guibert, et al., 2008), (Lao, et al., 2008), (Bradley, et al., 2010), (Kaabar, et al., 2010)
Bio-matériaux		(Perry, et al., 1988), (Schofield, et al., 1989), (Guo, et al., 2000), (Doubleday, et al., 2008)
Micro-organismes		
Plantes : hyper- accumulation, mécanismes de protection, symbiose		(Mazzolini, et al., 1981), (Devès, et al., 2005), (Isaure, et al., 2006), (Tarnawska, et al., 2007), (Pongrac, et al., 2010), (Pallon, et al., 2007), (Kachenko, et al., 2008), (Verhaeghe, et al., 2008), (Collins, et al., 2010)
Distribution et/ou analyse quantitative cellulaire		(Heck, et al., 1988), (Li, et al., 1991), (Allan, et al., 1991), (Moretto, et al., 1993), (Ortega, et al., 1996), (Moretto, et al., 1997), (Thong, et al., 1997), (Dillon, et al., 1998), (Ortega, et al., 2003), (Ortega, et al., 2003), (Khodja, et al., 2003), (Bresson, et al., 2006), (Fiedler, et al., 2007), (Watt, et al., 2009),

	(Ortega, et al., 2009), (Jeynes, et al., 2010), (Simon, et al., 2010)
Articles de revue, ouvrages	Techniques d'imagerie des éléments chimiques (Mc Rae, et al., 2009), (Lobinski, et al., 2006), analyse cellulaire (Ortega, 2005), (Moretto, et al., 1997), botanique (Mesjasz-Przybylowicz, et al., 2007), bio-matériaux (Kaabar, et al., 2010) (Irigaray, et al., 2001), Sciences de la vie (Llabador, et al., 1998)

Cependant, comme l'intensité de l'émission X dépend de la masse irradiée, le problème de la correction des effets de matrice se complique lorsque l'échantillon présente une *distribution en masse* due à sa topologie, à sa porosité ou à la variation locale de sa densité comme c'est le cas pour les échantillons biologiques. Quand l'échantillon est hétérogène du point de vue de son épaisseur, même dans le cas d'un échantillon fin, la connaissance de la masse surfacique de l'échantillon est donc indispensable.

Plusieurs méthodes de normalisation de l'intensité de l'émission X permettant de résoudre le problème posé par l'épaisseur de l'échantillon ont été proposées. Bos et al (Bos, et al., 1982) ont utilisé l'atténuation par l'échantillon du rayonnement gamma à 1013 keV émis lors de la réaction nucléaire $^{27}\text{Al}(p,p'\gamma)^{27}\text{Al}$ générée par l'introduction d'une plaque d'aluminium massive placée derrière l'échantillon. Si le principe de la mesure de l'atténuation d'un rayonnement de référence par l'échantillon permet bien de connaître la quantité de matière irradiée, il reste que cette méthode introduit un artefact majeur qui est le rayonnement X parasite provenant de la plaque d'aluminium. De plus, la méthode possède une limite basse pour l'épaisseur analysable à cause de l'énergie importante du rayonnement de référence. La mesure de la masse de l'échantillon proposée par Lierde *et al* (Van Lierde, et al., 1997) reprend globalement ce principe en remplaçant la plaque d'aluminium par une feuille d'or et en estimant la masse de l'échantillon par la mesure du décalage en énergie du pic d'or sur le spectre RBS. La méthode est plus sensible en termes de masse analysable mais introduit comme précédemment un rayonnement parasite provenant des raies L de l'or sur le spectre d'émission X à l'énergie en particulier de la raie $K_{\alpha 1}$ du phosphore.

La mesure de l'intensité du rayonnement de freinage constitue un autre moyen de mesurer l'épaisseur de l'échantillon (Lindh, 1982). Contrairement aux méthodes précédentes, aucun signal parasite ne vient perturber la mesure de concentration des éléments chimiques, et la méthode ne nécessite pas la mise en œuvre de plusieurs techniques simultanément. Ce dernier point qui a pu jouer un rôle lorsque le nombre de voies d'acquisition était plus limité ne pose plus les mêmes problèmes aujourd'hui. La limite la plus importante de cette méthode vient du fait que les contributions multiples au bruit fond du spectre PIXE (bremsstrahlung des particules incidentes et des électrons secondaires, réactions nucléaires) ne sont pas toujours faciles à simuler dans un cas général. La plupart des logiciels de traitement PIXE ont

d'ailleurs opté pour l'application d'un filtre de soustraction du fond (Campbell, et al., 2000) (Ryan, et al., 1988) plutôt que pour la simulation. D'autre part, la variation de l'intensité du rayonnement de freinage ne dépend pas uniquement de l'épaisseur traversée mais aussi de la composition chimique de la cible. En conséquence, un échantillon présentant de fortes hétérogénéités en composition induira localement un rayonnement de freinage non proportionnel à la quantité de matière analysée. Dans le cas des échantillons biologiques, de fortes discontinuités dans la composition chimique peuvent apparaître quand la structure des échantillons est elle même hétérogène comme dans le cas d'organismes hyper-accumulateurs, de biomatériaux ou d'échantillons ayant incorporé des particules de composition chimique très différente de la matrice biologique.

Etant donnée que la matière biologique est essentiellement composée des éléments légers, en particulier C, N, et O, une méthode de mesure de la masse irradiée consiste à utiliser la spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford (Russell, et al., 1981) (Li, et al., 1985) (Themner, et al., 1986) (Grime, 1996) en complément de la méthode PIXE. Contrairement aux cas précédents, les variations locales de composition chimique de la matrice sont bien prises en compte dans le calcul de l'épaisseur car le résultat est le fruit d'une simulation et non pas seulement d'une mesure. La méthode possède une sensibilité importante lui permettant d'être appliquée à l'analyse des échantillons les plus fins comme les monocouches cellulaires. C'est d'ailleurs la méthode que nous utilisons au laboratoire. La méthode est limitée indirectement par les phénomènes de perte de masse organique apparaissant au cours de l'irradiation à cause principalement de l'échauffement local de l'échantillon (Van Lierde, et al., 1995) (Maetz, et al., 1996) (Arndt, et al., 1997). Ces phénomènes de perte de masse organique peuvent néanmoins introduire une erreur importante dans le calcul de la concentration des éléments chimiques car la variation de la masse au cours de l'irradiation peut atteindre jusqu'à 20 à 30% de la masse initiale (Devès, et al., 2001). Dans le cas d'échantillons fins, pour lesquels la quantité de matière est si faible que les durées d'analyse sont typiquement de plusieurs heures, ces artéfacts de mesure peuvent difficilement être évités, sans recours à l'analyse cryogénique (Tylko, et al., 2007) ou sans augmentation de l'angle solide de détection PIXE (Ryan, et al., 2010). Pour accéder à la concentration réelle des éléments chimiques, il est donc nécessaire de déterminer la *masse initiale* de l'échantillon et non pas la masse moyenne au cours de l'irradiation. Cette mesure peut être effectuée au moyen de la microscopie ionique en transmission et à balayage (STIM).

Le principe de la spectrométrie STIM repose sur la conversion en masse surfacique² de l'énergie perdue par les particules incidentes lors de leur traversée de l'échantillon (Sealock, et al., 1987). La méthode est mise en œuvre avec des courants de

² Le terme de masse surfacique correspond à la projection de la masse dans le plan de l'échantillon, et indique que la méthode STIM ne donne pas d'information concernant la distribution en volume de la masse de l'échantillon.

particules extrêmement faibles (1 fA) comparés aux intensités nécessaires utilisées pour la quantification des éléments chimiques en biologie (quelques centaines de pico-ampères) (Legge, et al., 1986) (Sealock, et al., 1987) ce qui permet de mesurer la masse initiale de l'échantillon sans perte de masse. Principalement utilisée en raison de sa haute résolution spatiale (Watt, et al., 2009), elle a rapidement été utilisée pour mesurer la variation locale d'épaisseur (Aloupogiannis, et al., 1987) (Schofield, et al., 1988), puis expressément pour remplacer la mesure de la masse souvent sous-estimée donnée par la spectrométrie RBS (Maetz, et al., 1999). La principale limite de la méthode est imposée par l'utilisation de détecteurs semi-conducteurs ne pouvant pas supporter un flux incident de particules incidentes plus important que quelques milliers de particules par seconde. Il en découle que la mesure de la masse par la méthode STIM ne peut pas être effectuée simultanément avec la méthode PIXE. L'analyse est généralement effectuée en 2 temps, en réduisant le courant pour l'analyse STIM, puis en l'augmentant dans un deuxième temps pour réaliser une analyse PIXE d'une zone rigoureusement identique (Pongrac, et al., 2010).

La limite en courant imposée par l'utilisation des détecteurs silicium peut être contournée en intercalant entre le détecteur, placé hors de l'axe, et l'échantillon une feuille mince de polymère jouant le rôle d'élément diffuseur. L'idée proposée originellement comme méthode de mesure de l'épaisseur de l'échantillon (Pallon, 1987), a été reprise récemment par son auteur spécifiquement pour permettre de mettre simultanément en œuvre les techniques PIXE et STIM (Pallon, et al., 2004). Cette géométrie de détection, qui allie une relative simplicité d'utilisation et une résolution en masse intermédiaire entre la méthode STIM classique et la méthode STIM hors-axe - l'échantillon jouant alors le rôle de diffuseur, tend à s'imposer naturellement comme méthode de normalisation de l'émission X (Pallon, et al., 2009).

1.4 PARTICULARITES DE L'ANALYSE CELLULAIRE

Un point particulier nous amène à considérer le cas des échantillons très fins ($<200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) comme les monocouches cellulaires. En effet, la sensibilité de la méthode STIM dépend de la perte d'énergie des particules dans l'échantillon (Sealock, et al., 1987), qui elle-même est une fonction du numéro atomique de la particule et varie avec l'inverse de leur vitesse. Pour augmenter la résolution en masse, il est donc préférable d'utiliser des particules alphas de faible énergie plutôt que des protons. Au contraire, pour augmenter le signal d'émission X, l'utilisation de protons de haute énergie est à privilégier. Si comme précédemment, les mêmes conditions d'analyse sont utilisées pour mettre en œuvre les méthodes PIXE et STIM, alors le dilemme ne pourra être résolu qu'au détriment de la précision d'une méthode par rapport à l'autre. Une solution consiste alors à réaliser l'analyse en adaptant la nature et l'énergie des particules en fonction de la méthode, STIM ou PIXE, mise en œuvre. Cette option implique une manipulation plus importante de l'accélérateur, se traduisant de fait par un allongement

de la durée des expériences, qui explique en partie pourquoi la méthode STIM n'est généralement pas mise en œuvre dans un cas où elle offre pourtant le plus d'avantage.

La difficulté de la quantification des éléments chimiques cellulaires a souvent été éludée en ne considérant que la répartition des éléments chimiques dans l'échantillon sans quantification, ou contournée en choisissant un élément chimique comme standard interne (Allan, et al., 1991) (Guo, et al., 2000) (Jeynes, et al., 2010), en normalisant le signal d'émission X sur l'intensité du rayonnement de freinage (Li, et al., 1991), ou, le plus souvent, en utilisant la masse obtenue au moyen de la spectrométrie RBS (Heck, et al., 1988) (Moretto, et al., 1997) (Thong, et al., 1997) (Ortega, et al., 2003) (Bresson, et al., 2006) (Fiedler, et al., 2007) (Barapatre, et al., 2010).

Les méthodes de normalisation de l'intensité du signal d'émission X ne sont pas entièrement satisfaisantes, soit parce qu'elles ne sont pas quantitatives, soit parce qu'elles sont potentiellement biaisées par les dommages cellulaires apparaissant au cours de l'irradiation et le recours à l'analyse quantitative STIM devient très pertinent pour déterminer précisément la composition chimique des cellules. Avec le développement au laboratoire d'une ligne nanosonde (Barberet, et al., 2009), permettant l'imagerie densimétrique haute résolution (Figure 3) et la cartographie de la distribution des éléments chimiques cellulaire avec une résolution sub-micrométrique (Figure 4), le passage de la normalisation des données par la masse STIM plutôt que RBS sera d'autant plus nécessaire que la densité de courant déposée localement sera importante.

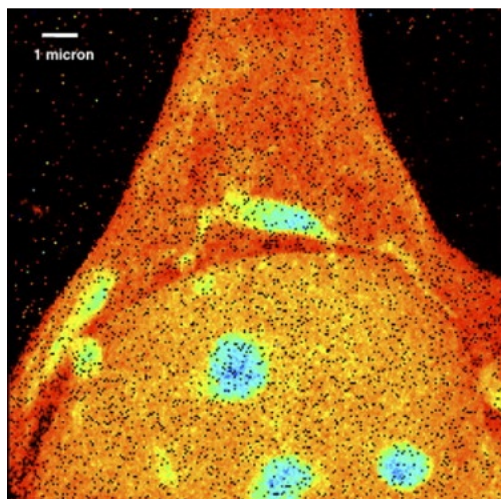


Figure 3 : Image densimétrique d'une cellule tumorale mammaire (MCF-7) (détail) montrant une partie du noyau contenant des nucléoles (bleus) et révélant des structures périnucléaires denses. Image obtenue avec un faisceau de particules alphas de 2 MeV de 80×90 nm. De (Minqin, et al., 2007), Centre pour l'analyse par faisceau d'ions (CIBA), Singapour.

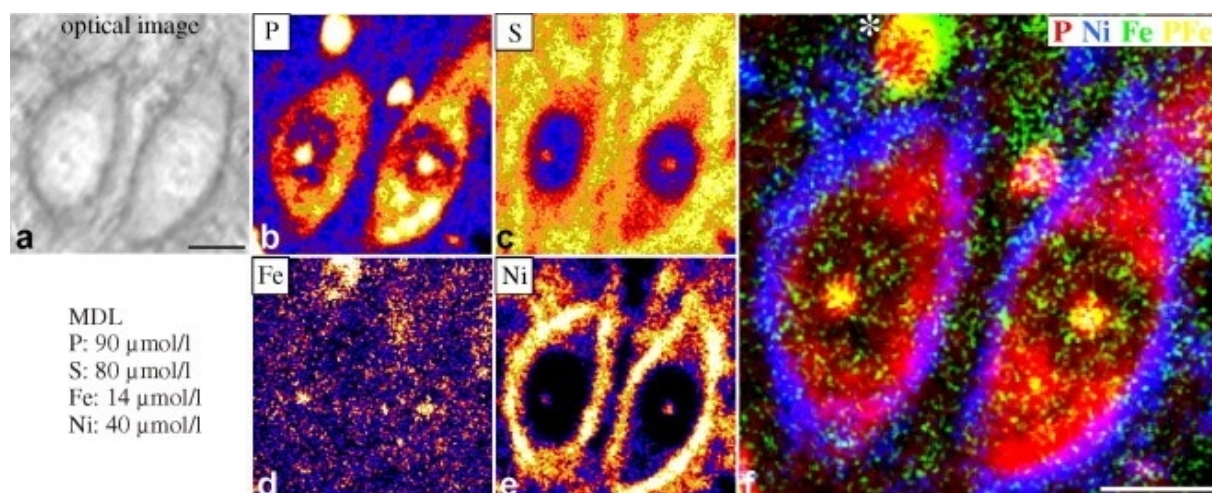


Figure 4 : Image de la distribution des éléments chimiques P, S, Fe, Ni dans une coupe de cerveau humain Parkinsonien inclus dans une résine, montrant en particulier la distribution des éléments chimiques dans 2 neurones. Les images ont été obtenues avec un faisceau de protons de 2,25 MeV et une résolution spatiale de 1 μm Barre d'échelle : 10 μm . De (Fiedler, et al., 2007), Lipsion, Université de Leipzig.

Pour anticiper les problèmes posés par l'utilisation de nanofaisceau d'ions et pour améliorer la précision des mesures de la concentration des éléments chimique, nous avons donc décidé de faire évoluer les méthodes de quantification de la composition chimique cellulaire et de proposer une nouvelle *méthodologie* pour la quantification et la détermination de la répartition des éléments chimiques cellulaires par faisceaux d'ions à partir d'une combinaison des méthodes d'analyse PIXE, RBS et STIM. Dans ce document, nous présentons cette démarche qui s'appuie fortement sur le développement d'un logiciel pour le traitement quantitatif des expériences STIM. La validité de cette méthode ainsi que ses limites seront discutées, en particulier en termes d'incertitude de mesure de la composition chimique.

En complément, nous présenterons le développement d'une base de données pour la capitalisation des compositions chimiques cellulaires (BDC4) développée en réponse au nombre limité d'analyses qu'il est possible d'effectuer en raison à la fois du temps minimum nécessaire pour réaliser une acquisition et de l'accès limité aux plateformes d'analyse par faisceaux d'ions. Cette base de données s'inscrit parfaitement dans la logique de d'utilisation de la composition chimique cellulaire comme un traceur de l'activité biologique, et doit permettre à terme de définir des compositions chimiques de référence pour les différents types cellulaires analysés.

Enfin, nous présenterons l'application de la méthodologie STIM-PIXE-RBS à l'étude de la toxicologie cellulaire du cobalt (Ortega, et al., 2009), pour illustrer sa

pertinence dans le cas d'échantillons présentant une perte de masse organique au cours de l'analyse.

2 METHODES D'ANALYSE PAR FAISCEAU D'IONS

2.1 SPECTROMETRIE D'EMISSION X INDUITE PAR PARTICULES CHARGEES (PIXE)

La spectrométrie d'émission X induite par particules chargées est une méthode d'analyse multi-élémentaire permettant d'analyser les éléments chimiques avec une sensibilité de l'ordre du $\mu\text{g/g}$. Le principe de l'analyse repose sur la mesure de l'énergie et de l'intensité du rayonnement X émis par un échantillon placé dans un faisceau de particules chargées. L'interaction peut être décomposée schématiquement en 2 phases : l'ionisation ou la création d'une lacune sur une couche électronique de cœur (niveau K, L ou M) suivie d'un retour à l'état fondamental par désexcitation radiative. L'énergie des raies X émises étant caractéristique de l'atome émetteur et leur intensité proportionnelle à leur concentration, la méthode permet de déterminer la composition chimique de l'échantillon.

S'il revient au physicien anglais, James Chadwick (Chadwick, 1912), d'avoir observé le premier le spectre d'émission X produit par un échantillon placé devant une source de radium, le développement de la méthode comme technique d'analyse quantitative doit beaucoup au travail de Castaing (Castaing, 1952) qui a permis d'établir un lien entre l'intensité de l'émission X et la concentration des éléments chimiques en utilisant des faisceaux d'électrons comme source d'excitation. Il faut néanmoins attendre le développement des détecteurs semi-conducteurs en remplacement des cristaux à dispersion de longueurs d'onde pour faire de la technique une méthode réellement multi-élémentaire. Dans les années 1970, Johansson *et al* ont montré que la sensibilité de la méthode augmentait de plusieurs ordres de grandeurs quand elle était mise en œuvre avec un faisceau de protons plutôt que d'électrons. Aujourd'hui encore, bien que l'acronyme PIXE soit généraliste, la mise en œuvre de la méthode implique souvent l'utilisation de protons comme particules incidentes.

2.1.1 INTERACTIONS ION-MATIERE

Le modèle atomique de Bohr permet de rendre compte schématiquement du phénomène d'ionisation de l'atome suite au transfert d'énergie de l'ion vers l'électron (Figure 5). L'ionisation correspond au cas où l'énergie apportée est suffisante pour éjecter un électron de cœur vers le niveau du vide avec une énergie cinétique nulle (cas limite) ou positive. Quand l'énergie est juste suffisante pour permettre une transition vers une couche électronique d'énergie supérieure, on parle alors seulement d'*excitation*.

Les interactions entre les particules chargées accélérées et les atomes de la cible ne mènent pas toutes à la création d'une lacune sur un niveau de cœur, phase préalable à l'émission d'un rayonnement X caractéristique. Seules les interactions inélastiques, avec transfert de tout ou partie de l'énergie de la particule incidente à l'électron peuvent être à l'origine du phénomène d'ionisation (Johansson, et al., 1995). Ainsi, un effet prépondérant dans l'interaction ion-atome-cible est la diffusion élastique,

sans excitation des niveaux électroniques ou nucléaires, ou diffusion de Rutherford, à l'origine de la spectrométrie éponyme, qui sera présentée dans le chapitre suivant (2.2 RBS). La diffusion inélastique, gouvernée par l'attraction électrostatique entre charges de signe opposé, est à l'origine des concepts de *perte d'énergie* et de *pouvoir d'arrêt* (voir à ce sujet les chapitres 2.2 RBS et 2.3 STIM). Leur importance se vérifie si l'on s'intéresse à la distribution en énergie des particules dans l'échantillon indispensable à la description d'expérience d'implantation ionique ou pour l'analyse PIXE d'échantillons épais dans lesquels le faisceau d'ions est en partie ou totalement arrêté. Dans le cas d'échantillons minces, comme les monocouches cellulaires, le concept de pouvoir d'arrêt est à la base de l'imagerie densimétrique STIM (voir chapitre 2.3 STIM).

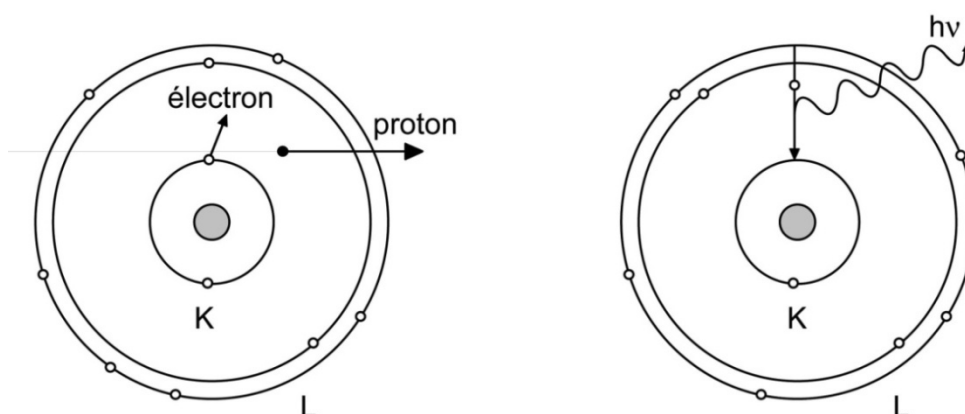


Figure 5 : Schéma de principe de la méthode PIXE montrant la phase d'ionisation (gauche) et la phase de désexcitation radiative donnant lieu à l'émission X (droite). Le schéma est conforme aux modèles simplifiés de la méthode, type BEA ou PWBA, dans lesquelles le changement de trajectoire de la particule incidente n'est pas pris en compte.

Une conséquence de la dissipation d'une partie de l'énergie cinétique des ions incidents dans l'échantillon est l'émission d'un rayonnement de freinage, autrement appelé *bremsstrahlung*. Ce rayonnement est continu et constitue une source de bruit de fond majeure pour les spectres d'émission X. Son intensité est proportionnelle au carré de la décélération, soit $(F/m)^2$. Compte tenu des masses relatives du proton et de l'électron³, cela signifie que le rayonnement de freinage est $(1836)^2$ fois plus important pour un faisceau d'électrons que pour un faisceau de protons. Même si en réalité, ce rapport est moindre car les protons ont un parcours moyen supérieur à celui des électrons dans la matière, et par conséquent un nombre d'interactions plus importants,

³ Masse du proton : $m_p = 1.672 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$; Masse de l'électron : $m_e = 9,109 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$

il reste nettement inférieur à celui issu du ralentissement des électrons. Au final, avec des protons comme particules incidentes, le ralentissement des électrons secondaires constitue généralement la principale source de bruit de fond. L'énergie de ce rayonnement dépend du transfert d'énergie entre le proton et l'électron. Cette énergie varie entre 0 et une énergie maximale correspondant à un choc supposé frontal entre l'ion et l'électron et la projection de l'électron vers l'avant. L'énergie maximale transférée est alors donnée par la relation suivante,

$$E_{max} = \frac{4 \cdot m_e \cdot M_p}{(m_e + M_p)^2} E_0 \quad (Eq. 1)$$

Où m_e est la masse de l'électron,

M_p est la masse du proton,

E_0 est l'énergie incidente de la particule.

Soit dans le cas du choc d'un proton sur un électron au repos,

$$E_{max} \cong \frac{E_0}{500} \quad (Eq. 2)$$

Pour des protons de 3 MeV, le bruit de fond continu correspondant au bremsstrahlung des électrons secondaires s'étend jusqu'à une énergie de 6 keV, une gamme d'énergie correspondant aux raies K des éléments de $Z < 25$ (Mn) et aux raies L pour $Z < 63$ (Eu).

2.1.2 MODELES DE DESCRIPTION DES SECTIONS EFFICACES D'IONISATION

La connaissance des sections efficaces d'ionisation, c'est-à-dire de la probabilité de créer une lacune sur une couche électronique de cœur, est capitale pour la quantification des éléments chimiques par PIXE. Cette connaissance repose à la fois sur des approches théoriques et sur leurs validations expérimentales.

Pour des énergies de particules incidentes très supérieures à l'énergie de liaison de l'électron, la description de l'interaction proton-électron est qualitativement bien reproduite par les théories *BEA* (Binary Encounter Approximation) et *PWBA* (Plane Wave Born Approximation). Dans la première, l'interaction n'est considérée que comme le choc de deux particules chargées et la section efficace d'ionisation calculée à partir de l'échange de quantité de mouvement entre l'ion et l'électron, le noyau atomique ne servant qu'à calculer le moment cinétique initial de l'électron. Dans la seconde, on applique la théorie des perturbations à la transition entre deux états, un état initial (une onde plane et un électron lié) et un état final (onde plane et électron éjecté dans le continuum), reliés par une interaction coulombienne. Les 2 théories établissent

qualitativement que la section efficace d'ionisation de la couche i d'un élément de numéro atomique Z augmente avec l'énergie de la particule et atteint un maximum lorsque la vitesse de la particule égale celle de l'électron. L'énergie de cet optimum est donnée par la relation 3,

$$E_{opt} = \frac{M_p}{m_e} U_i^Z \quad (Eq. 3)$$

Si U_i^Z est l'énergie de liaison de l'électron de la couche i pour un élément Z .

Ces deux modèles permettent aussi de définir un facteur d'échelle pour les sections efficaces d'ionisation afin de calculer les sections efficaces pour tout type de particule incidente, à partir de la section efficace d'un proton de même vitesse. Cette loi d'échelle (Eq. 4) indique que les sections efficaces d'ionisation, quelle que soit la masse de la particule, sont identiques à celle d'un proton possédant la même énergie par nucléon multipliée par le carré du numéro atomique.

$$\sigma_X(E) = \sigma_{protons} \left(\frac{E}{A_X} \right) \cdot Z_X^2 \quad (Eq. 4)$$

où Z_X^2 est le numéro atomique de la particule incidente.

Cependant, il faut noter que les limites de ces théories interviennent lorsque l'hypothèse de départ, selon laquelle seul l'électron voit son état modifié pendant l'interaction, n'est plus valide, comme c'est le cas lorsque sont créées plusieurs lacunes sur un même atome. Ces phénomènes sont d'autant plus prépondérants que la masse du projectile augmente, ce qui intervient assez rapidement à partir de l'hélium.

Pour des énergies de particules de l'ordre de grandeur de l'énergie de liaison, la *méthode semi classique* (SCA, semi classical approximation) (Hansteen, 1989) intègre dans son modèle la déflexion de la particule incidente dans le champ coulombien, ce qui avait été omis par hypothèse dans les théories BEA et PWBA.

Les modèles de description des sections efficaces d'ionisation les plus pertinents sont néanmoins ceux incluant les corrections dites *ECPSSR* à la théorie PWBA comme celui développé par Brandt et Lapicki (Brandt, et al., 1981). Au départ, le formalisme ECPSSR ne décrivait les électrons qu'à partir de fonctions d'onde hydrogénoïdes (de type Dirac-Fock), omettant les interactions répulsives inter-électroniques, puis Chen et Craseman (Chen, et al., 1980) ont proposé une description incluant des fonctions d'ondes de type Dirac-Hartree-Slater (ECPSSR-DHS) permettant de mieux rendre compte des effets d'écrantage du potentiel nucléaire.

L'acronyme ECPSSR renvoie à la prise en compte dans la théorie PWBA des phénomènes de perte d'énergie de la particule incidente (E- Energy), de déflexion coulombienne de sa trajectoire (C-Coulomb), de perturbation de l'état stationnaire de l'électron lié due à la présence de la particule, perturbation introduite sous forme de

modification de l'énergie de liaison (PSS – perturbed stationary state) et d'augmentation de la masse relativiste (R-relativistic effects).

Parallèlement au développement des modèles de sections efficaces d'ionisation, les sections efficaces expérimentales, dites couramment « de référence », ont été mesurées pour les couches K, L et M. Elles ont été utilisées, dans une optique pragmatique de développement d'une nouvelle méthode analytique, pour ajuster les différents modèles aux données expérimentales. Ainsi, Johansson *et al* (Johansson, et al., 1976) ont rapidement paramétré le modèle BEA pour générer des tables de sections efficaces d'ionisation à des fins d'analyse chimique, de même que Cohen et Harrigan (Cohen, et al., 1985) à partir du modèle non relativiste ECPSSR-DF, ou Campbell (Campbell, et al., 1985) avec le modèle plus complexe de Chen incluant les corrections relativistes. Tous ces travaux d'ajustement des données expérimentales ont fortement contribué à l'essor de la technique PIXE et constituent la base des nombreux logiciels de traitement des données expérimentales utilisés aujourd'hui (Blaauw, et al., 2002).

2.1.3 MODES DE DESEXCITATION

L'atome-cible ionisé retourne rapidement à l'état fondamental (10^{-16} s). Pour cela, il suit au moins une voie de désexcitation qui est soit *non-radiative* (transitions Auger, transitions Koster-Cronig) soit *radiative* (émission X). Le rendement de fluorescence ω_K correspond à la probabilité que l'atome emprunte la voie radiative. Il est décrit par la formule semi-empirique de Bambynek (Bambynek, 1984) qui reproduit assez fidèlement le modèle ECPSSR-DHS de Chen (Chen, et al., 1980),

$$\left(\frac{\omega_K}{1 - \omega_K}\right)^{1/4} = \sum_{i=0}^3 B_i Z^i \quad (Eq. 5)$$

Avec les coefficients B_i définis comme décrit dans le Tableau 2 pour les couches K et L.

La relation précédente indique que le rendement de fluorescence augmente avec le numéro atomique (Figure 6). Le mode de désexcitation radiatif ne devient prépondérant que pour les couches K des éléments chimiques plus lourds que le gallium ($Z=31$). Pour une lacune sur une couche K des éléments plus légers, ou sur les couches L et M, l'atome revient principalement à l'état fondamental par l'émission d'un électron Auger.

Tableau 2 : Coefficient de Bambynek (Bambynek, 1984) pour le calcul des rendements fluorescence à partir d'un trou créé sur un niveau K ou L selon la formule 5.

	K	L
B₀	$(3.70 \pm 0.52) \times 10^{-2}$	0.17765
B₁	$(3.112 \pm 0.044) \times 10^{-2}$	2.98937×10^{-3}
B₂	$(5.44 \pm 0.11) \times 10^{-5}$	8.91297×10^{-5}
B₃	$-(1.25 \pm 0.07) \times 10^{-6}$	-2.67184×10^{-7}

La Figure 7 présente les différentes transitions donnant lieu à l'émission d'un photon X. Pour une lacune sur une couche donnée, on calcule la probabilité d'émission d'une raie à partir du rendement de fluorescence en pondérant ce rendement par l'intensité relative k , également appelé rapport d'embranchement, de la raie considérée (Scofield, 1974),

$$p_K = \omega_K \cdot k \quad (Eq. 6)$$

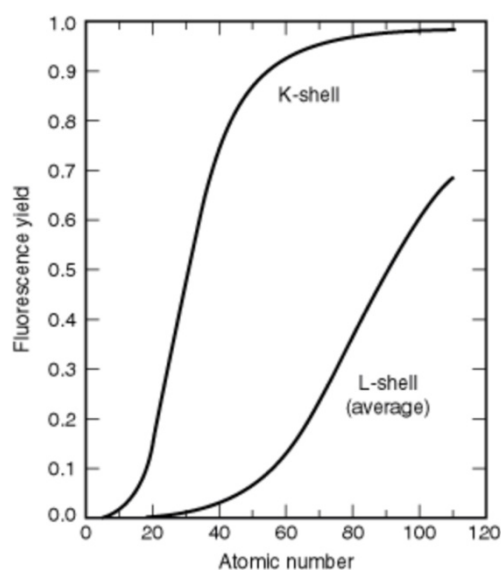


Figure 6 : Variation du rendement de fluorescence en fonction du numéro atomique pour une lacune initialement créée sur un niveau K ou L (Scofield, 1974).

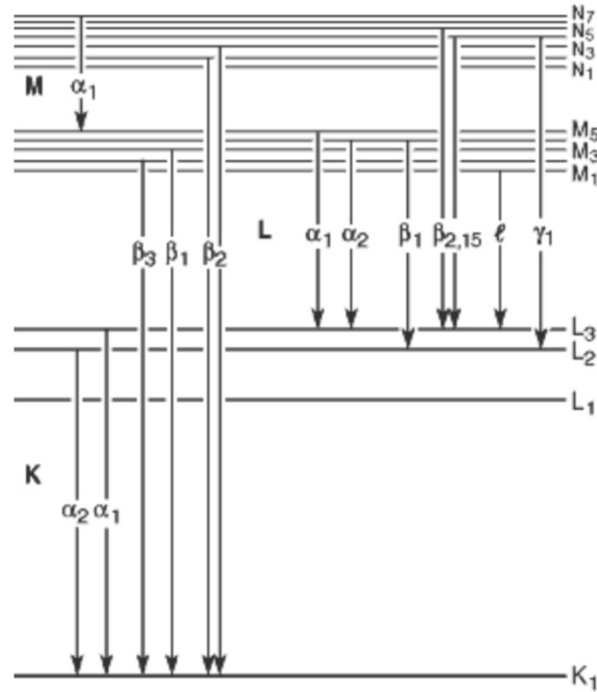


Figure 7 : Transitions électroniques donnant lieu à l'émission d'un photon X. La figure reprend la notation de Siegbahn couramment utilisée en spectroscopie d'émission X. L'IUPAC recommande cependant l'utilisation d'une nomenclature plus explicite du type (Niveau libre Niveau occupé), soit, pour la raie $K_{\alpha 1}$, la notation KL_3 et pour la raie moyenne K_{α} , la notation $KL_{2,3}$. (Thompson, et al., 2000).

2.1.4 SECTIONS EFFICACES TOTALES DE PRODUCTION X ET QUANTIFICATION

La combinaison des notions de *sections efficaces d'ionisation d'une couche K* $\sigma_K^i(E)$, de *rendement de fluorescence* ω_K , et de *poids de la raie* considérée k , permet de définir la *section efficace de production* de rayonnement X. Pour une lacune sur une couche K, on l'écrit sous la forme suivante,

$$\sigma_K^X(E) = \sigma_K^i(E) \cdot \omega_K \cdot k \quad (\text{Eq. 7})$$

A partir des notions développées dans les paragraphes précédents, on peut écrire que le nombre de photons créés N_x est tel que,

$$N_x = N_a \cdot N_p \cdot \sigma_K^X \quad (\text{Eq. 8})$$

Où N_a est le nombre d'atome par unité de surface

et N_p le nombre de particules incidentes.

Dans le cas où l'atténuation du rayonnement X émis et la variation d'énergie des particules incidentes peuvent être ignorées, comme c'est le cas pour des échantillons biologiques fins, on écrit alors que le nombre de photons X détectés est,

$$N_d = N_x \cdot T \cdot \varepsilon \cdot \Omega \quad (Eq. 9)$$

Où T est la transmission par les filtres placés devant le détecteur,

ε est l'efficacité de détection,

Ω , l'angle solide de détection.

La méthode PIXE est une méthode de quantification absolue des éléments chimiques qui ne nécessite pas le recours à un échantillon de référence de composition connue. Il est de même possible, à partir des différents modèles de description des sections efficaces, de prévoir *a priori* pour une matrice donnée, la limite de détection pour la méthode. Il a ainsi été montré (Johansson, et al., 1976) que la sensibilité de la méthode était maximale pour des éléments chimiques de numéro atomiques compris entre $20 < Z < 35$ et $75 < Z < 85$, ce qui en fait une méthode de choix, quoique de manière non exclusive, pour les applications en biologie (Llabador, et al., 1998).

2.2 SPECTROMETRIE DE RETRODIFFUSION RUTHERFORD (RBS)

La spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford est une méthode d'analyse chimique de surface qui permet de déterminer la composition et la masse surfacique d'un échantillon. Elle tire son nom du physicien néo-zélandais, Ernest Rutherford, à l'origine, dans la première décennie du XX^e siècle, d'un nouveau modèle atomique dans lequel la charge positive et l'essentiel de la masse se trouvent concentrés dans un volume réduit de l'atome, le noyau. Le principe de la méthode repose sur la mesure de l'énergie des particules incidentes après diffusion sur les noyaux des atomes de l'échantillon. Sous certaines conditions, on peut considérer que l'interaction ion-noyau est purement électrostatique et une approche mécanistique permet de relier l'énergie des particules mesurée à la masse des noyaux diffuseurs et au parcours des ions dans l'échantillon. La mise en œuvre de la méthode reprend globalement l'expérience de Geiger et Marsden en

1913 (Geiger, et al., 1913)⁴ avec un détecteur placé du même côté que la source et mesurant l'énergie des particules diffusées vers l'arrière. Le développement de l'analyse par spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford s'est néanmoins accru seulement dans les années 1960 avec l'apparition de chaînes d'acquisition électroniques et de détecteurs solides possédant des caractéristiques adéquates en termes de résolution en énergie, linéarité, temps de réponse et bande passante.

2.2.1 ANALYSE QUALITATIVE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE

Lorsque l'énergie des particules incidentes est supérieure à l'énergie de liaisons des atomes de la cible (quelques dizaines d'eV) tout en restant inférieure à la hauteur de la barrière coulombienne⁵ (quelques MeV), et si il n'y a pas de résonnance, l'interaction ion-noyau est purement électrostatique et l'énergie des particules détectées après l'interaction ne dépend que de la masse des atomes de la cible et du parcours des particules dans l'échantillon.

Dans ce cas, l'interaction peut être décrite en termes mécanistiques comme une collision purement élastique entre 2 sphères dures de masses M_1 et M_2 (Figure 8). L'application des principes de conservation de l'énergie (Eq. 10) et de la quantité de mouvement (Eq. 11) permet de calculer le rapport entre les énergies de la particule incidente avant et après l'interaction (Eq. 12). Ce rapport, appelé *facteur cinématique*, ne dépend que des masses M_1 et M_2 de la particule incidente et du noyau cible et de l'angle θ de diffusion:

$$\left. \begin{aligned} E_0 &= E_1 + E_2 \\ \frac{1}{2} M_1 v_0^2 &= \frac{1}{2} M_1 v_1^2 + \frac{1}{2} M_2 v_2^2 \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 10)$$

Où E_0 est l'énergie cinétique avant la collision de la particule incidente de masse M_1 et de vitesse v_0 ,

E_1 est l'énergie cinétique de la particule incidente après la collision,

⁴ Geiger et Mardsen ont imaginé en 1913 une expérience de rétrodiffusion des particules alphas sur une feuille mince et permis de valider le modèle atomique proposé par Rutherford suggérant l'existence d'un noyau atomique dense et chargé positivement.

⁵ La barrière de Coulomb est une barrière en énergie due aux forces de répulsion électrostatiques entre les noyaux de la cible et de l'ion incident qui doit être franchie pour entrer dans des processus de fusion nucléaire. La hauteur de cette barrière se calcule à partir de l'énergie du potentiel électrostatique créée par les charges q_1 et q_2 de l'ion incident et du noyau cible. Pour les noyaux légers, la hauteur de la barrière est de quelques MeV.

E_2 est l'énergie cinétique après la collision du noyau cible de masse M_2 et de vitesse v_2 ,

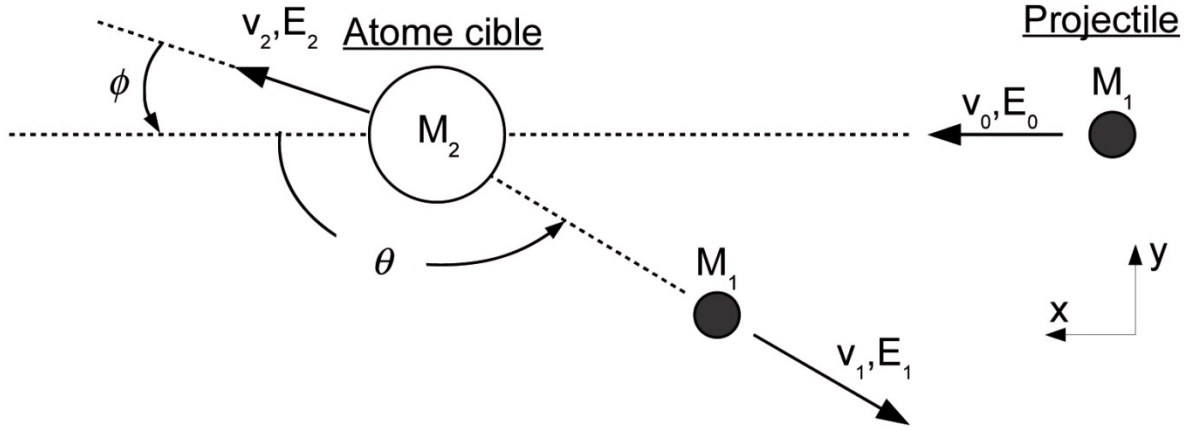


Figure 8 : Représentation de la collision élastique de 2 sphères dures. D'après (Chu, et al., 1978).

$$\left. \begin{array}{l} \overline{M_1 v_0} = \overline{M_1 v_1} + \overline{M_2 v_2} \\ \text{Projection des vecteurs quantité de mouvement sur l'axe x} \\ M_1 v_0 = M_1 v_1 \cos \theta + M_2 v_2 \cos \phi \\ \text{Projection des vecteurs quantité de mouvement sur l'axe y} \\ 0 = \frac{1}{2} M_1 v_1 \sin \theta - \frac{1}{2} M_2 v_2 \sin \phi \end{array} \right\} \quad (Eq. 11)$$

Où θ est l'angle de diffusion de la particule incidente,

ϕ est l'angle de diffusion du noyau cible.

Dans le référentiel du centre de masse, le facteur cinématique peut s'écrire de la manière simplifiée suivante

$$K_{M_2} = \frac{E_1}{E_0} = 1 - \frac{2M_1 M_2}{(M_1 + M_2)^2} (1 - \cos \theta_c) \quad (Eq. 12)$$

Où l'indice M_2 renvoie à la masse de l'atome cible,

et où θ_c est l'angle de diffusion dans le référentiel du centre de masse.

La formule précédente indique clairement que pour un angle de diffusion et un ion incident donnés, l'énergie de la particule rétrodiffusée ne dépend que de la masse

du noyau cible. Cette propriété explique la capacité de la méthode à sonder la nature des éléments chimiques de la cible. Elle permet partiellement d'interpréter qualitativement les spectres de rétrodiffusion Rutherford.

Pour un échantillon bi-atomique AB, l'identification des éléments chimiques ne peut se faire que si la différence entre leur masse ΔM se traduit par une différence en énergie ΔE après rétrodiffusion supérieure à la résolution en énergie du détecteur de particules ($\approx 12 \text{ keV}$).

D'après la relation décrivant le facteur cinématique, on peut écrire que cette différence est proportionnelle à l'écart en masse entre les noyaux :

$$\left. \begin{array}{l} E_1 = K_A E_0 \\ E_2 = K_B E_0 \end{array} \right\} \text{ donnent } \Delta E = E_0 \cdot \left(\frac{dK}{dM} \right) \Delta M \quad (\text{Eq. 13})$$

Plus la différence entre les masses des atomes de la cible est importante et plus la différence entre les énergies mesurées est importante. Ceci montre que la méthode est plus résolutive en masse pour les noyaux lourds car l'écart en masse entre des atomes de numéros atomiques voisins augmente avec Z. Pour des angles de diffusion supérieurs à 90° , la méthode n'est valide que pour les noyaux de la cible plus lourds que la particule incidente, ce qui rend l'hydrogène « invisible » pour la méthode.

Dans le cas des échantillons biologiques, on peut calculer d'après la relation précédente que pour séparer les constituants majeurs de la matrice organique, C, N et O, il faut que l'énergie incidente soit supérieure à 400 keV dans la géométrie standard du dispositif expérimental de la plateforme AIFIRA (voir section 3.5).

2.2.2 ANALYSE QUANTITATIVE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE

La mesure de l'énergie des particules rétrodiffusées nous permet de déterminer qualitativement la composition de la cible. Pour obtenir des informations quantitatives concernant la composition chimique et l'épaisseur de l'échantillon, il est nécessaire de connaître les *sections efficaces de diffusion différentielles* (Eq. 14) qui correspondent à la probabilité de diffusion des ions par unité d'angle solide et par unité de charge.

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{1}{Nt} \frac{\left(\frac{dQ}{d\Omega} \right)}{Q} \quad (\text{Eq. 14})$$

où N , est le nombre d'atomes par unité de volume,

t est l'épaisseur de l'échantillon,

Q est la charge déposée au cours de l'analyse,

Ω est l'angle solide de détection

Les sections efficaces différentielles sont définies pour un angle de diffusion et une énergie donnés. Elles sont calculées en faisant les hypothèses que l'angle solide est si petit que l'angle de diffusion θ est parfaitement connu, que l'épaisseur de l'échantillon est petite de telle sorte que l'énergie d'interaction est aussi connue, et que le nombre de particules incidentes est suffisamment important pour que la fraction des particules détectées ($dQ/d\Omega$) soit aussi parfaitement connue.

Dans la réalité, on s'intéresse toujours à la probabilité d'observer un événement dans un angle solide Ω fini, et non pas à la probabilité d'interaction par unité d'angle solide. Pour connaître cette probabilité d'observer une rétrodiffusion dans l'angle solide expérimental, il faut intégrer la section efficace différentielle sur cet angle solide,

$$\Sigma = \int_{\Omega} \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right) d\Omega \quad (Eq. 15)$$

Dans la pratique, pour calculer le nombre de particules diffusées N_d dans un angle solide donné (Eq. 18), on a introduit la notion de *section efficace différentielle moyenne* σ définie comme la moyenne de l'intégrale de la section efficace différentielle sur l'angle solide de détection Ω ,

$$\sigma = \frac{1}{\Omega} \int_{\Omega} \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right) d\Omega \quad (Eq. 16)$$

Comme pour des angles solides faibles, la *section efficace de diffusion différentielle moyenne* tend vers la *section efficace de diffusion différentielle*, et que les angles solides de détection sont souvent limités, elle est devenue la variable couramment utilisée en spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford.

$$\lim_{\Omega \rightarrow 0} \sigma = \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (Eq. 17)$$

La connaissance des sections efficaces de diffusion permet de prédire le nombre de particules détectées A pour un angle solide et un nombre de particules incidentes donnés.

$$\left. \begin{array}{l} A = \sigma \cdot \Omega \cdot Q \cdot Nt \\ \text{soit } Nt = \frac{A}{\sigma \cdot \Omega \cdot Q} \end{array} \right\} \quad (Eq. 18)$$

Lorsque l'angle solide de détection est connu, et que le nombre de particules incidentes est mesuré, la méthode permet donc de quantifier le nombre d'atomes par

unité de surface Nt , à supposer que la section efficace de diffusion différentielle soit parfaitement connue.

Pour calculer la section efficace différentielle pour une collision élastique, en plus des principes de conservation de l'énergie et de la quantité de mouvement, il est nécessaire d'appliquer un modèle décrivant l'interaction entre l'ion et le noyau pendant la collision. Dans la plupart des cas, la distance minimale ion-noyau reste bien supérieure à la dimension du noyau mais inférieure au rayon de Bohr. L'interaction est alors bien décrite par un modèle de répulsion coulombienne utilisé pour la formulation de la loi de Rutherford (Rutherford, 1911)

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_c = \left[\frac{Z_1 Z_2 e^2}{4E_c \sin^2(\frac{\theta_c}{2})} \right]^2 \quad (Eq. 19)$$

où l'indice c indique que l'on travaille dans le référentiel du centre de masse,

Z_1 et Z_2 sont les numéros atomiques, respectivement, de l'ion et de l'atome cible,

e est la charge élémentaire de l'électron,

E_c l'énergie de la particule incidente juste avant l'interaction,

θ_c , l'angle de diffusion dans le référentiel du centre de masse

Dans le cas simple d'interactions ion-noyau purement électrostatiques, la section efficace de diffusion différentielle varie comme le carré des numéros atomiques. En plus d'être plus résolutive en masse, la méthode est donc plus sensible si elle est mise en œuvre avec des ions lourds ou si la cible contient des éléments lourds. Les sections efficaces de diffusion présentent une dépendance angulaire forte, en $\sin^{-4}(\theta/2)$, qui implique que la probabilité d'interaction augmente fortement quand l'angle de diffusion diminue. Il en découle que la probabilité d'observer une diffusion des ions vers l'arrière, c'est à dire à un angle de diffusion supérieur à 90° , est marginale et que l'interaction ions-cible est avant tout un phénomène de pénétration-ralentissement-implantation. La relation précédente n'est plus valide quand θ tend vers 0, car la section efficace tend alors vers l'infini, ce qui ne correspond plus à l'hypothèse de départ selon laquelle les sections efficaces sont suffisamment petites pour que, d'un point de vue géométrique, elles ne se superposent pas.

2.2.3 PERTE D'ENERGIE LINEAIRE ET POUVOIR D'ARRET

Les phénomènes de dissipation en énergie qui prédominent lors de la pénétration des ions dans la cible sont les interactions des ions avec les nuages

électroniques et la diffusion aux petits angles sur les noyaux. Ces phénomènes sont pris en compte par l'introduction des concepts de *perte d'énergie linéaire*, dE/dx , et de *pouvoir d'arrêt*, ε ,

$$\lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{\Delta E}{\Delta x} = \frac{dE}{dx}(E) \quad (Eq. 20)$$

Où E est l'énergie de la particule incidente.

$$\varepsilon = \frac{1}{N} \left(\frac{dE}{dx} \right) \quad (Eq. 21)$$

Où N est la densité atomique (at/cm³).

La perte d'énergie linéaire se mesure facilement à partir d'une feuille mince d'un échantillon de composition connue en faisant la différence entre l'énergie des particules incidentes et l'énergie des particules transmises et en divisant par l'épaisseur de la couche mince. Elle présente néanmoins l'inconvénient de dépendre de la densité de l'échantillon. Si on prend l'exemple de 2 échantillons de masses surfaciques identiques mais de densités différentes, la perte d'énergie linéaire sera plus importante pour l'échantillon plus dense puisque l'énergie sera perdue sur une distance plus courte. En considérant que les interactions multiples que subissent les ions incidents le long de leur parcours sont indépendantes les unes des autres, on introduit la notion de *pouvoir d'arrêt*, comme étant la moyenne de la perte d'énergie linéaire par atome de la cible. Deux échantillons de masses surfaciques identiques possèdent donc un pouvoir d'arrêt identique.

2.2.4 FORMES DES SPECTRES DE RETRODIFFUSION RUTHERFORD

La Figure 9 reprend les notions développées précédemment pour illustrer la forme des spectres de rétrodiffusion. Pour un échantillon poly-atomique, le spectre de rétrodiffusion présente un pic pour chaque élément dont la position en énergie dépend du *facteur cinématique*. L'énergie maximale détectée pour chaque élément, $K_X \cdot E_0$, correspondant en effet à la diffusion des particules incidentes sur les noyaux des atomes de surface.

$$E_{\max} = E_{\text{Surface}} = K_X \cdot E_0 \quad (Eq. 22)$$

Quand la rétrodiffusion a lieu sur un noyau situé en profondeur, l'énergie détectée dépend de la *perte d'énergie* de l'ion avant la collision ΔE_1 , du transfert d'énergie pendant l'interaction $(1 - K_X)E_0$ et de la perte d'énergie sur le parcours de retour ΔE_2 . L'énergie minimale détectée dépend donc de l'épaisseur de l'échantillon et peut être exprimée en termes de masse surfacique (g.cm⁻²).

$$E_{prof} = K_X(E_0 - \Delta E_1) - \Delta E_2 \quad (Eq. 23)$$

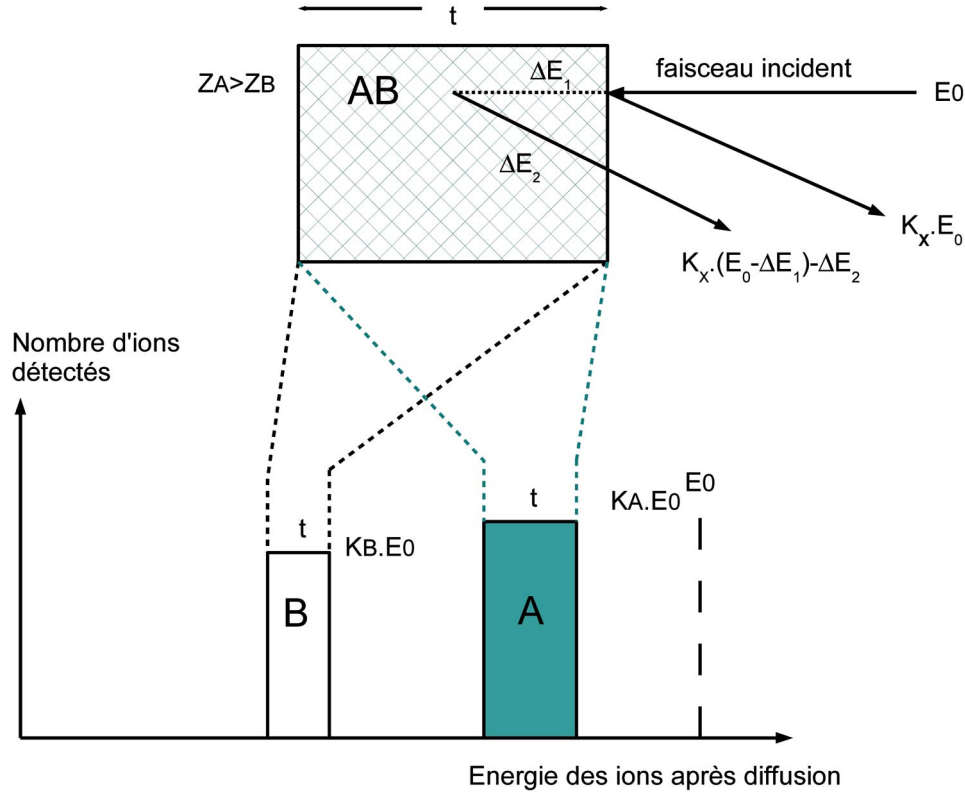


Figure 9 : Interprétation qualitative des spectres de rétrodiffusion pour un échantillon bi-atomique de composition AB et d'épaisseur t.

2.2.5 ECARTS PAR RAPPORT A LA FORMULATION DE RUTHERFORD

Quand l'angle de diffusion tend vers 0, la section efficace tend vers l'infini et l'hypothèse de départ selon laquelle les sections efficaces sont suffisamment petites pour être considérées comme indépendantes les unes des autres n'est plus valide. La diffusion aux petits angles correspond à des interactions entre l'ion et le noyau à des distances bien supérieures au rayon nucléaire. A ces distances, les interactions électrostatiques répulsives sont très faibles et la section efficace ne suit plus la loi de Rutherford en $Z_1 Z_2 e^2$ (voir Eq. 19). De même, la diffusion d'un ion léger sur un atome lourd ne peut pas être décrite sans faire intervenir un potentiel supplémentaire correspondant à l'écrantage partiel de la charge nucléaire.

Les plus grands écarts avec la théorie apparaissent néanmoins lorsque l'énergie incidente est suffisante pour que la distance minimale entre l'ion et le noyau soit du même ordre de grandeur que la taille du noyau (Trocellier, et al., 2000). Dans ce cas précis, les forces nucléaires commencent à influencer le processus de diffusion. L'interaction peut être inélastique et l'énergie des particules diffusées s'écarter de la

valeur $K_X E_0$. Des écarts par rapport à la formulation de Rutherford sont aussi observés même lorsque la diffusion reste élastique, avec une dépendance forte des sections efficaces de diffusion en fonction de l'énergie incidente, de l'angle de diffusion et de la nature des noyaux cibles. Etant donné que la hauteur de la barrière coulombienne est une fonction de la charge du noyau, ces écarts par rapport à la formulation de Rutherford sont néanmoins surtout prépondérants pour les noyaux légers. C'est le cas en particulier pour la diffusion des protons sur les noyaux de carbone, d'azote et d'oxygène, les constituants majeurs des matrices biologiques, pour lesquels les écarts à la formulation de Rutherford peuvent atteindre un facteur 7 (Razafindrabe, 1995). Dans le cas de l'interaction des protons de quelques MeV avec les atomes de carbone, d'azote et d'oxygène, comme ces écarts se font dans le sens d'une augmentation de la probabilité de diffusion, il est possible d'utiliser la méthode RBS pour mesurer la composition chimique et l'épaisseur des échantillons biologiques à partir d'un faisceau de protons.

2.2.6 AVANTAGES ET LIMITES DE LA SPECTROMETRIE DE DIFFUSION RUTHERFORD

Il n'est pas toujours aisé de définir les limites de la méthode tant elles sont conditionnées à la nature de l'échantillon, sa préparation, son état de surface. La méthode présente néanmoins de nombreux avantages comme d'être multi-élémentaire, de donner accès à des profils de concentration en profondeur (mise en évidence de structures multicouches), d'avoir une spécificité isotopique, et de pouvoir être mise en œuvre en parallèle avec les autres méthodes d'analyse par faisceau d'ions, NRA, ERDA, ou PIXE.

La spectrométrie RBS est une méthode quantitative ayant une sensibilité qui dépend du type d'échantillon analysé mais qui peut descendre jusqu'à des valeurs d'épaisseur équivalentes à quelques couches atomiques. En revanche, la méthode RBS, qui n'est basée que sur des phénomènes nucléaires, ne peut apporter aucune information sur la nature des liaisons chimiques entre éléments.

2.3 MICROSCOPIE IONIQUE EN TRANSMISSION ET A BALAYAGE (STIM)

La microscopie ionique en transmission et à balayage est une méthode d'imagerie densitométrique par faisceaux d'ions basée sur la mesure de la variation locale de la densité électronique de l'échantillon. La méthode a été développée au cours des années 1980 en même temps que les premiers microfaisceaux d'ions voyaient le jour (Overley, et al., 1983) (Lefevre, et al., 1983). Son principe repose sur la mesure de la *perte d'énergie* des particules transmises (Chu, et al., 1978). Selon le type et l'énergie des particules incidentes utilisées, la méthode permet d'analyser des échantillons dans une gamme d'épaisseur allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de micromètres. Ne nécessitant que l'emploi de faisceaux de très faible intensité, inférieure au femto-ampère, la méthode peut être mise en œuvre dans les conditions expérimentales offrant la meilleure résolution spatiale (<100 nm). Les images étant par ailleurs obtenues assez rapidement, la méthode a permis le développement de la tomographie par faisceau d'ion, STIM-3D (Bench, et al., 1992).

2.3.1 PERTES D'ENERGIE DES IONS DANS LA MATIERE

Au début des années 1910, Bohr, qui vient de compléter le modèle planétaire de l'atome défini par Rutherford, en proposant que les électrons soient situés dans des couches électroniques d'énergie quantifiée, cherche à savoir comment une charge ponctuelle peut transférer une partie de son énergie à ce « nouvel » atome. Le premier modèle d'interaction qu'il développe est construit sur l'hypothèse que les interactions du couple ion-atome (électron ou noyau) peuvent être décrites comme des interactions purement électrostatiques entre deux charges ponctuelles, isolées, sans perturbation de la particule incidente et sans déplacement de l'électron (Figure 10, gauche). Etant donnée l'abondance relativement plus importante des électrons, il propose de séparer les contributions nucléaires et électroniques, ces dernières étant plus probables, et considère l'atome avant tout comme un plasma d'électrons.

Dans ce cas simplifié, on peut calculer que la force électrostatique qui s'exerce sur la particule incidente est, dans la direction perpendiculaire à son déplacement, de la forme suivante,

$$\left. \begin{aligned} F_{\perp} &= F \cos \theta = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Z_1 e^2 b}{r^2} \frac{1}{r} \\ \text{ou} \quad F_{\perp} &= \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Z_1 e^2 b}{r^3} \end{aligned} \right\} \text{ (Eq. 24) d'après (Bourgeois, 1998)}$$

Où ϵ_0 est la permittivité du vide,

Z_1 est le numéro atomique de la particule incidente,

e est la charge de l'électron,

r est la distance entre la particule incidente et le noyau cible,

b est le paramètre d'impact de l'interaction correspondant à la distance d'approche entre les 2 charges.

L'énergie transmise à l'électron peut alors s'écrire sous la forme suivante,

$$P_{\perp} = \int_{-\infty}^{+\infty} F_{\perp} dt = \int_{-\infty}^{+\infty} F_{\perp} \frac{dx}{v} = -\frac{1}{2\pi\epsilon_0} \left(\frac{Z_1 e^2}{bv_1} \right) \quad (\text{Eq. 25})$$

Où v_1 est la vitesse de la particule incidente.

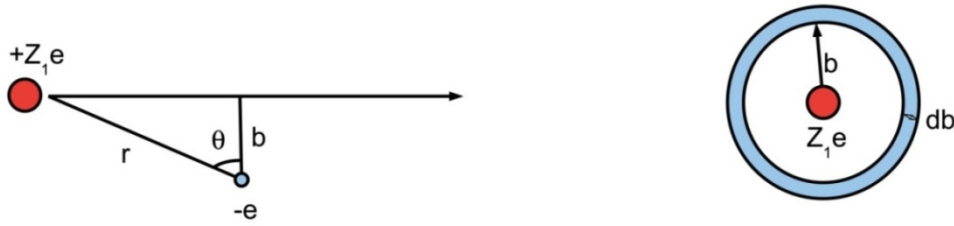


Figure 10 Gauche : Schéma de principe de l'interaction électrostatique entre une particule complètement ionisée de charge $+Z_1e+Ze$ et un électron. Le paramètre d'impact b correspond à distance entre la trajectoire de la particule et la droite parallèle à la trajectoire passant par le noyau cible. *Droite* : Vue dans l'axe de la trajectoire de la particule, la probabilité d'interaction avec un électron situé à une distance b de la particule.

Dans une approche non relativiste, la quantité d'énergie transférée à l'électron est donc,

$$\left. \begin{aligned} E_{\perp} &= \frac{P_{\perp}^2}{2m_e} \\ \text{soit } E_{\perp} &= \frac{1}{m_e} \frac{1}{8\pi^2\epsilon_0^2} \left(\frac{Z_1 e^2}{bv_1} \right)^2 \end{aligned} \right\} \quad (\text{Eq. 26})$$

Si on considère que la densité électronique est uniforme dans l'espace, on peut évaluer la perte d'énergie (Eq. 30) à partir du nombre d'interactions ion-électrons dn_i donné par la probabilité p_e qu'un électron se situe sur un cercle de rayon b autour de la trace de la particule (Eq. 28) (Figure 10, droite).

Le nombre d'interactions dn_i induisant une perte d'énergie $E_{\perp}$ peut en effet s'écrire en fonction de la densité électronique N_e ,

$$N_e = N \cdot Z_2 \quad (Eq. 27)$$

Où N est la densité atomique (at/cm³),

et Z_2 , le numéro atomique de la cible.

$$\left. \begin{aligned} dn_i &= N_e \cdot p_e \\ dn_i &= NZ_2 dx \cdot 2\pi b db \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 28)$$

Où dx est l'épaisseur de l'échantillon.

$$\left. \begin{aligned} \text{soit } dE &= E_{\perp} \cdot dn_i \\ dE &= NZ_2 \cdot \frac{1}{4\pi\epsilon_0^2} \frac{(Z_1 e^2)^2}{m_e v_1^2} \left(\frac{db}{b}\right) \cdot dx \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 29)$$

Soit la perte d'énergie électronique,

$$\left. \frac{dE}{dx} \right|_e = \int_{b_{min}}^{b_{max}} dE = \frac{N}{4\pi\epsilon_0^2} \frac{Z_2 Z_1^2 e^4}{m_e v_1^2} \cdot \ln\left(\frac{b_{max}}{b_{min}}\right) \quad (Eq. 30)$$

Il faut limiter l'intégration ci dessus pour éviter qu'elle ne diverge. Les limites b_{min} et b_{max} sont déterminées respectivement en considérant l'énergie maximale transmise (Eq. 31) et l'énergie minimale transmise à l'électron (Eq. 32).

$$\left. \begin{aligned} M_1 &\gg m_e \text{ donne } \Delta v_{max} = 2v \\ \text{et } E_{\perp max} &= m_e (2v_1)^2 \\ \text{soit } b_{min} &= \frac{Z_1 e^2}{4\pi\epsilon_0 m_e v_1^2} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 31)$$

L'énergie minimum transmise doit correspondre à un passage vers un niveau excité d'énergie quantifiée. En considérant l'énergie minimale moyenne d'ionisation I , on écrit que

$$E_{\perp min} = I \text{ donne } b_{max} = \frac{Z_1 e^2}{2\pi\epsilon_0 \sqrt{2m_e v_1^2} I} \quad (Eq. 32)$$

D'où la définition du *nombre d'arrêt* L

$$L = \ln\left(\frac{b_{max}}{b_{min}}\right) = \ln\left(\frac{2m_e v_1^2}{I}\right) \quad (Eq. 33)$$

Le modèle de perte d'énergie de Bohr reproduit bien les données expérimentales pour des particules lourdes ($Z \geq 2$), mais n'est plus valable pour des

particules plus légères comme les protons. Elle contient néanmoins les propriétés essentielles du phénomène de perte d'énergie comme le lien entre la perte d'énergie et la vitesse des particules (et non leur énergie) et le fait que la perte varie en Z^2 et est fonction de la densité électronique de la cible.

Le modèle est valide dès lors que la vitesse des particules est très supérieure à la vitesse des électrons mais sa portée est limitée du fait des hypothèses initialement formulées⁶. En effet, le modèle ne prend pas en compte l'effet de la polarisation du milieu par la particule incidente, ne considère pas la taille finie de la particule incidente par rapport au plasma d'électrons, ne permet pas de calculer la diffusion coulombienne sur les noyaux dont la charge est partiellement écrantée, n'introduit aucune correction relativiste et suppose que la particule incidente est complètement dépourvue de ses électrons, ce qui n'est plus valide lorsque la vitesse des particules est faible.

Une avancée majeure dans l'étude des interactions des particules chargées avec la matière a été obtenue par Bethe (Bethe, 1930) et Bloch (Bloch, 1933) en reconsidérant le problème de la perte d'énergie à partir de la mécanique quantique relativiste.

$$\left. \begin{aligned} -\frac{dE}{dx} &\propto \frac{Z_1^2 Z_2}{\beta^2 A_2} \left[\ln \left(\frac{2m_e c^2 \beta^2 \gamma^2}{I} \right) - \beta^2 - \frac{\delta}{2} \right] \\ \text{où } \beta &= \frac{v}{c} \text{ et } \gamma = \frac{1}{\sqrt{1 - v^2}} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 34)$$

Où les indices 1 et 2 renvoient respectivement à la particule incidente et à l'atome cible,

et où Z est le numéro atomique,

A est le nombre de masse,

c est la vitesse de la lumière,

I est l'énergie minimale moyenne d'ionisation,

m_e est la masse de l'électron au repos,

δ est un facteur de correction de densité de charge.

⁶ L'atome est considéré comme un plasma d'électrons, et l'ion incident est complètement ionisé

La formulation de Bethe-Bloch (Eq. 34) met en évidence que la perte d'énergie dépend du rapport Z_1^2/β^2 , soit une perte d'énergie 4 fois plus importante pour des particules α que pour des protons à vitesse équivalente. Elle introduit une correction de densité de charge δ pour tenir compte de la polarisation des atomes par la particule incidente qui réduit l'effet du champ électrique sur les électrons les plus éloignés. Le phénomène de polarisation est d'autant plus important que l'énergie des particules ou que la densité électronique augmentent.

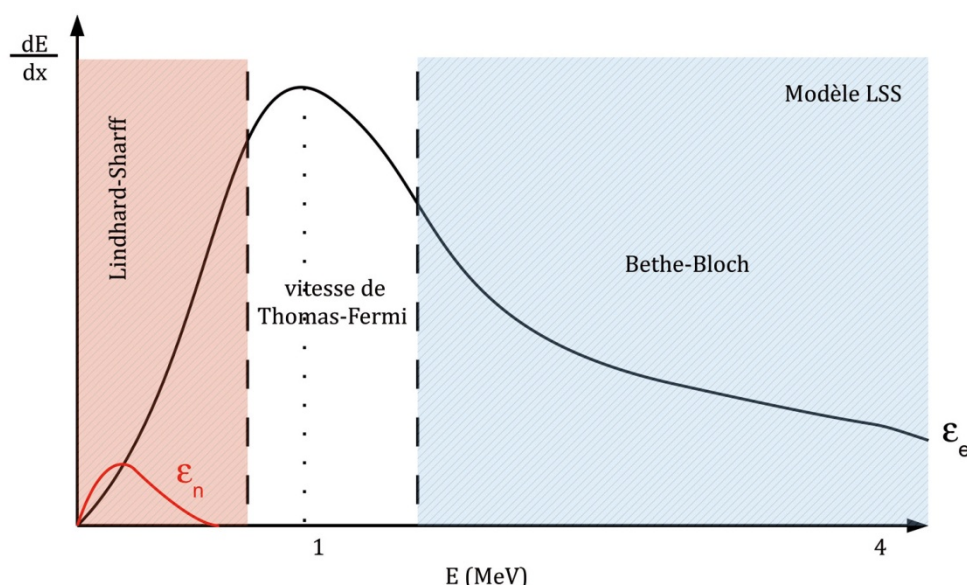


Figure 11 : Variation de la perte d'énergie linéaire en fonction de l'énergie de la particule incidente indiquant les domaines de validité pour les différents modèles de description développés par Lindhard-Scharff (Lindhard, et al., 1953) et Firsov (Firsov, 1959) à basse énergie et Bethe-Bloch à haute énergie. Le modèle LSS, Lindhard-Scharff-Schiott (Lindhard, et al., 1963), est le premier modèle dont la validité englobe tout le domaine spectral et tous les types d'ions incidents. A noter que le maximum correspondant à la vitesse de Thomas-Fermi correspond environ à une énergie de 0.5 à 1 MeV. La séparation des phénomènes de perte d'énergie d'origine nucléaire, ϵ_n , (rouge) et électronique, ϵ_e , (noir) a été suggérée par Bohr et leur contribution relative qualitativement déterminées par l'analyse de l'abondance relative des électrons et des noyaux dans la matière. L'échelle des énergies en abscisse est indicative et ne comporte volontairement pas de graduation.

Sans pouvoir calculer exactement le potentiel d'excitation moyen, Bethe et Bloch ont montré que I était proportionnel au numéro atomique de l'atome-cible (Eq. 35),

$$I = KZ_2 \quad (\text{Eq. 35})$$

avec K la constante de Bloch valant environ 10 eV.

Le modèle de Bethe-Bloch est précis à quelques pourcents pour des particules ayant une énergie entre le MeV (Figure 11) et jusqu'à quelques centaines de GeV. A mesure que l'énergie des particules diminue, la probabilité de capture d'un électron par la particule incidente augmente et la formulation n'est plus valide, comme dans le modèle de Bohr, car les particules incidentes sont considérées par hypothèse comme complètement ionisées.

Quand l'énergie des particules diminue, la probabilité de capture d'un électron par la particule incidente augmente et la charge effective de la particule diminue. Les électrons de cœur jouent un rôle décroissant dans le processus de ralentissement, et la courbe de perte d'énergie augmente moins rapidement jusqu'à un maximum correspondant à la vitesse de « Thomas-Fermi »⁷.

Les corrections apportées par Lindhard et Scharff (Lindhard, et al., 1953) et indépendamment par Firsov (Firsov, 1959), incluant les effets de la polarisation, permettent de rendre compte du transfert d'énergie au plasma quantique lorsque la vitesse des particules est faible ainsi que du transfert d'énergie vers les noyaux. Quand l'énergie des particules diminue encore, la probabilité de neutralisation des particules incidentes augmente fortement et la perte d'énergie électronique devient proportionnelle à la vitesse des particules. Pour des énergies proches de 0, les transferts d'énergie entre les noyaux de la particule incidente et de l'atome-cible deviennent prépondérants, il y a échanges de charges entre la particule incidente et l'atome, c'est le domaine des pertes d'énergie nucléaires.

Au début des années 1960, Lindhard, Scharff et Schiott (Lindhard, et al., 1963) développent le modèle LSS permettant de décrire les interactions ions-matière quelles que soient l'énergie et la nature de la particule incidente. Basé sur une description statistique de l'atome de Thomas-Fermi⁸, le modèle est plus précis pour des atomes lourds possédant beaucoup d'électrons. Il sera amélioré dans les décennies suivantes grâce d'une part, aux méthodes numériques permettant de décrire les atomes au moyen de fonctions d'onde plus réalistes de type Hartree-Fock, et d'autre part grâce à la redéfinition du critère permettant de déterminer la charge de l'ion incident. Bohr avait en effet suggéré que l'ion perde ceux de ses électrons ayant une vitesse instantanée plus faible que sa vitesse, mais Brandt *et al* (Brandt, et al., 1982) ont montré que le

⁷ La vitesse de Thomas-Fermi correspond à $Z_1^{\frac{2}{3}} \cdot v_0$ où $v_0 = \frac{e^2}{\hbar}$ est la vitesse de Fermi

⁸ Jusqu'au développement des méthodes numériques dans les années 1970, l'atome est considéré selon le modèle de Thomas-Fermi, qui permet de calculer statistiquement la densité électronique et l'énergie du niveau fondamental, et par conséquent d'éviter d'avoir à résoudre l'équation de Schrödinger, ce qui s'avère indispensable dans les cas où le nombre d'électrons est très grand.

modèle s'avérerait plus précis en prenant plutôt comme référence la vitesse relative des électrons par rapport à la vitesse de Fermi, $v_0 = e^2/\hbar$.

2.3.2 PRINCIPE DE L'IMAGERIE STIM

Le principe de l'imagerie STIM repose sur la mesure de la variation locale de l'énergie des particules transmises à travers un échantillon. Pour être mise en œuvre, il faut que les particules incidentes aient une vitesse suffisante pour traverser l'échantillon. Dans la mesure où l'échantillon est donné, et qu'il existe une gamme d'énergie accessible et un type de particules incidentes restreint, cela signifie qu'il existe une épaisseur limite analysable pour un échantillon. Cette limite, on l'a vu, dépend de la nature et de la vitesse de la particule incidente ainsi que du rapport Z/A moyen de l'échantillon, et décroît pour des ions incidents lourds ou pour un échantillon possédant un rapport Z/A grand. Les deux paramètres importants de la méthode sont la résolution spatiale du faisceau, qui définit la taille minimale des structures visibles de l'échantillon, et la résolution en énergie du spectre qui définit le contraste de l'image.

Le montage expérimental d'une analyse STIM se compose d'un système de focalisation des ions, d'un système de balayage électrostatique et d'un détecteur à dispersion en énergie placé dans l'axe optique derrière l'échantillon (Figure 12).

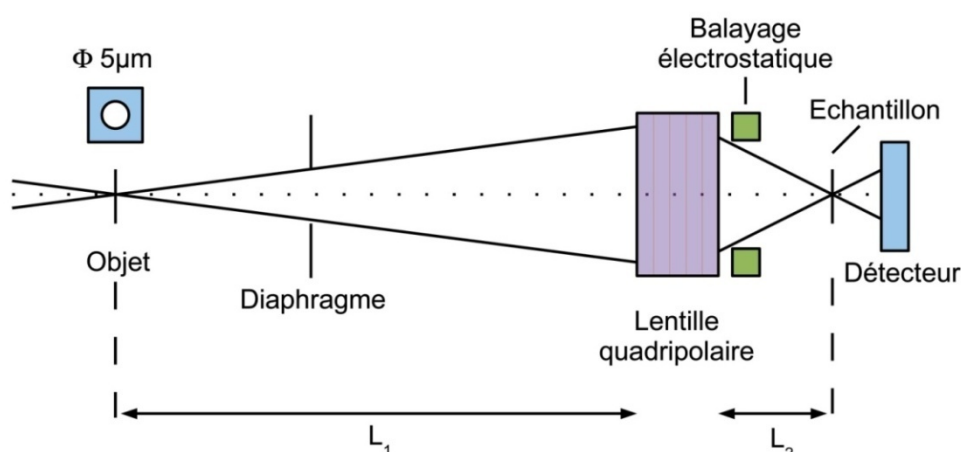


Figure 12 : Dispositif expérimental type d'une analyse STIM comprenant un système de focalisation (lentille quadripolaire), un système de balayage électrostatique et un détecteur à dispersion en énergie placé dans l'axe optique, derrière l'échantillon. La taille du faisceau sur la cible dépend de la taille de l'objet placé en entrée (ici un collimateur de $5\mu\text{m}$ de diamètre) et des distances objet-lentille (L_1) et lentille-cible (L_2).

On peut considérer, (voir chapitre 3 Dispositif expérimental), que la taille du faisceau sur la cible est, au premier ordre, directement proportionnelle à la taille de l'objet placé à l'entrée de la ligne. En conséquence, pour obtenir un faisceau très petit sur la surface de l'échantillon, il suffit de diminuer la taille de l'objet, avec dans ce cas idéal, pour seule limite de résolution spatiale la brillance de la source. C'est ce principe qui est exploité dans la mise en œuvre de la méthode STIM, et qui permet de réaliser des images avec une résolution spatiale d'environ un ordre de grandeur plus faible qu'en conditions d'analyse PIXE-RBS.

La conséquence de la diminution de la taille de l'objet est la diminution du courant de particules sur la cible. Dans des conditions standard de mesure, le courant sur la cible est inférieur au femto-ampère (10^{-15}A). L'analyse STIM reste cependant possible car, contrairement aux méthodes d'analyse PIXE et RBS pour lesquelles les sections efficaces d'interactions sont faibles, on peut considérer ici que la totalité des particules transmises est détectée. Du fait de la fragilité des détecteurs semi-conducteurs utilisés pour l'analyse STIM, qui possèdent une limite intrinsèque en termes de flux de particules incidentes (quelques 10^3 particules / seconde) à partir de laquelle le détecteur est endommagé, la diminution du courant incident n'est en soi pas un problème pour l'analyse STIM.

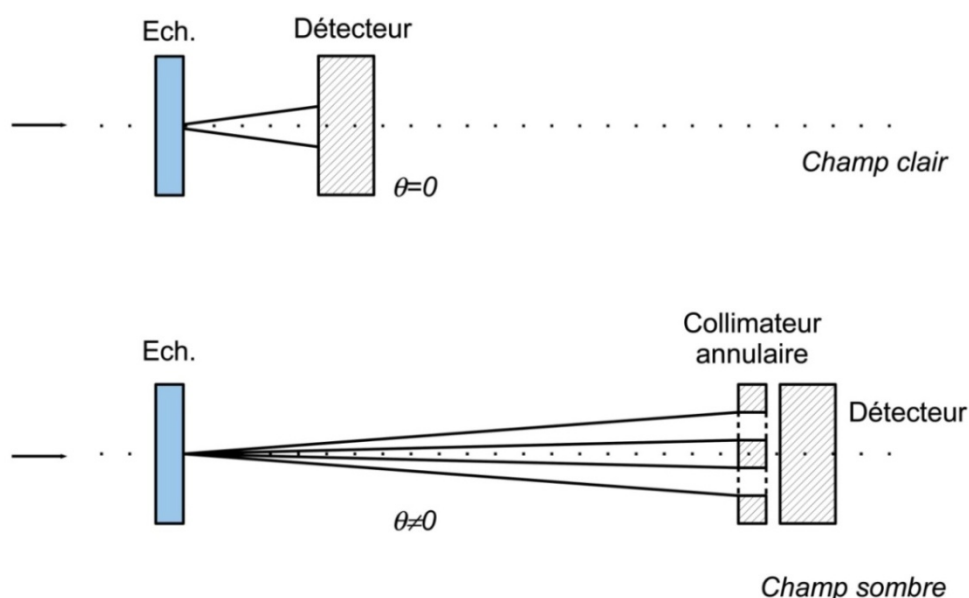


Figure 13 : Montages expérimentaux pour l'imagerie STIM en champ clair (haut) et champ sombre (bas). En champ clair, la totalité des particules transmises est détectée, tandis qu'en imagerie en champ sombre, seules sont détectées les particules diffusées selon un angle sélectionné par le collimateur annulaire placé devant le détecteur.

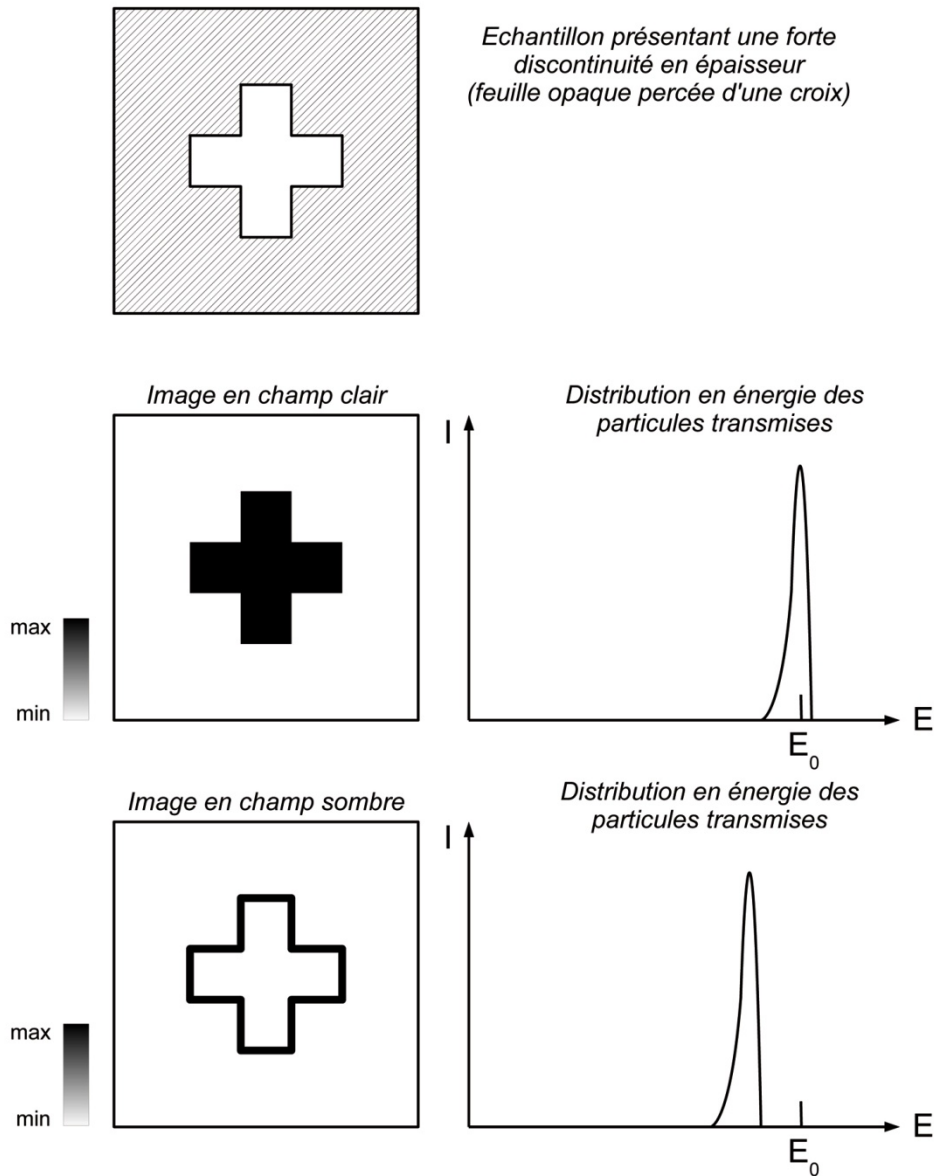


Figure 14 : Comparaison des images en champ clair et champ sombre sur un échantillon présentant une forte discontinuité en épaisseur. Le montage en champ sombre correspond à une sélection en épaisseur de certaines zones de l'échantillon, ici la zone de discontinuité. Les images sont obtenues en sélectionnant la totalité du spectre en énergie et représentent donc la variation d'intensité du faisceau transmis en fonction de la position du faisceau.

Comme en microscopie classique, on distingue deux modes d'acquisition des images en STIM (Sealock, et al., 1987), l'imagerie en *champ clair* et l'imagerie en *champ sombre* (Figure 13). Dans le mode de contraste en champ clair, le détecteur de particules est placé derrière l'échantillon et collecte les particules transmises avec une efficacité proche de 100%. La dépendance de l'intensité de détection en fonction de l'énergie transmise est faible si on reste dans le cas où le parcours des particules incidentes est très supérieur à l'épaisseur de l'échantillon. Lorsque l'épaisseur de l'échantillon augmente, l'efficacité de détection diminue parce que la proportion de particules

diffusées en dehors de l'angle d'ouverture du détecteur augmente mais reste néanmoins suffisamment importante pour obtenir une image de l'échantillon en quelques minutes.

Dans le mode de contraste en champ sombre (Figure 13), un collimateur annulaire est placé devant le détecteur dont la position par rapport à l'échantillon est ajustée pour sélectionner un angle de diffusion des particules transmises. L'efficacité de détection atteint un optimum pour des épaisseurs de l'échantillon conduisant à un phénomène de diffusion multiple à un angle compatible avec l'ouverture angulaire du collimateur⁹. Au delà d'une certaine épaisseur, comme pour les épaisseurs proches de 0, l'efficacité de détection tend vers 0. Le montage en champ sombre correspond donc à la sélection des zones de l'échantillon en fonction de leur épaisseur.

Dans le cas d'un échantillon homogène en épaisseur mais présentant de fortes discontinuités, comme dans l'exemple ci dessus (Figure 14), on constate que l'information véhiculée par les particules transmises, dans le cas du montage en champ clair, est redondante, là où le montage en champ sombre met l'accent sur la zone de discontinuité.

2.3.3 FORMATION DES IMAGES

La façon la plus simple de traiter les images STIM est de réaliser, à partir du spectre en champ clair, un seuillage sur le spectre en énergie des particules transmises et de représenter la variation de l'intensité du signal transmis en fonction de la position du faisceau, comme dans le cas précédent (Figure 14). Dans le cas d'un échantillon présentant une variation continue en épaisseur (Figure 15), le contraste des images reconstruites est faible car l'efficacité de détection, ou l'intensité du signal transmis, n'est affectée que par les phénomènes minoritaires d'interactions multiples se traduisant par une diffusion aux grands angles des particules incidentes en dehors du cône de détection. On peut certes obtenir une idée plus précise de la nature de l'échantillon en ne prenant en compte qu'une partie du spectre en énergie, mais l'image de l'échantillon ainsi reconstruite est alors incomplète (Figure 15 centre). La sélection en énergie du spectre permet néanmoins d'obtenir des résultats équivalents à la mesure en champ sombre.

⁹ Dans cette configuration, la diffusion des particules incidentes est aussi partiellement due aux interactions avec les noyaux des atomes de la cible.

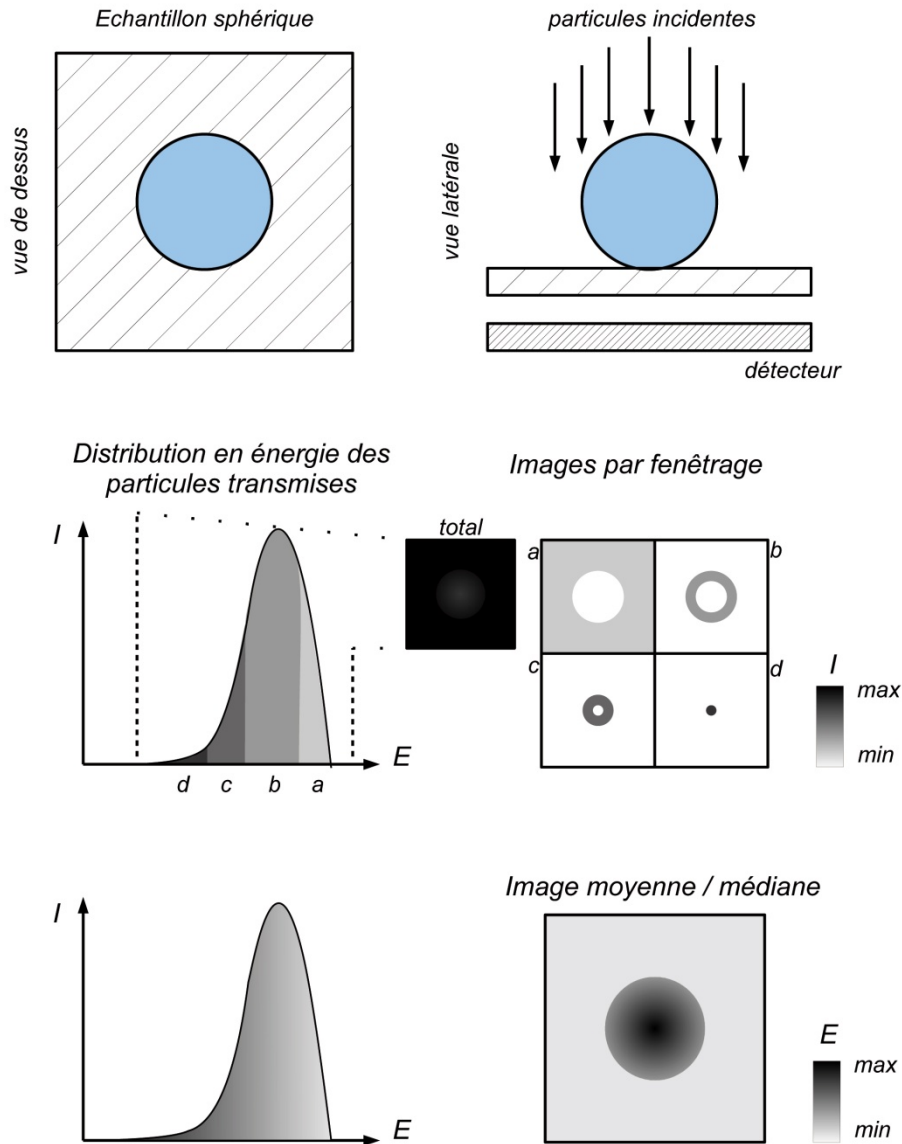


Figure 15: Principe de formation des images STIM dans le cas d'un échantillon présentant une distribution continue en épaisseur. L'imagerie par seuillage, qui correspond à l'image de la variation d'intensité du signal transmis, est un type d'image à faible contraste (milieu). En comparaison, les images de la variation de l'énergie transmise (bas), énergie moyenne ou énergie médiane, permettent d'augmenter sensiblement le contraste de l'image.

Pour améliorer le contraste des images, une solution consiste à reconstruire des images de la variation locale de l'énergie des particules transmises (Figure 15, bas). Etant donné que la perte d'énergie est un phénomène statistique, l'énergie mesurée en chaque pixel présente une distribution gaussienne centrée sur une valeur d'énergie proportionnelle à l'épaisseur traversée. On peut choisir de représenter cette distribution en énergie en calculant les énergies *moyenne* ou *médiane* correspondantes. Le calcul de l'énergie médiane transmise pour chaque pixel est évidemment plus long car les données doivent être triées au préalable, mais la valeur est plus robuste et peu sensible

au bruit. L'imagerie de l'énergie médiane permet par conséquent de travailler à partir de spectres à faible statistique et donc de réduire le temps d'acquisition. Dans la mesure du possible, il sera donc toujours préférable de la mettre en œuvre au dépend de l'imagerie de l'énergie moyenne. Le contraste des images en énergie est limité par la résolution en énergie du détecteur et par *la dispersion en énergie* des particules incidentes traduisant le fait que le transfert d'énergie est un phénomène statistique.

$$\left. \begin{array}{l} \delta_{dn_i} = \sqrt{dn_i} \\ \text{avec } dn_i = NZ_2 dx \cdot 2\pi b db \end{array} \right\} \text{ (Eq. 36)}$$

Si l'on considère que le nombre d'interactions dn_i subies par la particule incidente suit une loi de Poisson, alors l'écart type de la distribution donnant lieu à une perte d'énergie peut s'écrire de la manière suivante,

$$\left. \begin{array}{l} \text{soit } \delta_{dE} = E_{\perp} \cdot \delta_{dn_i} \\ \text{et } \delta_{dE}^2 = E_{\perp}^2 \cdot dn_i \\ \delta_{dE}^2 = 2\pi \cdot NZ_2 \Delta x \int_{b_{min}}^{b_{max}} E_{\perp}^2 b db \\ \delta_{dE}^2 = 2\pi \cdot NZ_2 \Delta x \frac{(Z_1 e^2)^2}{m_e v_1^2} (E_{max} - E_{min}) \end{array} \right\} \text{ (Eq. 37) d'après (Chu, et al., 1978)}$$

Où E_{max} et E_{min} correspondent aux transferts d'énergie pour des facteurs d'impact respectivement b_{min} et b_{max} . Comme le transfert maximal d'énergie vers l'électron, $2m_e v_1^2$, est très supérieur au transfert minimum, $E_{min} \ll E_{max}$, on peut écrire que les fluctuations statistiques de l'énergie des particules transmises est de la forme,

$$\delta_{dE}^2 = 4\pi \cdot NZ_2 \Delta x \cdot (Z_1 e^2)^2 \text{ (Eq. 38)}$$

La relation précédente montre d'une part que l'élargissement du pic est proportionnel à l'épaisseur traversée (Δx) et indépendante de la vitesse des particules incidentes, et d'autre part, que la distribution en énergie autour de la valeur moyenne est symétrique. Dans le cas des particules alpha, l'ordre de grandeur de la fluctuation en énergie des particules transmises est d'environ 5% de la perte d'énergie moyenne.

2.3.4 ANALYSE QUANTITATIVE. REGLE D'ADDITIVITE DES POUVOIRS D'ARRÊT

La mesure du pouvoir d'arrêt d'un matériau à partir d'un faisceau de particules mono-énergétiques est une expérience relativement simple, ce qui explique que les pouvoirs d'arrêt sont des caractéristiques des matériaux depuis longtemps bien connues (Ziegler, 1996). Il en découle que la mesure de la perte d'énergie d'un faisceau de particules transmises à travers l'échantillon donne facilement accès à la masse surfacique $\rho \cdot dx$ du matériau, selon la relation suivante :

$$\left. \begin{aligned} \varepsilon &= \frac{1}{N} \left(\frac{dE}{dx} \right) \\ N &= \frac{1}{\varepsilon} \left(\frac{dE}{dx} \right) \\ \text{et finalement,} \\ \rho \cdot dx &= \frac{M}{N} \left(\frac{dE}{\varepsilon} \right) \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 39)$$

Où ε est le pouvoir d'arrêt, M est la masse molaire de l'élément considéré et N , le nombre d'Avogadro.

Dans le cas d'un matériau poly-atomique, on peut utiliser la règle d'additivité des pouvoirs d'arrêt ou règle de Bragg. En effet, du fait que le phénomène de transfert d'énergie est un phénomène aléatoire, la description de l'interaction totale ion-électrons peut être considérée comme la somme d'interactions *indépendantes* pour lesquelles on introduit une énergie moyenne d'excitation. De ce principe découle la règle d'additivité des pouvoirs d'arrêt stipulant que le pouvoir d'arrêt d'un matériau poly-atomique se calcule en sommant les pouvoirs d'arrêt des éléments qui le composent pondérés par leur abondance.

$$\varepsilon^{AmBn} = m\varepsilon^A + n\varepsilon^B \quad (Eq. 40)$$

Pour un élément donné, la quantité d'énergie échangée pendant l'interaction ne dépend que de la vitesse de la particule incidente, et ce, indépendamment de son environnement chimique.

3 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Les expériences présentées ici ont été réalisées sur la plateforme d'analyse par faisceaux d'ions AIFIRA (Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine), une plateforme multidisciplinaire en partie financée par l'IN2P3 via le CENBG, par l'institut de Chimie du CNRS via le laboratoire CNAB, par la région Aquitaine, par l'université de Bordeaux 1, ainsi que par le fonds européen de développement régional (FEDER)

La plateforme fonctionne à partir d'un accélérateur électrostatique de type Singletron® fonctionnant selon le principe décrit par Cockcroft et Walton (Cockcroft, et al., 1932) et délivre des faisceaux de protons, de deutons ou de particules alpha avec une énergie comprise entre 0.5 MeV et 3.5 MeV. Les expériences s'articulent autour de l'une des 5 lignes expérimentales développées sur le site: une ligne de faisceau extrait à l'air pour l'analyse d'échantillons ne pouvant pas être mis sous vide, une ligne d'analyse macroscopique permettant de réaliser des analyses par réactions nucléaires, ou spectrométrie Rutherford ou des expériences de canalisation ; une ligne de physique nucléaire essentiellement dévolue à la mesure de sections efficaces d'interactions neutrons-matière, une ligne microsonde et une ligne nanosonde qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail et qui seront décrites dans les paragraphes suivants.

Schématiquement, une ligne d'analyse est un dispositif composite comprenant un accélérateur d'ions, lui-même comprenant un générateur de haute tension, une source d'ions, une colonne d'accélération et un système de régulation de l'énergie des particules, ainsi qu'un système de focalisation magnétique et une chambre d'analyse équipée des détecteurs adéquats.

3.1 PRINCIPE DE LA GENERATION DE HAUTE TENSION DE TYPE COCKCROFT-WALTON

Le développement des accélérateurs électrostatiques est à l'origine motivé par la recherche de source d'ions possédant une énergie supérieure à l'énergie des ions émis par les sources radioactives afin de passer la barrière coulombienne et de réaliser des expériences de physique nucléaire sur des noyaux lourds (Cockcroft, et al., 1932).

Le modèle d'accélérateur développé par Cockcroft et Walton est un modèle générant une haute tension selon un mécanisme purement électronique. Contrairement aux modèles « à courroie » du type Van de Graaff ou Pelletron, la génération de la haute tension se fait sans pièce en mouvement, ce qui confère au potentiel du terminal une plus grande stabilité (Cleland, et al., 1965). Le principe de la génération de la haute tension est basé sur le montage en cascade d'étages de doubleurs de Schenkel (Figure 16). La haute tension est générée par multiplication de la tension d'entrée et se fait par le redressement et le filtrage d'une tension alternative. Originellement limité en termes de tension maximale accessible, principalement pour des raisons de fiabilité des composants électroniques utilisés, le système a surtout été utilisé pour sa capacité à accélérer des forts courants de particules. Finalement, le principe a été amélioré afin de

développer des modèles d'accélérateurs électrostatiques possédant une grande stabilité en énergie permettant le développement de lignes d'analyses à haute résolution spatiale.

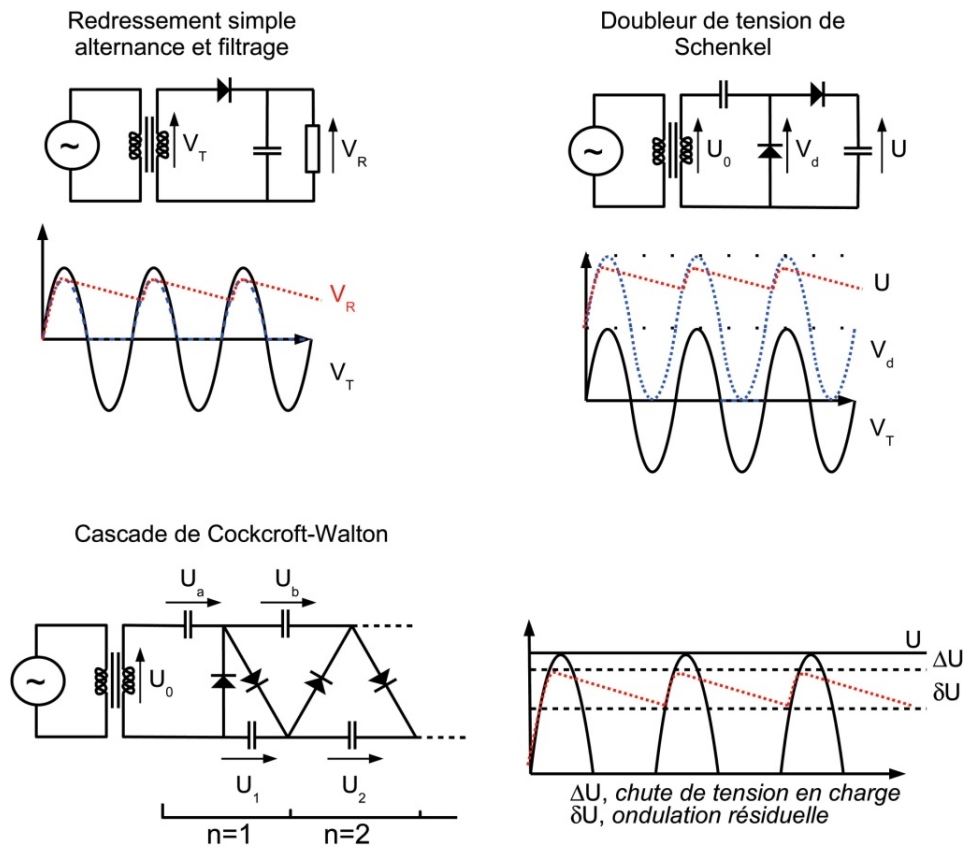


Figure 16 : Principe de la multiplication de tension par un montage en cascade de type Cockcroft-Walton. Haut, gauche : L'utilisation combinée d'un condensateur et d'une diode permet de redresser la tension alternative délivrée par le transformateur. Du fait du temps limité de recharge, la tension V_r redressée présente des ondulations caractéristiques dépendant de la charge du condensateur et de la période de la tension d'entrée. La valeur redressée est légèrement inférieure à la tension maximale d'entrée. Haut droite : le doubleur de tension de Schenkel reprend ces principes pour doubler la tension d'entrée. Bas gauche : Montage de Cockcroft-Walton correspondant à un empilement de n étages de doubleur de Schenkel. Chaque étage ne supporte jamais plus de 2 fois la tension maximale délivrée par le transformateur. Bas droite : illustration des phénomènes de chute de tension et ondulation résiduelle.

Dans le doubleur de tension de Schenkel, si on néglige les chutes de tension et l'ondulation résiduelle, c'est à dire dans le cas de *la marche à vide*, la tension en sortie est environ le double de la tension d'entrée,

$$U \cong 2U_0 \quad (Eq. 41)$$

En théorie, comme il est possible d'empiler les étages de multiplication à l'infini, il est facile d'atteindre le potentiel de sortie voulu, et ce, en ne faisant jamais supporter plus de 2 fois la tension d'entrée aux éléments du système. La tension de sortie, après n étages, sera alors proportionnelle au nombre d'étages, soit

$$U_s = nU \cong 2nU_0 \quad (Eq. 42)$$

Dans la réalité, quand on soutire un courant I à la capacité de sortie, on fait apparaître une chute de tension correspondant à l'ondulation résiduelle δU telle que,

$$\left. \begin{aligned} \delta U &= \frac{\delta Q}{C} \\ \text{soit exprimé en fonction de la fréquence d'oscillation } f \text{ de la tension d'entrée} \\ \delta Q &= \int_0^T I dt = I \cdot T = \frac{I}{f} \\ \text{et finalement,} \\ \delta U &\cong \frac{I}{fC} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 43)$$

En plus de l'ondulation résiduelle, on observe en charge une chute de tension sur les condensateurs due au fait que la recharge n'est pas suffisamment rapide. Cette chute de tension entraîne une chute totale en sortie, dans un montage asymétrique comme celui de la figure 2, qu'on peut montrer égale à (Hellborg, 2005)

$$U = \sum U_i = \frac{I}{fC} \left(\frac{2}{3}n^3 + \frac{1}{2}n^2 + \frac{n}{6} \right) \quad (Eq. 44)$$

Dans le cas où n est grand, la chute de tension n'est pas négligeable et il devient nécessaire pour atteindre des tensions élevées d'augmenter la fréquence d'oscillation et/ou d'augmenter la capacité des condensateurs utilisés.

3.2 FONCTIONNEMENT DE L'ACCELERATEUR AIFIRA

Les accélérateurs de type Singletron (Mous, et al., 1997) reprennent le principe de la multiplication de la tension décrit par Cockcroft et Walton mais le système est optimisé, notamment en termes d'ondulation résiduelle, pour obtenir une stabilité du potentiel du terminal compatible avec le développement de ligne de faisceau focalisé (microsonde et nanosonde) (Figure 17). L'ensemble du système est placé dans une cuve

étanche fonctionnant sous une haute pression de SF₆, un gaz diélectrique possédant une tension de claquage d'environ 40 MV/m à la pression de fonctionnement de 8 atm¹⁰.

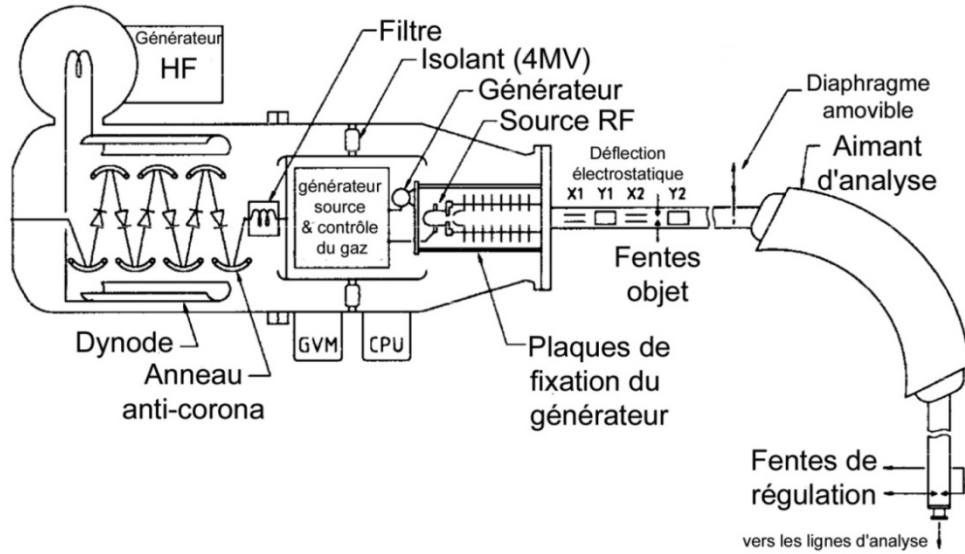


Figure 17 : Schéma de principe de l'accélérateur Singletron (d'après Mous (Mous, et al., 1997)). Voir le détail des différents éléments dans le texte.

Un générateur haute fréquence fournit une tension d'entrée alternative u_e de 400 V à un circuit RLC-série composé d'une bobine et de 2 dynodes semi-cylindriques. A la fréquence de résonance, l'énergie déposée sur les dynodes est maximale et la tension de sortie u_s proportionnelle à la tension d'entrée via le facteur de qualité $Q_f Q$,

$$\left. \begin{aligned} u_s &= Q_f \cdot u_e \\ \text{avec } Q_f &= \frac{L\omega}{R} \end{aligned} \right\} \quad (\text{Eq. 45})$$

Comme à la fréquence de résonance on peut écrire que

$$L\omega = \frac{1}{C\omega} \quad (\text{Eq. 46})$$

Alors à l'accord,

$$u_s = \frac{1}{R} \sqrt{\frac{L}{C}} u_e \quad (\text{Eq. 47})$$

¹⁰ On peut comparer cette valeur à la tension de claquage dans l'air à pression atmosphérique qui est de 0,8 MV/m.

Dans un montage à vide, le facteur de qualité de l'installation est de l'ordre de 1000. En fonctionnement le facteur de qualité est de l'ordre de 100, soit une tension maximale sur les dynodes d'environ 40 kV.

Les étages de redressement et multiplication ($n=50$) de la tension alternative, montés en parallèle, sont reliés aux dynodes par couplage capacitif au travers d'anneaux corona¹¹ (Cleland, et al., 1965). Les étages multiplicateurs sont montés entre les paires d'anneaux corona et redressent la tension alternative déposée sur les anneaux pour générer la tension continue du terminal. La forme des dynodes et des anneaux anti-corona a été ajustée afin d'abaisser le champ électrique maximal dans l'enceinte en fonctionnement en dessous de la valeur de claquage du gaz isolant. L'ordre de grandeur du champ électrique maximal, situé à la pointe des anneaux corona, est de 20 à 30 MV/m.

La tension du terminal, dans un montage de multiplication avec couplage en parallèle (Figure 18 :), peut s'écrire de la manière suivante

$$E = \left. \begin{aligned} E &\cong 2nV - \Delta U \pm \delta U \\ E &= \frac{2nV}{k} - \frac{I(N-1)}{fCk} \pm \frac{I}{2fC} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 48)$$

Où k est le facteur de couplage du système, dépendant du rapport entre les capacités des condensateurs situés entre les anneaux corona et entre les anneaux et les dynodes.

Pour maximiser la fraction $1/k$ de la tension des dynodes déposée sur les anneaux corona, il est nécessaire d'augmenter la capacité des condensateurs couplant les dynodes aux anneaux corona C_{Dy-Co} , tout en diminuant celle des condensateurs situés entre les anneaux C_{Co-Co} (Gott dang, et al., 2002).

$$k \cong 1 + \frac{C_{Co-Co}}{C_{Dy-Co}} \quad (Eq. 49)$$

Le potentiel maximal du terminal sur l'installation AIFIRA est légèrement inférieur à 4 MV, ce qui correspond à un facteur de couplage d'environ 1,15.

¹¹ Le rôle des anneaux corona étant de modifier le gradient de champ électrique autour de la colonne haute tension afin d'éviter les décharges corona, ou claquages, on parle aussi d'anneaux *anti-corona*.

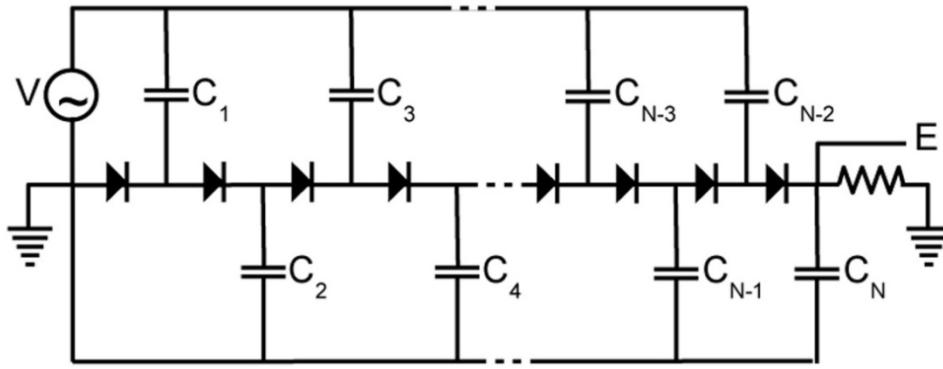


Figure 18 : Schéma de principe de la multiplication d'une tension alternative dans un montage en parallèle reprenant le principe décrit par Cockcroft et Walton. Le montage est celui utilisé dans les accélérateurs de type Dynamitron, Tandetron ou Singletron (d'après Cleland, (Cleland, et al., 1965)). La tension de sortie est donnée par la formule précédente.

La modulation du potentiel du terminal se fait par la modification de la tension d'entrée V au moyen des transistors de puissance IBGT¹², fonctionnant à la même fréquence que la tension d'entrée, comme des portes logiques de largeur temporelle modulable.

3.3 ONDULATION RESIDUELLE ET REGULATION EN ENERGIE DU TERMINAL

Sur les accélérateurs de type Singletron, les sources d'ondulation résiduelle identifiées (Figure 19) proviennent d'une contribution du *circuit oscillant* (≈ 30 kHz) ainsi que des *alimentations primaires* (50 Hz et 300 Hz) qui sont en partie atténuée par un filtre placé entre le terminal et la sortie de la haute tension (Figure 17) (Mous, et al., 1997). Une troisième contribution vient des vibrations engendrées par le *générateur* du terminal. Ces vibrations entraînent un déplacement du terminal qui perturbe la mesure du champ électrique entre le terminal et la paroi du tank à la base de la régulation GVM (Generating Voltmeter). Cette contribution dans la gamme 0-100 Hz est atténuée en fixant le générateur sur la paroi du tank afin d'isoler mécaniquement le terminal et le tube d'accélération.

¹² Transistor bipolaire à grille isolée (*Insulated Gate Bipolar Transistor*)

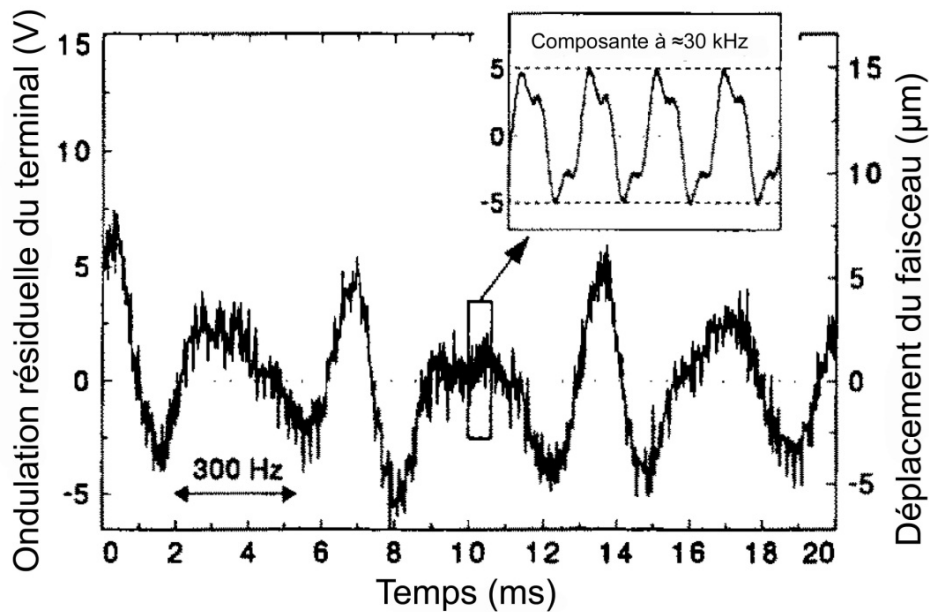


Figure 19: Ondulation résiduelle mesurée sur un accélérateur de type Singletron (d'après (Mous, et al., 1997)) pour des protons de 2.25 MeV montrant les contributions des alimentations primaires ainsi que du circuit oscillant autour de 36 kHz. Sur AIFIRA, la résonance du circuit est légèrement inférieure, autour de 30 kHz.

L'ondulation résiduelle mesurée sur la plateforme AIFIRA au moment de son installation était de 28 V à une énergie de 2250 keV, soit une variation relative de $2,5 \cdot 10^{-5}$.

La régulation du potentiel électrique du terminal par le GVM correspond à la mesure de l'intensité du champ électrique entre le terminal et la paroi du tank permettant en retour de calculer la tension du terminal équivalente (Rohrer, et al., 2005). Le principe est simple mais présente le désavantage de dépendre de la stabilité du tank. La température de la pièce, la montée en température à l'allumage, la variation de pression de SF₆, ou les vibrations du terminal induites par le générateur se traduisent toutes par la variation de la distance terminal-tank donc par la variation du champ électrique et *in fine* par la variation de la tension apparente du potentiel du terminal. La dérive de la régulation mesurée par le constructeur, en mode GVM, peut atteindre quelques centaines de volts sur une durée de 8 heures, ce qui peut devenir critique dans le cas de l'utilisation d'un nanofaisceau.

Pour réguler plus finement la tension du terminal, l'accélérateur est donc équipé d'un aimant d'analyse déviant la trajectoire des particules à 90° par rapport à la direction de sortie du tube et d'un système de fentes de régulation placées à la sortie de l'aimant (Mous, et al., 1997). La lecture du courant différentiel sur les fentes est utilisée dans une boucle de réaction pour ajuster la tension du terminal. L'aimant d'analyse a été spécialement conçu pour générer un champ statique d'une grande stabilité, notamment

par l'introduction de cales céramiques dans l'interstice réduisant l'influence de la température sur le champ magnétique dans l'aimant. La dérive de la régulation en énergie obtenue ainsi sur la plateforme AIFIRA est inférieure à 28 V sur une durée de 4 heures.

3.4 BRILLANCE DE L'ACCELERATEUR ET PRINCIPE DE FOCALISATION

La plateforme AIFIRA est équipée avec une source Radio-Fréquence (RF) située, dans la cuve sous pression de SF₆, entre la colonne de génération de la haute tension et la colonne accélératrice (Figure 17). Le principe de fonctionnement de la source repose sur la création d'un plasma à partir d'un gaz basse pression et l'application d'un champ RF fonctionnant à environ 100 MHz pour une puissance d'environ 50W (Bartha, 2005). Une fois le plasma créé, sa forme est contrôlée par l'application d'un champ magnétique permettant de lui conférer une grande stabilité (Visser, et al., 2005). L'éjection des ions dans le tube accélérateur se fait par l'application d'une tension de quelques kilovolts sur une anode d'extraction. La géométrie de la source a été optimisée afin d'augmenter son émittance sans augmentation de sa divergence (Mous, et al., 1997).

La colonne accélératrice, en redistribuant les gradients de champ électrique dans la cuve, permet de transporter et accélérer les ions sans dégradation de l'émittance et de l'intensité du faisceau (Weisser, 2005). Il est préférable par ailleurs que la focalisation du tube soit connue et compatible avec la gamme la plus large d'énergies et de masses des ions accélérés, et sans provoquer de diffusion ni induire d'aberrations importantes (Hyder, 2005).

Sur AIFIRA, les ions qui sortent de la colonne accélératrice sont focalisés sur des fentes situées à environ 1,5 m de la sortie de l'accélérateur (Figure 20). La position de ce point focal définit le plan objet de l'aimant de régulation qui, à son tour, focalise le faisceau dans le plan objet des lignes de microanalyse (microsonde et nanosonde). Le système est complété par deux paires de plaques de déviation électrostatique (X, Y) permettant de compenser les imperfections dans l'alignement des différents composants de la ligne.

Un des paramètres clef de la source est sa brillance qui conditionne le développement des lignes spatialement résolues en définissant le courant limite délivrable sur la cible. La brillance de la machine peut être définie comme l'intensité de courant sur l'échantillon par unité de surface, d'ouverture angulaire et par électron-volt (Szymanski, et al., 1997) (Incerti, et al., 2006).

$$B = \frac{i}{A_0 E} \frac{d^2}{S_a} \quad (Eq. 50) \text{ d'après (Szymanski, et al., 1997)}$$

Où i est le courant sur la cible, A_0 est la surface du collimateur objet, E est l'énergie des particules incidentes, d est la distance entre le collimateur objet et le collimateur d'ouverture et S_a , la surface du collimateur d'ouverture.

Sur l'installation AIFIRA, la brillance, mesurée après l'aimant d'analyse, est supérieure à $30 \text{ A} \cdot \text{rad}^{-2} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{eV}^{-1}$, soit environ 5 fois la brillance de l'ancienne installation Van de Graaff.

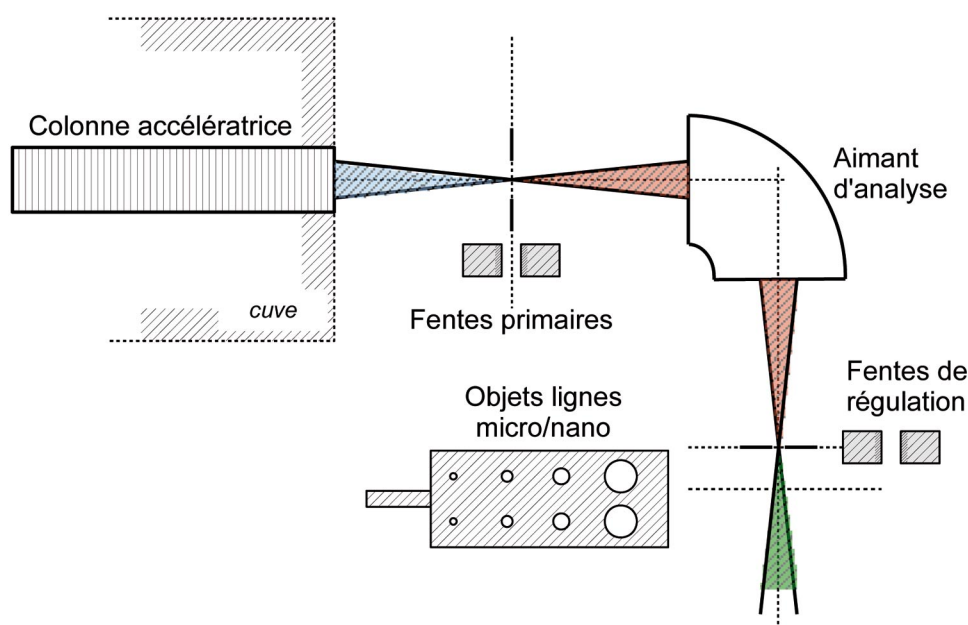


Figure 20 : Schéma de principe du positionnement relatif sur AIFIRA de l'aimant d'analyse par rapport au plan focal de la colonne accélératrice et des objets des lignes microsonde et nanosonde par rapport au plan focal de l'aimant d'analyse. Le défaut d'alignement peut être en partie corrigé au moyen de 2 paires de plaques de déflection électrostatique situées entre la sortie de la colonne et l'aimant (non montrées – voir figure 3).

3.5 DESCRIPTION DES LIGNES MICROSONDE ET NANOSONDE

Les lignes microsonde et nanosonde ont été développées avec l'objectif d'atteindre une résolution spatiale maximale sur cible d'environ 100nm en configuration STIM sur la ligne nanosonde (Barberet, et al., 2009). Cette résolution spatiale fixe des contraintes importantes en termes de vibrations maximales acceptables de la structure du bâtiment d'accueil. Les lignes microsonde et nanosonde sont donc isolées du reste du bâtiment grâce à une dalle flottante de béton de 200 tonnes, arrimée sur des pieux fixés sur le socle calcaire à 18 mètres de profondeur. D'autre part, l'ensemble objet-optique quadripolaire-échantillon de la ligne nanosonde est monté sur

un monobloc de marbre permettant de coupler les déplacements résiduels de l'ensemble de la ligne (Figure 21).

La boîte contenant les collimateurs objet définit l'entrée des lignes d'analyse (Figure 21). Elle contient deux paires de fentes (X, Y) en tantale permettant de diminuer l'énergie déposée sur les collimateurs. L'ouverture maximale des fentes a été fixée à 300 μm ¹³ en largeur comme en hauteur. Les objets sont des collimateurs de platine iridié (Pt-Ir) de diamètre variable : 50 μm , 20 μm , 10 μm et 5 μm . Les collimateurs de 50 μm , 20 μm et 10 μm sont utilisés pour des expériences de type micro-PIXE, tandis que le collimateur de 5 μm ne sert qu'aux expériences STIM. La relation précédente (Eq. 50) montre que le passage d'un collimateur de 50 μm à un collimateur de 20 μm se traduit par une diminution d'un facteur 6,25 de l'intensité sur la cible.

Situé à une distance de 1200 mm de la boîte-objets, l'aimant de déviation permet d'alimenter l'une des 5 lignes d'analyse installées sur la plateforme AIFIRA. Pour diminuer le nombre d'éléments potentiellement perturbateurs, en termes de trajectoire du faisceau, la ligne nanosonde a été développée dans l'axe optique de la machine. Pour supprimer les champs magnétiques résiduels, l'aimant d'analyse doit être démagnétisé avant chaque expérience sur la ligne nanosonde. La ligne microsonde, initialement développée sur l'accélérateur Van de Graaff, a été installée à la sortie de l'aimant de déviation sur un axe formant un angle de 10° avec l'axe optique matérialisé par les fentes de régulation de la machine.

La focalisation du faisceau sur la ligne microsonde se fait au moyen d'un quadruplet de lentilles quadripolaires magnétiques arrangée selon la configuration « russe » décrite par Dymnikov (Dymnikov, et al., 1963) (Yavor, et al., 1964) correspondant à deux doublets à alimentation inversée montés tête-bêche. Le principal intérêt de cette configuration réside dans le fait que le grandissement du système est important, même pour des courants d'alimentation faibles ne nécessitant pas de refroidissement poussé (type à eau), et que les aberrations chromatiques sont relativement faibles. D'autre part, le système est symétrique et permet l'utilisation d'objets circulaires en entrée de ligne. Le grandissement de la ligne microsonde est d'environ 10 dans les plans de focalisation horizontal et vertical (Incerti, et al., 2003),

$$D_x = D_y \cong 10$$

¹³ Cette limite correspond à une limite nécessaire pour le logiciel de réglages de la machine, mais l'écartement des fentes n'étant pas étalonné, cette valeur peut être légèrement différente dans un sens comme dans l'autre.

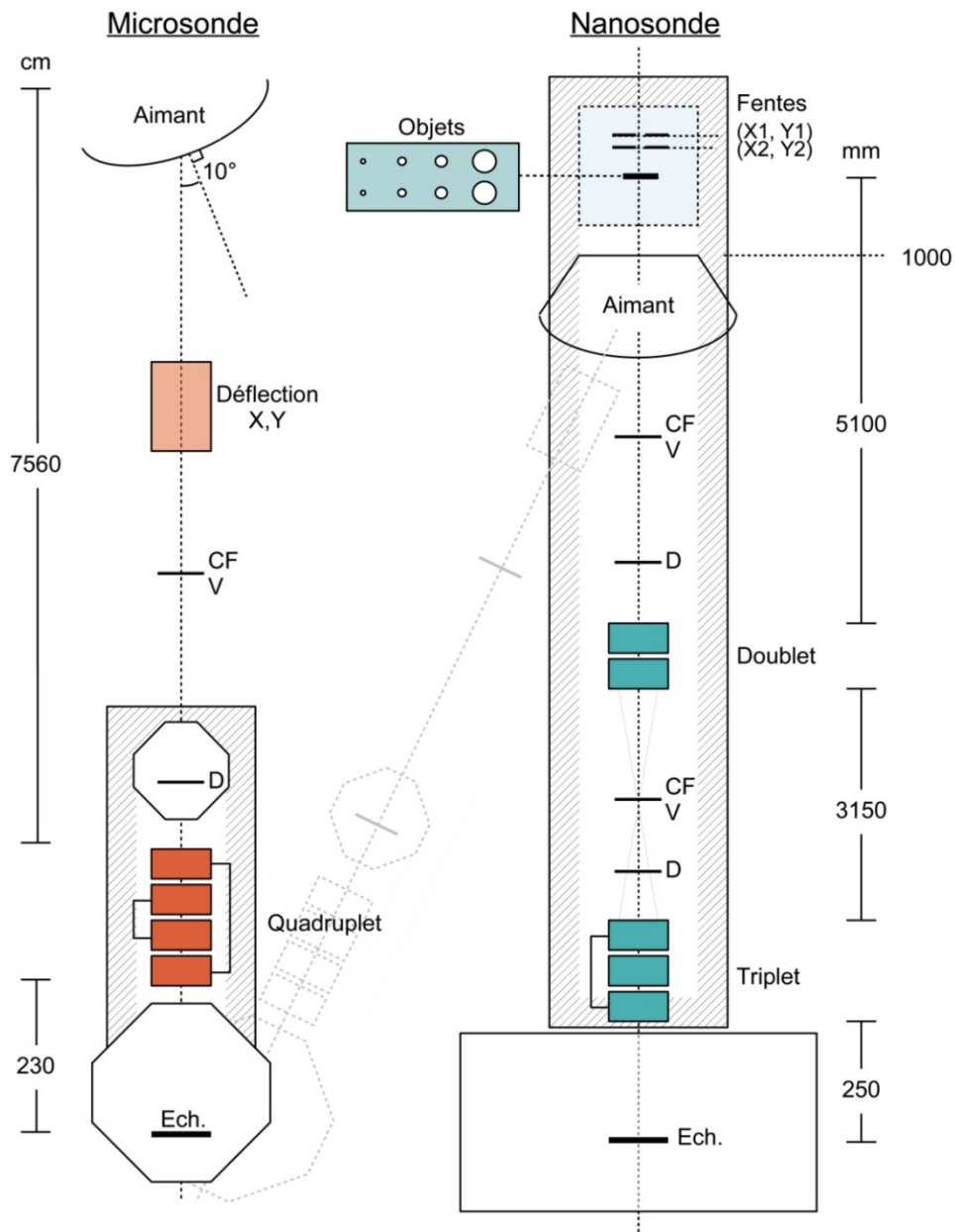


Figure 21 : Schéma des lignes d'analyse microsonde et nanosonde de la plateforme AIFIRA. Les 2 lignes fonctionnent à partir d'un jeu de collimateurs-objets positionnés à l'entrée des lignes sur le monobloc de marbre (contour hachuré). Les collimateurs sont protégés par un jeu de fentes (X,Y) placé en amont. L'aimant de déviation permet de distribuer le faisceau dans la ligne microsonde désaxée de 10° (position réelle surimpression pointillée). L'aimant est démagnétisé pour les expériences effectuées sur la ligne nanosonde. Les diaphragmes (D) sont positionnés à 400mm de l'entrée des quadripôles dont le diamètre est de 100 mm sur la ligne nanosonde et 150 mm sur la ligne microsonde. L'espacement entre les lentilles d'un même groupe est de 40 mm. CF : cage de Faraday ; V : quartz de visualisation ; D : diaphragme.

Sur la ligne nanosonde, la focalisation est obtenue en utilisant une combinaison de lentilles quadripolaires arrangées en doublet puis triplet (Barberet, et

al., 2009). Même si les aberrations augmentent lorsque le grandissement des optiques augmente (Legge, et al., 1993) (Jamieson, 2001), il reste que le grandissement constitue la première contribution à la taille du faisceau (Jamieson, 2001). La configuration en quintuplet a été choisie de telle sorte que la distance de travail (25 cm) soit suffisamment grande pour avoir un environnement de l'échantillon dégagé, permettant notamment de placer plusieurs détecteurs et de motoriser l'ensemble des éléments de la chambre d'analyse. La configuration choisie permet en outre de disposer d'un point de diagnostic entre le doublet et le triplet, pour faciliter le réglage de la focalisation. La position relative des quadripôles magnétiques a été déterminée par simulation de l'ensemble de la ligne et correspond à la configuration donnant la meilleure résolution spatiale sur cible (Incerti, et al., 2006) (Incerti, et al., 2007) (Andersson, et al., 2008). Contrairement à la ligne microsonde, le facteur de grandissement dans les plans de focalisation horizontal et vertical n'est plus identique (Incerti, et al., 2005),

$$D_x \cong 64$$

$$D_y \cong 100$$

3.6 DESCRIPTION DES CHAMBRES D'ANALYSE

La chambre d'analyse de la ligne microfaisceau a servi de base à l'élaboration de la chambre d'analyse de la ligne nanosonde. Hormis la motorisation des éléments constitutifs de la chambre nanosonde et un volume utile élargi, permettant notamment de réaliser des expériences d'ERDA, les chambres d'analyse sont similaires (Figure 22). L'échantillon est placé à une distance de travail, définie par rapport au plan de sortie du dernier quadripôle, d'environ 250 mm¹⁴. L'observation de l'échantillon peut se faire en réflexion par l'avant ou en transmission, les 2 modes offrant des grossissements compatibles avec l'observation des cellules.

L'analyse PIXE se fait grâce à un détecteur silicium dopé au lithium (Sirius) dont la surface active est de 80mm², situé à une distance de 30 mm de la surface de l'échantillon. L'angle entre le détecteur PIXE et la normale à l'échantillon est de 45°. Un filtre de carbone ultra pur (99.999%) possédant un trou, dont le diamètre est de 1 mm, est placé devant le détecteur afin de discriminer positivement le signal d'émission X provenant des éléments de Z intermédiaire (20 < Z < 30) au détriment du signal provenant des éléments légers en concentration mineure (10 < Z < 20).

¹⁴ 230 mm sur la ligne microsonde et 250 mm sur la ligne nanosonde.

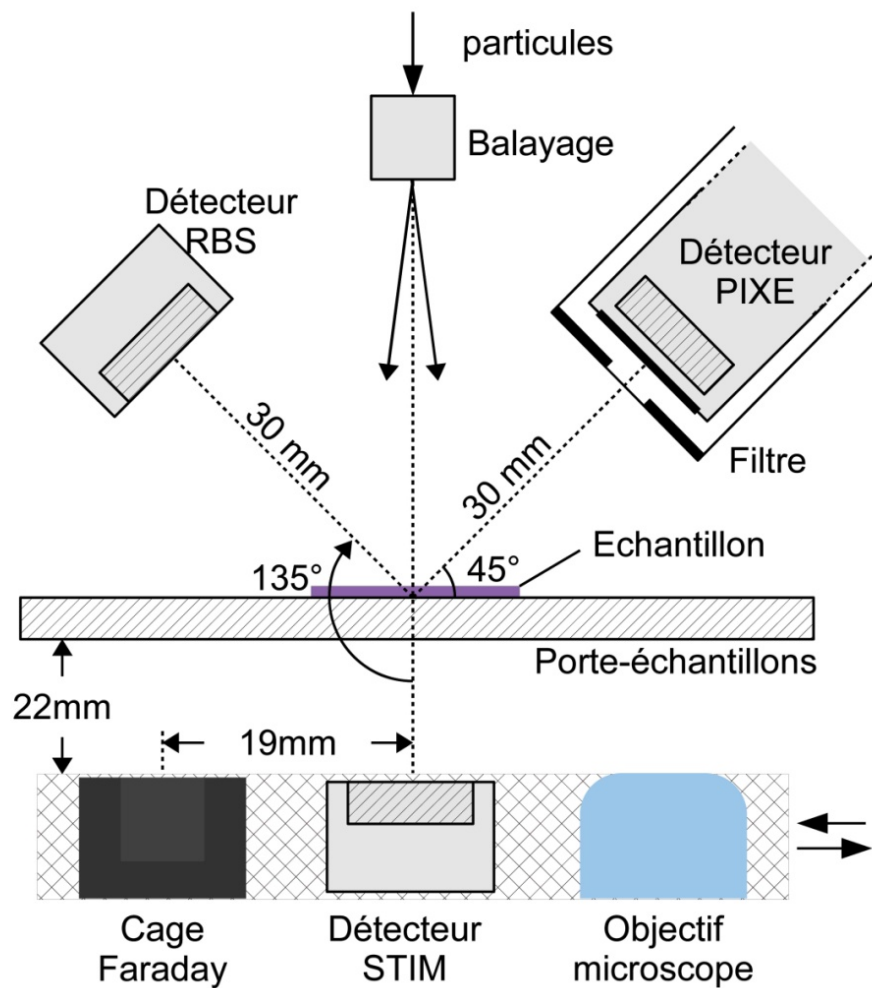


Figure 22 : Schéma de l'environnement de l'échantillon montrant la position relative des détecteurs PIXE, RBS et STIM. La géométrie de détection est identique sur les 2 lignes d'analyse. Le support arrière est amovible, et les éléments qu'il porte sont placés sélectivement dans l'axe du faisceau : cage de Faraday pour arrêter le faisceau de particules transmises et pour les réglages de la ligne d'analyse ; Détecteur STIM pour la mesure de l'énergie des particules transmises ; Objectif du microscope : pour l'observation et la sélection des cellules d'intérêt avant analyse PIXE-RBS.

Symétriquement, un détecteur semi-conducteur (silicium Canberra PD-30-100-12AM¹⁵) est utilisé pour l'analyse RBS. Placé à 45° de l'axe optique, il permet de détecter les particules rétrodiffusées autour d'un angle de 135°.

¹⁵ Comme l'indique la référence, la surface active du détecteur est 30mm², l'épaisseur de la zone déplétée est 100µm, la résolution en énergie est de 12 keV.

Un détecteur identique est utilisé pour l'analyse STIM et est placé sur le support escamotable de la cage de Faraday dans l'axe du faisceau à une distance de 22 mm de la surface de l'échantillon. En configuration PIXE, le support est décalé pour remplacer le détecteur STIM par une cage de Faraday.

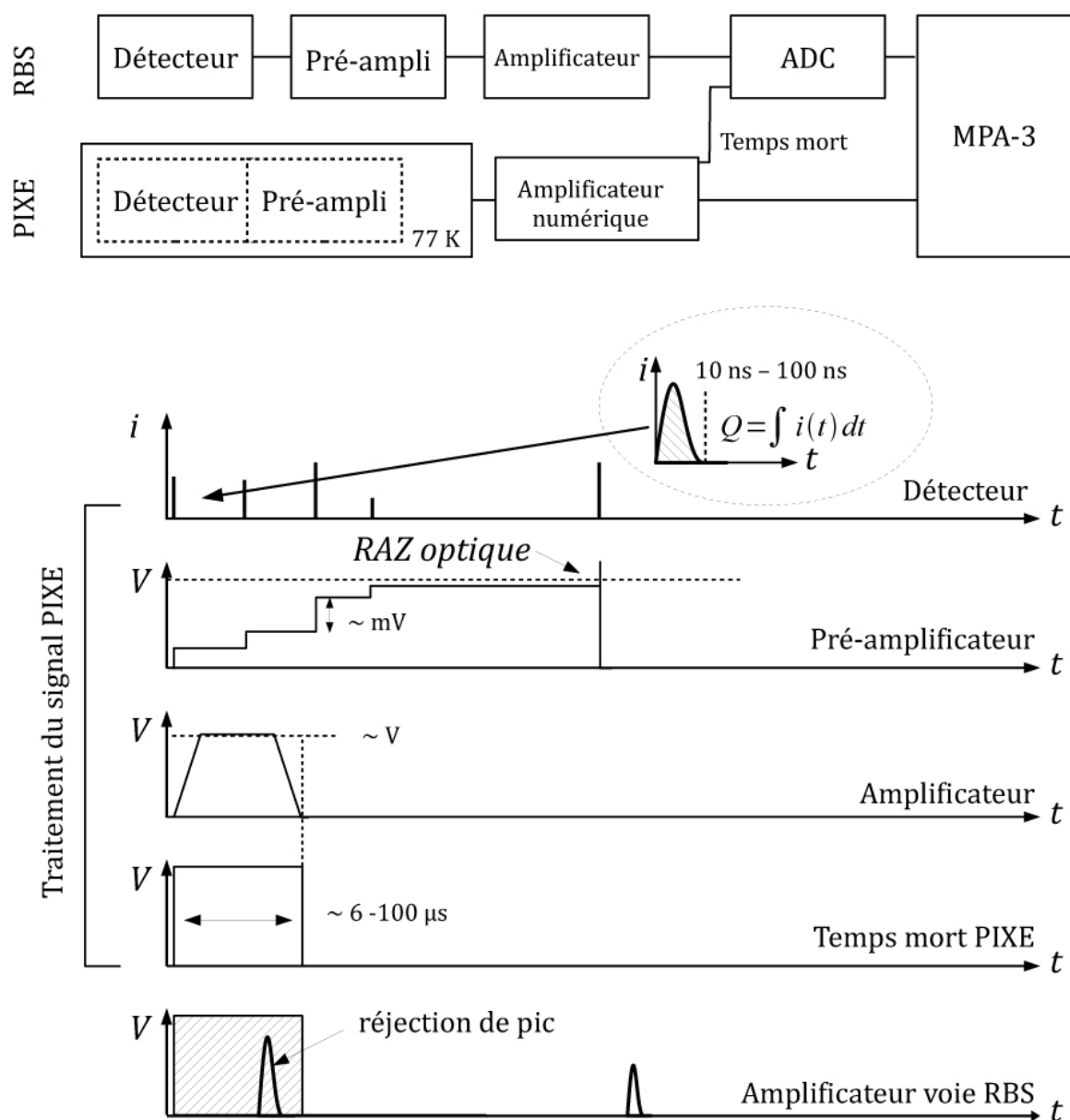


Figure 23: Principe de l'analyse PIXE-RBS en coïncidence temporelle permettant la normalisation de l'intensité du signal d'émission X par la charge déposée au cours de l'analyse simulée à partir du spectre de rétrodiffusion. Le signal de la voie PIXE est traité de manière numérique (Digital Signal Processing) avec un temps de traitement ajustable entre 6 μ s et 100 μ s en fonction des pré-requis en termes de taux de comptage maximal et résolution en énergie. La constante de traitement du signal choisie par l'utilisateur détermine le temps mort de la voie PIXE, utilisé pour la coïncidence avec la voie RBS, c'est à dire la durée pendant laquelle toutes les

impulsions de la voie RBS sont rejetées.

Les données sont enregistrées au moyen du système d'acquisition multicanaux MPA-3, permettant l'enregistrement ultra-rapide de 16 voies d'acquisition en mode liste (Barberet, et al., 2009) (Figure 23). Le système permet l'enregistrement de 10^6 évènements par seconde et offre une gestion simple des coïncidences entre les différentes voies. Pour réaliser les expériences PIXE-RBS-STIM, 5 voies d'acquisition au minimum sont nécessaires : 2 voies pour coder la position du faisceau (X, Y) et une voie par détecteur. Les voies d'acquisition RBS et PIXE sont utilisées en coïncidence temporelle grâce au signal de temps mort fourni par le processeur du détecteur PIXE de telle sorte que la charge déposée pendant l'analyse soit identique pour ces 2 voies.

Dans le cas de l'analyse d'échantillons fins comme les monocouches cellulaires, l'expérience est réalisée en 2 temps, en configuration STIM d'abord, c'est à dire avec un faisceau de particules α et un détecteur STIM positionné dans l'axe, puis en configuration PIXE-RBS, avec un faisceau de protons et un détecteur STIM placé hors-axe et remplacé par une cage de Faraday ne servant qu'à arrêter le faisceau de particules transmises.

4 RESULTATS – ASPECTS METHODOLOGIQUES

4.1 LOGICIEL D'ANALYSE QUANTITATIVE DES DONNEES STIM

La méthode STIM, initialement développée comme outil d'imagerie, peut être utilisée pour déterminer la masse surfacique de l'échantillon à partir de la conversion de la perte d'énergie des particules en masse équivalente. Pour effectuer ce calcul, nous avons développé un logiciel de traitement des analyses STIM appelé Paparamborde (Programme d'Analyse des Particules RAlenties dans la Matière de BORDEaux). Le logiciel a été développé initialement en langage Visual Basic puis retranscrit en C++, un langage orienté objet, lui conférant, outre la possibilité de traitement d'un nombre important de données, une évolutivité importante. Une description du programme est donnée en annexe 8.1 (page 172).

4.1.1 PAPARAMBORDE : PROGRAMME D'ANALYSE DES DONNEES STIM

Une vue d'ensemble de l'interface graphique du logiciel Paparamborde est présentée dans la Figure 24. L'interface est schématiquement découpée en zones graphiques qui suivent l'enchaînement logique du calcul de la masse de l'échantillon. Ces zones sont, de haut en bas et de gauche à droite :

1. Une zone de définition du type de particules, de l'énergie incidente et de la calibration en énergie. Il n'y a pas de restriction quant à la nature ou l'énergie incidente des ions sélectionnés.
2. Une zone de définition de la composition et de la densité de l'échantillon.
3. Une zone de définition des bornes du calcul permettant de supprimer éventuellement des parties bruitées du spectre.
4. une zone d'affichage du résultat du calcul en termes d'énergie moyenne transmise, d'énergie médiane transmise, de masse équivalente et d'épaisseur équivalente avec les incertitudes associées.
5. une zone présentant le spectre en énergie des particules transmises ainsi que la variation du pouvoir d'arrêt pour la composition définie par l'utilisateur et dans la gamme d'énergie correspondant au spectre.
6. Dans le cas d'un fichier de données de type liste (X, Y, Energie), l'image médiane de la zone analysée est calculée et affichée en fausses couleurs. L'échelle des couleurs est convertie en masse équivalente ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), épaisseur équivalente (μm). Cette zone est interactive et permet à l'utilisateur de définir des profils densimétriques, ou de sélectionner des zones d'intérêt et d'en extraire le spectre correspondant pour analyse.

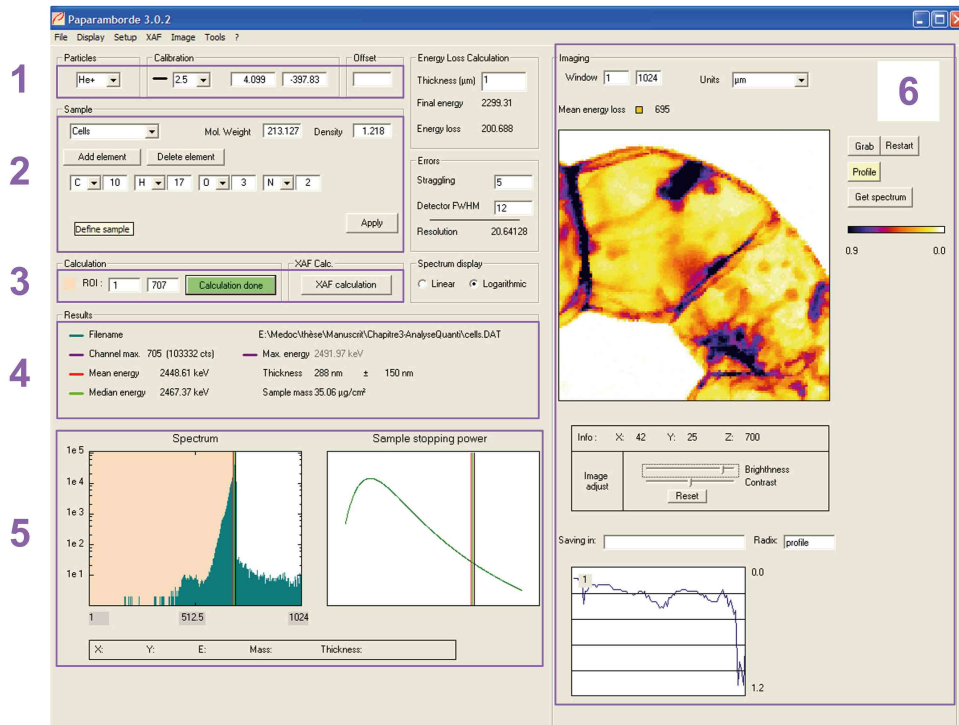


Figure 24: Vue d'ensemble de l'interface du logiciel Paparamborde. (Détail du fonctionnement : voir le texte).

Dans la version de Paparamborde écrite en C++, une routine de calibration a été incluse, permettant de calibrer les spectres en énergie à partir de l'analyse d'un échantillon de référence et de la mesure d'un blanc (faisceau directement sur le détecteur). Cette routine a été ajoutée dans la mesure où les erreurs dans la détermination de la masse dues à la calibration sont faibles par rapport aux incertitudes sur les pouvoirs d'arrêt. La routine permet d'éviter l'opération fastidieuse de changement d'énergie des particules incidentes.

4.1.2 PRINCIPE DU CALCUL DE LA MASSE SURFACIQUE

Le pouvoir d'arrêt d'un matériau ε définit la relation existant entre la perte d'énergie linéaire dE/dx d'un faisceau de particules et sa densité atomique N (Eq. 21). La conversion de l'énergie perdue par les particules incidentes en masse surfacique de l'échantillon peut se faire selon la relation suivante :

$$\rho \cdot dx = \frac{M}{N} \frac{dE}{\varepsilon} \quad (\text{Rappel: Eq. 39})$$

La perte d'énergie linéaire dE/dx varie avec l'énergie de la particule incidente. Par conséquent, le pouvoir d'arrêt ε est aussi une fonction de l'énergie des particules incidentes, et la mesure de la masse surfacique se fait par intégration de la variation de $1/\varepsilon(E)$ sur le domaine d'énergie des particules $[E_{min}, E_{max}]$

$$\rho \cdot dx = \frac{M}{N} \int_{E_{min}}^{E_{max}} \frac{dE}{\varepsilon(E)} \quad (Eq. 51)$$

4.1.3 CALCUL APPROCHE DE LA MASSE SURFACIQUE

On peut calculer la masse surfacique de l'échantillon sans résoudre l'intégration ci dessus en négligeant la variation d'énergie des particules incidentes ($E = cte$) et en l'approximant soit, à l'énergie à la surface E_0 , soit à l'énergie moyenne $\bar{E}$. La masse surfacique peut alors être calculée selon la relation suivante

$$\overline{\rho \cdot dx} = \frac{M}{N} \frac{\Delta E}{\varepsilon(E)} \quad (Eq. 52)$$

$$\text{Approximation à l'énergie moyenne} \left\{ \begin{array}{l} \Delta E = E_0 - E_{min} \\ E = \bar{E} = \frac{E_0 - E_{min}}{2} \\ \varepsilon(E) = \varepsilon(\bar{E}) \end{array} \right.$$

$$\text{Approximation à l'énergie à la surface} \left\{ \begin{array}{l} \Delta E = E_0 - E_{min} \\ E = E_0 \\ \varepsilon(E) = \varepsilon(E_0) \end{array} \right.$$

L'approximation de l'énergie à l'énergie à la surface correspond à un cas limite pour lequel la perte d'énergie des particules peut être négligée et elle n'est valide que pour des échantillons très fins et homogènes. L'approximation n'est déjà plus valide pour des échantillons de quelques micromètres d'épaisseur (Tableau 3, colonne 1).

L'approximation à l'énergie moyenne permet, quant à elle, de mesurer précisément la masse des échantillons dans la mesure où la vitesse des particules reste supérieure à la vitesse de Thomas-Fermi pour laquelle le pouvoir d'arrêt présente un maximum. Dans ce cas, la variation des pouvoirs d'arrêt entre les énergies initiale et finale est quasi-linéaire et les erreurs commises sur la détermination de la masse quand l'énergie réelle des particules incidentes est supérieure à l'énergie moyenne compensent celles commises dans le cas inverse. Pour ces mêmes raisons, la validité de l'approximation de l'énergie à l'énergie moyenne diminue lorsque les particules transmises ont une vitesse inférieure à la vitesse de Thomas-Fermi.

Pour tester la validité de ces approximations, on peut prendre l'exemple de la mesure de l'épaisseur d'une feuille de polycarbonate¹⁶ de 4 μm d'épaisseur à partir de la distribution en énergie de particules transmises d'énergie initiale égale à 2 MeV ou 1,2 MeV. Le programme SRIM (Ziegler, et al., 2010) permet de générer de telles distributions en énergie (Figure 25) qui correspondent au cas décrit précédemment de distributions situées de part et d'autre du maximum de la courbe de pouvoir d'arrêt, correspondant à la vitesse de Thomas-Fermi.

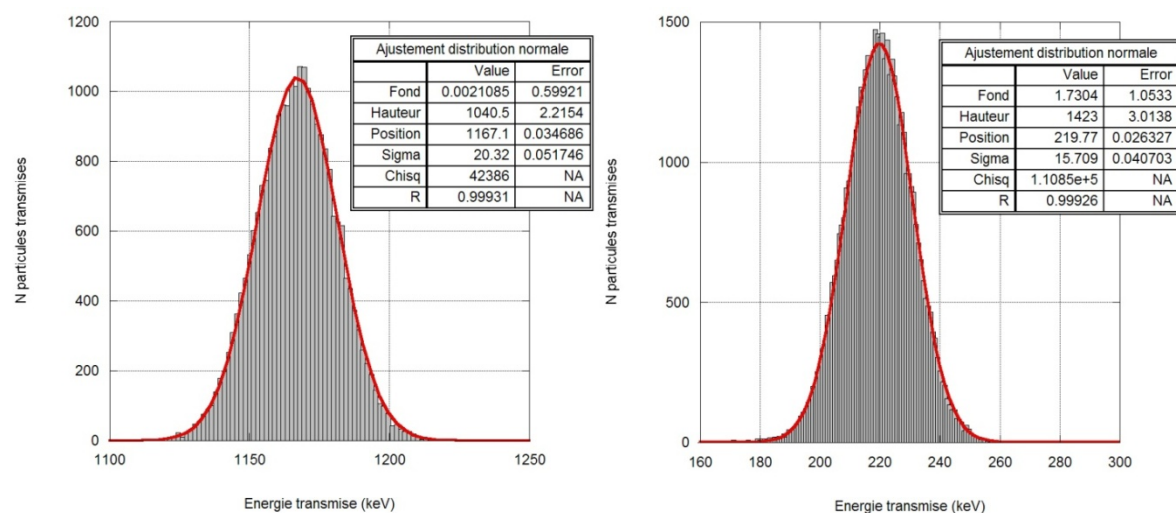


Figure 25: Distribution en énergie des particules alphas transmises à travers une feuille mince de polycarbonate, $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$, générée avec le programme SRIM. Gauche : $E_0 = 2 \text{ MeV}$; $N = 5.10^4$ particules. Droite : $E_0 = 1,2 \text{ MeV}$; $N = 1.10^5$ particules.

Les distributions peuvent être ajustées au moyen d'une fonction gaussienne permettant de déterminer l'énergie moyenne transmise. Dans notre cas, les paramètres de la simulation indiquent que les distributions sont centrées autour des énergies $E_{2 \text{ MeV}} = 1167 \pm 21 \text{ keV}$ et $E_{1,2 \text{ MeV}} = 220 \pm 16 \text{ keV}$. On peut alors calculer l'épaisseur de la feuille à partir des relations simplifiées présentées précédemment (Tableau 3).

L'erreur commise dans le cas de l'approximation à l'énergie moyenne est nulle dans le cas où l'énergie transmise reste supérieure à l'énergie correspondant au pouvoir d'arrêt maximal. Elle augmente lorsque pour des énergies transmises proches de zéro confirmant la limite de validité de la méthode lorsque l'épaisseur de l'échantillon

¹⁶ La composition chimique et la densité du polycarbonate, très proches des valeurs cellulaires, en font un très bon analogue des échantillons biologiques pour l'analyse STIM.

est importante. Ce résultat implique que le calcul de la masse des échantillons biologiques sera faussé chaque fois que leur épaisseur ou leur densité sera suffisante pour ralentir fortement les particules. Etant donné que la précision maximale du calcul de la masse surfacique est obtenue dans le cas limite où l'énergie incidente correspond à la perte d'énergie maximale dans la zone la plus dense de l'échantillon, on a toujours intérêt à se placer expérimentalement dans un cas où les pertes d'énergie s'étalent de part et d'autre du maximum correspondant à la vitesse de Thomas-Fermi. L'erreur totale commise dépendra de la proportion dans la zone analysée de ces zones denses pour lesquelles l'erreur commise est la plus importante. Comme il n'est a priori pas possible de déterminer l'importance de ces zones, et pour la raison évoquée ci-dessus, nous avons préféré développer une méthode de calcul prenant en compte la variation de l'énergie des particules incidentes.

Tableau 3 : Calcul de l'épaisseur d'une feuille de polycarbonate de 4 μm à partir des approximations de l'énergie des particules à l'énergie moyenne et à l'énergie à la surface.

Echantillon	Polycarbonate 4 μm		
Energie incidente	$E_0 = 2 \text{ MeV}$	$E_0 = 2 \text{ MeV}$	$E_0 = 1,2 \text{ MeV}$
E transmise	1167	1167	220
Approximation	En. surface	En. moyenne	En. moyenne
E (keV)	2000	1583	710
$\varepsilon(E)$ (keV/μm)	187	209	265
Epaisseur (μm)	4,9	4,0	3,70
Différence (μm)	+0,9	+0,0	-0,30
Erreur (%)	+22	+0	-9,3

4.1.4 CALCUL EXACT DE LA MASSE SURFACIQUE PAR LE LOGICIEL PAPARAMBORDE

Le logiciel Paparamborde a été développé dans le but de calculer la masse des échantillons à partir du spectre en énergie des particules transmises et tout en tenant compte de la variation du pouvoir d'arrêt avec l'énergie des particules incidentes. La discrétisation du spectre en énergie des particules transmises entraîne le remplacement de l'intégrale par une somme sur l'ensemble des canaux du spectre de pertes d'énergie.

La perte d'énergie totale ΔE est alors définie comme la somme de n pertes d'énergie élémentaires δE (Figure 26)

$$\Delta E = n. \delta E \quad (Eq. 53)$$

Pour des raisons pratiques, on définit la perte d'énergie élémentaire δE comme étant égale à la pente de la droite de calibration en énergie du spectre, a .

$$\left. \begin{array}{l} \delta E = a \\ avec \quad E_i = a * i + b \end{array} \right\} \quad (Eq. 54)$$

si i est le numéro du canal.

L'échantillon peut alors être vu comme la somme de n couches de masse m_i ayant entraîné chacune la perte d'énergie élémentaire δE (Figure 26, haut). La seule différence entre les couches i successives est la valeur du pouvoir d'arrêt ε_i calculé en tenant compte de la variation en énergie des particules incidentes (Figure 26, en bas à gauche).

$$m_i = \frac{M}{N} \frac{\delta E}{\varepsilon_i} \quad (Eq. 55)$$

Les pouvoirs d'arrêt ε_i sont calculés grâce au programme SRMODULE.EXE fourni avec le logiciel SRIM (Ziegler, et al., 2010). La prise en compte de la variation du pouvoir d'arrêt est effectuée en considérant qu'une particule dans la couche i ayant perdu une énergie totale $\Delta E_i = i * \delta E$ a interagit avec une masse M_i telle que

$$M_i = \sum_{j=1}^i m_j \quad (Eq. 56)$$

La masse totale de l'échantillon m est alors égale à la somme des masses M_i pondérée par le poids du canal p_i dans le spectre total. On peut calculer en effet le nombre total de coups H_T dans le spectre comme étant égal à la somme des coups dans chaque canal i

$$H_T = \sum_{i=1}^n H_i \quad (Eq. 57)$$

où H_i est le nombre de coups dans le canal i , et

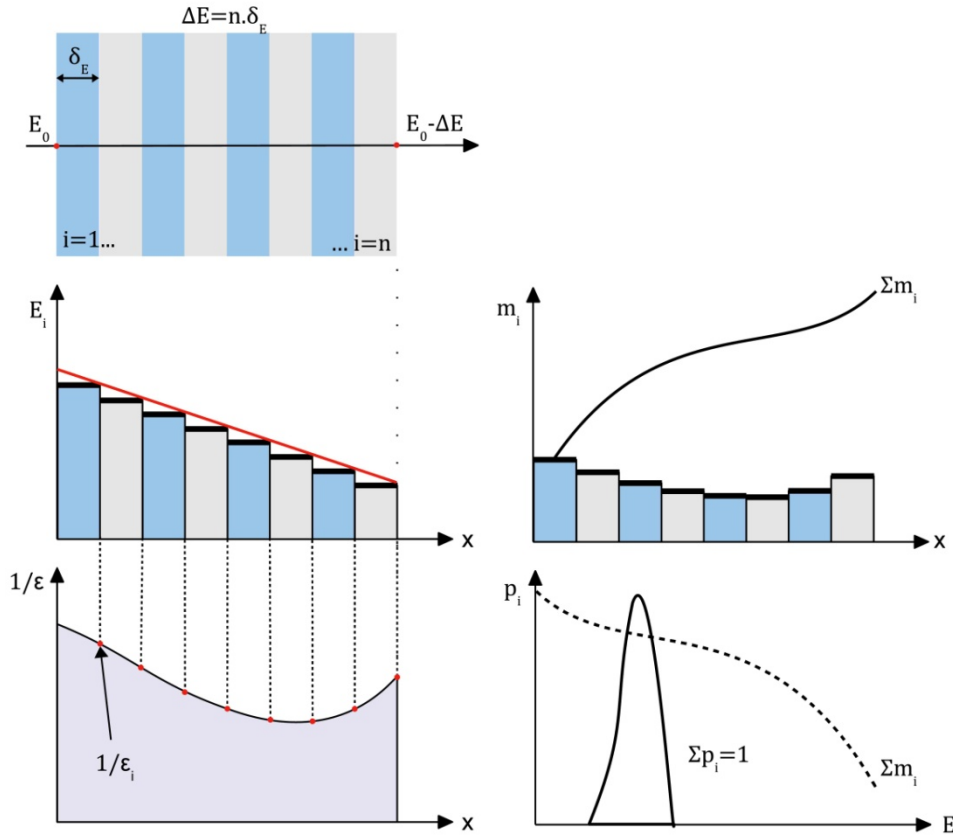


Figure 26 : Principe du calcul de la masse avec le logiciel Paparamborde. En haut : l'échantillon est divisé en n couches dont l'épaisseur correspond à une perte d'énergie constante δE . La valeur de δE correspond à la pente de la droite de calibration en énergie du spectre, permettant de faire l'analogie entre une couche et un canal du spectre de perte d'énergie. Milieu, gauche : pour chaque canal, l'énergie des particules calculée, $E_i = E_0 - i * \delta E$, permet de calculer le pouvoir d'arrêt correspondant (en bas à gauche). Milieu, droite : le calcul du pouvoir d'arrêt permet de définir une masse équivalente. La prise en compte de la variation du pouvoir d'arrêt avec l'énergie des particules incidentes se fait en considérant qu'une particule détectée à l'énergie E_i a interagi avec i couches dont la masse totale est égale à la somme des i masses ayant chacune induit la perte d'énergie δE . Bas, droite : la masse d'échantillon est le produit de la masse équivalente par canal et du poids du canal correspondant défini comme le nombre de coups dans le canal divisé par le nombre de coups total dans le spectre.

$$p_i = \frac{H_i}{H_T} \text{ avec } \sum_i p_i = 1 \quad (\text{Eq. 58})$$

On peut donc finalement écrire que la masse d'échantillon m est égale à

$$m = \sum_{i=1}^n M_i \cdot p_i \quad (Eq. 59)$$

4.1.5 CALCUL D'INCERTITUDES

Le calcul de l'incertitude sur la détermination de la masse par Paparamborde est construit sur l'hypothèse que la distribution en énergie des particules suit, à l'échelle du faisceau, une loi normale. Il pourrait arriver néanmoins que l'échantillon présente une distribution en épaisseur dans le volume sondé, délimité par la taille du faisceau. Dans ce cas, le calcul des incertitudes devrait prendre en compte la forme de la distribution en énergie des particules transmises.

L'incertitude associée à la mesure de la masse peut être calculée à partir de la relation existant entre la masse et le pouvoir d'arrêt,

$$\left. \begin{aligned} si, m &= \sum_i m_i \cdot p_i \\ dm &= \frac{\partial m}{\partial m_i} dm_i + \frac{\partial m}{\partial p_i} dp_i \\ dm &= p_i dm_i + m_i dp_i \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 60)$$

Soit

$$\left. \begin{aligned} \frac{dm}{m} &= \frac{dp_i}{p_i} + \frac{dm_i}{m_i} \approx \frac{dm_i}{m_i} \\ car \ dp_i &= \frac{\partial p_i}{\partial H_i} dH_i + \frac{\partial p_i}{\partial H_T} dH_T \\ dp_i &= \frac{dH_i}{H_T} - \frac{dH_T}{H_T^2} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 61)$$

Comme les incertitudes sur la mesure des hauteurs de pics et du nombre total de coups dans le spectre sont faibles,

$$\left. \begin{aligned} dH_i &= \sqrt{H_i} \ll H_T \\ et \\ dH_T &= \sqrt{H_T} \ll H_T^2 \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 62)$$

on peut écrire que

$$dp_i \approx 0$$

Et finalement que,

$$\left. \begin{aligned} \frac{\Delta m}{m} &= \frac{\Delta m_i}{m_i} \\ m_i &= \frac{M}{N} \frac{a}{\varepsilon_i} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 63)$$

Avec a , la pente de la droite de calibration.

Soit finalement, une incertitude sur la masse élémentaire m_i égale à

$$\frac{\Delta m_i}{m_i} = \frac{\Delta a}{a} + \frac{\Delta \varepsilon_i}{\varepsilon_i} \quad (Eq. 64)$$

Les incertitudes sur les pouvoirs d'arrêt comprennent un terme correspondant à la précision des simulations des courbes de pouvoir d'arrêt expérimentales et un terme correspondant à l'erreur sur la détermination de la position du pic d'intérêt proportionnel au nombre de coups dans le canal correspondant, soit

$$\left. \begin{aligned} \frac{\Delta \varepsilon}{\varepsilon} &= \sqrt{\sigma_{\varepsilon \exp}^2 + \frac{\sigma_{\varepsilon \exp}^2}{H_i}} \\ \frac{\Delta \varepsilon}{\varepsilon} &= \sigma_{\varepsilon \exp} \sqrt{\frac{H_i + 1}{H_i}} \\ \text{avec } \lim_{N \rightarrow \infty} \left(\frac{H_i + 1}{H_i} \right) &= 1 \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 65)$$

La relation 65 indique que pour un nombre de coups H_i dans le canal tendant vers l'infini, l'erreur sur la détermination du pouvoir d'arrêt ne dépend plus que de la précision sur les ajustements des courbes expérimentales. Ziegler et al proposent de les estimer à partir de l'écart entre toutes les données expérimentales existantes et la courbe de simulation, soit 3,9% (Ziegler, et al., 2010).

L'incertitude sur la mesure de la perte d'énergie par canal est liée à l'incertitude sur la calibration en énergie des spectres. En effet, on a

$$\text{soit, } \left\{ \begin{aligned} E_1 &= a * C_1 + b \\ E_2 &= a * C_2 + b \\ \Delta E &= E_1 - E_2 = a * \Delta C \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 66)$$

Et

$$\text{soit } \left\{ \begin{aligned} a &= \frac{\Delta E}{\Delta C} \\ \frac{\Delta a}{a} &= \frac{\Delta(\Delta E)}{\Delta E} + \frac{\Delta(\Delta C)}{\Delta C} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 67)$$

L'incertitude sur la différence en énergie des particules dépend de la stabilité en énergie de la machine car

$$\left. \begin{array}{l} \Delta E = E_1 - E_2 \\ \text{et } \frac{\Delta(\Delta E)}{\Delta E} = \frac{dE_1}{E_1} + \frac{dE_2}{E_2} = 2 * \frac{dE}{E} \end{array} \right\} \quad (Eq. 68)$$

Où $\frac{dE}{E}$ est la stabilité en énergie de la machine et vaut environ $2,5 \cdot 10^{-5}$.

L'incertitude relative sur la mesure de l'écart en position entre 2 pics dépend de la largeur des pics et du nombre de particules détectées.

$$\delta^2 = \frac{FWHM_1}{2,35 * N_1} + \frac{FWHM_2}{2,35 * N_2} \quad (Eq. 69)$$

Où *FWHM* (Full Width at Half Maximum) est la largeur du pic à mi-hauteur¹⁷.

Cette erreur est de l'ordre de quelques dizaines de keV alors que la différence en énergie des pics utilisés pour la calibration est de l'ordre de quelques centaines de keV. D'où une erreur relative,

$$\frac{\Delta(\Delta C)}{\Delta C} = \frac{\delta}{\Delta E} \approx 10^{-2} \quad (Eq. 70)$$

Finalement, on peut écrire que

$$\frac{\Delta a}{a} = 2 * \frac{\Delta E}{E} + \frac{\delta}{\Delta E} \approx \frac{\delta}{\Delta E} \quad (Eq. 71)$$

L'erreur sur la calibration en énergie peut être négligée devant les incertitudes sur les pouvoirs d'arrêt si la calibration est effectuée à partir de pics suffisamment distants, et finalement l'incertitude sur la détermination de la masse par la méthode STIM est due essentiellement à l'incertitude sur les pouvoirs d'arrêt.

$$\frac{\Delta m}{m} = \frac{\Delta \varepsilon}{\varepsilon} + \frac{\delta}{\Delta E} \approx \frac{\Delta \varepsilon}{\varepsilon} < 4\% \quad (Eq. 72)$$

Le tableau suivant présente un récapitulatif du calcul des incertitudes sur la détermination de la masse par le logiciel Paparamborde.

¹⁷ Dans le cas d'un pic gaussien, la largeur à mi-hauteur vaut : $FWHM = 2,35 \times \sigma$.

Tableau 4 : Récapitulatif des incertitudes de calcul de la masse surfacique par Paparamborde.

Variable	Formulation	Valeur
m , masse de l'échantillon	$\frac{\Delta m}{m} = \frac{\Delta m_i}{m_i}$	$< 4\%$
m_i , masse correspondant au canal i	$\frac{\Delta m_i}{m_i} = \frac{\Delta a}{a} + \frac{\Delta \varepsilon_i}{\varepsilon_i}$	$< 4\%$
a , pente de la droite de calibration	$\frac{\Delta a}{a} = \frac{\Delta(\Delta E)}{\Delta E} + \frac{\Delta(\Delta C)}{\Delta C}$	$\approx 10^{-2}$
ΔE , écart en énergie des pics de la calibration	$\frac{\Delta(\Delta E)}{\Delta E} = \frac{dE_1}{E_1} + \frac{dE_2}{E_2} = 2 * \frac{dE}{E}$	$\approx 5.10^{-2}$
ΔC , écart en canaux des pics de calibration	$\frac{\Delta(\Delta C)}{\Delta C} = \frac{\delta}{\Delta E}$	$\approx 10^{-2}$
ε_i , pouvoir d'arrêt correspondant au canal i	$\frac{\Delta \varepsilon_i}{\varepsilon_i}$	$< 4\%$

4.1.6 LIMITE DE DETECTION

La limite de détection de la méthode peut être calculée à partir de la moyenne des mesures effectuées sur un blanc à laquelle on ajoute l'erreur associée à la méthode (Mc Naught, et al., 2003).

$$l_{dd} = \bar{E}_{blanc} + k * err. std \quad (Eq. 73)$$

Le facteur multiplicatif k est choisi en fonction de l'intervalle de confiance désiré. Il est égal à 1,96 pour un intervalle de confiance de 95%.

On peut calculer la limite de détection de la méthode STIM à partir du signal mesuré directement sur le détecteur. La mesure du blanc correspond à la perte d'énergie minimale mesurable correspondant à la résolution en énergie du détecteur STIM. Par ailleurs, l'erreur sur la détermination de la position d'une fonction gaussienne est donnée par la formule de l'erreur standard

$$err. std (Gauss) = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (Eq. 74)$$

D'où il vient que la limite de détection peut s'écrire de la manière suivante,

$$l_{dd} = FWHM_{détecteur} + \frac{1,96}{2,35} * \frac{FWHM_{détecteur}}{\sqrt{N}} \quad \left. \vphantom{l_{dd}} \right\} \quad (Eq. 75)$$

*avec $FWHM = 2,35 * \sigma$*

Considérant une résolution en énergie du détecteur de 12 keV, on peut calculer la limite de détection de la méthode en fonction du nombre de particules

détectées (Figure 27). Dans ce cas, le calcul indique qu'à partir de 1000 particules détectées, la limite de détection se stabilise autour de 12 keV, soit une masse équivalente de polycarbonate ou de cellules de $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ou une épaisseur équivalente de 65 nm.

De manière similaire, on peut estimer la limite de quantification de la méthode. Elle est généralement définie comme égale à 3 fois la limite de détection (Mc Naught, et al., 2003). Dans notre cas, la limite de quantification est donc de 36 keV, soit une masse équivalente de $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de polycarbonate ou de cellules ou une épaisseur équivalente de 195 nm¹⁸. Cette limite de quantification est en adéquation avec les épaisseurs moyennes des monocouches cellulaires analysées qui varient entre 1 et 10 μm .

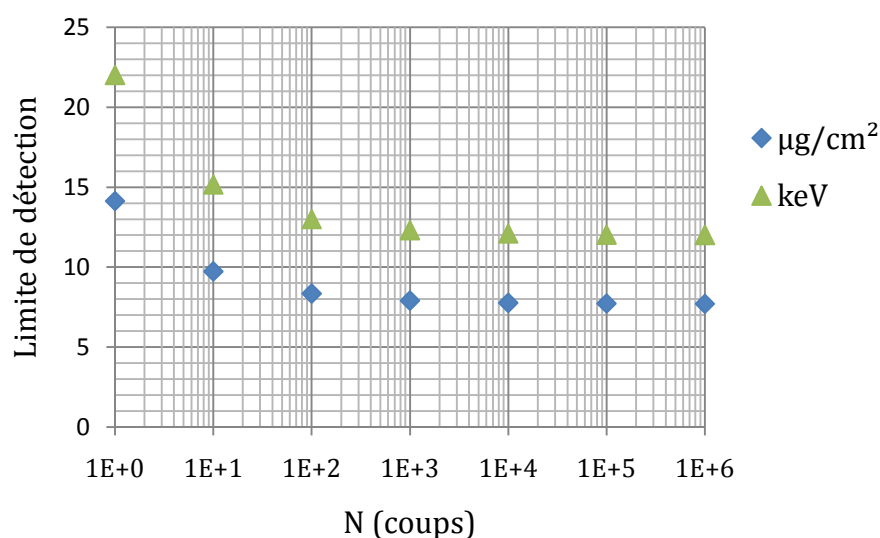


Figure 27 : Variation de la limite de détection (LDD) de la méthode STIM en fonction du nombre de particules détectées. La LDD est calculée en keV (vert), puis convertie en masse équivalente ou épaisseur équivalente (bleu) d'un échantillon à partir de la connaissance du pouvoir d'arrêt du matériau. Ici, la LDD est donnée en masse équivalente de polycarbonate.

4.1.7 RESOLUTION EN MASSE

¹⁸ Limite de quantification calculée pour un faisceau de He^+ de 2 MeV. Dans le cas d'un faisceau de protons de même énergie, la limite de quantification est multipliée par 10 ($240 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

La résolution en masse de la méthode STIM peut être calculée à partir de l'écart minimal en énergie en deçà duquel 2 distributions ne peuvent pas être séparées. La résolution en masse est un critère important de la qualité des images densimétriques obtenues par la méthode [chapitre 2.3 STIM]. Dans le cas d'une distribution gaussienne, l'incertitude sur la détermination de la position moyenne est donnée par la définition de l'erreur standard (Eq. 73).

Si on considère maintenant deux distributions identiques ($N_1 \approx N_2$ et $\sigma_1 \approx \sigma_2$) séparées par une énergie ΔE , on peut montrer que l'erreur δ commise sur la mesure de l'écart en énergie est

$$\left. \begin{array}{l} E_1 - E_2 = \Delta E \pm \delta \\ \text{avec } \delta^2 = \delta E_1^2 + \delta E_2^2 \\ \text{soit } \delta = \sigma \sqrt{\frac{2}{N}} \text{ si } \delta E_1 = \delta E_2 = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \end{array} \right\} \quad (Eq. 76)$$

Pour que les distributions soient séparées, il faut que l'écart en énergie soit au moins 3 fois supérieur à l'erreur.

$$\left. \begin{array}{l} \Delta E > 3 * \delta \\ \Delta E > 3 * \sigma \sqrt{\frac{2}{N}} \end{array} \right\} \quad (Eq. 77)$$

Dans le cas de 2 distributions correspondant à des masses très faibles d'échantillon, pour lesquelles on peut négliger le phénomène de dispersion en énergie des particules transmises dû à la nature aléatoire de l'interaction ions-matière, on peut considérer que $\sigma = FWHM/2,35$

$$\Delta E > \frac{3\sqrt{2}}{2,35} * FWHM * \frac{1}{\sqrt{N}} \quad (Eq. 78)$$

La résolution en masse présentée dans la Figure 28 est calculée pour une largeur à mi-hauteur correspondant à une résolution en énergie du détecteur de 12 keV. Cette résolution est inférieure à 1 keV au-delà de 470 particules détectées. Cette résolution a été calculée dans le cas optimal où la distribution ne présente aucune dispersion en énergie autre que celle due à la détection des particules. Dans le cas d'un échantillon plus épais, il faut considérer que la variance totale de la distribution en énergie des particules transmises est égale à la somme quadratique des écarts-types, soit

$$\sigma_{Total}^2 = \sigma_{détecteur}^2 + \sigma_{dispersion}^2 \quad (Eq. 79)$$

Si on reprend l'exemple précédent de la feuille de polycarbonate de 4 μm d'épaisseur, modèle d'un échantillon de monocouche cellulaire, la simulation Monte-Carlo de la distribution en énergie des particules transmises donnée par le logiciel SRIM indique que la dispersion en énergie était de 21 keV. Dans ce cas, la largeur de la distribution mesurée avec un détecteur possédant une résolution de 12 keV est donc

$$FWHM = 2,35 * \sqrt{12^2 + 21^2} = 24,2 \text{ keV}$$

soit une largeur de pic 2 fois plus importante que la largeur optimale déterminée par la résolution en énergie du détecteur. La résolution en masse équivalente est donc 2 fois moins importante que la résolution en masse optimale, soit une épaisseur de cellules de 8 nm pour $N = 10^3$ coups.

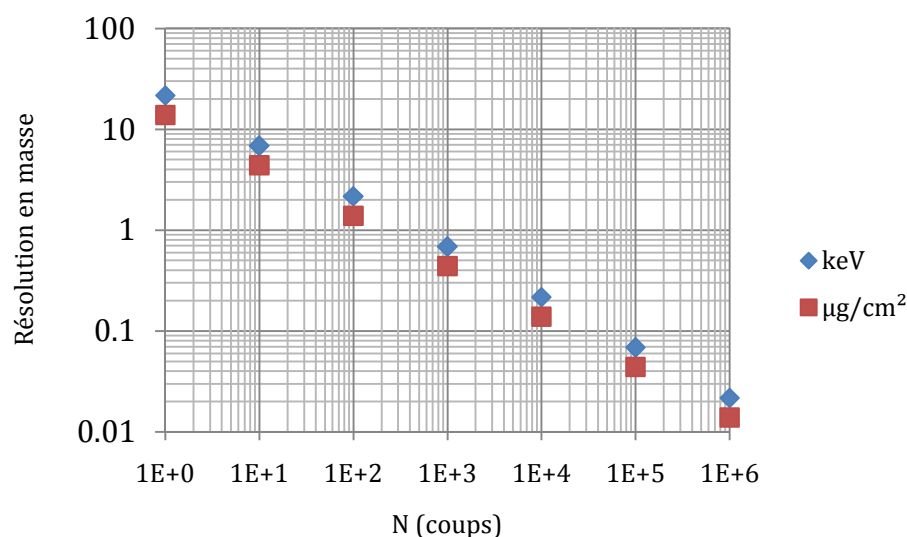


Figure 28 : Pouvoir de résolution de la méthode STIM en fonction du nombre de particules détectées. Le pouvoir de résolution exprimé en keV (bleu) peut être converti en masse surfacique de polycarbonate (rouge) à partir des pouvoirs d'arrêt.

4.1.8 VALIDATION DU CALCUL

Pour valider le calcul de la masse d'échantillon par le logiciel Paparamborde, on peut reprendre l'exemple de la feuille de polycarbonate de 4 μm , simulée avec un faisceau de particules alphas de 1,2 MeV donnant un spectre d'énergies transmises réparties de part et d'autre du maximum de la courbe des pouvoirs d'arrêt (Tableau 3). La masse surfacique de la feuille de polycarbonate mesurée avec le logiciel Paparamborde est 473 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Tableau 5). Cette masse équivaut à une épaisseur de 4 μm . L'écart par rapport à la valeur de référence (480 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) est proche de zéro, dans

un cas où le calcul par approximation à l'énergie moyenne donnait une erreur proche de 10% (Tableau 3).

Tableau 5 : Calcul de la masse surfacique d'une feuille de polycarbonate de $480 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ à partir d'un spectre simulé de pertes d'énergie (Figure 25, He^+ , 1,2 MeV).

	Référence	Paparamborde
Masse surfacique	480	473
Erreur relative		-0,1%

En complément, l'ensemble de la méthode, incluant les erreurs expérimentales, a été validé expérimentalement à partir de l'analyse de films polymère commerciaux d'épaisseur comprise entre $0,2 \mu\text{m}$ et $7,5 \mu\text{m}$. Des films non commerciaux dont l'épaisseur est inférieure à $1 \mu\text{m}$, ont été préparées à partir d'un bloc de résine époxy découpé au microtome. L'épaisseur des coupes a été mesurée au moyen de la microscopie à force atomique. Les résultats sont donnés dans les tableaux suivants (Tableau 6, Tableau 7).

Tableau 6 : Mesure de la masse surfacique et calcul de l'épaisseur équivalente de coupes de résine epoxy par la méthode STIM. Les épaisseurs de référence sont données par l'analyse de la tranche des coupes par microscopie à force atomique. Densité résine $d = 1,16$; Faisceau : $\alpha = 2 \text{ MeV}$.

Epaisseur AFM	Paparamborde		Ecart
(moyenne $\pm$ écart-type ; n=5) (nm)	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	(nm)	(%)
156 ± 17	$20,1 \pm 2,3$	173 ± 42	+10,9
477 ± 8	$54,3 \pm 6,3$	468 ± 38	-1,9
560 ± 43	$68,1 \pm 7,9$	587 ± 37	+4,8
804 ± 70	$98,8 \pm 11,4$	852 ± 32	+6,0

Tableau 7: Mesure de la masse surfacique et calcul de l'épaisseur équivalente de films polymères commerciaux par la méthode STIM. Les épaisseurs de référence sont données par le constructeur avec une incertitude de ± 10 %. Densités : polycarbonate = 1,2 ; Mylar = 1,395 ; Kapton = 1,42.

Référence	Paparamborde		Ecart %
	Masse	Epaisseur	
	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	(μm)	
Polycarbonate 3 μm	362	3,0	+0
Mylar 3,5 μm	530	3,8	+8,5
Polycarbonate 6 μm	774	6,5	+8,3
Kapton 7,5 μm	1065	7,5	+0

L'équivalence entre les mesures de l'épaisseur des films au moyen des méthodes AFM et de la méthode STIM, ainsi que l'accord avec les valeurs de référence données par les constructeurs des films polymère permet de valider expérimentalement l'analyse de la masse surfacique par le logiciel Paparamborde. L'erreur relativement importante (+10,9 %) calculée sur la coupe la plus fine (156 nm) peut s'expliquer par le fait que la masse équivalente est inférieure à la limite de quantification de la méthode (24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, ou ~ 200 nm).

4.2 ANALYSE QUANTITATIVE CELLULAIRE PAR COMBINAISON DES METHODES STIM-PIXE-RBS

4.2.1 PRINCIPE

Le principe de l'analyse par faisceaux d'ions de la composition chimique des échantillons biologiques fins, c'est-à-dire d'échantillons possédant une épaisseur inférieure au parcours moyen des particules dans la matière, repose sur la combinaison des techniques d'analyse PIXE et RBS ou STIM permettant de mesurer, respectivement, la masse surfacique d'un élément chimique et la masse surfacique totale. On a vu au chapitre précédent comment la spectrométrie STIM permettait de mesurer la masse surfacique d'un échantillon avec une précision inférieure à 5 %. La concentration d'un élément chimique $[C_{el}]$, est calculée en normalisant la masse surfacique des éléments chimiques donnée par l'analyse PIXE par la masse surfacique totale de l'échantillon :

$$[C_{el}] = \frac{m_{el}}{M_{total}} \quad (Eq. 80)$$

La principale limite de la méthode vient du fait que la masse organique de l'échantillon peut varier au cours de l'analyse à cause principalement des temps d'acquisition relativement longs nécessaires pour quantifier les éléments-traces dans des échantillons fins. Ces temps d'acquisition sont imposés par les faibles sections efficaces de rétrodiffusion, par l'angle solide PIXE limité et par la faible quantité de matière correspondant aux échantillons fins. A ce sujet, on peut noter que la quantité absolue d'un élément chimique dont la concentration est de l'ordre de $10^{-6} g/g$ dans une cellule unique, dont la masse sèche vaut environ $10^{-10} g$, est de $10^{-16} g$, soit environ 10^6 atomes. L'angle solide PIXE, de l'ordre de 0,1 Sr, est limité par la capacité de production de détecteurs de grande surface active. Au final, l'analyse des éléments-traces cellulaires dans une cellule unique nécessite plusieurs heures d'analyse avec un courant de quelques centaines de pico-ampères. Dans ces conditions, il est fréquent d'observer une modification de l'échantillon résultant de son irradiation. Néanmoins, tant que la perte de masse observée ne concerne que la matrice organique, le problème devient avant tout un problème de normalisation pouvant être résolu en mesurant la masse initiale au moyen de la méthode STIM. Dans cette combinaison des méthodes d'analyse par faisceaux d'ions, les méthodes STIM, PIXE et RBS sont alors respectivement employées pour déterminer la masse surfacique initiale de l'échantillon, la masse surfacique des éléments chimiques de numéro atomiques supérieur à 11 (Na) et ceux composant la matrice organique (C, N, O) qui sont mesurés par RBS (Carmona, et al., 2008).

4.2.2 INCERTITUDES SUR LA DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DES ELEMENTS CHIMIQUES

La relation précédente (Eq. 79) implique que l'incertitude sur la mesure de la concentration des éléments chimiques soit égale à la somme quadratique des erreurs sur la mesure de la masse surfacique d'un élément et de la masse surfacique totale qui sont mesurées indépendamment,

$$\frac{\Delta[C_{el}]}{[C_{el}]} = \sqrt{\left(\frac{\Delta m_{el}}{m_{el}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta M_{Total}}{M_{Total}}\right)^2} \quad (Eq. 81)$$

On a vu dans la partie précédente que l'incertitude sur la mesure de la masse d'échantillon au moyen de la méthode STIM était dominée par la contribution de l'incertitude sur les pouvoirs d'arrêt des matériaux. Soit

$$\frac{\Delta M_{Total}}{M_{Total}} \approx 4\% \quad (\text{rappel: Eq. 71})$$

Pour calculer l'incertitude associée à la mesure de la masse surfacique des éléments chimiques par la méthode PIXE, on peut revenir à la relation entre le nombre de photons X détectés N_d (Chapitre 2-1-PIXE) et les paramètres instrumentaux

$$N_d = \rho * dx * Q * \sigma_p * T * \varepsilon * \Omega_p \quad (Eq. 82)$$

Où $\rho * dx$ est la densité surfacique de l'échantillon (at/cm²), Q est le nombre de particules incidentes, σ_p la section efficace de production de rayonnements X, T est le facteur de transmission des photons X par les différents filtres placés devant le détecteur PIXE, ε est l'efficacité du détecteur et Ω_p l'angle solide de détection PIXE. La masse surfacique des éléments chimiques est donc donnée par la relation suivante

$$m_{el} = \rho * dx = \frac{N_d}{\sigma_p * Q * T * \varepsilon * \Omega_p} \quad (Eq. 83)$$

Et l'incertitude associée à la mesure est la somme quadratique suivante,

$$\frac{\Delta m_{el}}{m_{el}} = \sqrt{\left[\frac{\Delta \sigma_p}{\sigma_p}\right]^2 + \left[\frac{\Delta Q}{Q}\right]^2 + \left[\frac{\Delta \Omega_p}{\Omega_p} + \frac{\Delta N_d}{N_d} + \frac{\Delta T}{T} + \frac{\Delta \varepsilon}{\varepsilon}\right]^2} \quad (Eq. 84)$$

Où les mesures des sections efficaces de productions et de la charge sont considérées comme indépendantes des mesures de l'angle solide de détection, du nombre de photons détectés, de la transmission et de l'efficacité du détecteur qui sont elles mesurées simultanément à partir d'échantillons de référence de composition connue.

4.2.3 INCERTITUDES ASSOCIEES A L'ETALONNAGE DU DETECTEUR PIXE

Les méthodes PIXE et RBS sont utilisées en coïncidence temporelle, c'est à dire en utilisant le signal de temps mort de la voie PIXE comme condition de traitement des événements de la voie RBS, impliquant alors que la charge déposée soit identique pour les 2 voies d'acquisition. Les paramètres d'angle solide, d'efficacité de détection et de filtre de la voie PIXE peuvent alors être ajustés relativement à la charge mesurée à partir d'échantillons de référence de composition connue.

$$T * \varepsilon * \Omega_p = \frac{1}{Q} * \frac{N_d}{\sigma_p * \rho. dx} \quad (Eq. 85)$$

Si on appelle H le produit de la transmission, de l'efficacité de détection et de l'angle solide PIXE, alors on voit que le produit de H par Q est une caractéristique du système de détection globalement équivalente à l'efficacité totale de détection.

$$\left. \begin{aligned} H &= T * \varepsilon * \Omega_p \\ H * Q &= \frac{N_d}{\sigma_p * \rho. dx} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 86)$$

Le produit $H * Q$ correspond au rapport entre le nombre de photons détectés et le nombre de photons émis et varie avec l'énergie des photons X. Cette variation peut être mesurée à partir d'échantillons de référence donnant un spectre de raies couvrant la gamme d'énergie de fonctionnement du détecteur (1-30 keV).

Si on reprend le calcul de l'incertitude sur la mesure de la masse surfacique d'un élément chimique dans le cas d'un détecteur étalonné, on a

$$\rho. dx = \frac{N_d}{\sigma_p * [H * Q]} \quad (Eq. 87)$$

$$\text{soit } \frac{\Delta m_{el}}{m_{el}} = \frac{\Delta(\rho. dx)}{\rho. dx} = \sqrt{\left[\frac{\Delta\sigma_p}{\sigma_p}\right]^2 + \left[\frac{\Delta N_d}{N_d}\right]^2 + \left[\frac{\Delta[H * Q]}{[H * Q]}\right]^2} \quad (Eq. 88)$$

Avec l'incertitude sur la mesure de l'efficacité donnée par l'analyse d'échantillons de référence

$$\frac{\Delta[H * Q]}{[H * Q]} = \frac{\Delta H}{H} + \frac{\Delta Q}{Q} = \sqrt{\left[\frac{\Delta\sigma_p}{\sigma_p}\right]^2 + \left[\frac{\Delta N_d}{N_d}\right]_{ref}^2 + \left[\frac{\Delta(\rho. dx)}{\rho. dx}\right]_{ref}^2} + \frac{\Delta Q}{Q} \quad (Eq. 89)$$

4.2.4 ESTIMATION DE L'INCERTITUDE TOTALE DE MESURE POUR UN DISPOSITIF EXPERIMENTAL CALIBRE

4.2.4.1 Incertitudes sur les sections efficaces de production du rayonnement X

Les variations des sections efficaces expérimentales d'ionisation pour les raies K et L sont reproduites par le logiciel GupixWin (Campbell, et al., 2000) avec un écart inférieur à 1% . Les sections efficaces de production sont liées aux sections efficaces d'ionisation par l'intermédiaire du rendement de fluorescence et du rapport d'embranchement,

$$\sigma_p = \sigma_i * \omega * k \quad (Eq. 90)$$

Soit en négligeant les incertitudes sur le rendement de fluorescence et le rapport d'embranchement,

$$\frac{\Delta\sigma_p}{\sigma_p} = \sqrt{\left(\frac{\Delta\sigma_i}{\sigma_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\omega}{\omega}\right)^2 + \left(\frac{\Delta k}{k}\right)^2} \approx \frac{\Delta\sigma_i}{\sigma_i} < 1\% \quad (Eq. 91)$$

4.2.4.2 Incertitudes sur la mesure du nombre de photons X détectés

L'incertitude sur le nombre de photons détectés est donnée par le logiciel GupixWin (Campbell, et al., 2000) utilisé pour le traitement des données PIXE. Le logiciel évalue les erreurs sous forme, soit d'une incertitude de type « statistique », calculée à partir de l'évaluation du nombre de coups dans le fond autour du pic d'intérêt, soit d'une incertitude de type « ajustement » calculée à partir de l'écart entre la simulation et le spectre expérimental. Les deux incertitudes correspondent à deux modes de calcul de la même erreur et sont données pour aider l'utilisateur à évaluer la justesse de son analyse. L'ordre de grandeur de ces erreurs est donc le même. On peut essayer de l'évaluer à partir du calcul de l'erreur 'statistique' dérivé de l'analyse du nombre total de coups N contenus dans un pic d'intérêt et provenant de l'élément d'intérêt (P), du fond (B), et le cas échéant d'un recouvrement de pic voisin (O) (Figure 29)

$$N = P + O + B \quad (Eq. 92)$$

Dans le cas idéal où il n'y a pas de pic de superposition ($O = 0$), l'erreur statistique est la somme quadratique de l'erreur sur la mesure de l'aire du pic N et de l'erreur sur l'évaluation du bruit de fond B .

$$\left. \begin{array}{l} \sigma_P^2 = \sigma_N^2 + \sigma_B^2 \\ \sigma_P^2 = N + B \\ \sigma_P = \sqrt{N + B} \end{array} \right\} \quad (Eq. 93)$$

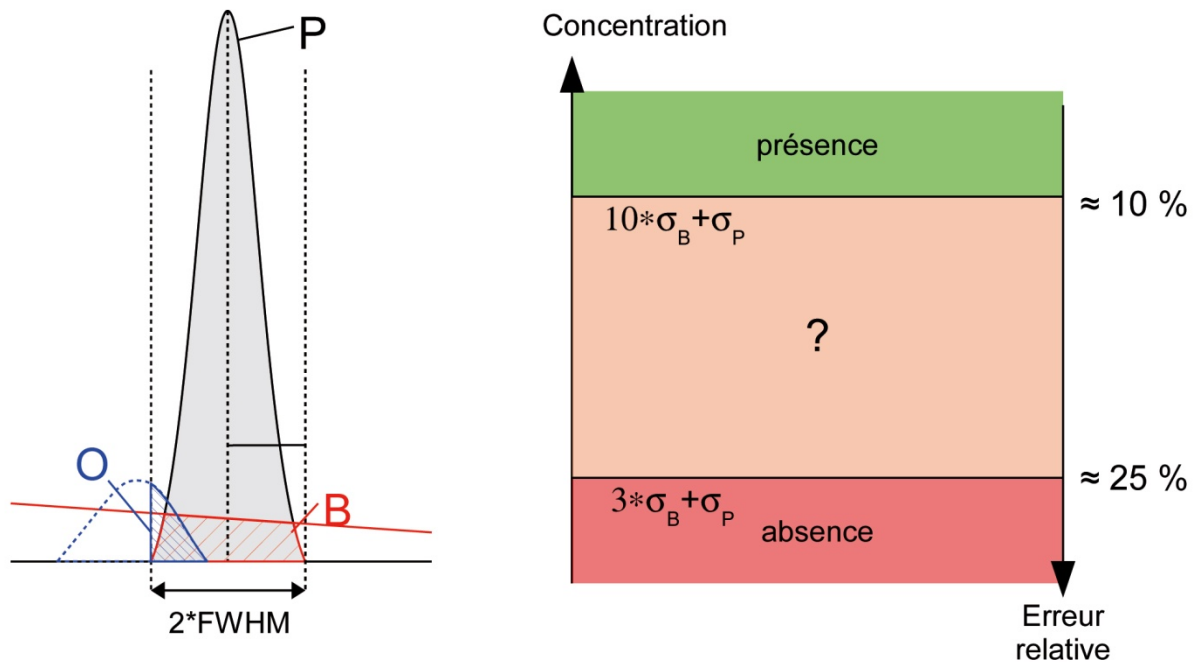


Figure 29 : Gauche : Contributions à la formation des pics des spectres PIXE. Le nombre total de coups dans un pic dépend de la concentration de l'élément d'intérêt (P), de la contribution du bruit de fond (B), et de la superposition avec les pics voisins (O). Droite : la traduction des concepts de limite de détection et de limite de quantification en termes d'erreur relative indique que les seuils de présence d'un élément chimique dans l'échantillon et d'absence correspondent respectivement à des erreurs relatives de l'ordre de 10% maximum et 25% minimum.

4.2.4.3 Estimation de l'erreur relative dans le cas de concentrations correspondant aux limites de détection et de quantification

Pour donner un ordre de grandeur de l'erreur relative sur la mesure du nombre de photons détectés, on peut partir de la définition des limites de détection et de quantification de la méthode PIXE. Elles sont définies à partir de l'évaluation de la surface d'un pic par rapport au bruit de fond, par les relations suivantes :

$$\text{limite de détection} = 3 * \sigma_B$$

$$\text{limite de quantification} = 10 * \sigma_B$$

La limite inférieure en deçà de laquelle le logiciel GupixWin considère que la concentration est inférieure à la limite de détection correspond à la limite de détection plus l'erreur sur la mesure. La limite supérieure, à partir de laquelle on peut considérer que l'élément est présent dans l'échantillon en quantité mesurable, est définie comme égale à la limite de quantification plus l'erreur sur la mesure.

Dans le cas idéal où il n'y a pas de pic de superposition ($O = 0$) et où le fond est évalué à partir de l'incertitude sur la mesure du nombre de photons X , on peut estimer les seuils définis précédemment en termes d'erreurs relatives (Figure 29).

$$\sigma_B = \sigma_P \text{ (Eq. 94)}$$

Dans le cas où la concentration d'un élément est supérieure au seuil de présence, on peut écrire que

$$\left. \begin{array}{l} P > 10 * \sigma_B + \sigma_P \\ P > 11 * \sigma_P \\ \text{Et finalement,} \\ \frac{\sigma_P}{P} < \frac{1}{11} \approx 10 \% \end{array} \right\} \text{ (Eq. 95)}$$

Un calcul identique pour le seuil de détection indique que pour des erreurs supérieures à 25%, l'élément est considéré comme ayant une concentration inférieure à la limite de détection.

$$\left. \begin{array}{l} P > 3 * \sigma_B + \sigma_P \\ \frac{\sigma_P}{P} < \frac{1}{4} \approx 25 \% \end{array} \right\} \text{ (Eq. 96)}$$

4.2.4.4 Incertitude sur la mesure de l'efficacité totale de détection [$H * Q$]

L'incertitude sur la mesure de l'efficacité du détecteur, outre les incertitudes sur les sections efficaces de production du rayonnement X et sur la mesure de l'aire des pics du spectre PIXE, est donnée par l'incertitude sur la masse surfacique des échantillons de référence utilisés. Dans le cas des échantillons de référence commercialisés par la société Micromatter Inc., la masse surfacique des couches minces déposées sur une feuille de Mylar est donnée à $\pm 5\%$. Si on considère que pour l'analyse de ces standards le nombre de coups détectés est relativement important et l'erreur associée relativement faible, de l'ordre de 1 % pour une surface comprenant 10^4 coups. On peut donc écrire que l'incertitude sur la mesure de l'efficacité de détection vaut

$$\left. \begin{array}{l} \frac{\Delta H}{H} = \sqrt{\left[\frac{\Delta \sigma_p}{\sigma_p}\right]^2 + \left[\frac{\Delta N_d}{N_d}\right]_{ref}^2 + \left[\frac{\Delta(\rho \cdot dx)}{\rho \cdot dx}\right]_{ref}^2} \\ \frac{\Delta H}{H} = \sqrt{0,01^2 + 0,01^2 + 0,05^2} = 5,2\% \end{array} \right\} \text{ (Eq. 97)}$$

4.2.4.5 Incertitude sur la mesure de la charge

La mesure de la charge est effectuée à partir du spectre RBS enregistré simultanément à l'analyse PIXE. La hauteur des pics sur les spectres RBS dépend en effet de la charge déposée au cours de l'irradiation, ainsi que de la section efficace de

rétrodiffusion, de l'angle solide de détection et de la concentration atomique de l'élément chimique considéré. L'incertitude sur la mesure de la charge est calculée en considérant comme indépendantes les mesures sur les sections efficaces et sur l'angle solide de détection d'une part et sur la hauteur du pic et la composition chimique de la matrice d'autre part.

$$\frac{\Delta Q}{Q} = \sqrt{\left[\frac{\Delta H_0}{H_0} + \frac{\Delta(Nt)}{Nt}\right]^2 + \left[\frac{\Delta\sigma(E_0)}{\sigma(E_0)}\right]^2 + \left[\frac{\Delta\Omega}{\Omega}\right]^2} \quad (Eq. 98)$$

Que ce soit dans le cas des échantillons cellulaires, cultivés sur un support polycarbonate de 2 μm d'épaisseur, ou que ce soit sur les échantillons de référence utilisés pour la calibration du détecteur PIXE, la mesure de charge est effectuée à partir du signal de rétrodiffusion provenant du support, en particulier sur le pic du carbone qui est le pic le plus intense. La hauteur du pic de carbone dépend de la durée de l'acquisition mais on peut l'évaluer à partir des spectres obtenus sur la ligne comme étant de l'ordre de $10^2 \text{ coups}/\mu\text{C}/\%_{\text{at}} \text{ C}$ ¹⁹. Dans le cas d'un échantillon biologique lyophilisé, la concentration de carbone est d'environ 30 $\%_{\text{at}}$ et le courant incident limité généralement à 500 pA. La hauteur du pic de carbone pour une acquisition d'une heure est donc

$$H = 10^2 \times 500 \times 10^{-6} \times 3600 \times 30 = 5400$$

Soit

$$\frac{\Delta H}{H} = 1,4\%$$

L'erreur relative sur la mesure de la masse surfacique du carbone est difficile à évaluer car elle dépend de la concentration de l'hydrogène qui n'est pas mesurée. Dans le cas des échantillons de référence utilisés pour la calibration, la composition chimique du Mylar a été fixée à la composition théorique. Dans le cas des échantillons biologiques, la teneur en hydrogène est généralement fixée relativement à la concentration du carbone,

$$\frac{[H]}{[C]} \approx 1,7$$

Ces hypothèses concernant la concentration en hydrogène des échantillons sont tout à fait justifiées mais leur validité suppose que la composition chimique de l'échantillon, en tout cas celle du support, ne change pas au cours de l'analyse. En

¹⁹ $\%_{\text{at}}$, pourcentage en fraction atomique.

première approximation, on fera l'hypothèse que les supports de Mylar ou de polycarbonate ont le même comportement pendant toutes les analyses. Pour évaluer les incertitudes associées à la mesure de la charge, on peut considérer qu'une erreur relative de 10 % sur la teneur en hydrogène se traduit par une erreur de 5 % sur la masse de carbone utilisée pour la mesure de charge, avec une concentration atomique de l'ordre de 50 %.

Les sections efficaces de rétrodiffusion expérimentales ont été ajustées avec une précision de 2 % (Amirikas, et al., 1993).

$$\frac{\Delta\sigma(E_0)}{\sigma(E_0)} < 2\%$$

La mesure de l'angle solide a été effectuée à partir de la mesure de la distance cible-détecteur et de la surface active du détecteur en utilisant la relation suivante :

$$\Omega \simeq \frac{S}{d^2} \quad (Eq. 99)$$

Soit,

$$\left. \begin{aligned} d\Omega &= \frac{\partial\Omega}{\partial S} dS + \frac{\partial\Omega}{\partial d} dd \\ d\Omega &= \frac{dS}{d^2} - \frac{2S \cdot dd}{d^3} \\ \Delta\Omega &= \sqrt{\left[\frac{\Delta S}{d^2}\right]^2 + \left[\frac{2S \Delta d}{d^3}\right]^2} \end{aligned} \right\} \quad (Eq. 100)$$

Et finalement

$$\frac{\Delta\Omega}{\Omega} = \sqrt{\left[\frac{\Delta S}{S}\right]^2 + \left[\frac{2 \Delta d}{d}\right]^2} \quad (Eq. 101)$$

L'incertitude sur la mesure de la surface active du détecteur n'est pas connue, mais on peut supposer qu'elle est assez faible. Si on considère une surface active de 30 mm², le rayon du détecteur est donc de 3,09 mm et la précision sur la mesure du rayon de 0,1 mm donne une erreur relative de 6,45 %. La distance cible-détecteur mesurée est 30 mm avec une précision de 1 mm, soit une erreur relative de 3,33 %. Au final, on peut estimer que l'incertitude sur la mesure de l'angle solide de détection RBS est

$$\frac{\Delta\Omega}{\Omega} = \sqrt{0,0645^2 + (2 \times 0,033)^2} = 9,3\%$$

En reprenant les évaluations précédentes on peut estimer que l'incertitude sur la mesure de la charge par RBS est de l'ordre de 11,4 %.

$$\frac{\Delta Q}{Q} = \sqrt{[0.014 + 0.05]^2 + [0.02]^2 + [0.093]^2} = 11,4\%$$

4.2.4.6 Incertitude totale

Le tableau suivant (Tableau 8) présente un récapitulatif des différentes sources d'erreurs associées à la mesure de la concentration des éléments chimiques par les méthodes d'analyse par faisceau d'ions. Au final, la concentration des éléments chimiques mesurée par la combinaison des méthodes d'analyse STIM, RBS et PIXE est de l'ordre de 20% pour un système parfaitement calibré et pour un élément chimique dont la concentration est égale à la limite de quantification. L'erreur totale dépend principalement de l'erreur sur la mesure de la surface du pic d'émission X et de la mesure de la charge par RBS. Dans le cas d'un élément chimique dont la concentration est plus importante on peut s'attendre à ce que l'erreur relative diminue significativement.

Tableau 8 : Récapitulatif des incertitudes de mesures associées à la mesure de la concentration d'un élément chimique par la combinaison des méthodes STIM-PIXE-RBS.

Variable	Formule	Valeur
Concentration d'un élément chimique	$\frac{\Delta[C_{el}]}{[C_{el}]} = \sqrt{\left(\frac{\Delta m_{el}}{m_{el}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta M_{Total}}{M_{Total}}\right)^2}$	< 19,8%
Masse surfacique totale (STIM)	$\frac{\Delta M_{Total}}{M_{Total}}$	4%
Masse surfacique élémentaire (PIXE-RBS)	$\frac{\Delta m_{el}}{m_{el}} = \sqrt{\left[\frac{\Delta \sigma_p}{\sigma_p}\right]^2 + \left[\frac{\Delta N_d}{N_d}\right]^2 + \left[\frac{\Delta[H * Q]}{[H * Q]}\right]^2}$	< 19,4%
Sections efficaces de production du rayonnement X	$\frac{\Delta \sigma_p}{\sigma_p}$	< 1%
Surface du pic d'intérêt	$\frac{\Delta N_d}{N_d}$	< 10%
Efficacité de détection X	$\frac{\Delta H}{H} = \sqrt{\left[\frac{\Delta \sigma_p}{\sigma_p}\right]^2 + \left[\frac{\Delta N_d}{N_d}\right]_{ref}^2 + \left[\frac{\Delta(\rho \cdot dx)}{\rho \cdot dx}\right]_{ref}^2}$	5,2%
Charge	$\frac{\Delta Q}{Q} = \sqrt{\left[\frac{\Delta H_0}{H_0} + \frac{\Delta(Nt)}{Nt}\right]^2 + \left[\frac{\Delta \sigma(E_0)}{\sigma(E_0)}\right]^2 + \left[\frac{\Delta \Omega}{\Omega}\right]^2}$	11,4%
Hauteur du pic de carbone	$\frac{\Delta H_0}{H_0}$	≈ 1,5%
Masse surfacique du carbone	$\frac{\Delta(Nt)}{Nt}$	5%
Sections efficaces de rétrodiffusion	$\frac{\Delta \sigma(E_0)}{\sigma(E_0)}$	2%
Angle solide RBS	$\frac{\Delta \Omega}{\Omega}$	9,3%
Efficacité totale de détection	$\frac{\Delta[H * Q]}{[H * Q]} = \frac{\Delta H}{H} + \frac{\Delta Q}{Q}$	16,6%

Rappel : $[C_{el}]$, concentration d'un élément chimique (g/g) ; m_{el} , masse surfacique d'un élément chimique (g/cm²) ; M_{Total} , masse surfacique d'un échantillon (g/cm²) ; σ_p , section efficace de production d'un photon X (cm⁻²) ; N_d , nombre de photons détectés (coups) ; H , efficacité de détection ; Q , charge déposée au cours de l'analyse (C) ; H_0 , hauteur du pic du carbone (coups) ; Nt , masse surfacique du carbone (g/cm²) ; $\sigma(E_0)$, section efficace de diffusion Rutherford à l'énergie E_0 ; Ω , angle solide de détection RBS.

4.3 DEVELOPPEMENT D'UNE BASE DE DONNEES DE COMPOSITIONS CHIMIQUES

L'analyse des cellules isolées permet d'observer la distribution des éléments chimiques à l'échelle subcellulaire, elle est néanmoins, d'un point de vue expérimental, assez contraignante, notamment en termes de durée des analyses, car il s'agit d'analyser des éléments peu concentrés dans une quantité de matière réduite²⁰. Parallèlement aux développements instrumentaux permettant d'optimiser les temps d'acquisition, il est intéressant de développer des solutions en amont de l'analyse permettant de retirer un maximum d'information des données expérimentales. C'est dans ce sens que nous avons développé une base de données de compositions chimiques cellulaires (BDC4).

4.3.1 DEMARCHE QUALITE

La création de la base de données de compositions chimiques cellulaires est un moyen d'augmenter la taille des groupes d'échantillons. *In fine*, l'augmentation du volume de données doit permettre de définir des compositions chimiques de référence pour tous les types d'échantillons analysés avec la possibilité d'identifier des anomalies chimiques intra- ou inter cellulaires.

Nous avons développé une base de données selon les principes de l'assurance qualité définis dans le guide FD X50-550 (« Démarche Qualité en recherche - Principes Généraux et recommandations ») (Piédallu, 2001) et le référentiel NF EN ISO/CEI 17025 (« Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ») (Slama, 2000). La base de données est développée selon une approche orientée « client », par processus, en intégrant une démarche d'amélioration continue. La démarche qualité implique par ailleurs une approche factuelle pour la prise de décision nécessitant la définition d'objectifs mesurables. L'intérêt de la démarche qualité est qu'elle intègre dans les étapes de création, d'alimentation et d'utilisation de la base de données des critères extra-scientifiques (formation des utilisateurs, convivialité d'utilisation, pertinence des résultats de recherche) qui ont une influence sur sa qualité intrinsèque. La création de la base de données, selon les principes de l'assurance qualité, garantit en un sens le développement d'un outil d'analyse conforme aux attentes des chercheurs, et évolutif permettant d'augmenter sa pertinence.

4.3.1.1 Clarification de la problématique et identification des causes du problème

²⁰ Si on considère une cellule ronde de diamètre égal à 10 μm et possédant une masse surfacique de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, on peut calculer que la masse totale de la cellule est de l'ordre de 0,1 ng (surface, $S \approx 100 \mu\text{m}^2$)

L'enjeu de l'élaboration de la base de données pour la capitalisation des données de composition chimique a été définie au moyen d'un questionnaire de type QQQQCCP permettant de préciser la problématique, de recenser les acteurs concernés et de définir les aspects temporels et spatiaux (Tableau 9).

Tableau 9 : Clarification du problème posé par l'élaboration d'un questionnaire de type QQQQCCP.

Donnée d'entrée	Capitaliser les connaissances de compositions chimiques dans une base de données	
Qui est concerné par le problème?	Acteurs directs: Emetteurs et récepteurs: personnels du groupe ICCS (chercheurs, ingénieurs, doctorants)	Acteurs indirects (éventuels): Emetteurs : néant Récepteurs : chercheurs extérieurs, tout public intéressé
Quoi?	Créer une base de données exhaustive, accessible, mise à jour en continu, pertinente dans les résultats obtenus.	
Où ?	Prioritairement, dans le laboratoire demandeur (intranet), et éventuellement à l'extérieur, chez le public intéressé (extranet)	
Quand ?	En permanence.	
Comment ?	Actuellement uniquement une base de données sous format papier ou fichiers informatiques séparés, très faiblement exploitée.	
Pourquoi ?	Pour pouvoir utiliser de façon optimale l'ensemble des données antérieures et celles à venir.	
Donnée de sortie	Comment capitaliser les connaissances de compositions chimiques dans une base de données ?	

Le projet d'élaboration d'une base de données de compositions chimiques, qui répond en premier lieu à une attente des personnels internes au laboratoire, peut être ouvert à l'ensemble de la communauté scientifique, à commencer par les groupes de recherches utilisant les techniques d'analyse par faisceaux d'ions et qui partagent nos problématiques. La mise en service de la base de données répond à la fois à une demande d'information des personnels concernés, et propose un accès simplifié aux données permettant d'obtenir une vue d'ensemble de la composition chimique des cellules (Figure 30). Au delà de l'acquisition de nouvelles connaissances par la mise en commun d'informations disparates, la base de données permet d'optimiser les coûts de fonctionnement par un gain attendu en efficacité.

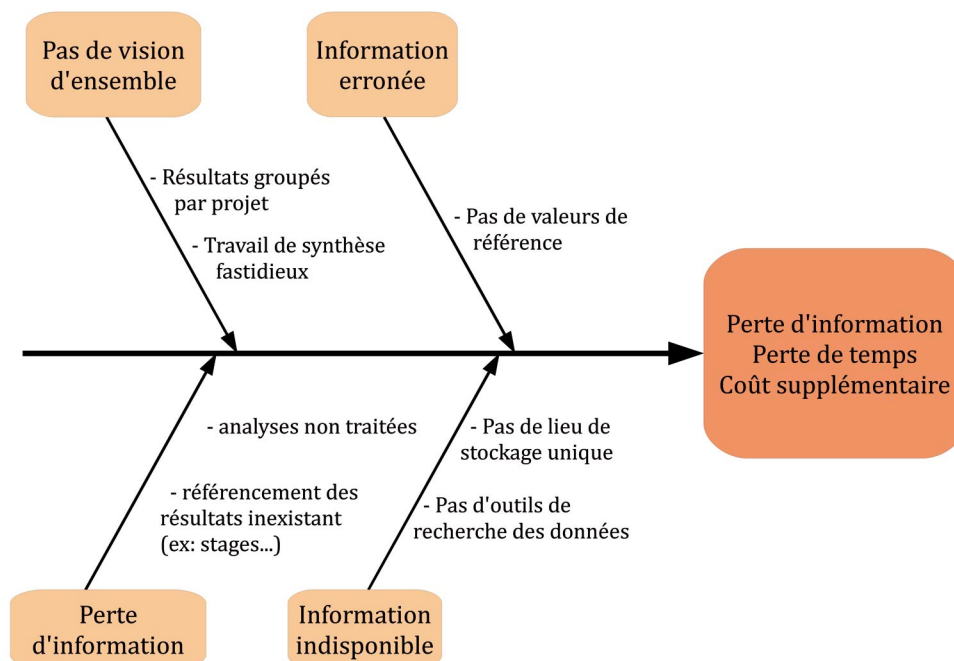


Figure 30: Diagramme de type causes-effets recensant les problèmes posés par l'absence de base de données de la composition chimique cellulaire.

Le questionnaire QQQCCP conduit à se poser la question de la *capitalisation* des données, c'est à dire, au delà du recensement et de l'archivage des données, de leur *exploitation optimale* à des fins de recherche, un résultat qui peut être représenté dans un diagramme de type causes-effets (Figure 30), recensant les principaux problèmes auxquels la base de données peut apporter une solution. Au delà des aspects pratiques de la base permettant un gain en temps dans le traitement des données, son développement doit permettre de générer des valeurs de référence pour les compositions chimiques cellulaires qui pourront être utilisées ultérieurement pour vérifier la validité de nouvelles compositions chimiques cellulaires et différencier chimiquement types et/ou structures cellulaires.

4.3.2 ACTIONS PRIORITAIRES

Un exercice de type *brainstorming silencieux* permet d'identifier les actions à mener pour répondre à la question précédemment posée « comment capitaliser les connaissances de compositions chimiques dans une base de données » ? (Annexes, 8.3.1 Tableau 23) Les actions à mener peuvent ensuite être regroupées par thèmes, eux-mêmes classés par priorité. On a pu définir ainsi 5 priorités pour la conception de la base de données :

1. Identifier et impliquer les personnes compétentes pour la rédaction du cahier des charges
2. Créer physiquement la base de données répondant aux spécifications
3. Avoir une base de données conviviale et exhaustive

4. Informer et former le personnel en interne
5. Développer l'accès à la connaissance à l'extérieur du laboratoire

Les opérations de définition du cahier des charges et de réalisation de la base de données ont été définies comme les actions prioritaires. Un point intéressant dans le recours à la démarche qualité est l'introduction de critères comme la convivialité et la communication vers l'extérieur. Ces critères qui ont à l'évidence une influence sur l'alimentation et l'utilisation de la base de données, avec des répercussions sur la capitalisation des données, sont logiquement introduits dans l'étape d'élaboration, car la démarche qualité est par essence une réflexion sur les conditions de fonctionnement des activités de recherche. Le risque majeur associé à chacune des actions prioritaires et les solutions à apporter le cas échéant peuvent être identifiés a priori et permettre d'initier le processus d'amélioration continue.

4.3.3 CARTOGRAPHIE DES PROCESSUS

Dans une approche processus des activités (Segot, 2000), on distingue les processus de réalisation (création, alimentation, consultation de la base de données) des processus de direction (pilotage), de support (matériel, personnel, financier) et des processus considérés comme critiques (Annexes, 8.3.2 Figure 49). En se fixant comme objectif la satisfaction des utilisateurs (chercheurs internes, externes), on peut identifier que les processus critiques sont la mesure des besoins en termes d'information chimique, l'accès à l'information, la mesure de la satisfaction des utilisateurs et la communication (articles scientifiques, lettre d'information, plaquette, site internet) vers l'extérieur. En interne, les étapes critiques correspondent à l'analyse des indicateurs d'utilisation de la base de données (taux de remplissage, nombre de recherche), l'analyse des enquêtes de satisfaction, la revue des processus et le déploiement des ressources nécessaires. Chacun de ces processus est vital dans le sens où il suffirait à rompre la boucle d'amélioration continue initiée par la démarche qualité. La démarche processus est un système fractal dans la mesure où chaque processus représenté dans la Figure 49 pourrait lui même être cartographié selon la même procédure. L'approche processus implique donc la désignation d'un pilote devant identifier les processus stratégiques.

4.3.4 DESCRIPTION DE LA BASE DE DONNEES BDC4

La base de données pour la capitalisation des données de compositions chimiques (BDC4, Base de Données pour la Capitalisation des Compositions Chimiques Cellulaires) a été développée à partir du logiciel commercial FileMaker Pro, un gestionnaire de base de données relationnelles. La base est constituée à partir de 3

tables principales permettant de gérer les analyses, les échantillons et les images (repérages, montages expérimentaux et cartographies chimiques), ainsi que 5 tables secondaires permettant de normaliser l'entrée des données. Ces tables secondaires sont une table de taxonomie pour le référencement des types d'échantillons, une table d'expériences décrivant le type de données (AIFIRA, mais aussi ESRF et micro-XRF), une table référençant les zones d'intérêts pour l'identification des structures cellulaires, une table de concentrations des éléments chimiques mesurées s'appuyant sur le tableau de Mendeleev, et une table d'anomalies référençant les pannes observées et les solutions apportées au cours des expériences (Figure 31). Toutes ces tables sont construites à partir de fiches types élaborées en concertation avec les utilisateurs. D'un point de vue pratique, les tables sont reliées par une interface conviviale, faisant en sorte que l'architecture de BDC4 soit transparente pour l'utilisateur.

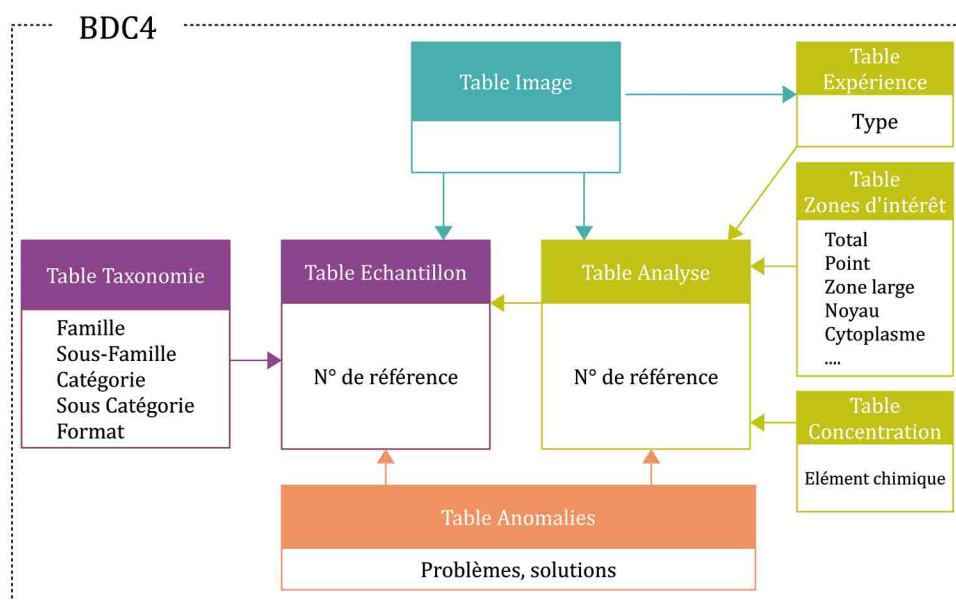


Figure 31: Architecture de la base de données relationnelle BDC4 pour la capitalisation des compositions chimiques cellulaires.

4.3.5 TABLES PRINCIPALES

La table « Echantillon » occupe une position centrale dans l'architecture de la base, car toutes les tables lui sont liées directement ou indirectement à travers la table « Analyse » (Figure 31). Les relations existant entre les tables sont exploitées de sorte que les informations liées d'une table soient visibles lors de la consultation des autres tables. Si l'on crée une nouvelle fiche d'« Analyse » d'un échantillon, les informations apparaîtront automatiquement sur la fiche de l'échantillon correspondant. De la même manière, la table « Echantillon » contient une autre table liée contenant les informations relatives aux images se rapportant à l'échantillon.

Les champs propres de la table « Echantillon » ('référence', 'nom') sont utilisés pour leur identification univoque. La seule manière de garantir la correspondance entre les échantillons « physiques » et les données est d'établir une correspondance stricte entre un échantillon et sa fiche dans la base de données. Au cours de l'analyse des données, la cellule, ou le compartiment cellulaire peuvent correspondre, du point de vue de la statistique, à un « individu ». On pourrait être alors tenté d'archiver les données en créant une fiche par « individu ». Mais, au-delà de l'aspect purement fastidieux de la démarche consistant à créer une fiche pour chaque cellule ou chaque noyau, ou chaque cytoplasme, le lien existant entre cet individu et les données afférentes ne pourrait plus être garanti (Figure 32).

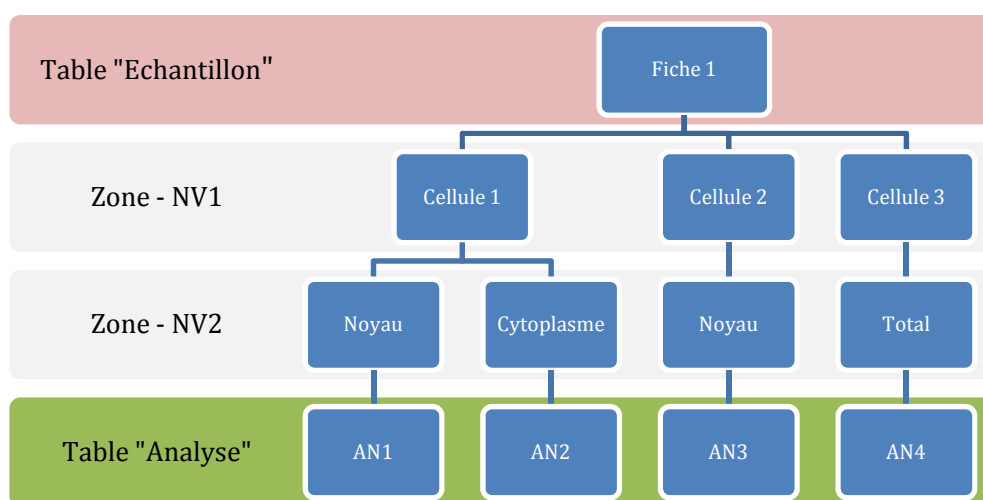


Figure 32 : Exemple de relations existant entre les tables « Echantillon » et « Analyse » permettant de différencier des « individus » au sens statistique du terme. Dans cet exemple, l'analyse des données a conduit à différencier 4 entités distinctes sur une même préparation, qui pourront être considérées séparément au cours du traitement statistique mais qui sont toutes reliées à la même fiche « Echantillon ».

Les informations permettant d'identifier les « individus » sont référencées dans la table « Analyse ». Pour un échantillon donné, il est possible de créer une infinité de fiches « analyse » se rapportant à autant de cellules, cytoplasmes, noyaux, que voulu.

La table « Image » est construite sur le même principe mais peut être liée indifféremment à une fiche « Echantillon », « Analyse » ou « Expérience ». L'apport majeur de la table « Image » reste néanmoins la possibilité de stocker les résultats des expériences d'imagerie de la distribution des éléments chimiques.

4.3.6 TABLES SECONDAIRES

Les tables secondaires permettent de créer un thésaurus afin de normaliser l'entrée des données dans la base. Par exemple, la création d'une fiche échantillon suppose la définition de son type selon une nomenclature prédéfinie comprenant les références à une famille, une catégorie et un format d'échantillon (Figure 33).

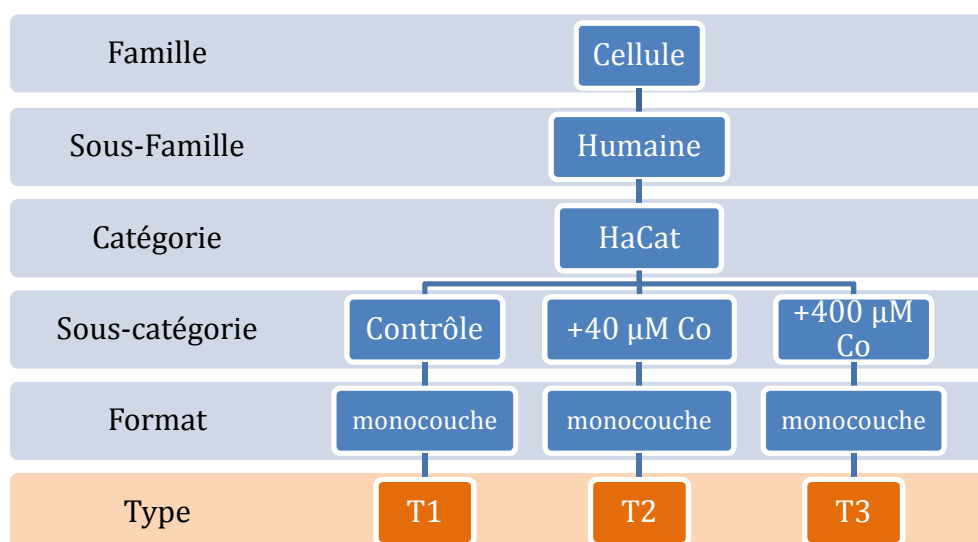


Figure 33: Nomenclature de la table « Taxonomie » permettant l'identification unique des types d'échantillons à partir de catégories prédéfinies. Le numéro de référence associé à chaque type est généré automatiquement par le logiciel et est strictement unique.

Sur le même modèle, on normalise les données d'entrée pour les zones d'intérêts des analyses, les éléments chimiques, et les types d'expériences.

4.3.7 UTILISATION DE BDC4

On a distingué dans les processus de réalisation de la démarche de « capitalisation des compositions chimiques dans une base de données », les processus de création et maintenance de la base, d'alimentation et de consultation (Annexes, 8.3.2, Figure 49). Les 3 processus de réalisation sont décalés chronologiquement, le processus de consultation ne pouvant avoir lieu avant celui d'alimentation, lui même conditionné au processus de création de la base. A terme, les 3 processus de réalisation doivent être maintenus simultanément.

A ce jour, la base BDC4 est dans sa phase d'alimentation, avec 127 fiches « Echantillons » créées, principalement des échantillons de composition chimique de

référence utilisés pour la calibration des dispositifs expérimentaux, et 74 fiches « analyse » constituant un taux de remplissage de 74% (8 expériences et 102 acquisitions référencées). Les objectifs fixés dans le cadre de la démarche qualité sont un taux de remplissage de 100% concernant les nouvelles expériences, et un archivage de 10% / an de résultats d'expériences antérieures.

Pour entrer pleinement dans la phase de consultation de la base et définir des compositions chimiques de référence pour tous les types cellulaires étudiés au laboratoire, il est impératif d'être en mesure de garantir la fiabilité des analyses. Il est en effet toujours possible de discriminer au sein d'une population homogène quelles valeurs sont aberrantes. Le problème est plus complexe lorsque l'on souhaite comparer 2 populations homogènes, car les différences éventuellement observées peuvent être soit réelles, soit due à un biais de l'analyse, ce risque étant d'autant plus important que le nombre de mesures est restreint. Pour minimiser le risque d'introduire dans la base de données des informations biaisées, on a défini un protocole d'analyse quantitative des échantillons par faisceaux d'ions (Figure 34) reprenant les étapes clés de l'analyse (mesure de d'échantillons « blancs », contrôle du dispositif, calcul de la puissance des tests statistiques).

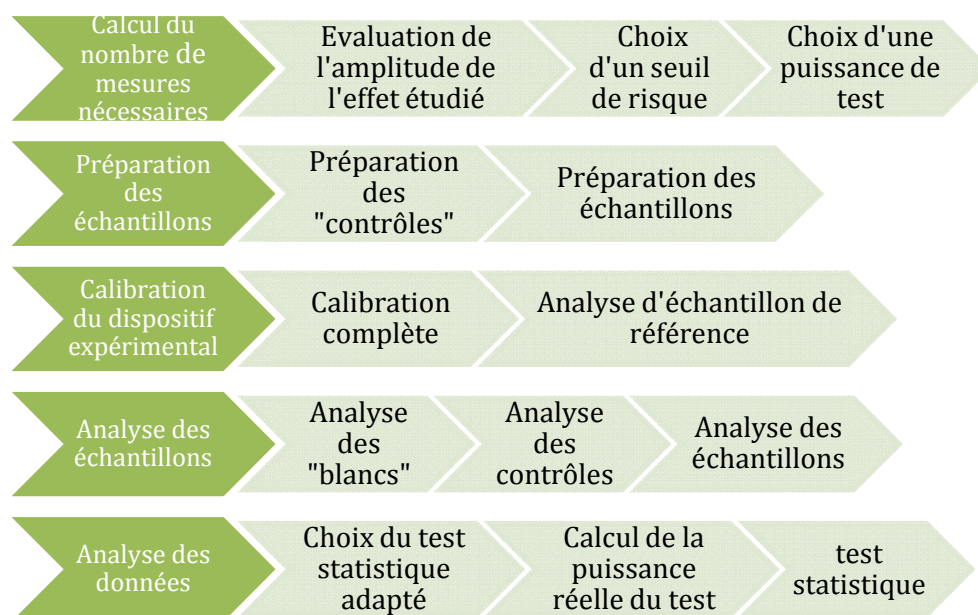


Figure 34: Protocole d'analyse quantitative des éléments chimiques cellulaires par faisceaux d'ions.

4.3.8 TESTS STATISTIQUES EXACTS

La base de données permet en partie de répondre au problème posé par le nombre restreint de mesures par le regroupement des données. On peut néanmoins estimer que sauf cas exceptionnel, il n'y aura jamais de groupes contenant plus de 30 échantillons avant regroupement, et il est donc impératif d'associer à la base de données des outils d'analyse basés sur les tests statistiques non paramétriques adaptés à l'analyse de groupe contenant un petit nombre d'échantillons (Siegel, et al., 1988).

Tableau 10: Grille de choix des tests statistiques adaptés à l'étude de petits échantillons ($n < 30$).

Echantillons	Echelles de mesure			
	Choix binomial	Catégories nominales	Catégorie ordinales	Echelle d'intervalles
Un seul échantillon	Test binomial	Chi ² de Pearson		
Deux séries appariées	Test de Mc Nemar		Test du signe	Test de permutations pour mesures paires Test de Wilcoxon
Deux échantillons indépendants	Test exact de Fisher	Test Chi ² de Pearson	Test de Mann & Whitney Test de Kruskal et Wallis	Test de permutations pour mesures indépendantes Test de Mann & Whitney Test de Kruskal et Wallis
Plus de deux séries appariées	Test de Cochran			Test de Friedman Test de Page
Plus de deux échantillons indépendants	Test Chi ² de Pearson	Test Chi ² de Pearson	Test de Kruskal et Wallis Test de jonckheere Terpstra	Analyse de variance par permutations des scores Test de Kruskal et Wallis Test de jonckheere Terpstra
Mesure de l'association entre variables	Coefficient de contingence Coefficient Kappa de Cohen		Coefficient de corrélation par rangs de Spearmann Coefficient de concordance de Kendall	

Si les tests statistiques exacts sont parfaitement adaptés au traitement des données, il est néanmoins difficile avec le logiciel Filemaker de les intégrer directement dans la base de données car il n'est pas possible *a priori* de déterminer quel est le test approprié au cas scientifique étudié (groupes appariés / indépendant ; échelle de mesure) (Tableau 10). Nous avons préféré dissocier la base de données des outils statistiques et développer au cas par cas des outils d'analyse des données pouvant dialoguer avec la base de données via ODBC (Open Data Base Connectivity). Le logiciel Filemaker Pro, qui est parfaitement adapté à la gestion des données, mais est très limité en termes de calcul sur les données triées, permet néanmoins un interfaçage avec des

applications extérieures permettant le traitement statistiques des données. Dans un premier temps, les données peuvent être exportées puis analysées avec des outils statistiques non paramétriques comme Tanagra (Rakotomalala, 2005), mais il est évident que les tests les plus utilisés comme le test de Kruskal et Wallis ou le test de Mann et Whitney devront être inclus dans la base de données.

Le problème posé par le petit nombre de mesures est un problème double. Il s'agit d'une part de savoir si l'échantillonnage déterminé par les mesures est représentatif de la population étudiée, et, le cas échéant, si le nombre d'analyse est suffisant pour comparer plusieurs échantillons entre eux. L'évaluation de la qualité de l'échantillonnage est difficile car il dépend de la variabilité biologique du phénomène étudié, c'est à dire de la variation de la réponse biologique à une même sollicitation entre plusieurs cellules. Cette évaluation suppose que l'on ait une bonne connaissance a priori du phénomène que l'on étudie. Le plus souvent la variabilité biologique des phénomènes que nous étudions est faible en regard de la variabilité métrologique comme dans l'exemple présenté dans le chapitre suivant où les concentrations en cobalt des cellules exposées à 400 μM de CoCl_2 pendant 48 h variaient entre 580 $\mu\text{g/g}$ et 888 $\mu\text{g/g}$, soit une moyenne et un écart type de $694 \pm 126 \mu\text{g/g}$. On constate ainsi que l'écart type des mesures correspond à la précision de la méthode (20%).

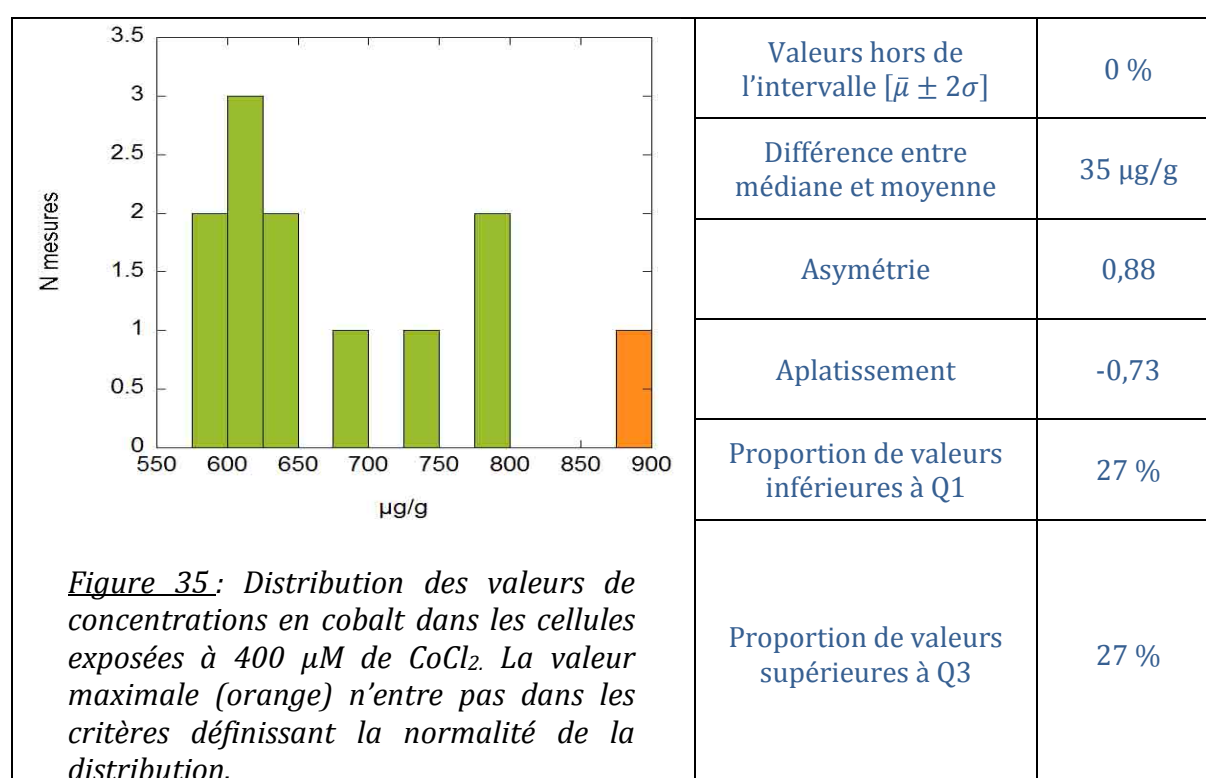
La qualité de l'échantillonnage peut être donnée à partir de l'évaluation de la normalité de la distribution des mesures, car pour des mesures indépendantes, les résultats doivent se distribuer selon une loi normale. Pour un nombre de mesures inférieur à 30, il est difficile de déterminer si la distribution des résultats suit une loi gaussienne, mais on peut vérifier que les critères de description d'une loi normale sont respectés. La plus grande partie des mesures doit être située dans l'intervalle $[\bar{\mu} \pm 2\sigma]$, la différence entre la valeur médiane et la valeur moyenne doit être faible, la distribution doit être symétrique et non aplatie (coefficient d'aplatissement et kurtosis compris entre $[-1, 1]$) et la proportion de valeurs dans le premier et le dernier quartile d'environ 25 %.

Par exemple, dans le cas de l'étude présentée dans le chapitre suivant, on remarque que tous ces critères d'évaluation sont respectés, sauf le critère d'asymétrie, égal à 1,01, indiquant un léger excès de valeurs fortes. Cette dissymétrie est due à la valeur maximale (888 $\mu\text{g/g}$) (Figure 35). En supprimant cette valeur, la distribution devient conforme aux critères d'évaluation de la normalité d'une distribution (Tableau 11).

Si on considère que le petit nombre d'individus disponibles est représentatifs de la population à étudier, l'analyse des résultats peut être effectuée à partir de tests statistiques adaptés à l'analyse de petits échantillons ($n < 30$) (Siegel, et al., 1988). Pour un nombre d'échantillon inférieur à 10, les tests statistiques sont basés sur le calcul exact, par permutations des données, de la probabilité d'observer les résultats obtenus. Pour un nombre de mesures compris en 10 et 30, le nombre de permutations devient grand et les tests exacts nécessitent le recours à une méthode de type Monte-Carlo. Pour un nombre de mesures supérieur à 30, on peut faire un test de normalité de la

distribution et utiliser le cas échéant les statistiques paramétriques. Une grille de choix des tests statistiques adaptés à l'analyse de petits échantillons est présentée dans le Tableau 10. Les tests les plus couramment utilisés sont les tests de Mann et Whitney (variables indépendantes) et Wilcoxon (variables dépendantes) pour la comparaison de 2 échantillons, et Kruskal et Wallis (variables indépendantes) et Friedman (variables dépendantes) pour la comparaison de plus de 2 échantillons.

Tableau 11: Critères d'évaluation de la normalité de la distribution des résultats des mesures de la concentration du cobalt cellulaire dans des cellules exposées à 400 μM de chlorure de cobalt (la valeur extrême de 888 $\mu\text{g/g}$ a été retirée de la série pour ramener le critère de symétrie à une valeur inférieure à 1).



L'utilisation de tests statistiques exacts ne modifie pas le risque que l'échantillonnage soit biaisé et ne permet pas de s'affranchir du problème de validité de l'analyse statistique imposé par le nombre réduit de mesures. Il est essentiel de calculer pour chaque test employé, la *puissance du test*, qui est définie comme la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle quand l'hypothèse alternative H_1 est vraie. Elle est par définition associée au risque de deuxième espèce β , qui est la probabilité de ne pas rejeter H_0 quand H_1 est vraie,

$$\text{Puissance} = 1 - \beta$$

L'hypothèse alternative H_1 est en général celle que l'on veut démontrer. Une puissance de test de 30% par exemple signifie que, dans le cas où l'hypothèse H_1 est avérée (il y a effectivement une différence entre les populations étudiées), on a seulement 30% de chance de l'observer au seuil α choisi.²¹

La puissance d'un test augmente en même temps que le nombre de mesures, que le seuil α choisi, que l'amplitude de l'effet mesuré, et est inversement proportionnelle à l'écart type des mesures. Elle est a priori calculée avant l'expérience pour planifier le nombre de mesures à effectuer, mais cela suppose alors que l'amplitude de l'effet soit connue à l'avance. Dans tous les cas, la puissance du test peut être calculée *a posteriori* pour vérifier que le nombre de mesures est suffisant. On admet par convention qu'une puissance de test de 80% est suffisante même s'il existe des cas pour lesquels cette puissance pourrait ne pas être suffisante (test de l'innocuité d'un produit sur un organisme par exemple) et pour lesquels il convient d'adapter le seuil d'acceptation au cas scientifique.

La normalisation des procédures d'analyse des échantillons et de traitement des données est un premier pas dans la découverte de phénomènes biologiques à l'échelle cellulaire, comme dans le cas de l'analyse du cobalt cellulaire. Les tests statistiques adaptés à l'analyse des petits échantillons sont a priori aussi valides, aussi exigeants et ont une puissance proche de celle des tests paramétriques mais l'augmentation du nombre de mesures présente quand même l'avantage de diminuer le risque de biais induit par un facteur aléatoire pendant la mesure ou la préparation des échantillons.

²¹ α est défini comme le risque d'erreur de « première espèce » qui correspond à l'affirmation selon laquelle il existe une différence entre les groupes observés alors que l'hypothèse nulle est vraie (il n'y a en réalité pas de différence entre les groupes).

5 RESULTATS - ASPECTS EXPERIMENTAUX

5.1 BILAN DU DEVELOPPEMENT DES LIGNES MICROSONDE ET NANOSONDE SUR AIFIRA

Le développement des lignes d'analyse sur la plateforme AIFIRA a débuté avec le transfert, sans modification majeure, de la ligne microsonde initialement installée sur l'accélérateur Van de Graaff du CENBG. La ligne nanosonde a été développée simultanément au transfert de la ligne microsonde, ce qui a permis d'assurer la continuité des programmes de recherche nécessitant l'usage de microfaisceaux d'ions. L'analyse cellulaire par microsonde et/ou nanosonde est désormais uniquement effectuée sur la ligne « nanosonde » en configuration triplet (microsonde) ou quintuplet (nanosonde)²².

La configuration triplet de la ligne nanosonde permet d'obtenir un faisceau de 1 μm pour les analyses PIXE, c'est à dire avec un courant de particules supérieur à 300 pA, et un faisceau de 300 nm pour les analyses STIM (Tableau 12). Par rapport à l'ancienne installation, ces caractéristiques correspondent à un gain en résolution d'un facteur 2 à courant constant.

Tableau 12 : Caractéristiques de la ligne nanosonde en configuration triplet et quintuplet mesurée avec un faisceau de protons de 1,5 MeV. D'après (Barberet, et al., 2010).

	Triplet	Quintuplet
STIM		
- Résolution spatiale (nm)	300 × 300	200 × 250
PIXE		
- Résolution spatiale (nm)	1000 × 1000	1200 × 1500
- Courant	>300 pA	30 pA
- Objet	20 μm	100 μm

En configuration quintuplet, le grandissement de la ligne est supérieur d'un facteur 5 environ à la configuration triplet, permettant d'obtenir un faisceau micrométrique à partir d'un objet de 100 μm de diamètre. Le courant sur la cible dans cette configuration est limité à 30 pA, ce qui ne permet pas de réaliser des expériences d'analyse sur des éléments chimiques peu concentrés ou dans des échantillons fins comme les monocouches cellulaires. Même en remplaçant l'objet de 100 μm de diamètre

²² Une partie des résultats présentés ici a néanmoins été obtenue sur la ligne microsonde avant son démontage pour laisser la place à un système d'irradiation cellulaire.

par un objet plus petit pour passer en configuration STIM, la résolution spatiale du faisceau reste 5 à 6 fois supérieure à la résolution théorique (grandissements de 100 et 65 respectivement dans les plans horizontal et vertical), ce qui est le signe de la présence d'aberrations résiduelles importantes. La configuration en double étage de focalisation a été choisie car elle correspond théoriquement à une configuration pour laquelle les aberrations sphériques sont minimales. Néanmoins, Merchant *et al* (Merchant, et al., 2007) ont montré que la résolution spatiale sur cible dans une configuration en double étage était limitée facteur correspondant aux aberrations sphériques du deuxième étage multipliées par le grandissement du premier étage. Ce facteur constitue une limite à la résolution spatiale qui pourrait expliquer partiellement la faible résolution obtenue.

Le résultat précédent est obtenu dans le cas d'un système parfaitement aligné. En réalité, les défauts d'alignement et réglages constituent la source principale d'altération de la résolution spatiale du dispositif. Ces défauts de réglages sont partiellement dus au fait que les diagnostics présents sur la ligne sont insuffisants ou peu adaptés aux réglages fins nécessaires à l'obtention d'un nanofaisceau. En particulier, le diagnostic situé entre le doublet et le triplet, constitué d'un quartz et d'une caméra équipée d'un objectif de grandissement $\times 20$, rend le réglage du doublet délicat car le système ne permet pas de changer la mise au point, de visualiser les faisceaux défocalisés et possède un champ d'observation réduit (Ishikawa, et al., 2009) (Udalagama, et al., 2005).

Dans la chambre d'analyse, le diagnostic est obtenu à partir de la luminescence d'un quartz. Le dispositif est adapté au réglage d'un microfaisceau d'ions mais est limité dans le cas d'un nanofaisceau, à la fois par le pouvoir de résolution des optiques et la sensibilité du phénomène de luminescence ne permettant pas d'observer l'influence d'une variation très petite de champ magnétique sur la taille du faisceau. Pour aller plus loin, il faudrait envisager de mettre en place des expériences de type « grid shadow » (Rothermel, et al., 2009) (Jamieson, et al., 1989) (Andersson, et al., 2008), et développer des méthodes d'imagerie rapide à partir de l'émission d'électrons secondaires.

Le problème de l'alignement entre les 2 étages de focalisation de la ligne nanosonde est un problème difficile à résoudre. L'alignement des quadripôles a été effectué en prenant comme référence le quadripôle milieu du triplet. Cet élément, utilisé seul, permet de focaliser dans un seul plan le faisceau incident, l'image de l'objet placé en entrée correspondant alors à une *ligne* dans le plan focal du triplet. En inversant la polarité de la tension d'alimentation de ce quadripôle, on forme une seconde ligne perpendiculaire à la première. Le point de croisement des 2 lignes constitue un point de référence pour tous les autres quadripôles, ceux du triplet comme ceux du quintuplet, et l'opération renouvelée avec chacun d'eux permet de régler l'ensemble du dispositif relativement à ce quadripôle. En prenant soin d'aligner le premier élément sur l'axe optique, il est possible d'obtenir un système centré sur cet axe. La précision de ce réglage est limitée par la luminescence du quartz comme expliqué précédemment. La méthode ne permet pas par ailleurs de définir un point de repère dans la boîte de

diagnostic située entre le doublet et le triplet, ce qui permettrait d'affiner le réglage de la focalisation en configuration quintuplet. La encore, le développement de techniques d'imagerie alternative pour le diagnostic devrait permettre de résoudre le problème.

En ce qui concerne le problème de courant maximal sur cible en configuration quintuplet, on note que la ligne ne dispose pas de système de déflexion électrostatique autre que celui de l'accélérateur, car tous les éléments potentiellement perturbateurs ont été supprimé dès la conception de la ligne. En conséquence, il n'est pas possible aujourd'hui d'agir sur la trajectoire du faisceau sans modifier les paramètres de la machine. Ce point est très limitant dans la mesure où la configuration présentant la meilleure résolution n'est pas celle permettant d'obtenir un courant sur cible maximal. Envisager d'ajouter un système de déflexion à l'entrée de la ligne pourrait résoudre ce problème.

5.2 ETALONNAGE DES DETECTEURS PIXE UTILISES SUR LES LIGNES MICROSONDE ET NANOSONDE

Les détecteurs PIXE utilisés sur les lignes microsonde et nanosonde ont été calibrés selon le principe exposé précédemment. Pour chaque analyse, un spectre de rétrodiffusion et un spectre d'émission X sont enregistrés et simulés a posteriori pour obtenir respectivement, la charge déposée au cours de l'analyse et la masse surfacique de l'élément considéré. Le résultat est alors comparé à la valeur de référence et la différence interprétée comme une conséquence de l'efficacité limitée du détecteur. L'analyse d'une gamme d'échantillons de référence couvrant des énergies allant de 1 keV à 10 keV permet de reconstruire la courbe de variation de l'efficacité en fonction de l'énergie des photons X. En dernier lieu, la courbe est simulée au moyen d'une fonction exponentielle permettant de reproduire la réponse du détecteur et les paramètres de simulation sont utilisés pour générer un fichier d'entrée utilisé par le logiciel Gupix pour les analyses ultérieures.

5.2.1 *CONDITIONS EXPERIMENTALES ET LISTE DES ECHANTILLONS DE REFERENCE*

Les courbes d'efficacité des détecteurs ont été mesurées à partir de 2 jeux d'échantillons de référence se présentant sous la forme d'une couche mince mono- ou bi-atomique déposée sur une feuille de Mylar de 3,5 ou 6,3 μm d'épaisseur. La masse surfacique des dépôts des échantillons de référence préparés au laboratoire a été certifiée par micro-fluorescence X tandis que celle des échantillons commerciaux est certifiée par pesée avec une précision de $\pm 5\%$. Le choix des échantillons a été effectué afin de couvrir une gamme en énergie des photons X allant environ de 1 keV à 10 keV (Tableau 13 et Tableau 14).

En combinant les éléments légers et lourds il est possible de détecter environ une vingtaine de raies différentes ayant des énergies entre 0,93 keV pour la raie $L_{\alpha 1}$ du cuivre jusqu'à 9,25 keV pour la raie K_{α} du gallium.

Les courbes d'efficacité des détecteurs ont été mesurées sans filtre placé devant le détecteur ($T = 1$) avec un faisceau de protons de 1,5 MeV. Le choix de calibrer les détecteurs sans filtre permet d'utiliser la calibration obtenue quel que soit le filtre utilisé à condition de bien caractériser les paramètres de transmission du filtre. Les détecteurs utilisés sur les deux lignes sont identiques hormis la longueur de la canne qui est plus importante sur le détecteur de la nanosonde à cause des dimensions de la chambre d'analyse de la nanosonde. La surface nominale du cristal de silicium dopé est de 80 mm² mais les détecteurs possèdent un collimateur interne diminuant la taille de la surface active à 50 mm². Cette dernière surface est celle utilisée dans le calcul de l'angle solide géométrique de détection en tenant compte de la distance entre la fenêtre de sortie et la surface du cristal. L'étanchéité du détecteur est assurée par une fenêtre de Duraberyllium de 12 µm d'épaisseur. En tenant compte de la couche morte de surface et du contact ohmique, la transmission totale théorique croît exponentiellement à partir de 500 eV pour atteindre son maximum autour de 4 keV. Au-delà, la transmission suit un plateau jusqu'à environ 10 keV puis chute en raison de l'épaisseur limitée de la zone dopée en lithium qui ne suffit plus à absorber toute l'énergie incidente. L'ensemble de ces caractéristiques permet de calculer l'efficacité théorique des détecteurs utilisés sur la plateforme AIFIRA (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Tableau 13: Liste des échantillons de référence indiquant la masse surfacique totale et les raies utilisées pour la calibration.

Echantillon	Masse totale ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) $\pm 5\%$	Raie 1	Raie 2	Raie 3
NaCl	48,1	Na K	Cl K	
NaF	55,1	Na K		
MgF ₂	49,6	Mg K		
Mg	48,1	Mg K		
Al	46,7	Al K		
Al	24,9	Al K		
SiO	48,4	Si K		
Si	26,8	Si K		
KI	47,1	K K	I L	
CaF ₂	59,3	Ca K		
CaF ₂	39,3	Ca K		
Ti	22,7	Ti K		
Mn	45,0	Mn K		
Fe	55,4	Fe K		
Fe	35,3	Fe K		
Co	47,3	Co K		
Co	54,8	Co K		
Cu	50,9	Cu K	Cu L	
Cu	96,0	Cu K	Cu L	
CuS _x	46,8	S K	Cu K	Cu L
ZnTe	46,7	Zn K	Zn L	Te L
GaP	54,4	P K	Ga K	Ga L
GaP	77,6	P K	Ga K	Ga L

Tableau 14: Energie des raies utilisées pour la calibration et masse élémentaire de référence.

Echantillons	Raie	Energie (keV)
NaF, CaF ₂	F K	0,68
Cu, CuS _x	Cu L	0,93
ZnTe	Zn L	1,01
NaCl, NaF	Na K	1,04
GaP	Ga L	1,10
MgF ₂ , Mg	Mg K	1,25
Al	Al K	1,49
Si, SiO	Si K	1,74
GaP	P K	2,01
CuS _x	S K	2,31
NaCl	Cl K	2,62
KI	K K	3,31
CaF ₂	Ca K	3,69
ZnTe	Te L	3,76
KI	I L	3,94
Mn	Mn K	5,90
Fe	Fe K	6,40
Co	Co K	6,93
Cu, CuS _x	Cu K	8,05
ZnTe	Zn K	8,64
GaP	Ga K	9,25

Pour éviter que les échantillons ne se dégradent au cours de l'irradiation, les analyses sont effectuées avec une densité de courant réduite par l'augmentation de la taille du faisceau ou la diminution de l'intensité du courant de particules incidentes.

La mesure de la charge a été effectuée au moyen d'un détecteur silicium partiellement déplété dont la surface active est de 30 mm². La distance à la cible est de 30 mm, soit un angle solide de détection de 33,3 msr. L'angle solide de détection permet de convertir la charge simulée avec le logiciel SimNRA (Mayer, 1999) et qui est exprimée en nombre de particules stéradian (p.sr). Les sections efficaces de rétrodiffusion résonnantes pour le carbone et l'oxygène ont été utilisées pour la simulation des spectres RBS (Razafindrabe, 1995). La composition chimique du support de Mylar a été fixée à la valeur théorique de telle sorte que la variation d'une analyse à l'autre de la hauteur des pics ne soit attribuée qu'à la variation de charge. La validité de cette hypothèse est renforcée par le fait que la composition théorique permet de simuler correctement les spectres expérimentaux indiquant que le rapport de concentration entre le carbone et l'azote dans les échantillons est celui attendu.

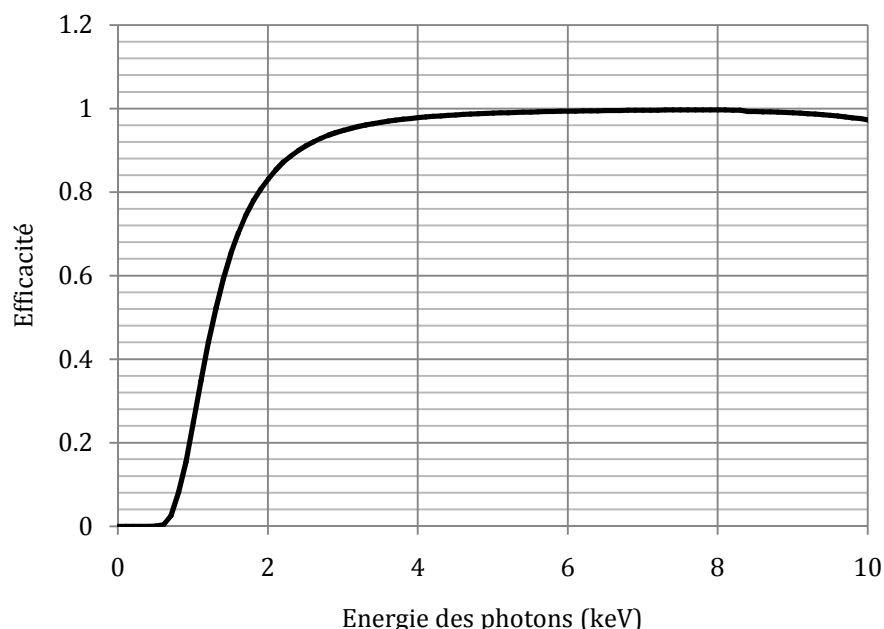


Figure 36 : Efficacité théorique des détecteurs Si(Li) utilisés sur la plateforme AIFIRA. L'efficacité est calculée à partir des paramètres fournis par le constructeur : fenêtre d'entrée de Duraberyllium de 12 μm d'épaisseur, contact ohmique (10 nm de nickel) et couche morte de surface (4 nm de silicium) ainsi que de l'épaisseur de la zone dopée en lithium (500 μm).

Tableau 15 : Conditions d'analyse pour la calibration des détecteurs PIXE et paramètres clés des simulations

Accélérateur		
Particules incidentes	Protons	
Energie	1,5 MeV	
Ligne d'analyse	Nanosonde	Microsonde
Chambre d'analyse		
Détecteur PIXE	Sirius, Si(Li)	Link
- Surface active	80 mm ² collimaté à 50 mm ²	
- Contact de surface	Ni, 10 nm	
- Couche morte	Si, 4 nm	
- Epaisseur de la zone dopée	~ 500 μm	
- Fenêtre d'entrée	Duraberyllium 12 μm	
- Distance Fenêtre-cristal	2,8 mm	
Distance détecteur-cible	22 mm	13 mm
Angle solide	81,3 msr	200,3 msr
Filtre	Aucun	
Taille du faisceau	Environ 100 $\times$ 100 μm^2	$\phi = 5 \mu\text{m}$
Courant sur cible	~1 nA	< 100 pA
Mesure de la charge	Voie RBS en coïncidence	

Détecteur RBS	Silicium partiellement déplété
- surface active	30 mm ²
- résolution mesurée	11 keV
- Distance cible -détecteur	30 mm
- Angle solide de détection	33,3 msr
- angle de rétrodiffusion	135°
Traitement des données	
PIXE	GupixWIN
RBS	SimNRA 5.02
- sections efficaces	résonantes (Razafindrabe, 1995)
- composition du support	Fixé à C ₁₀ H ₈ O ₄

5.2.2 MESURES DE L'EFFICACITE DES DETECTEUR PIXE

Préalablement à la calibration des détecteurs PIXE, il faut mesurer la résolution en énergie du détecteur RBS, par exemple sur une couche mince d'or déposée sur un substrat de silicium car la hauteur des pics de rétrodiffusion décroît proportionnellement à cette résolution. Bien que la mesure de la résolution en énergie puisse se faire directement sur les spectres des échantillons de référence, la mesure est plus précise sur un échantillon parfaitement plan contenant un élément lourd. Dans notre dispositif expérimental, la résolution en énergie mesurée est de 11,0 keV (Figure 37).

Pour chaque analyse d'un échantillon de référence, deux spectres sont enregistrés simultanément et servent à la mesure de charge et la mesure de la masse surfacique de la couche mince analysée (Figure 38).

Le spectre RBS permet de mesurer la charge déposée au cours de l'analyse PIXE et la hauteur du pic de carbone est utilisée pour calculer l'incertitude associée à la mesure de la charge selon la relation présentée précédemment (Tableau 8).

Dans l'exemple de la Figure 37 par exemple, la hauteur maximale du pic de carbone est 1560 coups, soit une erreur de 2,53%. Associée aux incertitudes sur la composition chimique du support (5%), sur les sections efficaces de rétrodiffusion (2%) et sur l'angle solide (9,3%), l'incertitude totale est estimée à 11%. L'ensemble des résultats des mesures est présenté dans le tableau suivant (Tableau 16). La charge simulée est utilisée pour mesurer la masse surfacique des échantillons de référence et la valeur est comparée à la valeur de référence pour calculer l'efficacité de détection comme étant égale au rapport de la valeur mesurée sur la valeur de référence. L'incertitude sur la mesure de la masse surfacique est calculée en combinant l'erreur de simulation donnée par le logiciel GupixWin, l'incertitude sur les sections efficaces de production des raies X (1%) et la précision sur la valeur de référence (5%) (Tableau 8).

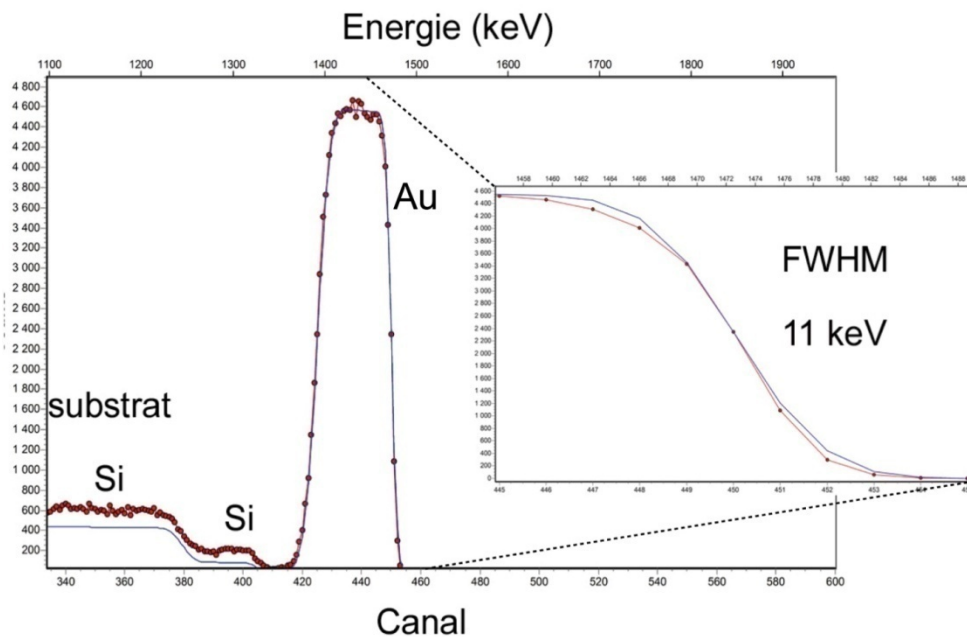


Figure 37: Mesure de la résolution en énergie du détecteur RBS sur une couche d'or déposée sur un substrat de silicium. La couche d'or étant poreuse, le spectre présente deux pics correspondant au silicium de surface et au substrat.

L'erreur sur le calcul de la surface du pic utilisée ici est l'erreur de simulation (%FIT) car elle est légèrement supérieure à l'erreur statistique. L'incertitude calculée ici correspond donc à une valeur maximale de l'erreur sur la mesure. L'incertitude relative sur la mesure de la masse surfacique varie entre 5 % et 6 % à cause de l'influence prépondérante de la précision de la valeur de référence. L'incertitude totale de l'efficacité correspond à la somme de l'erreur sur la mesure de la charge et de l'erreur sur la masse surfacique PIXE et varie essentiellement entre 16 % et 17 % avec quelques valeurs plus élevées légèrement inférieures à 20 %.

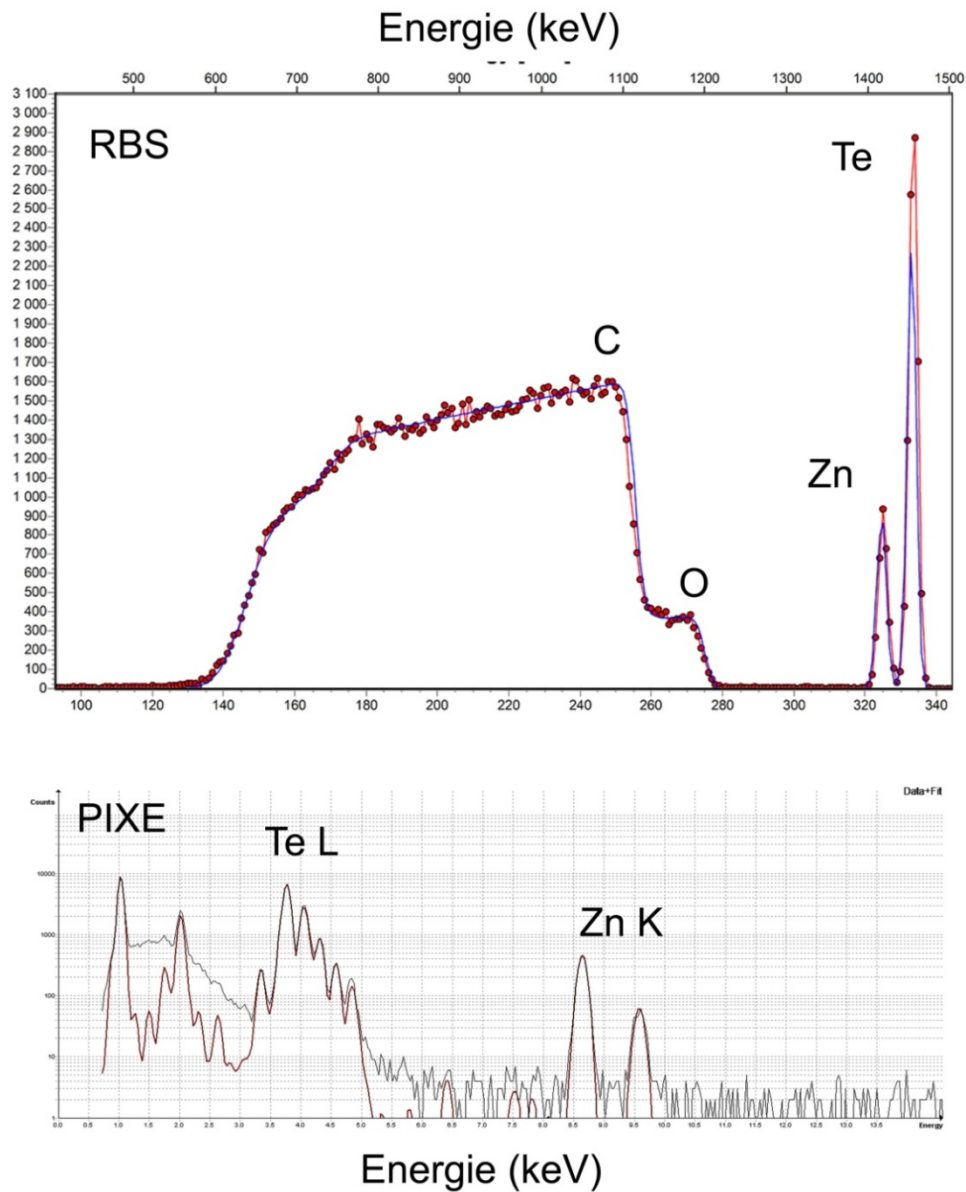


Figure 38 : Spectre RBS (haut) et PIXE (bas) correspondant à l'analyse d'une couche mince de ZnTe déposée sur une feuille de Mylar. Les 2 spectres sont enregistrés simultanément. Haut : Spectre RBS (rouge) et simulation du spectre (bleu). Le pic du carbone provenant du support de Mylar est utilisé pour calculer l'erreur de mesure de la charge. Les erreurs de simulation correspondant à l'analyse de la couche mince de surface n'ont pas d'incidence sur la mesure de la charge car elles n'influent que sur la position en énergie des pics de carbone et d'oxygène, la valeur de référence de la masse surfacique étant par ailleurs celle donnée par le constructeur. Bas : Spectre expérimental PIXE (noir) et simulation (rouge). L'erreur associée à la simulation a été utilisée pour évaluer l'incertitude de la mesure.

Tableau 16 : résultats des simulations des spectres expérimentaux pour la calibration du détecteur de la nanosonde.

Raie	Energie (keV)	Charge (μC)	$\Delta Q/Q$ (%)	Réf. (μg/cm ²)	m_{el} (μg/cm ²)	Erreur (%Fit)	$\Delta H/H$ (%)	Efficacité (%)	Erreur Totale (%)
Cu L	0,93	0,059	11,8	46,8	2,20	0,82	5,2	0,05	17,0
		0,054	11,9		1,83	0,81	5,2	0,04	17,1
		0,053	11,9		1,06	1,97	5,5	6,7	18,6
Zn L	1,01	0,051	11,9	15,8	0,88	1,92	5,4	5,6	17,5
		0,048	11,9		0,82	1,95	5,5	5,2	17,1
Na K	1,04	0,040	12,1	18,9	4,29	0,67	5,1	22,7	17,2
Ga L	1,10	0,051	11,9	42,8	3,11	0,70	5,1	12,4	17,0
		0,053	11,8		3,27	0,69	5,1	13,6	16,9
Mg K	1,25	0,045	12,0	19,3	10,21	0,55	5,1	52,8	17,1
		0,054	11,8		10,00	0,53	5,1	51,7	16,9
		0,060	11,8		9,80	0,51	5,1	50,7	16,9
Al K	1,49	0,039	12,1	46,7	48,16	0,25	5,1	103,1	17,2
		0,043	12,0		47,07	1,02	5,2	100,8	17,2
		0,027	12,4		53,52	1,19	5,2	114,6	17,6
Si K	1,74	0,044	12,0	30,8	42,22	1,63	5,4	137,1	17,4
		0,045	12,0		43,27	0,30	5,1	140,5	17,1
		0,027	12,4		47,83	1,85	5,1	155,3	17,5
P K	2,01	0,051	11,9	11,6	5,75	0,64	5,1	72,02	17,0
		0,053	11,8		6,01	0,63	5,1	78,93	16,9
S K	2,31	0,059	11,8	10,3	11,37	0,69	5,1	110,34	16,9
		0,054	11,9		9,29	0,72	5,1	90,20	17,0
Cl K	2,62	0,040	12,1	29,2	28,24	0,66	5,1	96,74	17,2
Ca K	3,69	0,080	11,6	30,4	35,49	1,25	5,3	116,7	16,9
		0,053	11,7		34,26	1,49	5,3	112,7	17,0
		0,047	11,9		33,98	1,69	5,4	111,7	17,3
Te L	3,76	0,053	11,9	30,0	28,79	1,04	5,2	93,18	17,1
		0,051	11,9		26,12	1,07	5,2	84,52	17,1
		0,048	11,9		23,59	1,09	5,2	76,35	17,1
Fe K	6,40	0,128	11,5	55,4	54,07	0,42	5,1	97,6	16,6
		0,056	11,9		54,38	0,62	5,1	98,2	17,0
		0,050	11,9		54,02	1,30	5,3	97,5	17,2
Cu K	8,05	0,059	11,8	46,8	40,86	0,98	5,2	87,32	17,0
		0,054	11,9		40,60	1,16	5,2	86,75	17,1
Zn K	8,64	0,053	11,9	15,8	13,72	1,90	5,4	86,81	17,3
		0,051	11,9		14,18	2,00	5,5	89,73	17,4
		0,048	11,9		14,61	2,01	5,5	92,48	17,4
Ga K	9,25	0,051	11,9	42,8	38,93	1,53	5,3	90,95	17,2
		0,053	11,8		38,06	1,53	5,3	88,91	17,1

Les résultats obtenus avec le détecteur de la microsonde sont présentés dans le Tableau 17. L'incertitude sur la mesure de la charge est légèrement supérieure à celle mesurée précédemment et oscille entre 12% et 14,5%. En conséquence, l'incertitude totale sur la détermination de l'efficacité est légèrement supérieure dans le cas du détecteur de la microsonde (17,9% en moyenne contre 16,6 % pour la calibration du détecteur de la nanosonde).

Tableau 17 : résultats des simulations des spectres expérimentaux pour la calibration du détecteur de la microsonde.

Raie	Energie (keV)	Charge (μC)	$\Delta Q / Q$ (%)	Réf. (μg/cm ²)	m_{el} (μg/cm ²)	Erreur (%Fit)	$\Delta H / H$ (%)	Efficacité (%)	Erreur Totale (%)
F K	0,68	0,208	12,2	30,0	0,24	1,4	5,3	0,8	17,5
		0,178	12,3		0,24	1,45	5,3	0,8	17,8
		0,065	13,5		0,23	2,13	5,5	0,8	19,0
F K	0,68	0,160	12,4	22,3	0,15	2,18	5,5	0,7	17,9
		0,136	12,5		0,14	2,10	5,5	0,6	18,0
Na K	1,04	0,209	12,2	25,1	7,03	0,56	5,1	28,0	17,3
		0,178	12,3		6,27	0,57	5,1	25,0	17,4
		0,065	13,5		6,55	0,40	5,1	26,1	18,6
Mg K	1,25	0,198	12,2	48,1	17,53	0,48	5,1	36,4	17,3
		0,538	14,0		18,11	0,90	5,2	37,6	19,2
Al K	1,49	0,187	12,3	24,9	12,53	0,81	5,2	50,3	17,5
		0,178	12,3		13,61	0,85	5,2	54,7	17,5
		0,062	13,6		13,98	1,35	5,3	56,1	19,1
Si K	1,74	0,154	12,4	26,8	17,05	0,30	5,1	63,6	17,5
		0,087	13,1		19,44	0,31	5,5	72,5	18,6
P K	2,01	0,221	12,1	8,6	6,35	0,34	5,1	73,9	17,2
		0,177	12,3		6,74	0,34	5,1	78,4	17,4
		0,088	13,1		6,88	0,44	5,1	80,0	18,2
Ca K	3,69	0,160	12,4	17,0	15,15	0,98	5,1	89,1	17,5
		0,136	12,5		14,91	0,83	5,2	87,7	17,7
Ti K	4,51	0,134	12,5	22,7	19,8	0,32	5,2	87,4	17,9
Fe K	6,40	0,153	12,5	35,3	32,7	0,33	5,1	92,7	17,6
Co K	6,93	0,196	12,2	54,8	48,3	0,70	5,1	88,1	17,3
		0,062	13,6		48,7	0,44	5,1	88,8	18,7
Cu K	8,01	0,174	12,3	96,0	83,0	0,72	5,1	86,5	17,4
		0,041	14,4		85,1	0,56	5,1	88,6	19,5
Ga K	9,25	0,177	12,3	68,9	60,5	0,52	5,1	87,8	17,4
		0,088	13,1		63,4	0,70	5,1	92,1	18,2
		0,221	12,1		54,8	0,49	5,1	79,6	17,2

Les courbes présentant la variation de l'efficacité des détecteurs en fonction de l'énergie des photons X sont présentées dans la Figure 39. Pour les 2 détecteurs, l'efficacité augmente rapidement de 0% autour de 1 keV à 90% vers 4 keV en suivant une variation conforme à l'efficacité théorique de détection (courbe pointillée verte). Les valeurs expérimentales ont été ajustées à partir d'une fonction exponentielle de la forme suivante :

$$E = A + B(1 - e^{-Cx}) \quad (Eq. 101)$$

Où x est l'énergie des photons X.

Cette simulation de la courbe d'efficacité permet de générer un fichier de variation de l'efficacité en fonction de l'énergie des photons X qui est utilisé par le logiciel de traitement PIXE pour les analyses ultérieures.

Dans le cas du détecteur de la ligne microsonde, on relève un écart systématique entre l'efficacité théorique et les données expérimentales du fait de l'erreur sur le calcul de l'angle solide PIXE, principalement due au fait qu'il est difficile de connaître avec exactitude la distance réelle entre le détecteur et la cible. Cette erreur est néanmoins totalement compensée par la mesure de l'efficacité du détecteur et justifie à posteriori la calibration des détecteurs.

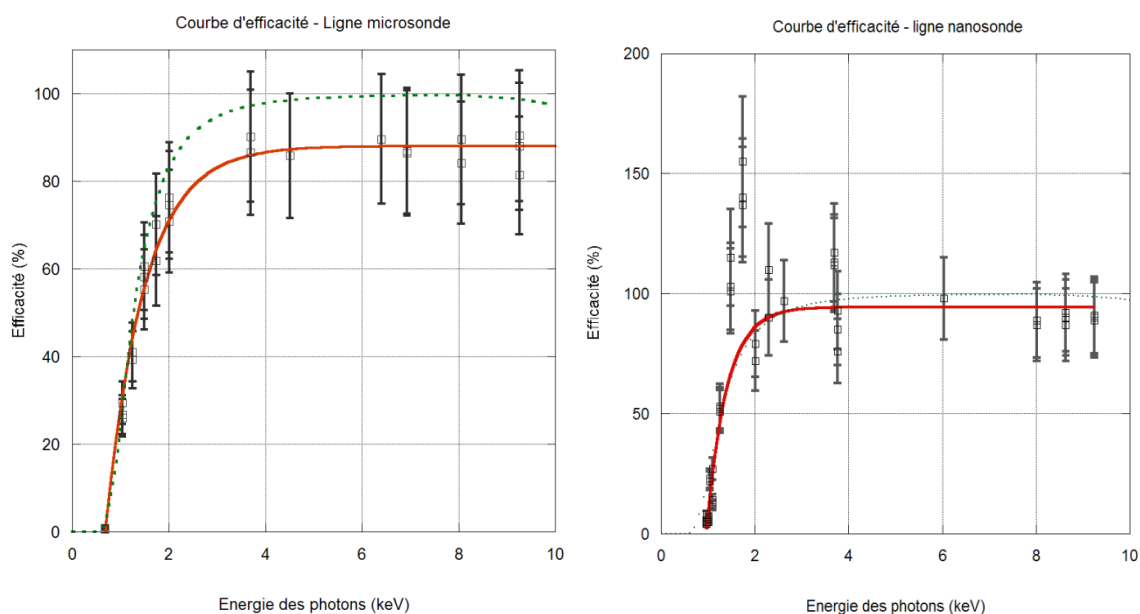


Figure 39 : Courbes d'efficacité des détecteurs Si(Li) utilisés sur la plateforme AIFIRA. Gauche : courbe d'efficacité du détecteur de la ligne microsonde. Les données sont ajustées au moyen d'une fonction exponentielle (rouge) reproduisant la forme de la courbe théorique (vert). Droite : courbe d'efficacité du détecteur de la ligne nanosonde (rouge) et efficacité théorique (vert). Suite à un problème de contamination de la surface du détecteur par condensation de vapeurs d'huile, les valeurs d'efficacité du détecteur à l'énergie de l'aluminium et du silicium n'ont pas été utilisées pour la simulation de l'efficacité (rouge).

5.3 APPLICATION A L'ETUDE DES MECANISMES DE TOXICITE DU COBALT

Le cobalt est un élément chimique dont certains composés sont classés comme potentiellement carcinogènes par l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) (IARC, 2003). L'exposition des individus aux composés du cobalt peut être d'origine environnementale comme industrielle, le cobalt étant largement employé dans les secteurs de la métallurgie (propriétés magnétiques, résistance des matériaux), de la chimie (catalyse), de l'agro-alimentaire (sous forme de compléments alimentaires). Il existe une toxicité chimique résultant de l'inhalation ou de l'ingestion des composés cobaltiques ou de la l'exposition cutanée, qui provoquent des réactions allergiques ou des problèmes respiratoires graves (Barceloux, et al., 1999). De plus, l'isotope ^{60}Co utilisé dans le secteur médical pour la radiothérapie ou la stérilisation et présent dans l'industrie électronucléaire présente une toxicité radiologique assez bien caractérisée (Le Guen, et al., 2005). Par contre, les mécanismes de toxicité chimique ne sont pas totalement connus, même si des dommages sur l'ADN, des mutations génétiques et des phénomènes d'aneuploïdie ont été répertoriés dans des études *in vitro* effectuées sur des modèles cellulaires animaux ou humains. La connaissance partielle de l'action du cobalt sur le fonctionnement du corps humain découle en partie du manque de techniques de caractérisation permettant de sonder à l'échelle subcellulaire les éléments chimiques en concentration mineurs ou traces. Le recours aux techniques d'analyse par microfaisceaux d'ions permet de combler cette lacune et d'affiner la compréhension de l'action du cobalt sur les cellules au travers de l'observation directe de sa distribution intracellulaire. De plus, le caractère multi-élémentaire de l'analyse par faisceau d'ions permet de suivre des variations éventuelles de la composition chimique des cellules exposées.

Le travail présenté dans cette thèse est centré sur les questions de méthodologie et de conditions de l'analyse des éléments chimiques cellulaires. Il ne s'agit donc pas ici de détailler les mécanismes d'action des composés du cobalt, mais plutôt de montrer l'apport de la combinaison STIM-PIXE-RBS à la compréhension de ces phénomènes. Les implications de cette étude en termes de compréhension des mécanismes biologiques mis en jeu au cours de l'exposition des cellules au cobalt sont détaillées dans l'article de Ortega (Ortega, et al., 2009).

5.3.1 PREPARATION DES ECHANTILLONS ET CONDITIONS D'ANALYSE

Le protocole de préparation des échantillons est un protocole spécifiquement adapté à l'analyse des cellules par les techniques d'analyse par faisceau d'ions (Carmona, et al., 2008). Les cellules sont cultivées sur un film de polycarbonate de 2 μm , qui a été choisi en raison de sa compatibilité avec les cultures cellulaires, sa simplicité d'utilisation et de sa grande neutralité en regard des méthodes d'analyse employées. Les films sont à la fois fins, pour perturber le moins possible la mesure de la masse cellulaire par STIM, et propres (exempts de contaminations en éléments chimiques). D'autre part,

les échantillons devant être placés sous vide, les cellules sont cryo-fixées puis lyophilisées à basse température selon une procédure permettant de conserver la distribution des éléments chimiques cellulaires, sans remobilisation des éléments chimiques endogènes, comme le confirme la distribution homogène après fixation des éléments diffusibles comme le potassium. Les méthodes cryogéniques évitent de plus l'apport d'éléments contaminants contrairement aux méthodes de fixation chimiques.

L'étude que nous avons menée est basée sur la comparaison de groupes de kératinocytes humains (lignée cellulaire HaCat) incubés *in vitro* avec des concentrations croissantes de chlorure de cobalt, CoCl_2 , soit : un groupe contrôle non exposé (G0), et deux groupes dont les cellules ont été exposées à des concentrations de 40 μM (G40) (pas de toxicité) et 400 μM (G400) (20% toxicité) de CoCl_2 pendant 48 h. Ces concentrations correspondent respectivement à une dose non toxique et à une dose présentant une toxicité aigüe. Les cellules sont ensuite cryo-fixées par immersion rapide dans de l'isopentane porté à la température de $-160\text{ }^\circ\text{C}$ puis déshydratées à basse température (entre -65°C et $-35\text{ }^\circ\text{C}$) pendant 72 h.

Les analyses de la composition chimique des cellules et de la distribution des éléments chimiques cellulaires ont été effectuées sur la ligne microsonde de la plateforme AIFIRA en combinant une analyse STIM (He^+ , 2,0 MeV, $\phi = 0,75\text{ }\mu\text{m}$) permettant de mesurer la masse cellulaire suivie d'une analyse PIXE-RBS (H^+ , 3,0 MeV, $\phi = 2,0\text{ }\mu\text{m}$).

5.3.2 ANALYSE DE LA CONCENTRATION MOYENNE DU COBALT INTRACELLULAIRE

La mesure de la concentration moyenne du cobalt a été effectuée à partir de l'analyse de zones de 700 μm de largeur. Les zones sélectionnées pour l'analyse sont des zones homogènes en termes de densité cellulaire et permettent d'analyser quelques centaines de cellules par analyse. Par ailleurs, la taille du faisceau pour l'analyse PIXE étant inférieure au pas du balayage ($pas = 700 / 128 = 5,5\text{ }\mu\text{m}$), les dommages dus à l'irradiation sont minimisés. Le nombre de mesures effectué étant limité, les données sont comparées en utilisant des tests statistiques adaptés à l'analyse de petits nombres d'échantillons ($n < 30$). La comparaison des concentrations des éléments chimiques entre les différents groupes est effectuée en utilisant le test non paramétrique de Kruskal et Wallis adapté à l'analyse de plus de 2 populations indépendantes.

Les résultats indiquent que la concentration cellulaire du cobalt augmente avec l'exposition avec un effet de seuil entre 40 μM et 400 μM (Figure 40). La concentration en cobalt des populations 'G0' et 'G40' reste inférieure à la limite de détection (5 $\mu\text{g/g}$). La concentration du cobalt dans les cellules exposées à 400 μM de CoCl_2 varie entre 580 et 888 $\mu\text{g/g}$. Les tests non paramétriques indiquent qu'il n'y a pas de différence significative de concentration en cobalt au seuil de 5% entre les groupes G0 et G40 tandis que le groupe exposé à 400 μM se distingue significativement à la fois

du groupe G0 et du groupe exposé G40. Le caractère quantitatif des méthodes d'analyse par faisceaux d'ions permet la mise en évidence d'un *effet de seuil*, correspondant à la multiplication par un facteur supérieur à 100 de la concentration interne de cobalt en réponse à une exposition seulement décuplée entre 40 et 400 μM . La présence d'un effet de seuil implique l'existence de processus de régulation de l'incorporation et/ou de l'excrétion du cobalt cellulaire. Avec la sensibilité limitée à 5 $\mu\text{g/g}$ des méthodes utilisées, il n'est pas possible d'infirmer l'incorporation du cobalt pour des expositions sub-toxiques (40 μM), mais l'absence de toxicité suggère que le cobalt est incorporé de manière très contrôlée dans les cellules.

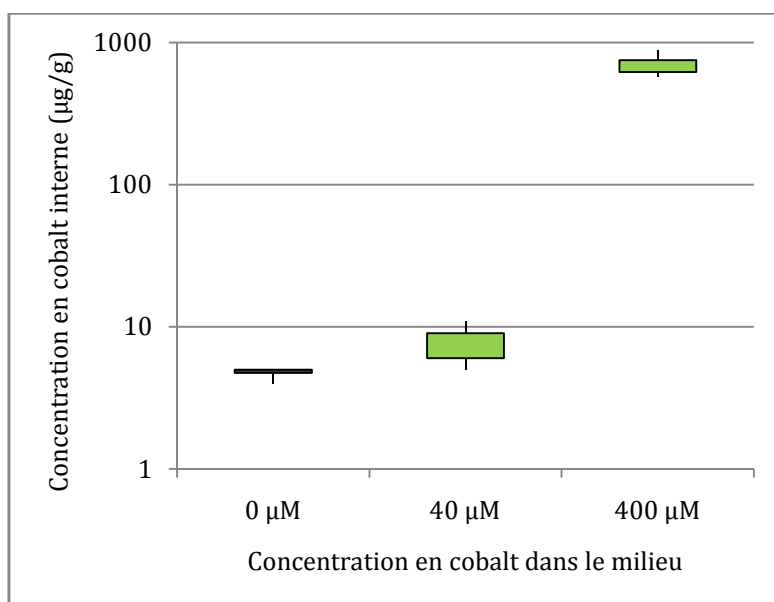


Figure 40: Concentrations du cobalt cellulaire en fonction de l'exposition des cellules. Les boîtes contiennent 50 % des valeurs mesurées et sont délimitées par le premier et le dernier quartile. Les barres sont délimitées par les valeurs minimale et maximale observées. (Les valeurs sont reprises dans le Tableau 18).

*Tableau 18: Concentrations du cobalt cellulaire en fonction de l'exposition des cellules ($\mu\text{g/g}$). Les données sont celles utilisées dans le graphique précédent. Lorsque la concentration en cobalt est inférieure à la limite de détection, la valeur utilisée est la lod. Les valeurs correspondant à la lod sont marquées d'une étoile * dans le tableau.*

	Contrôle (n=5)	40 μM (n=13)	400 μM (n=12)
Valeur minimale	4*	5*	580
Quartile inférieur	4,75*	6*	618
Médiane	5*	8*	632
Quartile supérieur	5*	9*	750
Valeur maximale	5*	11*	888

5.3.3 OBSERVATIONS DE LA DISTRIBUTION DU COBALT INTRACELLULAIRE

Pour des expositions fortes des cellules au cobalt (400 μM), induisant une augmentation importante de la concentration cellulaire, se pose la question de la répartition du cobalt à l'échelle cellulaire. L'analyse directe de la compartimentation du cobalt par faisceaux d'ions présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques, basées sur le fractionnement cellulaire combiné à une analyse élémentaire, dont celui de diminuer le nombre d'étapes de préparation potentiellement perturbatrices, de ne faire aucune hypothèse sur les organites cibles du cobalt, et de donner une vue d'ensemble de la répartition des éléments chimiques cellulaires.

L'observation de la répartition intracellulaire du cobalt a été effectuée pour le groupe G400 pour lequel l'incorporation du cobalt est suffisante pour induire des concentrations cellulaires supérieures à la limite de détection (Figure 41). L'analyse préliminaire à haute résolution spatiale par la méthode STIM permet d'identifier nettement la position des cellules ainsi que leur structure. Les cellules sont cultivées à quasi confluence impliquant la jonction des cytoplasmes de cellules adjacentes. Les noyaux cellulaires, qui se détachent parfois pour cette lignée cellulaire du corps de la cellule pendant la lyophilisation, sont facilement identifiables à leur forme ronde et à la présence de structures denses internes rappelant les nucléoles.

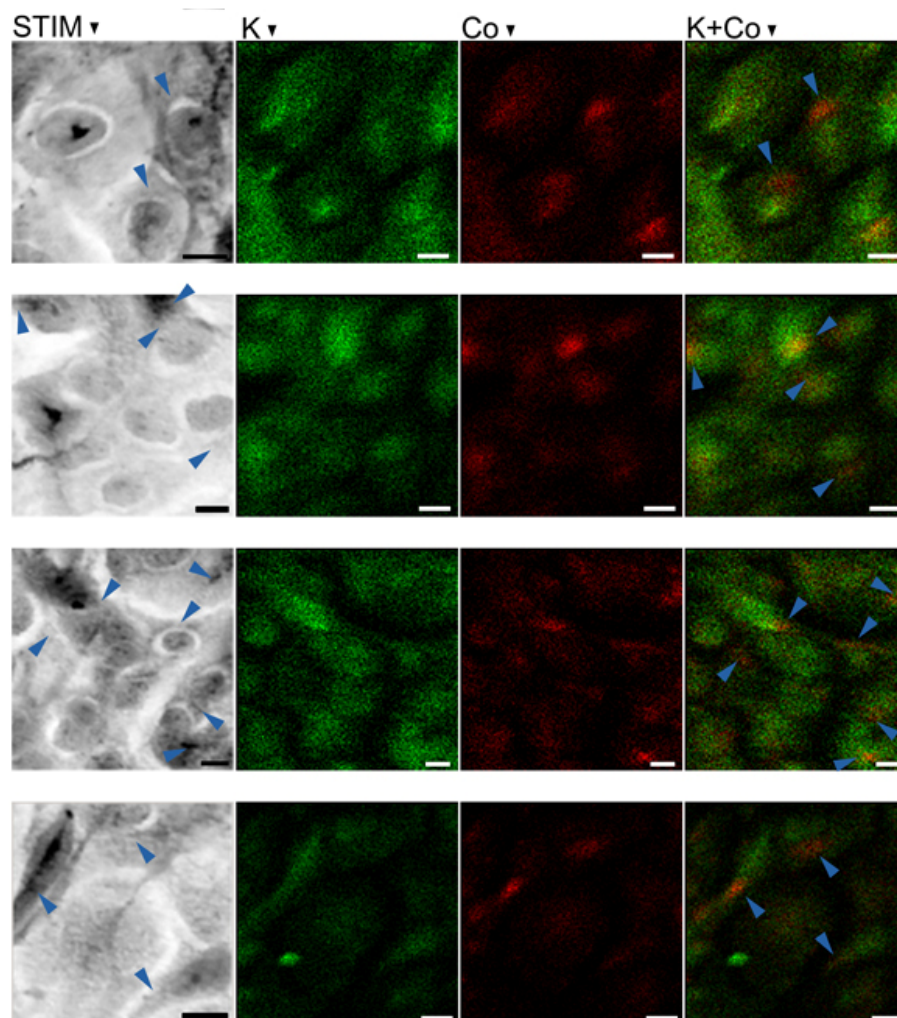


Figure 41: Analyse de la distribution du cobalt cellulaire dans des cellules HaCat exposées à 400 μM de CoCl_2 pendant 48 h. Gauche : L'identification des structures cellulaires, ainsi que la mesure de la masse des cellules avant irradiation, sont effectuées par analyse STIM. Les images densimétriques permettent d'identifier les noyaux cellulaires et des structures denses correspondant aux nucléoles. Milieu : répartition du potassium (vert) et du cobalt (rouge) dans les cellules préalablement observées en STIM. Les images ne sont pas normalisées par la masse cellulaire entraînant une augmentation apparente de la concentration dans les zones plus épaisses. Droite : la superposition des images de cobalt et de potassium, dont la distribution suit la masse surfacique, met en évidence la présence de structures péri-nucléaires riches en cobalt (flèches bleues). Barre d'échelle = 10 μm ; Echelles de couleur : STIM : du blanc (moins dense) au noir (plus dense) ; PIXE : du noir (minimum) au rouge ou vert (maximum).

L'analyse PIXE-RBS des mêmes cellules permet d'établir une correspondance entre les cellules, identifiées par la présence de potassium et les structures cellulaires observées en STIM. Les images de la distribution du cobalt montrent clairement que celui-ci est distribué dans tous les compartiments cellulaires, noyaux inclus, montrant que l'ADN des cellules et les protéines nucléaires peuvent être la cible directe du cobalt.

La concentration surfacique en cobalt et potassium est plus importante dans les noyaux que dans les cytoplasmes, car les images ne sont pas normalisées par la quantité de matière analysée. Les zones les plus épaisses comme les noyaux cellulaires apparaissent donc comme les plus concentrées. La superposition des cartographies du cobalt et du potassium, ce dernier possédant une distribution homogène à l'échelle cellulaire donc proportionnelle à la masse irradiée, permet de corriger cet effet topologique et met en évidence la présence de structures micrométriques disposées autour des noyaux cellulaires. Ces structures ne sont pas identifiables sans marquage spécifique mais leur position à la périphérie des noyaux et leur taille laissent penser qu'il pourrait s'agir de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique.

Les images de la distribution des éléments chimiques ont été utilisées pour extraire les spectres locaux (STIM, PIXE et RBS) correspondant aux noyaux, aux cytosols et aux structures riches observées autour des noyaux afin de calculer la concentration locale des éléments chimiques cellulaires (Figure 44). La quantification du cobalt cellulaire par normalisation des données PIXE par la masse cellulaire permet d'établir que les concentrations en cobalt sont plus faibles d'environ 25% dans le cytoplasme que dans le noyau (Tableau 19).

Tableau 19 : Concentration en cobalt ($\mu\text{g/g}$) mesurées dans les différents compartiments cellulaires.

Paramètres	Moyenne sur zones larges (n=12)	Cytoplasmes (n=6)	Noyaux (n=6)	Structures péri-nucléaires (n=6)
Valeur minimale	580	468	549	1083
Quartile inférieur	618	482	595	1222
Médiane	632	513	686	1391
Quartile supérieur	750	554	876	1472
Valeur maximale	888	574	956	1474

Contrairement à la seule observation des images de la distribution du cobalt, l'analyse quantitative permet de calculer une concentration exprimée en $\mu\text{g/g}$ de masse sèche qui est corrigée des effets de topologie. En ce qui concerne les zones péri-nucléaires, l'analyse indique que ces structures cellulaires concentrent le cobalt dans des proportions importantes, environ 2 fois la concentration mesurée dans le noyau et le cytoplasme. Les différences observées entre les sous-structures (noyaux, cytoplasmes et structures péri-nucléaires) sont significativement différentes les unes des autres (test de l'hypothèse nulle : $p_{\text{Noy-Cyt}} = 0,06$; $p_{\text{Noy-SP}} = p_{\text{Cyt-SP}} = 0,03$).

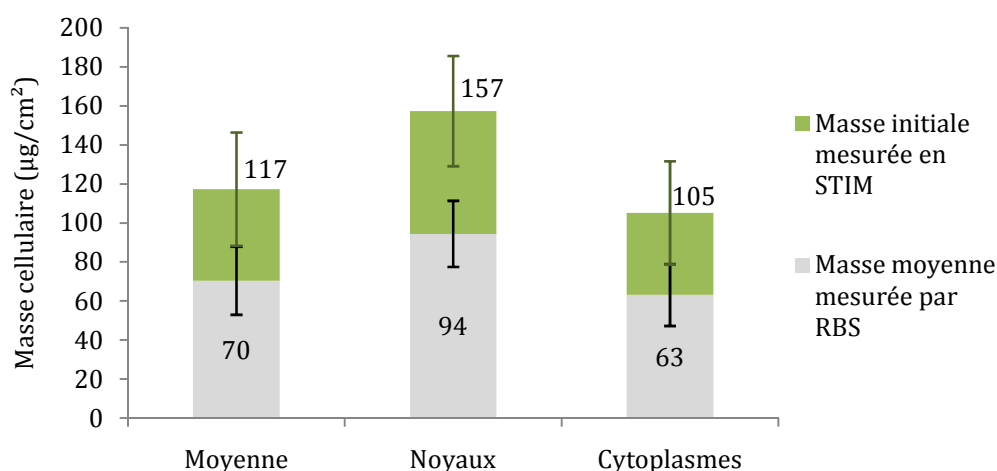
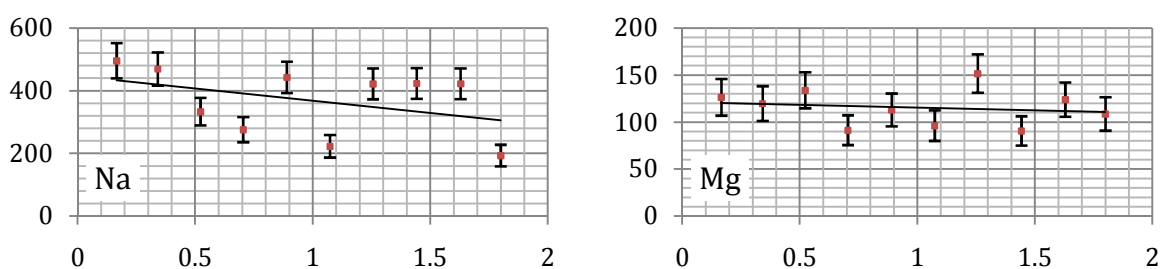


Figure 42: Masse cellulaire initiale mesurée en STIM et masse moyenne au cours de l'irradiation mesurée en RBS dans les cellules entière (moyenne), les noyaux cellulaires et les cytoplasmes. (Valeurs moyennes $\pm$ écart type). L'écart entre les 2 mesures permet d'évaluer la perte de masse au cours de l'irradiation, ici de l'ordre de 40 % de la masse initiale.

L'apport de la méthode STIM à la mesure de la concentration des éléments chimiques cellulaires est primordial pour la quantification des éléments cellulaires. Si on compare en effet la masse initiale mesurée en STIM à la masse moyenne au cours de l'analyse RBS, on peut mesurer l'effet de l'irradiation en termes de perte de masse. Dans les exemples donnés ici, la perte de masse s'élève à 40 % de la masse initiale (Figure 42). L'ordre de grandeur de la perte de masse observée ici fait partie des valeurs maximales observées jusqu'à présent. Il est délicat de commenter néanmoins cette valeur car elle est très dépendante du type de cellules analysées et de leur préparation. On peut vérifier néanmoins que la perte de masse est une perte purement organique en vérifiant que la concentration surfacique des éléments chimiques reste stable au cours de l'analyse (Figure 43). La perte de masse sous irradiation affecte préférentiellement les éléments volatiles tels que l'hydrogène ou l'oxygène (Maetz, et al., 1999).



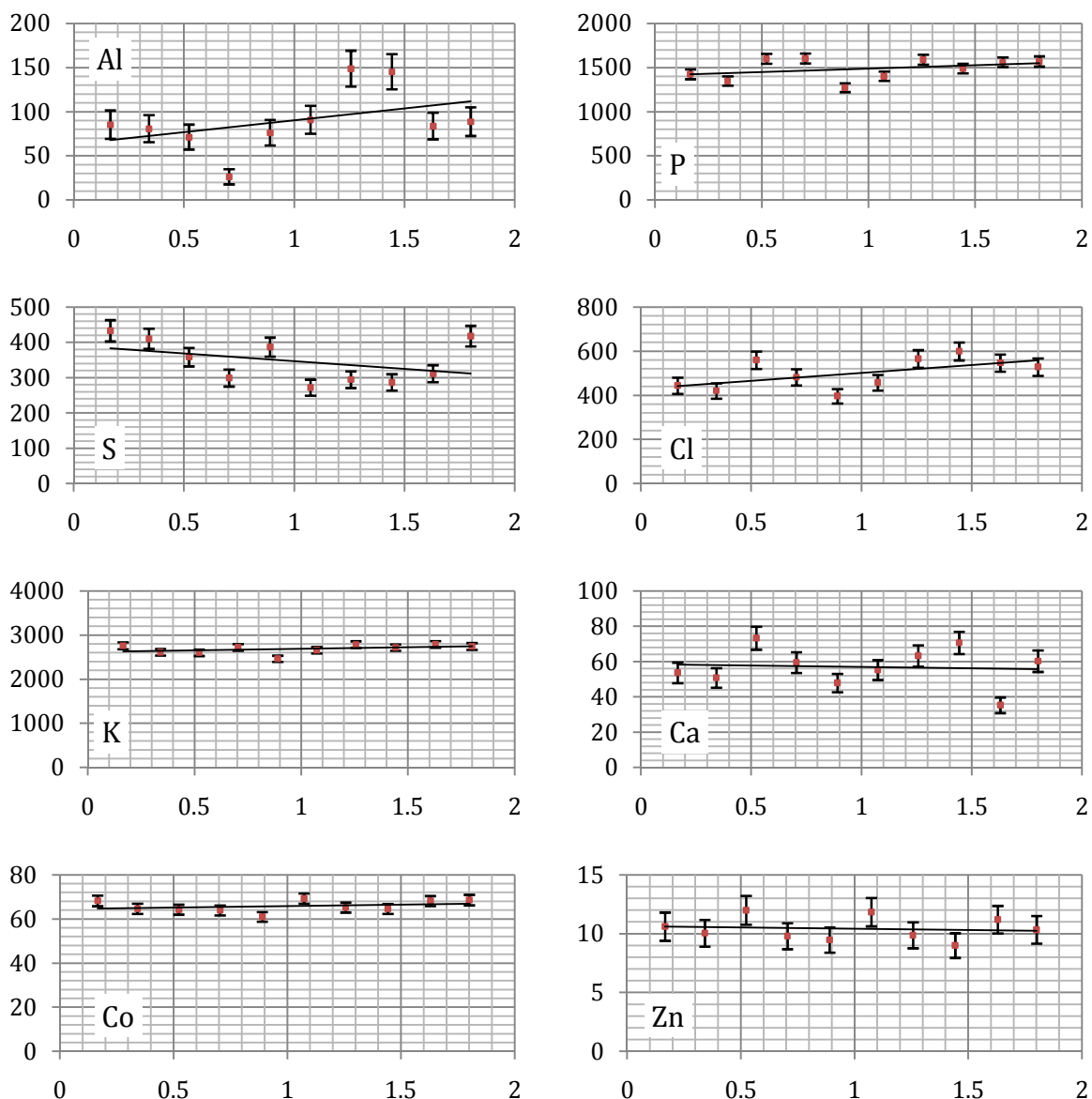


Figure 43 : Variation de la concentration surfacique des éléments chimiques cellulaires dans une cellule unique (ng/cm²) en fonction de la charge déposée (μC). La charge déposée au cours de cette analyse est égale à 1,8 μC. Les barres d'erreurs sont calculées à partir de l'erreur statistique donnée par le logiciel Gupix.

L'influence de la perte de masse organique sur la mesure de la concentration des éléments chimiques se traduit donc par une augmentation apparente de la concentration des éléments chimiques (Figure 44, gauche). Dans notre exemple, si on se réfère à la concentration moyenne mesurée à partir de l'analyse de zones comprenant plusieurs centaines de cellules (Figure 40), la concentration dans les différents compartiments cellulaires calculée à partir de la masse RBS est systématiquement supérieure à la valeur moyenne. Ce résultat ne peut pas s'expliquer autrement que par un problème de normalisation, car les cellules sont divisées schématiquement en 2 compartiments (noyau ou cytoplasme – les zones péri-nucléaires étant incluses dans la partie cytoplasmique) délimités par soustraction. Plus simplement, on considère dans

une cellule que tout ce qui n'appartient pas au noyau appartient de fait au cytoplasme. L'utilisation de la masse initiale comme mesure de référence pour la normalisation permet de corriger ce problème et de mesurer des concentrations locales en accord avec les valeurs moyennes (Figure 44, droite).

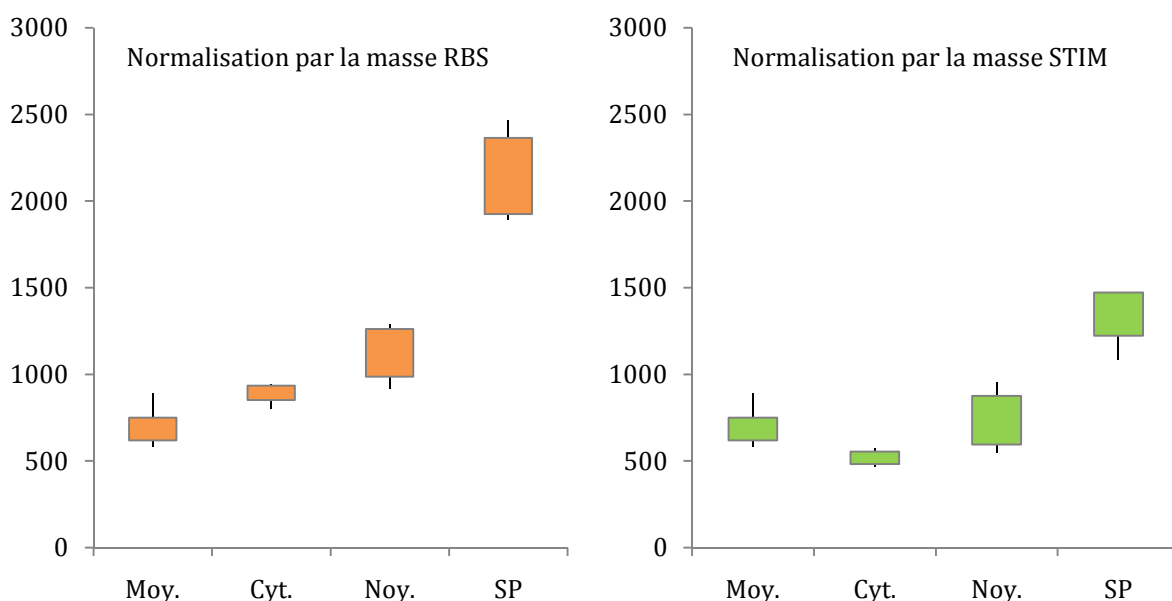


Figure 44: Concentrations cellulaires du cobalt ($\mu\text{g/g}$). Gauche : Normalisation par la méthode RBS ; Droite : Normalisation par la méthode STIM. Les valeurs moyennes (Moy.) sont celles mesurées à partir de l'analyse de zones larges comprenant plusieurs centaines de cellules. Les cellules sont schématiquement divisées en 2 compartiments cellulaires (noyau et cytoplasme). Les structures péri-nucléaires (SP) sont comprises dans la partie cytoplasmique. Les boîtes sont délimitées par le premier et le dernier quartile et contiennent 50 % des mesures expérimentales. Les barres d'erreurs sont définies par les valeurs minimale et maximale.

5.3.4 ANALYSE MULTI-ELEMENTAIRE

Le second apport majeur des méthodes d'analyse par faisceaux d'ions à l'analyse cellulaire est donné par l'aspect multi-élémentaire de la méthode. On peut compléter les données de l'incorporation du cobalt en fonction de l'exposition (Figure 40) par les mesures de la concentration des autres éléments chimiques cellulaires (Figure 45). Ces données apportent un éclairage nouveau sur l'effet de seuil dans l'incorporation du cobalt apparaissant entre 40 et 400 μM car elles indiquent que la concentration des autres éléments chimiques cellulaires n'est pas modifiée sauf celles du magnésium et du zinc. La diminution significative du magnésium et du zinc met en évidence un phénomène de compétition dans le transport et le stockage de ces éléments et celui du cobalt.

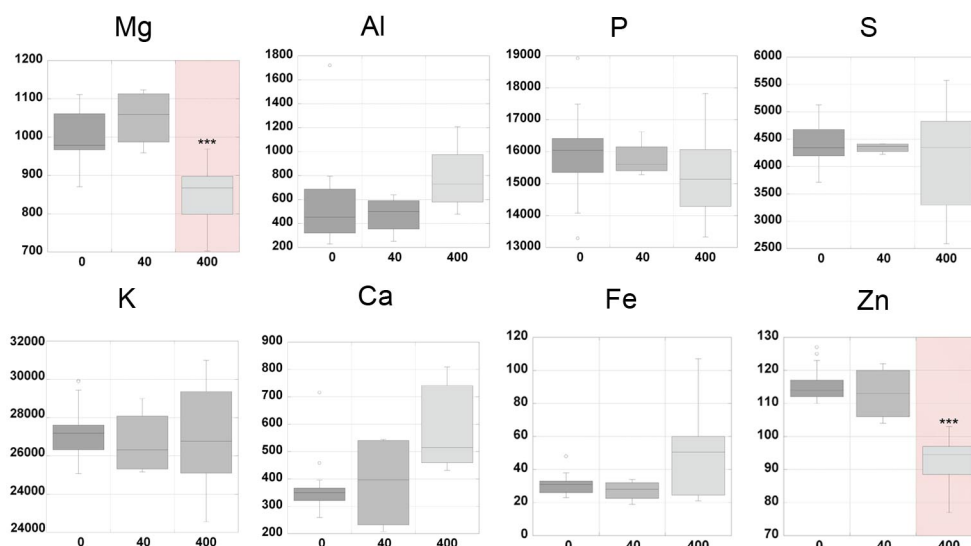


Figure 45: Concentration des éléments chimiques cellulaires ($\mu\text{g/g}$) dans des cellules HaCat en fonction de l'exposition au CoCl_2 : contrôle (gauche), exposition sub-toxique (40 μM , milieu) et toxicité aigüe (400 μM , droite). Les différentes expositions sont comparées par un test de Kruskal et Wallis. Les concentrations soulignées (Mg et Zn) sont celles pour lesquelles l'hypothèse nulle peut être rejetée au risque de 5 %.

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1 POINTS FORTS ET LIMITES DE LA METHODOLOGIE STIM-PIXE-RBS

La méthodologie STIM-PIXE-RBS est une méthode d'analyse multi-élémentaire quantitative possédant une limite de détection proche du microgramme par gramme ($\mu\text{g/g}$) et une précision de l'ordre de 20% dans le cas d'un élément chimique dont la concentration correspond à la limite de détection. L'aspect quantitatif de la méthode est un des avantages les plus importants car il donne un point de comparaison entre des échantillons différents, information capitale pour mettre en évidence des phénomènes de *redistribution* des éléments chimiques cellulaires et de *compétition* dans le transport et le stockage des éléments chimiques (Ortega, et al., 2009).

La profondeur de pénétration des ions dans la matière organique étant de l'ordre de plusieurs dizaines de micromètres, la méthode permet de faire l'analyse de cellules entières. Du point de vue de la quantification, cela signifie qu'une vue d'ensemble de la composition chimique cellulaire peut être obtenue à partir de cette méthode, d'autant que, mis à part l'hydrogène, tous les éléments chimiques peuvent être quantifiés en routine. La méthode peut alors servir de référence pour les méthodes d'analyse chimique indirectes, basées sur le fractionnement cellulaire et l'analyse *a posteriori* des fractions isolées, pour lesquelles le risque est important de perdre une partie des éléments chimiques d'intérêt au cours des différentes étapes de séparation. D'autre part, les étapes de cryofixation des échantillons garantissent la conservation de la structure chimique sans apport d'éléments exogènes (Carmona, 2008).

En termes d'imagerie, la résolution spatiale micrométrique permet de différencier les structures cellulaires les plus volumineuses comme le noyau, les nucléoles, l'appareil de Golgi. La meilleure résolution spatiale est cependant obtenue en configuration STIM, avec une taille de faisceau de l'ordre de 250 nm (Figure 46). La résolution spatiale ainsi obtenue permet d'obtenir des images avec la même définition que la microscopie optique, mais avec une profondeur de champ supérieure permettant d'améliorer la qualité des images. En parallèle, la méthode STIM est quantitative ce qui permet d'identifier les structures cellulaires en fonction de critère de densité ou de masse surfacique locale. La méthode n'est pas destructive et elle peut donc servir de référence pour la normalisation de données d'analyse complémentaires ne permettant pas de mesurer la quantité de matière analysée comme l'analyse de fluorescence par rayonnement synchrotron.

6.1.1 CONTRAINTES LIEES A L'ANALYSE

Si les conditions d'analyse, en particulier le fait que le système soit placé sous vide, imposent des contraintes quant à la préparation des échantillons, inversement, la nature des échantillons, principalement leur masse surfacique faible, constitue un facteur limitant de l'analyse. D'une part, la durée d'analyse est inversement proportionnelle à la quantité de matière analysée, et le nombre de mesures qu'il est

possible de faire nécessairement limité du fait de l'accès restreint à la plateforme d'analyse. D'autre part, on a vu précédemment que l'utilisation de particules alpha était indispensable pour mesurer précisément la masse surfacique des échantillons très fins ($<200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), tandis que l'émission X induite était plus importante dans le cas de l'irradiation des cellules avec un faisceau de protons. En conséquence, la nécessité de changer la nature et l'énergie des particules incidentes pour mettre en œuvre la méthodologie STIM-PIXE-RBS sur des échantillons fins, constitue une limite pour les mêmes raisons de temps d'accès limité à la plateforme. On notera que dans le cas des échantillons plus épais, la méthode STIM peut être mise en œuvre avec des protons donc sans changement de particules, alors la méthode STIM-PIXE-RBS tend à devenir la méthode de référence (Pallon, et al., 2009).

La résolution spatiale limitée à 300 nanomètres en conditions d'imagerie et à $1 \mu\text{m}$ en condition d'analyse PIXE, constitue aussi une des limites de la méthode. Si on se réfère à la taille des structures cellulaires (Tableau 20), on vérifie qu'une fraction seulement des compartiments cellulaires est observable avec la méthode, à la condition que ces structures observables présentent un contraste chimique ou densimétrique suffisant.

Tableau 20 : Taille des principales structures cellulaires.

Structure	Taille (nm)
Membranes (nucléaire, plasmique, RE)	5 à 10
Cytosquelette	7×70
Nucléosome	10
RE-ribosomes	15
Chromatine	30
Pores nucléaires	50 à 100
RE- feuillet	50
RE-vésicules	50
Peroxisome	100
Vésicules	100
Appareil de Golgi	200 × 1000
Lysosomes	200 à 500
Mitochondrie	500 à 1000
Chromatide	600
Noyau	5 à 10×10^3
Cellule	10 à 100×10^3
Nanoparticules	5 à 500

6.2 PERSPECTIVES

6.2.1 ANALYSE STIM DE NANOPARTICULES

Dans l'exemple ci-après, l'analyse STIM permet de déterminer précisément les structures cellulaires d'une cellule embryonnaire de souris (Balb 3T3) exposée à des nanoparticules de CoFeO_4 . Dans ces conditions, il est possible de différencier des structures cellulaires comme des vésicules cytoplasmiques (blanc) et bien sûr les agrégats de nanoparticules situés à la périphérie du noyau (noir). Une condition d'observation des structures cellulaires est qu'elles présentent un contraste en densité supérieur au pouvoir de résolution de la méthode estimé à $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, soit une épaisseur équivalente de 10 nm de cellule.

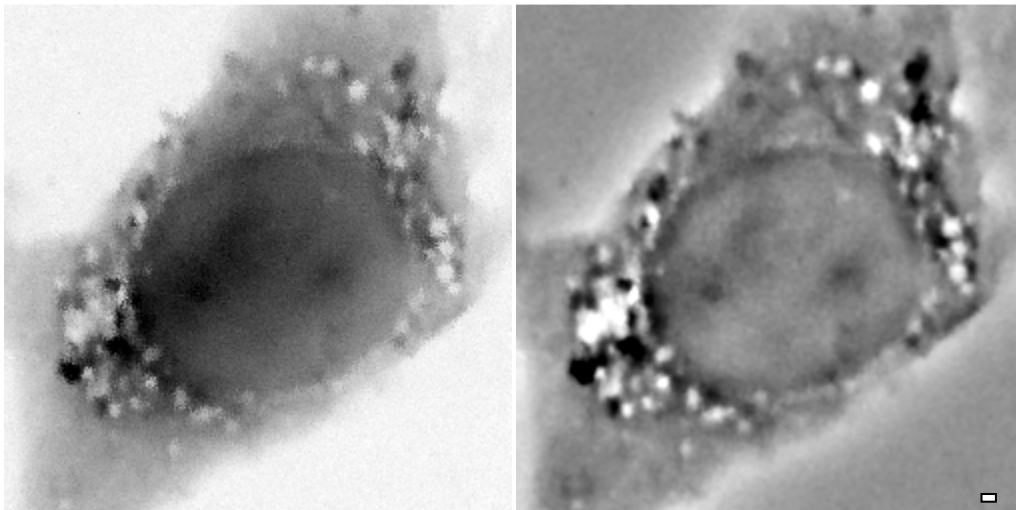


Figure 46: Gauche: Image densitométrique STIM d'une cellule embryonnaire de souris Balb 3T3 exposée à des nanoparticules de CoFeO_4 . Droite: traitement de la même image par l'application d'un filtre passe-bande permettant d'accentuer le contraste de l'image. Les nanoparticules sont facilement identifiables (en noir) car elles possèdent une densité très supérieure à la densité des structures cellulaires. Taille du faisceau 250 nm. Barre d'échelle: 1 μm . Echelle de niveaux de gris allant du blanc (moins dense) au noir (plus dense).

L'analyse quantitative STIM trouve dans le cas de l'étude de cellules exposées à des nanoparticules une application originale exploitant le potentiel de l'imagerie densimétrique. En effet, le contraste en densité entre les structures cellulaires ($d \approx 1$) et les nanoparticules ($d = 5,7$) est tel, qu'il permet l'identification des nanoparticules directement en STIM à partir de la mesure locale de masse surfacique, sans avoir recours à l'analyse PIXE-RBS. Rigoureusement, la méthode d'identification ne peut fonctionner que si les nanoparticules ont une masse surfacique au moins supérieure à la

structure cellulaire la plus dense. Dans l'exemple présenté ici, les zones les plus denses ont une masse surfacique de $110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (support inclus, ici une fenêtre de Si_3N_4 de 100 nm d'épaisseur). Cette masse surfacique correspond approximativement à une épaisseur équivalente de 700 nm de cellules posées sur un support de 100 nm de nitrure de silicium. Cela correspond aussi à la masse surfacique d'une nanoparticule sphérique de 192 nm ($d \sim 5,7$). Ceci signifie que pour des nanoparticules de diamètre supérieur, la masse surfacique sera toujours supérieure à la structure cellulaire la plus dense et que le traitement de l'image par seuillage permettra d'identifier avec certitude la présence des nanoparticules. Comme le plus souvent, les nanoparticules s'agrègent dans le milieu de culture, cette valeur mesurée de 192 nm correspond en réalité à la taille minimale des agrégats observables. Lorsque le diamètre des nanoparticules est inférieur au diamètre du faisceau, la masse locale moyenne dans la zone délimitée par le faisceau peut être calculée en fonction du taux d'occupation de cette zone par les nanoparticules (Tableau 21). Dans l'exemple ci-dessus, le calcul montre que toutes les particules de masse surfacique égale à $110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ peuvent être identifiées avec certitude. Pour des particules de densité égale à 20 (cas de l'or), que l'on peut considérer légitimement comme une valeur maximale réaliste, les particules peuvent être identifiées avec certitude si leur diamètre est supérieur à 25 nanomètres. En deçà, la variation locale de masse surfacique n'est plus mesurable à cause du pouvoir de résolution limitée de la méthode ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Dans cet exemple, il faut un agrégat d'au moins 2 particules de 30 nm pour qu'elles soient observables.

Tableau 21 : Diamètre équivalent des nanoparticules de masse surfacique égale à $110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en fonction de leur densité. Les particules qui ont un diamètre inférieur au diamètre du faisceau (250 nm) contribuent à l'augmentation de la masse surfacique locale ($110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dans le cas des zones les plus denses) en raison de la proportion de surface qu'elles occupent sous le faisceau. Le pouvoir de résolution de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ limite la taille ou la densité des nanoparticules identifiables par cette méthode.

Densité des nanoparticules	Diamètre équivalent (nm)	Proportion de la surface du faisceau	Masse locale apparente ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	1100	1	220
2	550	1	220
3	367	1	220
4	275	1	220
5	220	0,77	195
6	183	0,54	169
7	157	0,40	153
8	138	0,30	143
9	122	0,24	136
10	110	0,19	131
20	25	0,01	111

6.2.2 PREPARATION DES ECHANTILLONS ET UTILITE DE L'ANALYSE CRYOGENIQUE

L'obtention de faisceaux d'ions possédant une résolution spatiale micrométrique ou sub-micrométrique suppose que l'ensemble du dispositif soit placé sous vide. Ceci impose une contrainte forte sur la préparation des échantillons qui doivent être lyophilisés avant analyse. Quelle que soit la solution retenue, il est nécessaire de développer des protocoles spécifiques de préparation des échantillons ou d'analyse permettant de conserver la structure chimique des cellules sans perte ni apport d'éléments chimiques exogènes. Une vue d'ensemble des méthodes de préparation des échantillons biologiques pour la microanalyse est présentée dans la figure ci dessous.

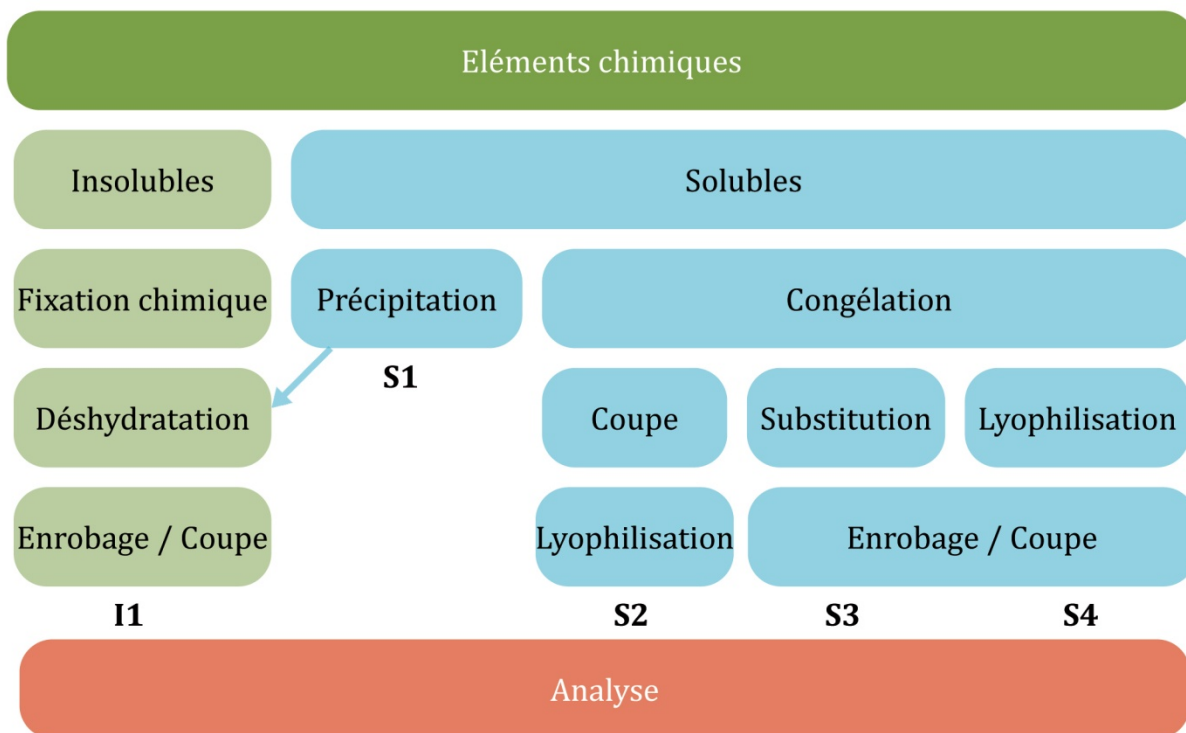


Figure 47 : procédures de préparation des échantillons biologiques pour l'analyse des éléments chimiques. Les étapes d'enrobage et coupe ne sont pas toujours obligatoires car elles dépendent de la nature des échantillons (tissus, culots cellulaires, monocouches cellulaires). D'après (Nagata, 2004)

Pour exploiter le caractère multi-élémentaire des méthodes d'analyse par faisceau d'ions, il est préférable d'avoir recours à des méthodes de préparation adaptées à l'analyse de tous les éléments chimiques cellulaires, y compris ceux qui sont dissous dans le milieu cellulaire. L'analyse de cellules fixées chimiquement n'est pas exempte d'information, mais, en supposant qu'aucun élément exogène n'a été apporté pendant la préparation, elle ne permet d'étudier que les éléments chimiques fixés à la matrice organique tandis que l'information sur les éléments diffusibles est perdue (Figure 47, I1).

Les protocoles que nous utilisons (Figure 47, S2 ou S4) allient une étape de fixation cryogénique et une étape de lyophilisation permettant d'analyser les échantillons sous vide. Ces protocoles sont adaptés à l'analyse quantitative des éléments chimiques cellulaires comme l'indique le fait que les éléments diffusibles intracellulaires comme le potassium sont toujours présents et possèdent une distribution homogène après fixation. Néanmoins, dans certains cas, comme celui des cellules HaCat présenté précédemment, les cellules une fois fixées peuvent présenter des imperfections comme le décollement des noyaux du cytoplasme, l'augmentation de la porosité ou un phénomène de rétraction partiel. Ces dommages peuvent être amplifiés lors de l'irradiation car une part de la masse organique, dont la fonction première est le maintien de la structure cellulaire, est volatilisée pendant l'analyse (Maetz, et al., 1999).

L'importance de ces artefacts est difficile à prévoir car elle varie entre les lignées cellulaires, certaines étant plus fragiles que d'autres. L'influence de ces artefacts est cependant limitée dès lors que la taille du faisceau reste supérieure à la dimension de ces artefacts. Le passage de l'analyse micrométrique à l'analyse nanométrique implique une révision des protocoles de préparation des échantillons permettant de conserver leur structure à l'échelle du faisceau (Carmona, et al., 2010).

Aujourd'hui, la préparation des échantillons pour l'analyse se fait schématiquement en 2 étapes : une étape de cryofixation par plongeon des cibles dans de l'isopentane refroidi à une température de 113 K, suivi d'une étape de lyophilisation à basse température (183 K) et pression réduite (10^{-3} mbar) pendant 48 h (Figure 47, S2 ou S4). Les protocoles permettant la meilleure conservation des structures cellulaires sont ceux qui incluent une étape de substitution permettant de déshydrater et polymériser à basse température une résine de remplacement (Figure 47, S3) (Shiurba, 2001). La conservation des éléments diffusibles reste néanmoins problématique (Mony, et al., 1997) justifiant le développement de dispositifs expérimentaux permettant d'analyser les échantillons à l'état congelé (Tylko, et al., 2007).

On peut anticiper que le développement d'un système d'analyse cryogénique posera le problème de la manipulation des cellules, en particulier pendant l'étape de transfert des cellules dans la chambre d'analyse, et de l'analyse sous vide qui suppose la mise au point d'un dispositif froid mais isolé thermiquement du reste de la chambre d'analyse pour éviter les problèmes liés à la condensation des vapeurs résiduelles dans la chambre. L'analyse de cellules congelées présente un intérêt particulier dans la mesure où il permettrait de minimiser sinon de supprimer le phénomène de perte de masse organique observé au cours de l'irradiation, principalement dû à l'échauffement de l'échantillon sous le faisceau. Le développement d'un tel système cryogénique représenterait en outre une avancée qualitative importante pour l'analyse des échantillons biologiques puisqu'il permettrait de les étudier dans leur état hydraté (congelé) donc dans des conditions proches de l'état natif comparativement aux échantillons lyophilisés.

6.3 AUTRES PERSPECTIVES

Le gain en résolution spatiale attendu en PIXE-RBS avec la validation de la ligne nanosonde doit permettre d'analyser des compartiments cellulaires aujourd'hui invisibles, comme les lysosomes, les mitochondries, et un nombre important de nanoparticules métalliques. En ce qui concerne l'analyse STIM, l'amélioration de la résolution spatiale devrait permettre de visualiser des structures encore plus fines (Sealock, et al., 1987) comme les pores nucléaires, les feuillettes du réticulum endoplasmique, les vésicules les plus fines, à la condition néanmoins que l'échantillon soit préparé en coupe pour minimiser le phénomène d'élargissement du faisceau dans

l'échantillon et limiter les problèmes liés à l'analyse de structures non perpendiculaires à la surface de coupe.

On a évoqué à plusieurs reprises la contrainte imposée par le temps d'accès restreint à la plateforme d'analyse, et on conçoit donc aisément que les améliorations du dispositif permettant de diminuer la durée des analyses sont à compter parmi les plus importantes. La durée des analyses dépend de la concentration des éléments chimiques d'intérêt et de la quantité de matière analysée, 2 paramètres sur lesquels il n'est pas possible d'agir. Par contre, il est envisageable d'augmenter l'angle solide de détection, en multipliant le nombre de détecteur PIXE ou en utilisant un détecteur multi-cristaux (Ryan, et al., 2010), et d'augmenter l'intensité du courant incident à la condition de s'affranchir des problèmes de perte de masse induite par l'irradiation (Tylko, et al., 2007). Ce dernier point constitue un argument supplémentaire pour développer un système d'analyse cryogénique. Le gain en durée d'analyse pourrait être utilisé au choix pour augmenter le nombre de mesures, ou pour améliorer les limites de détection, calculée à partir de l'intensité du signal mesuré.

D'un point de vue expérimental, un certain nombre de développements pourraient être apportés au dispositif comme le développement de l'imagerie en électrons secondaires évoqué précédemment pour répondre au problème posé par la visualisation des faisceaux sur le quartz (Ishikawa, et al., 2009). En particulier, on a vu que la mesure de la charge était un des paramètres contribuant le plus à l'incertitude totale de mesure de la concentration des éléments chimiques. L'introduction d'un système de mesure de la charge, en utilisant une cage de Faraday, l'intensité de l'émission d'électrons secondaires (Ishikawa, et al., 2009), ou la diffusion partielle du faisceau incident (Kristiansson, et al., 2010) pourrait permettre de diminuer l'incertitude de mesure. L'incertitude totale de mesure détermine les processus biologiques observables avec la méthode, les effets ayant une amplitude en termes de modification de la concentration des éléments chimiques inférieure à cette incertitude ne sont pas mesurables.

Les méthodes d'analyse par faisceaux d'ions possèdent des caractéristiques en termes de résolution spatiale et de sensibilité adaptées à l'étude de la concentration et de la distribution des éléments chimiques dans les échantillons biologiques, en particulier dans les échantillons très fins comme les monocouches cellulaires. La pertinence de l'utilisation combinée des méthodes STIM-PIXE-RBS pour l'analyse cellulaire, nous amène à considérer la notion de *complémentarité* des méthodes comme une notion centrale, car les découvertes que nous ferons ne sauraient se faire sans connaissance d'informations manquantes concernant les compartiments cellulaires et les protéines cibles des éléments chimiques, ou l'isotopie et l'état d'oxydation de ces éléments, autant d'information *complémentaires*.

BIBLIOGRAPHIE

7 BIBLIOGRAPHIE

Adams F. Analytical atomic spectrometry and imaging: Looking backward from 2020 to 1975 [Revue] // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. - 2008. - 7 : Vol. 63. - pp. 738-745.

Allan G. L., Camakaris J. et Legge G. J. F. The elemental analysis of normal and Menkes' fibroblast cells with the SPMP [Revue] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. - 1991. - 1-3 : Vol. 54. - pp. 175-179.

Aloupogiannis P. [et al.] An improved method for matrix effects corrections using the proton energy loss determined along with the PIXE measurements [Revue] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. - 1987. - 1-3 : Vol. 22. - pp. 72-77.

Amirikas R., Jamieson D. N. et Dooley S. P. Measurement of (p, p) elastic cross sections for C, O and Si in the energy range 1.0-3.5 MeV [Revue] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. - 1993. - 1-4 : Vol. 77. - pp. 110-116.

Andersson F. [et al.] A detailed ray-tracing simulation of the high resolution microbeam at the AIFIRA facility [Revue] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. - 2008. - 8 : Vol. 266. - pp. 1653-1658. - *Ion Beam Analysis - Proceedings of the Eighteenth International Conference on Ion Beam Analysis, Eighteenth International Conference on Ion Beam Analysis*.

Arndt P. [et al.] On the accuracy of element concentrations and masses of micron sized samples determined with the Heidelberg proton microprobe [Revue] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. - 1997. - 1-4 : Vol. 130. - pp. 192-198. - *Nuclear Microprobe Technology and Applications*.

Bambynek W. X-ray and inner shell processes in atoms, molecules and solid [Conférence] // *X-84 / éd. Society American Physical*. - Leipzig : [s.n.], 1984. - Vol. P1. - pp. 716-813.

Barapatre N. [et al.] Trace element mapping in Parkinsonian brain by quantitative ion beam microscopy [Revue] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. - 2010. - 11-12 : Vol. 268. - pp. 2156-2159. - *19th International Conference on Ion Beam Analysis*.

Barberet P. [et al.] First results obtained using CENBG nanobeam line: performances and applications [Conférence] // *ICNMTA 2010*. - Leipzig : [s.n.], 2010.

Barberet P. [et al.] Technical description of the CENBG nanobeam line [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2009. - 12-13 : Vol. 267. - pp. 2003-2007. - Proceedings of the 11th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and the 3rd International Workshop on Proton Beam Writing.

Barbotteau Y., Irigaray J. L. et Moretto P. PIXE characterization of tissues surrounding metallic prostheses coated with biological glasses [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2004. - 1-2 : Vol. 215. - pp. 214-222.

Barceloux D. G. et Barceloux D. Cobalt [Revue] // Clinical Toxicology. - 1999. - 2 : Vol. 37. - pp. 201-216.

Bartha L. Positive-Ion Sources [Section du livre] // Electrostatic Accelerators / éd. Hellborg Ragnar. - [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2005. - 10.1007/3-540-27095-7_19.

Bench G. [et al.] Olfactory bulb uptake and determination of biotransfer factors in the California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) exposed to manganese and cadmium in environmental habitats. [Revue] // Environ Sci Technol. - 2001. - 2 : Vol. 35. - pp. 270-277.

Bench G. [et al.] STIM tomography: a three-dimensional high resolution imaging tool [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1992. - 1-4 : Vol. 68. - pp. 481-490.

Bethe H. Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie [Revue] // Annalen der Physik. - 1930. - 3 : Vol. 397. - pp. 325-400.

Bischof W. [et al.] Trace element analysis of biological samples using a proton microprobe [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. - 1982. - 1 : Vol. 197. - pp. 201-207.

Blaauw M. [et al.] The 2000 IAEA intercomparison of PIXE spectrum analysis software [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2002. - 1-4 : Vol. 189. - pp. 113-122.

Bloch F. Zur Bremsung rasch bewegter Teilchen beim Durchgang durch [Revue] // Annalen der Physik. - 1933. - 16 : Vol. 287. - p. 285.

Bos A. J. J. [et al.] A new way of assignment of concentrations in pixe analysis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. - 1982. - 1 : Vol. 197. - pp. 139-146.

Bos A. J. J. [et al.] On the incorporation of trace elements into human hair measured with micro-PIXE [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1984. - 1-3 : Vol. 3. - pp. 654-659.

Bosch F. [et al.] The Proton Microprobe: A Powerful Tool for Nondestructive Trace Element Analysis [Revue] // Science. - 1978. - 4330 : Vol. 199. - pp. 765-768.

Bourgeois C. Interaction particules-matière [Revue] // Techniques de l'ingénieur. - 1998. - AF3530.

Bradley D. A. [et al.] Synchrotron and ion beam studies of the bone-cartilage interface [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. - 2010. - 1-3 : Vol. 619. - pp. 330-337. - Frontiers in radiation physics and applications: Proceedings of the 11th International Symposium on Radiation Physics.

Brandt W. et Kitagawa M. Effective stopping-power charges of swift ions in condensed matter [Revue] // Phys. Rev. B. - [s.l.] : American Physical Society, 1982. - 9 : Vol. 25. - pp. 5631-5637.

Brandt W. et Lapicki G. Energy loss effect in inner shell coulomb ionization and associated phenomena [Revue] = Phys. Rev. A // Physical Review A / éd. Society American Physical. - 1981. - Vol. 23. - pp. 1717-1729.

Bresson C. [et al.] An interdisciplinary approach to investigate the impact of cobalt in a human keratinocyte cell line [Revue] // Biochimie. - 2006. - 11 : Vol. 88. - pp. 1619-1629. - Facets of Environmental Nuclear Toxicology.

Campbell J. L. [et al.] Analytic fitting of monoenergetic peaks from Si(Li) X-ray spectrometers [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1985. - 1 : Vol. 9. - pp. 71-79.

Campbell J. L. [et al.] The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2000. - 1-2 : Vol. 170. - pp. 193-204.

Carmona A. [et al.] Manganese Accumulates within Golgi Apparatus in Dopaminergic Cells as Revealed by Synchrotron X-ray Fluorescence Nanoimaging [Revue] // ACS Chemical Neuroscience. - 2010. - 3 : Vol. 1. - pp. 194-203.

Carmona A., Devès G. et Ortega R. Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques [Revue] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. - 2008. - 6 : Vol. 390. - pp. 1585-1594.

Castaing R. Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle [Rapport]. - [s.l.] : Thèse, Université de Paris, 1952.

Chadwick J. The g rays excited by the b-rays of radium [Revue] // Philosophical magazine. - 1912. - 6 : Vol. 24.

Chen M. H., Crasemann B. et Mark H. Relativistic K-Shell Auger rates, level widths, and fluorescence yields [Revue] // Physical Review A. - [s.l.] : American Physical Society, 1980. - Vol. 21. - pp. 436-441.

Chu W-K., Mayer J. W. et Nicolet M-A. Backscattering spectrometry [Revue] / éd. Inc. Academic Press. - 1978.

Cichocki T. [et al.] Proton microbeam study of calcium-phosphate complexes in human arteries [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1987. - 1-3 : Vol. 22. - pp. 210-213.

Cleland M. R et Farrell P. Dynamitrons of the Future [Revue] // IEEE Transactions on Nuclear Science. - 1965. - Vol. 12. - pp. 227-234.

Clemente E. [et al.] PIXE analysis of hair samples from artisanal mining communities in the Acupan region, Benguet, Philippines [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2004. - Vol. 219-220. - pp. 161-165. - Proceedings of the Sixteenth International Conference on Ion Beam Analysis.

Cockcroft J. D. et Walton E. T. S. Experiments with High Velocity Positive Ions. (I) Further Developments in the Method of Obtaining High Velocity Positive Ions [Revue] // Proceedings of the Royal Society of London. Series A. - 1932. - 830 : Vol. 136. - pp. 619-630.

Cohen D. D. et Harrigan M. Atomic data and nuclear tables [Livre]. - 1985. - Vol. 33/255.

Collins R. N. [et al.] Uptake, Localization, and Speciation of Cobalt in *Triticum aestivum* L. (Wheat) and *Lycopersicon esculentum* M. (Tomato) [Revue] // Environmental Science & Technology. - 2010. - 8 : Vol. 44. - pp. 2904-2910.

Deconninck G. The use of ion beam analysis in biological sciences [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. - 1981. - 1-3 : Vol. 191. - pp. 543-550.

Devès G. [et al.] Fully quantitative imaging of chemical elements in *Arabidopsis thaliana* tissues using {STIM}, {PIXE} and {RBS} [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2005. - 1-4 : Vol. 231. - pp. 117-122.

Devès G. et Ortega R. Comparison of STIM and particle backscattering spectrometry mass determination for quantitative microanalysis of cultured cells [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2001. - 1-4 : Vol. 181. - pp. 460-464.

Dikhoff T. G. et van der Heide J.A., Mc Vie, J. G. Topographic PIXE analysis of platinum levels in kidney slices from CIS-platin treated patients [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1985. - Part 2 : Vol. 10-11. - pp. 639-642.

Dillon C. T. [et al.] Permeability, Cytotoxicity, and Genotoxicity of Chromium(V) and Chromium(VI) Complexes in V79 Chinese Hamster Lung Cells [Revue] // Chemical Research in Toxicology. - 1998. - 2 : Vol. 11. - pp. 119-129.

Doty S. B. [et al.] Proton microprobe analysis of zinc in skeletal tissues [Revue] // Nuclear Instruments and Methods. - 1981. - 1-3 : Vol. 181. - pp. 159-164.

Doubleday Z. [et al.] Quantitative elemental imaging of octopus stylets using PIXE and the nuclear microprobe [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2008. - 1 : Vol. 266. - pp. 67-72.

Dymnikov A. D. et Yavor S. Y. 4 quadrupole lenses as an analog of an axially symmetric system [Revue] // Soviet physics - technical physics. - 1963. - Vol. 8. - p. 639.

Egerton R. F. Electron energy-loss spectroscopy in the TEM [Revue] // Reports on Progress in Physics. - 2009. - 1 : Vol. 72. - p. 016502.

Ektessabi A. M. et Hamdi M. Characterization of calcium phosphate bioceramic films using ion beam analysis techniques [Revue] // Surface and Coatings Technology. - 2002. - 1 : Vol. 153. - pp. 10-15.

Endo K. [et al.] Demonstration of inter- and intracellular distribution of boron and gadolinium using micro-proton-induced X-ray emission (Micro-PIXE). [Revue] // Oncol Res. - 2006. - 2 : Vol. 16. - pp. 57-65.

Fiedler A. [et al.] Intracellular iron concentration of neurons with and without perineuronal nets [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2007. - 1 : Vol. 260. - pp. 153-158. - Nuclear Microprobe Technology and Applications (ICNMTA2006) and Proton Beam Writing (PBW II), 10th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and 2nd International Workshop on Proton Beam Writing.

Firsov O. B. [Revue] // Zh. Eksp. Teor. Fiz.. - 1959. - Vol. 36. - p. 1517.

Freitas R. A. Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities [Livre]. - [s.l.] : Landes Bioscience, 1999. - 1st.

Geiger H. et Marsden E. The laws of deflexion of alpha particles through large angles [Revue] // Philosophical Magazine. - 1913. - Vol. 25. - pp. 604-623.

Gott dang A., Mous D. J. W. et Haitsma R. G. The novel HVEE 5 MV Tandetron(TM) [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2002. - 1-4 : Vol. 190. - pp. 177-182.

Grime G. W. The " Q factor" method: quantitative micro-PIXE analysis using RBS normalisation [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1996. - Vol. 109-110. - pp. 170-174.

Guibert G. [et al.] Study of new sheep bone and Zn/Ca ratio around TiAlV screw: PIXE-RBS analysis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2008. - 5 : Vol. 266. - pp. 813-819.

Guinote I. [et al.] Using skin to assess iron accumulation in human metabolic disorders [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2006. - 1-2 : Vol. 249. - pp. 697-701. - Ion Beam Analysis - Proceedings of the Seventeenth International Conference on Ion Beam Analysis.

Guo P. [et al.] Study of metal bioaccumulation by nuclear microprobe analysis of algae fossils and living algae cells [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2000. - Vol. 161-163. - pp. 801-807.

Hansteen J. M. The SCA description of inner-shell coulomb ionization and associated phenomena [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1989. - 4 : Vol. 42. - pp. 426-435.

He Y. [et al.] Dopaminergic cell death precedes iron elevation in MPTP-injected monkeys [Revue] // Free Radical Biology and Medicine. - 2003. - 5 : Vol. 35. - pp. 540-547.

He Y. [et al.] Increased iron in the substantia nigra of 6-OHDA induced parkinsonian rats: a nuclear microscopy study [Revue] // Brain Research. - 1996. - 1 : Vol. 735. - pp. 149-153.

Heck D. [et al.] Localized changes of trace element concentrations within diseased human liver lobules [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1987. - 1-3 : Vol. 22. - pp. 196-200.

Heck D. [et al.] Trace element metabolism in liver cells after copper sulphate uptake [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1988. - 3 : Vol. 30. - pp. 420-423.

Hellborg R. Cascade Generators [Section du livre] // Electrostatic Accelerators / éd. Hellborg Ragnar. - [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2005. - 10.1007/3-540-27095-7_11.

Hosseini A. A. [et al.] Determination of toxic and non-toxic hair trace elements in tobacco smokers using PIXE and NAA techniques [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1996. - Vol. 109-110. - pp. 239-242. - Proceedings of the Seventh International Conference on Particle Induced X-ray Emission and Its Analytical Applications.

Hyder H. R. McK. Electrostatics [Section du livre] // Electrostatic Accelerators / éd. Hellborg Ragnar. - [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2005. - 10.1007/3-540-27095-7_7.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, cobalt in hard-metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide, and vanadium pentoxide [Livre]. - Lyon : IARC, 2003. - Vol. 86.

Incerti S. [et al.] A comparison of ray-tracing software for the design of quadrupole microbeam systems [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2005. - 1-4 : Vol. 231. - pp. 76-85. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Incerti S. [et al.] Geant4 simulation of the new CENBG micro and nanoprobe facility [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2006. - 1-2 : Vol. 249. - pp. 738-742. - Ion Beam Analysis - Proceedings of the Seventeenth International Conference on Ion Beam Analysis.

Incerti S. [et al.] Monte Carlo simulation of the CENBG microbeam and nanobeam lines with the Geant4 toolkit [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2007. - 1 : Vol. 260. - pp. 20-27. - Nuclear Microprobe Technology and Applications (ICNMTA2006) and Proton Beam Writing (PBW II), 10th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and 2nd International Workshop on Proton Beam Writing.

Incerti S. [et al.] Simulation of ion propagation in the microbeam line of CENBG using GEANT4 [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2003. - Vol. 210. - pp. 92-97. - 8th International Conference of Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Irigaray J. L., Oudadesse H. et Brun V. Nuclear methods to characterize biomaterials [Revue] // Biomaterials. - 2001. - 7 : Vol. 22. - pp. 629-640.

Isaure M.-P. [et al.] Micro-chemical imaging of cesium distribution in Arabidopsis thaliana plant and its interaction with potassium and essential trace elements [Revue] // Biochimie. - 2006. - 11 : Vol. 88. - pp. 1583-1590. - Facets of Environmental Nuclear Toxicology.

Ishikawa T. [et al.] Development of a real-time beam current monitoring system for microbeam scanning-PIXE analysis using a ceramic channel electron multiplier [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2009. - 12-13 : Vol. 267. - pp. 2032-2035. - Proceedings of the 11th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and the 3rd International Workshop on Proton Beam Writing.

Jallot E. [et al.] Study of matrix effects with the alpha parameter method to correct PIXE data for bioceramics embedded in resin [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1998. - 1-2 : Vol. 142. - pp. 156-162.

Jamieson D. N. et Tapper U. A. Grid shadow pattern analysis of achromatic quadrupole lenses [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1989. - 2 : Vol. 44. - pp. 227-232.

Jamieson D. N. New generation nuclear microprobe systems [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2001. - 1-4 : Vol. 181. - pp. 1-11.

Jeynes J. C. G. [et al.] Microbeam PIXE analysis of platinum resistant and sensitive ovarian cancer cells [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2010. - 11-12 : Vol. 268. - pp. 2168-2171. - 19th International Conference on Ion Beam Analysis.

Johansson E. [et al.] Micro-PIXE analysis of macro- and trace elements in blood cells and tumors of patients with breast cancer [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1987. - 1-3 : Vol. 22. - pp. 179-183.

Johansson E. et Lindh U. Leukemia -- Its manifestation in the microelement profile in individual blood cells as determined in the nuclear microprobe [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1984. - 1-3 : Vol. 3. - pp. 637-640.

Johansson S. A. E. et Johansson T. B. Analytical application of particle induced X-ray emission [Revue] // Nuclear Instruments and Methods. - 1976. - 3 : Vol. 137. - pp. 473-516.

Johansson S. A. E., Campbell J. L. et Malmqvist K. G. Particle Induced X-ray Emission [Livre]. - New York : John Wiley and Sons, Inc., 1995. - Vol. 133.

Johansson S. A., Campbell J. L. et Malmqvist K. G. Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE) [Livre]. - [s.l.] : Wiley-Interscience, 1995. - p. 496.

Kaabar W. [et al.] Compositional and structural studies of the bone-cartilage interface using PIXE and SAXS techniques [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. - 2010. - 1-3 : Vol. 619. - pp. 78-82. - Frontiers in radiation physics and applications: Proceedings of the 11th International Symposium on Radiation Physics.

Kaabar W. [et al.] micro-PIXE and SAXS studies at the bone-cartilage interface [Revue] // Applied Radiation and Isotopes. - 2010. - 4-5 : Vol. 68. - pp. 730-734. - The 7th International Topical Meeting on Industrial Radiation and Radio isotope Measurement Application (IRRMA-7).

Kachenko A. G [et al.] Quantitative elemental localisation in leaves and stems of nickel hyperaccumulating shrub *Hybanthus floribundus* subsp. *floribundus* using {micro-PIXE} spectroscopy [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2008. - 4 : Vol. 266. - pp. 667-676.

Kertész Z. [et al.] Nuclear microprobe study of TiO₂-penetration in the epidermis of human skin xenografts [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2005. - 1-4 : Vol. 231. - pp. 280-285. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Khodja H. [et al.] Investigation of cadmium toxicity on renal epithelial cells using nuclear microprobe analysis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2003. - Vol. 210. - pp. 359-363. - 8th International Conference of Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Kristiansson P. [et al.] A pre-sample charge measurement system for quantitative NMP-analysis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2010. - 11-12 : Vol. 268. - pp. 1727-1730. - 19th International Conference on Ion Beam Analysis.

Kusakabe T. [et al.] Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure [Revue] // Toxicology in Vitro. - 2008. - 6 : Vol. 22. - pp. 1469-1475.

Landsberg J. P. [et al.] Identification and analysis of senile plaques using nuclear microscopy [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1991. - 1-3 : Vol. 54. - pp. 180-185.

Lao J., Nedelec J. M. et Jallot E. New Insight into the Physicochemistry at the Interface between {Solâ~Gel-Derived} Bioactive Glasses and Biological Medium: A {PIXE-RBS} Study [Revue] // The Journal of Physical Chemistry C. - 2008. - 25 : Vol. 112. - pp. 9418-9427.

Le Guen B. et Ansoborlo E. Le cobalt et ses isotopes. Traité EMC. [Livre]. - Paris : Elsevier SAS, 2005. - Vol. 16-002-C-60.

Lefevre H. W. [et al.] Scanning MeV-ion microprobe for light and heavy ions [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. - 1983. - 1-3 : Vol. 218. - pp. 39-42.

Legge G. J. [et al.] High resolution imaging with high energy ion beams [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1993. - 1-4 : Vol. 77. - pp. 153-168.

Legge G. J. [et al.] Microbeam imaging at micron and submicron resolution [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1986. - 1-6 : Vol. 15. - pp. 669-674.

Legge G. J. A history of ion microbeams [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1997. - 1-4 : Vol. 130. - pp. 9-19. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Li H.-K. et Akselsson K. R. Rutherford backscattering -- A tool for quantification of the results of PIXE analysis of single hair strands [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1985. - 2 : Vol. 12. - pp. 265-268.

Li M. [et al.] Elemental maps of Amoeba proteus by a scanning proton microprobe [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1991. - 1-3 : Vol. 54. - pp. 156-159.

Lindh U. Biomedical application of the nuclear microprobe [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1987. - Part 2 : Vol. 24-25. - pp. 638-642. - Proceeding of the Nith International Conference on the Application of Accelerators in Research and Industry.

Lindh U. Elemental mapping of tissue sections at cellular resolution: A nuclear microprobe investigation [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. - 1982. - 1 : Vol. 197. - pp. 185-190.

Lindhard J. et Scharff M. [Revue] // Mat. Fys. Medd. Dan. Vid. Selsk.. - 1953. - Vol. 27.

Lindhard J., Sharff M. et Schiott H. E. [Revue] // Mat. Fys. Medd. Dan. Vid. Selsk.. - 1963. - 14 : Vol. 33.

Llabador Y. et Moretto P. Applications of nuclear microprobes in the life science [Livre]. - Singapour : World Scientific, 1998.

Lobbess M. B. [et al.] Atherosclerosis: contrast-enhanced MR imaging of vessel wall in rabbit model--comparison of gadofosveset and gadopentetate dimeglumine. [Revue] // Radiology. - 2009. - 3 : Vol. 250. - pp. 682-691.

Lobinski R., Moulin C. et Ortega R. Imaging and speciation of trace elements in biological environment [Revue] // Biochimie. - 2006. - 11 : Vol. 88. - pp. 1591-1604. - Facets of Environmental Nuclear Toxicology.

Maetz M. [et al.] Low-dose nuclear microscopy as a necessity for accurate quantitative microanalysis of biological samples [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1999. - 1-4 : Vol. 158. - pp. 292-298.

Maetz M. [et al.] Structural and chemical modifications of microsamples induced during PIXE analysis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1996. - Vol. 109-110. - pp. 192-196. - Proceedings of the Seventh International Conference on Particle Induced X-ray Emission and Its Analytical Applications.

Magyar M. T. [et al.] Calcium distribution in the vessel wall and intima-media thickness of the human carotid arteries. [Revue] // Ultrasound Med Biol. - 2007. - 8 : Vol. 33. - pp. 1171-1178.

Mahrok M. F., Crumpton D. et Francois P. E. Proton induced X-ray fluorescence analysis and its application to the measurement of trace elements in hair [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1984. - 1 : Vol. 4. - pp. 120-126.

Mavon A. [et al.] In vitro Percutaneous Absorption and in vivo Stratum Corneum Distribution of an Organic and a Mineral Sunscreen [Revue] // Skin Pharmacology and Physiology. - 2007. - 1 : Vol. 20. - pp. 10-20.

Mayer M. SIMNRA, a simulation program for the analysis of NRA, RBS and ERDA [Conférence] // Proceeding of the 15th international conference on the

application of accelerators in research and industry. - [s.l.] : J.L. Dungan and I.L. Morgan (eds), 1999. - Vol. AIP proceedings 475. - p. 541.

Mazzolini A. P., Legge G. J. F. et Pallaghy C. K. The distribution of trace elements in mature wheat seed using the Melbourne proton microprobe [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. - 1981. - 1-3 : Vol. 191. - pp. 583-589.

Mc Naught A. D. et Wilkinson A. IUPAC compendium of chemical terminology [Livre]. - Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2003.

Mc Rae R. [et al.] In Situ Imaging of Metals in Cells and Tissues [Revue] // Chemical Reviews. - 2009. - 10 : Vol. 109. - pp. 4780-4827.

Meinecke C. [et al.] Cellular distribution and localisation of iron in adult rat brain (substantia nigra) [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2006. - 1-2 : Vol. 249. - pp. 688-691. - Ion Beam Analysis - Proceedings of the Seventeenth International Conference on Ion Beam Analysis.

Merchant M. J. [et al.] A survey of two-stage focusing systems for nanobeam design [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2007. - 1 : Vol. 260. - pp. 8-14. - Nuclear Microprobe Technology and Applications (ICNMTA2006) and Proton Beam Writing (PBW II), 10th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and 2nd International Workshop on Proton Beam Writing.

Mesjasz-Przybyłowicz J. et Przybyłowicz W. J. Nuclear microprobe in plant sciences -- Present status and challenges [Revue] // South African Journal of Botany. - 2007. - 2 : Vol. 73. - pp. 302-302.

Minqin Ren [et al.] Nano-imaging of single cells using STIM [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2007. - 1 : Vol. 260. - pp. 124-129. - Nuclear Microprobe Technology and Applications (ICNMTA2006) and Proton Beam Writing (PBW II), 10th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and 2nd International Workshop on Proton Beam Writing.

Mony M.-C. et Larras-Regard E. Imaging of subcellular structures by scanning ion microscopy and mass spectrometry. Advantage of cryofixation and freeze substitution procedure over chemical preparation [Revue] // Biology of the Cell. - 1997. - 3 : Vol. 89. - pp. 199-210.

Moretto P. et Llabador Y. The nuclear microprobe: An insight of applications in cell biology [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics

Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1997. - 1-4 : Vol. 130. - pp. 324-334. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Moretto Ph. [et al.] PIXE microanalysis in human cells: physiology and pharmacology [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1993. - 1-4 : Vol. 75. - pp. 511-517.

Mous D. J. W. [et al.] The novel ultrastable HVEE 3.5 MV Singletron(TM) accelerator for nanoprobe applications [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1997. - 1-4 : Vol. 130. - pp. 31-36. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Murao S. [et al.] PIXE measurement of human hairs from a small-scale mining site of the Philippines [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2002. - 1-4 : Vol. 189. - pp. 168-173.

Nagata T. X-ray microanalysis of biological specimens by high voltage electron microscopy [Revue] // Progress in Histochemistry and Cytochemistry. - 2004. - 4 : Vol. 39. - pp. 185-319.

Ollerhead R. W., Legge G. J. et Jones L. N. Distributions of sulphur and other elements in human hair follicles [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1989. - Part 1 : Vol. 40-41. - pp. 664-668.

Ortega R. [et al.] Cobalt distribution in keratinocyte cells indicates nuclear and perinuclear accumulation and interaction with magnesium and zinc homeostasis [Revue] // Toxicology Letters. - 2009. - 1 : Vol. 188. - pp. 26-32.

Ortega R. [et al.] Combination of synchrotron radiation X-ray microprobe and nuclear microprobe for chromium and chromium oxidation states quantitative mapping in single cells [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2003. - Vol. 210. - pp. 325-329. - 8th International Conference of Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Ortega R. [et al.] Nuclear microprobe determination of platinum quantitative distribution in rat brain tumors after cisplatin or carboplatin injection for PAT treatment of glioma [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2005. - 1-4 : Vol. 231. - pp. 321-325. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Ortega R. [et al.] Quantitative mapping of platinum and essential trace metal in cisplatin resistant and sensitive human ovarian adenocarcinoma cells [Revue] // Cellular and Molecular Biology. - 1996. - 1 : Vol. 42. - pp. 77-88.

Ortega R. Chemical elements distribution in cells [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2005. - 1-4 : Vol. 231. - pp. 218-223.

Ortega R., Suda A. et Devès G. Nuclear microprobe imaging of gallium nitrate in cancer cells [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2003. - Vol. 210. - pp. 364-367. - 8th International Conference of Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Overley J. C. [et al.] Energy-loss radiography with a scanning MeV-ion microprobe [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. - 1983. - 1-3 : Vol. 218. - pp. 43-46.

Pallon J. [et al.] A view on elemental distribution alterations of coronary artery walls in atherogenesis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1995. - 1-4 : Vol. 104. - pp. 344-350. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Pallon J. [et al.] An off-axis STIM procedure for precise mass determination and imaging [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2004. - Vol. 219-220. - pp. 988-993.

Pallon J. [et al.] STIM evaluation in GeoPIXE to complement the quantitative dynamic analysis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2009. - 12-13 : Vol. 267. - pp. 2080-2084.

Pallon J. [et al.] Symbiotic fungi that are essential for plant nutrient uptake investigated with {NMP} [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2007. - 1 : Vol. 260. - pp. 149-152.

Pallon J. A forward scattering technique for the determination of target thickness [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1987. - 1-3 : Vol. 22. - pp. 87-90.

Perry C. C., Grime G. W. et Watt F. An X-ray analytical study of mandibles from calanus pacificus, an herbivorous copepod [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1988. - 3 : Vol. 30. - pp. 367-371.

Piédallu M-A. Démarche qualité en recherche. Principes généraux et recommandations [Livre]. - [s.l.] : AFNOR, 2001. - Vol. FD X50-550.

Pinheiro T. [et al.] Experimental investigations into sample preparation of Alzheimer tissue specimens for nuclear microprobe analysis [Revue] // Nuclear

Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1991. - 1-3 : Vol. 54. - pp. 186-190.

Pinheiro T. [et al.] Imaging iron in skin and liver: Non-invasive tools for hemochromatosis therapy [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2009. - 12-13 : Vol. 267. - pp. 2140-2143. - Proceedings of the 11th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and the 3rd International Workshop on Proton Beam Writing.

Pongrac P. [et al.] Cd induced redistribution of elements within leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2010. - 11-12 : Vol. 268. - pp. 2205-2210.

Rakotomalala R. TANAGRA : un logiciel gratuit pour l'enseignement et la recherche [Conférence] // EGC. - 2005. - pp. 697-702.

Razafindrabe L. Dosage des éléments de faible numéro atomique par microsonde nucléaire: application aux échanges ioniques cellulaires [Revue] // Thèse de l'université de Bordeaux. - 1995.

Ren M. [et al.] Nuclear microprobe investigation into the trace elemental contents of carotid artery walls of apolipoprotein E deficient mice [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2007. - 1 : Vol. 260. - pp. 240-244. - Nuclear Microprobe Technology and Applications (ICNMTA2006) and Proton Beam Writing (PBW II), 10th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and 2nd International Workshop on Proton Beam Writing.

Rohrer L. et Schnitter H. Stabilization [Section du livre] // Electrostatic Accelerators / éd. Hellborg Ragnar. - [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2005. - 10.1007/3-540-27095-7_15.

Roijers R. B. [et al.] Early Calcifications in Human Coronary Arteries As Determined with a Proton Microprobe [Revue] // Analytical Chemistry. - 2008. - 1 : Vol. 80. - pp. 55-61.

Rothermel M., Butz T. et Reinert T. Rearranging a nanoprobe: Line foci, grid shadow patterns and performance tests [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2009. - 12-13 : Vol. 267. - pp. 2017-2020. - Proceedings of the 11th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications and the 3rd International Workshop on Proton Beam Writing.

Russell S. B. [et al.] Proton backscatter as a means of mass normalization in PIXE scanning of human hair [Revue] // Nuclear Instruments and Methods. - 1981. - 1-3 : Vol. 181. - pp. 97-98.

Rutherford E. The scattering of α and β particles by matter and the structure of the atom [Revue] // Philosophical Magazine. - 1911. - 6 : Vol. 21. - pp. 669-688.

Ryan C. G. [et al.] SNIP, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of PIXE spectra in geoscience applications [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1988. - 3 : Vol. 34. - pp. 396-402.

Ryan C. G. [et al.] The Maia 384 detector array in a nuclear microprobe: A platform for high definition PIXE elemental imaging [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2010. - 11-12 : Vol. 268. - pp. 1899-1902. - 19th International Conference on Ion Beam Analysis.

Schofield R. M. S. [et al.] X-ray microanalytical surveys of minor element concentrations in unsectioned biological samples [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1988. - 3 : Vol. 30. - pp. 398-403.

Schofield R., Lefevre H. et Shaffer M. Complementary microanalysis of Zn, Mn and Fe in the chelicera of spiders and scorpions using scanning MeV-ion and electron microprobes [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1989. - Part 1 : Vol. 40-41. - pp. 698-701.

Scofield J. H. Atomic Data and nuclear data tables [Livre]. - 1974. - Vol. 14/121.

Sealock R. M., Jamieson D. N. et Legge G. J. F. Scanning transmission microscopy with a 2 MeV alpha particle microbeam [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1987. - 3 : Vol. 29. - pp. 557-566.

Segot M. Systèmes de management de la qualité [Livre]. - [s.l.] : AFNOR, 2000. - Vol. ISO 9000.

Sera K., Futatsugawa S. et Murao S. Quantitative analysis of untreated hair samples for monitoring human exposure to heavy metals [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2002. - 1-4 : Vol. 189. - pp. 174-179.

Shiurba R. Freeze-substitution: Origins and applications [Section du livre] // A Survey of Cell Biology / éd. Jeon Kwang W.. - [s.l.] : Academic Press, 2001. - Vol. 206.

Siegel S. et Castellan N. J. Non parametric statistics for the behavioral sciences [Livre]. - New York : McGraw & Hill, 1988.

Simon M. [et al.] The skin barrier function: a micro-PIXE study [Revue] // X-Ray Spectrometry. - 2009. - 2 : Vol. 38. - pp. 132-137.

Simon M. [et al.] Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity [Revue] // Nanotoxicology. - 2010. - 0 : Vol. in press. - pp. 1-15.

Slama M. Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais [Livre]. - [s.l.] : AFNOR, 2000. - Vol. NF EN ISO/CEI 17025.

Sziksai Z. [et al.] Nuclear microprobe investigation of the penetration of ultrafine zinc oxide into intact and tape-stripped human skin [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2010. - 11-12 : Vol. 268. - pp. 2160-2163. - 19th International Conference on Ion Beam Analysis.

Szymanski R. et Jamieson D. N. Ion source brightness and nuclear microprobe applications [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1997. - 1-4 : Vol. 130. - pp. 80-85. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Tapper U. A. [et al.] Elemental regional distribution in human brain tumours -- PIXE analysis of biopsy and autopsy samples [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1987. - 1-3 : Vol. 22. - pp. 176-178.

Tarnawska M. [et al.] Nickel toxicity in the hepatopancreas of an isopod Porcellio scaber Oniscidea [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2007. - 1 : Vol. 260. - pp. 213-217.

Themner K. et Malmqvist K. G. Determination of local areal densities of heterogeneous biological samples by elastically backscattered protons in pxe microanalysis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1986. - 1-6 : Vol. 15. - pp. 404-406.

Themner K., Spanne P. et Jones K. W. Mass loss during X-ray microanalysis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1990. - 1-4 : Vol. 49. - pp. 52-59.

Thompson A. C. et Vaughan D. X-ray data booklet [Livre]. - [s.l.] : LBNL, 2000.

Thong P. S. [et al.] Iron and cell death in Parkinson's disease: a nuclear microscopic study into iron-rich granules in the parkinsonian substantia nigra of primate models [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1999. - 1-4 : Vol. 158. - pp. 349-355.

Thong P. S. [et al.] Nuclear microscopy of single whole cultured cells: preparation and analysis of human Chang liver cells [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1997. - 1-4 : Vol. 130. - pp. 351-357. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Trocellier P. et Trouslard P. Spectrométrie de collisions élastiques et de réactions nucléaires. Théorie. [Revue] // Techniques de l'ingénieur. - 2000. - p. 2560.

Tsuboi Y. [et al.] Characterization of thin films for biomaterial applications using PIXE and RBS [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. - 1994. - 1-3 : Vol. 353. - pp. 597-600.

Tylko G., Mesjasz-Przybyłowicz J. et Przybyłowicz W. J. In-vacuum {micro-PIXE} analysis of biological specimens in frozen-hydrated state [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2007. - 1 : Vol. 260. - pp. 141-148.

Udalagama C. N. [et al.] An automatic beam focusing system for MeV protons [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2005. - 1-4 : Vol. 231. - pp. 389-393. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Valkovic V. Application of nuclear analytical techniques in the study of trace element role in biology and medicine [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1989. - Part 2 : Vol. 40-41. - pp. 848-852.

Van Lierde S. [et al.] Nuclear microprobe analysis of brain tissue: Quantitative aspects and concentration variability of minor and trace elements [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1997. - 1-4 : Vol. 130. - pp. 444-448. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Van Lierde S. [et al.] Study of some analytical-methodological aspects in nuclear microprobe analysis of soft biological tissues [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and

Atoms. - 1995. - 1-4 : Vol. 104. - pp. 328-332. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Verdier F. [et al.] Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the Cynomolgus monkey [Revue] // Vaccine. - 2005. - 11 : Vol. 23. - pp. 1359-1367.

Verhaeghe E. [et al.] Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga <i>Laminaria digitata</i> suggests a new mechanism for its accumulation [Revue] // Journal of Biological Inorganic Chemistry. - [s.l.] : Springer Berlin / Heidelberg, 2008. - Vol. 13. - pp. 257-269. - 10.1007/s00775-007-0319-6.

Visser J. [et al.] Considerations on accelerator systems requirements and limitations for μ -probe applications [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2005. - 1-4 : Vol. 231. - pp. 32-36. - Nuclear Microprobe Technology and Applications.

Watt F. [et al.] A nuclear microscopy study of trace elements Ca, Fe, Zn and Cu in atherosclerosis [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2006. - 1-2 : Vol. 249. - pp. 646-652.

Watt F. [et al.] Imaging of single cells and tissue using MeV ions [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2009. - 12-13 : Vol. 267. - pp. 2113-2116.

Watt F. [et al.] The Oxford scanning proton microprobe: A medical diagnostic application [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1984. - 1-3 : Vol. 3. - pp. 599-605.

Weisser D. Voltage Distribution Systems - Resistors and Corona Points [Section du livre] // Electrostatic Accelerators / éd. Hellborg Ragnar. - [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2005. - 10.1007/3-540-27095-7_12.

Yavor S. Y., Dymnikov A. D. et Ovsyannikova L. P. Achromatic quadrupole lenses [Revue] // Nuclear Instruments and Methods. - 1964. - Vol. 26. - pp. 13-17.

Yin S. [et al.] Study on the correlation of trace elements in human scalp hair with esophageal cancer by PIXE [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 1993. - 1-4 : Vol. 75. - pp. 177-179.

Ynsa M. D. [et al.] Comparative study between reconstructed and native human epidermis using nuclear microscopy [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2006. - 1-2 : Vol. 249. - pp. 710-714.

Ziegler J. F. Stopping and ranges of ions in matter [Livre]. - [s.l.] : Pergamon press, 1996.

Ziegler J. F., Ziegler M. D. et Biersack J. P. SRIM - The stopping and range of ions in matter (2010) [Revue] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. - 2010. - 11-12 : Vol. 268. - pp. 1818-1823. - 19th International Conference on Ion Beam Analysis.

8 ANNEXES

8.1 FONCTIONNEMENT DU LOGICIEL PAPARAMBORDE

Le logiciel Paparamborde, initialement développé en Visual Basic, a été traduit en C++. Il est construit autour de la classe *STIMSpectra*, les classes *SRIM* et *AtomData* servant essentiellement à dialoguer avec le module SRMODULE (Ziegler, et al., 2010) du logiciel SRIM.

La classe *STIMSpectra* sert à générer un objet de type 'spectre STIM' pour chaque analyse (Tableau 22). Elle est construite autour d'un tableau de type `<vector><float>` dont la taille correspond au nombre de canaux du spectre, la première ligne du tableau (indice 0) servant à enregistrer les paramètres de calibration associés au spectre ainsi que sa taille. A partir de la deuxième ligne, les résultats pour chaque canal des calculs de l'énergie des particules et des valeurs de pertes d'énergie électroniques et nucléaires sont stockées respectivement dans les colonnes 1, 2 et 3. La première colonne (indice 0) correspond au nombre de coups dans le canal i .

Tableau 22 : Structure des données dans la classe STIMSpectra. E_0 est l'énergie des particules incidentes, a est la pente de la droite de calibration, b est l'ordonnée à l'origine de la droite de calibration, M est la masse des ions incidents, i_{max} correspond à la taille du spectre (nombre de lignes du vecteur), H_i est le nombre de coups dans le canal i , E_i est l'énergie des particules dans le canal i , $\left.\frac{de}{dx}\right|_i^e$ et $\left.\frac{de}{dx}\right|_i^n$ sont respectivement les pertes d'énergie électroniques et nucléaires correspondant au canal i , et m_i la masse équivalente du canal i .

N° ligne					
0	E_0 (keV)	a	b	M	i_{max}
i	H_i	E_i	$\left.\frac{de}{dx}\right _i^e$	$\left.\frac{de}{dx}\right _i^n$	m_i

Le fonctionnement détaillé du calcul est présenté dans la partie 4.1.2

```
class STIMSpectra
{
    vector <vector <float> > Spectre;
public:
    STIMSpectra(int size=1025);
    ~STIMSpectra(void);

    //setters
    void SetA(float a);
    void SetB(float b);
```

```

void SetE(int channel);
void SetE0(float E0);
void SetIon(int Z);
void SetCount(int channel, float count);
void SetDeDxe(int channel, float DeDxe);
void SetDeDxn(int channel, float DeDxn);
void SetMass(int channel, float mass);
void SetSize(int Nbchannel);

//getters
float GetA(void) const;
float GetB(void) const;
float GetE(int) const;
int GetChannel(float E) const;
float GetE0(void) const;
float GetCount(int channel) const;
int GetIon(void) const;
float GetMass(int channel) const;
float GetDeDxe(int channel) const;
float GetDeDxn(int channel) const;
int GetSize(void) const;
float GetDeltaE(int channel) const;

//spectrum operation
void calibrate(float E0, float a, float b, int IZ=1);
float MassCalc(int channel_min=1, int channel_max=5000);
float TotalMassCalc(int channel_min, int channel_max);
int GetMedianChan (void);
void FitCalibration(int x1, float y1);
void FitCalibration(int x1, float y1, float x0);
//void FitCalibration(const vector <float> & xmass);
template<typename T> T min(T a, T b);
template<typename T> T max(T a, T b);

//opening spectra
void ReadSpectra(string path);
void OutputMass(string path);
void affiche(void);
};

```

```

class SRIM
{
    string path_SROUT, path_SRIN;
    vector <string> data_SROUT;

    int IZ; //Z of incoming ion
    float Imass; //Mass of incoming particule
    bool SolidTarget; //target type: 0/solid; 1/Gas
    float Density; //Density of target
    bool Corr; //Compound correction
    int stop_unit; //stopping units for calculation

public:

    SRIM(STIMspectra &s);
    ~SRIM(void);

    void SetPath(string path1="SR_OUT.txt", string path2="SR.IN");
    void ReadSROUT(STIMspectra &s);

```

```

    void WriteSRIN(const STIMSpectra &sp, const AtomData &atm, const
Sample &sample, int channel_start, int channel_stop);
    void SetSolidTarget(bool type=0);
    void SetCorr(bool corr=0);
    void SetStoppingUnits(int unit=4);
    void SetDensity(float density=1);

};

```

```

class AtomData
{
    friend class SRIM;
    int A[93];           // Atomic number
    string B[93];        // Element symbol
    string C[93];        // Element name
    int D[93];           // MAI mass
    float E[93];         // MAI weight
    float F[93];         // Natural Weight
    float G[93];         // Density (g/cm3)
    float H[93];         // Atomic Density
    float I[93];         // Fermi velocity
    float J[93];         // Heat Sublimation
    float K[93];         // Gas density (g/cm3)
    float L[93];         // Gas Atomic density /cm3
    string path_ATOMDATA;

public:
    AtomData(string path="ATOMDATA");
    ~AtomData(void);
    void SetPath(string path="ATOMDATA");
    void Read(void);
    string GetSymbol(int Z) const;
    string GetElName(int Z) const;
    int GetMAIMass(int Z) const;
    float GetMaiWeight(int Z) const;
    float GetNatWeight(int Z) const;
    float GetDensity(int Z) const;
    float GetAtDensity(int Z) const;
    float GetFermiVel(int Z) const;
    float GetHeatSub(int Z) const;
    float GetGasDensity(int Z) const;
    float GetGasAtDensity(int Z) const;

};

```

8.2 MESURES DE LA TAILLE DU FAISCEAU EN CONFIGURATION TRIPLET ET QUINTUPLET

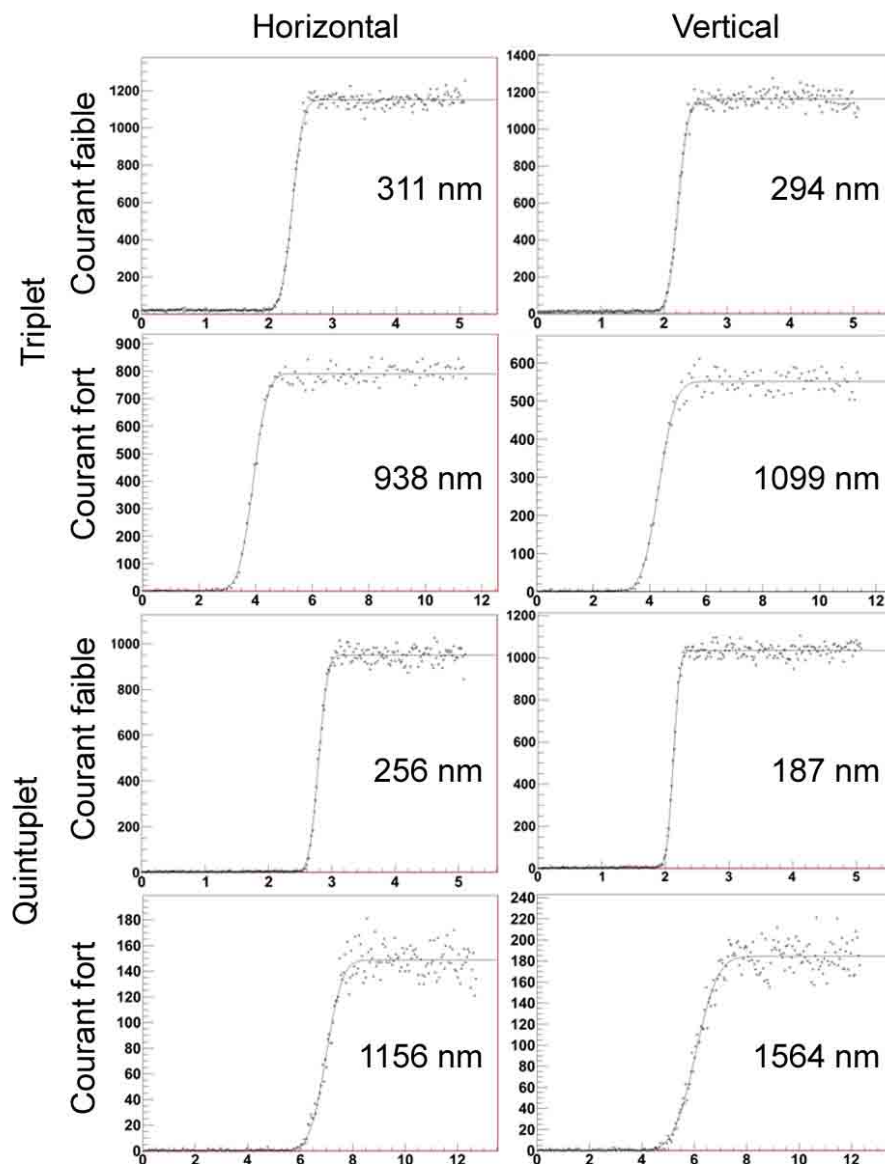


Figure 48: Mesures de la taille en STIM du faisceau d'ions sur la ligne nanosonde en configurations 'triplet' et 'quintuplet'. Le profil est obtenu en balayant le faisceau sur le bord d'une grille de nickel. Les valeurs sont calculées par simulation de la marche par une fonction erreur reproduisant la convolution d'une fonction gaussienne et d'une marche. Abscisse : déplacement du faisceau (μm) ; Ordonnée : nombre de particules transmises. D'après [Barberet, et al., 2010].

8.3 DEMARCHE QUALITE

8.3.1 RESULTAT DU BRAINSTORMING SILENCIEUX

Le *brainstorming silencieux* est un exercice au cours duquel les participants sont invités à écrire sur autant de morceaux de papier que nécessaire, toutes les idées qui leur viennent et répondant à la question initialement posée, ici « Comment capitaliser les données dans une base de données de compositions chimiques ». Le principe du silence garantit une plus grande indépendance des participants, notamment vis à vis des liens hiérarchiques existants entre les participants. L'exercice ne doit pas durer plus de 5 minutes et chaque idée doit être rédigée en employant un verbe d'action (« identifier », « créer », « rendre », ...).

Dans un deuxième temps, une personne du groupe est désignée pour lire à haute voix les idées récoltées. Les participants sont ensuite invités à regrouper les idées qui leur paraissent similaires, toujours en silence. La personne désignée responsable de l'activité veille à isoler les idées qui ne font pas l'unanimité concernant leur groupe d'appartenance. Lorsque toutes les idées ont été classées, les participants identifient les groupes d'idées qu'ils ont créés en leur attribuant une action comme par exemple « Identifier et impliquer les personnes compétentes pour la rédaction du cahier des charges » (Tableau 23). Les groupes d'idées sont ensuite classés par priorité par votation, puis les participants sont invités à réfléchir au risque principal associé à chaque groupe et à proposer une alternative.

Tableau 23 : Priorités identifiées des options d'intervention pour la création de la base de données (BDD). Chaque case du tableau correspond à une action à mener proposée lors d'un brainstorming silencieux permettant de répondre à la question « Comment capitaliser les données de composition chimique dans une base de données ? ».

1	2	3	4	5
Identifier et impliquer les personnes compétentes pour la rédaction du cahier des charges	Créer physiquement la base de données répondant aux spécifications	Avoir une base de données conviviale et exhaustive	Informar et former le personnel en interne	Développer l'accès à la connaissance à l'extérieur du labo
Identifier les personnes ayant les connaissances	Avoir une BDD fiable	Obtenir des résultats de recherche	Informar les chercheurs du laboratoire	Libre accès à tous les académiques du

		facilement exploitable		domaine
Etablir en amont 1 « fiche modèle » exhaustive avec l'ensemble des infos à trouver	Créer une plateforme intranet de connaissances	Intégrer obligatoirement toute nouvelle donnée dans la BDD	Sensibiliser tout concerné en interne	Disponibilité gratuite pour le corps enseignant
Avoir des outils de calcul associés	Avoir un stagiaire informatique (PHP, MySQL)	Rendre les données facilement et rapidement accessibles	Former tout nouvel arrivant	Créer un réseau international de la thématique
Inclure des références bibliographiques (ex : HAL, ...)				
Répertorier les différents composants possibles				
Faire valider la fiche modèle par différents utilisateurs				
Connaître les données existantes				
Créer des critères de classification				

Evaluation des risques principaux				
Manque de disponibilité et/ou de motivation	Manque de compétences	Pas de mise à jour de la base de données	Mauvaise formation	Risque de piratage des données
Solutions envisagées				
Demande de formation par les personnes compétentes	Former les personnels aux outils de gestion des BDD	Créer un indicateur de taux de remplissage de la BDD	Organiser une formation obligatoire pour tous les personnels	Contrôler les accès à la BDD

8.3.2 CARTOGRAPHIE DES PROCESSUS DE FONCTIONNEMENT DE LA BASE DE DONNEES

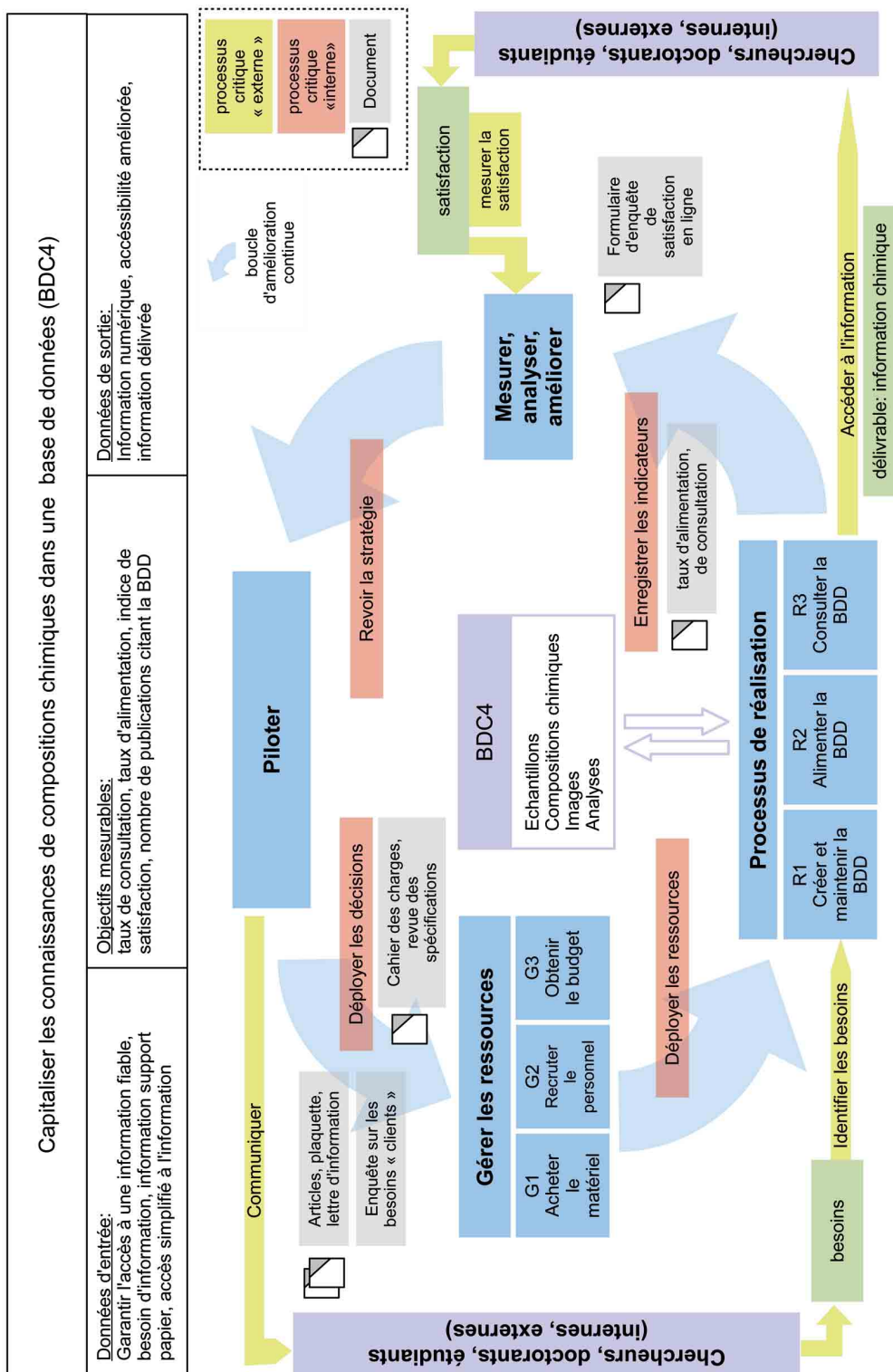


Figure 49 : Cartographie des processus selon un modèle type « ISO9000 » indiquant les interfaces critiques internes et externes associées à la démarche d'amélioration continue.

Résumé

Etudier le rôle des éléments traces à l'échelle cellulaire requiert des outils analytiques de pointe. Nous avons développé une nouvelle *méthodologie* précise de la répartition des éléments chimiques cellulaires à partir d'une combinaison des méthodes d'analyse par faisceaux d'ions PIXE, RBS et STIM. Cette méthodologie s'appuie fortement sur le développement d'un logiciel (Paparamborde) pour le traitement quantitatif des expériences STIM. La validité de cette méthode ainsi que ses limites sont discutées. La méthode STIM-PIXE-RBS permet de quantifier la composition en éléments trace ($\mu\text{g/g}$) avec une incertitude de mesure évaluée à 19,8% dans des compartiments cellulaires de masse inférieure à 0,1 ng.

Une des limites de la méthode réside dans le faible nombre d'échantillons analysables en raison à la fois du temps minimum nécessaire pour réaliser une acquisition et de l'accès limité aux plateformes d'analyse par faisceaux d'ions. C'est pourquoi nous avons également développé une base de données pour la capitalisation des compositions chimiques cellulaires (BDC4). Cette base de données s'inscrit dans la logique de d'utilisation de la composition chimique cellulaire comme un traceur de l'activité biologique, et doit permettre à terme de définir des compositions chimiques de référence pour les différents types cellulaires analysés.

L'application de la méthodologie STIM-PIXE-RBS à l'étude de la toxicologie nucléaire du cobalt permet d'illustrer son intérêt en pratique. En particulier, l'analyse STIM s'avère indispensable dans le cas d'échantillons présentant une perte de masse organique au cours de l'analyse PIXE-RBS.

Abstract

The study of the role of trace elements at cellular level requires the use of state-of-the-art analytical tools that could achieve enough sensitivity and spatial resolution. We developed a new methodology for the accurate quantification of chemical element distribution in single cells based on a combination of ion beam analysis techniques STIM, PIXE and RBS. The quantification procedure relies on the development of a STIM data analysis software (Paparamborde). Validity of this methodology and limits are discussed here. The method allows the quantification of trace elements ($\mu\text{g/g}$) with a 19.8 % uncertainty in cellular compartments with mass below 0.1 ng.

The main limit of the method lies in the poor number of samples that can be analyzed, due to long irradiation times required and limited access to ion beam analysis facilities. This is the reason why we developed a database for cellular chemical composition capitalization (BDC4). BDC4 has been designed in order to use cellular chemical composition as a tracer for biological activities and is expected to provide in the future reference chemical compositions for any cellular type or compartment.

Application of the STIM-PIXE-RBS methodology to the study of nuclear toxicology of cobalt compounds is presented here showing that STIM analysis is absolutely needed when organic mass loss appears during PIXE-RBS irradiation.