

Surfaces nanostructurées pour la détection localisée et l'identification quantitative de polluants et pesticides

1. Contexte/justification scientifique

Depuis un siècle, nous avons connu une explosion des produits de synthèse dans l'industrie, l'agriculture et notre vie quotidienne. Aujourd'hui, environ 100 000 substances chimiques sont produites, importées et utilisées en Europe et 5 000 d'entre elles sont considérées comme dangereuses pour l'homme et l'environnement [1]. Le développement industriel, l'agriculture intensive et les nouvelles pratiques domestiques ont entraîné la présence dans nos déchets de nouvelles substances susceptibles d'engendrer des risques sanitaires et environnementaux notamment à travers la pollution des sols et de l'eau.

En 2015, la France comptait près de 6 000 sites et sols pollués [2]. Les anciens sites industriels, les dépôts d'hydrocarbures ou de déchets concentrent la plus grande partie des pollutions et dans la moitié des cas, les eaux souterraines à proximité de ces sites sont-elles mêmes contaminées par un ou plusieurs polluants. Les différents types d'hydrocarbures représentent un peu moins de 60 % des produits impliqués dans la pollution des nappes, les métaux et métalloïdes près de 20 % et les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène) ou les cyanures représentent chacun moins de 10 % des pollutions de nappe. Bien que des efforts considérables aient été réalisés par les industriels pour réduire de moitié ces rejets, la pollution industrielle représente encore à elle seule près de 50 % de la pollution globale.

À l'échelle mondiale, l'agriculture utilise 70 % des ressources d'eau, ce qui rend ce secteur d'activité le plus grand consommateur. Un rapport de l'institut international de recherche sur les politiques alimentaires [3] souligne avec inquiétude que plus de 80% des sols agricoles dans le monde ont des problèmes de fertilité. Les pollutions agricoles des sols sont principalement dues à deux facteurs : les produits chimiques (engrais, pesticides, fongicides, herbicides, insecticides) et l'élevage intensif avec les excréments, fumiers et lisiers. Il est à noter que les jardins privés sont aussi une source de pollution de l'eau importante due principalement au non-respect par l'utilisateur des dosages indiqués sur les emballages des produits phytosanitaires utilisés.

Compte tenu de toutes ces sources de pollutions, nos écosystèmes aquatiques (cours d'eau et eaux souterraines) sont devenus d'importants réservoirs de polluants [4]. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) ont fait état en 2016 [5] d'études scientifiques réalisées sur les effets sanitaires potentiels des produits chimiques dangereux, comme les pesticides. Ces travaux permettent de les classer comme cancérigènes, neurotoxiques ou tératogènes (susceptibles d'endommager le fœtus). Comme les pesticides sont susceptibles de migrer vers milieux lors de leur application, ils font l'objet d'une surveillance régulière dans les cours d'eau. Les taux de pesticides présents aujourd'hui dans les eaux naturelles sont à des concentrations de quelques microgrammes par litre [6].

Le rejet constant de polluants dans l'environnement et leurs présences dans la chaîne alimentaire constituent une menace à la fois pour l'équilibre de l'environnement et pour la santé humaine [7]. Par ailleurs, des études ont notamment révélées que des produits de dégradation des pesticides peuvent être aussi toxiques, ou même plus toxiques, que la molécule d'origine [8]. Ainsi, afin de protéger le consommateur, de nombreuses réglementations ont été mises en place en fixant des Limites Maximales de Résidus (LMR) dans les produits destinés aux alimentations humaine et animale [9]. L'OMS a par ailleurs fixé des valeurs guides spécifiques à chaque molécule de pesticide (de l'ordre du microgramme à quelques dizaines de microgrammes par litre), le plus souvent plus élevées que la norme européenne [10] de 0,1 µg/l

(sauf pour l'aldrine, la dieldrine, l'heptachlore et l'heptachloreépoxyde, pour lesquels la valeur paramétrique est 0,030 µg/l).

L'ampleur de la pollution de l'eau est particulièrement préoccupante et complexe à traiter car des micropolluants (résidus médicamenteux, autres produits de soins corporels, additifs pour plastiques,...) ne sont pas inclus dans les réglementations ni dans les programmes de surveillance sanitaire. C'est pour cette raison que la gestion sur le long terme de la qualité de l'eau est devenue un nouvel enjeu écologique et humain et que l'analyse de l'eau nécessite de développer des technologies innovantes spécifiques et sensibles permettant la détection de substance à faible dose dans un milieu donné. Il est nécessaire que ces techniques soient capables de contrôler, sans à priori, en continu et *in situ* la qualité des eaux souterraines et marines. Bien que les techniques usuelles de séparation et de détection soient de plus en plus performantes (l'une des techniques les plus utilisées étant la chromatographie en phase gaze couplée à la spectrométrie de masse GC-SM), ces outils ne permettent pas systématiquement d'identifier et de quantifier les espèces recherchées présentes en faibles teneurs (de l'ordre du microgramme ou même du nanogramme par litre) dans des milieux très dilués.

Une grande variété de capteurs reposant sur différents modes de transduction sont en développement dans les laboratoires de recherche. Parmi toutes les méthodes de détection optique, l'identification de molécules par analyses spectrales utilisant la diffusion Raman exaltée de surface (DRES ou SERS en anglais pour Surface-Enhanced Raman Scattering) grâce à des supports métalliques nanostructurés est certainement l'une des voies les plus prometteuses. Cette technique a certains avantages car elle est rapide, très sensible, peut être miniaturisée et permet de détecter simultanément un ou plusieurs composés dans des mélanges, même sous forme de trace (10^{-10} M) [11]. L'utilisation de cette technique à des fins applicatives nécessite néanmoins de développer des supports SERS pour lesquels on maîtrise parfaitement les paramètres géométriques de surface (pour reproduire les facteurs d'exaltation tout en bénéficiant d'une dépendance spectrale). Cette contrainte technologique a récemment été levée par le développement dans l'équipe PIMS (IMMM, Le Mans) d'une méthodologie de structuration basée sur le principe de lithographie douce (utilisant un microscope à force atomique comme outil de nanostructuration) [12].

Dans le cadre du projet **DIPP-SUF**, nous proposons de développer une méthode d'analyse innovante (enveloppe Soleau n° 593641, décembre 2017) basée sur l'utilisation couplée de supports spécifiques DRES (méthodologie breveté à l'IMMM) et d'une analyse chimiométrique robuste permettant la détection et l'identification quantitative de multi-résidus dans des solutions extrêmement diluées. Nous prendrons soin d'étudier la reproductibilité des mesures, et chercherons à quantifier la sensibilité et la sélectivité de nos supports et des supports commerciaux.

2. Description du projet - Objectifs du projet

Projet

Nous proposons d'élaborer des surfaces métalliques (or, argent) nanostructurées afin de détecter, identifier et quantifier des espèces moléculaires en très faible concentration au sein de mélanges complexes.

La première étape va consister à développer et optimiser la topographie nanométrique de support métallique afin d'assurer une exaltation des signaux Raman des molécules à détecter.

Une simulation des champs électromagnétiques localisés, induits par l'excitation (sous irradiation) des plasmons à la surface du métal, permettra d'estimer et de prédire le facteur d'exaltation de chaque type de nanostructure.

Nous proposons ensuite de mettre au point et développer dans le cadre du projet **DIPP-SUF** une méthodologie d'analyse chimiométrique des données spectrales Raman dite de « soft-modelling » permettant sans à priori sur le système chimique / biologique étudié (1) d'estimer le nombre d'espèces pures présentes dans le mélange complexe, (2) d'extraire l'ensemble des spectres des espèces pures (présents dans le cube de données hyperspectrales) nécessaire à l'identification moléculaire et (3) d'estimer la concentration de chacune d'entre elles.

Cette méthode devra être validée et optimisée sur des molécules modèles avant de l'appliquer sur des molécules d'intérêts.

Caractère innovant

L'équipe PIMS a développé une méthode innovante de nanostructuration de surfaces métalliques basée sur un principe de lithographie douce en utilisant un microscope à force atomique comme outil de nanostructuration. Cette méthode originale et peu coûteuse autorisant le contrôle fin des formes et des espacements à l'échelle locale a reçu le soutien de la SATT-OUEST Valorisation avant d'être breveté fin 2014. Les techniques conventionnelles de lithographie comme la photolithographie (technique la plus utilisée actuellement dans l'industrie microélectronique) permettent de fabriquer de manière reproductible des surfaces avec des architectures complexes. Notre méthode offre plusieurs avantages par rapport à ces techniques puisqu'elle ne nécessite pas d'équipement de type salle blanche ni l'utilisation de masque (dont la fabrication est chronophage et coûteuse) ni de résine ou d'illumination spécifique.

L'atout majeur de notre méthode de fabrication réside dans la possibilité de lithographier différentes structures (morphologie, topographie) sur un même substrat (Figure 1), ce qui est un avantage pour réaliser des supports dédiés et optimisés aux analyses DRES. Des analyses multi-longueurs d'onde sont donc accessibles avec un seul support et ce quelles que soient les molécules à étudier.

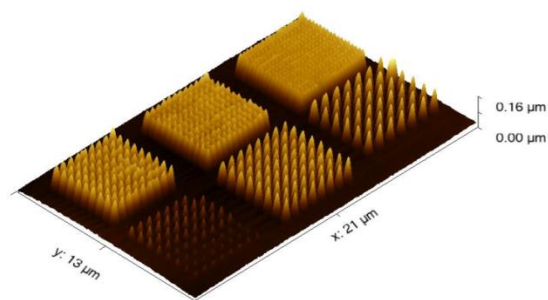


Figure 1 : vue en 3D de structures périodiques obtenues sur une surface d'or.

Impact attendu

Bien que la problématique sociétale soit clairement définie et attractive au plan nationale et internationale, il reste néanmoins essentiel pour nos laboratoires de démontrer d'une part la faisabilité et la pertinence d'une telle démarche et d'autre part la possibilité de proposer des solutions innovantes.

En cas de succès, nous proposerons un projet plus ambitieux (à l'ANSES ou à l'ANR) en nous adossant à un ou plusieurs partenaires spécialisés en environnement et dans certains types de polluants.

Le succès de notre projet permettra par ailleurs d'engager des discussions avec des industriels pour le développement d'instruments portables dédiés à l'analyse sur site de molécules d'intérêt (polluants, pesticides, perturbateurs endocriniens,...) à fort impact sociétal. Cette technologie

de contrôle sera basée sur une stratégie de détection et d'analyse grâce à des logiciels de suivi « intelligents » alimentés par des capteurs physiques SERS.

3. Méthodes/description du projet

Pour atteindre les objectifs du projet **DIPP-SUF**, la méthodologie sera basée sur 3 axes opérationnels :

- Préparation et optimisation de support SERS : Elaboration, simulation des facteurs d'exaltation optique
- Détection et mesures spectroscopiques de molécules en milieu dilué
- Exploration et exploitation des données spectrales par analyses multivariées

Chaque axe sera coordonné par un responsable.

Axe 1 – Préparation et optimisation de supports SERS : Elaboration, simulation *Responsable M. Edely, IMMM*

Elaboration des supports nanostructurés

Cette tâche vise à préparer des supports nanostructurés pour étudier les molécules modèles et les polluants. Décrivons brièvement la méthode que nous avons brevetée [12]. Elle consiste à déposer sur un substrat solide un film polymère d'épaisseur nanométrique par la technique du spin-coating. Une pointe AFM est ensuite utilisée pour lithographier dans ce film les nano- ou micro-structures et un film métallique est alors déposé par PVD sur la surface du polymère nanostructuré. La méthode du « template stripping » [13] permet alors de transférer ce film structuré sur le support qui nous servira à faire les mesures spectroscopiques. Grâce au système closed-loop (qui offre une résolution nanométrique sur le positionnement de la pointe AFM dans les trois dimensions de l'espace), cette méthode offre l'avantage de pouvoir élaborer sur un même support plusieurs nanostructures contrôlées.

Dans la première partie du projet **DIPP-SUF**, nous allons utiliser des supports multi-structurés en or et argent pour explorer les propriétés d'exaltation Raman sur deux molécules modèles (le benzenethiol et le cristal violet) et des polluants (parmi des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des pesticides comme l'atrazine, l'acétochlore et l'isoproturon et des polluants émergents comme le dichlofénac, 17-bêta-estradiol et le 17-alphaéthynylestradiol) et nous étudierons (Axe 2 du projet) les facteurs d'exaltation expérimentaux en fonction des longueurs d'onde incidente. Des structures périodiques avec différentes tailles de base (90-900 nm de large), de hauteur (10-300 nm) et pas du réseau (0-500 nm) seront élaborées sur des zones allant de 10 μm X 10 μm à 50 μm X 50 μm . Plusieurs architectures de même type seront systématiquement élaborées sur un même support pour contrôler l'homogénéité et la reproductibilité des mesures et rendre plus robustes les analyses chimiométriques (Axe 3).

Simulation des facteurs d'exaltation optique

Les caractérisations de nos structures en champ proche ont révélé que les points de forte exaltation étaient localisés sur les nanostructures (dû à l'agglomération de nanoparticules dont les tailles sont comprises entre 3 et 10 nm). La géométrie des arrangements des nanostructures et notamment l'espacement entre elles a donc une influence sur l'exaltation du champ local.

C'est le champ électrique engendré par l'excitation des plasmons à la surface du métal, coté diélectrique, qui est impliqué dans le processus Raman. Afin d'y avoir accès, nous allons mener des calculs de distribution de ce champ sur les profils réels des structures avec le logiciel d'éléments finis COMSOL Multiphysics. Ce logiciel contient plusieurs modules dédiés à différents domaines physiques (électromagnétisme, thermodynamique, l'écoulement de fluides, mécanique, etc) pour lesquels différents systèmes d'équations et de variables sont prédéfinis. Pour notre étude, nous allons utiliser les modules Radio Frequency et Wave Optics, adaptés aux ondes électromagnétiques. Les calculs seront réalisés en deux dimensions à partir des géométries des nanostructures. La partie solveur du logiciel permettra d'effectuer le calcul du champ local en paramétrant la longueur d'onde du champ incident dans le visible entre 400 et 900 nm, ce qui autorise l'accès à la dépendance spectrale de l'exaltation en fonction de la géométrie des nanostructures et des métaux utilisés. Nous effectuerons des calculs similaires pour des substrats commerciaux : la comparaison des résultats de simulation et des facteurs d'exaltation expérimentaux permettra d'optimiser des supports pour l'analyse de mélange. L'influence de l'orientation du champ incident et les effets de polarisation seront étudiés.

Axe 2 – Détection et mesures spectroscopiques de molécules diluées

Responsable J.-F. Bardeau, IMMM

Molécules étudiées

La première année, notre principal objectif sera de valider le concept d'analyse quantitative sur des solutions diluées contenant des molécules modèles. Nous avons choisi la molécule de cristal violet et le benzèthioliol car des résultats préliminaires montrent que des solutions de 10^{-6} M permettent de recouvrir complètement la surface des supports et que les intensités Raman enregistrées sont très intenses.

Après validation de la méthode de traitement, nos travaux seront focalisés sur la détection simultanée de plusieurs polluants sur un même capteur. Nous envisageons de tester une série de polluants (parmi des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des pesticides comme l'atrazine, l'acétochlore et l'isoproturon et des polluants émergents comme le dichlorofénac, 17- β -estradiol et le 17- α -éthinyloestradiol). Nos travaux s'attacheront à vérifier la reproductibilité, la linéarité et la limite de détection pour mélanges dilués (10^{-10} M à 10^{-2} M) de plusieurs composants.

Une solution mère sera préparée pour chaque molécule et des dilutions seront ensuite préparées. Les supports nanostructurés seront immergés dans les solutions diluées pendant un temps allant de 5 min à quelques heures, puis séchés et directement étudiés par Raman. Des analyses en solution seront testées avec un objectif à immersion et comparées aux analyses réalisées à l'air.

Compte tenu des travaux d'optimisation de nos supports SERS et des conditions expérimentales d'enregistrement des signaux Raman, nous pourrons alors déterminer les limites de détection pour toutes les molécules étudiées.

Mesures spectroscopiques

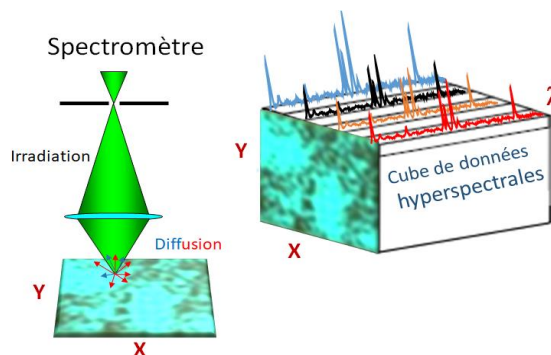
La spectroscopie Raman est une technique basée sur la diffusion inélastique de la lumière qui permet de caractériser la structure et la composition de la matière en exploitant les caractéristiques vibrationnelles qui sont spécifiques de groupements ou d'arrangements moléculaires. C'est une technique non destructive qui ne nécessite qu'une faible quantité de matière et qui peut être utilisée avec un minimum de préparation des échantillons. Cette analyse

vibrationnelle est une technique qui ne nécessite pas de marquage au préalable car le spectre vibrationnel est caractéristique de la composition moléculaire des matériaux étudiés.

L'effet Raman exalté de surface (SERS) est un moyen d'amplifier par plusieurs ordres de grandeur le signal Raman de molécules. Dans le cadre de cet axe, nous allons chercher à optimiser les conditions expérimentales d'enregistrement des spectres Raman sur les zones nanostructurées pour former un jeu de données spectrales avec le meilleur rapport signal/bruit possible. Les mesures spectroscopiques seront effectuées en priorité sur un spectromètre imageur Raman de dernière génération (mis en place en septembre 2018) mais aussi sur nos différents spectromètres Raman (Xplora, JY-Horiba), T64000 (JY-Horiba) ce qui nous permettra de bénéficier de plusieurs longueurs d'onde d'excitation (diodes laser 532, 638 et 785 nm et les raies d'un laser Argon-Krypton) et d'une plus grande gamme de résolutions spectrales.

Le principe du spectromètre imageur repose sur l'acquisition de données spectrales en chaque point de la zone étudiée. Ces données enregistrées en plusieurs zones d'un même échantillon ou à plusieurs longueurs d'onde sur une même zone formeront un cube de données hyperspectrales (Figure 2).

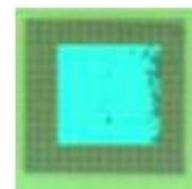
Figure 2 :
Génération d'un cube de données hyperspectrales par imagerie spectroscopique



Le cube de données qui contient simultanément des informations spectrales et spatiales sur l'échantillon, caractérisera donc la complexité et l'hétérogénéité de la zone analysée. Compte tenu des propriétés d'exaltation des supports et de la géométrie et l'orientation des nanostructures sur la surface, des analyses Raman en polarisation (en variant la polarisation des faisceaux incidents et diffusés) seront menées et comparées aux résultats de simulation (Axe 1).

Dans le cadre du projet **DIPP-SUF**, nous débuterons nos analyses sur les molécules de cristal violet et de benzèthiol (Figure 3). Nous chercherons à ajuster les concentrations pour réduire le nombre de molécules en surface, puis optimiser les temps d'acquisition, les puissances laser, les résolutions spectrales et spatiales pour détecter les traces de molécules présentes sur les supports car c'est sur des concentrations de molécules plus faibles que la technique SERS peut constituer une approche particulièrement intéressante.

Figure 3 : Superposition sur 1 zone structurée de l'image optique des structures et de la cartographie Raman (obtenue à 785 nm) de l'aire intégrée de la bande à 1000 cm^{-1} (analyse faite à partir d'une solution de BT à 10^{-6} M).



Dans le cas des molécules isolées, le cube des données spectrales sera collecté sur plusieurs structures de même nature afin de vérifier l'homogénéité et la répétabilité des analyses. Ces données spectroscopiques permettront de déterminer pour chaque structure des facteurs d'exaltation expérimentaux qui seront comparés aux prédictions calculées par éléments finis (Axe 1). Ces éléments seront pris en compte pour optimiser nos supports SERS.

Dans le cas des mélanges, le cube de données devra refléter les caractéristiques spectrales de l'ensemble des constituants de la surface imagée. L'analyse des données en composantes principales (ACP) devrait donc nous permettre d'optimiser les conditions expérimentales d'enregistrement des cubes de données spectrales avant que nous nous engageons à développer des méthodologies originales de traitement de données utilisant des outils chimiométriques (Axe 3).

Axe 3 – Exploration et exploitation des données spectrales par analyses multivariées

Responsable L. Duponchel, LASIR

Le principal objectif de cet axe sera de développer des méthodologies originales de traitement de données dites de résolution multivarié de courbes capables de révéler et quantifier, le plus précisément possible, les molécules en présence et d'extraire l'ensemble des spectres purs et leurs concentrations relatives pour chaque spectre de mélange.

Ces analyses quantitatives seront réalisées sur les données spectrales enregistrées sur les supports nanostructurés ayant été mis en contact avec (i) les molécules modèles et (ii) polluants en très faibles concentrations (données définies dans l'axe 2).

La méthodologie qui sera appliquée dans cet axe sera la même quelles que soient les molécules étudiées. Les analyses effectuées sur les molécules uniques permettront d'optimiser les supports et les conditions expérimentales d'enregistrement. Les travaux effectués sur les mélanges permettront alors de développer des méthodologies originales (enveloppe Soleau n° 593641, décembre 2017) de traitement de données basés sur analyses chimiométriques de résolution multivarié de courbes.

Molécules uniques

- Pour chaque molécule, nous prendrons soin d'étudier les données spectrales enregistrées sur différentes nanostructures par analyse en composantes principales (ACP) [14] Cette phase est essentielle pour atteindre notre objectif final car la réduction de dimensionnalité sera un indicateur important de la structure des données et des phénomènes chimiques, physiques sous-jacents aux données recueillies.
- L'ACP sera utilisée systématiquement sur les premiers jeux de données (caractéristiques de chaque molécule) afin de permettre d'optimiser les conditions expérimentales de collection et obtenir des données spectrales homogènes et répétables. Pour cela, nous devons tester plusieurs concentrations pour être au-dessus de la limite de détection et inférieur au recouvrement total de la surface (pour éviter de sonder des molécules sans contact avec la surface).

Ces analyses nous permettront alors de :

a. Déterminer le nombre de variables indépendantes et les domaines spectraux caractéristiques de chaque composante. Ces résultats pouvant dépendre des temps d'analyse, de la puissance laser, du rapport signal/bruit, de la longueur d'onde incidente et des caractéristiques topographiques des nanostructures, une étude comparative des ACPs

permettra alors de déterminer les meilleures conditions expérimentales pour révéler des modifications spectrales infimes.

b. Comparer les résultats obtenus sur des zones identiques et vérifier l'homogénéité des réponses. Nous pourrions alors déterminer, pour chaque longueur d'onde incidente, le nombre de zones nanostructurées (la surface minimale) à explorer pour rendre l'analyse pertinente et robuste.

c. Déterminer la limite de détection des molécules en fonction des conditions expérimentales (optimisation de la topographie des nanostructures, de la longueur d'onde incidente et de la surface analysée).

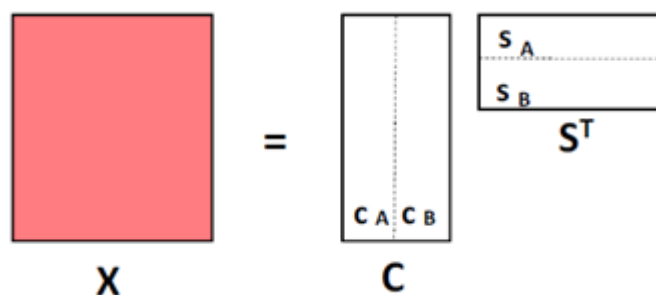
L'ensemble de ces résultats nous permettra de poursuivre nos travaux sur les mélanges de molécules en utilisant des supports nanostructurés optimisés et une méthodologie d'analyse

Mélanges de molécules.

La résolution multivariée de courbes (Multivariate Curve resolution) est une méthode chimiométrique [15] très utilisée en exploration de données en particulier lorsque le système chimique est mal connu voire inconnu. Cette méthode a montré sa pertinence pour « démélanger » (terme utilisé en traitement du signal) des solutions étudiées et retrouver les spectres purs et les concentrations relatives de toutes les espèces présentes dans un système chimique étudié.

En effet, on peut montrer (Figure 4) qu'une matrice X de données spectrales possédant selon ses lignes l'ensemble des spectres peut se décomposer en une matrice de concentrations C et une matrice de spectres S . On retrouve ainsi dans la première colonne de la matrice C les concentrations de l'espèce A dans tous les mélanges étudiés, la deuxième colonne étant associée à l'espèce B pour notre exemple. Parallèlement à cela, la première ligne de la matrice S donne le spectre du produit pur A et la deuxième ligne celui de l'espèce B.

Figure 4 : Décomposition d'une matrice de données spectrales X en une matrice de concentrations C et une matrice de spectres S purs.



Dans le cadre de notre projet, nous comptons profiter des optimisations expérimentales mis au point dans la première partie du projet pour acquérir des spectres Raman de bonnes qualités sur un ensemble prédéfini de zones nanostructurées. A partir des cubes de données hyperspectrales nous prévoyons de tester et développer des méthodologies de traitement des données (enveloppe Soleau n° 593641, décembre 2017) pour remonter aux spectres purs des espèces en présence, notamment en se basant sur une approche MCR-ALS (Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares). Cette méthode a été choisie compte tenu de

la qualité des extractions qu'elle propose sans connaissance *à priori* du système chimique, son modèle bilinéaire de contributions pures et sa grande adaptabilité à différents systèmes (spectroscopies moléculaires et techniques séparatives). Dans le cadre de ces travaux, nous testerons la méthode SIMPLISMA (SIMPLe-to-use Interactive Self-modeling Mixture Analysis) pour générer des estimations initiales de concentration et de spectres purs.

Dans le cas des mélanges de molécules modèles et des polluants, nous porterons une attention particulière à évaluer la performance relative de différentes approches.

4. Les partenaires

Le projet **DIPP-SUF** s'appuie sur les compétences spécifiques et complémentaires des différents partenaires. En effet, ce projet multidisciplinaire nécessite de mettre à profit des compétences en science des matériaux et en nanostructuration de surface (**IMMM**), en micro-spectrométrie Raman (**IMMM**, **LASIR**) et en traitements chimiométriques de données spectrales (**LASIR**). Le développement d'une méthode d'analyse innovante basée sur l'utilisation couplée de supports multistructurés spécifiques DRES et d'une analyse chimiométrique permettant la détection et l'identification quantitative de multirésidus dans des solutions extrêmement diluées est un projet ambitieux. Néanmoins, compte tenu de leurs compétences et des relations scientifiques étroites initiées depuis plus d'un an, les partenaires sont confiants pour relever le défi et atteindre l'ensemble des objectifs affichés dans les délais proposés.

L'équipe « Physique des Interfaces et des MésoStructures » (PIMS) de l'**Institut des Molécules et Matériaux du Mans** (IMMM) a développé des savoir-faire en élaboration de systèmes confinés et des compétences spécifiques en caractérisation structurale multi-échelle et plus spécifiquement dans l'étude des propriétés vibrationnelles de monocouche moléculaire [16], de films ultra-minces de polymère [17] et de systèmes confinés hybrides polymère-métal [18]. Récemment, l'équipe PIMS a développé un procédé de fabrication de surface nanostructurée permettant de contrôler de manière déterministe des arrangements topographiques d'intérêt notamment pour la Diffusion Raman Exaltée de Surface (DRES ou SERS pour Surface Enhanced Raman Scattering en Anglais) [12].

Jean-François Bardeau (DR CNRS, porteur du projet), Nicolas Delorme (Pr) et Mathieu Edely (IGR) mettront à profit leurs expertises pour réaliser, contrôler, étudier, simuler et mettre à profit les propriétés optiques de leurs supports nanostructurés pour le développement de méthodes et outils de mesures de l'exposition aux polluants, substances phytopharmaceutiques et multirésidus dans des concentrations très faibles.

Le **Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman** (LASIR, UMR CNRS 8516) a une expertise reconnue au niveau international en chimiométrie (traitements statistiques multivariés des données) appliquée à la spectroscopie moléculaire. Ces compétences sont ainsi mises à profit pour l'exploration des données en spectroscopie résolue en temps [19], en imagerie spectroscopique [20] ou à un niveau plus appliqué pour le développement de méthodologies de caractérisation de matériaux complexes en milieu industriel [21]. Dans le cadre de ce projet, Ludovic Duponchel (Pr, Université de Lille) développera des méthodologies de traitement de données originales dites de résolution multivarié de courbes capables d'extraire l'ensemble des spectres purs et leurs concentrations relatives pour chaque

spectre de mélange. Ce concept sera particulièrement exploité dans l'analyse des données d'imagerie hyperspectrale.

5. Organisation du projet

Coordination du projet

J.-F. Bardeau, Directeur au CNRS, coordinateur scientifique du projet assurera le lien entre les partenaires sur les aspects scientifiques et financiers du projet. Expert dans l'analyse structurale et vibrationnelle de nanomatériaux, de surfaces fonctionnalisées et de systèmes hybrides confinés (auteurs de 120 publications et de 4 brevets dont 2 en relation directe avec le projet **DIPP-SUF**), le coordinateur possède par ailleurs une grande expérience dans l'organisation de projets pluridisciplinaires compte tenu de ses responsabilités scientifiques dans 5 projets nationaux et 13 projets régionaux. Il a développé avec son équipe depuis 10 ans des activités de recherche sur la conception, la nanostructuration et l'étude des propriétés physiques de surfaces modèles (or, silicium, titane, acier...). Le coordinateur assurera le respect strict des engagements contractuels pour la remise des livrables.

- Le diagramme de Gantt (document en Annexe) permet de visualiser de façon synthétique les différentes phases du projet.

DIPP-SURF	Taches / Mois		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Equipes		Achats molécules/logiciels de traitement																									
Le MANS	Supports SERS	Préparation/optimisation supports SERS				L, J		L								L								L			
		Simulation / prédiction des propriétés optiques										L						L									
Le MANS	Molécules	Etudes de molécules modèles																									
		Etudes de polluants																									
Le MANS	Mesures spectroscopiques	Cartographies Raman / Analyses multi-longueurs d'onde				J										J											
		Analyses multivariées des données						J		L	J		L					J		L				J		L	
Le MANS/LILLE	Exploration / Exploitation données spectrales	Analyses chimiométriques quantitatives													L, J												

Le programme scientifique du projet **DIPP-SUF** sera divisé en **3 axes opérationnels** :

- **Développement de supports SERS : (Responsable M. Edely)**
 - Préparation/optimisation des supports SERS
 - Simulation / prédiction des propriétés optiques
- **Mesures spectroscopiques (Responsable J.-F. Bardeau)**
 - Cartographies Raman / Analyses multi-longueurs d'onde
- **Exploration / Exploitation des données spectrales (Responsable L. Duponchel)**
 - Analyses multivariées des données
 - Analyses chimiométriques quantitatives

Les mentions « Li » et « Ji » correspondent au mois « i » pour le **livrable L** et le **jalón J**. Pour chaque risque envisagé, nous avons proposé une solution alternative afin que le projet puisse continuer.

Les livrables sont les suivants :

L4-Supports : Elaboration et caractérisation des premières multi-structures SERS

L6-Supports : Définition des structures optimisées pour l'étude des mélanges de molécules modèles

L9-Supports : Bilan des simulations des propriétés optiques et prédictions des facteurs d'exaltation

L7-Mesures : Bilan provisoire des analyses multivariées effectuées sur les molécules seules

L11-Mesures : Bilan des analyses multivariées effectuées sur des mélanges de molécules modèles

L12-Mesures : Bilan de la robustesse des analyses statistiques sur l'ensemble des données

L14-Supports : Définition des structures optimisées pour l'étude des mélanges de polluants

L16-Supports : Bilan des simulations des propriétés optiques et prédictions des facteurs d'exaltation

L21-Supports : Développement de tous les supports multi-structurés

L18-Analyses : Bilan des analyses multivariées effectuées sur les différents polluants

L23-Analyses : Bilan des analyses multivariées effectuées sur les différents mélanges de polluants

L19-Analyses : Bilan des analyses quantitatives à partir des analyses multivariées effectuées sur les différents polluants

L24-Analyses : Bilan des analyses multivariées effectuées sur les différents mélanges de polluants

Les jalons sont les suivants :

J4-Support : Réussir à sélectionner les structures permettant d'exalter les signaux des deux molécules modèles. Si la structure est la même pour les deux molécules, nous réaliserons un support avec une structure unique.

Solution alternative : nous réaliserons un support contenant 2 types de structures. Cette possibilité offerte par notre méthodologie brevetée permet en effet de réaliser à façon, sur un même support, des structures adaptées à la détection de molécules spécifiques. Nos supports ainsi optimisés permettront d'étudier les mélanges par spectroscopie Raman.

J4-Mesures : Ne pas réussir à détecter les molécules modèles sur nos supports.

Solution alternative : utiliser des substrats commerciaux. Cette solution est anticipée dès le départ du projet pour ne pas risquer de bloquer le projet.

J5-Analyses : Il n'y a pas vraiment de risque à l'analyse statistique des données spectrales. Si les données n'ont pas suffisamment de bons rapport/bruit, les cartographies Raman seront réalisées à nouveau.

J9-Analyses : Ne pas réussir à estimer le nombre d'espèces moléculaires présentes dans le mélange complexe à partir des jeux de données Raman. Ce risque est limité puisque nous aurons optimisé dans la première phase du projet les structures aux molécules à détecter.

Solution alternative : augmenter la taille des cartographies Raman et/ou multiplier le nombre de zones analysées sur un même support.

J9-Analyses : Ne pas réussir à extraire l'ensemble des spectres d'espèces pures nécessaires à l'identification moléculaire. La limite de détection pour des solutions diluées à plusieurs composants sera un élément à prendre en compte dans nos études.

Solution alternative : Augmenter la concentration des espèces non détectées pour déterminer les limites de détection. Par ailleurs, nous pourrions effectuer une analyse multispectrale (multi-longueurs) pour les données issues des mélanges.

J12-Analyses : Ne pas réussir à estimer la concentration de chaque espèce à partir des données spectrales et des facteurs d'exaltation prédits par simulation. Ce risque est réel puisque c'est l'un des principaux objectifs du projet **DIPP-SUF**.

Solution alternative : Déterminer les rapports de concentration entre les espèces détectées.

J14-Mesures : Ne pas réussir à détecter la présence de polluants sur nos supports.

Solution alternative : utiliser des substrats commerciaux. Cette solution est anticipée dès le départ du projet pour ne pas risquer de bloquer le projet. L'analyse sur plusieurs types de supports doit normalement limiter ce risque.

J16-Analyses : Si les données n'ont pas suffisamment de bons rapport/bruit. Les possibilités offertes par les spectromètres de nouvelles générations limitent ce risque.

Solution alternative : les cartographies Raman seront réalisées à nouveau avec plus de temps et/ou une puissance plus grande. Nous pourrions aussi moyenniser les données spectrales obtenues sur plusieurs zones nanostructurées.

J22-Analyses : Ne pas réussir à estimer le nombre d'espèces moléculaires présentes dans le mélange complexe à partir des jeux de données Raman. Ce risque est limité puisque nous aurons optimisé dans la première phase du projet les structures aux molécules à détecter.

Solution alternative : augmenter la taille des cartographies Raman et/ou multiplier le nombre de zones analysées sur un même support

J24-Analyses : Ne pas réussir à estimer la concentration de chaque polluant à partir des données spectrales et des facteurs d'exaltation prédits par simulation. Ce risque est réel puisque c'est l'un des principaux objectifs du projet **DIPP-SUF**.

Solution alternative : Déterminer les rapports de concentration entre les espèces détectées.

6. Actions de valorisation

Compte tenu de son caractère pluridisciplinaire et de sa structuration en 3 axes opérationnels, le développement du projet **DIPP-SUF** permettra d'assurer une valorisation des travaux de chaque partenaire.

- Actions de diffusion au sein de la communauté scientifique

La présentation de nos résultats sera organisée autour de deux axes :

- la publication des résultats obtenus dans des revues internationales à comité de lecture,
- et leur présentation dans des congrès nationaux ou internationaux. Dans ce domaine, en parallèle des congrès classiques de nos sociétés savantes respectives (**Société Française de Physique, Société Française de Statistique**) de manière à renforcer la visibilité des équipes associées dans ce projet), nous nous efforcerons de présenter les résultats de notre projet dans des congrès plus spécialisés, choisis en fonction de l'avancement global du projet et en accord avec l'ensemble des partenaires, tels que le Congrès du Groupe Français des Pesticides (qui se tient à Limoges cette année), le Colloque International sur la Pollution du Sol (organisé par l'ONU-Environnement et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS))...

- **Actions envisagées de diffusion de la culture scientifique**
Nous envisageons de développer des opérations de diffusion de la culture scientifique auprès du grand public : la Fête de la Science, la nuit des chercheurs en sont deux exemples. Nous pourrions alors aborder (i) la menace écologique, environnementale et sanitaire, que peut entraîner la persistance des pesticides ou multirésidus notamment dans les sols et les eaux. (ii) les objectifs du projet **DIPP-SUF** et (iii) les résultats obtenus avec l'ensemble des partenaires.
Nous envisageons par ailleurs de créer, dès le lancement du projet, un site WEB dédié au projet, volontairement orienté vers la vulgarisation scientifique dans lequel nous ne manquerons pas de présenter les objectifs généraux du projet, les noms des partenaires et les logos des organismes institutionnels, le soutien de l'ANSES et des financeurs ainsi que les résultats les plus marquants.
- **Actions envisagées en faveur de la valorisation sociétale**
Bien que notre approche soit exploratoire, elle présente néanmoins un fort potentiel en termes d'impact sociétal car elle vise à participer à toutes les activités liées à la détection et l'identification de trace de polluants et de résidus dans les sols et les eaux. Ce type d'innovation technologique permettrait alors de faire plus facilement un contrôle des expositions, de développer des actions de prévention adaptées, de réduire les impacts environnementaux et de renforcer les dispositifs de phytopharmacovigilance.
- **Actions envisagées en termes de valorisation économique**
Compte tenu des applications sanitaires et environnementales potentielles, les partenaires s'engagent à signer une charte de confidentialité mutuelle au début du projet. Si nos résultats le permettent, nous nous engagerons dans une dynamique de réseau (via les pôles de compétitivité, SATT, CCI,...) pour initier rapidement des partenariats industriels pour développer un démonstrateur portable adapté à la mesure sur le terrain.

7. Références

- [1] www.cedre.fr
- [2] www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr
- [3] www.ifpri.org
- [4] www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr
- [5] www.euro.who.int/fr/health-topics
- [6] www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr
- [7] www.observatoire-pesticides.gouv.fr; Sanchez-Pena L.C., Reyes B.E., Carrillo I.L., Recio R., Moran-Martinez J., Cebrian M.E., Quintanilla-Vegas B., Organophosphorous pesticide exposure alter sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 196,108-113 (2004); Spanio M., Toft G., Hagmar L., Eleuteri P., Rescia M., Rignell-Hydborn A., Trkiel E., Exposure to PCB and pp'DDE in European and Inuit populations impact in human sperm chromatin integrity, *Hum. Reprod.*, 20, 3488-349 (2005) ; Tago D, Andersson H, Treich N., Pesticides and health: a review of evidence on health effects, valuation of risks, and benefit-cost analysis, *Adv Health Econ Health Serv Res.* 24, 203-95 (2014) ;
- [8] Jokanović M., Biotransformation of organophosphorus compounds, *Toxicology*, 166, 139-160 (2001) ; Souissi Y., Bourcier S., Ait-Aissa S., Maillot-Maréchal E., Bouchonnet S., Genty C., Sablier M., Using mass spectrometry to highlight structures of degradation compounds obtained by photolysis of chloroacetamides: Case of acetochlor, *Journal of Chromatography A*, 1310, 98– 112 (2013).
- [9] aida.ineris.fr/consultation_document/32856

- [10] aida.ineris.fr/consultation_document/36270
- [11] Nie S., Emory S.R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science* 275, 1102–1106 (1997) ; Kneipp K., Wang Y., Kneipp H., Perelman L.T., Itzkan I., Dasari R., Feld M.S., Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* 78, 1667–1670 (1997); Anker J.N., Hall W.P., Lyandres O. Shah N.C., Zhao J., Van Duyne R.P., Biosensing with plasmonic nanosensors, *Nat. Mater* 7, 442–453 (2008) ; Yang S., Dai X., Stogin B.B., Wong T.-S., Ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering detection in common fluids, *PNAS* 113, 268-273 (2016).
- [12] Brevet - Nouveau procédé de préparation de revêtements métalliques. Inventeurs : J.-F. Bardeau, N. Delorme, M. Edely, A. Gourbil. Demande de brevet d'invention français déposée le 05/11/2010. Numéro de dépôt : 10 59149. International PCT 2011 ; Brevet- Procédé de Fabrication d'un motif métallique nanostructuré et motif métallique Inventeurs : M. Edely, N. Delorme, J.-F. Bardeau. Demande de brevet d'invention français déposée en décembre 2014 - N° de dépôt : 1461880
- [13] Hegner M., Wagner P., Semenza G., Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy, *Surface Science* 291, 39-46 (1993).
- [14] Wold S., Esbensen K., Principal Component Analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2 37-52 (1987).
- [15] Tauler R., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30, 133-146 (1995) ; Tauler R., Smilde A., Kowalski B., *Journal of Chemometrics* 9, 31-58 (1995).
- [16] Delorme N., Bardeau J.-F., Bulou A. and Poncin-Epaillard F., Azobenzene-containing monolayer with photoswitchable wettability, *Langmuir* 21, 12278-12282 (2005); Delorme N., Bardeau J.-F., Bulou A. and Poncin-Epaillard F., Controlled modification of octadecyltrichlorosilane self-assembled monolayer by CO₂ plasma, *Thin Solid Films*, 496, 612-618, (2006).
- [17] Vignaud G., Bardeau J.-F., Gibaud A. and Grohens Y., Multiple glass-transition temperatures in thin supported films of isotactic PMMA as revealed by enhanced Raman scattering, , *Langmuir* 21, 8601-8604 (2005).
- [18] Pattier B., Bardeau J.-F., Edely M., Gibaud A., Delorme N., Cheap and robust ultraflat gold surfaces suitable for high-resolution surface modification, *Langmuir* 24, 821-825 (2008); Siniscalco D., Bardeau J.-F., Edely M., Gourbil A., Delorme N., Temperature-Induced Structural Transitions on Hybrid Nanothick Metal/Polymer Assemblies, *J. Phys. Chem. C* 117(14), 7391-7397 (2013).
- [19] Fadel A., de Juan A., Vezin H., Duponchel L., New strategy to identify radicals in a time evolving EPR data set by multivariate curve resolution-alternating least squares, *m. Anal. Chim. Acta*, 947, 9-15 (2016) ; André S., Calvosa E., Duponchel L., In-line and real-time prediction of recombinant antibody titer by in situ Raman spectroscopy, *Anal. Chim. Acta*, 892, 148-152 (2015).
- [20] Pisapia C., Jamme F., Duponchel L., Ménez B., Tracking hidden organic carbon in rocks using chemometrics and hyperspectral imaging, *Sci. Rep.* 8(1), 2396 (2018) ; Moncayo S., Duponchel L., Mousavipak N., Panczer G., Trichard F., Bousquet B., Pelascini F., Motto-Ros V., Exploration of megapixel hyperspectral LIBS images using principal component analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 33(2), 210-220 (2018).
- [21] André S., Lagresle S., Da Sliva A., Heimendinger P., Hannas Z., Calvosa E., Duponchel L., Developing global regression models for metabolite concentration prediction regardless of cell line, *Biotechnol. Bioeng.* 114(11), 2550-2559 (2017); Levet A., Colombani J., Duponchel L., Studying radiolytic ageing of nuclear power plant electric cables with FTIR spectroscopy, *Talanta*, 172, 139-146 (2017).