THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Victor FABRE

Le 13 mars 2023

Méthode danalyse moléculaire à laide dun dispositif combinant une surface superhydrophobe et la spectroscopie Raman exaltée pour des applications en exobiologie

---

Ecole doctorale : **SDU2E - Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace**

Spécialité : **Astrophysique, Sciences de l'Espace, Planétologie**

Unité de recherche :
IRAP - Institut de Recherche en Astrophysique et Planetologie

Thèse dirigée par
Philippe LOUARN et Emmanuelle TREVISIOL

Jury

Mme Gaëlle CHARRON, Rapporteure
Mme Anne TALNEAU, Rapporteure
Mme Véronique VUITTON, Examinatrice
M. Philippe LOUARN, Directeur de thèse
Mme Emmanuelle TREVISIOL, Co-directrice de thèse
M. Adnen MLAYAH, Président
Mme Delphine FAYE, Invitée
M. Christophe VIEU, Invité

« […] la science, c'est la boussole de la vie ; mais ce n'est pas la vie. »

Mikhaïl Aleksandrovitch Bakounine, *Dieu et l'État*, 1882

A mon épouse, Hortense, sans qui rien n'aurait été pareil

Remerciements

Si l'on doit remercier, c'est avant tout que le travail de doctorant est un travail collectif et ce à plusieurs titres. Il s'agit d'une production scientifique effectuée dans l'organe de production qu'est le laboratoire de recherche. Aussi, le vocabulaire marxiste s'accorde parfaitement à ce cadre. Dès lors, les remerciements doivent se faire selon deux plans : la sphère de la production et celle de la reproduction – en d'autres termes, les sphères professionnelle et privée.

En premier lieu, je tenais à exprimer ma gratitude envers mes encadrants de thèse, Emmanuelle Trevisiol, Philippe Louarn et Christophe Vieu. Tout au long de ces presque quatre années, ils ont su être à l'écoute, disponibles et aidants. À l'heure où l'on demande à la science de se faire selon les logiques du marché, tous trois donnent à voir une science à caractère humain qui ne peut se pratiquer que par la collaboration et non la compétions acharnée de tous contre tous. Si nous voyons la thèse comme une forme de compagnonnage, je pense pouvoir dire que j'ai eu de la chance de l'effectuer en leur compagnie.

Durant mon discours de fin de thèse, je me suis permis de faire la critique de l'idéologie du mérite. Les remerciements sont en soi une critique de cette idéologie qui voudrait que l'on se fasse tout seul. Quel est le mérite quand on a la chance d'effectuer une thèse au sein de LAAS ? Qui plus est, dans l'Eden qu'est l'équipe ELiA ? Aussi, je tiens particulièrement à remercier l'ensemble de l'équipe et en particulier les camarades du bureau C205 : Élise, Claire, Victor mais aussi Bastien, Mathieu, Ianis et Ophélie. Bien évidement les permanents sont aussi de la partie : Laurent, Christophe et Étienne.

Le LAAS, c'est également des moyens de production de pointe qui ne seraient rien sans les individus qui se dévouent pour permettre aux étudiants d'effectuer leur thèse dans les meilleures conditions. Je tenais donc à les remercier tous et en particulier Franck, Jean-Baptiste, Adrian, les Laurents, Aurélie. Le LAAS, c'est encore du personnel dans divers services qui nous épaule dans notre quotidien. Merci à eux.

Je tiens enfin à remercier le jury de thèse qui a pris le temps de relire ces travaux de recherche.

Vient maintenant la sphère privée.

La première personne que je tiens particulièrement à remercier est mon épouse Hortense qui m'a soutenu et encouragé tout au long de cette étape de ma vie. Le travail accompli ne serait surement pas celui qu'il est aujourd'hui sans elle.

Ensuite, il y a bien évidement ma famille : mon père et ma mère, ma tante ainsi que mon beau-père, mon frère et mes sœurs, qui m'ont toujours conforté dans mes projets aussi bien personnels que professionnels.

Mon grand-père, sans qui mon attrait pour les sciences aurait pu ne jamais se réveiller.

Ma belle-famille, qui depuis de nombreuses années, m'accompagne dans tous mes choix.

Pour conclure, j'adresse une pensée à mes camarades et amis de l'INSA, avec qui je me suis construit depuis de nombreuse année déjà.

Résumé

Depuis les années 1970 et les missions Viking, la recherche de traces de vie dans l'Univers est devenue un sujet d'actualité pour la communauté scientifique. Si pour l'instant, aucune preuve formelle n'a pu être apportée concernant la présence de vie sur une planète telle que Mars, l'évolution des techniques ainsi que les nouvelles missions poussées par les agences spatiales européenne et américaine comptent bien y répondre.

La thèse intitulée « Méthode d'analyse moléculaire à l'aide d'un dispositif combinant une surface superhydrophobe et la spectroscopie Raman exaltée pour des applications en exobiologie » apporte une contribution technologique et méthodologique au champ disciplinaire de l'exobiologie. A travers un questionnement sur le phénomène de la « vie » ainsi que sur les techniques de détection de traces moléculaires, nous avons choisi d'éprouver la spectroscopie Raman exaltée de surface couplée à une surface superhydrophobe.

Un dispositif de détection moléculaire basé sur ces techniques a été développé et caractérisé. La détection de composés dilués à des concentrations inférieures au femto-molaire a été démontrée, ouvrant des perspectives pour la détection de traces de vie. Une méthode algorithmique permettant de traiter l'information pertinente est présentée. Finalement, le procédé technologique ainsi que les protocoles mis au point ont été appliqués à un objet d'étude extraterrestre : une météorite.

Mots-clés : Exobiologie, spectroscopie Raman, spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS), surface superhydrophobe, concentrateur

Abstract

Since the 1970s and the Viking missions, the search for traces of life in the Universe has become a hot topic for the scientific community. If for the moment, no formal proof could be brought concerning the presence of life on a planet such as Mars, the evolution of the techniques as well as the new missions pushed by the European and American space agencies intend to answer it well.

The thesis " Molecular analysis method using a device combining a superhydrophobic surface and enhanced Raman spectroscopy for exobiology applications " brings a technological and methodological contribution to the disciplinary field of exobiology. Through a questioning on the phenomenon of "life" as well as on the techniques of detection of molecular traces, we chose to examine the surface-enhanced Raman spectroscopy coupled to a superhydrophobic surface.

A molecular detection device based on these techniques has been developed and characterized. The detection of diluted compounds at sub-femto-molar concentrations has been demonstrated, opening perspectives for the detection of life traces. An algorithmic method to process the relevant information is presented. Finally, the technological process and the protocols developed have been applied to an extraterrestrial object of study: meteorites.

Keywords: Exobiology, Raman spectroscopy, surface-enhanced Raman spectroscopy, superhydrophobic surface, concentrator

Table des matières générale

Liste des sigles et abréviations.....1

Introduction générale.....3

Chapitre 1 Exobiologie.....7

Chapitre 2 Dispositif d'analyse moléculaire combinant des nanostructures métalliques et une surface superhydrophobe.....29

Chapitre 3 Caractérisation du dispositif d'analyse moléculaire..91

Chapitre 4 Le SERS comme méthode analytique ?.....129

Chapitre 5 Vers un « catalogue » de spectres SERS d'intérêt.....179

Chapitre 6 Application du dispositif de détection et de la méthode d'analyse SERS à l'étude de météorites.....203

Conclusion générale.....225

Liste des sigles et abréviations

ADN – DNA : Acide DésoxyriboNucléique – DesoxyriboNucleic Acid
AMP : Adénosine monophosphate
BPE : trans-1,2-bis (4-pyridyl) éthylène
BPNN : back-propagation neural network
BSA : Bovine Serum Albumine
BSi : Black Silicon
BZT : benzenethiol
CAO : Conception Assistée par Ordinateur
CB : Cassie-Baxter
CCA : Constant Contact Angle
CCD : Charge Coupled Device
CCR : Constant Contact Radius
CNES : Centre National d'Etudes Spatiales
CNN : Convolutional Neural Network
CVD : Chemical Vapor Deposition
CWT : Continuous Wavelet Transform
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DI : Dé-Ionisée
DMSO : diméthylsulfoxyde
EDX : spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie
FDTS: 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane
FRET: Förster Resonance Energy Transfer
GPS: Global Positionning System
HMDS : HexaMethylDiSilasane
HOMO: highest occupied molecular orbital
HPLC: High Pressure Liquid Chromatography
IA : Intelligence Artificielle
ICP-RIE: Inductive Coupled Plasma – Reactive Ion Etching
IR : InfraRouge
LAAS-CNRS : Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes – Centre National de Recherche Scientifique
LC-UV / MS : Liquid Chromatography – UltraViolet / Mass Spectrometry
LDI MS: Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry).
LFIEF: Local Field Intensity Enhancement Factor
LIMS: Laser ablation Ionization Mass Spectrometer
LSPR: Localized Surface Plasmon Resonance
LUMO: lowest unoccupied molecular orbital
MACE Metal Assisted Chemical Etching
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MBZT : 3-methoxybenzenethiol)
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
MEF : Metal Enhanced Fluorescence

MOMA : Mars Organic Molecule Analyzer
MSPD: Multi-scale Peak Detection
NA : Numerical Aperture
NASA : National Aeronautics and Space Administration
ORIGIN: ORganics Information Gathering INstrument
PCA : Principal Component Analysis
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDMS : PolyDiMéthylSiloxane
PP : Polypropylene
PTFE : PolyTétraFluoroEthylène
PVD : Physical Vapor Deposition
RF : Radio Fréquence
RLS : Raman Laser Spectrometer
SERRS: Surface enhanced Resonant Raman Spectroscopy
SERS: Surface Enhanced Raman spectroscopy
SH : SuperHydrophobe
SHERLOC: Scanning Habitable Environments with Raman and Luminescence for Organics and Chemicals
SH-SERS: SuperHydrophobic – Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SOM: self-organized map neural networks
TA : Transverse Accoustic
TIRFM : Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
TOC : Total Organic Carbon
TOF : Time Of Flight
TRR/L: Time-Resolved Raman and Luminescence
UPW Ultra Pure Water
UV : UltraViolet
W : Wenzel

Introduction générale

Ne devrait-on pas se pencher sur ce qu'est thèse avant d'en écrire une ? Le PhD, comme les anglophones aiment l'appeler, est l'abréviation de Philosophiæ doctor ou docteur en philosophie. Or, les sciences contemporaines s'éloignent souvent de la dimension philosophique que peut revêtir le sujet traité. Si l'on s'en tient à la définition latine du PhD, la thèse qui nous occupe devrait intégrer cette dimension. Les collègues des sciences sociales ont l'intéressante habitude de situer leur point de vue : le fameux « d'où je parle ». Un emprunt à leur pratique me semble bienvenu, peut-être même nécessaire, si l'on souhaite aborder la dimension philosophique du sujet que l'on va traiter scientifiquement (par scientifiquement, entendons selon des méthodes scientifiques). La thèse « méthode d'analyse moléculaire à l'aide d'un dispositif combinant une surface superhydrophobe et la spectroscopie Raman exaltée pour des applications en exobiologie» s'est effectuée en collaboration entre l'IRAP (Institut de Recherche en Astrophysique et Planétologie) et le LAAS-CNRS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des systèmes). En outre, cette thèse a bénéficié de l'appui financier du CNES (Centre National d'Études Spatiales). La position que nous occupons est donc celle de chercheur en ingénierie dans laquelle le monde se comprend par son objectivation.

En effet, la méthode de compréhension qui nous est particulière passe par le « rendre objet ». Une fois l'objet créé, c'est son étude qui va nous intéresser. Dans la logique attenante, la compréhension de cet objet amène à la fois à une meilleure appréhension du monde mais aussi à de nouveaux questionnements. Ce cycle est incessant : de nouveaux objets permettent de se poser de nouvelles questions permettant elles-mêmes de créer de nouveaux objets et ainsi de suite. L'objet qui nous intéresse ici doit servir à traiter une question relative à la vie. Dans l'approche qui est la mienne la question part avec le présupposé suivant : la vie existe ailleurs, et avec le bon instrument, les traces qu'elle laisse nous seraient accessibles. Dès lors, l'enjeu n'est pas de savoir si la vie se trouve ailleurs mais plutôt quand et surtout comment, nous pourrions trouver des traces de vie extra planétaires. C'est donc un problème d'outil mais aussi de temporalité qu'il faut traiter. Cette dernière est importante car à trop attendre, il est possible de rater le coche de la détection à cause par exemple de contaminations irréversibles engendrées par les diverses missions en cours ou qui ont déjà eu lieu. Rater le coche, c'est aussi pouvoir se retrouver dans l'impossibilité pour x ou y raisons d'effectuer la mission. Le comment, c'est la question de l'outil adéquat ; c'est ce dont il sera traité dans les prochains chapitres.

Une question métaphysique sous-tend ce sujet : comment, à partir de matière inerte, se forme la vie ? Nous n'y répondrons bien évidement pas dans ce mémoire de thèse. Finalement, si l'on cherche des traces de vie dans l'Univers, c'est que l'on pense que les mécanismes qui ont engendré la vie sur Terre ont pu également être efficients ailleurs. Par conséquent, trouver des traces de vies dans un ailleurs non terrien revient également à comprendre et à décrire la vie terrienne qui nous sert de référence. C'est ce cheminement de pensée qui nous amène à nous intéresser à la détection de traces de vie lors de missions d'exploration spatiales .

L'idée ici est de s'interroger sur notre sujet d'étude d'un point de vue conceptuel. Le temps d'une thèse est aussi un temps de la réflexion. A l'heure où la catastrophe que représente le changement climatique est en cours, nous pensons qu'il est primordial de prendre ce temps pour parler du vivant. Il n'est plus à démontrer que ce désastre entropique est d'origine anthropique. Dès lors, utiliser cet espace pour se questionner sur le vivant mais aussi sur l'exception que représente Homo Sapiens dans le règne animal, en plus d'être en adéquation avec le sujet, semble plus que jamais d'utilité publique.

Trouver des traces de vie peut sembler être une curieuse activité, tant les vivants semblent se trouver aux quatre coins du globe. Paradoxalement, si la conception de ce qui est vivant ou non est une notion communément admise, en ce qu'elle fait sens commun, mais nos sens sont souvent trompeurs. Sans rentrer dans les détails, le chapitre I traitera de la question de la définition de la vie, c'est-à-dire sur quels critères se fier pour dire d'une chose qu'elle est vivante ou inerte.

S'interroger en tant que scientifique sur ce qu'est la vie ne peut se faire sans invoquer Erwin Schrödinger. Faire dialoguer des penseurs permet de mieux appréhender des problèmes complexes. Nous proposons plus particulièrement de faire dialoguer Erwin Schrödinger avec Nietzche à travers le livre de Barbara Stiegler[1] *Nietzsche et la vie*.

Dans sa quête de compréhension du phénomène vivant, Schrödinger[2] prend le parti de chercher le support physique à l'hérédité. En se basant sur les lois de la physique statistique il écrit dans son livre *qu'est-ce que la vie ?* : « Nous croyons qu'un gène – ou peut-être l'ensemble de la vibre chromosomique – est un solide apériodique. » Ce solide apériodique fut découvert en 1953 par Rosalind Franklin, Francis Crick et James Watson et n'est autre que l'ADN. Bien que conjecturant le support physique de l'hérédité comme étant une molécule apériodique, Schrödinger, prudent, n'en fait pas le trait caractéristique de la vie. Le trait caractéristique de la vie selon lui se définit en opposition à l'inerte. Ce qui pourrait se comprendre pour un physicien moderne. En effet, pour les classiques, la phusis est la nature, la vie, le monde. Les modernes ont réduit la dimension de la physique à l'inerte (notre tropisme pour le silicium en est une conséquence). Schrödinger dans ce livre, essaye peut-être de faire un pont entre deux pratiques venues d'époques différentes.

Il ajoute : « Comment l'organisme vivant retarde-t-il la décadence ? La réponse est évidente : en mangeant, buvant, respirant et (dans le cas des plantes) en assimilant ». Le terme d'assimilation est intéressant dans la mesure où à l'époque où Schrödinger écrit ces lignes, le parallèle entre l'assimilation et la vie a déjà était fait par au moins deux penseurs : le premier est physiologiste Wilhelm Roux et le second, s'inspirant du premier, n'est autre que Nietzsche. Pour Schrödinger, il semblerait que l'assimilation ne soit propre qu'aux plantes. Or, pour Nietzche, l'assimilation c'est le « rendre identique » et donc tout processus de nutrition est un processus d'assimilation. Puis Schrödinger se questionne : « Quel est donc ce précieux quelque chose, incorporé à notre nourriture, qui nous sauve de la mort ? »

Là encore, nous retrouvons un terme propre à la pensée nietzschéenne : incorporer. Incorporer, c'est faire rentrer une partie dans un tout. N'ayant pas de corps, la nourriture ne peut incorporer. Nietzsche rebaptise l'activité de nutrition en incorporation. Ce n'est pas la nourriture qui nous sauve de la mort mais c'est notre capacité à l'assimiler ; preuve en est, certains aliments ne sont pas comestibles ou non assimilables par l'organisme.

A sa question Schrödinger fournit la réponse suivante :

« La réponse est facile. Tout processus, ou évènement, ou développement – appelez-le comme vous voulez – en un mot tout ce qui se passe dans la nature, signifie un accroissement de l'entropie de la partie du monde où l'évènement se produit. Ainsi un organisme accroit constamment son entropie – ou, pourrait-on dire, crée de l'entropie positive – et ainsi tend à se rapprocher de l'état dangereux d'entropie maximal, qui est la mort. Il ne peut s'en maintenir éloigné, c'est-à-dire rester en vie, qu'en soutirant continuellement au milieu environnant de l'entropie négative […]. Donc un organisme se nourrit d'entropie négative. ».

La nourriture, par son assimilation, diminue l'entropie de l'organisme et retarde l'état d'entropie maximal. La nourriture serait donc de l'entropie négative. Il serait bon de distinguer deux formes de nourriture que l'on pourrait qualifier de primaire et secondaire. La nourriture primaire est issue d'organismes autotrophes, c'est-à-dire capable de se construire à partir de minéraux. Cette nourriture se trouve en début de la chaîne alimentaire. La nourriture secondaire quant à elle peut être qualifiée d'hétérotrophe, c'est-à-dire qu'elle se construit à partir de substances soit autotrophes soit hétérotrophes. Les organismes autotrophes sont des puits entropiques. Le concept d'entropie négative qui permet de se représenter en termes physiques le vivant n'a de sens que si l'on regarde un organisme isolé. Dire qu'un organisme se nourrit d'entropie négative semble assez critiquable dans la mesure où tout organisme produit de l'entropie.

Il y a deux concepts qu'il faut nécessairement aborder si l'on veut faire le pont entre la situation que nous connaissons aujourd'hui et le vivant : il s'agit de la stase et du flux. Le flux c'est le devenir, le mouvement. Tout vivant est en devenir, en mouvement, la permanence n'est qu'une illusion. Cette

notion de flux héraclitéenne va être réutilisée par Nietzsche. Celui-ci est le premier à penser les bouleversements de la révolution industrielle comme une accélération des rythmes de vie. Cette accélération, comme l'écrit Barbara Stiegler, « fait réaliser aux hommes du XIX[e] siècle qu'ils sont plongés dans un flux absolu, où toute entité stable se révèle être une fiction, fragile et provisoire. » A l'opposé du flux, la stase est décrite par Barbara Stiegler dans l'introduction de son livre : « Par « stase », j'entends ici, non seulement son sens biologique et médical, « l'arrêt ou le ralentissement considérable [...] dans l'écoulement d'un liquide organique », mais aussi toutes les formes de stabilité qui permettent soit de dissimuler, soit de ralentir réellement le flux du devenir grâce aux rythmes plus lents inventés par les corps vivants »

Aussi pour Nietzche « les vivants ont besoin à la fois de s'exposer au flux toujours nouveau de ce qui leur arrive, puisque c'est lui qui les nourrit et qui les pousse à évoluer, de le différer ou de retarder sur lui, en fabriquant tout un arsenal de stases et de clôtures permettant de le ralentir, de le filtrer, de le digérer, bref de l'incorporer, ce qui suppose aussi de l'aménager et de le transformer pour le rendre vivable ».

Ces notions de flux et de stase peuvent être rapprochées du concept d'entropie. Qu'est ce qui caractérise le flux si ce n'est l'augmentation d'entropie ? La diminution locale de l'entropie est caractéristique de la stase. Dans un système clos, l'entropie augmente ; ainsi sa diminution au sein du vivant est concomitante de l'augmentation de l'entropie du système global. Or la Terre n'est pas un système fermé mais c'est un système ouvert qui bénéficie de l'apport énergétique du soleil. La présence d'organismes autotrophes permet de ralentir le flux du devenir entropique de la Terre.

Telle une pythie, Nietzsche prédit : « Je prévois quelque chose d'effrayant. Le chaos tout proche. Tout est flux ». Le tout flux que Nietzsche pressent peut-être interprété à l'aune de nos connaissances actuelles comme la fin d'Homo Sapiens ou plus éloigné encore la mort thermique de l'univers. A travers l'accélération du flux dû au développement industriel qu'avait entrevu Nietzche, on peut apercevoir ce qui différencie Homo Sapiens du reste du vivant : sa capacité d'exosomatisation, c'est-à-dire à développer des outils. Mais plus encore, c'est sa capacité à évoluer rapidement grâce ses organes exosomatiques qui fait de lui une espèce à part comme le décrira pour la première fois Lotka[3] dans son papier de 1945 « The law of evolution as maximal principle »:

« The one outstanding exception is the human species. Here evolution, especially in more recent times, has followed an entirely new path. In place of slow adaptation of anatomical structure and physiological function in successive generations by selective survival, increased adaptation has been achieved by the incomparably more rapid development of "artificial" aids to our native receptor effector apparatus, in a process that might be termed exosomatic evolution ».

Georgescu Roeggen[4] enfonce le clou : « Seul l'homme en est venu, au cours des temps, à utiliser une masse qui ne lui appartenait pas génétiquement, mais qui prolongea son bras endosomatique et accrut sa puissance. Alors seulement l'évolution humaine transcenda les limites biologiques pour inclure aussi (et même au premier chef) l'évolution d'instruments exosomatiques, c'est-à-dire produits par l'homme mais n'appartenant pas à son corps. C'est pourquoi l'homme peut maintenant voler dans le ciel ou nager sous l'eau bien que son corps n'ait ni ailes ni nageoires ni branchies ».

Cette production d'organes exosomatiques qui permet à l'Homme de dépasser sa limite biologique n'est que le fruit de la technique. Or cette production d'outils, dans nos sociétés technicistes, ne peut résulter qu'en un accroissement de l'entropie et donc, en termes nietzschéens, en l'aboutissement du tout flux. Cet excédent entropique ne peut être assimilé par les organismes autotrophes en ce que l'Homme, dans sa prédation incessante, détruit à la fois les conditions d'habilité de la planète pour lui mais aussi pour les autres vivants.

Ces pérégrinations philosophiques ne sont pas dénuées d'intérêt ; elles revêtent même une portée éthique car réfléchir sur nos objets de recherche permet d'anticiper les implications possibles des découvertes – surtout quand celles-ci touchent de près ou de loin au vivant. Le dispositif pour l'exobiologie auquel j'ai consacré trois années de ma vie pendant ce travail de thèse est un nouvel avatar exosomatique, on se doit légitimement de questionner son usage et son potentiel impact. Je

souhaiterais donc terminer cette introduction avec un exercice de pensée qui consiste à imaginer que son futur usage conduise à la découverte de traces de vie extra-terrestre.

Au vu des modifications en cours de la biosphère, quels seraient les réflexes que l'on pourrait observer à l'annonce de la découverte de traces de vie extraterrestres ? Spéculativement, nous pourrions en envisager de deux types : un réflexe caractérisé par l'hubris et un autre par l'humilité. Dans une lettre écrite en 1911, Constantin Tsiolkovski, théoricien de la cosmonautique moderne, écrit[5] « La Terre est le berceau de l'humanité, mais on ne passe pas sa vie entière dans un berceau. », dans un style plus moderne, Cooper, le personnage principal du film Interstellar [6] (2014) dit : « L'Homme est né sur Terre, rien ne l'oblige à y mourir ». Le scénario de ce film fait état d'une planète Terre qui ne peut plus nourrir l'humanité. Bien que les raisons de la catastrophe ne soient pas données, il est difficile de ne pas y voir un écho au changement climatique en cours. Ainsi, à plus de cent ans d'intervalle, nous retrouvons la pensée qui caractérise si bien la démesure humaine. L'humanité n'aurait aucune raison de rester ancrée sur le bateau Terre, surtout si celui-ci est en train de couler. Cette pensée a un écho dans les délires mégalomaniaques d'un Elon Musk qui pense que pour survivre aux catastrophes en cours, l'espèce humaine devrait devenir une espèce multiplanétaire. La découverte de traces de vie extra planétaire pourrait donc encourager les fantasmes de certains. A l'inverse, l'humilité serait de relativiser la place de la vie sur Terre et plus encore celle de l'Homme. De se dire que bien après l'extinction de l'humanité sur Terre il persistera quelque part dans le cosmos des formes de vie, peut-être plus étranges encore que celles que nous connaissons. Ce serait une invitation à l'imaginaire pur dénué de toute arrière-pensée de permanence ou de conquête. Il faut cependant se méfier de la curiosité insatiable de l'Homme qui pourrait l'amener à vouloir repousser les limites de sa connaissance sur les formes de vie extraterrestres, l'amenant à aller toujours plus loin, au détriment du soin qu'il pourrait porter au berceau qui l'a vu naître.

Cette thèse s'inscrit dans une globalité qui est celle de l'étude de la vie au sens large. Comme susmentionnée, la recherche en ingénierie nous oblige. À quoi donc ? Concevoir, mettre au monde des objets techniques qui une fois réalisés existeront dans notre monde exosomatique ? Notre sujet d'étude concerne un dispositif permettant de détecter des composants organiques avec une sensibilité très poussée. Un de ses usages potentiels est la recherche de traces de vie. Nous aborderons dans les six chapitres qui composent cette thèse, les choix qui ont été faits, nos réalisations technologiques ainsi que les résultats obtenus en essayant de les illustrer sur des expériences préfigurant l'usage de ce dispositif pour l'exobiologie.

Références :

1. Stiegler, B. *Nietzsche et la vie. Une nouvelle histoire de la philosophie.* (2021).
2. Schrödinger, E. *What is life? and other scientific essays*. (Garden City, Doubleday, 1956).
3. Lotka, A. J. The Law of Evolution as a Maximal Principle. *Human Biology* **17**, 167–194 (1945).
4. Nicholas Georgescu-Roegen,. La décroissance. Entropie - Écologie - Économie. *texte* http://classiques.uqac.ca/contemporains/georgescu_roegen_nicolas/decroissance/decroissance.html (2005).
5. NETS, J. W. : Konstantin E. Tsiolkovsky. *NASA* http://www.nasa.gov/audience/foreducators/rocketry/home/konstantin-tsiolkovsky.html (2013).
6. Rueducinema.com. Interstellar : L'homme est né sur Terre, rien ne l'oblige à y mourir ! [Cooper]. *Rueducinema.com* http://www.rueducinema.com/repliquescultes/lire/interstellar-homme-mourir-terre/5060/.

Chapitre 1 : Exobiologie

Table des matières

Chapitre 1 : Exobiologie *9*
1 Questionnements sur une définition de la vie *9*
1.1 Approche déductive **9**
1.2 Approche inductive **10**
1.3 Difficultés d'une définition du vivant **11**
2 De la vie à la signature du vivant *12*
2.1 Biosignature **12**
2.2 Les biomolécules comme biosignature **12**
2.3 Les techno-signatures **14**
3 Détection de traces de vie *14*
3.1 Les techniques spectroscopiques - spectrométriques **15**
3.1.1 Spectrométrie de masse 15
3.1.2 Spectroscopie Infrarouge 16
3.1.3 Spectroscopie Raman 17
3.2 Spatialisation des techniques de spectroscopie **18**
Discussion *20*
Bibliographie *23*

Chapitre 1 : Exobiologie

Depuis les années 1970 et les missions Viking, la recherche de vie dans l'Univers a pris un tournant en ce qu'un des objectifs de ces missions était la recherche d'une éventuelle forme de vie au stade élémentaire. Si pour l'instant aucune preuve formelle n'a pu être apportée concernant la présence de vie ou non sur Mars, les nouveaux programmes spatiaux pour cette planète comptent bien y répondre. Par ailleurs, Mars n'est pas la seule planète pour laquelle cette question se pose. En effet, l'idée qu'il puisse y avoir de la vie sur Titan, satellite de Saturne et sur Europe, satellite de Jupiter, a fait son chemin.

La thèse « Méthode d'analyse moléculaire à l'aide d'un dispositif combinant une surface superhydrophobe et la spectroscopie Raman exaltée pour des applications en exobiologie » appartient au champ disciplinaire de l'exobiologie. Celui-ci vise à améliorer les connaissances relatives à l'origine, l'évolution et la distribution de la vie dans l'Univers[1]. Indirectement mais de manière cruciale, cette quête du vivant au-delà de notre planète soulève la question de la définition de la Vie. Le qu'est-ce que la Vie ? conditionne entièrement les méthodes scientifiques qui seront mobilisables pour la découvrir.

1 Questionnements sur une définition de la vie

L'idée que la vie puisse venir d'ailleurs n'est pas novatrice ; le philosophe grec Anaxagore, cinq siècles avant notre ère, affirmait déjà que les germes de la vie étaient présents partout dans l'univers, voyageant entre les planètes comme des graines : c'est le concept de panspermie[2]. Ainsi, trouver ou ne pas trouver de la vie ou des traces de vie lors de missions extra-planétaires pourrait nous en apprendre davantage sur l'origine de la vie sur Terre d'une part et d'autre part, aurait un impact conceptuel et sociétal fort.

Dans l'optique de concevoir des missions pour déceler d'éventuelles traces de vie, il convient de s'interroger sur la définition même de Vie. Deux approches coexistent, déductive et inductive.

1.1 Approche déductive

L'approche déductive consiste à essayer, à partir de nos connaissances, de donner une définition universelle de la vie.

Les définitions de la vie sont pléthoriques ; ainsi,

« Les organismes vivants se distinguent par leur complexité spécifique »[3]

« La vie est un processus qui organise la matière à des niveaux de complexité plus élevés et qui maintient cette complexité »[4]

« La vie est définie comme un système matériel qui peut acquérir, stocker, traiter et utiliser l'information pour organiser ses activités »[5]

« La vie est une propriété attendue et collectivement auto-organisée de polymères catalytique »[6]

Plusieurs critiques ont été adressées à ces définitions, notamment le fait d'utiliser des termes mal définis, tels qu'« information », « complexité », dont l'utilisation pose problème. En effet, en recourant à ces termes, à quoi se réfère-t-on ? L'information est une illustration probante de ces enjeux polysémiques : l'information entropique telle que définie par Shannon ne correspond en rien au concept d'information tel qu'entendu généralement.

En première approximation, notre analyse devrait se baser sur la définition de la NASA (National Aeronautics and Space Administration) :

« Life is a self-sustained chemical system capable of undergoing Darwinian evolution »[7] qui pourrait se traduire par : « La vie est un système chimique autonome, capable d'évolution darwinienne ».

La difficulté avec une telle définition est sa portée pratique. Comment peut-on déterminer qu'un système chimique auto-entretenu est capable d'évolution Darwinienne ?

Pour pouvoir déterminer avec certitude si un système en est en capacité, il faudrait soit trouver un ensemble d'indices permettant de retracer une évolution, soit étudier le système sur une échelle de temps nous permettant de détecter son caractère évolutif tout en caractérisant le milieu au sein duquel cette évolution se produit. Deux difficultés difficilement franchissables semblent donc se dessiner. Premièrement, les ressources matérielles qu'il faudrait collecter permettant de retracer une évolution Darwinienne ne sont pas compatibles avec les traces espérées de vie que nous pensons détecter. Secondement, l'analyse d'un système et de son milieu sur des échelles de temps nécessaires à l'évolution des systèmes vivants est incompatible avec nos instruments de mesure.

L'approche déductive est donc une impasse en ce qu'elle ne nous permet pas d'accéder à une définition pratique de la vie.

1.2 Approche inductive

L'approche inductive se base sur l'observation des êtres vivants que nous connaissons. Une liste de propriétés est ainsi établie, parmi lesquelles figurent, par exemple, le besoin d'énergie, l'adaptation, la reproduction, la croissance, la diminution locale de l'entropie. La vie est appréhendée comme une superposition de ces propriétés.

Elle serait ainsi un déséquilibre thermodynamique couplé à un état de faible entropie et à un codage et une transformation de l'information pour Schulze-Makuch et Irwin[8], tandis que Arrhenius[9] met plutôt l'accent sur l'auto-organisation, l'autoréplication, l'évolution, le métabolisme et l'encapsulation.

Si la propriété A ne suffit pas à définir la vie, les propriétés A + B + C peuvent le faire de façon minimale et A + B + C + D de façon non minimale. L'avantage de cette définition descriptive réside dans sa portée pratique. Une fois les propriétés minimales de la vie établies, il suffirait de trouver un système remplissant toutes les conditions pour détecter de la vie.

Il y a toutefois un écueil à cette approche : il est difficile de faire émerger une définition nécessaire et suffisante. De fait, le problème ne réside plus en la définition des termes – nous pouvons en trouver des non ambigus pour définir la propriété –, il réside dans le choix même des propriétés. Dès lors, chaque discipline choisit celles qu'elle juge fondamentales en son domaine. Aucune définition universelle ne peut alors émerger.

1.3 Difficultés d'une définition du vivant

Selon Edouard Marchery[10], il conviendrait de cesser de se soucier de la définition de la vie. Dans son article, il sépare le problème de la définition de la vie en deux : soit nous la définissons à travers des concepts populaires, ce qui déboucherait sur une impasse car les concepts ne sont pas des définitions, soit la notion de vie est un concept scientifique qui s'inscrit dans le cadre de sciences particulières et sa définition ne se réfère qu'au cadre de la discipline choisie, ce qui rendrait le projet d'une définition de la vie universelle sans intérêt.

Si définir la vie semble être une impasse, des consensus scientifiques permettent malgré tout de guider notre réflexion. Le premier réside dans le fait que le vivant retarde le déclin vers un équilibre thermodynamique ; c'est le concept d'entropie négative établie par E. Schrodinger[11] qui sera popularisé sous le terme de « néguentropie » issu des travaux de L. Brillouin[12].

Un deuxième consensus concerne l'origine de la vie elle-même, qui serait issue de l'évolution chimique de procédés pré-biotiques. Trois scénarii basés sur l'apparition des fonctions de réplication, métabolisme et compartimentalisation pourraient être à l'origine de l'apparition de la vie[13]. Ces trois fonctions pourraient même avoir une origine unique basée sur une réaction d'homologation du cyanure d'hydrogène et de certains de ses dérivés[14].

Les définitions précédentes reposent toutes sur nos connaissances de la vie sur Terre. Bien que celle-ci soit difficilement définissable, S.Bartlett et al.[15] ont essayé de les généraliser afin de proposer une définition de la vie (life) noté *vye (lyfe)* permettant d'appréhender des formes de vie inconnues qui pourraient exister dans l'Univers.

Cette vye est définie comme :

"Lyfe is any hypothetical phenomenon that maintains a low-entropy state via dissipation and disequilibria conversions, utilizes autocatalytic networks to achieve nonlinear growth and proliferation, employs homeostatic regulatory mechanisms to maintain stability and mitigate external perturbations, and acquires and processes functional information about its environment."

La vye repose donc sur 4 piliers : la dissipation (métabolisme), l'auto-catalyse (croissance), l'homéostasie (régulation) et l'apprentissage (évolution), la vie étant un sous ensemble de la vye. Cette définition de la vie hypothétique tombe dans les mêmes écueils que les précédentes.

La vie n'est pas un système que l'on peut réduire à la somme de ses parties. Elle en est supérieure. Une définition purement basée sur les sciences physiques ne peut pas déterminer ce qu'est la vie ; Le vivant ne se définit ni par le prisme de la mécanique, ni par celui de la thermodynamique ou de la cybernétique, chacun d'entre eux ne l'approchant que par une de ses facettes. Il nous semble donc que l'utilisation de concepts scientifiques précis ne peut que réduire le concept de vie et ainsi ne donner qu'une vision partielle de ce qu'elle est.

Finalement, l'impossibilité de définir la vie ne rend pas impossible sa détection en dehors de nos frontières terrestres. En effet, tous les processus au sein de l'organisme vivant ont pour finalité le maintien d'un état de faible entropie, de réplication et ce notamment au niveau de la cellule. Les produits de ces processus sont la signature du vivant.

2 De la vie à la signature du vivant

2.1 Biosignature

S'il est donc complexe – si ce n'est impossible – de définir ce qu'est la vie, une approche pragmatique pour déterminer s'il y a ou s'il y a eu de la vie dans telle région de l'espace consiste à chercher des biosignatures. Elles sont définies comme "un objet, une substance et/ou un motif (pattern) dont l'origine fait spécifiquement appel à un agent biologique". De plus, déterminer avec certitude des biosignatures suppose de montrer d'une part, une forte probabilité de production par des organismes vivants et d'autre part, l'improbabilité que celle-ci soit issue d'un processus non biologique ou abiotique[16].

Cette définition inclut donc : morphologies cellulaires et extracellulaires, tissus biogènes dans les roches, structures moléculaires bio-organiques, chiralité, minéraux biogènes, schémas d'isotopes stables biogènes dans les minéraux et les composés organiques, gaz atmosphériques, changements temporels des propriétés planétaires globales[4].

2.2 Les biomolécules comme biosignature

Pour déterminer la présence actuelle ou passée de vie sur une planète, il s'agit de déterminer les marqueurs qui, sur ladite planète, nous permettraient de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse.

Les biomarqueurs choisis sont basés sur ce que nous connaissons de la vie sur Terre, c'est-à-dire sur des biomolécules. Ce sont « des composés chimiques que l'on trouve dans les organismes vivants. Elles comprennent des substances chimiques principalement composées de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote, de soufre et de phosphore. Les biomolécules sont les composantes essentielles de la vie et remplissent d'importantes fonctions dans les organismes vivants. Les biomolécules comprennent les acides aminés, les lipides, les glucides, les protéines, les polysaccharides et les acides nucléiques. »[17]

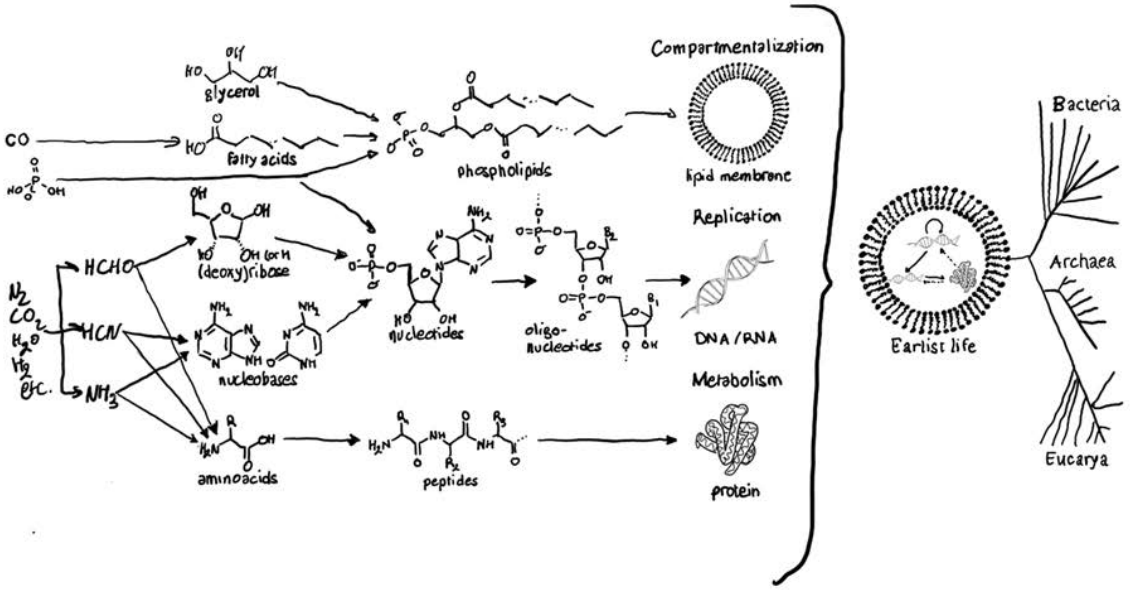


Figure 1 Structures et voies de synthèse abiotiques des biomacromolécules exploitant trois fonctions fondamentales de la vie (réplication, compartimentation et métabolisme). Reprise de: Origins of building blocks of life: A review - Norio Kitadai et al. (2017)

La figure 1 nous montre une voie abiotique qui aurait pu mener à la synthèse de biomolécules depuis la première cellule et jusqu'aux premières bactéries, archées et autres eucaryotes. Si l'on s'en tient à ce diagramme, le fait de trouver des biomolécules ne nous renseigne pas en soi, sur la présence de vie. En effet, celles-ci pouvant être synthétisées de manière abiotique, il nous faut connaître leur processus de synthèse pour pouvoir affirmer qu'elles sont issues de la vie.

La présence seule de biomolécules (indépendante des processus de production) est un élément important dans la mesure où, bien que ne permettant pas totalement de statuer sur la présence ou non de vie, il nous renseigne quant à la possibilité de trouver de la vie (potentialité). Un environnement dans lequel ne seraient présentes que des biomolécules « abiotiques » permettrait d'en apprendre plus sur les mécanismes qui permettent de passer de l'abiotisme au biotisme. La présence d'énantiomère en excès est un indicateur de plus pour détecter des traces de vie.[18]

La figure 1 peut être vue comme une "chaîne de valeurs" des molécules. Plus on s'avance vers la droite de la chaîne, plus les molécules se ramifient (plus d'atomes, plus de fonctions chimiques …). Ce faisant, elles acquièrent des fonctions nécessaires à la vie mais deviennent par là même plus fragiles et sensibles aux conditions extérieures et donc plus difficiles à préserver. Les conditions environnementales qui règnent sur des planètes telles que Mars avec une atmosphère faible et un fort rayonnement ionisant, nous obligent à nous questionner sur la qualité des biomarqueurs que nous pouvons trouver. Cependant, la découverte (sur Terre) en 1993 d'un fossile de cyanobacterie daté de 3.5 milliards d'années, fait des cyanobactéries un micro-organisme modèle pour la détection de trace de vie sur Mars[19].

Ainsi, si les molécules les plus complexes présentent un intérêt important car se rapprochant au plus près de la vie telle que nous la connaissons, les briques élémentaires qui constituent ces molécules ne sont pas pour autant intéressantes. Les acides gras, sucres, acides aminés ainsi que les bases nucléiques sont les plus à même d'être trouvés.

2.3 Les techno-signatures

Si les biomolécules sont des bons candidats pour la détection de vie lors de missions d'exploration planétaire, les techno-signatures sont d'autres signatures possibles.

J.C. Tarter[20] en donne la définition suivante : *« evidence of some technology that modifies its environment in ways that are detectable.* »

Selon l'équation de Drake[21] les techno-signatures devraient être moins répandues que les biosignatures dans la galaxie. Selon Jason T. Wright et al.[22], ce sont au contraire les techno-signatures qui devraient l'être le plus. En outre, elles devraient fournir une information de meilleure qualité dans la mesure où elles seraient plus abondantes, auraient une meilleure longévité, seraient plus facilement détectables et non ambiguës quant à la présence passée ou actuelle de vie sur une planète.

A quelle question tentons-nous donc de répondre à travers ces techno-signatures ? Est-ce la question fondamentale de l'émergence du phénomène vivant ou bien sommes-nous seuls dans l'univers ?

L'approche techno-signature est une approche anthropomorphique dans laquelle nous ne cherchons qu'une forme de vie "intelligente" – dans le cas présent, *intelligent* se réduit à une civilisation technologique c'est-à-dire produisant des artefacts ou organes exosomatiques – et ce en supposant que toute forme de vie "intelligente" évoluerait comme l'espèce humaine avec un tropisme à dépasser les limites du cadre de sa propre planète.

Aussi, les techno-signatures ne seront pas étudiées dans le cadre de cette thèse ; nous nous concentrerons sur les signatures du vivant d'ordre moléculaire.

3 Détection de traces de vie

Nous avons vu précédemment ce que nous entendons par détecter des traces de vie, reste encore à déterminer ce qu'est une trace et les moyens employables pour les trouver.

La notion de trace relève de la chimie analytique. Bien que répandue dans la communauté, cette notion est mal définie. Pour certains, une trace correspond à une concentration de 1ppm soit 1µg/g (0.0001%) ou 1mg/L pour les liquides[23]. Pour d'autres au contraire, c'est la machine de détection qui fait la trace, c'est-à-dire qu'une concentration en analytes suffisamment faible pour qu'il soit difficile d'obtenir des résultats fiables avec un instrument de mesure correspond à une trace[23].

Il y a une historicité à la notion de trace dans la mesure où celle-ci a évolué concomitamment aux techniques de détection.[24]

Dans son livre de 1964 sur l'analyse de traces, George H Morrison[25] nous donne une définition souple en ce que "*La connotation du terme "trace" varie selon le domaine d'expertise ou les intérêts du lecteu*r." De plus, il définit la trace à 100 ppm en poids et l'ultra-trace en dessous de 1ppm.

Un des domaines les plus abondants en ce qui concerne la détection de traces, est la recherche d'explosifs. En effet, depuis les attentats du 11 septembre 2001 aux États-Unis, le développement de technologies permettant de détecter des traces d'explosifs est devenu une priorité pour la sécurité

intérieure. S'agissant d'un problème de sécurité nationale, les technologies de détection de traces d'explosifs se doivent d'être à la fois fiables et sensibles.

Dès 2004, Sandia National Laboratories, un laboratoire piloté par l'entreprise américaine d'armement Lockheed Martin, travaillait sur des méthodes pour détecter des traces d'explosifs. Dans son rapport, Kevin L. Linker[26] explique que leur détection comporte trois sous-systèmes, à savoir un système de collection, un de préconcentration et un de détection. L'idée ici était de pré-concentrer un échantillon prélevé dans l'environnement de la cible (analyse de l'air) ou directement sur la cible (en utilisation d'un coton-tige que l'on va frotter sur la cible) puis d'effectuer une détection en utilisant une méthode de spectroscopie (mobilité ionique, spectrométrie de masse, spectroscopie infrarouge).

Dans leur revue de la littérature, J. Sarah Caygill et al.[27] listent toutes les technologies permettant l'analyse d'explosifs. Nous pouvons séparer ces techniques en trois sous-groupes : les techniques spectroscopiques, celles basées sur des capteurs et celles basées sur des nanotechnologies.

Le choix de la technique d'analyse dépend non seulement de ce que l'on cherche à détecter, mais aussi du domaine d'application de celle-ci. Le spatial est un domaine particulier dans lequel des contraintes fortes s'exercent. De fait, la durée des missions ainsi que l'environnement extra-terrestre imposent l'utilisation de technologies sur lesquelles nous avons suffisamment de recul et dont nous sommes sûrs de la fiabilité. De plus, il faut que ces technologies soient légères : le domaine du spatial a des contraintes en termes de charge utile.

Aussi, si détecter des biomolécules ou des explosifs à l'état de trace est analogue, les techniques basées sur des capteurs physico-chimiques ou sur des nanotechnologies nécessitant des interactions spécifiques ne sont pas propices dans le cadre de notre étude.

Nous allons donc analyser les techniques spectroscopiques sans a priori utilisées pour la détection de biomolécules dans le cadre de l'exobiologie.

3.1 Les techniques spectroscopiques - spectrométriques

3.1.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique très utilisée en chimie analytique (une sensibilité sub-attomole a été démontrée[28]). Elle permet d'évaluer la composition chimique d'une substance après ionisation basée sur le ratio masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse est divisé en trois parties : la source d'ions, l'analyseur en masse (m/z) et la partie détection.

La source d'ions est primordiale : seules les espèces ionisées peuvent être détectées. Aussi, beaucoup de développements ont été réalisés – parmi les plus notables, l'électro-nébulisation, la désorption-ionisation laser, la désorption-ionisation laser assistée par matrice ou encore la désorption ionisation laser assistée par une surface.

L'analyseur permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge. S'il en existe plusieurs types, ce sont les analyseurs en temps de vol (TOF : time of flight) qui ont significativement amélioré la méthode. En imposant un champ électrique connu, les ions vont être accélérés et leur vitesse dépendra du rapport m/z. En mesurant le temps mis par une particule chargée à atteindre le détecteur situé à une distance connue, il est possible de remonter à l'information m/z qui est caractéristique de l'ion étudié.

L'utilisation de la spectroscopie de masse pour détecter des traces de vies n'est pas nouvelle dans la mesure où dès 1971, Richard Radmer et Bessel Kok[29] proposent d'y avoir recours pour les missions Viking d'après 1975. L'idée sous-jacente est que cette technique permet avec un seul instrument, de réaliser des mesures relatives à la vie et à l'environnement Martien. Pour détecter une manifestation claire de la vie, il faudrait observer des conversions biochimiques endergoniques complexes comme la croissance, l'évolution photosynthétique de l'O_2 ou encore la fixation du CO_2.

Xiang Li et al. [30], en 2015, ont montré qu'il était possible de détecter des traces de matériaux organiques ajoutées au sein d'un échantillon analogue martien qui contient du perchlorate en utilisant la technique LDI-MS (laser desorption ionization mass spectrometry).

La présence de jarosite sur Mars a amené à étudier ce minéral sur Terre. En utilisant la technique LDI, J.M. Kotler et al.[31] ont permis de mettre en évidence la présence de matière organique – notamment de glycine – dans des échantillons de jarosite provenant de plusieurs endroits sur Terre. La biogénicité des biomolécules reste cependant inconnue.

Jooes W. Aerts et al.[32] ont utilisé un spectromètre de masse couplé à la chromatographie en phase liquide ou à la chromatographie multidimensionnelle en phase gazeuse pour analyser l'empreinte biologique de plusieurs sites du désert de l'Atacama au Chili. Ils ont pu par ce biais, détecter et analyser des acides aminés extraits de croûtes de sel et de sédiments. Les acides aminés détectés correspondent aux acides aminés les plus fréquents dans la machinerie protéique des archées, bactéries et eucaryotes. Les auteurs ont souligné cependant que la détection d'acides aminés n'est pas suffisante pour déterminer si l'on a détecté des traces de vie ; c'est par la distribution énantiomérique des acides aminés que l'on peut avoir une certitude à ce sujet. Cette distribution diffère en effet en fonction du processus de fabrication biotique ou abiotique.

Le problème majeur avec les instruments utilisés dans les articles susmentionnés est que les ressources matérielles nécessaires pour les analyses ne sont pas adaptées à la spatialisation. De nouveaux équipements ont vu le jour ; c'est notamment le cas du LIMS pour *miniature laser ablation ionisation mass spectrometer.* Dans leur étude, Andreas Riedo et al.[33] ont montré que cet équipement peut identifier des cellules uniques et même faire la distinction entre des couches de carbone biotique et abiotique au sein d'un échantillon et ce dans des analogues martiens.

D'autres dispositifs ont été développés, tels que Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA), qui est un spectromètre de masse spécifiquement développé pour ExoMars 2018. Ce dispositif a pour objectif de caractériser des composés organiques avec pour objectif de trouver des traces de vie.[34] Niels F. W. Ligtering et. al[35] ont quant à eux mis en place un nouveau système LDI-MS appelé ORIGIN (ORganics Information Gathering INstrument). Cet instrument permet de détecter et quantifier des acides aminés et ce pour des concentrations de quelques $[fmol.mm^{-2}]$. De surcroit, contrairement aux autres LDI-MS, ce dispositif permet la caractérisation y compris en présence de sels et de minéraux.

3.1.2 Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie InfraRouge (IR) est une méthode de spectroscopie vibrationnelle de caractérisation non destructive basée sur l'absorption des IR. Elle dispose d'un historique dans le domaine spatial. Dans le cadre d'ExoMars, un spectromètre infrarouge étudiera la minéralogie de la surface en analysant le rayonnement solaire réfléchi dans le proche infrarouge[36].

Z. Peeters et al.[37] ont, en 2003, présenté des données spectrométriques IR sur l'adénine et l'uracile et ce pour des conditions spatiales simulées. L'étude de la photostabilité dans les UV de ces bases

nucléiques à basse température (12 K) permet d'en apprendre un peu plus les chemins possibles de formation des purines et pyrimidines dans les environnements circumstellaires.

S. Dumas et al.[38] ont étudié des biomarqueurs avec cette technique dans le cadre de missions de recherche de vie. En utilisant la méthode algorithmique PCA (Principal Component Analysis), ils ont pu séparer les composés organiques et minéraux d'analogues martiens.

Enfin, Louisa J. Preston et al.[39] ont montré qu'il était possible de détecter des biosignatures venant de microorganismes dans le Lac Tirez en Espagne. Ce lac a la particularité d'être un lac hypersalin endoréique qui se situe dans une région semi-aride. Les roches évaporitiques le composant peuvent préserver des biomolécules sur des temps géologiques significatifs pour l'étude de traces de vie sur d'autres planètes.

3.1.3 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est basée sur la diffusion inélastique d'une source de lumière monochromatique (généralement un laser) par un échantillon. La lumière diffusée dépend des modes vibratoires des molécules présentes au sein de l'échantillon. L'analyse spectrale de cette lumière permet d'étudier les modes vibratoires et donc de faire de l'identification des molécules présentes.

La littérature concernant la technique Raman et l'exobiologie est dense. La mission persévérance (2020) embarquait un spectromètre Raman (TRR/L : time-resovled Raman and luminescence) pour l'analyse des minéraux ainsi que SHERLOC (Scanning Habitable Environments with Raman & Luminescence for Organics & Chemicals), un spectromètre Raman dans l'UV conçu pour détecter des composés organiques.

Le Raman Laser Spectrometer (RLS) quant à lui est un équipement de première importance d'Exomars 2020 qui servira à analyser des échantillons recueillis sous la surface martienne.

Dès 2003, Alex Ellery et al.[40] suggèrent l'utilisation de cette technique pour détecter des traces de vie sur Mars. Ils proposent de détecter les hopanoïdes, biomolécules présentent dans la paroi de cyanobactéries, mais aussi de pigments permettant la photosynthèse.

L'étude d'analogue de sol martien en Raman dans des conditions similaires à celles qui existent sur Mars pour détecter des biomolécules est une prémisse avant de pouvoir exploiter réellement la méthode. L'identification de Bêta-Carotène présent dans un analogue martien a ainsi été démontrée par spectroscopie Raman[41].

La technique de micro Raman, par laquelle il est possible de faire la cartographie d'un échantillon permettant d'associer à une coordonnée spatiale un spectre Raman, est de première importance dans l'étude de microfossiles. De plus, par l'analyse de la bande D (1350 cm^{-1} et G (1580 cm^{-1}) du carbone, il est possible de faire la distinction entre carbone biogénique et carbone abiogénique[42].

Cette technique a aussi été employée pour analyser la micro distribution de matière carbonée dans la météorite de Murchison. Des cartographies de 100 μm^2 avec une résolution de 1 μm^2 ont été effectuées, mettant en évidence la matière minérale et carbonée composant cette météorite[43].

Howell G.M Edwards et al.[44] ont analysé 10 échantillons géologiques et biologiques jugés pertinents pour préparer la mission ExoMars. Les signatures Raman décrivent bien les échantillons et les signatures biologiques ne sont pas masquées par les signatures géologiques. La méthode ne permet cependant pas de déterminer une limite de détection. Les mêmes auteurs[45] discutent dans un autre papier, du rôle de la spectroscopie Raman dans la détection de biomarqueurs. Aussi expliquent-ils que cette technique a été identifiée comme de premier ordre pour l'analyse moléculaire

notamment en minéralogie, biogéologie et biologie dans la mesure où les signatures des molécules composant ces domaines se retrouvent dans la bande de fréquence 100 - 3500 cm^{-1}.

La principale limite du Raman est le peu de photons émis. Ainsi, pour acquérir un spectre de qualité, il est nécessaire d'exposer l'échantillon suffisamment longtemps ou d'augmenter la puissance du laser. Cette faiblesse rend la technique difficilement utilisable pour détecter des molécules dans des quantités faibles (<1 ppm). La limite de détection pour des composés organiques est située entre 100 et 1000 ppm selon Mann et al.[46]

La technique SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy) permet quant à elle, l'exaltation du signal Raman par des nanostructures métalliques, dépassant ainsi les faiblesses du Raman.

Dès 2004, Chahrazade El Amri et. al[47] ont étudié l'adsorption et la désorption d'adénine pour deux météorites : la martienne Zagami et Murchison. Pour ce faire, ils ont mélangé de la poudre de météorite avec de l'adénine en faisant varier sa concentration et son pH (8 et 10). Après centrifugation, ils ont mélangé le surnageant avec des nanoparticules d'argent en suspension colloïdale pour exalter le signal Raman. Des nanoparticules d'argent ont aussi été ajoutées aux solutions pures d'adénine. En analysant indépendamment ces deux solutions (adénine + nanoparticules et surnageant + nanoparticules), ils ont pu montrer qu'en fonction des météorites, l'adénine pouvait plus ou moins s'adsorber aux nanoparticules d'argent. En effet, des spectres SERS plus faibles pour les solutions de surnageant que pour les solutions d'adénine signifient qu'une partie de l'adénine s'est adsorber aux grains de météorites. La technique d'extraction est donc primordiale dans la mesure où il faut mettre en contact lesdites nanoparticules avec la molécule cible pour qu'il y ait exaltation.

Stephen A. Bowden et al.[48] ont montré qu'il était possible de détecter avec cette méthode, des molécules organiques dans des organismes vivants et dans des sédiments détritiques, et ce pour deux environnements géologiques différents.

La détection de molécules organiques à l'état de trace dans des analogues martiens (désert de Mojave et vallée sèche de l'Antarctique) par spectroscopie Raman exaltée de surface a pareillement été démontrée[49].

Plus récemment, cette technique a été employée pour détecter des niveaux extrêmement faibles de biomarqueurs qui ont adhéré passivement à des surfaces minérales dans une méthode qui représente la façon dont cette interaction aurait lieu dans un environnement naturel sur Mars[50].

3.2 Spatialisation des techniques de spectroscopie

La spectroscopie de masse et la spectroscopie Raman sont les deux techniques de détection qui semblent les plus à même de répondre à notre problématique.

Les travaux de thèse de C. Juanes Vallejo[51] sur l'étude de techniques spatialisables pouvant permettre de détecter des traces de vie lors d'une mission d'exploration planétaire sont à mentionner. En effet, dans cette étude, deux phases d'évaluation des différentes techniques ont permis de les classifier.

A la fin de la première phase, sur les 16 techniques retenues, seules 9 seront évaluées lors du second tour et classées dans l'ordre suivant (de la meilleure à la moins bonne) :

- SERS (surface-enhanced raman spectroscopy)

- SERRS (surface-enhanced resonant raman spectroscopy)
- Optical nanofibers
- TIRFM (total internal reflection fluorescence microscopy)
- FRET (Förster resonance energy transfer)
- Carbon Nanotubes / Nanowires
- Microcantilevers
- Optical Microcavities
- Ion Channels.

Les deux techniques qui se démarquent dans cette étude sont la technique SERS et les techniques basées sur les nano-fibres optiques. Il est à noter que la spectrométrie de masse n'est pas mise de côté mais est considérée comme une technologie qui doit être complémentaire de la solution technologique envisagée.

Les nanofibres optiques sont des fibres optiques dont le diamètre est inférieur à la longueur de la lumière. Ces nanofibres optiques permettent de sonder l'interaction lumière-matière à l'échelle atomique. Les avantages de ces techniques sont nombreux : elles peuvent détecter et identifier des cibles, compter des molécules uniques, être automatisées et disposent d'une masse faible. Cependant, ce qu'il ressort de l'étude est que la maturité de cette technologie, avec peu de composants commercialement disponibles n'est pas compatible avec les applications spatiales envisagées.

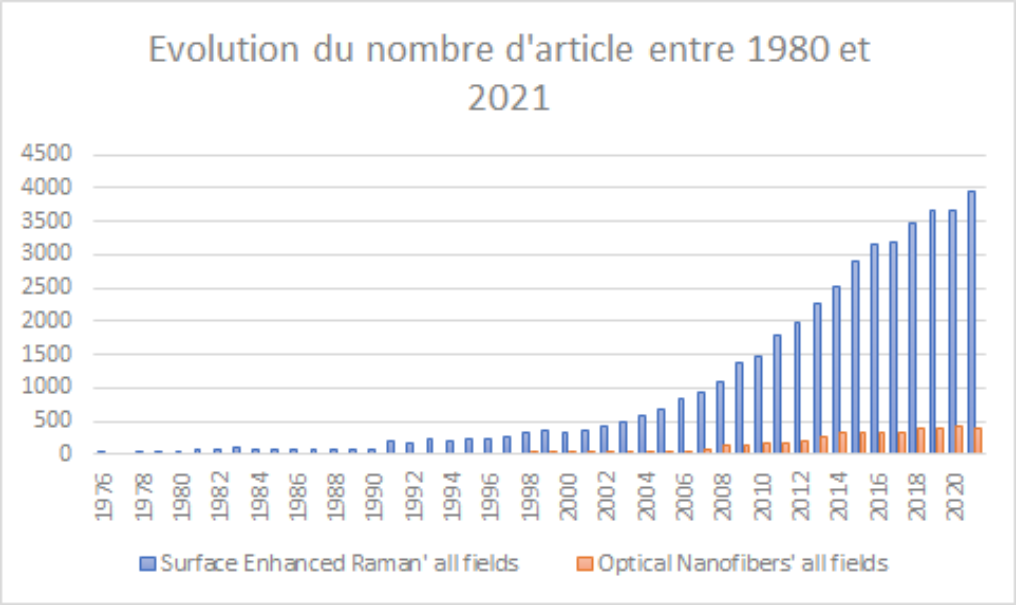


Figure 2 Evolution du nombre d'article entre 1976 et 2021 pour les mots clefs 'SERS raman' et 'Optical nanofibers' rechercher dans le moteur de recherche Web of Science

De plus, si l'on appréhende l'activité de recherche par le prisme de la publication d'articles pour les techniques SERS et nanofibres optiques (figure 2), nous constatons que la technique SERS fait l'objet d'études depuis les années 1980 avec une forte communauté et un nombre de publications qui croît chaque année. Aussi, en s'appuyant sur les travaux de thèse de C. Juanes Vallejo, nous avons choisi d'éliminer la technique se basant sur les nanofibres optiques.

Discussion

La vie telle que nous la connaissons sur Terre est basée sur la chimie du carbone. Par ailleurs, l'eau est un élément essentiel pour l'apparition de la vie, notamment car elle est le solvant de base des réactions chimiques prébiotiques.[52]

La détection de traces de vie sur des planètes de notre système solaire passe dès lors par la détection d'eau sur celle-ci. La présence d'eau liquide passée sur Mars ainsi que de glace présente actuellement n'est plus à démontrer, ce qui laisse à penser qu'une vie y aurait été possible[53]. C'est enfin la découverte d'un lac de 20 km de large d'eau liquide sous la calotte glacée au pôle sud de Mars[54] qui a requestionné la présence actuelle de vie – peut-être microbienne – sur cette planète.

La détection de traces de vie revient donc à analyser soit des échantillons solubilisés dans l'eau, soit directement l'eau provenant de ces planètes. C'est donc par l'analyse de ces solutions et la détermination de la présence ou non de biomolécules que nous pourrons statuer sur la présence présente ou passée de vie sur telle ou telle planète. Les ressources collectées *in situ* étant rares, le choix qui est fait est de travailler sur l'objet « goutte », c'est-à-dire d'analyser les éléments présents dans un micro-volume d'eau.

Détecter des traces de vie signifie détecter des biomarqueurs cibles à des niveaux inférieurs à 1 partie par trillion (ppt), soit 10^6 biomolécules de poids moléculaire 600 g/mol par milligramme d'échantillon.

Les études réalisées en utilisant la technique Raman se concentrent sur des organismes tels que les cyanobactéries plutôt que sur des traces biomoléculaires. Or, il semble plus probable ou tout du moins plus conservateur, de chercher des traces de vie (qui peuvent être issues de ces organismes) plutôt que les organismes eux-mêmes. Les conditions environnementales régnant sur Mars par exemple avec une atmosphère très faible et un fort bombardement de rayons ionisants, laissent penser que si des traces de vie sont encore présentes, elles doivent être transformées et présentes en faible quantité.

Les difficultés inhérentes à la spectrométrie de masse reposent sur la préparation de l'échantillon ainsi que sur l'ionisation de celui-ci. La littérature nous montre que beaucoup d'efforts ont été faits pour développer de nouveaux équipements.

Identifier des signatures organiques biogéniques *in situ* lors de missions planétaires pour déterminer la présence de vie passée ou présente est un défi complexe. L'étude d'une technologie complémentaire à la spectrométrie de masse est donc nécessaire. La spectroscopie Raman exaltée de surface présente des avantages non négligeables et a été utilisée dans beaucoup de domaines scientifiques mais reste marginale dans le champ de l'exobiologie.

La figure 3 permet de comparer les techniques basées sur la spectrométrie masse avec celles basées sur la spectroscopie Raman et de fluorescence. Nous pouvons constater que la spectroscopie Raman ne nécessite pas de traitement de l'échantillon avant analyse. De plus, des instruments spatialisables pour analyse *in situ* ont déjà été développés. Hormis les composés organiques volatiles, cette technique permet de détecter des composés des classes suivantes : acides aminés, acides gras, polymères (acides désoxyribonucléiques, acides ribonucléiques et protéines). Le revers de cette méthode comme mentionnée plus haut, est une limite de détection de l'ordre du mg/g. A l'inverse, les

techniques basées sur la spectrométrie de masse sont plus sensibles (µg/g) mais nécessitent des étages de traitement des échantillons pour détecter des composés organiques volatiles, des acides aminés et des acides gras. Il faut cependant noter que tous les éléments de ces classes ne sont pas accessibles et que des traitements spécifiques permettent d'augmenter les sensibilités de ces techniques de détection. Si la spectroscopie de masse reste la technique de référence en chimie analytique – notamment grâce à sa sensibilité – il convient de se demander s'il n'est pas possible avec le SERS de se rapprocher de ce que l'on peut faire en spectrométrie de masse. Aussi, dans le cadre de cette thèse, il semble pertinent d'étudier le SERS comme technologie de détection cette technologie de détection. En plus de bénéficier d'une activité de recherche prolifique, elle s'enrichit des connaissances acquises dans l'application du Raman pour l'exobiologie. En outre, l'utilisation de cette technique de détection qui peut être non destructive n'empêche en rien le recours à la spectrométrie de masse pour obtenir une information des plus exhaustives.

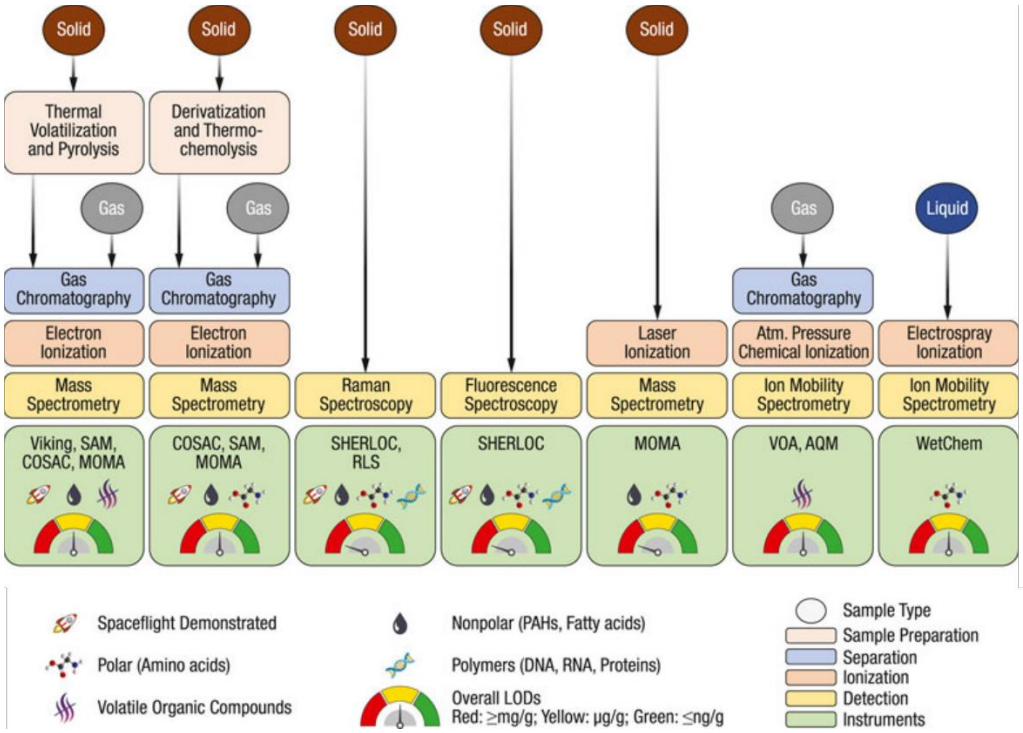


Figure 3 Vue d'ensemble des techniques d'analyse chimique abordées dans la revue « In situ organic biosignature detection techniques for space applications » de Victor Abrahamsson et al. [55]. Les symboles mentionnés en légende permettent d'évaluer les techniques en fonction des limites de détection globale, du type d'échantillon, de la combinaison de techniques et des classes d'analytes potentiellement détectables.

Le problème que nous souhaitons aborder est la détection des molécules très faiblement concentrées et ce dans le cadre de la détection de traces de vie. Le défi technologique est donc double. D'une part il faut être en mesure de détecter des composés concentrés au sub-femtomolaire, d'autre part nous ne savons pas en amont de l'expérience ce que nous allons trouver in-situ. La technique SERS semble à même de résoudre ces deux contraintes. Cette technique permet de faire de la détection directe - de sonder directement l'analyte- ou indirecte – sonder l'interaction entre l'analyte et un marqueur qui le cible. De plus, depuis la découverte de l'exaltation Raman par une structure métallique en 1976, les limites de détection n'ont cessé d'être repoussées pour arriver à des concentrations attométriques. Pour ce faire, les surfaces SERS ont dues être couplées à d'autres techniques, notamment les surfaces superhydrophobes. En effet, celles-ci permettent de concentrer

localement les analytes à la suite de l'évaporation de l'eau les contenant. C'est en sondant le dépôt que l'on peut arriver à de telle détection[56–59].

Il convient donc de réfléchir à l'implémentation d'un dispositif SERS à une surface superhydrophobe : ces deux techniques permettant d'atteindre des seuils de détection compatible avec nos attentes.

Dès lors le dispositif de détection peut être découper en deux étages :

- Un étage superhydrophobe permettant de concentrer localement les analytes
- Un étage plasmonique permettant d'exalter le signal Raman

Il convient aussi de discuter d'un troisième étage qui consisterait en la préparation de l'échantillon et au dépôt de la goutte sur la surface.

Le prochain chapitre détaillera les procédés techniques mis en œuvre dans le cadre de cette thèse pour réaliser une surface superhydrophobe couplée avec des antennes plasmoniques permettant d'exalter le signal Raman ; les termes « dispositif d'analyse moléculaire », « dispositif », « SH-SERS » ou une combinaison de ceux-ci désigneront la surface développée.

Bibliographie

1. Sciences, N. R. C. (US) T. G. on L. *Exobiology*. *Space Science in the Twenty-First Century: Imperatives for the Decades 1995 to 2015: Life Sciences* (National Academies Press (US), 1988).
2. Kawaguchi, Y. Panspermia Hypothesis: History of a Hypothesis and a Review of the Past, Present, and Future Planned Missions to Test This Hypothesis. in *Astrobiology: From the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence* (eds. Yamagishi, A., Kakegawa, T. & Usui, T.) 419–428 (Springer, 2019). doi:10.1007/978-981-13-3639-3_27.
3. S. -B, P. C. L. E. Orgel 1973. The Origins of Life: Molecules and Natural Selection. vii+237pp., numerous figs. Chapman & Hall Ltd, London. Price £3.60 hardback; £1.95 Science Paperback. *Geological Magazine* **111**, 265–266 (1974).
4. Palyi, G., Zucchi, C. & Caglioti, L. *Fundamentals of life*. (Elsevier, 2004).
5. Dyson, F. *Origins of Life*. (Cambridge University Press, 1999).
6. Kauffman, S. A. *The Origins of Order: Self Organization and Selection in Evolution*. (Oxford University Press, 1993).
7. NASA Astrobiology. https://astrobiology.nasa.gov/research/life-detection/about/.
8. Schulze-Makuch, D. & Irwin, L. N. Definition of Life. in *Life in the Universe: Expectations and Constraints* (eds. Schulze-Makuch, D. & Irwin, L. N.) 7–24 (Springer, 2008). doi:10.1007/978-3-540-76817-3_2.
9. Arrhenius, G. Life Out of Chaos. *Fundamentals of Life* (2002).
10. Machery, E. Why I stopped worrying about the definition of life... and why you should as well. *Synthese* **185**, 145–164 (2012).
11. Schrödinger, E. *What is life? and other scientific essays*. (Garden City, Doubleday, 1956).
12. Brillouin, L. The Negentropy Principle of Information. *Journal of Applied Physics* **24**, 1152–1163 (1953).

13. Lanier, K. A. & Williams, L. D. The Origin of Life: Models and Data. *J Mol Evol* **84**, 85–92 (2017).
14. Patel, B. H., Percivalle, C., Ritson, D. J., Duffy, C. D. & Sutherland, J. D. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nature Chem* **7**, 301–307 (2015).
15. Bartlett, S. & Wong, M. L. Defining Lyfe in the Universe: From Three Privileged Functions to Four Pillars. *Life (Basel)* **10**, 42 (2020).
16. National Academies of Sciences, E. *An Astrobiology Strategy for the Search for Life in the Universe*. (2018). doi:10.17226/25252.
17. Glossaire: Biomolécule. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/fr/glossaire/abc/biomolecule.htm.
18. Avnir, D. Critical review of chirality indicators of extraterrestrial life. *New Astronomy Reviews* **92**, 101596 (2021).
19. Schopf, J. W. Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. *Science* **260**, 640–646 (1993).
20. Tarter, J. C. The evolution of life in the Universe: are we alone? *Proceedings of the International Astronomical Union* **2**, 14–29 (2006).
21. Drake, F. D. CHAPTER IX - THE RADIO SEARCH FOR INTELLIGENT EXTRATERRESTRIAL LIFE. in *Current Aspects of Exobiology* (eds. Mamikunian, G. & Briggs, M. H.) 323–345 (Pergamon, 1965). doi:10.1016/B978-1-4832-0047-7.50015-0.
22. Wright, J. T. *et al.* The Case for Technosignatures: Why They May Be Abundant, Long-lived, Highly Detectable, and Unambiguous. *ApJL* **927**, L30 (2022).
23. Chapter 1. Achieving Valid Trace Analysis. in *Trace Analysis* (eds. Prichard, E., Points, J. & Mackay, G. M.) 1–39 (Royal Society of Chemistry, 2007). doi:10.1039/9781847559401-00001.
24. Laitinen, H. A. History of Trace Analysis. *J Res Natl Bur Stand (1977)* **93**, 175–185 (1988).
25. ed), G. H. M. (1921-. *Trace analysis: physical methods. George H. Morrison, editor*. (1965).

26. Linker, K. L. *Large-volume sampling and preconcentration for trace explosives detection.* https://www.osti.gov/biblio/919138-sd0FX8/ (2004) doi:10.2172/919138.
27. Caygill, J. S., Davis, F. & Higson, S. P. J. Current trends in explosive detection techniques. *Talanta* **88**, 14–29 (2012).
28. Valaskovic, G. A., Kelleher, N. L., Little, D. P., Aaserud, D. J. & McLafferty, F. W. Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Anal Chem* **67**, 3802–3805 (1995).
29. Radmer, R. & Kok, B. A Unified Procedure for the Detection of Life on Mars. *Science* (1971) doi:10.1126/science.174.4006.233.
30. Li, X. *et al.* Detection of Trace Organics in Mars Analog Samples Containing Perchlorate by Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Astrobiology* **15**, 104–110 (2015).
31. Kotler, J. M., Hinman, N. W., Yan, B., Stoner, D. L. & Scott, J. R. Glycine Identification in Natural Jarosites Using Laser Desorption Fourier Transform Mass Spectrometry: Implications for the Search for Life on Mars. *Astrobiology* **8**, 253–266 (2008).
32. Biosignature Analysis of Mars Soil Analogs from the Atacama Desert: Challenges and Implications for Future Missions to Mars | Astrobiology. https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ast.2019.2063?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed.
33. Riedo, A. *et al.* The Detection of Elemental Signatures of Microbes in Martian Mudstone Analogs Using High Spatial Resolution Laser Ablation Ionization Mass Spectrometry. *Astrobiology* **20**, 1224–1235 (2020).
34. Brinckerhoff, W. B. *et al.* Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA) mass spectrometer for ExoMars 2018 and beyond. in *2013 IEEE Aerospace Conference* 1–8 (IEEE, 2013). doi:10.1109/AERO.2013.6496942.

35. Ligterink, N. F. W. *et al.* ORIGIN: a novel and compact Laser Desorption – Mass Spectrometry system for sensitive in situ detection of amino acids on extraterrestrial surfaces. *Sci Rep* **10**, 9641 (2020).
36. Korablev, O. I. *et al.* Infrared Spectrometer for ExoMars: A Mast-Mounted Instrument for the Rover. *Astrobiology* **17**, 542–564 (2017).
37. Peeters, Z., Botta, O., Charnley, S. B., Ruiterkamp, R. & Ehrenfreund, P. The Astrobiology of Nucleobases. *ApJ* **593**, L129–L132 (2003).
38. Dumas, S., Dutil, Y. & Joncas, G. Detection of biomarkers using infra-red spectroscopy. *Acta Astronautica* **67**, 1356–1360 (2010).
39. Preston, L. J., Barcenilla, R., Dartnell, L. R., Kucukkilic-Stephens, E. & Olsson-Francis, K. Infrared Spectroscopic Detection of Biosignatures at Lake Tírez, Spain: Implications for Mars. *Astrobiology* **20**, 15–25 (2020).
40. Ellery, A. & Wynn-Williams, D. Why Raman Spectroscopy on Mars?—A Case of the Right Tool for the Right Job. *Astrobiology* **3**, 565–579 (2003).
41. Böttger, U. *et al.* Optimizing the detection of carotene in cyanobacteria in a martian regolith analogue with a Raman spectrometer for the ExoMars mission. *Planetary and Space Science* **60**, 356–362 (2012).
42. Bower, D. M., Steele, A., Fries, M. D. & Kater, L. Micro Raman spectroscopy of carbonaceous material in microfossils and meteorites: improving a method for life detection. *Astrobiology* **13**, 103–113 (2013).
43. Amri, C. E., Maurel, M.-C., Sagon, G. & Baron, M.-H. The micro-distribution of carbonaceous matter in the Murchison meteorite as investigated by Raman imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **61**, 2049–2056 (2005).
44. Edwards, H. G. M. *et al.* Raman spectroscopic analysis of geological and biogeological specimens of relevance to the ExoMars mission. *Astrobiology* **13**, 543–549 (2013).

45. Edwards, H. G. M., Hutchinson, I. B., Ingley, R. & Jehlička, J. Biomarkers and their Raman spectroscopic signatures: a spectral challenge for analytical astrobiology. *Phil. Trans. R. Soc. A.* **372**, 20140193 (2014).
46. Mann, C. K., Vickers, T. J. & Womack, J. D. Detection and Determination of Minor Components in Nominally Pure Solids by Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc., AS* **41**, 1324–1329 (1987).
47. El Amri, C., Baron, M.-H. & Maurel, M.-C. Adenine adsorption on and release from meteorite specimens assessed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **35**, 170–177 (2004).
48. Bowden, S. A., Wilson, R., Cooper, J. M. & Parnell, J. The Use of Surface-Enhanced Raman Scattering for Detecting Molecular Evidence of Life in Rocks, Sediments, and Sedimentary Deposits. *Astrobiology* **10**, 629–641 (2010).
49. Tang, S., Chen, B., McKay, C. P., Navarro-Gonzálezv, R. & Wang, A. X. Detection of trace organics in Martian soil analogs using fluorescence-free surface enhanced 1064-nm Raman Spectroscopy. *Opt. Express, OE* **24**, 22104–22109 (2016).
50. Whitaker, D. A., Munshi, T., Scowen, I. J. & Edwards, H. G. M. Development of a Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Methodology to Detect Immobilized Organic Materials in Biogeological Contexts. *Astrobiology* **21**, 1089–1098 (2021).
51. Juanes-Vallejo, C. M. Engineering design instrumentation for life detection planetary exploration missions. (2011).
52. Westall, F. & Brack, A. The Importance of Water for Life. *Space Sci Rev* **214**, 50 (2018).
53. Schmidt, F. *et al.* Circumpolar ocean stability on Mars 3 Gy ago. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2112930118 (2022).
54. Orosei, R. *et al.* Radar evidence of subglacial liquid water on Mars. *Science* **361**, 490–493 (2018).
55. Abrahamsson, V. & Kanik, I. In situ organic biosignature detection techniques for space applications. *Frontiers in Astronomy and Space Sciences* **9**, (2022).

56. De Angelis, F. *et al.* Breaking the diffusion limit with super-hydrophobic delivery of molecules to plasmonic nanofocusing SERS structures. *Nature Photon* **5**, 682–687 (2011).
57. Song, W., Psaltis, D. & Crozier, K. B. Superhydrophobic bull's-eye for surface-enhanced Raman scattering. *Lab Chip* **14**, 3907–3911 (2014).
58. Luo, X. *et al.* Atto-Molar Raman detection on patterned superhydrophilic-superhydrophobic platform via localizable evaporation enrichment. *Sensors and Actuators B: Chemical* **326**, 128826 (2021).
59. Rui Tan, J. M., Ruan, J. J., Lee, H. K., Phang, I. Y. & Ling, X. Y. A large-scale superhydrophobic surface-enhanced Raman scattering (SERS) platform fabricated via capillary force lithography and assembly of Ag nanocubes for ultratrace molecular sensing. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 26983–26990 (2014).

Chapitre 2 : Dispositif d'analyse moléculaire combinant des nanostructures métalliques et une surface superhydrophobe

Table des matières

Chapitre 2 : Dispositif d'analyse moléculaire combinant des nanostructures métalliques et une surface superhydrophobe 31

1 Les surfaces superhydrophobes 31

1.1 Le modèle de Thomas Young (1805) 33

1.2 Le modèle de Wenzel (W) 33

1.3 Le modèle de Cassie-Baxter (CB) 34

1.4 Revue de la littérature 36

1.4.1 Évaporation sur des surfaces superhydrophobes 36

1.4.2 Vers un contrôle plus poussé 41

2 Spectroscopie Raman exaltée 42

2.1 La spectroscopie Raman 42

2.1.1 La découverte de l'effet Raman 42

2.1.2 Principe de fonctionnement 43

2.1.3 Section efficace 43

2.1.4 Comparaison des section efficace Raman et de fluorescence 44

2.2 Exaltation de surface 45

2.2.1 Plasmonique 45

2.2.2 Facteur d'exaltation 50

2.2.3 Section efficace totale SERS 51

2.2.4 L'exaltation chimique 51

2.2.5 Exaltation du signal Raman et du signal de fluorescence 52

3 Revue de la littérature combinant surface surperhydrophobe et antennes plasmoniques 54

4 Procédé technologique 59

4.1 Réalisation du dispositif combinant une surface superhydrophobe et des nanostructures métalliques 59

4.2 Conception du masque 62

4.3 Caractérisation morphologique de la surface des dispositifs 62

4.3.1 Caractérisation visuelle 62

4.3.2 Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB) 63

4.3.3 Du silicium noir à la surface SERS : dépôt métallique 67

5 Discussion autour du procédé de fabrication mis au point 73

5.1 L'aspect superhydrophobe de la surface 73

5.2 Le procédé « black silicon » 75

5.2.1 Explication du procédé de fabrication 75

5.2.2 Influence du ratio SF_6/O_2 dans la morphologie du silicium noir 76

Résumé du chapitre 79

Bibliographie 81

Chapitre 2 : Dispositif d'analyse moléculaire combinant des nanostructures métalliques et une surface superhydrophobe

Le chapitre 1 a mis en exergue les technologies sélectionnées pour concevoir un dispositif permettant la détection de biomolécules à des niveaux de concentrations compatibles avec certaines attentes du domaine de l'exobiologie. Dans un premier temps nous allons brièvement décrire les surfaces superhydrophobes de manière à conceptualiser leurs apports potentiels dans le cadre de la détection de biomolécules.

Dans un second temps nous aborderons la spectroscopie Raman ainsi que sa version exaltée par des nanostructures métalliques. Un point bibliographique permettra de nous situer par rapport à la littérature. L'intégration de ces deux briques technologiques dans un procédé de microfabrication classique de salle blanche sera ensuite détaillée.

Enfin une discussion sera menée autour de ce procédé en soulignant son originalité par rapport à l'état de l'art.

1 Les surfaces superhydrophobes

Comment trouver des analytes infinitésimalement présents dans un solution ? En substance, c'est la question à laquelle nous devons répondre. Faisons l'expérience suivante : nous cherchons à détecter un analyte connu en solution avec une technique de spectroscopie idéale, c'est-à-dire qui ne dépendrait que de la probabilité d'interaction entre la lumière et l'analyte. Si ce dernier est présent en grande proportion dans l'échantillon, la probabilité d'interaction sera forte, mais s'il se trouve en proportion infinitésimale, cette probabilité tendra alors vers zéro.

Une autre méthode consiste à déposer les analytes sur une surface avant de la sonder. Là encore, la probabilité d'interaction dépend de la concentration ; ce qui nous intéresse est donc d'augmenter cette première. Pour ce faire, il faut pré-concentrer l'échantillon. Parmi les méthodes de préconcentration, c'est la technique par évaporation de goutte qui a retenu notre attention[1] : elle a l'avantage de pouvoir facilement s'intégrer dans des dispositifs de détection.

L'évaporation d'une goutte contenant des analytes sur une surface plane conduit à la formation d'anneaux concentriques caractéristiques. Ce motif n'est pas homogène dans la mesure où il y a une surconcentration des analytes sur les bords tandis que la concentration est de plus en plus faible en se rapprochant du centre. Cet effet est nommé "coffee ring effect" ou « effet tâche de café »[2,3]. Comprendre ce phénomène permet de justifier l'utilisation d'une surface superhydrophobe.

Dans leur article, Robert D. Deagan et al. [3] donnent les conditions requises pour que l'effet tâche de café ait lieu. Il faut d'abord que le solvant effectue avec la surface un angle de contact non nul. Il est ensuite nécessaire que sa ligne de contact soit fixe et qu'enfin, le solvant s'évapore. Leur analyse leur a permis de démontrer que les mécanismes responsables du transport d'analytes dans les liquides tels que des gradients de tension de surface, les phénomènes de diffusion, les phénomènes

électrostatiques ou bien encore de gravité sont négligeables dans la formation du motif concentrique. Le phénomène est principalement dû à une contrainte géométrique. La surface libre est contrainte par la ligne de contact qui est fixe. Pour compenser les pertes dues à l'évaporation, le fluide va se déplacer de l'intérieur vers l'extérieur, ce flux amène les analytes en périphérie de la goutte (ce flux est le flux capillaire).

Supprimer l'effet tâche de café permet soit de concentrer les analytes présents dans une goutte sur une surface inférieure à la surface de contact que la goutte forme avec cette surface c'est ce qui nous intéresse dans le cadre de cette thèse – soit de les déposer de façon homogène sur une surface. Plusieurs techniques permettent de supprimer cet effet. Ainsi, Enqi He et al.[4] proposent une méthode basée sur l'évaporation de gouttes gelées. Pour ce faire, ils déposent une goutte sur un substrat refroidi par un module Peltier de manière à ce que la goutte gèle. Quand l'évaporation de la goutte gelée est effectuée à une température de -5°C, les microbilles qu'elle contient se déposent vers le centre. L'explication est la suivante : lors de l'évaporation, les particules adhèrent à la surface de la goutte, les ramenant progressivement vers son centre. Yanshen Li et al.[5] proposent quant à eux, une autre méthode basée sur l'évaporation de goutte sur une surface à faible conductivité thermique qui sera chauffée. En effet, en chauffant la surface, une différence de température entre le bord de la goutte et son sommet engendre un flux de Marangoni et ce, jusqu'à ce que la goutte ne devienne qu'un fin film liquide. Le motif qui en résulte est un îlot de particules au centre de la goutte et un anneau en périphérie. En effet Hua Hu et al.[6] ont montré que pour qu'il y ait effet tâche de café, il faut non seulement une ligne de contact fixe mais aussi la suppression des flux de Marangoni. Ces flux circulatoires dus à des gradients de tension de surface produits par la chaleur latente d'évaporation, conduisent les particules à se déposer préférentiellement au centre de la goutte. La figure 1 schématise les flux de Marangoni et capillaire qui peuvent être présents au sein d'une goutte s'évaporant sur une surface.

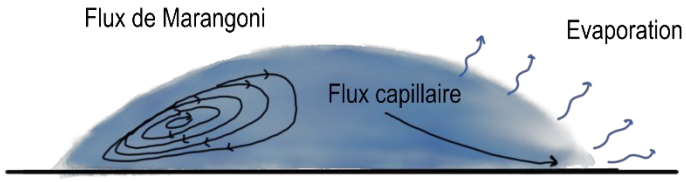


Figure 1 Schéma des flux de Marangoni et capillaire qui peuvent avoir lieu dans une goutte s'évaporant sur une surface. Adapté de [7]

Finalement, supprimer l'effet tâche de café dans une optique de concentration des analytes revient premièrement à empêcher la ligne de contact d'être fixe sur la surface et secondement, à activer les flux Marangoni. L'évaporation sur une surface superhydrophobe combine les deux effets, nous allons voir pourquoi.

La superhydrophobie n'est qu'un aspect du phénomène de mouillage. Dans le livre *gouttes, perles et ondes*, Pierre-Gilles de Gennes et. al[8] définissent le mouillage comme «l'étude de l'étalement d'un liquide déposé sur un substrat solide (ou liquide)».

Étymologiquement, il est aisé de comprendre que les surfaces hydrophobes sont des surfaces pour lesquelles l'eau a une répulsion. Autrement dit, une goutte déposée sur une telle surface ne va pas maximiser son étalement. Une surface superhydrophobe n'est qu'un cas particulier de surface hydrophobe dans lequel le mouillage est presque nul. Une méthode simple pour déterminer le mouillage d'un liquide sur une surface est la mesure de l'angle de contact qu'effectue cette goutte avec la surface. Une taxonomie arbitraire basée sur la mesure de l'angle de contact permet de classer les

surfaces. La figure 2 représente les différents types de surfaces en fonction de l'angle de contact que fait une goutte d'un certain liquide sur une certaine surface. Lorsque la goutte s'étale parfaitement sur la surface et que son angle de contact est inférieur à 10°, on parle alors de surface superhydrophile (1a) et lorsqu'il varie entre 10° et 90°, de surface hydrophile. Sur des surfaces hydrophobes, les gouttes ont un angle de contact compris entre 90° et 150° (1b). Enfin, les surfaces superhydrophobes sont celles pour lesquelles l'angle de contact est supérieur à 150°.

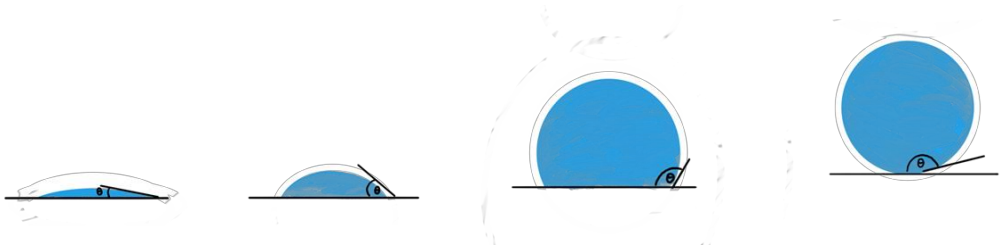


Figure 2 Schéma représentant les différentes conformations que peut prendre une goutte en fonction de la mouillabilité de la surface a) surface superhydrophile $\theta < 10°$, b) hydrophile $10° < \theta < 90°$, c) hydrophobe $90° < \theta < 150°$, superhydrohobe $\theta > 150°$. Adapté de [9]

Pour décrire ces phénomènes de mouillage, trois modèles se sont succédés depuis le XIXe siècle.

1.1 Le modèle de Thomas Young (1805)

En 1805, Thomas Young, par son modèle, met en évidence le fait que l'angle de contact que forme une goutte avec une surface plane, ne dépend pas du volume mais des tensions de surface qui, en s'équilibrant, définissent cet angle.[10]

$$cos(\theta_E) = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}}$$

La surface pensée par Thomas Young est une surface idéale, c'est-à-dire sans défaut de quelque nature que ce soit. La réalité est plus complexe, les surfaces réelles présentant des défauts de deux natures, physique (irrégularités sur la surface), et chimique.

1.2 Le modèle de Wenzel (W)

Wenzel[11] montre par ailleurs dans son article de 1936 que : « [...] contrary to the usual assumption, the adhesion tension, as defined in terms of characteristic interfacial tension values, is not a direct measure of wettability, but that the latter depends also definitely on the physical condition of the surface wetted. »

Dans le modèle de Wenzel, le liquide épouse la surface. Cette dernière n'est plus une surface plane mais une surface présentant une rugosité, le facteur de rugosité étant défini comme :

$$r = \frac{Surface_{réelle}}{Surface\ projetée}, \text{ (r >=1)}$$

Notons ici que ce facteur de rugosité est supposé suffisamment faible toutefois pour que la goutte épouse réellement tous les contours de la surface.

Le nouvel angle de contact que forme le liquide avec la surface sera alors décrit par l'équation suivante :

$$cos\theta_w^* = rcos\theta_E$$

Pour r égal 1, la surface est plane ; nous retrouvons par conséquent la relation de Young. Par ailleurs, une surface hydrophobe rugueuse sera plus hydrophobe que la même surface hydrophobe plane ; il en va de même concernant des surfaces hydrophiles.

Le modèle de Wenzel décrit bien ce que l'on observe dans les expériences sur les surfaces hydrophobes, à savoir une augmentation de l'angle de contact avec la rugosité.

1.3 Le modèle de Cassie-Baxter (CB)

Dans leur article daté de juin 1944 A.B.D Cassie et S. Baxter[12] étendent l'analyse de Wenzel aux surfaces poreuses : « *The wettability or water-repellency of porous surfaces has not been similarly investigated although it is of much importance for the rain resistance of all porous clothing, both natural and artificial.* »

Pour mettre en évidence leur relation, Cassie et Baxter se sont questionnés sur le mouillage de surfaces hétérogènes. Celles-ci sont constituées de deux éléments de nature chimique différentes. Ainsi, chacun des matériaux présente un angle de contact différent avec le liquide.

On peut définir l'angle de contact apparent sur ce type de structure par :

$$cos\theta_{CB}^* = \phi_1 cos\theta_1 + \phi_2 cos\theta_2$$

ϕ_1 *et* ϕ_2 sont des grandeurs sans dimension, représentant les fractions solides des deux éléments de nature chimique différentes.

Si de plus, la rugosité devient importante, il est alors possible que la goutte repose sur de l'air. Or, l'angle de contact d'une goutte avec de l'air est 180°, et celui avec le solide θ_E.

De plus, $\phi_1 + \phi_2 = 1$

La relation de Cassie-Baxter devient alors : $cos\theta_{CB}^* = -1 + \phi_s(1 + cos\theta_E)$

ϕ_s est la fraction solide de la surface, il est compris entre 0 et 1. Pour un réseau de piliers carrés de côté a et espacés de b bord à bord, $\phi_s = \frac{a^2}{(a+b)^2}$. Pour a = b = 5 µm alors $\phi_s = 0.25$

D'après cette relation, nous constatons un changement d'état lorsque θ_E est supérieur à 90°.

En effet si l'on prend par exemple $\theta_E = 90°$ et $\phi_s = 0.25$ alors $cos\theta_{CB}^* = -0.75$ donc $\theta_{CB}^* = 138.6°$.

Nous remarquons là encore, que la structuration va amplifier (c'est-à-dire plus ϕ_s augmente) la mouillabilité existante de la structure. Pour une surface hydrophile ($cos\theta_E$ positif), le cosinus de l'angle de contact augmente, la goutte s'étale encore davantage alors que pour une surface hydrophobe ($cos\theta_E$ négatif) le cosinus de l'angle effectif devient encore plus négatif exagérant ainsi le démouillage.

Ces trois modèles peuvent être résumés dans la figure 3. Les modèles de Wenzel et de Cassie-Baxter sont de première importance, notamment pour comprendre les cinétiques d'évaporation. En effet, comme nous pouvons le voir dans la figure 3, une goutte dans un état W imprègne la surface, ce qui n'est pas le cas dans l'état CB. Il est dès lors intéressant de se demander lequel des deux états va être favorisé en fonction de la structure créée. L'analyse donnée par David Quéré et José Bico [13] dans « controlled wetting by surface patterning » repose sur une conception énergétique. En fonction de la topographie, un des deux états va être énergétiquement plus stable. Ils établissent le critère suivant :

Le mode Cassie Baxter (i.e piégeage des poches d'air) est favorisé si : $\cos(\theta_E) < \frac{\phi_s - 1}{r - \phi_s}$

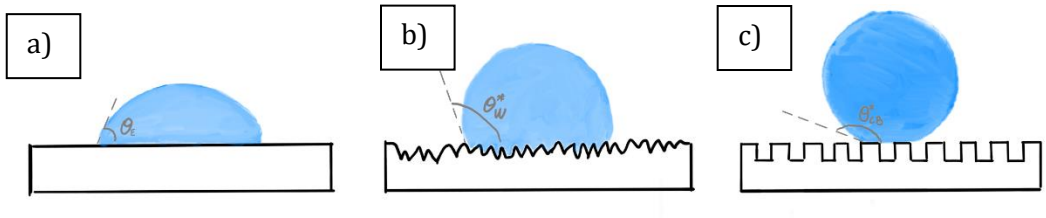


Figure 3 Schéma des différents angles de contact en fonction de la structuration sur une surface chimiquement hydrophobe. a) modèle de Young, la surface est plane, l'angle de contact apparent est régi par les tensions de surface. b) modèle de Wenzel, la surface est rugueuse, l'angle de contact apparent est régi par les tensions de surface ainsi que la rugosité. c) modèle de Cassie-Baxter, la rugosité (r) devient tellement importante que la goutte repose sur des poches d'air, l'angle de contact apparent est régi par les tensions de surface ainsi que la fraction de surface solide (ϕ_s) Adapté de [14]

Dans la pratique, il existe trois types de surfaces superhydrophobes dont la figure 4 nous donne la représentation : les surfaces composées de nanostructures (4a), celles composées de microstructures (4b) et enfin les surfaces hiérarchiques, c'est-à-dire composées à la fois de micro et de nanostructures.

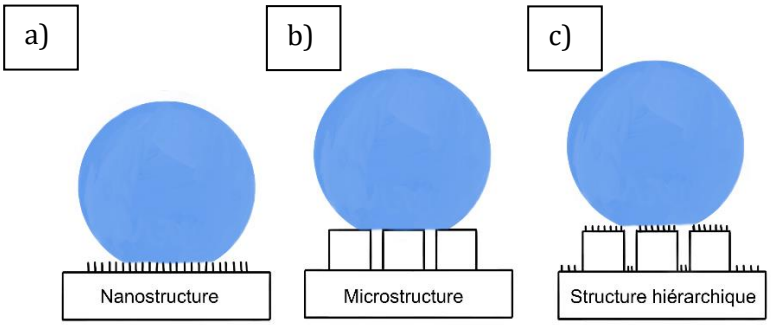


Figure 4 Schéma représentant les différents types de surfaces superhydrophobes : surface nanostructurée a), surface microstructurée b) et surface hiérarchique combinant micro et nanostructures c). Adapté de [15]

Un ordre d'idée des dimensions physiques impliquées nous est donné par la feuille de lotus Nelumbo nucifera (figure 5). Celle-ci est composée de microbosses d'environ 13µm de hauteur pour une largeur de 10µm. Des nanobosses de 780 nm de hauteur et de 40 nm de largeur sont présentes sur les microbosses.[16]

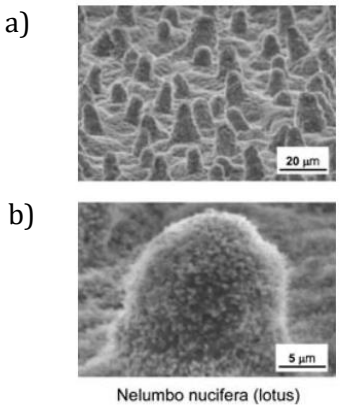


Figure 5 Micrographies électroniques à balayage de la surface de feuilles de N. nucifera (lotus). a), vue générale de la surface de la feuille b) focus sur une microbosse Recopié de [16]

Cet exemple nous permet d'apprécier les dimensions des surfaces superhydrophobes.

Les deux états Cassie-Baxter et Wenzel vont avoir une grande influence lors de l'évaporation ; il convient de voir dans quelle mesure.

1.4 Revue de la littérature

1.4.1 Évaporation sur des surfaces superhydrophobes

G. McHale et al.[17] ont étudié l'évaporation de gouttes sur des surfaces superhydrophobes(SH) fabriquées en SU-8. Elles sont constituées de piliers circulaires (5-15 µm de diamètre) disposés en réseaux périodiques, de telle sorte que la séparation centre à centre entre les piliers est comprise entre 20 et 30 µm. Ils sont les premiers, en 2004, à avoir étudié l'évaporation de gouttes sur des surfaces ainsi texturées. Dans leur expérience, la goutte s'évapore initialement en mode Cassie Baxter, c'est-à-dire avec un angle de contact constant. La goutte reposant sur les piliers, celle-ci saute entre les piliers lors de son évaporation pour finalement s'empaler sur les piliers et finir son évaporation en mode Wenzel, c'est à dire avec une ligne de contact fixe. Ces auteurs montrent donc pour la première fois une transition CB vers W, lors de l'évaporation d'une goutte.

Y.C .Jung et al.[18] se sont intéressés aux propriétés de mouillage durant l'évaporation et à la condensation de microgouttelettes d'eau sur des surfaces superhydrophobes. Ils proposent un critère selon lequel la transition du régime de Cassie et Baxter au régime de Wenzel se produit lorsque l'affaissement de la goutte entre deux aspérités est plus grand que la profondeur de la cavité, en d'autres termes, la goutte remplie les aspérités.

Yanjie Lu et al.[19] ont quant à eux développé un modèle permettant d'étudier l'évaporation d'une goutte sur une surface superhydrophobe, par lequel il est possible de décrire à la fois l'évolution de la forme de la goutte mais aussi la transition du régime de mouillage.

La figure 6 montre les différentes étapes qui surviennent lors de l'évaporation d'une goutte sur ce type de surfaces. En premier lieu, celle-ci s'évapore en maintenant sa ligne de contact avec la surface constante (CCR pour constant contact radius). Ensuite se déroule l'évaporation en mode angle de contact constant (CCA pour constant contact angle). Cette partie de l'évaporation correspond à ce qui est appelé mode CB d'évaporation ; la goutte reste au-dessus de la surface. Une phase de transition de mouillage est ensuite décrite. La goutte s'empale sur la rugosité de la surface et continue de s'évaporer en mode CCR. C'est finalement dans un mode mixte d'évaporation (CCR et CCA) que celle-ci se termine. La fin de l'évaporation correspond à ce qui est appelé mode W d'évaporation ; la goutte imprègne la surface.

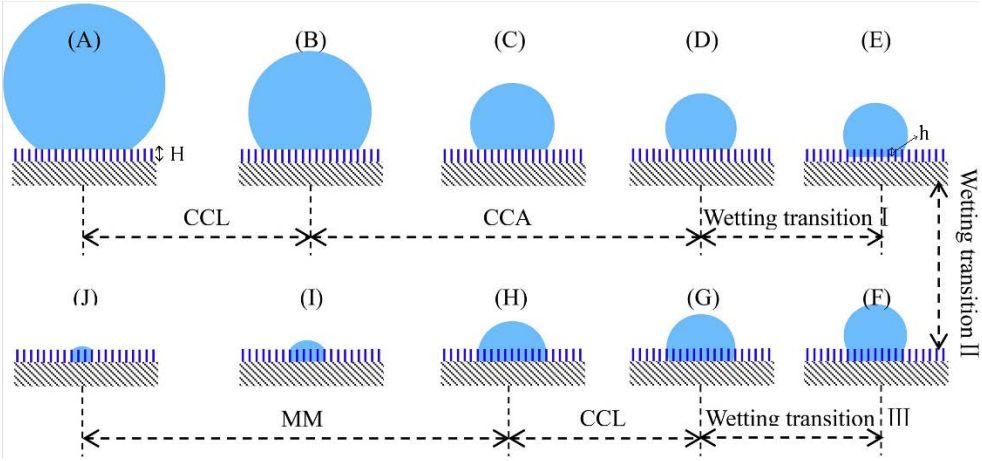


Figure 6 Schéma des états de mouillage d'une goutte pendant son évaporation sur des surfaces micro/nano texturées. (A)-(B) : la goutte Cassie-Baxter s'évapore en mode CCR (constant contact radius) ; (B)-(D) : la goutte s'évapore en mode CCA (constant contact angle) ; (D)-(E) : la goutte commence à passer de l'état Cassie-Baxter à l'état Wenzel en s'empalant entre les micro/nano piliers ; (E)-(F) : la goutte continue à empaler les piliers jusqu'à ce que h = H ; (F)-(G) : la gouttelette passe à l'état de Wenzel en agrandissant sa surface de base et en réduisant son CA; (G)-(H) : la goutte en mode Wenzel s'évapore en mode CCR ; (H)-(J) : la goutte s'évapore en mode mixe réduisant à la fois sa surface de base et son angle de contact jusqu'à disparition. Adapté de [19]

Marcel Sperling et al.[20] se sont interrogés sur la manière dont les surfaces superhydrophobes peuvent être utilisées pour assembler des suspensions colloïdales en objets plus complexes. La figure 7, issue de leur publication, permet de comprendre les flux existant dans une goutte dans l'Etat Wenzel ou dans l'état Cassie-Baxter. Que ce soit en mode CCA (4a)) ou mode CCR (4b)), des flux de Marangoni existent mais dans le cas a), ils vont avoir tendance à renvoyer les particules vers le centre tandis que dans le b) ils vont les renvoyer vers la périphérie.

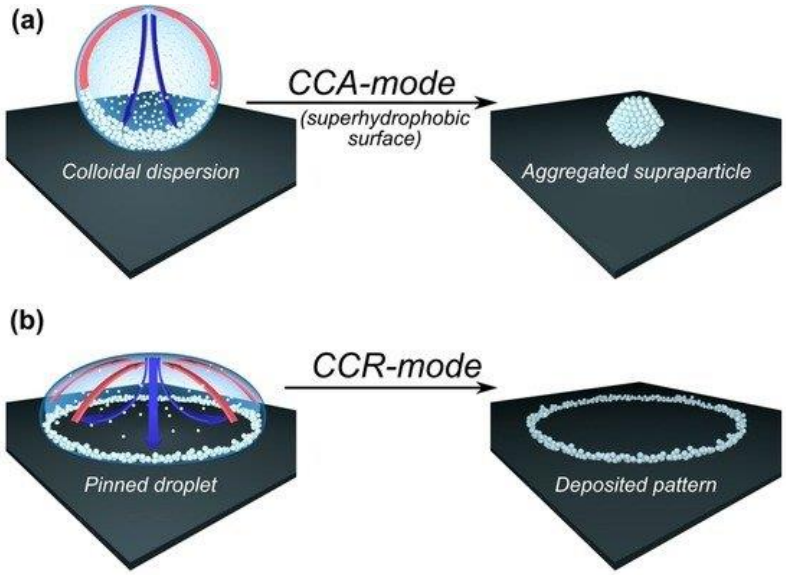


Figure 7 Description schématique des différents modes observés pour une gouttelette séchant sur un substrat solide, le flux massique d'eau refroidie (flèches bleues) et celui dû aux gradients de tension interfaciale (flux de Marangoni ; flèches rouges) étant indiqués pour : (a) le mode à angle de contact constant (CCA), tel qu'observé sur la plupart des surfaces superhydrophobes ; (b) le mode à rayon de contact constant (CCR). Extrait de [20]

Des travaux extrêmement pertinents pour notre étude se sont intéressés à des surfaces présentant une région hydrophile au sein d'une région superhydrophobe (ou l'inverse). Nous mettons en lumière deux études particulières qui ont servi d'inspiration à notre procédé.

Melissa L. McLauchlin et al.[21] ont quant à eux analysé les propriétés d'évaporation ainsi que la force d'accroche (pinning) d'une goutte déposée sur des surfaces superhydrophobes nanostructurées en silicium sur lesquelles des sites hydrophiles sont créés par ablation laser. La figure 8 représente la surface développée. La surface superhydrophobe composée de nanofils de silicium est de couleur marron sur cette image. Au centre de celle-ci une tâche correspondant au site hydrophile crée par ablation laser peut-être observée. Lorsqu'une goutte est placée sur une telle surface, l'angle de contact va être gouverné à la fois par la théorie CB et par la théorie W. Plus le volume de la goutte sera important et moins l'influence de la zone hydrophile sur l'angle de contact sera importante. Un aspect significatif de ce papier est le fait que la transition entre le mode CB et W lors d'une évaporation a lieu en périphérie de la zone hydrophile. De plus, les auteurs montrent que la force de piégeage de la goutte admet une relation linéaire avec la circonférence de la zone hydrophile. Ils démontrent enfin que ce type de surface permet de confiner la cristallisation d'une matrice lors de son évaporation sur la zone hydrophile, ce qui permet de faire émerger une application pour les systèmes MALDI. En effet, dans les systèmes de spectrométrie de masse assistée par matrice, l'évaporation de cette dernière laisse un dépôt de type tâche de café réduisant ainsi les performances globales.

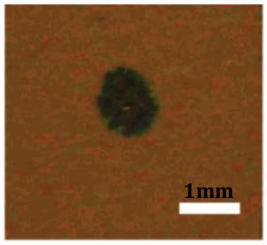


Figure 8 Image d'une goutte d'une solution de matrice d'acide sinapique dans 70% d'acétonitrile et 30% d'eau (un colorant vert a été ajouté) évaporée sur la surface développée par Melissa L McLauchlin. La tâche met en évidence le site hydrophile de 1 mm de diamètre créé par ablation laser. La barre d'échelle est 1mm. Extrait de [21]

Cette publication est fondamentale pour notre étude, même si elle n'explique pas en détail les processus d'évaporation. Elle prouve qu'il est possible, en utilisant la spectrométrie de masse, d'obtenir un signal cinq fois plus important sur des surfaces superhydrophobes avec des points d'accroche hydrophiles que sur les surfaces conventionnellement utilisées en MALDI-MS.

Plus récemment, Quming Yin et al[22], ont utilisé une méthode analogue à celle de Melissa L.Mclauclin pour supprimer l'effet tâche de café. En partant d'une surface hydrophile ou superhydrophile, les auteurs créent par fonctionnalisation une surface superhydrophobe ou hydrophobe puis créent des points d'accroche hydrophile ou superhydrophile par traitement plasma. Il en résulte ainsi trois types de surfaces : superhydrophobe avec points d'accroches superhydrophiles, hydrophobe avec points d'accroches hydrophile et hydrophobe avec points d'accroches superhydrophiles. La figure 9 regroupe les différents procédés mis en œuvre pour réaliser ces surfaces. Les auteurs démontrent que sur une surface hydrophobe avec des points d'accroches hydrophiles, il est possible de supprimer l'effet tâche de café. L'objectif n'est cependant pas de pré-concentrer mais plutôt de réaliser des dépôts homogènes.

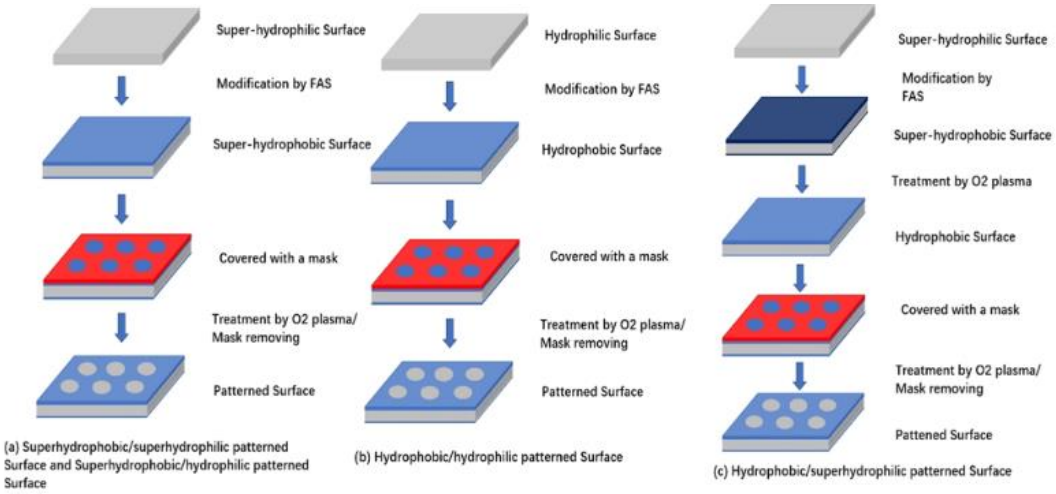


Figure 9 Schéma illustrant les méthodes mises en œuvre par Quming Yin et al. pour réaliser les différents types de surfaces texturées. Extrait de [13]

Au vu de la littérature, il est aisé de comprendre que pour concentrer le plus possible des analytes, il est nécessaire de retarder la transition entre le mode CCA et CCR. En effet, c'est ce dernier qui, avec une ligne de contact fixe, va imposer la surface minimale du dépôt final.

Aussi, la transition entre les modes CB et W d'évaporation est un aspect primordial pour le problème qui nous occupe. Adrien Bussonnière et al.[23] l'ont étudiée pour des structures micro et nano structurées. La comparaison des énergies de surface des modes CB et W leur permet d'établir un critère de transition basé sur la rugosité et la fraction solide. La transition apparaît lorsque l'on atteint un angle de contact critique qui dépend de la géométrie de la structure. Ils en déduisent que pour étendre l'état CB, il convient d'augmenter la rugosité de la structure c'est-à-dire de nanostructurer la surface.

Par ailleurs, les surfaces superhydrophobes ayant plusieurs niveaux de structures n'ont pas encore été décrites. Il s'agit de surfaces couplant deux niveaux de structures, généralement un niveau microscopique sur lequel un niveau nanoscopique est réalisé. Nastasia Okulova et al. [24] ont étudié cette question et notamment l'influence de telles structures sur l'évaporation. Trois surfaces en polymères ont ainsi été réalisées : une surface composée de micro-piliers circulaires disposés de façon hexagonale, une surface nano-rugueuse et enfin une surface combinant ces deux aspects. En analysant des évaporations sur ces différentes surfaces, les auteurs démontrent que la surface hiérarchique permet de maintenir le mode CB plus longtemps que les autres structures.

Il convient cependant de discuter les résultats précedents. En effet, Xiaoyan Zhang et al[25] ont quant à eux étudié l'évaporation de gouttes à la fois sur la surface superhydrophobe hiérarchique naturelle qu'est la feuille de lotus, et sur une surface en polymère la mimant. Ils arrivent à la conclusion que sur ces surfaces, la ligne de contact triple est fixe durant la quasi-totalité de l'évaporation, ce qui pourrait être dû selon eux, à une pénétration de vapeur d'eau dans la structure rugueuse ainsi qu'à une forte interaction entre la cire végétale et l'eau. Un paramètre permet de comprendre ce phénomène de surface superhydrophobe adhérente : il s'agit de l'hystérésis de l'angle de contact. Lorsque l'on incline une surface sur laquelle une goutte a été précédemment déposée, un angle de contact d'avancée et de recul se forme (figure 10). La différence entre ces deux angles correspond à l'hystérésis de l'angle de contact. Plus l'hystérésis de l'angle de contact est faible, plus la surface sera qualifiée de glissante. A l'inverse, un angle d'hystérésis important donne des propriétés collantes (sticky) à la surface. L'évaporation sur ces deux types de surface SH est différente. Les surfaces glissantes obéissent aux propriétés susmentionnées. Sur les surfaces dites collantes les évaporations s'effectuent d'abord en mode CCR puis en mode mixte CCR et CCA.[26]

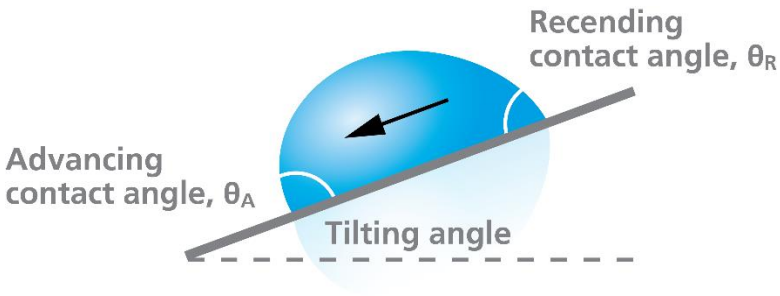


Figure 10 Schéma représentant une goutte sur un plan incliné. Un angle de contact d'avancée θ_A et de recul θ_R apparaissent sur la goutte lors de l'inclinaison du plan, ils caractérisent l'hystérésis de l'angle de contact. Recopié de [27].

1.4.2 Vers un contrôle plus poussé

Lorsque la goutte d'eau est piégée par un défaut de la surface dû à une possible imperfection du procédé de fabrication cela engendre une localisation du dépôt final au voisinage de ce défaut de surface. Il est dès lors difficile de prévoir la localisation du dépôt final sur des surfaces superhydrophobes conventionnelles (réseau uniforme de piliers). Pour définir de manière univoque et reproductible la localisation du dépôt final il faut donc concevoir un système qui va guider de manière déterministe la goutte au cours de l'évaporation et ceci sans altérer le caractère superhydrophobe de la surface.

Dès 2009, G. McHale et al.[28] ont montré qu'il était possible de guider des gouttes sur des surfaces superhydrophobes en modifiant seulement la topographie et sans changer la chimie de surface. En faisant varier la distance inter-piliers d'une surface superhydrophobe, il est possible d'induire un gradient de superhydrophobie. Celui-ci induit une force sur la goutte qui l'amène vers la zone de plus faible superhydrophobie. Un angle d'hystérésis faible est nécessaire pour que la goutte puisse se mettre en mouvement.

Une approche similaire a été développée par Wuzhou Song et al. [29]. La structure présentée est constituée d'une matrice de piliers circulaires disposés de manière hexagonale. Au-dessus de cette structure les auteurs ont rajouté 24 lignes de guidage disposées radialement autour d'un pilier central (figure 11).

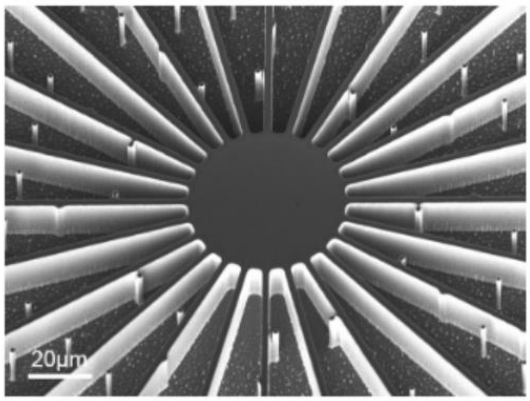


Figure 11 Image en microscopie à balayage de la structure fabriquée par Wuzhou Song et al. [29], des linges de guidage, des micro pilier ainsi qu'un pilier central peuvent être observés.

Les auteurs expliquent dans leur article qu'une autre façon de concevoir une surface superhydrophobe constituée uniquement de piliers est de faire varier l'espacement et/ ou le rayon des piliers. Par ailleurs, selon eux, les lignes de guidages avec leur structure connectée disposent d'une plus petite barrière énergétique associée au mouvement de la gouttelette que sur des structures n'ayant que des piliers.

Il convient de relever l'existence de deux autres approches. La première consiste à créer un point d'accroche hydrophile sur la surface[30], sur lequel la goutte se retrouve piégée, ce qui permet d'orienter son évaporation. Ce point peut être vu comme un défaut de surface intentionnellement positionné. La seconde approche consiste à créer une surface superhydrophobe sur un substrat mou tel que le PDMS (polydiméthylsiloxane)[31] et de déformer le substrat mécaniquement de manière à créer un point d'inflexion local permettant de guider la goutte vers ce point particulier.

Dans notre travail nous avons combiné et adapté plusieurs des solutions déjà proposées dans la littérature et que nous venons brièvement d'exposer. Nous les étudierons plus en détail après avoir présenté de manière générale la problématique de la spectroscopie Raman exaltée en surface.

2 Spectroscopie Raman exaltée

2.1 La spectroscopie Raman

2.1.1 La découverte de l'effet Raman

Chandrashekhara Venkata Râman, physicien indien, découvrit en 1928, indépendamment de Leonid Mandelstam, un effet optique de diffusion de la lumière qui porte son nom – découverte pour laquelle il reçut le prix Nobel de physique en 1930. Dans sa conférence pour ledit prix, Raman explique le cheminement intellectuel qui l'a amené à sa découverte. Lors d'un voyage en Europe durant l'été 1921, en observant l'opalescence de la mer Méditerranée, il a l'intuition que le phénomène qui donne cette couleur particulière à l'eau est similaire à celui qu'avait imaginé Rayleigh pour expliquer la couleur du ciel, à savoir la diffusion de la lumière par l'atmosphère. Raman imagine que les molécules d'eau diffusent la lumière du soleil. Il commença son investigation sur la diffusion de la lumière dans les milieux liquides dès son retour à Calcutta en septembre 1921.[32] Dès le début de ses recherches il découvrit que la diffusion de la lumière était un phénomène courant dans la nature, qui pouvait être observé dans des gaz, de la vapeur, des liquides, des solides amorphes et cristallins. L'effet Raman fut mis à jour lorsque Raman déplaça son étude de la théorie classique électromagnétique de lumière pour investiguer le champ de la nature corpusculaire de la lumière. Il découvrit expérimentalement qu'associée à la diffusion de type Rayleigh-Einstein, une autre radiation beaucoup plus faible en intensité est émise. Après avoir éliminé l'hypothèse d'une radiation parasite due à des impuretés dans la solution, Kariamanikkam Srinivasa Krishnan – alors étudiant de Râman - observa des radiations similaires dans d'autres liquides. C'est par l'étude de la diffusion de la lumière dans un liquide très visqueux que la vraie nature du phénomène fut trouvée. En étudiant la diffusion de la lumière du soleil à travers un échantillon de glycérine purifiée, Venkateswaran[33] remarqua que la couleur de l'échantillon était « d'un vert brillant au lieu du traditionnel bleu ». Le phénomène, similaire à celui observé par Raman, présentait l'avantage d'être beaucoup plus intense et donc plus facilement observable.

Toutes ces observations donnèrent à Raman l'idée selon laquelle le phénomène était analogue à l'effet Compton. Ce dernier[33] avait remarqué que « la longueur d'onde du rayonnement pourrait être dégradée au cours du processus de diffusion ». Bien qu'ayant conscience des limites de la théorie classique de la lumière, Raman[34], en l'absence de données suffisantes sur la structure des molécules, proposa une explication du phénomène :

> « The classical theory of light-scattering tells us that if a molecule scattering light is moving, rotating or vibrating, the scattered radiations may include certain frequencies, different from those of the incident waves. This classical picture, in many respects, is surprisingly like what we actually observe in the experiments. It explains why the frequency shifts observed fall into three classes, translational, rotational and vibrational, of different orders of magnitude. It explains the observed selection rules, as for instance, why the frequencies of vibration deduced from scattered light include only the fundamentals and not the overtones and combinations which ate so conspicuous in emission and absorption spectra. The classical theory can even go further and give us a rough indication of the intensity and polarization of the radiations of altered frequency. »

Raman mit ainsi en évidence la diffusion inélastique de la lumière par un liquide. Cette découverte majeure permettra par la suite, de mettre au point des technologies d'analyse non destructives de la matière.

2.1.2 Principe de fonctionnement

L'effet Raman peut être décrit en physique classique par la polarisabilité des molécules. Lorsqu'une molécule est soumise à un champ électromagnétique, elle se polarise par déformation de son nuage électronique induisant un moment dipolaire : $\vec{\mu_{induit}} = \alpha_R \vec{E}$

α_R est le tenseur de polarisabilité propre à chaque molécule. C'est un tenseur d'ordre 2.

2.1.3 Section efficace

Tout photon arrivant à proximité d'une molécule ne va pas forcément interagir avec elle. La probabilité d'interaction peut être décrite par une section efficace, grandeur homogène à une surface :

$$\sigma = \frac{P_R}{S_{inc}}$$

S_{inc} est la densité de puissance incidente en $[Wm^{-2}]$ tandis que P_R en $[W]$ est la puissance du signal résultant de l'interaction photons / molécules, dans notre cas le signal Raman. Plus la section efficace est grande et plus grande est la probabilité d'interaction et donc plus fort est le signal résultant de cette interaction. La section efficace permet donc de mesurer l'efficacité de phénomènes physiques et, ainsi, de les comparer. La section efficace différentielle permet de décrire la distribution angulaire du signal Raman émis c'est-à-dire la puissance émise par angle solide élémentaire $d\omega$. En général le mode de collection de ce signal s'effectue autour d'un angle de 90° avec la direction du laser incident (retro-diffusion à 90°). La quantité suivante peut alors être définie, pour un mode de vibration donné et pour une molécule par :

$$\frac{dP_R}{d\Omega}(90°) = \frac{d\sigma_R}{d\Omega} S_{Inc}$$

$\frac{dP_R}{d\Omega}(90°)$ a pour unité $[Wsr^{-1}]$ et représente la puissance Raman diffusée par unité d'angle solide dans le mode Stokes et moyennée sur toutes les orientations possibles de la molécule (« molecular-orientation-averaged differential Stokes Raman scattered power »). Cette expression fait apparaitre une section efficace Raman différentielle absolue : $\frac{d\sigma_R}{d\Omega}$. Cette dernière grandeur peut être à son tour reliée à la polarisabilité de la molécule par l'expression :

$\frac{d\sigma_R}{d\Omega} = \frac{L_M \omega_R^4}{16\pi^2(\epsilon_0)^2 c^4} \tilde{\alpha}^2$

$\tilde{\alpha}$ est la magnitude du tenseur de polarisabilité Raman. L_M est le facteur de correction du champ local, dans le vide il est égal à un.$\omega_R = \omega_L - \omega_v$ est la pulsation de l'onde diffusée pour un mode Stokes, elle correspond à la différence entre la pulsation du laser notée ω_L et la pulsation du mode vibrationnel notée ω_v.

Nous retiendrons de ce développement que l'efficacité du phénomène de diffusion inélastique à l'origine du signal Raman qu'il est possible de détecter, dépend d'une section efficace qui est propre au mode particulier de vibration de la molécule, de la fréquence d'excitation utilisée et de l'environnement électromagnétique dans lequel se trouve la molécule. Notons au passage que la section efficace des modes anti-Stokes est plus faible et que nous utiliserons dans nos travaux que les modes les plus intenses qui correspondent à une diffusion de la lumière à plus grande longueur d'onde. Dans la pratique la section efficace Raman de diverses molécules a été mesurée ou pour être plus exact pour les divers modes de vibration de chacune de ces molécules.

2.1.4 Comparaison des section efficace Raman et de fluorescence

La section efficace différentielle pour des molécules non résonantes est de l'ordre de $\sim 10^{-29} - 10^{-30} cm{-}2/sr$ [35]. Pour des molécules résonantes à la longueur d'onde d'excitation, la section efficace différentielle passe à $\sim 10^{-24} cm{-}2/sr$ tandis que la section efficace différentielle pour des fluorophores est de $\sim 10^{-17} cm{-}2/sr$.[36]

Le processus de fluorescence est donc de $\sim 10^{7}$ à $\sim 10^{13}$ plus efficace que la diffusion Raman.

Cette faible section efficace des molécules pour les processus Raman explique la raison pour laquelle il est difficile de détecter des composés faiblement concentrés avec cette technique. En effet, le signal Raman généré par un échantillon peut s'écrire sous la forme :

$$P_{raman} = KN\sigma_k I$$

Avec P_{raman} la puissance Raman mesurée par le détecteur en [photons/s], K étant l'efficacité du détecteur, N le nombre de molécules sous le faisceau, I le flux de photons incidents relié à la puissance du laser excitateur en [photons.cm^{-2}s^{-1}] et σ_k la section efficace pour un mode vibratoire donné k. Cette équation permet de comprendre les stratégies de détection. De fait, lorsque l'on diminue la concentration (donc N) pour continuer à obtenir un signal supérieur au niveau de bruit, il convient d'augmenter soit le temps d'acquisition, soit la puissance de la source incidente. La limitation du Raman pour les faibles concentrations, pour les échantillons biologiques notamment, est alors la photodégradation car l'augmentation du temps d'acquisition ou de la puissance du laser peut induire la dégradation de l'échantillon d'intérêt.

La diffusion Raman, de par ses propriétés physiques intrinsèques, ne permet pas la détection de molécules faiblement concentrées ou de molécules avec de faibles sections efficaces. Cette difficulté inhérente à la technique a pu être dépassée par la découverte des phénomènes d'exaltation de surface signal Raman par des nanostructures métalliques.

2.2 Exaltation de surface

Fleischmann, Hendra et McQuillan [37] sont les premiers en 1973, à mettre en évidence l'exaltation du signal Raman de la pyridine adsorbée sur une électrode d'argent. Leur hypothèse pour expliquer ce phénomène reposait sur la grande surface spécifique des électrodes rugueuses qui aurait eu pour effet de piéger efficacement les molécules et donc d'accroitre la concentration de surface des molécules adsorbées. Le phénomène observé est décrit comme une exaltation de surface du signal Raman, soit en anglais : SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy).

En 1977, Jenmaire et van Duyne[38] proposent une nouvelle hypothèse explicative de ce phénomène basée sur l'interaction des plasmons de surface de l'électrode métallique avec les molécules adsorbées pour expliquer l'exaltation du signal Raman. En effet, ils montrent que le signal d'une solution saturée en pyridine et le signal de la pyridine adsorbée sur une électrode d'argent sont différents – une différence qui ne pouvait pas s'expliquer par une augmentation de la surface sur laquelle la pyridine peut s'adsorber. Généralement, lorsque l'on analyse un échantillon en SERS, il y a un effet de moyennage spatial : le signal reçu provient de nombreuses molécules réparties sur la surface et dans des conformations diverses. Nous avons ainsi accès à une information macroscopique ne permettant pas de comprendre le phénomène à l'échelle de la molécule. C'est à partir des années 1990 et de la question du spectre de la molécule unique que la compréhension de l'effet SERS s'améliore. L'étude d'une seule molécule permet en effet de mieux comprendre l'interaction entre la lumière, la molécule et la surface métallique. Depuis les années 1980, nous savons que les nanostructures sur lesquelles s'adsorbent les molécules jouent un rôle important. Par conséquent, c'est à l'échelle nanométrique qu'il faut se placer pour comprendre les phénomènes en jeu. Les premières expériences d'études de molécules uniques ont été effectuées par K. Kneipp et S.Nie[39,40], qui, pour ce faire, ont utilisé des suspensions colloïdales afin d'exalter le signal Raman.

2.2.1 Plasmonique

L'une des composantes permettant de comprendre l'effet SERS est l'électromagnétisme car une partie importante de l'exaltation observée trouve son origine dans l'interaction entre la lumière et la surface des métaux nobles. Le modèle de Drude-Lorentz représente les électrons de conduction des métaux comme un plasma capable d'osciller. La vision quantique de ces oscillations les décrit comme des plasmons définis par D.Pines[41] en 1956 :

"The valence electron collective oscillations resemble closely the electronic plasma oscillations observed in gaseous discharges. We introduce the term 'plasmon' to describe the quantum of elementary excitation associated with this high-frequency collective motion."

A l'image du photon, qui est une particule quantique représentant les excitations élémentaires, ou mode, des oscillations du champ électromagnétique libre, les plasmons sont des quasi-particules quantiques représentant l'excitation élémentaire, ou mode, de l'oscillation de la densité de charge dans un plasma.[42]

En 1957, Ritchie[43] prédit l'existence d'un nouveau mode de plasmons dans des films fins. Ces nouveaux plasmons ont la propriété de se propager à l'interface métal/diélectrique sous forme d'une onde de densité de charge longitudinale. Le couplage entre les électrons libres et les photons définit alors un mode mixte dans lequel l'énergie est partagée entre le plasmon et le photon ; on parle alors d'un plasmon-polariton de surface.

On distingue usuellement deux types de plasmons-polaritons de surface. Les uns sont propagatifs à l'interface tandis que les autres sont confinés ou localisés. Typiquement ces plasmons de surface localisés sont générés au sein de nanoparticules métalliques ou au sein de nanostructures de surface. Ces derniers sont impliqués dans les mécanismes d'exaltation de surface de l'effet Raman qui sont observés à la surface de nanoparticules métalliques ou de nanostructures métalliques fabriquées par lithographie ou à la surface de films métalliques nano-rugueux.

2.2.1.1 Illustration avec le cas d'une nanoparticule sphérique

Le cas le plus simple pour étudier ces plasmons localisés de surface et leur interaction avec la lumière est celui d'une nanoparticule métallique sphérique ou nanosphère.

En se plaçant dans l'approche quasi statique – c'est-à-dire avec une longueur d'onde d'excitation plus grande que la taille de la nanosphère – on peut considérer le champ électrique comme uniforme sur tout le volume de la nanosphère. Un dipôle est ainsi créé.

Le champ électrique à l'intérieur de la nanosphère est proportionnel au champ électrique incident E0 et peut s'écrire :

$$E_{in} = \frac{3\epsilon_M}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_M} E_0$$

ϵ_M est la constante diélectrique relative du milieu

$\epsilon(\omega)$ est la constante diélectrique relative de la nanosphère.

Pour un métal la constante diélectrique relative prend une valeur négative en dessous de la fréquence plasma liée à l'oscillation des électrons libres. On observe alors que pour $\epsilon(\omega) \approx -2\epsilon_M$, le champ électrique induit tend vers l'infini. Ainsi, à la fréquence permettant d'approcher ces conditions, la réponse optique aura la signature d'une résonance baptisée résonance plasmonique. La partie imaginaire de la constante diélectrique relative nous renseigne quant à elle sur l'intensité de cette résonance car elle décrit les pertes d'absorption. Or, pour certaines fréquences, les métaux ont des absorptions faibles $(Im(\epsilon(\omega)) \approx 0)$. Ainsi, plus faible sera la partie imaginaire de la constante diélectrique relative et plus intense sera l'exaltation locale du champ électromagnétique.

Le choix des nanoparticules se fera donc en fonction de la longueur d'onde excitatrice du laser. Pour une longueur d'onde donnée, il s'agit de trouver le matériau ayant le moins de pertes par absorption et disposant d'une résonance plasmon pour cette longueur d'onde spécifique. La figure 12 récapitule la partie réelle et la partie imaginaire des constantes diélectriques pour l'argent, le cuivre, l'or et l'aluminium en fonction de la longueur d'onde. On peut voir que le cuivre, l'argent et l'or ont dans le visible une partie réelle négative et une partie imaginaire comprise entre 1 et 10 pour le cuivre et l'or et inférieure à 1 pour l'argent. L'argent a donc les meilleures propriétés plasmoniques dans le visible. Par ailleurs, l'aluminium, qui a une partie réelle de sa constante diélectrique négative sur une plage de longueur d'onde de 200 nm à 1200 nm, n'est adapté aux applications plasmoniques que dans l'UV dans la mesure où la partie imaginaire de sa constante diélectrique est supérieure à 2 du visible à l'infrarouge.

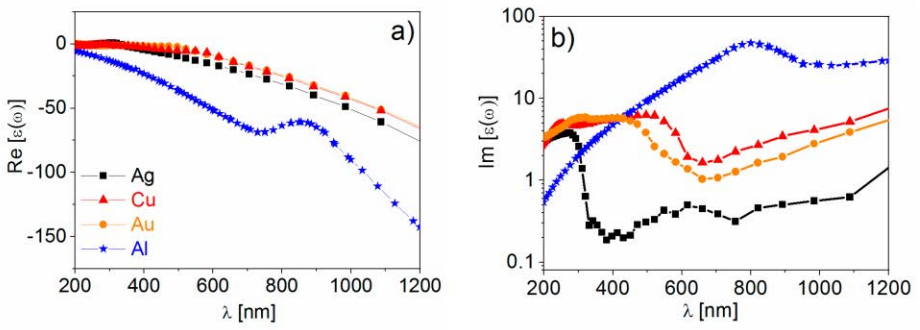


Figure 12 Partie réelle et partie imaginaire de la constante diélectrique pour les métaux habituels utilisés en plasmonique (a,b) respectivement (recopié de [44])

La nature du métal n'est pas le seul facteur qui peut influencer la résonance plasmonique ; c'est également le cas de la taille, de la morphologie et du couplage entre particules métalliques. [45]

2.2.1.2 Effet de couplage

Il est possible d'obtenir des exaltations électromagnétiques bien supérieures à ce que l'on peut obtenir en utilisant une nanoparticule unique en disposant deux nanoparticules à une distance inférieure à quelques dizaines de nanomètres. Dans ce cas le couplage des champs proches des nanoparticules développe un champ très intense au niveau de l'interstice entre les nanoparticules. La figure 13 nous permet de visualiser ce type de résonance plasmonique de surface localisée ou LSPR soit dans le cas d'une nanoparticule sphérique unique soit dans le cas de deux nanoparticules couplées distantes de 2 nm. La figure 14 présente les facteurs d'exaltation pour les deux configurations sus-présentées en fonction du diamètre des nanoparticules ainsi que de la longueur d'onde d'excitation. Ces graphiques illustrent l'importance de l'effet de couplage et de la distance inter-nanoparticules lorsque l'on cherche à obtenir des facteurs d'exaltation importants.

En effet, pour deux nanoparticules de 50 nm de diamètre distantes de 1 nanomètre, nous pouvons avoir un facteur d'exaltation de 10^{11} alors que dans le cas d'une nanoparticule isolée, le facteur d'exaltation que l'on peut espérer est de 200.

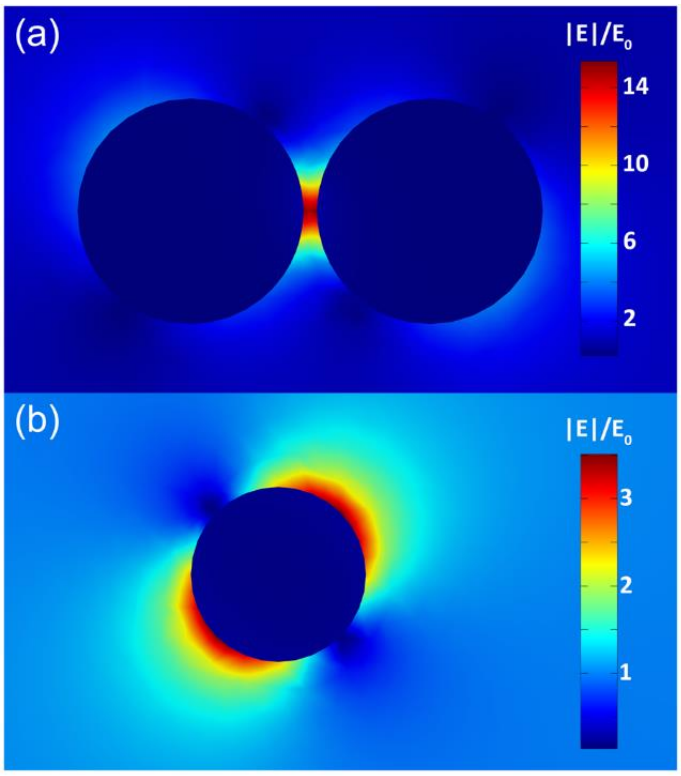


Figure 13 Modélisation de la résonance plasmonique. L'excitation incidente est un faisceau gaussien de longueur d'onde 633 nm, de diamètre 3µm, a) Pour deux nanoparticules d'argent de 50 nm de diamètre en interaction espacées de 2 nm b) Pour une particule isolée de 50 nm d'argent (extrait de [46])

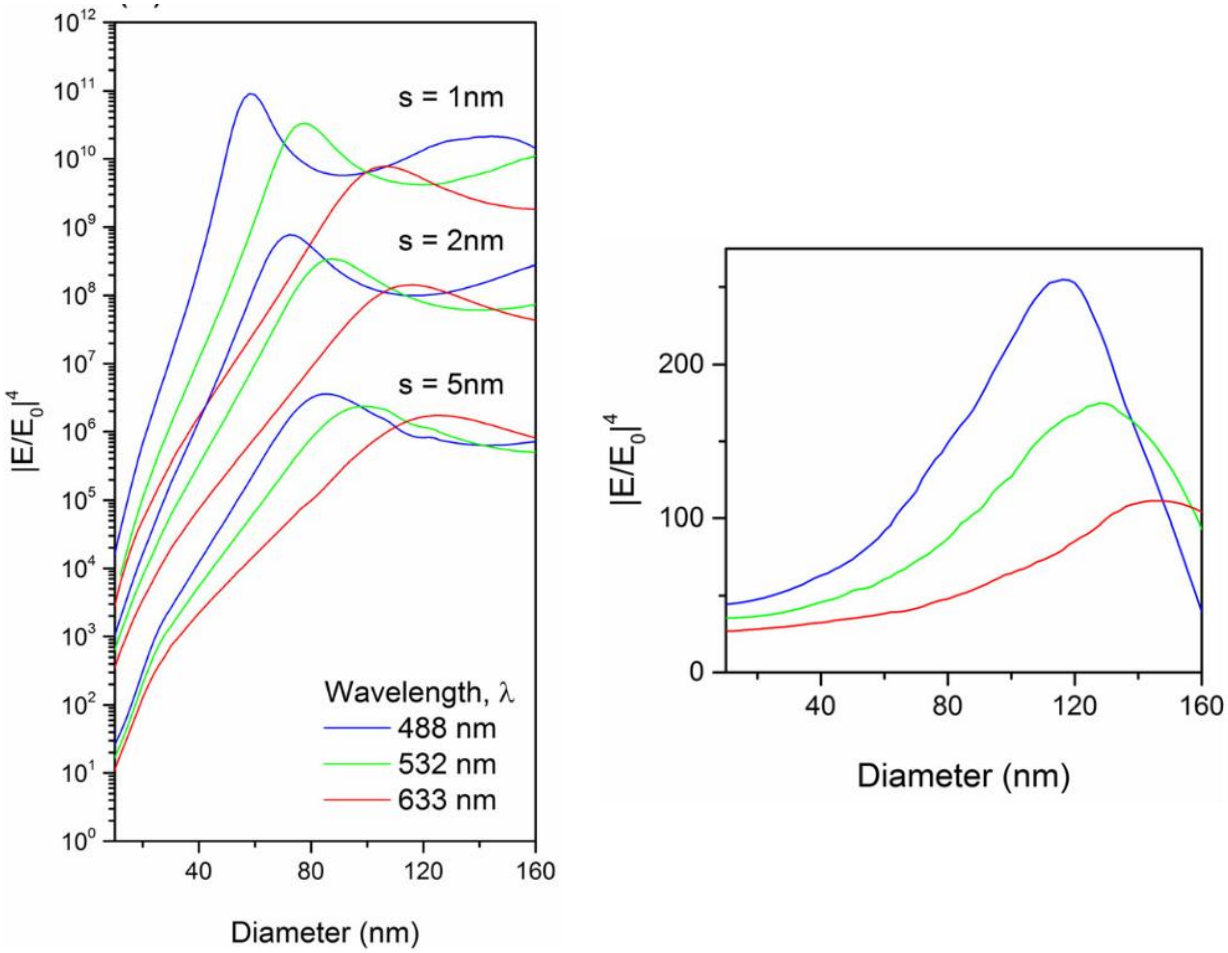


Figure 14 Modélisation du facteur d'exaltation en fonction de la longueur d'onde du laser et a) pour deux nanoparticules d'argent donc l'espacement varie, b) du diamètre d'une nanoparticule d'argent.

Il est important de souligner que l'exaltation du champ est locale. Les simulations présentées en figure 13 illustrent parfaitement cette localité. En effet, on peut remarquer que cette exaltation décroit avec la distance à la nanoparticule. Il a été montré[47] que le facteur d'exaltation du champ décroit avec la distance en ($1/d^{12}$). Aussi l'exaltation a une portée de quelques dizaines de nanomètres seulement. Dans la technique SERS cette exaltation est exploitée afin d'augmenter le signal Raman d'une vibration moléculaire, pour en tirer profit il faut donc que la molécule soit présente dans la région spatiale où le champ est exalté c'est-à-dire au voisinage immédiat de l'interstice entre les nanoparticules dans le cas du dimère soit aux pôles d'exaltation de la particule unique dans le cas 2. Cette coïncidence de la molécule et de la zone exaltée est un point très important de la technique SERS.

2.2.1.3 Effet d'antenne

Il existe aussi un effet de géométrie qui peut participer à l'exaltation du champ. Lorsqu'une surface métallique présentant des excroissances est soumise à un champ électromagnétique, la densité locale de charge est supérieure. Cet effet de pointe accentue la résonance plasmonique. Localement nous voyons apparaître à proximité des excroissances un champ électromagnétique intense sur une portée d'une dizaine de nanomètres. La morphologie de la surface métallique a donc

un impact sur l'exaltation du champ : la présence de protubérance favorise une augmentation de l'exaltation.

2.2.2 Facteur d'exaltation

2.2.2.1 Facteur d'exaltation du champ électrique local

Cette augmentation locale du champ électrique qui résulte de l'interaction entre la lumière et les nanoparticules métalliques est appelée point chaud (ou hot-spot en anglais).

Ce point chaud modifie le dipôle Raman de la façon suivante : $\mu_{induit} = \alpha_R E_{Loc}(\omega_L)$

Où $\omega_L$représente la pulsation du laser. L'énergie radiée par le dipôle $\propto |\mu_{induit}|^2$est alors exaltée par un facteur :

$$M_{Loc} = \frac{|E_{Loc}(\omega_L)|^2}{|E_{Inc}|^2}$$

E_{Loc} est l'amplitude du champ électrique à l'endroit où se situe la molécule

E_{Inc} est l'amplitude du champ électrique incident.

Ce facteur d'exaltation correspond à l'augmentation de l'intensité du champ électrique mais ne prend pas en compte les modifications de polarisation de celui-ci.

2.2.2.2 Facteur d'exaltation de radiation

Nous avons vu que l'augmentation locale du champ électrique amène le dipôle induit à radier plus d'énergie. Cependant, cette énergie n'est pas radiée dans un espace vide mais au contraire, à proximité d'une surface métallique. La radiation du dipôle Raman va donc être affectée par cette surface de deux manières.

Il peut y avoir premièrement une modification de la direction de la puissance radiée et d'autre part, la puissance totale radiée par le dipôle peut aussi être exaltée ou quenchée. Ce nouveau facteur d'exaltation va dépendre des propriétés optiques, de la géométrie de surface, de la position et de l'orientation du dipôle ainsi que de la fréquence d'émissions ω_R, il peut être noté $M_{Rad}^{d}(\omega_R)$ et il correspond à un facteur d'exaltation radiatif directionnel.

L'exaltation électromagnétique totale à l'action dans la technique SERS s'écrit :

$$SMEF \approx M_{Loc}(\omega_L) M_{Rad}^{d}(\omega_R)$$

Le facteur d'exaltation radiatif directionnel est souvent approximé par $M_{Rad}^{d}(\omega) = M_{Loc}(\omega)$

On peut ainsi résumer l'expression précédente par :

$$SMEF \approx M_{Loc}(\omega_L) M_{Loc}(\omega_R) \approx \frac{|E_{Loc}(\omega_L)|^2}{|E_{inc}|^2} \frac{|E_{Loc}(\omega_R)|^2}{|E_{inc}|^2}$$

Ainsi l'exaltation se produit à la fois à l'excitation et à l'émission ce qui résulte au final par une dépendance avec le champ électrique local à la puissance 4. Ce facteur d'exaltation peut prendre des valeurs importantes en raison de cette loi de puissance (la littérature fait état de facteurs d'exaltation allant de 10^4 à 10^{14})[48]. Notons que si la définition du facteur d'exaltation est précise, sa mesure expérimentale reste compliquée. Il devient plus simple dans ce cas de mesurer la section efficace SERS de la vibration moléculaire considérée et de considérer que cette section efficace SERS est exaltée du même facteur d'exaltation. Notons également qu'en pratique, en fonction du détail précis de la conformation de la molécule adsorbée au voisinage du point chaud, les facteurs d'exaltation observées pour une vibration moléculaire donnée sont très variables traduisant la coïncidence parfaite ou partielle de la liaison chimique sondée avec la région de maximale exaltation. Cette grande variabilité rend en pratique l'utilisation de l'intensité des pics Raman délicate à exploiter dans une perspective analytique c'est-à-dire pour déterminer une concentration moléculaire.

2.2.3 Section efficace totale SERS

Une autre manière de décrire l'effet d'exaltation Raman par la surface consiste à modifier la section efficace Raman d'un mode moléculaire de vibration donné. En modifiant cette section efficace, on augmente la probabilité d'interaction de la lumière avec la molécule et on obtient ainsi un signal plus important qui rend compte du même phénomène. La section efficace est alors affectée du même facteur d'exaltation électromagnétique total. Ainsi, la section efficace SERS différentielle détectée pour une polarisation P peut s'écrire d'après [42] :

$$\frac{d\sigma_{SERS}^{P}}{d\Omega} = \frac{\omega_R^4}{16\pi^2\epsilon_0^2 c^4} \left|\tilde{E}_{Loc}^{PW-P}(\omega_R).\hat{\alpha}.\tilde{E}_{Loc}(\omega_L)\right|^2$$

$\tilde{E}_{Loc}^{PW-P}$ est le champ électrique local normalisé, qui est solution du problème virtuel dans l'approche du théorème optique de réciprocité.

Si l'on reprend les ordres de grandeur des sections efficaces Raman 10^{-30} cm²/sr et des facteurs d'exaltation (entre 10^4 et 10^{14}), la section efficace SERS est comprise entre10^{-26} et 10^{-16} cm²/sr. Cette augmentation de la section efficace Raman permet de collecter plus de photons.

2.2.4 L'exaltation chimique

Un autre effet possiblement en jeu dans l'exaltation de l'effet Raman est un effet dit chimique qui traduit la modification du tenseur de polarisabilité Raman occasionnée par les interactions moléculaires entre la molécule sondée et les nanostructures métalliques à l'origine du point chaud. D'après Martin Moskovits[49], au lieu de parler d'exaltation chimique, il conviendrait donc davantage de parler d'un changement de nature et d'identité de l'adsorbat. Ainsi, le complexe métal-adsorbat peut donner lieu à une condition de résonance. La figure 15 décrit deux mécanismes de transfert de charges au sein d'une molécule en interaction avec une surface métallique. Dans le complexe métal-molécule, le laser peut rentrer directement en résonance avec les deux états d'énergie LUMO-HOMO (a) intrinsèques à la molécule adsorbée. Dans le cas d'une adsorption sans liaison covalente, un transfert de charge peut s'opérer indirectement à travers la particule métallique (b +c). Ces effets plus fins vont donc également affecter l'intensité Raman et donc contribuer à un facteur d'exaltation additionnel. Il convient de préciser que les facteurs d'origine chimique rapportés dans la littérature

sont au maximum de l'ordre de 100 et donc moins importants que l'exaltation d'origine électromagnétique.

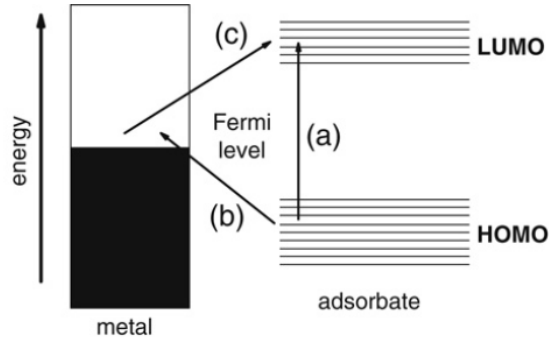


Figure 15 extrait de [42] Représentation schématique d'un mécanisme de transfert de charges, apparaissant comme une 'contribution résonante' à l'intensité SERS mesurée L'énergie laser peut être directement en résonance avec une transition électronique de la molécule {complexe métallique (cas (a)), ou peut provenir d'un couplage indirect (transfert de charges) à travers le métal ((b) + (c)).

2.2.5 Exaltation du signal Raman et du signal de fluorescence

L'augmentation locale du champ électrique permet d'exalter le signal Raman mais aussi le signal de fluorescence ou de luminescence de la molécule. On parle alors de MEF pour Metal Enhanced Fluorescence. Cette technique d'exaltation de la fluorescence a notamment été utilisée pour élaborer des tags, c'est-à-dire des nanoparticules métalliques sur lesquelles sont greffés des fluorophores. On peut donc se poser légitimement la question des paramètres du système qui vont affecter l'exaltation de l'un ou l'autre de ces signaux qui en pratique sont mesurés simultanément.

La prévalence du signal Raman ou du signal de fluorescence dans une configuration d'exaltation de surface dépend fortement de la distance entre la molécule sondée et la surface métallique, comme illustrée dans la figure 16. De manière qualitative on distingue trois régimes. Lorsque la distance est relativement grande, la section efficace de fluorescence est plus grande que la section efficace SERS (faible facteur d'exaltation) et les pics Raman sont noyés dans le signal de fluorescence (figure16 a). Pour une distance intermédiaire (Figure 16 b), le facteur d'exaltation est plus élevé et les pics Raman sont détectables et se superposent à la bande de fluorescence. Enfin, quand la distance tend vers le contact du fluorophore avec la structure métallique, il se produit un phénomène de quenching de la fluorescence alors que le signal Raman reste fortement exalté (Figure 16 c).

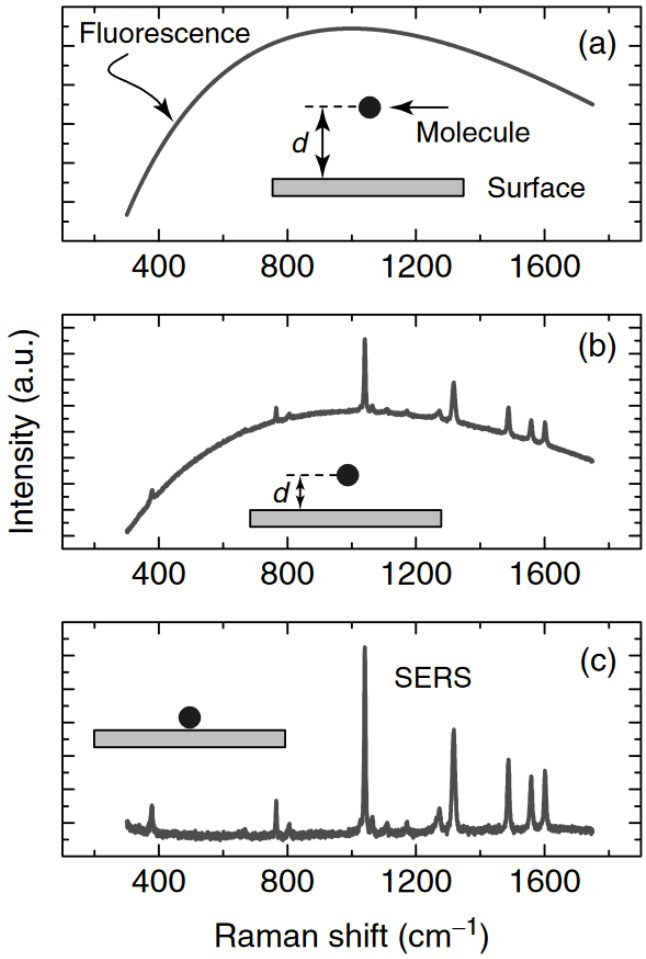


Figure 16 Représentation schématique des intensités relatives de fluorescence et de SERS pour des molécules situées à différentes distances d'une surface métallique. Nous supposons le cas d'une excitation résonante d'un colorant qui produit de la fluorescence dans des conditions normales à la longueur d'onde laser choisie. En (a), la molécule est très éloignée de la surface et la fluorescence domine. En (b), la molécule s'est rapprochée de la surface et le LFIEF (Local Field Intensity Enhancement Factor) augmente. Le SERS bénéficie d'un LFIEF plus élevé et la fluorescence (même si elle bénéficie d'un LFIEF plus élevé au niveau de l'absorption du processus) commence à subir l'extinction de l'efficacité radiative η. Dans (c), la molécule s'est encore rapprochée de la surface et la fluorescence a été éteinte, révélant ainsi le spectre SERS qui est à son efficacité maximale. Notez que cela ne signifie pas que la molécule n'est pas fluorescente, mais plutôt que l'émission est atténuée (c'est-à-dire que η domine). (extrait de [50])

Un point qui n'a pas été abordé dans cette présentation rapide du phénomène est l'impact de la polarisation de la lumière par rapport à l'orientation de la molécule et par rapport à la géométrie de la nanostructure qui exalte. Les études ont montré que les spectres SERS d'une molécule, diffèrent des spectres obtenus en spectroscopie Raman classique et notamment au niveau de leur dépendance par rapport à l'orientation vectorielle du champ excitateur c'est-à-dire en fonction de la polarisation du laser. Les intensités relatives des modes Raman observés en SERS ne reflètent plus uniquement le tenseur de polarisabilité Raman mais également la variation possible du facteur d'exaltation selon la direction vectorielle du champ. De plus, à concentration faible (proche de la molécule unique) les effets de moyennage des spectres sur plusieurs molécules disparaissent. Dès lors, c'est l'orientation moléculaire qui est sondée. On peut assister à la disparition de certains modes Raman ainsi qu'à l'apparition de nouveaux. Ces phénomènes de modification du spectre Raman sont décrits par des

règles de sélection propres à la configuration de la surface exaltatrice. Ces phénomènes propres à l'analyse en SERS la complexifient.

3 Revue de la littérature combinant surface surperhydrophobe et antennes plasmoniques

La réalisation d'une surface SERS nécessite des nanostructures métalliques. On peut distinguer deux types de surfaces SERS : les « surfaces 3D » qui correspondent par exemple à une configuration où des nanoparticules sont en suspension colloïdale au sein de la solution à analyser et les « surfaces 2D » qui correspondent à des nanostructures inscrites à la surface d'un film mince métallique.

Les suspensions colloïdales posent un problème de taille pour les applications analytiques : l'agrégation en solution[51]. En effet pour stabiliser la dispersion des particules il faut le plus souvent recouvrir leur surface par des molécules qui par répulsion électrostatique au sein de la solution vont empêcher l'agrégation des nanoparticules. Ces molécules vont donc apparaître dans les spectres Raman et peuvent masquer le signal des molécules contenues dans la solution. Nous nous intéresserons donc spécifiquement aux surfaces SERS dites 2D et plus particulièrement à celles qui sont combinées à une surface superhydrophobe.

Fugang Xu et al.[52] semblent être les premiers en 2011 à avoir l'idée de coupler surface superhydrophobe et surface SERS. Ces auteurs ont développé une surface composée de nano-tiges de ZnO sur lesquelles ils ont fait croître des grains d'argent. Ils démontrent par ailleurs que leur surface superhydrophobe produit un signal Raman trois fois plus important qu'une surface similaire mais hydrophile. La limite de détection est donnée à 1µM pour de l'adénine sur la surface superhydrophobe SERS et à 100 µM pour la surface hydrophile.

Francesco Gentile et al.[53,54] ont par la suite publié deux articles sur cette thématique en 2012. Le premier détaille un dispositif constitué de micro piliers de silicium circulaires agencés hexagonalement sur lesquels des nanopores ont été créés par anodisation du silicium dopé au bore. Une croissance de grain d'argent dans les nanopores est ensuite effectuée par réduction de nitrate d'argent. Le second reprend la même géométrie en enlevant les nanopores ; seuls les nano-grains d'argent sont déposés sur le haut des piliers. Une couche de C4F8 est ensuite déposée pour rendre la surface superhydrophobe. Une goutte contenant de la rhodamine 6G est alors évaporée sur cette structure. Une cartographie Raman de ce résidu permet de détecter la rhodamine 6G.

Les structures susmentionnées ne permettent pas de guider la goutte lors de l'évaporation. Comme décrit précédemment, Wuzou Song et al. [21], en induisant un gradient de superhydrophobie, ont réalisé une surface permettant de guider une goutte lors de l'évaporation vers le centre de la surface. L'analyse se fait en deux temps. D'abord, en évaporant une goutte contenant une suspension colloïdale d'or, les nanoparticules s'agrègent au centre de la surface. Ils évaporent ensuite une goutte contenant l'analyte d'intérêt, de la rhodamine 6G. La limite de détection pour cette surface et cette molécule est donnée à 10 fM.

Andong Wang et al. [55] ont créé une structure superhydrophobe en silicium par ablation laser femtoseconde. La technique par ablation laser permet directement de créer une structure hiérarchique, sur laquelle 60 nm d'argent sont ensuite évaporés.

La limite de détection pour une telle structure est de 0.1 fM pour de la rhodamine 6G. Le dépôt laissé par une goutte de 20 µL pour cette concentration est 0.14 mm^2.

Fangjia Chu et al.[56] présentent une surface en PTFE (polytétrafluoroéthène) qui est modifiée par gravure laser. Ce procédé permet de générer une surface hiérarchique superhydrophobe en une étape de procédé. Des zones non gravées sur la surface permettent de confiner le dépôt lors de l'évaporation. Une fois la structure définie, une première goutte de 5 µL chargée en nanoparticules d'argent est déposée sur le substrat. Trois molécules sont ensuite étudiées : la rhodamine 6G, le bleu de méthylène et la BSA (bovine serum albumin). Des gouttes de 5 µL de ces composés sont déposées sur la surface, évaporées, puis analysées en Raman. Les limites de détection atteintes sont de 10 fM pour la rhodamine 6G et le bleu de méthylène, et de 0.002 µg/mL pour la BSA.

Xiodan Ma et al. [30] transfèrent du PDMS sur un wafer en silicium par pulvérisation laser. Une seconde étape impliquant un laser est réalisée pour retirer le PDMS localement et graver le silicium. La structure finale est une structure hiérarchique hybride superhydrophobe / superhydrophile. Les nanostructures métalliques sont ajoutées aux analytes sous forme de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre. La limite de détection pour cette surface est donnée à 100 aM pour la rhodamine 6G pour une taille de dépôt final de 0.013 mm^2. Pour arriver à cette taille de dépôt, les auteurs chauffent la surface à 110 °C. En ce faisant, un film de vapeur d'eau se crée sous la goutte, permettant de la maintenir en état CB plus longtemps.

Georgii Pavliuk et al. [57] réalisent aussi une surface en PTFE en la mettant en forme à l'aide d'un faisceau laser. A la différence des autres formes de micro-structuration laser, la surface produite est constituée de micro-piliers carrés de 15 µm de côté, espacés de 95 µm avec en leur centre un pilier carré de 80 µm de côté. Cette structure de 4 mm^2 est superhydrophobe. Les auteurs utilisent ensuite un masque pochoir à travers lequel ils déposent 600 nm d'argent sur le pilier central. Cet argent est ensuite gravé à l'aide du laser pour créer les sites plasmoniques. Pour finir, ils déposent 25 nm d'or sur le pilier central en utilisant le même pochoir que précédemment. Les performances de leur dispositif sont les suivantes : évaporation de gouttes de 5µL sur une surface de 6400 $µm^2$, détection de colorants (rhodamine, DAPI) et de molécules médicamenteuses dans la gamme 10 nM à 1 pM.

Xiai Luo et al. [58] réalisent une structure similaire à celle de Geogii Pavliuk ; il s'agit d'une structure hybride superhydrophobe / superhydrophile par ablation laser mais cette fois-ci sur du cuivre. Le réseau de piliers carrés a une période de 40 µm avec des piliers de 80 µm de côté. Le pilier central fait quant à lui 100 µm de côté. Pour rendre la surface superhydrophobe, un traitement de surface est nécessaire. Du 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-Perfluorooctyltriethoxysilane est déposé par évaporation. Ce traitement de surface est ensuite retiré sur le pilier central par ablation laser.

Pour l'analyse SERS, des nanoparticules d'argent et d'or (sous forme sphérique et de nano étoiles pour ces dernières) sont ajoutées aux solutions de rhodamine 6G. La limite de détection pour cette molécule est donnée à 1 aM pour un dépôt confiné dans une zone d'environ 0.01 mm^2.

Xiangyun Guan et al [59] développent une surface presque identique à celle de Xiai Luo soit une structure hybride superhydrophobe / superhydrophile par ablation laser d'un substrat de cuivre pour réaliser des réseaux de piliers périodiques. Une modification de la tension de surface est ensuite réalisée avec de l'acide stéarique (diminution de la tension de surface ce qui va rendre la surface superhydrophobe), puis une zone hydrophile de 400 µm de diamètre est créée par ablation laser. Enfin, 30 nm d'or sont déposés par évaporation. Une limite de détection de 0.1 pM pour la rhodamine 6G confinée sur une zone de 1.25 mm^2 est démontrée.

Jian Yu et al. [60] développent une surface hybride sur du cuivre par gravure laser femtoseconde. Dans un premier temps, un micropore d'un diamètre de 300 µm est réalisé sur la surface. Un réseau de piliers carrés est ensuite créé comme précédemment. La surface est modifiée par immersion dans

de l'acide stéarique puis un anneau autour du micropore de 100 µm de largeur est gravé. Finalement, 60 nm d'argent sont déposés sur la surface par évaporation. Cette surface permet de confiner les analytes dans une région de 0.55 mm^2 autour du micropore. La limite de détection obtenue après évaporation d'une goutte de 5 µL contenante de la rhodamine 6G est de de 10 aM.

Huan Yang et al. [61] réalisent eux aussi une surface par texturation laser femtoseconde. Le substrat est de l'acier inoxydable. Après texturation, celui-ci est trempé dans une solution d'acide stéarique. Un dépôt de 60 nm d'or est ensuite effectué, suivi d'une ablation laser au centre de la surface d'un diamètre de 300µm avec comme objectif de créer une zone hydrophobe. A la fin du procédé de fabrication, une surface SERS combinant superhydrophobie et zone hydrophobe est obtenue. Une limite de détection de 10 fM est atteinte pour la rhodamine 6G confinée sur une surface de 0.7 mm^2.

Les articles susmentionnés permettent de comprendre qu'il existe plusieurs techniques pour fabriquer des dispositifs hybrides superhydrophobes / superhydrophiles. On peut distinguer deux techniques, l'une basée sur des procédés de microfabrication issus du domaine de la microélectronique avec des étapes de photolithographie, l'autre issue du domaine de l'impression avec de la gravure directe par laser. Toutes deux permettent de texturer une grande variété de substrats (silicium, cuivre, acier, polymères).

Il apparaît ensuite deux méthodes pour créer les antennes plasmoniques nécessaires à l'exaltation du signal Raman. La première consiste à évaporer – avec ou sans les analytes – une goutte d'une suspension colloïdale de nanoparticules métalliques. La seconde est le dépôt d'une couche métallique selon les procédés de microélectronique conventionnels par évaporation (physical vapor deposition ou PVD) / pulvérisation.

Par ailleurs, un point critique lors de la conception de surface SERS est la structuration des points chauds.

La figure 17 nous offre un aperçu des différents types de surfaces en fonction de l'exaltation Raman et du degré de structuration. Plus on augmente ce dernier, plus le procédé de fabrication de la surface est reproductible, mais moins le facteur d'exaltation est important sur sa totalité. Inversement, les surfaces très peu ordonnées ont un facteur d'exaltation homogène sur leur totalité mais le procédé de fabrication est moins reproductible

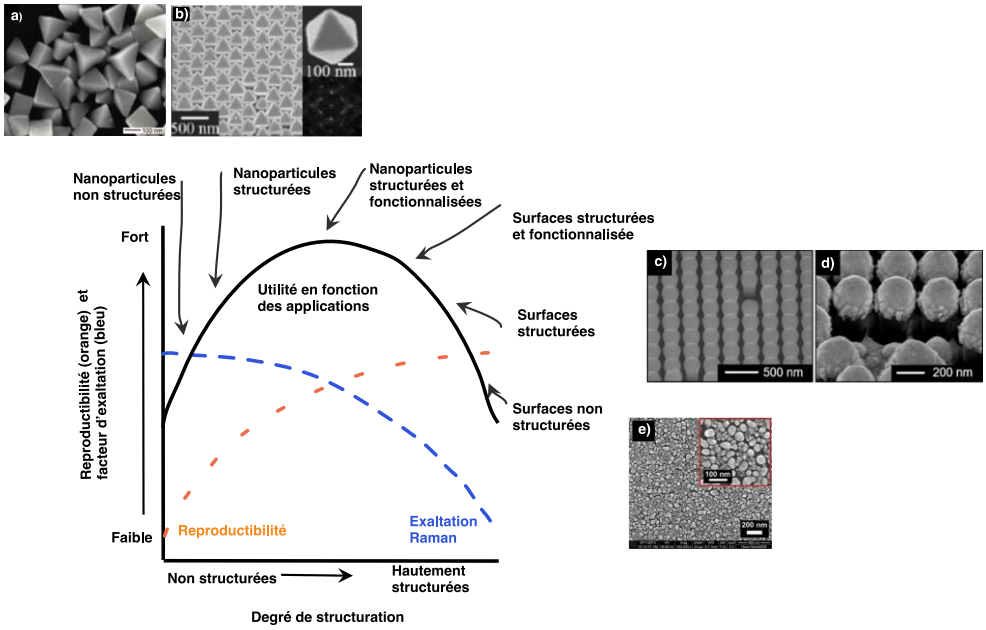


Figure 17 La reproductibilité/uniformité et l'exaltation Raman pour un grand nombre de substrats (axe Y) est corrélée au degré d'ordre (axe X). La reproductibilité/uniformité (ligne pointillée courte) augmente avec le degré de structuration ou l'ordre du substrat, tandis que l'exaltation (ligne pointillée longue) suit la tendance inverse. Pour des applications pertinentes, les substrats SERS doivent satisfaire un compromis entre le premier et le second élément. adapté de [62] a) Illustration de nanoparticules non structurées : bipyramides d'environ 75 et 150 nm de longueur d'arête [63], b) Illustration de nanoparticules structurées : monocouche de nanocrystaux octahedral d'argent préparée par la technique langmuir-blodgett [64] c,d) Illustration d'une surface structurée composée de nano piliers de silicium recouvert de silice c) sur lesquels de l'or a été déposé par évaporation d) recopié de [65], e)Illustration d'une surface non structurée, des nano ilots d'or ont été déposés par évaporation puis recuits à une température de 200°C recopié de [66].

Une façon de fabriquer une surface SERS consiste à déposer sur un substrat de silicium plan des films métalliques rugueux. La limitation de ces structures est que la densité des points chauds ainsi que le facteur d'exaltation de ceux-ci ne sont pas bien maîtrisés. Une couche métallique peut être aussi déposée sur une surface préalablement texturée.

Il existe plusieurs méthodes pour texturer une surface, notamment la lithographie électronique qui permet de concevoir des nanostructures bien définies. Cette technique permet par exemple de créer des nano-piliers de silicium qui, une fois recouverts de métal, forment des antennes plasmoniques. L'espacement entre les structures plasmoniques étant de première importance, Jianing Chen et al.[67] ont eu l'idée de créer des nano-fils qui, de par leur facteur de forme et le matériau utilisé, ont la propriété de se courber lors du séchage d'une goutte d'eau en raison des forces de capillarité. Pour ce faire, les auteurs ont disposé des nanostructures d'or par lithographie électronique. Ces nanostructures d'or, sont utilisés en épitaxie sélective afin de faire croitre des nano-fils d'InP(111)B par épitaxie en phase vapeur aux organométalliques. Les nano-fils ainsi créés ont une longueur de 2 µm pour un diamètre de 50 nm, 120 nm séparent les fils les uns des autres. Ces nano-fils sont ensuite décorés avec des nanoparticules d'or déposées sous forme d'aérosol. Lorsqu'une goutte contenant de la rhodamine est déposée sur la surface puis séchée, les nano-fils se plient à cause de capillarité les amenant plus proches les uns des autres, réalisant autant de dimères propices à une forte exaltation.

Ces surfaces composées de nano-piliers ont aussi été réalisées sur des polymères par technique de nanoimprint[68,69]. Celle-ci nécessite en amont une lithographie électronique pour créer le moule qui va permettre de fabriquer les nano-piliers dans les polymères.

La technique de lithographie électronique qui permet de concevoir des points chauds avec une dimension et une géométrie bien contrôlée présentant donc de grands facteurs d'exaltation, ne permet pas de fabriquer de grandes surfaces avec des densités de points chauds adaptées. De plus, le coût de fabrication est élevé, que ce soit en termes financier ou temporel.

Michael Stenbaek Schmidt et al.[70] ont réussi à dépasser ces difficultés et à créer une surface composée de nano-piliers de silicium capables de se courber lors de l'évaporation d'un solvant sans utiliser la lithographie électronique comme moyen de fabrication. Pour ce faire, ils ont réalisé une gravure plasma ICP-RIE (inductive coupled plasma - reactive ion etching) sans masque d'un substrat de silicium à température ambiante. En ajustant les paramètres de gravure, il est possible d'obtenir une densité superficielle de nano-piliers de $2x10^9$ / cm^2. Une couche métallique d'argent est ensuite évaporée sur la surface pour lui conférer les propriétés plasmoniques. Cette structure a ensuite été optimisée par la même équipe [71,72] et une limite de détection de 100 fM pour du trans-1,2-bis (4-pyridyl) éthylène (BPE) a été atteinte. Ces texturations du silicium par gravure ionique réactive se forment spontanément pendant le procédé et peuvent couvrir de grandes surfaces. Le temps de fabrication est réduit, il est de l'ordre de quelques minutes. Les substrats de silicium nano-texturés par ce procédé sont souvent appelées "black silicon". En effet après la gravure, pour certaines conditions expérimentales la réflectivité de la surface est fortement affectée par la nano-rugosité générée ce qui confère au substrat un aspect noir dû au piégeage de la lumière.

Yu-Luen Deng et al. [73] ont développé une surface basée sur cet effet. En réalisant une gravure plasma sans masque sur du silicium à -110°C, ils parviennent à créer une surface couverte de nano-pointes et ce jusqu'à 30 nano-pointes par μm^2. La morphologie de ces nano-pointes peut être modifiée en changeant les paramètres de gravure. Les auteurs déposent ensuite une couche d'or sur la surface précédemment réalisée. La limite de détection pour la surface créée est de 10 fM pour la rhodamine 6G. Ils démontrent également les possibilités analytiques de leur surface en faisant l'analyse Raman d'une cellule d'algue unique.

Ce tour d'horizon de la littérature nous a permis de sélectionner les techniques capables de répondre à notre problématique de recherche. Le dispositif que nous avons développé combinera des nanostructures métalliques et des surfaces superhydrophobes hiérarchiques. Notre substrat de départ sera le silicium afin de tirer profit de méthodes de fabrication bien éprouvées par la communauté des micro et nanotechnologies mais aussi des installations technologiques du LAAS-CNRS. En effet, le silicium nous permet d'utiliser les procédés de microélectronique ceux-ci sont répétables et bénéficient d'une solide connaissance issue d'années de pratique. En outre, le silicium est un matériau robuste, intégrable dans des dispositifs qui ont vocation à être spatialisés. Finalement, la production par ces techniques dispose d'une meilleure résolution et peut se faire à grande échelle.

La création de nanostructures par gravure plasma sans masque présente des avantages indéniables. Elle permet de créer des nanostructures sur l'entièreté d'un substrat de silicium en une seule étape de process et permet donc d'éviter le recours à une méthode de lithographie séquentielle et donc peu productive comme la lithographie électronique à balayage.

Nous nous projetons dans un procédé permettant de définir deux niveaux de structures : un premier micrométrique défini par lithographie optique et gravure ionique et un second constitué de nano-piliers de silicium créés par gravure sans masque (procédé dit « black silicon »). Le guidage de la goutte se fera à l'aide d'un point d'accroche hydrophile et par gradient de superhydrophobie. Un

dépôt métallique d'un film mince sera enfin nécessaire pour réaliser les points chauds au voisinage des résonances plasmoniques.

Nous allons voir maintenant comment intégrer dans un dispositif tous ces éléments.

4 Procédé technologique

L'ensemble des procédés technologiques développés pour la réalisation du dispositif ont été réalisés au sein de la salle blanche du LAAS-CNRS en très forte interaction avec les ingénieurs et techniciens du service TEAM du laboratoire.

4.1 Réalisation du dispositif combinant une surface superhydrophobe et des nanostructures métalliques

Le dispositif est réalisé sur un substrat de silicium monocristallin (001) de 4 pouces. La figure 17 représente les différentes étapes de fabrication.

La première étape consiste en une photolithographie, qui vise à transférer les motifs du masque dans une résine photosensible (figure 18a)). Pour ce faire, le wafer subit tout d'abord un plasma O_2 (5 minutes 800 W) et une induction de hexamethyldisilasane (HMDS) qui est un promoteur d'adhérence. Une résine positive (AZ ECI 300) est ensuite enduite sur le substrat. L'épaisseur de cette résine est de 1.1 µm.

Cette résine est insolée par illumination aux UV à travers le masque (aligneur optique MA6 gen 4 (dose 150 mJ/cm^2), puis recuite à 90 °C pendant 60 s. La figure 18b) schématise la structure après développement de la résine (25 s dans du MFCD-26).

L'étape 17c) correspond à l'étape de gravure et de retrait de la résine. Elle permet de transférer les motifs dans le silicium. En utilisant un procédé de gravure Bosch (Alcatel AMS4200), il est possible d'obtenir une profondeur de gravure de 6 µm en 100 s. Ce procédé combine des cycles de 2,5 s de SF_6 (250 sccm) et des cycles de 1,5 s de C_4F_8 (250 sccm) et O_2 (38 sccm). La puissance RF est de 2500 W tandis que la puissance RF pulsée est de 70 W pendant 20 ms. La température du réacteur est réglée à 10 °C et la pression à $5.10^{-2} mBar$. La résine est ensuite enlevée en trempant le wafer dans de l'acétone pendant 2 minutes puis en rinçant avec de l'eau déionisée. Un plasma O_2 (5 minutes, 800 W) est alors appliqué afin d'éliminer toute trace de résine. La figure 19a) est une image au microscope électronique à balayage (MEB) du centre de la surface après les deux premières étapes. Nous pouvons observer le piédestal central de 80 µm de diamètre, les micro-piliers de 3 µm ainsi que les lignes de guidage.

L'Alcatel AMS4200 est également utilisé pour créer les nano-piliers de silicium par un procédé dit « black silicon ». Le plasma est réalisé à 20 °C, les débits de gaz sont fixés à 38 sccm pour le SF_6 et 45 sccm pour l'O_2 et dure 5 minutes avec une puissance RF de 600 W et une puissance RF de 30 W. La pression est réglée à $10^{-2} mBar$. La figure 19b) nous montre le bord du piédestal après la gravure sans masque. Nous pouvons observer des nano-piliers présents sur toute la surface.

La surface subit ensuite un plasma d'Argon (100 W, 60 s) puis un plasma O_2 (800 W, 5minutes) pour éliminer d'éventuelles contaminations de gravure. Une couche de 100 nm d'argent est ensuite

déposée sur une couche d'accroche de Ti de 5 nm à l'aide de la machine d'évaporation thermique sous vide EVA 600. (figure 18f)).

La structure ainsi créée n'est pour l'instant pas superhydrophobe car la surface du substrat de silicium légèrement oxydé est de nature hydrophile. Comme précisé antérieurement nous souhaitons convertir l'ensemble de la surface hydrophobe excepté le piédestal central. Cette zone centrale hydrophile servira de point d'accroche lors du dépôt de la goutte à évaporer et dictera la transition du mouillage de la surface d'un mode CCA à un mode CCR. Pour ce faire, un « lift-off » de 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane (FDTS) est réalisé. L'idée est de structurer un plot de résine sur le piédestal, de réaliser le dépôt FDTS pour rendre tout le restant de la surface superhydrophobe puis de retirer la résine du piédestal. Pour cela, une couche de résine AZ499 de Microchemicals est enduite par spray-coating (système automatique de spray-coating Suss Microtec) et cuite à 90 °C pendant 2 minutes. Le MA6 gen 4 est utilisé pour exposer la résine avec une dose de 600 mJ/cm^2 à travers un nouveau masque aligné avec les motifs précédents et permettant de structurer le piédestal central. La résine est ensuite développée avec l'EVG 120. L'état de la surface est schématisé sur la figure 18h), la couche orangée représente la résine recouvrant le piédestal central.

Le FDTS est déposé en phase vapeur à l'aide de la plateforme ORBIS™ 1000 (40 °C avec une pression de chambre de 40 Torr, la durée du dépôt est de 5 minutes). Le débit de l'eau et du FDTS est réglé à 40 sccm.

La plaquette est ensuite immergée à chaud (80°C) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pendant 4 heures pour éliminer la résine. A la fin du process (schéma 13i)), le FDTS est présent sur toute la surface (en rouge sur l'image) sauf sur le piédestal. En observant la structure au microscope électronique à balayage (MEB) (figure 19c)), nous pouvons observer des nano-piliers de silicium recouvert d'argent. Les nano-piliers forment des paquets : ils se sont pliés lors du retrait de la résine. Leur rapprochement sommital est propice à la génération de points chauds intenses. La couche moléculaire de FDTS ne peut pas être visualisée au MEB.

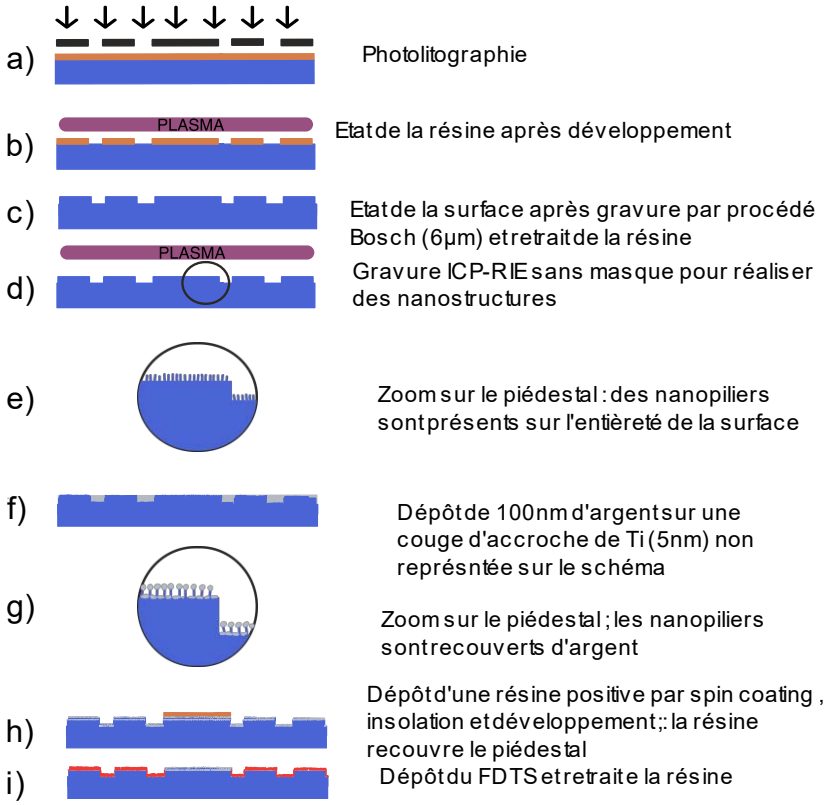


Figure 18 Schéma de principe du procédé salle blanche permettant de réaliser un dispositif combinant nanostructures et surface superhydrophobe

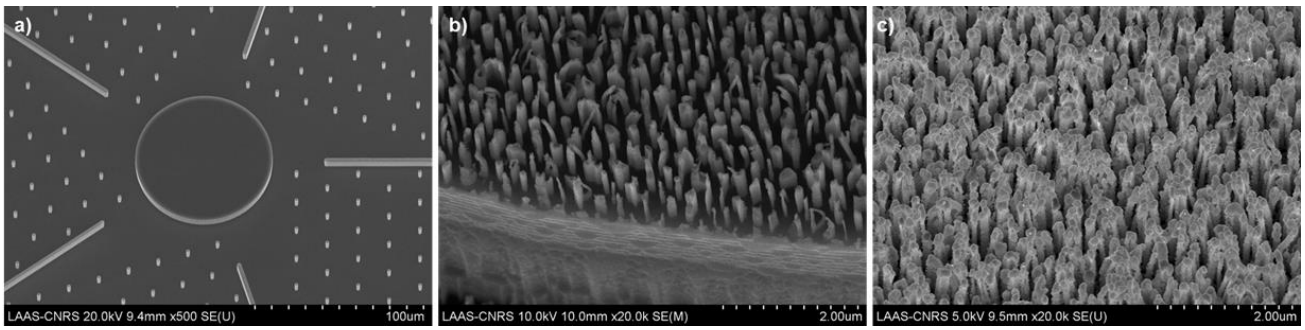


Figure 19 Images en microscopie électronique à balayage. a) Image inclinée à 30° et grossie x500 du centre de la surface après la première étape de gravure et le retrait de la résine. Sur cette image, le piédestal, les lignes de guidage, les micro piliers sont observables. b) Focus sur le piédestal après la gravure plasma sans masque. Le bord du piédestal et les nano piliers verticaux présents sur l'entièreté du piédestal sont observables. c) Image du piédestal après la dernière étape du process ; les nano piliers recouverts d'argent formant des paquets sont visibles.

4.2 Conception du masque

Une étape fondamentale à tout procédé technologique de microélectronique est la conception d'un masque. Celui-ci permet de transférer les motifs qu'il contient dans la matière. Le masque développé correspond à notre premier niveau de structure de la surface superhydrophobe.

La figure 20 représente un détail du masque produit par CAO. Le diamètre de la cellule élémentaire représentée ici est de 3 mm. Il est constitué de plusieurs éléments. Au centre de la surface se trouve un disque de 80 µm de diamètre, ce cercle définira dans notre dispositif la zone centrale hydrophile sur laquelle vont se concentrer tous les éléments à analyser. Celui-ci est entouré de 5 lignes de guidage qui présentent un angle de 72° entre elles. Au milieu de la surface, des disques de 3 µm de diamètre sont disposés en conformation hexagonale et répliqués de manière radiale tout autour du cercle central. Ces disques définiront les micro-piliers de la surface. La période entre ces disques est de 15 µm. Le choix de ces dimensions est issu d'une recherche d'optimisation basée sur le travail déjà décrit de Song. En faisant varier les paramètres qui concernent les dimensions d'espacement entre les micro piliers ainsi que le nombre de lignes de guidage, nous avons conclu que les dimensions susprésentées étaient les plus performantes tant pour le dépôt de la goutte que pour son guidage lors de l'évaporation.

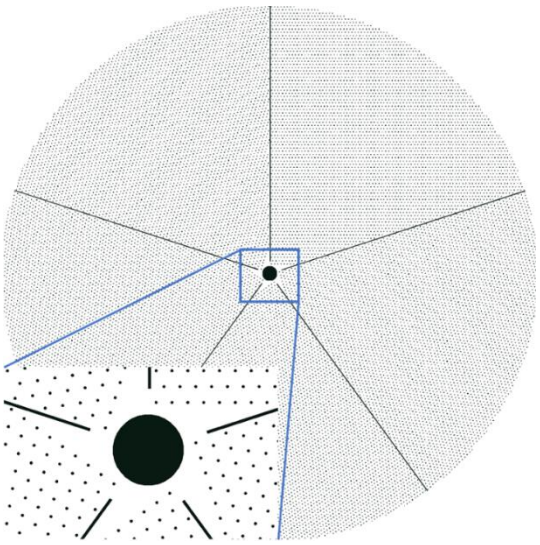


Figure 20 Image extraite du logiciel de CAO CleWin. Focus sur un dispositif qui est répliqué à l'identique 300 fois sur le masque. Le dispositif présente une forme circulaire de 3mm de diamètre. Nous pouvons observer le piédestal central ainsi que les ligne de guidage et les micro piliers. Un zoom sur le centre de la surface permet d'observer la conformation des micro piliers avec le piédestal.

4.3 Caractérisation morphologique de la surface des dispositifs

Le procédé technologique permettant de réaliser le dispositif SH-SERS est établi. Nous allons maintenant caractériser la morphologie de la surface du dispositif.

4.3.1 Caractérisation visuelle

La figure 21 représente un wafer à différentes étapes du procédé technologique. En 19a) nous observons le wafer après le premier niveau de structuration. On distingue des zones correspondant aux dispositifs. En 21b), la photographie nous montre le wafer après l'étape de gravure sans masque. Le wafer obtenu après cette étape de gravure n'est pas noir mais plutôt marron, ce qui peut s'expliquer par une densité ainsi qu'une morphologie de piliers qui ne lui permet pas d'absorber la totalité du spectre visible. Enfin la figure 21c) nous montre le wafer à la fin du process après le dépôt d'argent et le lift-off.

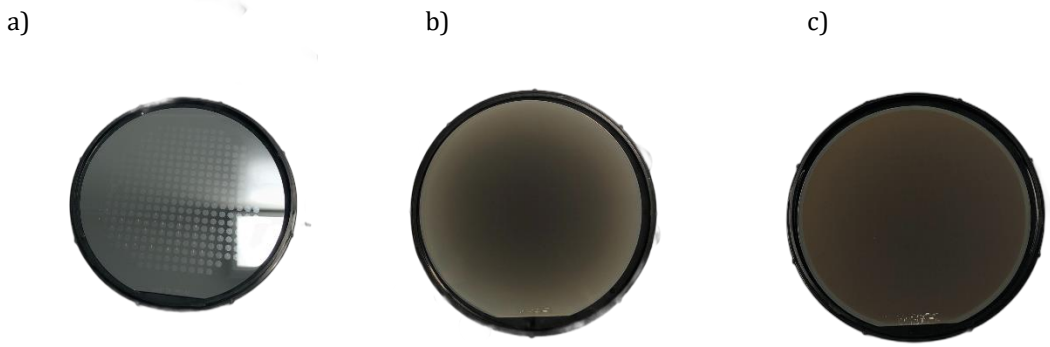


Figure 21 Photographies d'un wafer de 4 pouces aprèsles différentes étapes du procédé. a) après la gravure Bosch, b) après la gravure RIE sans masque, c) après le dépôt d'argent et les dernières étapes du procédé (wafer fini)

Pour caractériser de manière approfondie la morphologie de la surface, l'utilisation d'un microscope électronique à balayage est nécessaire.

4.3.2 Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour cette étude un wafer où seul les nano-piliers de silicium créés par gravure ICP – RIE sans masque a été réalisé. La figure 22 montre la surface du wafer après une gravure sans masque d'une durée de 5 minutes. Ces images ont été réalisées à 5 mm d'intervalle suivant l'axe x. On peut observer le phénomène suivant : plus on se déplace vers le bord du wafer, moins la densité de piliers semble importante. Cette observation est caractérisée en figure 24.

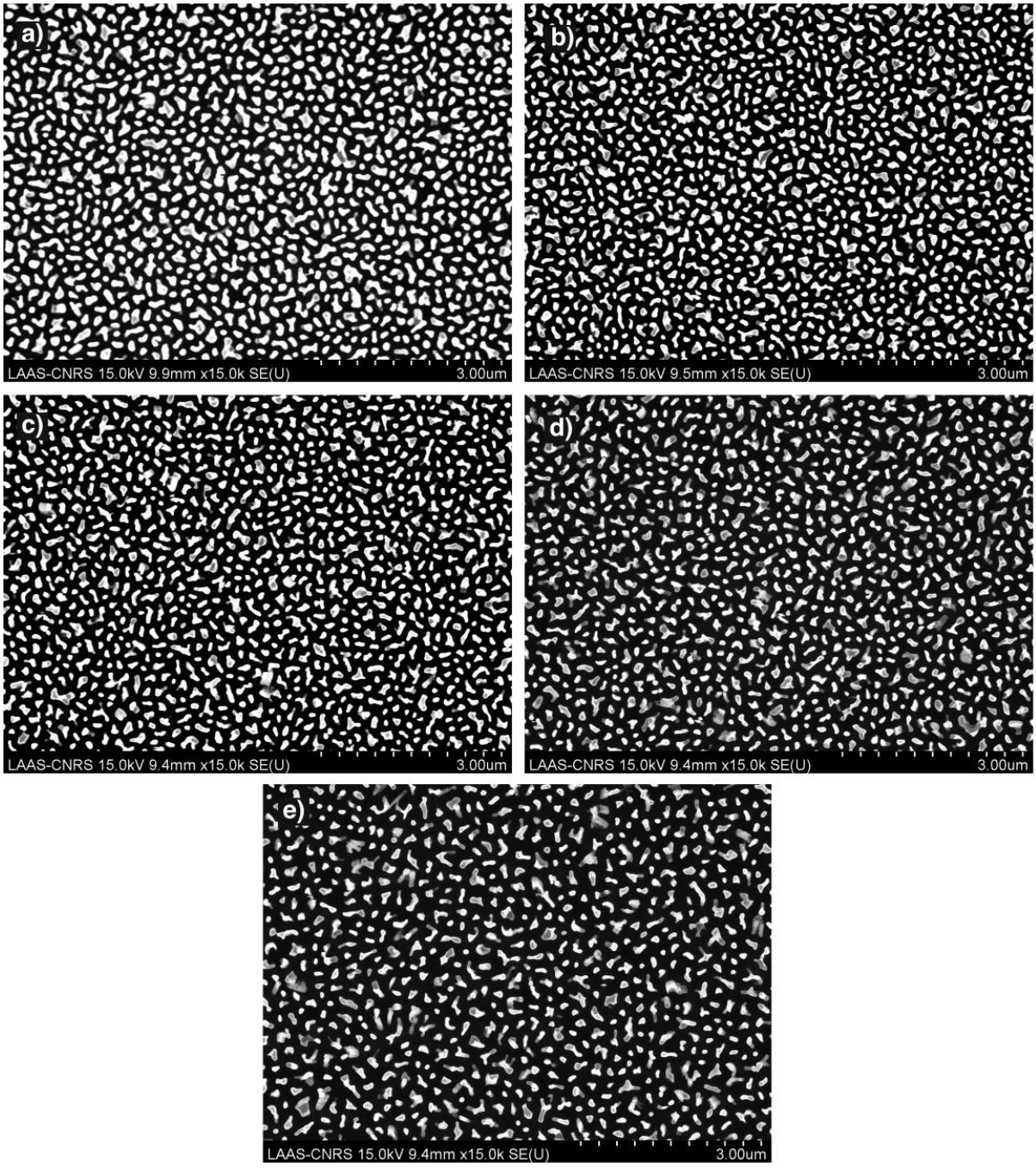


Figure 22 Image MEB de la morphologie du silicium noir en fonction de la position sur le wafer. a) x = 0 mm, b) x = 10 mm, c) x = 20 mm, d x = 30 mm, e) x = 40 mm

La figure 23 nous montre la morphologie des piliers selon l'axe x en ayant incliné le wafer de 30°. Nous observons des piliers verticaux, ce qui confirme le caractère anisotrope de la gravure.

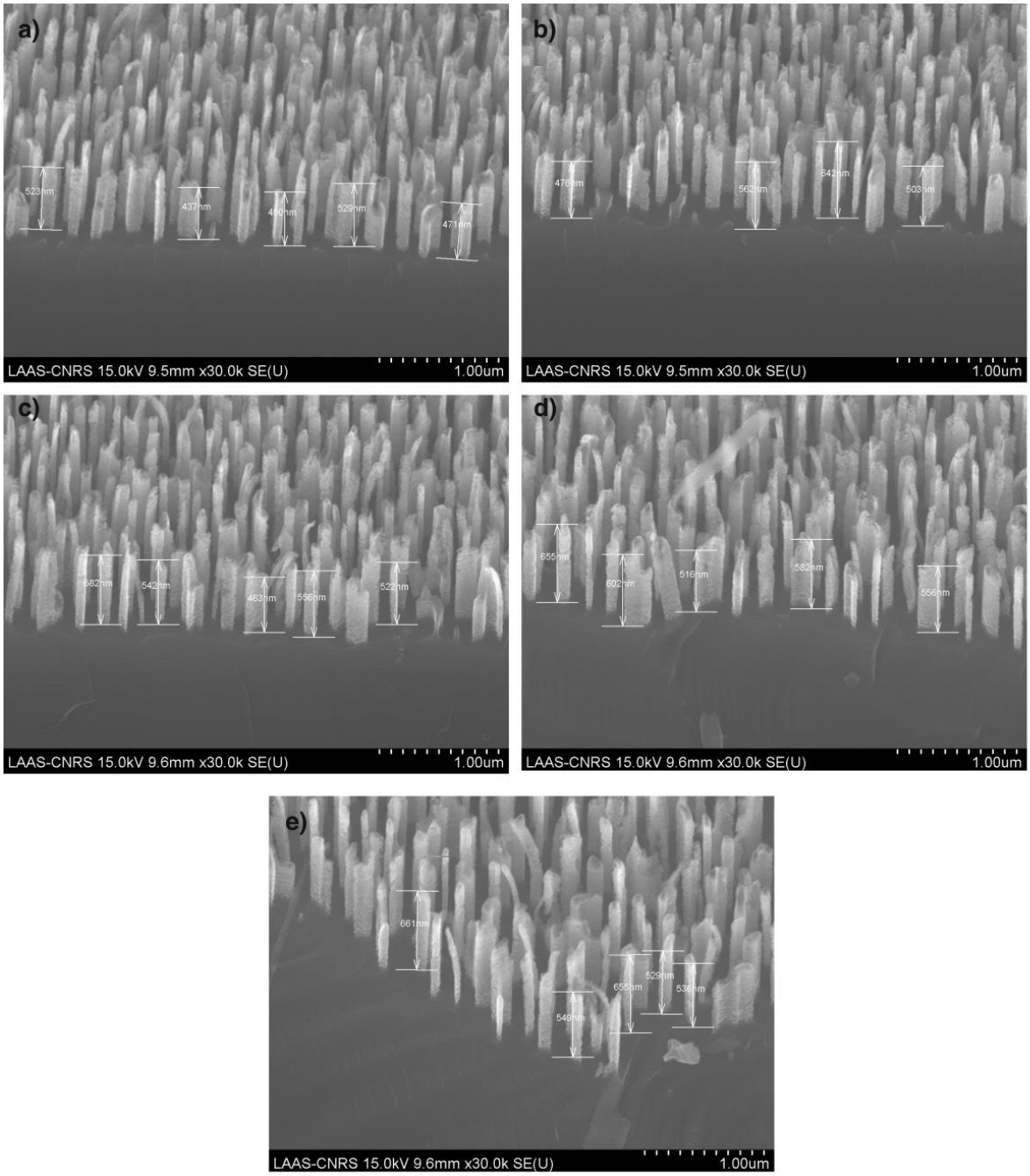


Figure 23 Image MEB de la morphologie du silicium noir en fonction de la position sur le wafer incliné à 30°. a) x = 0 mm, b) x = 10 mm, c) x = 20 mm, d x = 30 mm, e) x = 40 mm

4.3.2.1 Traitement d'image

Le logiciel de traitement d'image *imageJ* nous permet de déterminer pour chaque image, la superficie des piliers et leur position. A partir de ces données, nous pouvons mesurer la densité de piliers par μm^2.

La figure 24 représente la variation de la densité de piliers et de la hauteur moyenne en fonction de la position en x sur le wafer. Nous pouvons observer deux tendances. La première est la décroissance de la densité de piliers lorsque l'on se rapproche des bords du wafer, ce qui confirme la caractérisation visuelle que l'on peut faire grâce aux images MEB. La seconde est le fait que plus on se rapproche du bord du wafer, plus les piliers ont une hauteur importante.

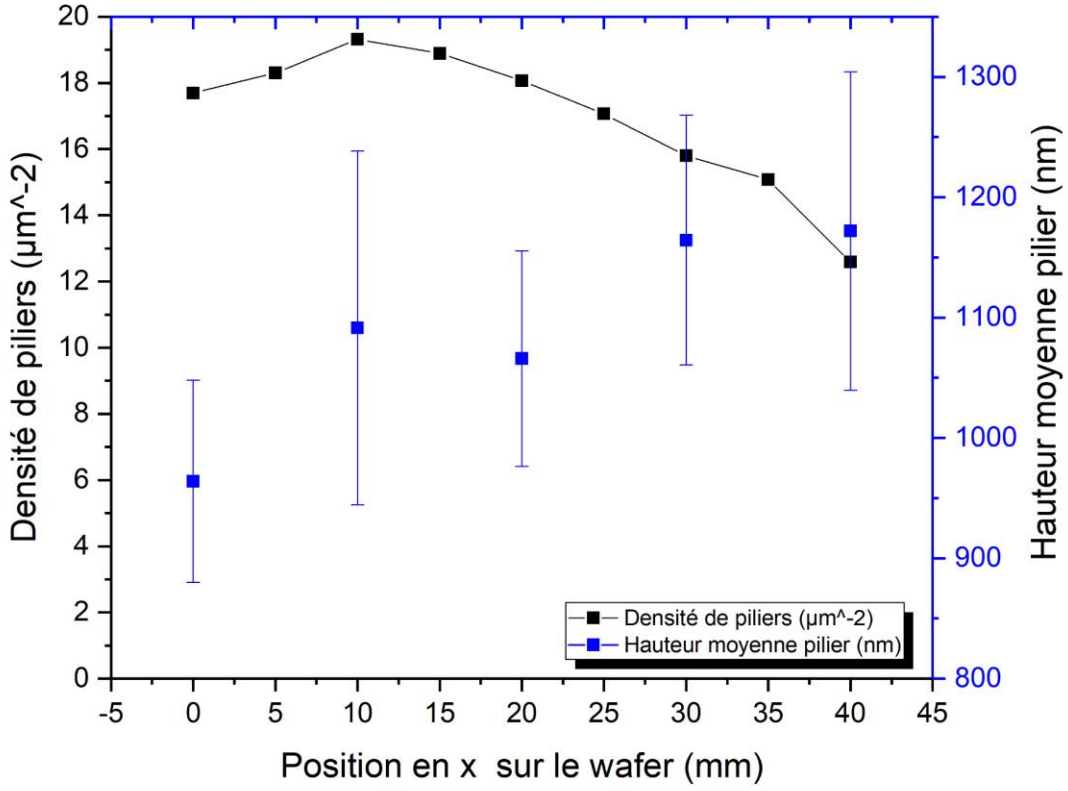


Figure 24 Variation de la densité de piliers et de la hauteur moyenne des piliers en fonction de la position en x sur le wafer.

Ces observations peuvent s'expliquer par le procédé de gravure. Dans un procédé de gravure sèche RIE, en fonction des paramètres de la machine, le plasma peut ne pas être homogène sur toute la superficie du wafer notamment lorsque l'on travaille avec des débits de gaz et une faible pression. En effet, dans une telle situation, le plasma est plus dense au centre du wafer que sur les bords[74]. Dans de telles conditions, la gravure est plus rapide sur les bords du wafer qu'au centre. Dès lors, la taille des piliers est plus importante sur les bords du wafer qu'au centre. L'inhomogénéité du plasma a aussi une influence sur la densité des piliers.

La fonction « suivi de particules » (Particles Tracking) nous permet aussi d'obtenir l'aire des nano-piliers. La figure 25a) représente l'histogramme de la superficie des piliers pour la surface en x = 0 mm. Une autre donnée recueillie est la position du centre de chaque pilier. A partir de ces informations et en prenant comme hypothèse que les piliers sont dans une formation hexagonale (soit 6 voisins pour chaque pilier), il est possible de déterminer une distance inter nano-piliers. En effet, en utilisant un algorithme dit des « k plus proches voisins » (k-nearest neighbors), il est possible de déterminer les distances entre chaque pilier et ses 6 voisins les plus proches. La figure 25b) représente l'histogramme des distances moyennes inter piliers pour la surface en x = 0 mm.

En ajustant une gaussienne à nos données, il est possible d'établir les propriétés moyennes de la surface :

- Surface moyenne d'un nano-pilier : 17 850 nm^2 soit un diamètre de 150 nm environ
- Distance moyenne inter nano-piliers : 256 nm.

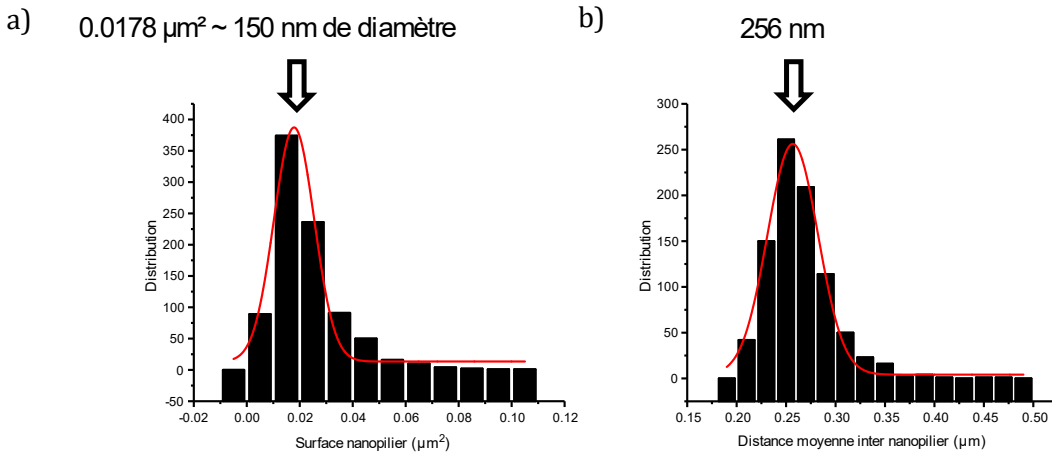


Figure 25 a) Histogramme et fit gaussien de la surface des nano-piliers en x = 0 mm b) distance moyenne inter piliers en x = 0 mm

4.3.2.2 Vérification des résultats

Nous avons pris comme hypothèse une formation hexagonale des piliers qui, de surcroît, sont circulaires. La superficie d'une maille est donc $S = \frac{3\sqrt{3}}{3} d^2$ avec d la distance inter nano-piliers. $S = 170267.54\ nm^2$

Or, dans une maille, nous avons 3 piliers, ce qui nous donne une densité de 17,62 piliers par µm². Ce résultat est cohérent avec la densité de piliers que l'on a mesurée avec ImageJ en $x = 0\ mm$ à savoir 17,69 piliers par µm².

4.3.3 Du silicium noir à la surface SERS : dépôt métallique

Le silicium noir seul ne peut pas exalter le signal ; pour créer des antennes plasmoniques, il faut déposer sur la surface une couche de métal non continue. Aussi, trois dépôts d'argent d'épaisseur 30 nm, 100 nm et 200 nm ont été effectués par évaporation dans le but de déterminer l'épaisseur d'argent permettant d'obtenir l'exaltation optimale, c'est-à-dire la surface SERS présentant la plus grande densité de points chauds. Ces trois épaisseurs d'argent ainsi que le mode de dépôt permettent d'obtenir, comme nous le verrons par la suite, des films métalliques discontinus. Le dépôt d'argent se fait sur une couche d'accroche de titane de 5 nm pour une meilleure adhérence de l'argent.

Les figures 26, 27 et 28 donnent des aperçus des dépôts d'argent sur le silicium noir selon l'épaisseur. On peut observer les nano-piliers sur lesquels repose un dôme d'argent. Plus l'épaisseur déposée d'argent est importante, plus le dôme est volumineux. Il est par ailleurs intéressant de noter qu'avec les épaisseurs de métal déposé nous n'avons pas réalisé de film continu, ce qui aurait été critique : nous n'aurions plus eu de plasmons localisés de surface.

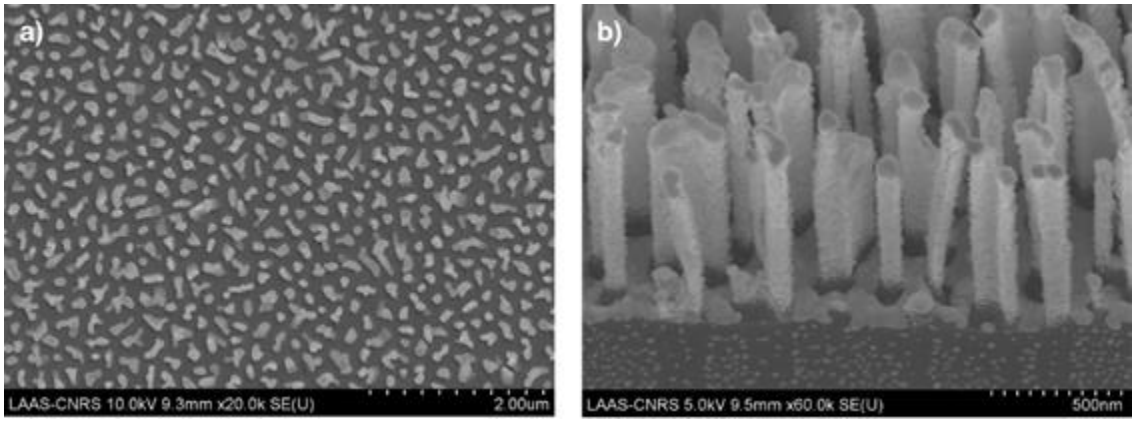


Figure 26 Images MEB du silicium noir après dépôt d'une couche d'Ag de 30 nm sur une couche d'accroche de Ti 5nm a) vue du dessus, b) vue inclinée à 30°

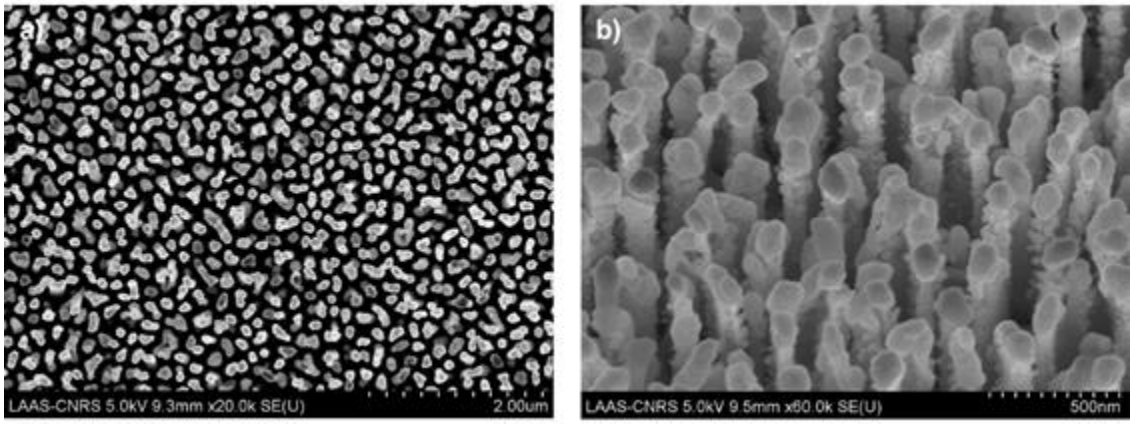


Figure 27 Images MEB du silicium noir après dépôt d'une couche d'Ag de 100 nm sur une couche d'accroche de Ti 5nm a) vue du dessus, b) vue inclinée à 30°

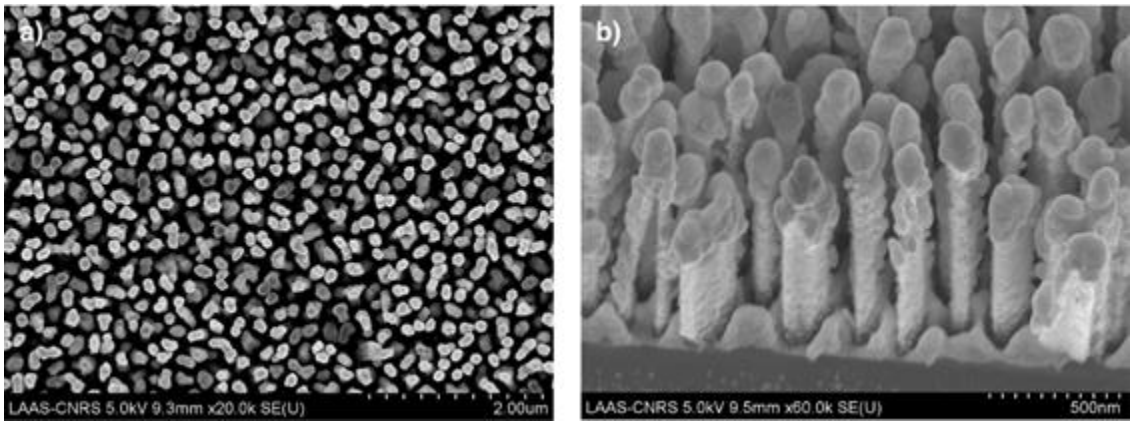


Figure 28 Images MEB du silicium noir après dépôt d'une couche d'Ag de 2000 nm sur une couche d'accroche de Ti 5nm a) vue du dessus, b) vue inclinée à 30°

Après évaporation d'une goutte d'eau « de salle blanche »[1], nous pouvons observer sur les figures 29, 30, 31 et 32, que les piliers se sont courbés, se rapprochant les uns des autres. Malgré un module de Young proche de 160 GPa pour le silicium[75], le rapport de forme des structures créées (≈ 6) fait que les forces de capillarité lors du séchage de la surface les ont courbés, ramenant les nanoparticules en contact les unes avec les autres.

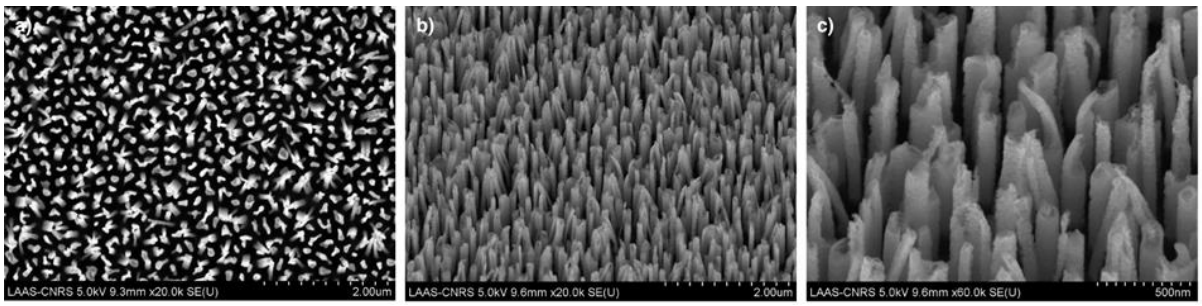


Figure 29 Images MEB du silicium noir après évaporation d'une goutte d'eau dé-ionisée a) vue du dessus, b) vue inclinée à 30°, grossissement x20k, c) vue inclinée à 30°, grossissement x60k

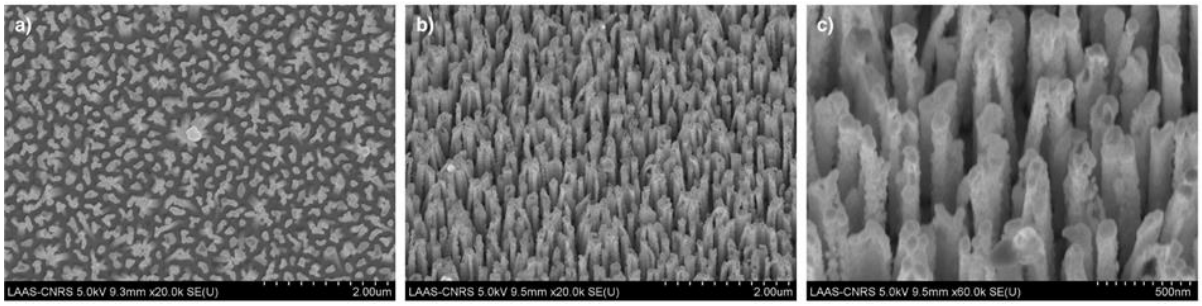


Figure 30 Images MEB du silicium noir après dépôt d'une couche d'Ag de 30 nm sur une couche d'accroche de Ti 5nm et après évaporation d'une goutte d'eau dé-ionisée a) vue du dessus, b) vue inclinée à 30°, grossissement x20k, c) vue inclinée à 30°, grossissement x60k

[1]L'eau de salle blanche issue des installations du LAAS-CNRS est une eau produite pas le système « Veolia Ultrapure water Treatment solution » qui peut être qualifiée d'ultra pure (*TOC<1ppb, Resistivity to 18.2 mega ohm, Boron<5ppt, Silica<0.5ppb, particle 0.05M<300c/l).*

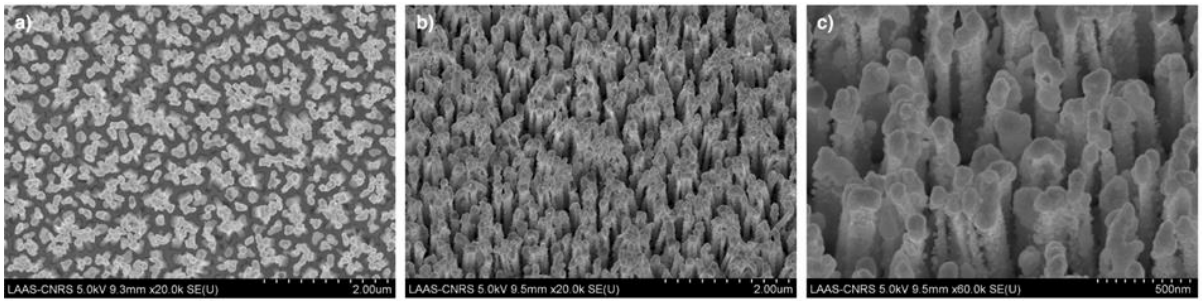


Figure 31 Images MEB du silicium noir après dépôt d'une couche d'Ag de 100 nm sur une couche d'accroche de Ti 5nm et après évaporation d'une goutte d'eau dé-ionisée a) vue du dessus, b) vue inclinée à 30°, grossissement x20k, c) vue inclinée à 30°, grossissement x60k

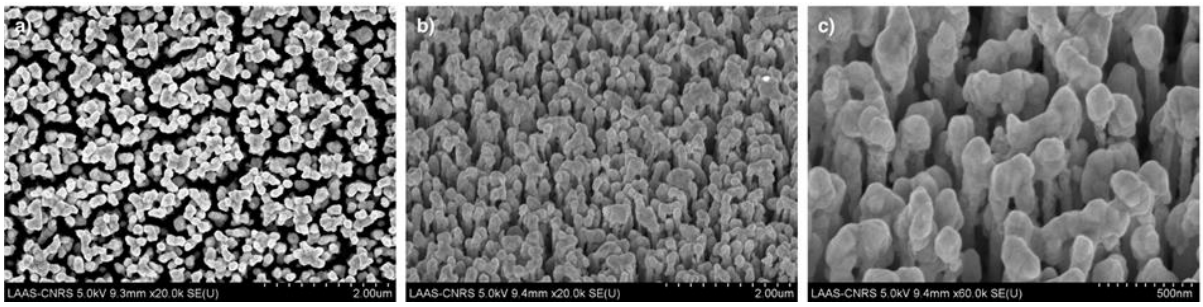


Figure 32 Images MEB du silicium noir après dépôt d'une couche d'Ag de 200 nm sur une couche d'accroche de Ti 5nm et après évaporation d'une goutte d'eau dé-ionisée a) vue du dessus, b) vue inclinée à 30°, grossissement x20k , c) vue inclinée à 30°, grossissement x60k

Par analyse de ces images via le logiciel ImageJ, il est possible de déterminer le nombre moyen de piliers avant l'évaporation ainsi que le nombre de paquets après celle-ci (Figure 33). On appellera paquet un regroupement de piliers dû à l'évaporation d'une goutte d'eau.

Type de surface	***Densité de piliers par*** μm^2
BSi-Ti5nm-Ag-30nm	17.4
BSi-Ti5nm-Ag-100nm	17.4
BSi-Ti5nm-Ag-200nm	11.6
BSi-Ti5nm-Ag-30nm-post évaporation	11.1
BSi-Ti5nm-Ag-100nm-post évaporation	6.5
BSi-Ti5nm-Ag-200nm-post évaporation	4.4

Figure 33 Densité de piliers par μm^2 en fonction du type de surface étudiée

La densité de piliers est similaire pour les surfaces ayant une couche de 30 et de 100 nm d'argent avant évaporation. Elle est inférieure pour la surface ayant une couche de 200 nm d'argent avant évaporation, ce qui peut s'expliquer par deux facteurs :

- Lorsque l'on fait l'analyse de l'image sous ImageJ, un seuil de détection est fixé. Celui-ci conditionne la reconnaissance des "particules" ; son paramétrage peut mener à une erreur sur l'analyse par la suite.
- Des grains d'argent ont pu coalescer, amenant des nano-piliers à fusionner.

Après évaporation, et ce quelle que soit la surface, nous observons une diminution de la densité des nano-piliers. On devrait à proprement parler d'une « paquétisation » : les nano-piliers se sont regroupés dans des « clusters ». Il faudrait dès lors parler d'une densité de paquets. Par ailleurs, on peut évaluer le nombre de nano-piliers moyen par paquet (Figure 34).

Type de surface	***Surface moyenne nano-pilier avant évaporation (μm^2)***	***Surface moyenne nano-pilier après évaporation (μm^2)***	***Nombre nano-piliers par paquet***
BSi-Ti5nm-Ag-30nm	0.022	0.041	1.86
BSi-Ti5nm-Ag-100nm	0.031	0.079	2.55
BSi-Ti5nm-Ag-200nm	0.049	0.133	2.71

Figure 34 Analyse de la surface des nano-piliers avant et après évaporation

Plus on augmente l'épaisseur du dépôt d'argent, plus nos paquets ont une superficie importante avec un nombre de nano-piliers important. Par ailleurs, la distance moyenne inter nano-piliers avant et après évaporation est aussi accessible. Les histogrammes présentés dans la figure 35 nous montrent la dispersion de la distance moyenne inter nano-piliers avant et après évaporation. Il convient de rappeler qu'après évaporation la distance mesurée est une distance entre les paquets de nano-piliers.

Dans le cas du silicium noir avec 30 nm d'argent, nous avons une distance moyenne inter nano-piliers de 266 nm avant évaporation et une distance entre les paquets de nano-piliers de 323 nm après évaporation. Pour ce qui du silicium noir avec un revêtement de 100 nm d'argent, elle est de 264 nm avant évaporation et de 414 nm après. Enfin, le silicium noir pourvu d'un revêtement de 200 nm d'argent dispose d'une distance moyenne inter nano-piliers de 324 nm avant évaporation et de 437 nm après évaporation.

En se courbant lors du séchage, certains nano-piliers se rapprochent tandis que d'autres s'éloignent. Ainsi la distance entre les paquets de nano-piliers augmentent.

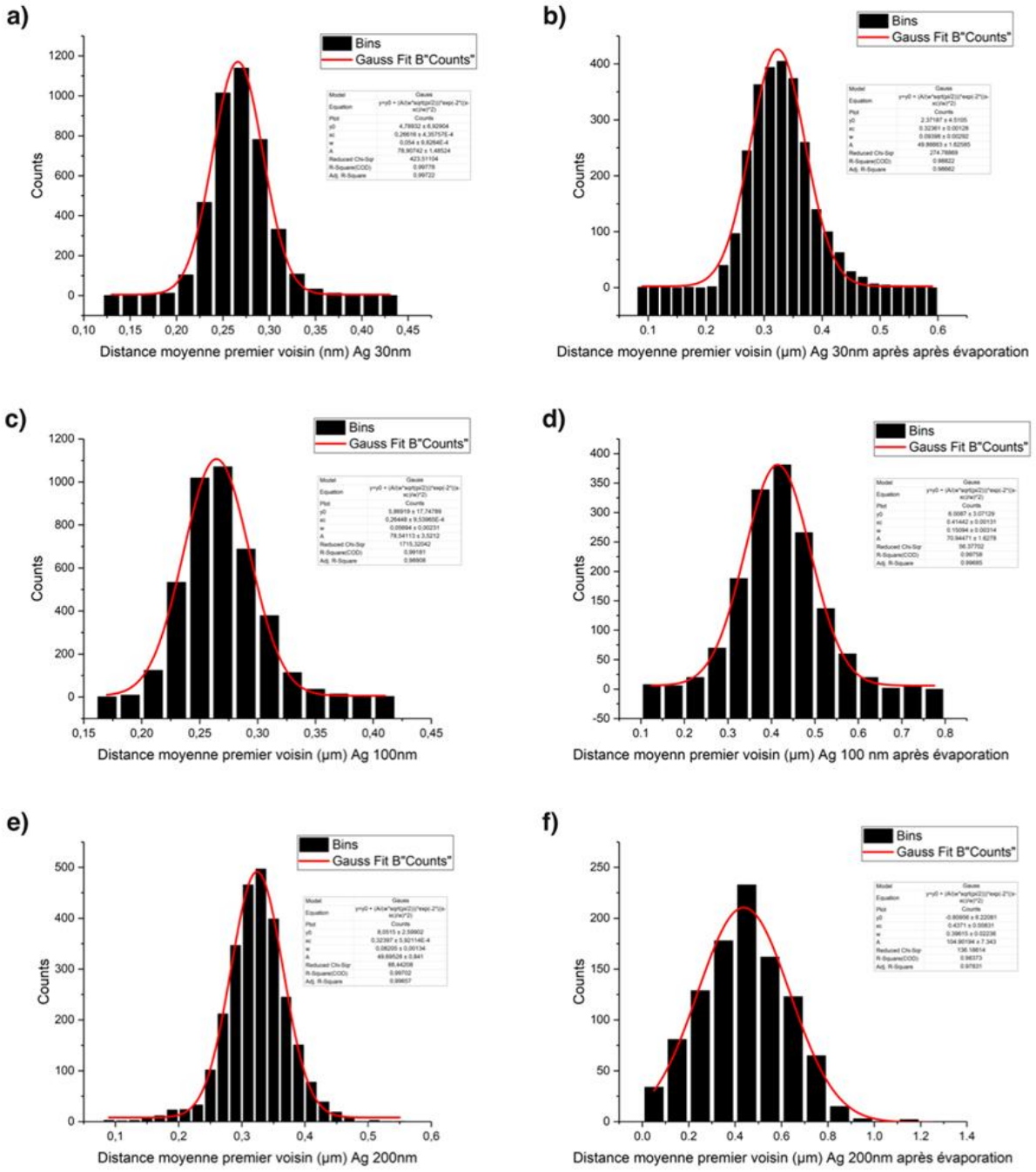


Figure 35 Histogrammes et fit gaussien de la distance moyenne au premier voisin avant et après l'évaporation de la goutte d'eau déionisée pour les épaisseurs 30 nm a,b), 100 nm c,d) et 200n m e,f). On constate une augmentation de la moyenne après séchage, ce qui s'explique par la création de paquets de nano-piliers s'éloignant les uns des autres.

Le choix de l'épaisseur d'argent est dicté par ce que l'on sait de la résonance plasmonique : le couplage entre les nanoparticules est primordial pour avoir des points chauds avec un grand facteur d'exaltation. Aussi, dans le cadre de notre application, nous recherchons une grande densité de points chauds pour augmenter les probabilités de rencontre d'une molécule avec un point chaud. L'épaisseur d'argent retenue est de 100 nm, qui est un compromis entre la densité de clusters et le nombre de nano-piliers par cluster.

5 Discussion autour du procédé de fabrication mis au point

5.1 L'aspect superhydrophobe de la surface

Nous avons vu qu'il existait un grand nombre de méthodes pour réaliser des surfaces SERS ayant des propriétés de concentration des analytes. Parmi celles-ci, quelques-unes permettent de localiser le dépôt en fin d'évaporation. Cet aspect de localisation est primordial. En effet, dans une optique de télémesure avec un souci d'automatisation pour se passer d'un opérateur, il convient de pouvoir prédire la position du dépôt. Pour une goutte de solution initiale de 6 µL occupant une aire de contact initiale de dimension millimétrique on peut estimer que le piédestal présente une surface 1400 fois plus petite que la surface de la zone de contact, on peut estimer que si au final tous les éléments non volatiles de la goutte se concentrent sur le piédestal on aura à sonder analytiquement en SERS uniquement le piédestal au lieu de l'entièreté de la surface, ainsi la durée de l'analyse est 1400 fois plus rapide.

Le dispositif présenté résulte d'un travail d'optimisation de précédents dispositifs qui se basaient eux-mêmes sur l'article de Song et al. [29]. Nous avons testé les dispositifs suivants :

- Micro-piliers circulaires espacés de bord à bord de 15 µm, disposés de manière hexagonale, avec un piédestal (80 µm de diamètre) central et 24 lignes de guidage
- Micro-piliers circulaires espacés de bord à bord de 20 µm, disposés de manière hexagonale, avec un piédestal (80 µm de diamètre) central et 24 lignes de guidage
- Micro-piliers circulaires espacés de bord à bord de 15 µm, disposés de manière hexagonale, avec une symétrie radiale autour du piédestal (80 µm de diamètre) central et 30 lignes de guidage
- Micro-piliers circulaires espacés de bord à bord de 15 µm, disposés de manière hexagonale, avec une symétrie radiale autour du piédestal (80 µm de diamètre) central
- Micro-piliers circulaires espacés de bord à bord de 20 µm, disposés de manière hexagonale, avec une symétrie radiale autour du piédestal (80 µm de diamètre) central et 30 lignes de guidage
- Micro-piliers circulaires espacés de bord à bord de 20 µm, disposés de manière hexagonale, avec une symétrie radiale autour du piédestal (80 µm de diamètre) central

Les premières études de guidage avec les dispositifs susmentionnés nous ont permis de constater qu'il était possible de guider une goutte sans les lignes de guidages, en utilisant simplement des propriétés de symétrie radiale mais non sans inconvénient. En effet, les lignes de guidage facilitent le dépôt de la goutte.

En contrepartie ces dernières favorisent une transition d'état en mode Wenzel lors de l'évaporation. En effet, plus il y a de lignes de guidage et plus la fraction solide de la surface proche du piédestal devient importante. Lorsque la fraction solide de la surface est importante, la goutte est en

contact avec plus de surface que de poches d'air favorisant un mode Wenzel. Un troisième point mis en évidence est que l'espacement entre les piliers a une influence sur l'angle de contact mais aussi sur l'évaporation (à hauteur de dispositif constante de 6µm). L'accroissement de cet espacement augmente l'angle de contact et donc le caractère superhydrophobe puisque la fraction solide de la surface est abaissée mais il favorise aussi la transition vers un mode Wenzel lors de l'évaporation par « effondrement » entre les piliers. Cet effet peut se comprendre en décrivant la force de Laplace qui s'exerce sur les parois de la goutte [76] :

$$F_{laplace} = \gamma \frac{2}{R}\left(S^2 - (\pi r^2)\right)$$

Avec R le rayon de la goutte, S l'espacement centre à centre entre les micro piliers, r le rayon des micro piliers et γ, la tension de surface. Cette force qui croît avec l'espacement va amener la goutte à s'empaler dans la structuration c'est-à-dire à s'effondrer entre les piliers. Elle dépend d'une part, de la géométrie de la structure et d'autre part, du rayon de la goutte. On constate que la force de Laplace à R constant et r constant évolue comme le carré de la distance inter-piliers. De plus, lors de l'évaporation, la force de Laplace augmente à cause de la diminution du rayon de la goutte.

Le motif choisi pour constituer le premier niveau de structure se base sur des observations faites avec les dispositifs susmentionnés et sur l'interprétation du passage du mode CB au mode Wenzel basé sur l'interprétation de la force de Laplace. Ainsi, l'espacement entre les micro-piliers a été défini à 15 µm ; les lignes de guidage ne sont pas connectées au piédestal. Le nombre de lignes de guidage a aussi été diminué passant de 24 à 5 et ce pour garder une surface spécifique importante à proximité du piédestal permettant de rester en état CB jusqu'à la toute fin de l'évaporation. La symétrie radiale autour du piédestal a été conservée.

La fabrication de ce niveau par lithographie optique suivie d'une gravure plasma présente des avantages non négligeables. Tout d'abord, les niveaux de résolution ne sont pas critiques et peuvent être facilement accessibles pour n'importe quelle plateforme technologique. Cela permet ensuite de réaliser environ 300 dispositifs sur un wafer de 4 pouces en deux étapes de procédé. Finalement, la méthode choisie est à mettre en regard des méthodes décrites dans la littérature utilisant l'ablation laser sur des substrats de PTFE, cuivre, acier inoxydable ou bien encore silicium. L'ablation laser nécessite un laser femtoseconde, qui est un dispositif à la fois onéreux et non conventionnel dans les plateformes technologiques. De plus, l'ablation laser ne permet de réaliser les dispositifs qu'un par un, ce qui est chronophage. D'après Georgii Pavliuk et al. [57], il faut environ 20 minutes pour réaliser une gravure de 4 mm^2. Si l'on s'en tient à ces chiffres, 100 h seraient donc nécessaires pour réaliser 300 dispositifs.

La réalisation de nano-piliers de silicium par gravure plasma sans masque est la partie la plus critique du procédé. En effet, cette gravure est très dépendante du paramétrage de la machine de gravure. Le caractère de cette gravure peut être vu comme un système instable : la moindre variation dans les paramètres initiaux provoque un changement drastique dans la morphologie finale. Il est nécessaire de faire un aparté sur les processus permettant la création de ces nano-piliers. En effet, ces nano-piliers ont deux fonctions : ils rajoutent un niveau de structuration et sont le support de l'argent permettant de créer des nano-antennes plasmoniques. C'est ce caractère double qui leur confère la criticité susmentionnée.

5.2 Le procédé « black silicon »

Le procédé « black silicon » permet de recouvrir la totalité du dispositif de nano-piliers de silicium. Cette modification de la surface du silicium par gravure, lui permet d'obtenir des propriétés optiques d'absorption de la lumière – propriétés qui le rendent particulièrement intéressant dans le domaine photovoltaïque[77] par exemple. C'est en créant des nanostructures sur la surface du silicium que l'on peut rendre celui-ci absorbant pour les longueurs d'onde allant du visible à l'infrarouge[78].

Pour créer de telles structures, plusieurs méthodes existent :

- Lithographie par faisceau d'électrons[79]
- Gravure chimique assistée par métal ou « metal assisted chemical etching (MACE) »[80]
- Gravure plasma RIE[70,72,81–83] (« reactive ion etching ») ou DRIE[84] (« deep reactive ion etching »)
- Gravure par pulse laser [85]

Le silicium noir a été particulièrement étudié dans le cadre de la gravure plasma. En effet, celui-ci peut apparaître à l'occasion d'une gravure plasma non optimisée et par conséquent, être considéré comme un défaut de gravure.

La méthode choisie pour réaliser le silicium noir a une influence sur sa morphologie. Si la lithographie à faisceau d'électrons (Electron Beam Lithography ou EBL) permet d'avoir des structures ordonnées, ce n'est pas le cas des autres méthodes.

5.2.1 Explication du procédé de fabrication

Dans une gravure sèche de type RIE, un plasma est généré pour graver le substrat. Ce type de gravure combine à la fois une gravure chimique et une gravure physique dans le but d'obtenir un profil de gravure anisotrope. Le choix des espèces qui composent le plasma dépend du matériau que l'on veut graver : dans le cas du silicium, un mélange $SF6/O_2$ peut être utilisé. Plusieurs réactions se déroulent simultanément lors d'une gravure plasma, ce qui rend le phénomène complexe à analyser. Il y a cependant deux réactions principales : la réaction de gravure et la réaction de passivation.

Martin Steglich et al.[86] décrivent les mécanismes en jeu dans la création des nanostructures.

L'équation 1 illustre le processus de gravure dans lequel la fluorine présente dans le plasma vient graver le silicium en formant une espèce volatile, le SiF_4. L'équation 2 nous montre que le produit ionisé de la réaction précédente réagit avec les radicaux oxygène pour former une couche de d'oxyfluorure de silicium.

$$Si + 4F^* \Rightarrow SiF_4 \uparrow \quad \text{Eq. 1}$$

$$SiF_y{}^+ + xO* \Leftrightarrow SiO_xF_y \quad \text{Eq. 2}$$

La couche d'oxyfluorure de silicium protège la surface de la gravure chimique par la fluorine. Cette couche de passivation n'est pas stable et se dégrade sous l'influence de la température du réacteur et du bombardement ionique du plasma.

Dans les procédés de microfabrication classiques, une tension sur le substrat est appliquée pour diriger les ions vers la surface et obtenir ainsi une gravure directionnelle. L'accélération des ions induit aussi une gravure physique de la surface.

Le débit d'O_2 est ajusté pour créer une couche de passivation. Celle-ci peut être divisée en deux couches : une latérale et une horizontale. La couche horizontale ne résiste pas au bombardement ionique. Les flancs étant protégés, la gravure devient anisotrope.

En augmentant le débit d'O_2 au-dessus d'un certain seuil, la vitesse de gravure est considérablement réduite à cause d'une sur-passivation : la couche de passivation horizontale n'est plus aussi bien détériorée lors de la gravure. C'est ce régime de sur-passivation qui conduit à la formation du silicium noir en deux étapes. La première consiste en une augmentation de la rugosité du substrat ; la seconde en l'augmentation de cette rugosité par ce qui est appelé l'effet de tranchée (trenching effect) : entre les nanostructures (les vallées) la gravure est plus prononcée.

Cet effet est dû à la réflexion des ions sur les parois latérales inclinées des nanostructures, induisant une densité d'ions dans les vallées plus importante qu'ailleurs. [87]

À son tour, la couche de SiO_xF_y en cours de passivation est éliminée plus rapidement dans les vallées. Finalement, il arrive un moment où la couche de passivation du SiO_xF_y est complètement éliminée dans les vallées les plus profondes.

5.2.2 Influence du ratio SF_6/O_2 dans la morphologie du silicium noir

La réalisation du silicium noir est critique car il est le support des nanoparticules métalliques permettant l'exaltation du signal Raman.

La figure 36 illustre l'influence du ratio SF_6/O_2 sur la morphologie du silicium noir.

Les paramètres de température, pression, puissance, durée, et débit d'O_2 ont été fixés aux valeurs nominales précédemment mentionnées. Seul le débit de SF_6 a été modifié.

Le centre du wafer (x = 0 mm) ainsi que le bord du wafer (x = 40mm) ont été imagés par microscopie électronique à balayage avec des inclinaisons de 0° et 30° pour trois modifications du débit de SF_6 : 35 sccm, 36.5 sccm et 40 sccm.

Avec un débit de 35 sccm de SF_6, les nanostructures réalisées ont une morphologie de type conique. Quand on augmente le débit de SF_6 à 36.5 sccm, des nano-piliers verticaux apparaissent au bord du wafer avec une hauteur qui semble identique tandis qu'au centre, les nano-piliers ont une hauteur variable.

En dépassant la condition optimale et en ayant un débit de SF_6 de 40 sccm, des nano-piliers verticaux de silicium et de hauteur similaire se forment sur l'entièreté du wafer. Cependant, si au centre du wafer, ceux-ci commencent à peine à se plier, ils sont complètement pliés au bord du wafer.

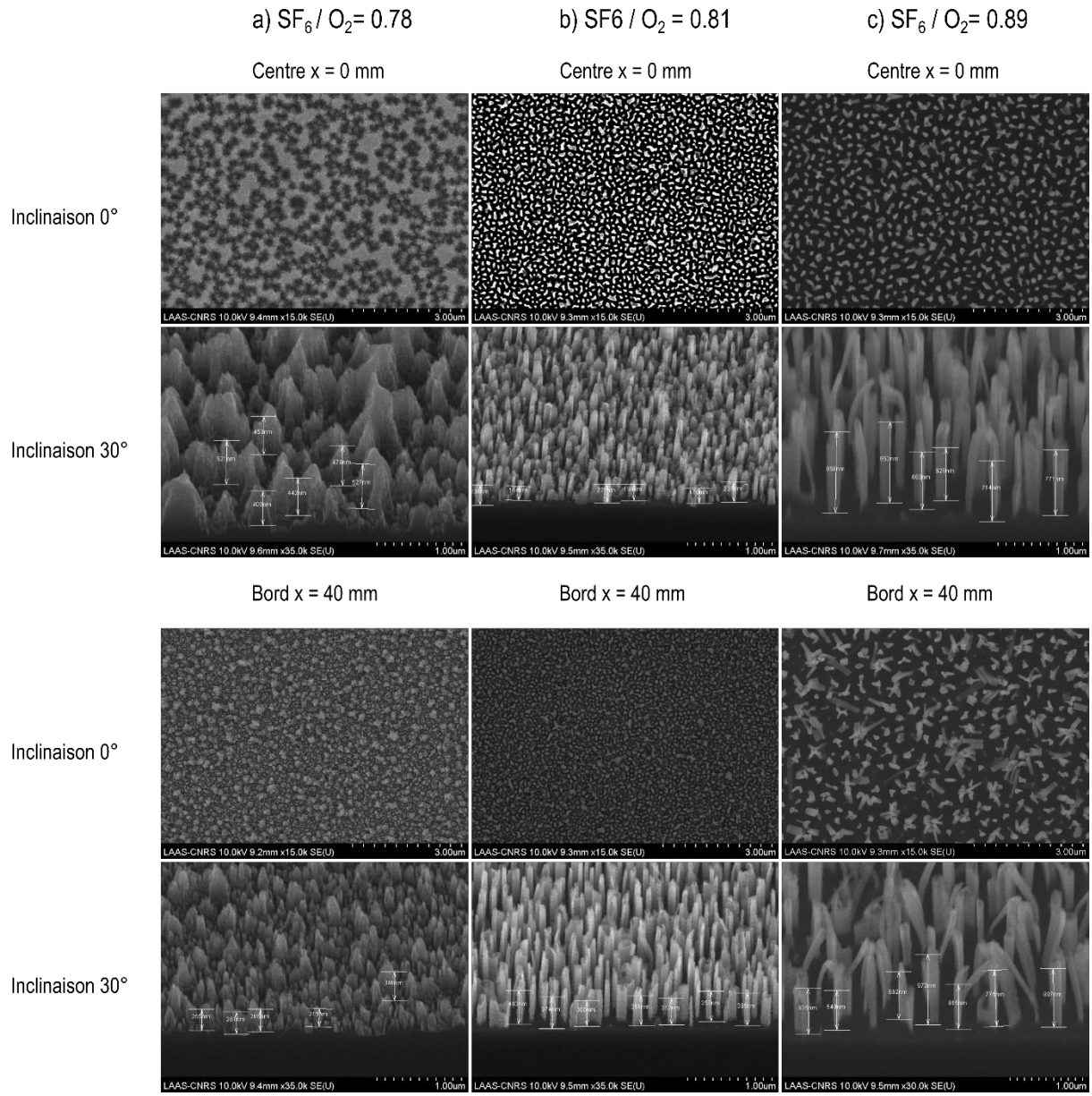


Figure 36 Images MEB illustrant l'influence du débit de SF6 sur la morphologie du silicium noir (x = 0mm, O_2 = 45 sccm , Picp = 600w, P_r =10^{-2} mBar , T = 20°C,) a) SF_6 = 35 sccm , b) SF_6 = 36.5 sccm , SF_6 = 40 sccm

Dans ce travail nous n'avons pas jugé utile d'étudier à proprement parler, les mécanismes de croissance du film mince métallique à la surface du silicium nanostructuré. Nous donnons ici une explication qualitative du mécanisme de formation des NPs d'Ag au sommet des nano-piliers qui nous a permis d'obtenir des surfaces avec des facteurs d'exaltation satisfaisants pour notre étude principale. Un travail plus en profondeur sur ces mécanismes de croissance permettrait sûrement d'optimiser la morphologie des nanoparticules d'Ag et leur proximité pour obtenir des facteurs d'exaltation encore plus importants en retouchant les paramètres liés au dépôt métallique.

Le paramètre principal du dépôt réalisé est l'épaisseur nominale de la couche. L'influence d ce paramètre est bien visible sur les figures 26,27 et 28. Pour notre étude de bons résultats ont été

obtenus avec des couches dont l'épaisseur est de l'ordre de 100 nm. Cette épaisseur nominale représente l'épaisseur théorique qu'aurait la couche mince métallique si elle avait été déposée sur une surface parfaitement plane. Les mécanismes de nucléation et de croissance de films minces métalliques sur des surfaces planes sont bien connus et décrits depuis les années 1970 par la théorie de Venables[88]. Nous savons que pour des épaisseurs nominales de 30 à 200 nm, la nucléation puis la croissance des grains cristallins et leur coalescence à température ambiante conduit à la formation d'une couche métallique continue et polycristalline. Qualitativement nous pensons que la structuration de la surface en nano-piliers perturbe la coalescence entre les grains mais surtout fragmente la couche mince entre le sommet des nano-piliers et le bas des nano-piliers. Il en résulte la formation au sommet des nano-piliers d'une petite couche d'Ag (ou de Ti/Ag) qui prend donc l'aspect d'une nanoparticule ayant une dimension dans le plan de la couche proche du diamètre du nano-pilier. Dans la direction normale à la surface, cette nanoparticule spontanément structurée par le nano-pilier, ne possède pas une épaisseur constante, elle ne prend pas l'allure d'un cylindre plein mais au contraire celle d'une petite boule. La forme exacte de cette boule est variable d'un nano-pilier à l'autre car elle est dictée par l'orientation cristalline locale et la minimisation de l'énergie de surface qui a tendance à facetter la particule. Nous n'avons pas fait d'observation en microscopie électronique en transmission de ces couches fragmentées mais il est probable qu'à faible épaisseur nominale, la majorité de ces nanoparticules soient monocristallines.

A faible épaisseur (30 nm), le diamètre dans le plan de la couche, de la nanoparticule posée au sommet est conforme au diamètre du nano-pilier qui la soutient. A plus forte épaisseur (100 nm), les effets cristallins sont plus visibles, le facettage s'observe clairement et le diamètre de la particule dans le plan peut dépasser celui du nano-pilier avec un léger surplomb métallique de part et d'autre du nano-pilier. L'augmentation de l'épaisseur nominale (200 nm) par ajout de matière, conduit alors à une nanoparticule anisotrope plus épaisse que large, qui revêt l'aspect d'une petite ogive. Au-delà de 200 nm on peut observer le bouchage des interstices entre nano-piliers et l'apparition d'une couche sommitale continue mais très rugueuse, sans nanoparticules et donc peu propice à la réalisation de points chauds de type nanoparticulaire. En addition de ces phénomènes, il faut noter que les atomes métalliques sont aussi déposés sur les flancs des nano-piliers. Sur ces surfaces latérales, par effet d'ombrage, la quantité de matière déposée est plus faible que sur le sommet des nano-piliers. Il en résulte donc la formation d'une couche métallique discontinue sur les flancs des nano-piliers où chaque grain cristallin prend l'aspect d'une petite nanoparticule dont la taille est nettement inférieure à la nanoparticule sommitale. Ces petites nanoparticules de flanc augmentent en dimension avec l'épaisseur nominale. Il n'est pas exclu qu'elles participent aussi à la génération de points d'exaltation du champ électromagnétique. Notons également que sur la surface plane de silicium en recès (en bas des piliers), une couche continue est formée (voir figure 28b par exemple). Cette couche présente des trous formant les empreintes des nano-piliers. Comme la taille de la nanoparticule sommitale dépasse le diamètre des nano-piliers lorsque l'épaisseur nominale est supérieure à 30 nm, les trous de la couche continuent en recès, par effet d'ombrage, possèdent un diamètre plus large que les nano-piliers et à peu près égal au diamètre de la nanoparticule formée au sommet. Cette couche continue au bas des nano-piliers ne génère pas de points d'exaltation plasmonique de type nanoparticulaires.

En résumé, nous disposons d'une bonne compréhension qualitative des mécanismes de formation des nanoparticules d'Ag sur les surfaces de black silicium. Les points chauds sont majoritairement générés par les nanoparticules formées au sommet des nano-piliers. A faible épaisseur nominale, la distance entre deux nanoparticules adjacentes ne permet pas de générer des dimères ou trimères de nanoparticules et les facteurs d'exaltation correspondent à ceux attendus pour des nanoparticules simples. A plus forte épaisseur nominale entre 100 et 200 nm, l'élargissement de la base des nanoparticules réduit leur espacement et donc favorise l'obtention de points chauds d'interstices (voir figure 13), dont les facteurs d'exaltation sont plus importants. Ce dernier effet est encore accentué après évaporation d'une goutte d'eau en raison de la flexion des nano-piliers conduisant à

la formation de petits paquets de nanoparticules en forte interaction (voir figure 30 et 31). Ces différentes hypothèses ont été confirmées par SERS. En pratique la gamme d'épaisseur qui génère des surfaces où l'exaltation est importante se situe entre 30 nm et 300 nm. Pour la suite des expériences, l'épaisseur utilisée est de 100 nm. Rappelons que des nanoparticules plus petites sont également formées sur les flancs des nano-piliers et peuvent également contribuer aux phénomènes d'exaltation. La caractérisation de ces nano-antennes plasmoniques est encore incomplète. Bien que nous ne les ayons pas caractérisées, ces nanoparticules d'Ag sont oxydées en surface. L'épaisseur de cette couche d'oxyde, dans nos échantillons n'est pas connue mais nous verrons plus tard que nous en voyons une trace en spectroscopie Raman. Dans une perspective à ce travail, la caractérisation de cette couche d'oxyde nous paraît importante à réaliser, son évolution au cours du temps également puisque ces dispositifs dans un contexte spatial sont amenés à être utilisés longtemps après leur élaboration.

Résumé du chapitre

Le procédé proposé dans ce chapitre peut être qualifié de polyvalent et peut être modifié en fonction de l'application visée. Il est par exemple possible d'utiliser le même procédé sans déposer d'argent pour disposer uniquement de l'aspect concentrateur du dispositif. De même, en inversant les étapes de création des nano-piliers et d'enduction de la résine pour effectuer le lift-off, il est possible de créer une surface sur laquelle le piédestal n'est pas recouvert de nano-piliers.

Bien qu'il soit possible de créer simplement de la nano-rugosité par gravure ICP-RIE sans masque, le caractère vertical des nano-piliers est critique à obtenir et nécessite une phase d'optimisation. D'autres méthodes peuvent être utilisées, en particulier la réalisation de nanostructures sur le piédestal via EBL, le dépôt de nanoparticules en suspension colloïdale ou encore le dépôt de films discontinus métalliques… Il convient de préciser que les propriétés plasmoniques n'en seraient que différentes.

Deux optimisations peuvent finalement s'effectuer, et qui ne nécessitent pas ou peu de développement. La première concerne la géométrie. En effet, nous avons vu que la force de Laplace qui a une influence dans la transition de l'état CB à Wenzel dépend de l'espacement entre les micro-piliers mais aussi de leur taille. On pourrait dès lors imaginer une surface pour laquelle ces facteurs varient en fonction de la distance au piédestal. Nous aurions ainsi des micro-piliers périphériques avec une taille et un espacement supérieur aux micro piliers dans la région centrale de la surface.

Le second concerne le dépôt métallique. Le *Scanning Habitable Environments with Raman and Luminescence for Organics and Chemicals (SHERLOC)*, qui est l'instrument dédié à la détection de vie sur Mars[89], dispose d'un spectromètre Raman fonctionnant dans l'UV à 248.6 nm. La première librairie concernant des minéraux possiblement décelables sur Mars, a été réalisée en utilisant un dispositif terrestre analogue au SHERLOC[90]. Dès lors, il serait intéressant de présenter une surface SERS répondant dans cette gamme de fréquence. Or, l'argent ne permet pas d'avoir d'exaltation plasmonique à cette longueur d'onde. Il est cependant possible de changer l'étape de dépôt d'argent par une étape de dépôt d'aluminium qui a, lui, les propriétés voulues dans l'UV.

Ce chapitre nous a permis de comprendre les propriétés superhydrophobes et plasmoniques nécessaires à la réalisation d'un dispositif permettant à la fois de concentrer des analytes localement et d'exalter le signal Raman. Le procédé de fabrication d'un tel dispositif a été détaillé et discuté au vu

de la littérature. La totalité d'un dispositif est présentée en figure 37. Sur cette même figure, les miniatures permettent de voir le dispositif à différentes étapes du process.

Le troisième chapitre nous permettra de caractériser les aspects superhydrophobes et plasmoniques du dispositif.

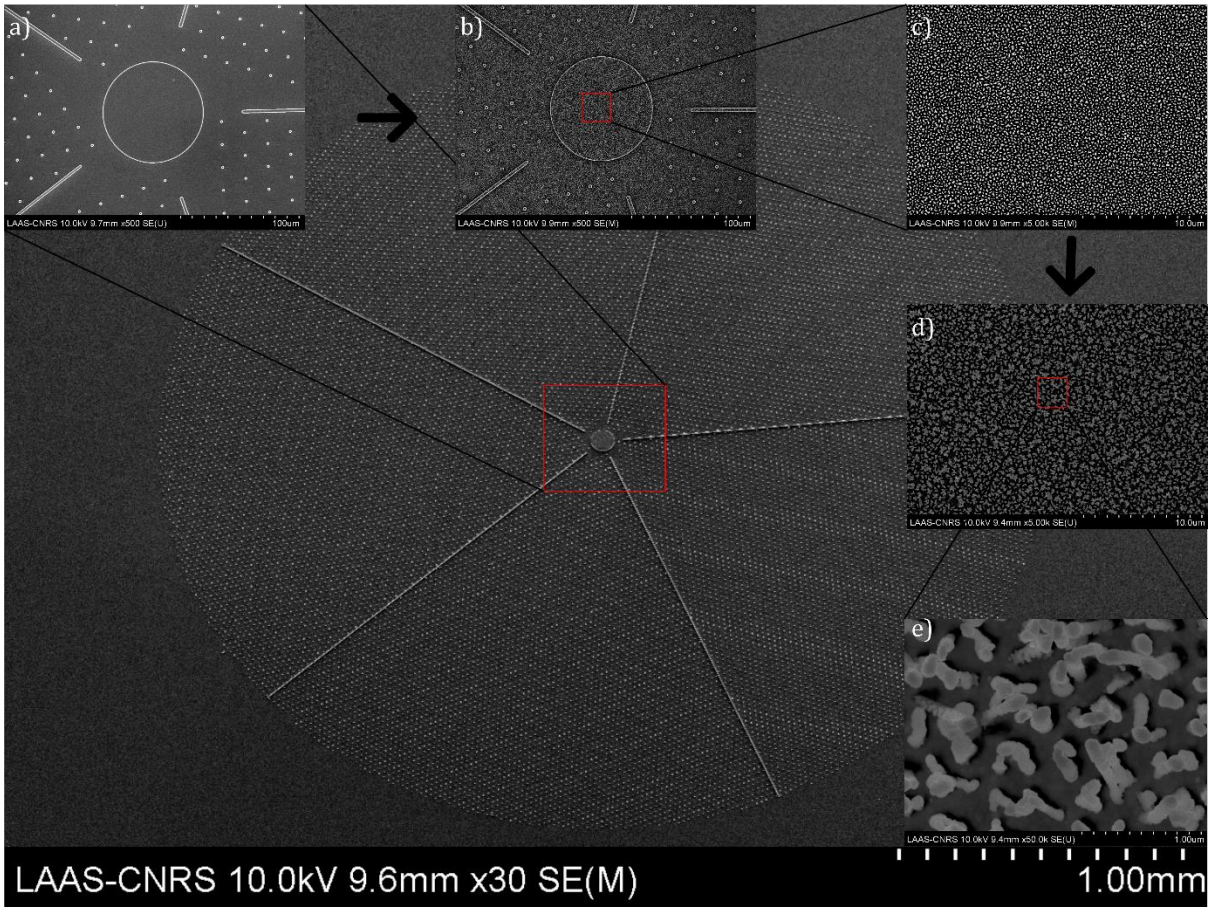


Figure 37 Image en microscopie électronique à balayage du dispositif en champ large, a) focus sur la zone « piédestal » après la première étape de gravure, cette même zone est représentée en b) après la gravure ICP-RIE sans masque pour créer les nano-piliers, en c) un focus est effectué sur les nano-piliers tandis qu'en d) sont représentés les nano-piliers en fin de process après les étapes d'évaporation thermique de 100 nm d'argent sur 5nm de titane et de lift-off du FDTS, e) zoom sur les nano-piliers recouverts d'argent.

Bibliographie

1. Fornells, E., Hilder, E. F. & Breadmore, M. C. Preconcentration by solvent removal: techniques and applications. *Anal Bioanal Chem* **411**, 1715–1727 (2019).
2. Deegan, R. D. Pattern formation in drying drops. *Phys. Rev. E* **61**, 475–485 (2000).
3. Deegan, R. D. *et al.* Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* **389**, 827–829 (1997).
4. He, E., Guo, D. & Li, Z. A Widely Applicable Strategy for Coffee-Ring Effect Suppression and Controllable Deposition of Nanoparticles Utilizing Ice Drying. *Advanced Materials Interfaces* **6**, 1900446 (2019).
5. Li, Y., Lv, C., Li, Z., Quéré, D. & Zheng, Q. From coffee rings to coffee eyes. *Soft Matter* **11**, 4669–4673 (2015).
6. Hua Hu*, † and & Larson, R. G. Marangoni Effect Reverses Coffee-Ring Depositions. *ACS Publications* https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp0609232 (2006) doi:10.1021/jp0609232.
7. Giorgiutti-Dauphiné, F. & Pauchard, L. Drying drops. *The European Physical Journal E* **41**, 32 (2018).
8. Gennes, P.-G. de, Brochard-Wyart, F. & Quéré, D. *Gouttes, bulles, perles et ondes*. (Belin, 2002).
9. Wang, Z., Paul, S., Stein, L. H., Salemi, A. & Mitra, S. Recent Developments in Blood-Compatible Superhydrophobic Surfaces. *Polymers* **14**, 1075 (2022).
10. III. An essay on the cohesion of fluids | Philosophical Transactions of the Royal Society of London. https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rstl.1805.0005.
11. Wenzel, R. N. RESISTANCE OF SOLID SURFACES TO WETTING BY WATER. *Ind. Eng. Chem.* **28**, 988–994 (1936).
12. Cassie, A. B. D. & Baxter, S. Wettability of porous surfaces. *Trans. Faraday Soc.* **40**, 546 (1944).

13. Controlled wetting by surface patterning. https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1051/lhb/2003070?needAccess=true&role=button doi:10.1051/lhb/2003070.
14. Hydrophobie (physique). *Wikipédia* (2022).
15. Ma, F. M. *et al.* Geometrical effect, optimal design and controlled fabrication of bio-inspired micro/nanotextures for superhydrophobic surfaces. *Mater. Res. Express* **4**, 092001 (2017).
16. Nosonovsky, M. & Bhushan, B. Lotus Effect: Roughness-Induced Superhydrophobicity. in *Applied Scanning Probe Methods VII: Biomimetics and Industrial Applications* (eds. Bhushan, B. & Fuchs, H.) 1–40 (Springer, 2007). doi:10.1007/978-3-540-37321-6_1.
17. McHale, G., Aqil, S., Shirtcliffe, N. J., Newton, M. I. & Erbil, H. Y. Analysis of Droplet Evaporation on a Superhydrophobic Surface. *Langmuir* **21**, 11053–11060 (2005).
18. Jung, Y. C. & Bhushan, B. Wetting behaviour during evaporation and condensation of water microdroplets on superhydrophobic patterned surfaces. *J Microsc* **229**, 127–140 (2008).
19. Li, Y., Li, X., Sun, W. & Liu, T. Mechanism study on shape evolution and wetting transition of droplets during evaporation on superhydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **518**, 283–294 (2017).
20. Sperling, M. & Gradzielski, M. Droplets, Evaporation and a Superhydrophobic Surface: Simple Tools for Guiding Colloidal Particles into Complex Materials. *Gels* **3**, 15 (2017).
21. McLauchlin, M. L. *et al.* Evaporative Properties and Pinning Strength of Laser-Ablated, Hydrophilic Sites on Lotus-Leaf-like, Nanostructured Surfaces. *Langmuir* **23**, 4871–4877 (2007).
22. Yin, Q. *et al.* Suppressing the Ring Stain Effect with Superhydrophilic/Superhydrophobic Patterned Surfaces. *ACS Omega* **5**, 11235–11240 (2020).
23. Bussonnière, A. *et al.* Universal wetting transition of an evaporating water droplet on hydrophobic micro- and nano-structures. *Soft Matter* **13**, 978–984 (2017).

24. Okulova, N., Johansen, P., Christensen, L. & Taboryski, R. Effect of Structure Hierarchy for Superhydrophobic Polymer Surfaces Studied by Droplet Evaporation. *Nanomaterials* **8**, 831 (2018).
25. Zhang, X. *et al.* Evaporation of Sessile Water Droplets on Superhydrophobic Natural Lotus and Biomimetic Polymer Surfaces. *ChemPhysChem* **7**, 2067–2070 (2006).
26. Lee, M. *et al.* Water droplet evaporation from sticky superhydrophobic surfaces. *Applied Physics Letters* **111**, 021603 (2017).
27. How to measure contact angle hysteresis and roll-off angle by tilting method? https://www.biolinscientific.com/blog/how-to-measure-contact-angle-hysteresis-and-roll-off-angle-by-tilting-method.
28. McHale, G., Elliott, S. J., Newton, M. I. & Shirtcliffe, N. J. Superhydrophobicity: Localized Parameters and Gradient Surfaces. in *Contact Angle, Wettability and Adhesion, Volume 6* (CRC Press, 2009).
29. Song, W., Psaltis, D. & Crozier, K. B. Superhydrophobic bull's-eye for surface-enhanced Raman scattering. *Lab Chip* **14**, 3907–3911 (2014).
30. Ma, X. *et al.* Hybrid superhydrophilic–superhydrophobic micro/nanostructures fabricated by femtosecond laser-induced forward transfer for sub-femtomolar Raman detection. *Microsyst Nanoeng* **5**, 48 (2019).
31. Seo, J. *et al.* Path-programmable water droplet manipulations on an adhesion controlled superhydrophobic surface. *Sci Rep* **5**, 12326 (2015).
32. Raman, C. V. The Colour of the Sea. *Nature* **108**, 367–367 (1921).
33. Compton, A. H. A Quantum Theory of the Scattering of X-rays by Light Elements. *Phys. Rev.* **21**, 483–502 (1923).
34. Raman, C. V. The molecular scattering of light. *Proc. Indian Acad. Sci.* **37**, 342–349 (1953).

35. Blackie, E. J., Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14466–14472 (2009).
36. Etchegoin, P. G. & Le Ru, E. C. A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6079 (2008).
37. Fleischmann, M., Hendra, P. J. & McQuillan, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **26**, 163–166 (1974).
38. Jeanmaire, D. L. & Van Duyne, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **84**, 1–20 (1977).
39. Nie, S. & Emory, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **275**, 1102–1106 (1997).
40. Phys. Rev. Lett. 78, 1667 (1997) - Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). https://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.78.1667.
41. Pines, D. Electron interaction in solids. *Can. J. Phys.* **34**, 1379–1394 (1956).
42. Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy - 1st Edition. https://www.elsevier.com/books/principles-of-surface-enhanced-raman-spectroscopy/le-ru/978-0-444-52779-0.
43. Ritchie, R. H. Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Phys. Rev.* **106**, 874–881 (1957).
44. Pilot *et al.* A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Biosensors* **9**, 57 (2019).
45. Taguchi, A. Deep-Ultraviolet Surface-Enhanced Raman Scattering. in *Far- and Deep-Ultraviolet Spectroscopy* (eds. Ozaki, Y. & Kawata, S.) 145–158 (Springer Japan, 2015). doi:10.1007/978-4-431-55549-0_8.
46. He, R. X., Liang, R., Peng, P. & Norman Zhou, Y. Effect of the size of silver nanoparticles on SERS signal enhancement. *J Nanopart Res* **19**, 267 (2017).

47. Kumari, G., Kandula, J. & Narayana, C. How Far Can We Probe by SERS? *ACS Publications* https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jpcc.5b07556 (2015) doi:10.1021/acs.jpcc.5b07556.
48. Le Ru, E. C., Blackie, E., Meyer, M. & Etchegoin, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C* **111**, 13794–13803 (2007).
49. Moskovits, M. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783–826 (1985).
50. Etchegoin, P. G. & Le Ru, E. C. Basic Electromagnetic Theory of SERS. in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* 1–37 (John Wiley & Sons, Ltd, 2010). doi:10.1002/9783527632756.ch1.
51. Langer, J. *et al.* Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **14**, 28–117 (2020).
52. Xu, F. *et al.* Silver Nanoparticles Coated Zinc Oxide Nanorods Array as Superhydrophobic Substrate for the Amplified SERS Effect. *J. Phys. Chem. C* **115**, 9977–9983 (2011).
53. Gentile, F. *et al.* Tailored Ag nanoparticles/nanoporous superhydrophobic surfaces hybrid devices for the detection of single molecule. *Microelectronic Engineering* **97**, 349–352 (2012).
54. Gentile, F. *et al.* Superhydrophobic Surfaces as Smart Platforms for the Analysis of Diluted Biological Solutions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 3213–3224 (2012).
55. Wang, A. *et al.* Low-adhesive superhydrophobic surface-enhanced Raman spectroscopy substrate fabricated by femtosecond laser ablation for ultratrace molecular detection. *J. Mater. Chem. B* **5**, 777–784 (2017).
56. Chu, F. *et al.* A Simple Laser Ablation-Assisted Method for Fabrication of Superhydrophobic SERS Substrate on Teflon Film. *Nanoscale Research Letters* **13**, 244 (2018).
57. Pavliuk, G. *et al.* Ultrasensitive SERS-Based Plasmonic Sensor with Analyte Enrichment System Produced by Direct Laser Writing. *Nanomaterials* **10**, 49 (2020).
58. Luo, X. *et al.* Atto-Molar Raman detection on patterned superhydrophilic-superhydrophobic platform via localizable evaporation enrichment. *Sensors and Actuators B: Chemical* **326**, 128826 (2021).

59. Guan, X. & Feng, G. Patterned superhydrophobic/superhydrophilic SERS sensors fabricated by femtosecond laser for precise positioning and ultra-sensitive detection. *Chemical Physics Letters* **783**, 139065 (2021).
60. Extremely Sensitive SERS Sensors Based on a Femtosecond Laser-Fabricated Superhydrophobic/-philic Microporous Platform | ACS Applied Materials & Interfaces. https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsami.2c10381.
61. Yang, H. *et al.* Femtosecond laser patterned superhydrophobic/hydrophobic SERS sensors for rapid positioning ultratrace detection. *Opt. Express, OE* **29**, 16904–16913 (2021).
62. Brown, R. J. C. & Milton, M. J. T. Nanostructures and nanostructured substrates for surface—enhanced Raman scattering (SERS). *Journal of Raman Spectroscopy* **39**, 1313–1326 (2008).
63. Wiley, B., Sun, Y. & Xia, Y. Synthesis of Silver Nanostructures with Controlled Shapes and Properties. *Acc. Chem. Res.* **40**, 1067–1076 (2007).
64. Lin, X.-M., Cui, Y., Xu, Y.-H., Ren, B. & Tian, Z.-Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues. *Anal Bioanal Chem* **394**, 1729–1745 (2009).
65. Kanipe, K. N., Chidester, P. P. F., Stucky, G. D. & Moskovits, M. Large Format Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrate Optimized for Enhancement and Uniformity. *ACS Nano* **10**, 7566–7571 (2016).
66. Liu, H. *et al.* Centimeter-scale-homogeneous SERS substrates with seven-order global enhancement through thermally controlled plasmonic nanostructures. *Nanoscale* **6**, 5099–5105 (2014).
67. Chen, J. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering of rhodamine 6G on nanowire arrays decorated with gold nanoparticles. *Nanotechnology* **19**, 275712 (2008).
68. Hu, M. *et al.* Gold Nanofingers for Molecule Trapping and Detection. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12820–12822 (2010).

69. Ou, F. S. *et al.* Hot-Spot Engineering in Polygonal Nanofinger Assemblies for Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Nano Lett.* **11**, 2538–2542 (2011).
70. Schmidt, M. S., Hübner, J. & Boisen, A. Large Area Fabrication of Leaning Silicon Nanopillars for Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Adv. Mater.* **24**, OP11–OP18 (2012).
71. Wu, K., Rindzevicius, T., Schmidt, M. S., Thilsted, A. H. & Boisen, A. Optimizing silver-capped silicon nanopillars to simultaneously realize macroscopic, practical-level SERS signal reproducibility and high enhancement at low costs. *Journal of Raman Spectroscopy* **48**, 1808–1818 (2017).
72. Wu, K. *et al.* Wafer-Scale Leaning Silver Nanopillars for Molecular Detection at Ultra-Low Concentrations. *J. Phys. Chem. C* **119**, 2053–2062 (2015).
73. Deng, Y.-L. & Juang, Y.-J. Black silicon SERS substrate: Effect of surface morphology on SERS detection and application of single algal cell analysis. *Biosensors and Bioelectronics* **53**, 37–42 (2014).
74. Williamson, A. J. Black Silicon for Photodiodes: Experimentally Implemented and FDTD Simulated. (2010).
75. Hopcroft, M. A., Nix, W. D. & Kenny, T. W. What is the Young's Modulus of Silicon? *J. Microelectromech. Syst.* **19**, 229–238 (2010).
76. Tsai, P., Lammertink, R. G. H., Wessling, M. & Lohse, D. Evaporation-Triggered Wetting Transition for Water Droplets upon Hydrophobic Microstructures. *Phys. Rev. Lett.* **104**, 116102 (2010).
77. Hsu, C.-H. *et al.* Fabrication and characteristics of black silicon for solar cell applications: An overview. *Materials Science in Semiconductor Processing* **25**, 2–17 (2014).
78. Marthi, S. R., Sekhri, S. & Ravindra, N. M. Optical Properties of Black Silicon: An Analysis. *JOM* **67**, 2154–2159 (2015).

79. Spinelli, P., Verschuuren, M. A. & Polman, A. Broadband omnidirectional antireflection coating based on subwavelength surface Mie resonators. *Nat Commun* **3**, 692 (2012).
80. Huo, C. *et al.* Metal-Assisted Chemical Etching of Silicon in Oxidizing HF Solutions: Origin, Mechanism, Development, and Black Silicon Solar Cell Application. *Advanced Functional Materials* **30**, 2005744 (2020).
81. Yoo, J., Yu, G. & Yi, J. Black surface structures for crystalline silicon solar cells. *Materials Science and Engineering: B* **159–160**, 333–337 (2009).
82. Inomata, Y., Fukui, K. & Shirasawa, K. Surface texturing of large area multicrystalline silicon solar cells using reactive ion etching method. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **48**, 237–242 (1997).
83. Nguyen, V. T. H., Jensen, F., Hübner, J., Leussink, P. & Jansen, H. On the formation of black silicon in SF6-O2 plasma: The clear, oxidize, remove, and etch (CORE) sequence and black silicon on demand. *Journal of Vacuum Science & Technology A* **38**, 043004 (2020).
84. Zhu, F., Wang, C., Zhang, X., Zhao, X. & Zhang, H. A three-step model of black silicon formation in Deep Reactive Ion Etching process. in *2015 28th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)* 365–368 (2015). doi:10.1109/MEMSYS.2015.7050965.
85. Nayak, B. K., Iyengar, V. V. & Gupta, M. C. Efficient light trapping in silicon solar cells by ultrafast-laser-induced self-assembled micro/nano structures. *Progress in Photovoltaics: Research and Applications* **19**, 631–639 (2011).
86. Steglich, M. *et al.* The structural and optical properties of black silicon by inductively coupled plasma reactive ion etching. *Journal of Applied Physics* **116**, 173503 (2014).
87. Etching in Microsystem Technology | Wiley. *Wiley.com* https://www.wiley.com/en-ie/Etching+in+Microsystem+Technology-p-9783527613786.

88. Venables, J. A. & Spiller, G. D. T. Nucleation and Growth of Thin Films. in *Surface Mobilities on Solid Materials: Fundamental Concepts and Applications* (ed. Binh, V. T.) 341–404 (Springer US, 1983). doi:10.1007/978-1-4684-4343-1_16.

89. Bhartia, R. *et al.* Perseverance's Scanning Habitable Environments with Raman and Luminescence for Organics and Chemicals (SHERLOC) Investigation. *Space Sci Rev* **217**, 58 (2021).

90. Razzell Hollis, J. *et al.* A deep-ultraviolet Raman and Fluorescence spectral library of 62 minerals for the SHERLOC instrument onboard Mars 2020. *Planetary and Space Science* **209**, 105356 (2021).

Chapitre 3 : Caractérisation du dispositif d'analyse moléculaire

Table des matières

Chapitre 3 : Caractérisation du dispositif d'analyse moléculaire 93

1 Caractérisation des surfaces superhydrophobes (SH) produites et de l'efficacité de concentration 93

1.1 Évaporation de gouttes d'eaux dites « ultra pures » 93

1.2 Évaporations de suspensions colloïdales de micro-particules de polystyrène 96

1.3 Évaporations de gouttes contenant de l'ADN de phage lambda 99

1.4 Evaporation d'eau de neige collectée sur le terrain 101

1.5 Capture de particules en suspension dans l'air 104

1.6 Discussion 106

2 Caractérisation des propriétés plasmoniques 107

2.1 Caractérisation du bruit de fond Raman : influence du procédé de fabrication. 107

2.2 Influence de la courbure des nano-piliers 110

2.3 Résonance plasmonique 111

2.4 Caractérisation par microscopie de fluorescence 112

2.5 Discussion 113

3 Spectroscopie Raman exaltée sur les surfaces produites 115

3.1 Système expérimental de Micro Raman 115

3.2 Spectroscopie Raman exaltée de la Rhodamine B 116

3.3 Discussion 118

3.3.1 L'exaltation du signal Raman et ses problématiques 118

3.3.2 Influence de la fluorescence 121

Résumé du chapitre 122

Bibliographie 124

Chapitre 3 : Caractérisation du dispositif d'analyse moléculaire

L'objectif de ce chapitre est de décrire la caractérisation de manière exhaustive du dispositif présenté dans le précédent chapitre. Cette caractérisation se fera en deux temps. Ce sont tout d'abord les propriétés de la surface superhydrophobes qui seront étudiées, ce qui permettra de dégager ses performances globales et de les discuter par rapport à la littérature. Nous nous intéresserons ensuite aux propriétés plasmoniques. Ces propriétés sont portées par les nano-piliers de silicium recouverts d'argent. Une attention particulière sera portée à la contamination de la surface suite à la méthode de fabrication. Enfin, le capteur sera caractérisé en utilisant la rhodamine B comme analyte modèle.

1 Caractérisation des surfaces superhydrophobes (SH) produites et de l'efficacité de concentration

Pour évaluer les performances des propriétés concentratrices du concentrateur du dispositif, des dispositifs spécifiques ont été développés, sur lesquels aucun dépôt métallique n'a été effectué. Ces dispositifs d'étude sont donc de simples concentrateurs superhydrophobes pour lesquels les nanopiliers sont bien présents mais pas la couche métallique. Une étude de ces dispositifs spécifiques a ensuite été réalisée en fonction de différents types de solutions évaporées à partir de micro-volumes déposés à la surface de nos dispositifs.

1.1 Évaporation de gouttes d'eaux dites « ultra pures »

Protocole

L'eau a été recueillie dans des flacons stériles à partir de différentes sources. Avant de rincer les flacons, la ligne d'eau a été purgée pendant 10s puis les flacons ont été rincés 5 fois. Des gouttes de 6 µL ont été pipetées manuellement sur la surface des concentrateurs et laissées s'évaporer dans les conditions ambiantes de la salle blanche.

Pour étudier le mode d'évaporation sur ces dispositifs SH hiérarchiques, nous avons commencé par utiliser des gouttes d'eau déminéralisée ultrapure. Il est à noter que ces expériences sont nécessaires pour toute analyse car elles servent également d'expériences contrôle. En effet, comme le dispositif concentre efficacement toute trace d'éléments sur le piédestal, il est nécessaire de caractériser le dépôt obtenu avec une goutte dite « d'eau pure ». Dans les expériences ultérieures où des composés spécifiques seront solubilisés dans de « l'eau pure » à des concentrations connues, tout élément initialement présent dans cette « eau pure » agira comme un contaminant qu'il est important de distinguer des analytes d'intérêt. Aussi, il est important d'évaluer la qualité de l'eau pure qui sera utilisée pour solubiliser les analytes. Deux types d'eaux déionisées ultrapures ont donc été étudiés. Le premier est produit par un système Milli-Q (système de purification d'eau Milli-Q® Direct 5), le

second par l'installation de salle blanche du laboratoire (« Veolia Ultrapure water Treatment solution »). Dans la littérature, ces deux sources sont caractérisées comme ultrapures. La figure 1 montre la cinétique d'évaporation d'une goutte de 6 µL d'eau ultra pure Milli-Q déposée sur un dispositif SH hiérarchique, enregistrée avec un microscope optique à champ clair.

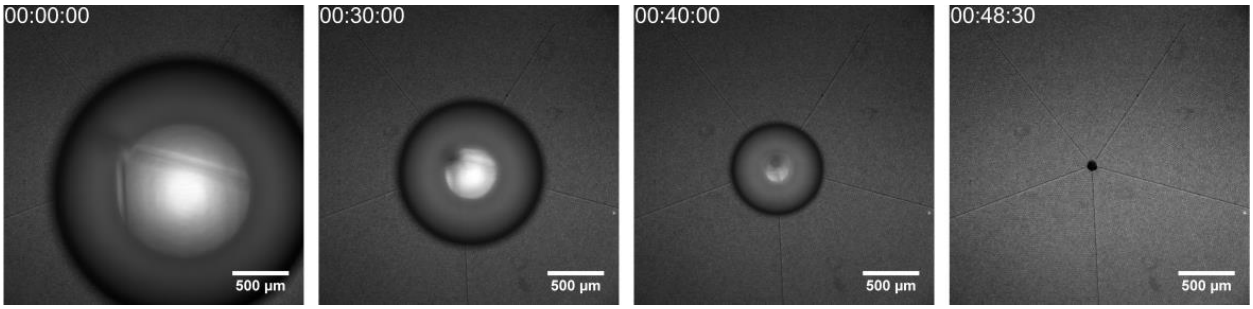


Figure 1 Micrographies optiques (vues de dessus) de la cinétique d'évaporation de gouttes milli-Q sur un dispositif superhydrophobe hiérarchique (vue de dessus) (barre d'échelle 500 µm) a) t = 0 minutes, b) t = 30 minutes, c) t= 40 minutes, d) t = 48 minutes et 30 secondes

L'évaporation des gouttes a duré 49 minutes à température ambiante et à la pression atmosphérique. L'angle de contact statique typique a été mesuré à 156° (voir figure 2), confirmant la nature SH de la surface du dispositif. Sur la figure 1a, nous pouvons observer la goutte à t = 0 s juste après le dépôt par pipetage. La goutte n'est pas bien centrée sur le piédestal en raison de son positionnement manuel. Les figures 1b et 1c montrent respectivement la goutte à t = 30 min et t = 40 min. On peut voir que lors de l'évaporation, la goutte est conduite vers le piédestal grâce aux lignes de guidage micro-structurées convergeant vers le centre du dispositif. La figure 1d montre la fin de l'évaporation à t ~ 48 min. La goutte a clairement atteint le piédestal, laissant un résidu après évaporation complète. Une étape clé de l'évaporation s'est produite au cours de la toute dernière minute du processus, lorsque la ligne triple s'est fixée aux bords du piédestal. L'observation d'un résidu après évaporation de l'eau Milli-Q ultra pure confirme qu'un fort enrichissement de la solution s'est produit sur le piédestal et qu'un échantillon d'eau ultra pure contient des éléments visibles sur le piédestal. Ce dépôt final contient donc tous les « contaminants » possibles. Ils peuvent être soit initialement présents dans « l'eau pure », soit incorporés pendant l'expérimentation, soit adsorbés à partir de l'air ambiant pendant la séquence d'évaporation, soit initialement présents à la surface du dispositif et remis en suspension dans la goutte en raison des propriétés autonettoyantes de la surface SH. Pour discuter de l'importance de ces sources possibles de contamination (intrinsèques ou extrinsèques à l'eau), nous avons étudié le résidu obtenu lors de l'utilisation d'une goutte d'eau distillée ultra pure provenant d'une autre source de production.

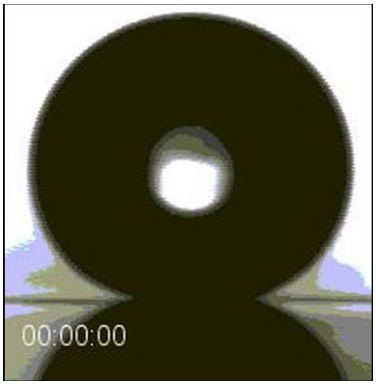


Figure 2 Image prise avec le DigiDrop en configuration transverse après dépôt d'une goutte de 6µL sur la surface d'un concentrateur SH. La goutte est sphérique et présente un angle de contact statique de 156° avec la surface.

Nous avons donc évaporé simultanément sur deux dispositifs issus d'un même lot de fabrication, une goutte de 6 µL d'eau Ultra-Pure (UPW) de salle blanche ainsi qu'une goutte de 6 µL d'UPW Milli-Q. Afin de limiter les risques de contamination potentielle notamment par des poussières, l'évaporation a été réalisée dans la salle blanche. La figure 3 montre les images MEB des deux piédestaux après évaporation totale. Les résidus obtenus sont différents, avec une plus grande quantité de particules de différentes tailles pour la goutte d'eau UPW Milli-Q (figure 3a) par rapport à la goutte d'eau issue de la source de la salle blanche (figure 3b). Cela suggère que les deux sources d'eau ont probablement des degrés de pureté différents. On ne peut exclure qu'une contamination externe se produise pendant le processus d'évaporation. Cependant, les conditions expérimentales étant identiques pour les deux évaporations, la contamination externe devrait être similaire.

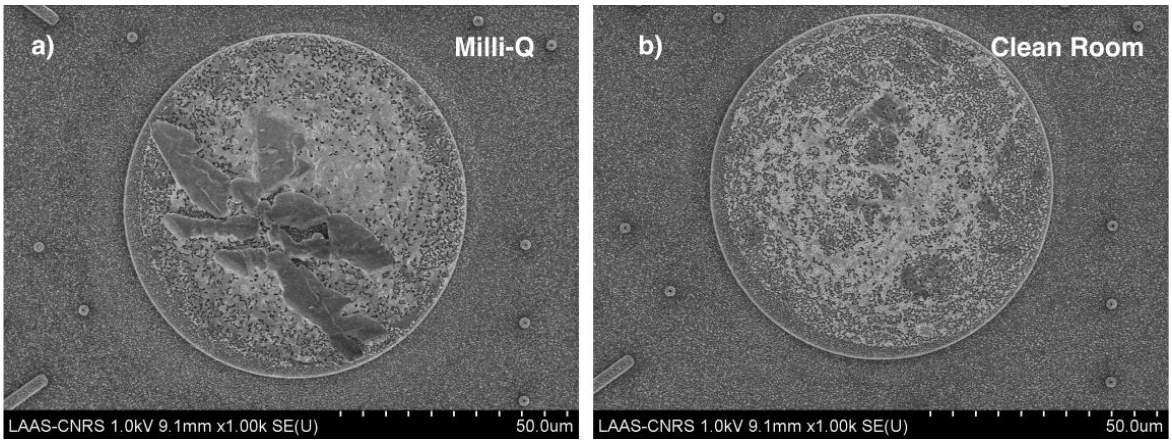


Figure 3 Micrographies SEM du piédestal après évaporation de gouttes d'eau ultra-pure (UPW) sur un dispositif superhydrophobe hiérarchique. La figure 3a) montre le résidu obtenu après évaporation de l'eau UPW Milli-Q La figure 3b) montre le résidu obtenu après évaporation de l'eau UPW de salle blanche.

Nous concluons de ces expériences deux éléments fondamentaux pour notre étude. Premièrement, les concentrateurs superhydrophobes à partir de nos surfaces SH hiérarchiques fonctionnent correctement pour des volumes d'analyse de 6 µL. Notons que nous n'avons pas réalisé d'études spécifiques pour savoir s'il était possible d'augmenter ou de diminuer ce volume. Deuxièmement, ces concentrateurs sont suffisamment efficaces pour concentrer tous les sels résiduels ou éléments solides contenus dans de l'eau ultra-pure. Il est aussi important de noter que si des éléments sont présents sur la surface avant le dépôt de la goutte ceux-ci peuvent être capturés. Ce résultat nous

imposera donc de toujours réaliser des expériences de contrôle avec de l'eau ultra-pure et des surfaces qui ont été préalablement rincées pour éliminer de potentielles poussières et ce afin de se donner une chance de distinguer dans une solution donnée les éléments initialement issus de l'eau dite « ultra-pure », des analytes d'intérêt possiblement contenus dans la solution aqueuse. Notons qu'il est possible de distinguer deux sources d'eau ultra-pures par observation des dépôts résiduels post évaporations. (L'expérience de la figure 3 a été reproduite plusieurs fois).

1.2 Évaporations de suspensions colloïdales de micro-particules de polystyrène

Protocole

Une suspension de billes de polystyrène fluorescentes vertes de 4,8 µm de diamètre (Fluoro-Max G0500, Thermo Scientific) a été utilisée. La concentration initiale était de 1% en poids, soit 1,64 x 10^8 microbilles par mL. Des dilutions en cascade ont été réalisées pour obtenir une suspension avec une concentration de 8,22 x 10^3, 4,11 x 10^3, 1,64 x 10^3, 1,64 x 10^2 microbilles par mL.

Des gouttes de 6 µL ont été déposées par pipetage manuel en salle blanche et laissées s'évaporer dans des conditions ambiantes. Le dépôt a ensuite été observé avec un microscope optique à fluorescence Olympus, équipé de 4 objectifs : x5, x10, x20 et x50. Un filtre fluorescent a été utilisé pour sélectionner l'émission de fluorescence des microbilles.

Afin de quantifier la capacité de nos dispositifs à concentrer les éléments sur le piédestal de 80 µm de diamètre sans en laisser en dehors de cette région, des expériences, utilisant des microbilles de polystyrène, ont été réalisées suivant le protocole susmentionné.

Après l'évaporation d'une goutte de 6 µL, l'entièreté du dispositif a été imagée par microscopie à épifluorescence afin de compter le nombre de microbilles initialement contenues dans la goutte de 6 µL. Il est alors possible de discriminer le nombre de microbilles à l'extérieur du piédestal et le nombre de microbilles localisées sur le piédestal. Nous avons procédé à 5 évaporations avec 4 concentrations nominales de microbilles différentes (5X4), chaque concentration ciblant une valeur nominale de microbilles à l'intérieur de la goutte échantillonnée de 1, 10, 25 et 50 (concentrations autour de 10^2-10^4 billes/mL). La manipulation nécessaire à la préparation des différentes suspensions génère par elle-même une dispersion intrinsèque du nombre réel de microbilles contenues dans une goutte. En effet, pour chaque concentration, les 5 expériences ont donné des nombres différents de microbilles, qui ont finalement été obtenus par inspection et dénombrement en microscopie de fluorescence. De plus, afin de démontrer l'utilité de la fabrication d'une surface SH hiérarchique combinant des micro-piliers et des nano-piliers, nous avons comparé deux conditions. Dans une première série d'expériences, le dispositif n'intégrait pas les nano-piliers (donc non hiérarchique) ; il n'était composé que du premier niveau de structures à l'échelle micrométrique. Dans une seconde série d'expérience le dispositif SH hiérarchisé complet a été testé (micro-piliers + nano-piliers). La figure 4 montre les résultats typiques de 4 évaporations de gouttes contenant les concentrations nominales de microbilles mentionnées ci-dessus. 1, 12 ,20 et 51 microbilles peuvent être observées sur le piédestal sur les figures 4a), 4b), 4c), 4d) respectivement. La figure 5 résume les différents résultats obtenus dans ces expériences (5 x 4 x 2 évaporations). La courbe représente le nombre de microbilles situées sur le piédestal après l'évaporation en fonction du nombre total de microbilles à l'intérieur de la

goutte pour les deux types de dispositifs. Dans le cas d'un dispositif SH hiérarchique, on observe une droite parfaite d'équation $y = x$, ce qui signifie que quelles que soient les concentrations, toutes les microbilles se trouvent localisées sur le piédestal après évaporation. La concentration de ces microbilles est donc idéale. Dans le cas d'un dispositif non hiérarchique, la même tendance est observée mais de manière moins reproductible (3 points expérimentaux se trouvent en dehors de la bissectrice). Les dispositifs SH hiérarchiques semblent donc être des concentrateurs optimaux – tout du moins pour les objets de taille micrométrique utilisés dans cette étude. Par optimal, nous faisons référence à la fonctionnalité cible du dispositif qui consiste à déposer tous les composants contenus dans une goutte d'eau dans une zone centrale bien définie. Bien sûr, à forte concentration, comme on le verra dans les expériences ultérieures, le dépôt final peut être plus grand que la taille du piédestal. Néanmoins, l'expérience montre qu'à faible concentration, les éléments peuvent être concentrés de manière déterministe sur le piédestal et ce de manière répétitive.

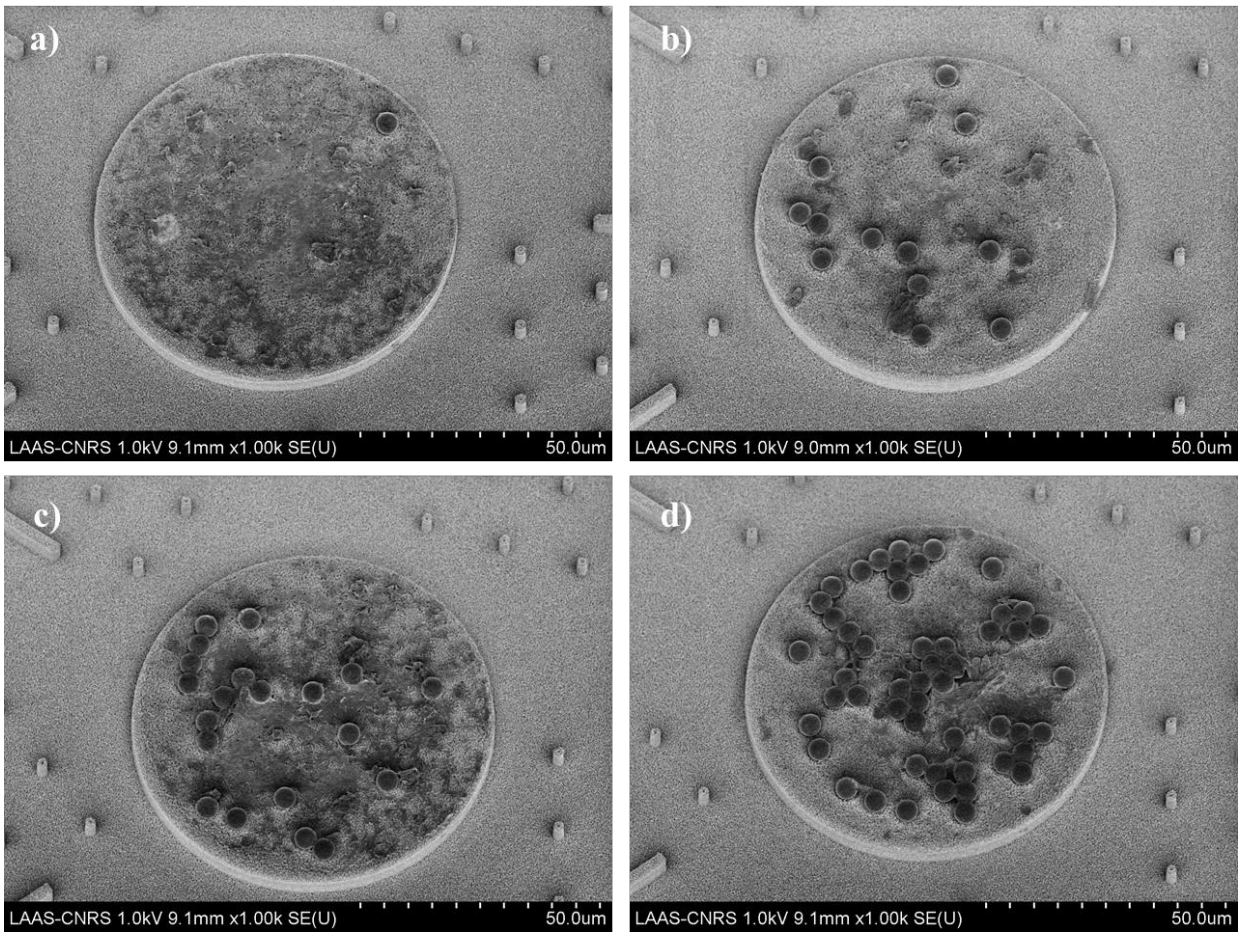


Figure 4 Images obtenues au Microscope Electronique à Balayage (MEB) de gouttes évaporées sur nos concentrateurs SH hiérarchiques contenant différentes concentrations nominales de microbilles de Polystyrène : a) en nominal 1 bille dans la goutte, b) en nominal 10 billes dans la goutte, c) en nominal 25, d) en nominal 50.

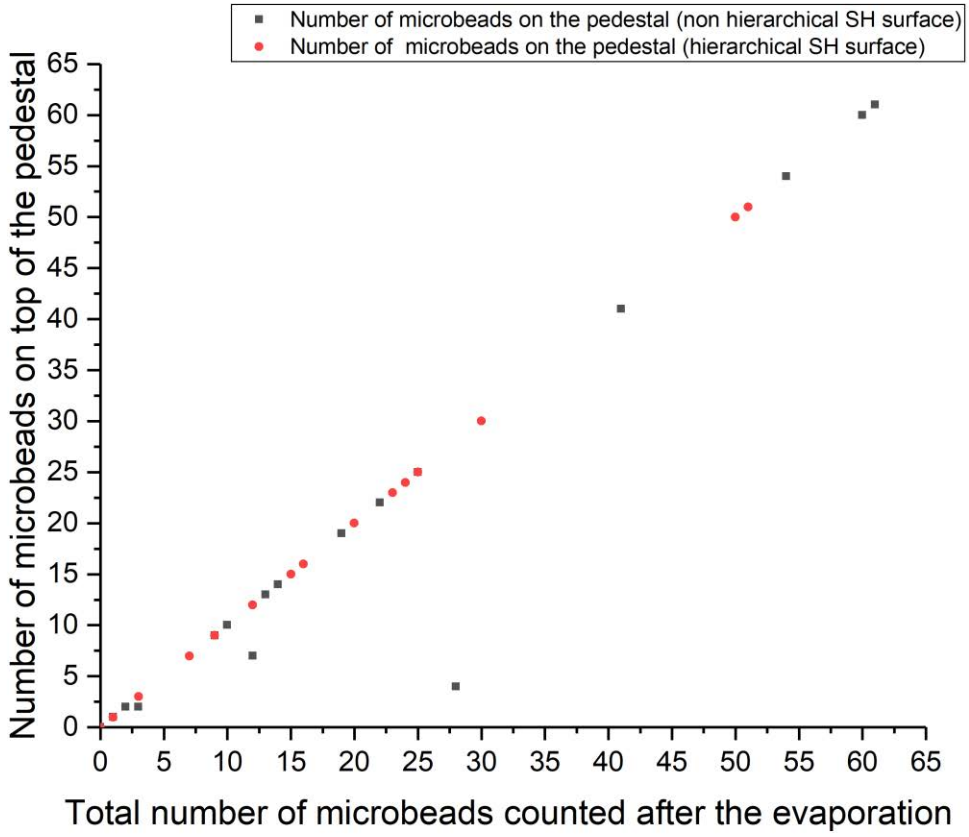


Figure 5 Nombre de microbilles sur le piédestal en fonction du nombre total de microbilles dans la goutte pour le dispositif hiérarchique SH (points rouges) et le dispositif non hiérarchique SH (points noirs).

1.3 Évaporations de gouttes contenant de l'ADN de phage lambda

Protocole

L'ADN du phage lambda a été acheté auprès de New England BioLabs. Il a été marqué à l'aide de YOYO-1 acheté chez Thermo Fischer Scientific. La concentration initiale était de 500 µg/mL avec un poids molaire de $3{,}2x10^7$ g/mol. La concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000C. Plusieurs dilutions en cascade ont été réalisées pour atteindre une concentration allant jusqu'à 100 aM. Des gouttes de 6 µL ont été déposées sur la surface par pipetage manuel. L'évaporation a eu lieu dans les conditions ambiantes de la salle blanche. Après l'évaporation, le dépôt a été observé avec un microscope optique fluorescent Olympus et avec le microscope électronique à balayage Hitachi S-48000. L'imagerie a été réalisée sur le piédestal et sur les micropiliers premiers voisins du piédestal. Pour mieux voir les brins d'ADN, l'échantillon a été incliné à 30°. L'image a été prise avec une tension d'accélération de 1 kV à un courant de 10 µA.

La capacité du dispositif à concentrer des éléments d'intérêt biologiques a ainsi été testée à l'aide de molécules d'ADN solubilisées dans de l'eau Ultra-Pure (UPW) de salle blanche à des concentrations connues. Le choix de ce type de solution a été dicté par le fait évident que l'ADN est une macromolécule d'intérêt pour l'exobiologie. La molécule d'ADN du phage lambda (ADN-λ) contient 48502 paires de base, étirée cette molécule présente une double hélice de longueur théorique égale à 16,5 µm. De nombreuses études ont montré que cette longue molécule peut être étirée et peignée par les forces capillaires lors de l'évaporation de solutions aqueuses la contenant[1–3]. Nous avons utilisé des molécules d'ADN double brins provenant du phage lambda marquées avec un intercalant fluorescent (YOYO-1) pour pourvoir les détecter par épifluorescence. La figure 6 montre le résultat de l'évaporation d'une goutte de 6 µL d'eau UPW en salle blanche contenant du λ-ADN marqué avec du YOYO-1 à une concentration de 1 fM. La figure 6a) est une vue d'ensemble de toute la région couverte par la goutte après dépôt par pipetage, où un seul point fluorescent est observable juste à la position du piédestal central. Dans la figure 6b), un zoom sur cette tache fluorescente permet d'observer clairement les bords du piédestal de 80 µm couvert de matériau fluorescent attribué aux molécules d'ADN et possiblement aux contaminants de l'eau UPW. Au bord du piédestal, on peut observer un fort signal de fluorescence.

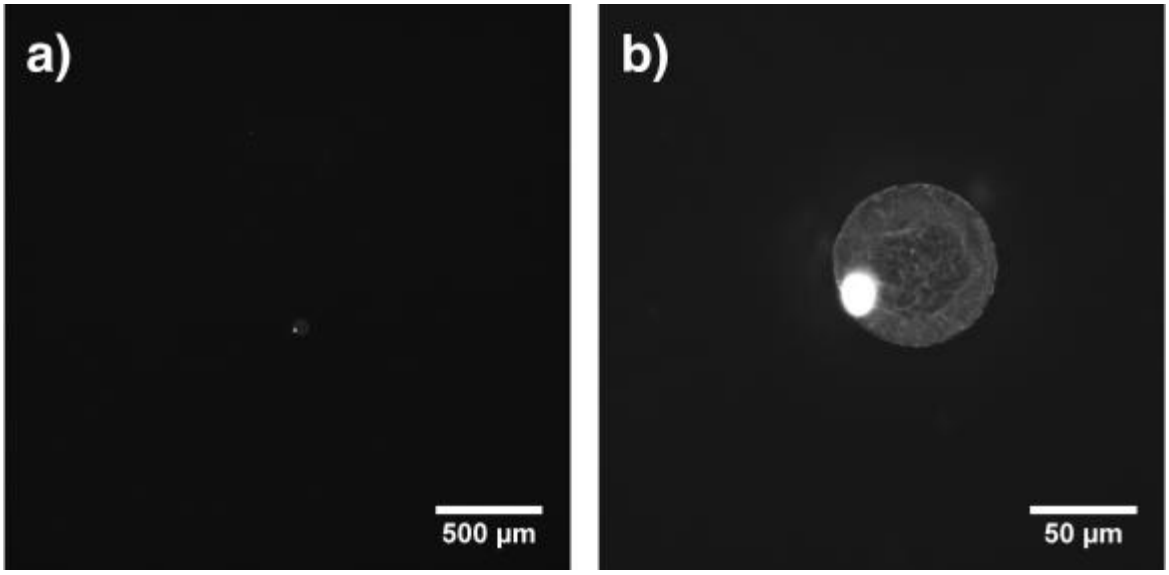


Figure 6 Images de microscopie par épifluorescence de la surface après l'évaporation d'une goutte d'eau UPW contenant des molécules d'ADN du phage lambda (marquées avec YOYO-1) à une concentration nominale de 1fM. L'image 8a) montre la surface entière du dispositif et l'image 8b) est un zoom sur le piédestal central du dispositif SH hiérarchique.

Le dépôt final sur le piédestal a ensuite été caractérisé par Microscopie Electronique à balayage (MEB) (figure 7). Dans la figure 7a), un résidu recouvre la totalité du piédestal. Dans cette zone, les brins de λ-ADN ne peuvent pas être identifiés individuellement en MEB car ils sont masqués par cette couche résiduelle.

Nous avons donc étendu l'inspection MEB aux micro-piliers premiers voisins du piédestal pour vérifier si des brins d'ADN n'ont pas été peignés à la fin de l'évaporation. Les figures 7b) et c) présentent des vues agrandies de deux d'entre eux. Il est possible de distinguer des brins de λ-ADN qui ont été peignés pendant l'évaporation et qui pour certains sont suspendus entre les nano-piliers.

En inspectant la surface au MEB, nous avons été capables d'observer des brins d'ADN seulement sur les micro-piliers les plus proches du piédestal. Comme l'atteste l'image en l'épifluorescence de la figure 6, de nombreuses molécules d'ADN recouvrent également le piédestal mais elles ne peuvent pas être observées individuellement au MEB car les contaminants provenant de la solution forment une couche résiduelle. Sur la figure 7a), l'agrégat 3D de molécules d'ADN non peignées (en haut à droite de l'image), observable en microscopie à fluorescence au bord du piédestal, est également visible.

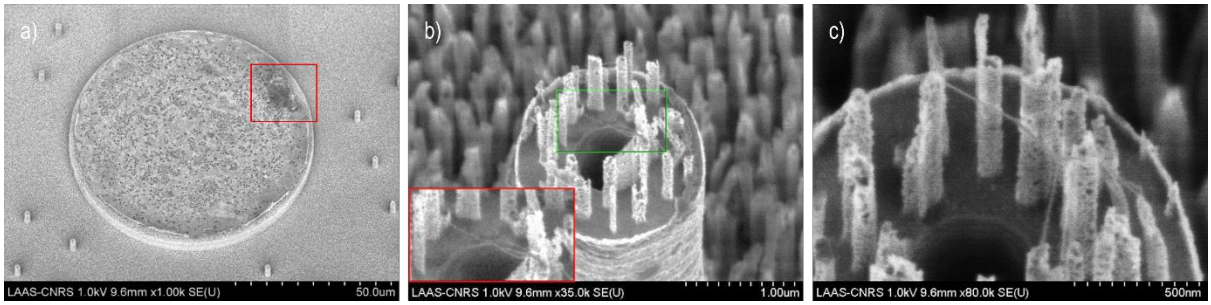


Figure 7 Images de microscopie électronique à balayage de la surface d'un dispositif SH hiérarchique après l'évaporation d'une goutte d'eau UPW contenant des molécules d'ADN du phage lambda à une concentration de 1 fM. a) Vue d'ensemble du piédestal, le dépôt 3D d'ADN non peignée est encadré en rouge b, c) Vues agrandies des micropiliers premiers voisins du piédestal où l'on peut distinguer les brins d'ADN parfois suspendus entre des nano-piliers.

Ces expériences montrent qu'à la fin de l'évaporation, les brins d'ADN sont localisés en grande majorité sur le piédestal central (caractérisation en fluorescence de la figure 6), et ce même pour une concentration aussi faible que 100 aM. En raison du fait que les molécules d'ADN peuvent être peignées par les forces capillaires, certains brins peuvent toutefois également être observés au sommet des tous premiers micro-piliers entourant le piédestal, mais aucun d'entre eux n'a pu être observé en dehors de cette région centrale. Une fois de plus nous caractérisons le bon fonctionnement du dispositif de concentration, mais ici dans le cas de molécules d'intérêt potentiel pour l'exobiologie. La longueur de l'ADN utilisé ici (16 µm) montre que certains éléments minoritaires peuvent être adsorbés à la surface de l'échantillon juste à côté du piédestal. Dans l'absolu, avec ce type de molécules, il sera donc intéressant de sonder le piédestal et d'élargir la zone sondée de quelques microns afin de ne passer à côté d'aucun spectre Raman d'intérêt.

1.4 Evaporation d'eau de neige collectée sur le terrain

Protocole

Une goutte de 6 µL issue d'un flocon de neige récolté en haute montagne a été évaporée dans des conditions ambiantes à la surface d'un dispositif SH hiérarchique. Le dépôt a été observé au microscope électronique à balayage (MEB) avec un système Hitachi S-48000. Cet équipement est doté d'un système de microanalyse par rayons X NORAN System Six. L'analyse élémentaire a été réalisé à une tension d'accélération du faisceau d'électrons de 30 kV.

Pour de futures applications environnementales, il est important d'étudier si le mécanisme de concentration à l'œuvre dans nos dispositifs est affecté lorsque des échantillons d'eau de terrain, c'est-à-dire prélevés dans l'environnement naturel, sont analysés. La question principale est de savoir si l'état CB peut être maintenu jusqu'à la fin du processus d'évaporation, et ce même si la goutte contient de nombreux éléments dissous et/ou en suspension. Pour connaître la robustesse de ce concentrateur, nous avons donc réalisé plusieurs expériences en utilisant de l'eau prélevée *in situ*. Dans ce but, nous avons en particulier manipulé des échantillons de neige prélevés à 5 cm sous la neige fraîche à une altitude de 2330 m dans les Pyrénées françaises (versant nord du Mont Saint-Barthélemy GPS : 42º 47' 0.5'' N / 1º 43' 0.97'' E le 7 février 2021, à ~1 pm). Les échantillons ont été collectés dans des tubes Eppendorf.

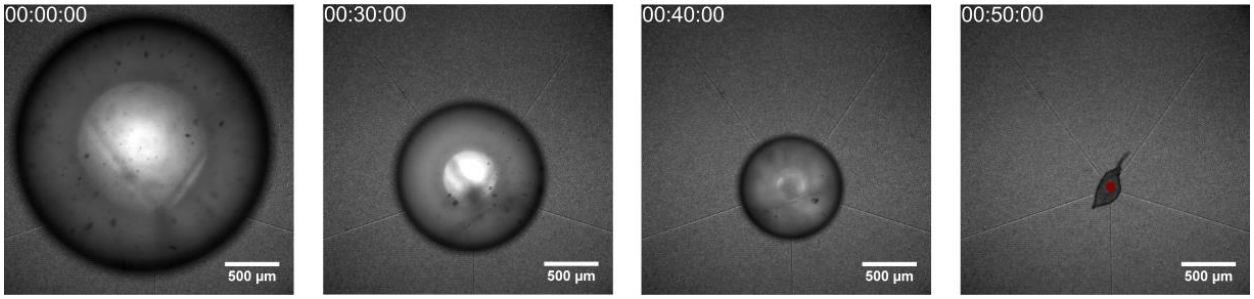


Figure 8 Micrographies optiques de la cinétique d'évaporation d'une goutte de 6µL de neige fraîche de montagne recueillie in situ sur un dispositif superhydrophobe hiérarchique (vue de dessus) a) t = 0 minutes, b) t = 30 minutes, c) t= 40 minutes, d) t = 50 minutes.

L'observation visuelle directe de la solution dans le tube Eppendorf a révélé que les échantillons contenaient des particules qui, après sédimentation, laissent un dépôt rougeâtre au fond du tube. Ce type d'échantillon est donc très bien adapté pour étudier l'effet des impuretés sur les propriétés du concentrateur. La figure 8 présente quelques images (vue de dessus) du processus d'évaporation d'une goutte de 6 µL de neige fondue déposée sur un dispositif hiérarchique SH. Pendant le processus d'évaporation, il a été possible d'observer les particules se déplacer de manière erratique à l'intérieur de la goutte. Cependant, comme on peut le constater sur la figure 8, l'auto-alignement de la goutte sur le piédestal central est toujours observé et après évaporation complète, un dépôt bien centré est observé à la convergence des lignes de guidage. Sur l'image de droite, le piédestal a été coloré en rouge pour attester de la localisation du dépôt final. On constate que même avec ce type d'échantillon, le concentrateur est toujours capable de retarder la transition CB - W jusqu'à ce que le bord de la goutte atteigne le piédestal. Bien entendu, dans ces conditions, le dépôt 3D final occupe un grand volume en raison de la forte concentration d'entités en suspension et sa section s'est avérée être plus grande que la taille du piédestal (voir figure 8d). Pour pousser plus loin l'analyse, la composition élémentaire du dépôt de neige a été analysée à l'aide d'une analyse élémentaire au sein du MEB (EDX, spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie). La figure 9 montre un spectre typique obtenu lors du balayage du faisceau d'électrons sur la région centrale du piédestal d'analyse. Les ions hydrosolubles classiques, les espèces métalliques et le carbone élémentaire sont aisément identifiés. Il est intéressant de noter que cette composition est très similaire à celle qui a été rapportée pour la poussière saharienne[4].

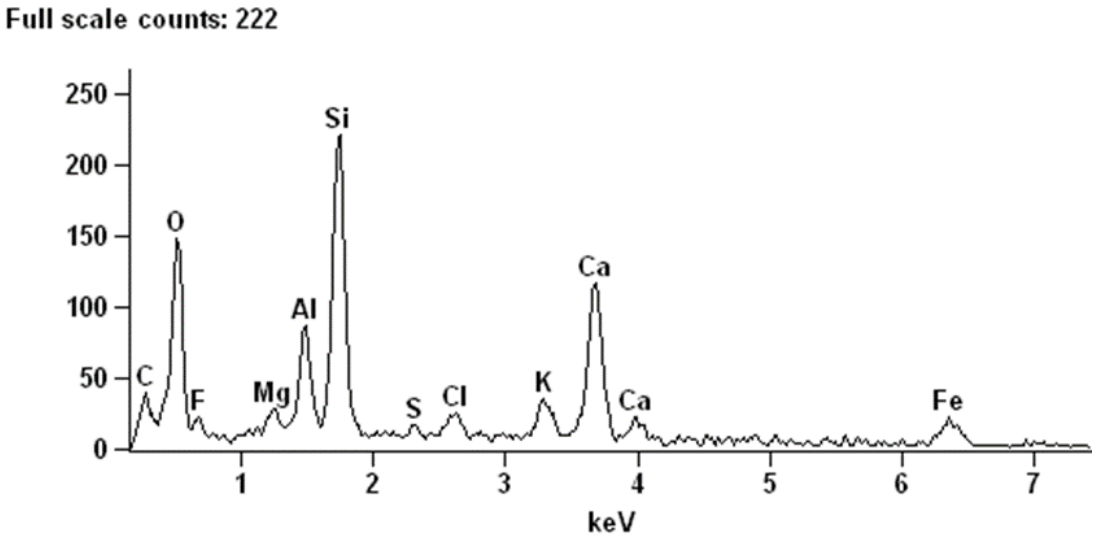


Figure 9 Analyse EDX du dépôt obtenu après concentration d'un échantillon de neige fraîche révélant la présence de minéraux et de métaux typiques de la composition de la poussière saharienne.

Ce résultat est cohérent avec le fait que, le 6 février 2021, un jour avant la collecte de la neige, un épisode de Sirocco s'est produit sur l'ensemble des Pyrénées. Le centre de prévision météorologique de Barcelone a produit une carte de prévision à partir de laquelle on peut estimer que le dépôt massif sur les Pyrénées est de ~2 g/m^2. D'après des estimations grossières, cela correspondrait à environ 10^{-7} g de poussière de sable dans la goutte et à une épaisseur finale du dépôt de l'ordre de quelques micromètres compte tenu de la surface finale du résidu, ce qui est tout à fait compatible avec l'observation que nous avons réalisée. La conclusion est que le dépôt de contaminants s'est produit sur le piédestal, même à de telles concentrations massiques. Les expériences utilisant des échantillons d'eau de diverses origines ont été reproduites plusieurs fois : eau du robinet, eau en bouteille, eau de mer. Dans tous les cas, les surfaces SH hiérarchisées se sont révélées systématiquement capables de concentrer efficacement les éléments à l'intérieur de la goutte vers la région centrale du dispositif. La figure 10 présente une évaporation représentative obtenue avec de l'eau de mer profonde (prélevée à 2000m), où le dépôt final est dominé par les processus de cristallisation des sels marins.

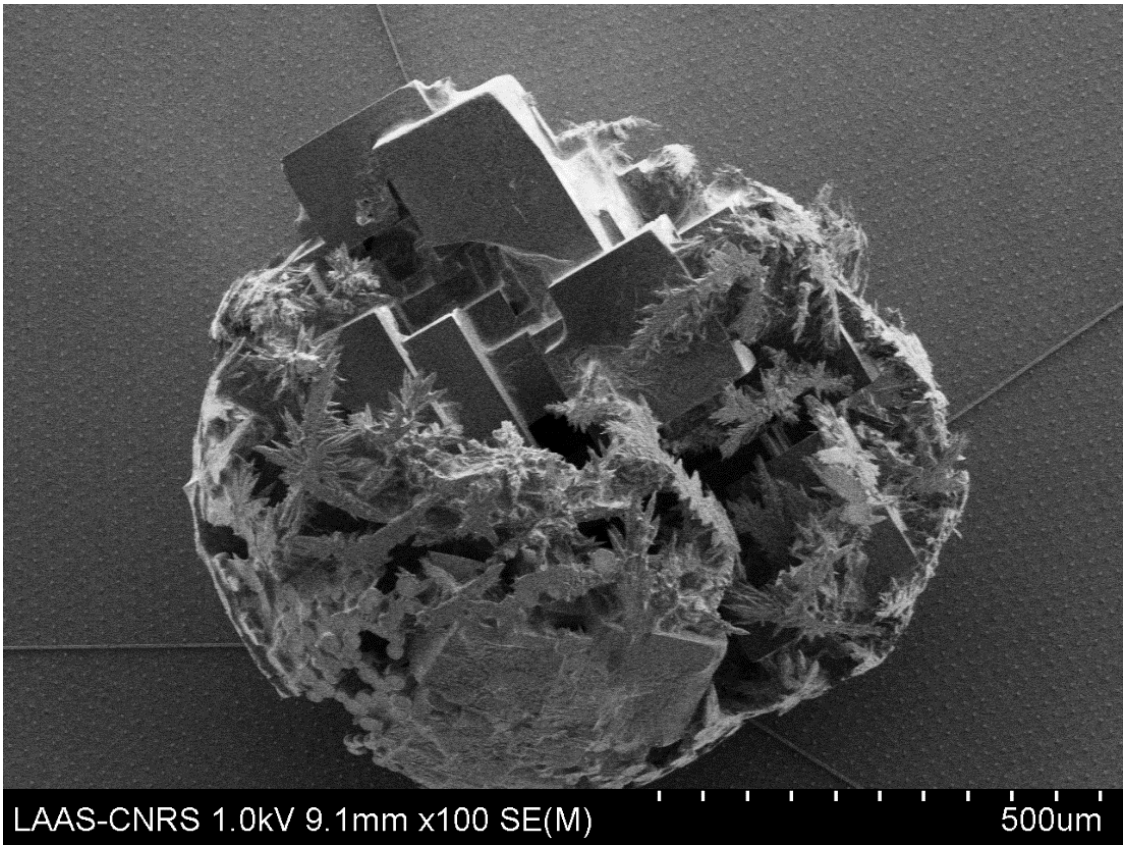


Figure 10 . Image de microscopie électronique à balayage du piédestal analytique d'un dispositif SH hiérarchique après l'évaporation d'une goutte de 6 µL d'eau de mer profonde (2000m de profondeur).

1.5 Capture de particules en suspension dans l'air

Protocole :

Des fleurs de marguerite ont été collectées dans des jardins publics et séchées à 60°C pendant 3 heures. Les pétales ont été retirés manuellement. Une goutte de 6 µL a d'abord été déposée sur la surface hiérarchique SH. Le pollen a été détaché de l'étamine en utilisant une aiguille et en grattant délicatement à une distance de 20 cm au-dessus d'une goutte en évaporation sur un dispositif SH hiérarchique. Pour éviter toute contamination supplémentaire, la surface a été placée dans une boîte hermétique. L'évaporation de la goutte est effectuée dans des conditions ambiantes. L'expérience de contrôle a été réalisée dans les mêmes conditions mais cette fois-ci, aucune goutte n'a été déposée sur la surface d'un dispositif SH hiérarchique. La surface a ensuite été observée avec le microscope optique Olympus en mode fluorescent et champ clair et avec le MEB Hitachi S-4800.

Comme indiqué précédemment, après évaporation complète d'une goutte sur la surface hiérarchique SH, tous les éléments contenus dans la goutte sont dirigés sur le piédestal. Ces éléments peuvent être ceux dilués ou en suspension dans la goutte (comme montré précédemment) mais aussi ceux collectés par la goutte lors de son évaporation à travers l'interface liquide/air. Ainsi la goutte pourrait servir de réceptacle à l'analyse – avec la même méthode – non pas d'un échantillon liquide mais des aérosols contenus dans l'atmosphère gazeuse autour de celle-ci. Pour démontrer cette possibilité, nous avons utilisé du pollen de marguerite comme aérosol modèle. Il a été détaché d'une fleur fraîchement récoltée à 20 cm de la surface d'un dispositif SH hiérarchique sur lequel une goutte d'eau de 6 µL UPW a été préalablement déposée. Comme contrôle, la même expérience a été réalisée sur la même surface mais sans goutte préalablement déposée. Le pollen étant auto-fluorescent[5] , nous avons utilisé cette propriété pour caractériser la localisation des grains de pollen sur la surface des dispositifs. Pour mieux repérer les particules de pollen, nous avons également observé les surfaces par MEB (Figure 11). Ces caractérisations indiquent que lorsqu'une goutte s'évapore sur le dispositif SH alors que le pollen de marguerite est dispersé dans l'atmosphère, on peut retrouver un dépôt sur le piédestal à la fin de l'évaporation (Figure 11a). Celui-ci est composé de sphères épineuses caractéristiques des pollens de marguerites mais aussi d'autres éléments. D'autre part, lorsqu'aucune goutte ne s'évapore à la surface, il n'a pas été possible d'observer de particules de pollen sur le piédestal mais nous avons pu observer quelques particules de pollen individuelles positionnées de manière aléatoire sur toute la surface du dispositif (voir figure 11b).

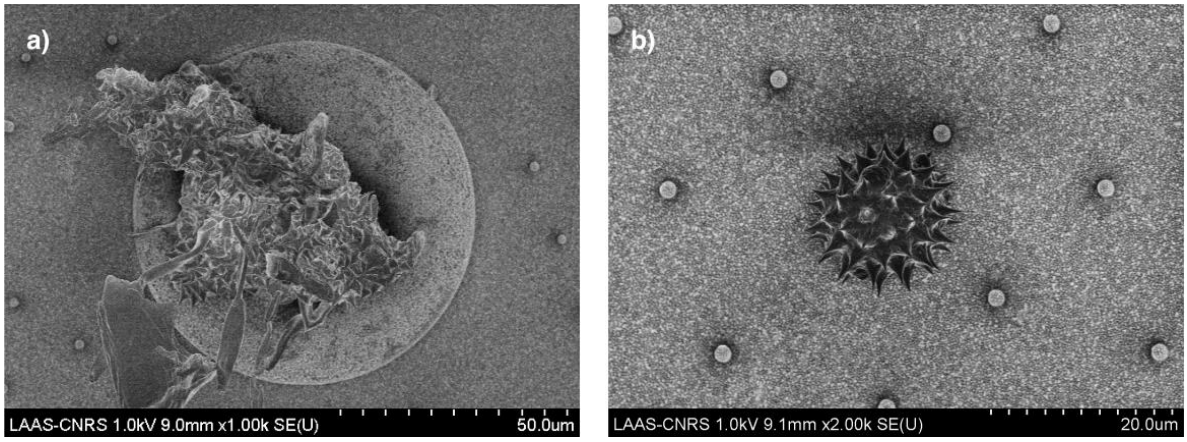


Figure 11 Images par microscopie électronique à balayage de la concentration d'aérosols de pollen de marguerite. a) Mise au point sur le piédestal après l'évaporation d'une goutte en contact avec des particules de pollen où l'on peut observer des agrégats de particules de pollen concentrés sur le piédestal. b) Observation d'une particule de pollen de marguerite située au hasard sur la surface d'un dispositif sec (expérience de contrôle)

Nous estimons que dans nos conditions d'expérience, la probabilité qu'une particule de pollen se retrouve au hasard sur la surface du piédestal est de 1 sur 1400. Mais les expériences réalisées montrent qu'en utilisant une goutte sessile comme collecteur, cette probabilité atteint 1. Il en découle que les surfaces superhydrophobes hiérarchiques sont polyvalentes et pourraient être utilisées pour analyser la qualité de l'air.

1.6 Discussion

Le rôle de la rugosité à l'échelle nanométrique et du niveau hiérarchique de la topographie sur le mode d'évaporation et la transition Cassie-Wenzel, a été prouvé expérimentalement et discuté par X. Chen et al.[6]. Nous montrons ici que le procédé de gravure sans masque du silicium noir (BSi) permet de maintenir l'état CB jusqu'à ce que les bords des gouttes atteignent la circonférence du piédestal, de manière systématique. Le silicium noir RIE sans masque améliore ainsi la qualité du concentrateur et la reproductibilité des différentes étapes de l'évaporation. Quantitativement, le concentrateur laisse les éléments sur une surface prédéterminée de ~5000 μm^2, ce qui est une amélioration par rapport aux 7800 μm^2 rapportés avec le design non hiérarchique de Song et al.[7]. Ceci est également une amélioration par rapport au système utilisant un piège superhydrophile entouré d'une surface superhydrophobe[8,9] qui concentre les éléments en suspension sur une surface de 6400 μm^2. La capacité d'enrichissement des dispositifs a pu être caractérisée par le rapport entre le volume initial des gouttes et la surface de la zone de dépôt final. Ce rapport volume/surface peut être interprété comme l'épaisseur d'une couche de liquide au-dessus d'une surface donnée, qui est évaporée sur cette surface. Les dispositifs que nous avons présentés dans ce travail présentent un rapport d'enrichissement de 1200 $\mu l/mm^2$, ce qui équivaut à l'évaporation d'une colonne d'eau virtuelle de 1,2 m au-dessus du piédestal.

Même lorsque l'eau distillée ultra pure est utilisée, les expériences ont révélé qu'une certaine quantité de matière est déposée sur le piédestal analytique à la fin du processus de concentration. Ceci met en évidence l'extrême efficacité de la surface SH hiérarchique pour localiser dans cette région tous les composés non volatiles présents dans la goutte évaporée. En outre, en partant de deux sources d'eau différentes – Milli-Q UPW et clean room DIW –, nous avons montré que les résidus observés sont significativement différents. Etant donné que durant l'expérience les deux gouttes se sont évaporées simultanément sur des surfaces provenant du même lot de fabrication et dans le même environnement, nous excluons la possibilité que cette différence puisse résulter d'une contamination extrinsèque provenant de la surface du dispositif ou de son environnement. Cette méthode de concentration constitue donc une technique comparative efficace de la pureté de l'eau qui pourrait être utilisée pour les industries des semi-conducteurs ou pharmaceutiques[10]. L'analyse des bactéries contaminant l'eau ultra pure a déjà été réalisée en recourant à des techniques élaborées de concentration[11]. En comparaison, ce type de dispositifs SH hiérarchiques procède de manière plus accessible et avec un temps de réponse réduit.

Nous avons également montré que ces dispositifs sont efficaces pour concentrer des brins d'ADN, ouvrant la voie à d'éventuelles applications biologiques ou environnementales. La robustesse du dispositif a été prouvée en évaporant des échantillons d'eau de terrain collectés *in situ*, plus chargés en éléments solides. Malgré la forte concentration de particules à l'intérieur de ces échantillons, sans aucune dilution après collecte, la possibilité de concentrer les éléments sur le piédestal de manière très reproductible (les expériences ont été reproduites au moins 50 fois) a été démontrée. Nous avons également constaté que les éléments non volatiles présents dans les eaux naturelles (rivière, neige, mer, etc.) peuvent finalement cristalliser sur le piédestal, la capacité de concentration du dispositif n'est pas affectée par l'abondance des éléments dans l'échantillon.

La préconcentration par évaporation du solvant étant une technique largement utilisée pour détecter des traces dans des échantillons environnementaux[12], nous démontrons dans ce chapitre que ces dispositifs SH hiérarchiques couplés à la microanalyse peuvent être utilisés pour analyser la composition des éléments présents dans l'eau environnementale.

Enfin, nous avons également vu que les contaminants présents dans l'atmosphère (du pollen par exemple) peuvent être concentrés avec ces dispositifs SH hiérarchiques. Ce mécanisme de collecte de particules en suspension dans l'atmosphère par une goutte d'eau sessile placée sur une surface superhydrophobe est déjà utilisé dans la nature. En effet, les plantes gymnospermes produisent une goutte de pollinisation qui capture le pollen flottant présent dans l'atmosphère pour finalement le concentrer sur l'organe reproducteur[13,14].

2 Caractérisation des propriétés plasmoniques

Le procédé de fabrication du silicium noir (Black Silicon ou BSi) peut générer des dépôts (oxyfluorure de silicium) à la surface et sur les parois des nano-piliers. Nous avons vu en effet que lors de la gravure plasma, une couche d'oxyfluorure de silicium se dépose sur la surface. Avant d'étudier les propriétés plasmoniques, il est donc important de vérifier l'état de surface post-gravure. La figure 12 représente les deux structures types (avant que les nano-piliers ne soient courbés) étudiées pour caractériser les propriétés plasmoniques.

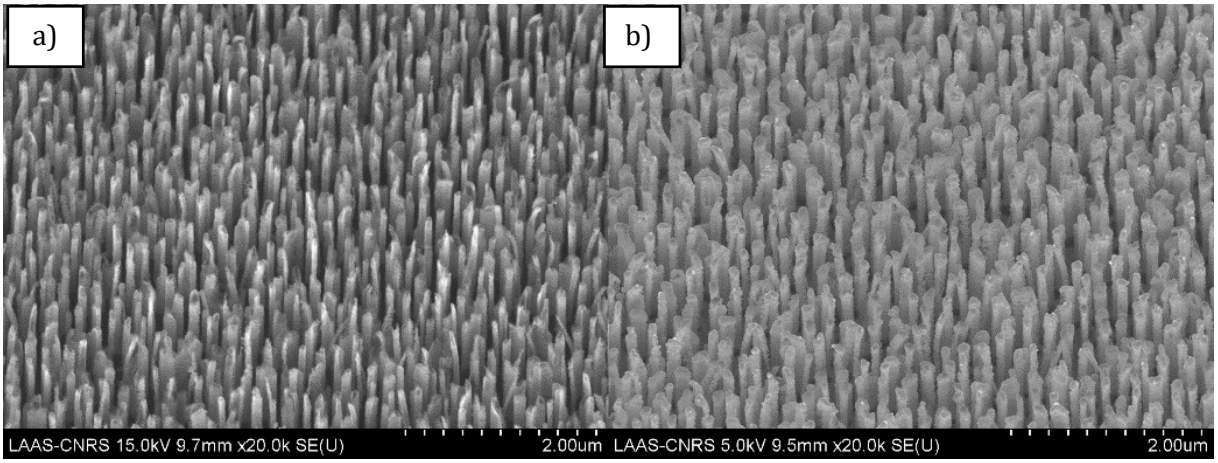


Figure 12 Images en microscopie électronique à balayage des structures étudiées pour caractériser les propriétés plasmoniques a) nano-piliers de silicium b) nano-piliers de silicium recouverts de 100 nm d'Ag sur une couche d'accroche de 5 nm de Ti.

2.1 Caractérisation du bruit de fond Raman : influence du procédé de fabrication.

La figure 13 représente le spectre Raman non exalté du silicium noir (BSi) post-gravure. Ce spectre a été acquis en utilisant un laser 532 nm avec une puissance de 0.1 mW à travers un objectif x100 (ouverture numérique NA = 0.9) pendant 5 secondes et 2 accumulations. La lumière a été diffractée sur un réseau 600 lignes par mm.

Sur ce graphique, nous pouvons observer les phonons optiques transverses (TA) du substrat de silicium de premier et second ordre à 520 cm^{-1} et 960 cm^{-1} (bande entre 920 et 1045 cm^{-1})

respectivement. Un phonon acoustique transverse de second ordre en 305 cm^{-1} peut aussi être observé.[15] Ce spectre est caractéristique du silicium monocristallin qui constitue le substrat de départ.

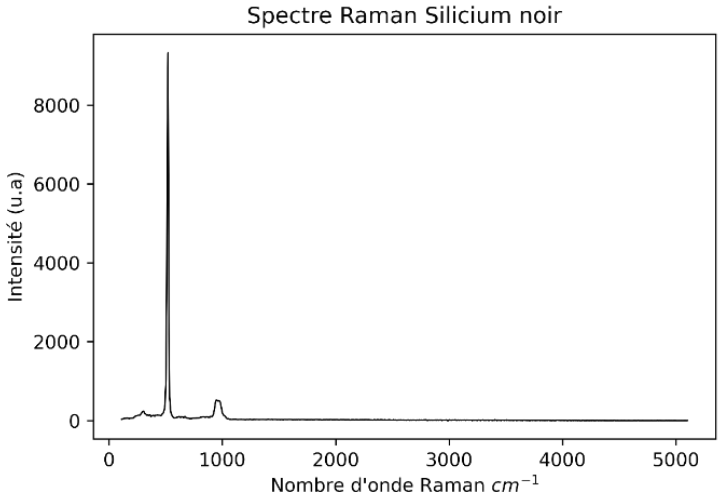


Figure 13 Spectre Raman (non exalté) du silicium noir après la gravure ICP-RIE sans masque (Le plasma est réalisé à 20 °C, les débits de gaz sont fixés à 38 sccm pour le SF_6 et 45 sccm pour l'O_2 et dure 5 minutes avec une puissance RF de 600 W et une puissance RF de 30 W. La pression est réglée à $10^{-2}mBar$)

La figure 14 présente le spectre moyen (90 spectres acquis) pour lequel différents traitements ont été effectués avant le dépôt d'argent. Les paramètres d'acquisitions sont les suivants : laser 532 nm, temps d'acquisition 250ms, objectif x 50 (ouverture numérique NA =0.8), réseau 600 l/mm.

Le spectre représenté en noir sur cette figure est un spectre moyen SERS que l'on peut obtenir après le dépôt d'argent pas CVD de 100 nm sur la couche d'accroche de titane de 5 nm. Ce dépôt est effectué directement après l'étape de gravure. Ce spectre présente plusieurs pics dans la zone [500 – 1700 cm^{-1}]. Le spectre représenté en bleu quant à lui, est le spectre SERS d'une surface qui subit un plasma O_2 (800W 5min) avant le dépôt d'argent. On constate une réduction de l'intensité des pics Raman dans la zone [500 – 1700 cm^{-1}]. Enfin, le spectre rouge correspond au spectre SERS d'une surface ayant subi un plasma Ar (100 W, 60 s) avant le dépôt d'argent. Sur ce dernier, les pics dans la zone [1000 -1800 cm^{-1}] ont quasiment disparu. Les pics à 1382 cm^{-1} et 1605 cm^{-1} peuvent être dus à des traces de carbone. Le pic à 480 cm^{-1} , une large bande centrée autour de 720 cm^{-1} et enfin un pic à 954 cm^{-1} restent présents sur le spectre.

La caractérisation des nano-piliers de silicium en Raman avant et après le dépôt d'argent est riche d'enseignement. Premièrement, la gravure RIE utilisée pour former les nano-piliers génère des composés sur la surface ; il y a donc une forme de contamination de celle-ci qu'il faut supprimer. Deuxièmement, ces composés de surface ne sont pas observables en Raman "classique" (voir figure 13) mais le sont en SERS (figure 14 spectre noir) dès lors que des nano-antennes plasmoniques en argent décorent ces piliers. Troisièmement, ces composés de surface proviennent bien de la gravure et non du dépôt d'argent puisqu'il apparaît possible de les enlever par un décapage plasma de surface avant le dépôt métallique (figure 14 spectre rouge). L'hypothèse la plus probable est que ces composés sont issus du procédé de gravure : probablement la couche de passivation d'oxyfluorure de silicium qui est spontanément formée pendant la gravure anisotrope du silicium. Nous constatons

également que les traitements de surface post-gravure, et en particulier le plasma à l'argon, permettent d'éliminer sur les spectres SERS les pics dans la région spectrale [1000 – 2000 cm^{-1}]. Enfin, une bande centrée en 740 cm^{-1} apparait sur tous les spectres SERS (après dépôt de la couche d'argent), quel que soit le traitement post-gravure ; elle est donc caractéristique du dépôt métallique.

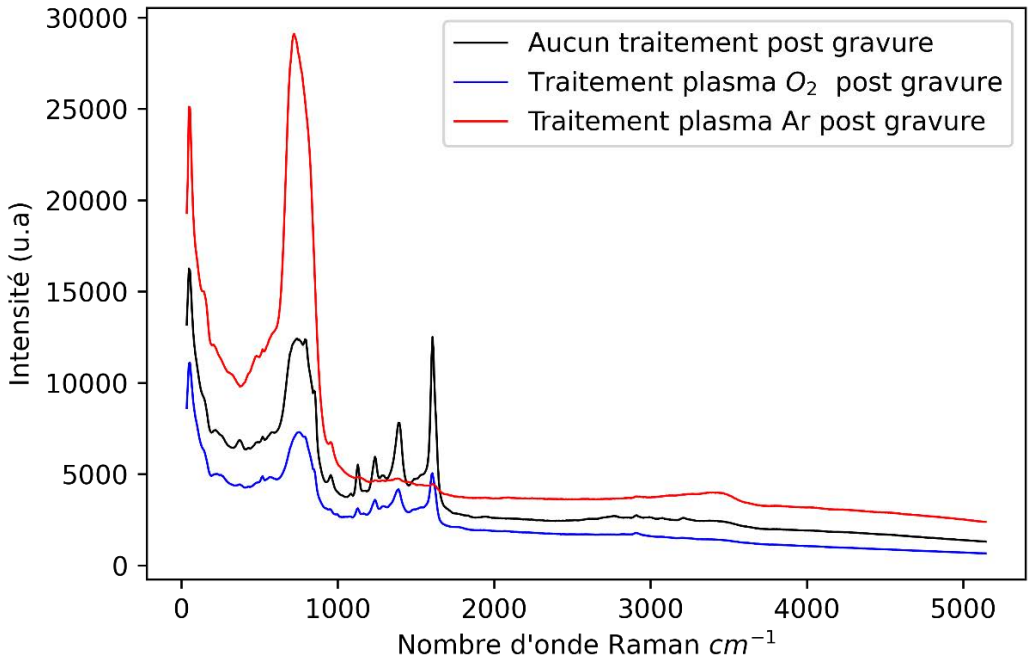


Figure 14 Spectres Raman (SERS) moyens pour des surfaces (structurées et après dépôt d'argent) ayant subi : aucun post traitement avant dépôt d'argent (noir), plasma O_2 5min 800W (bleu), plasma Ar 60s, 100W (rouge)

Table 1 Liste les différents pics détectés sur les spectres SERS des échantillons dont les spectres sont représentés sur la figure 3.

Pics spectre moyen BSi Ag sans traitement après gravure	Pics spectre moyen BSi Ag traitement par plasma O2 après gravure	Pics spectre moyen BSi Ag traitement par plasma Ar après gravure
	225.4	
373.4	373.4	
486.1		479.5
	519.0	
577.9	564.8	
739.5	752.3	720.3
790.7	790.7	
954.8	948.5	954.8
1128.2	1128.2	
1237.9	1237.9	
1292.3	1292.3	
1394.0	1388.1	1382.1
1605.5	1605.5	1605.5
1946.6		
2767.0		
2911.4	2906.5	
3211.3		

2.2 Influence de la courbure des nano-piliers

Afin d'avancer dans la compréhension des spectres SERS provenant des dispositifs après fabrication, nous comparons l'évolution des spectres SERS lorsque les nano-piliers sont courbés (voir chapitre 2). Rappelons que le passage d'une phase liquide à la surface des échantillons permet d'incliner les nano-piliers en raison des forces capillaires liées au passage du ménisque. Nous avons donc utilisé une structure nettoyée par plasma argon avant le dépôt métallique puis nous avons comparé le signal SERS qui provient d'une surface sur laquelle les nano-piliers se sont courbés lors de l'évaporation d'une goutte d'eau DI avec celui issu d'une surface qui présente des nano-piliers verticaux. La figure 15 présente le spectre moyen (90 spectres acquis) pour les deux types de surface. Le spectre de la surface « nano-piliers verticaux » a été multiplié par 4 pour plus de visibilité.

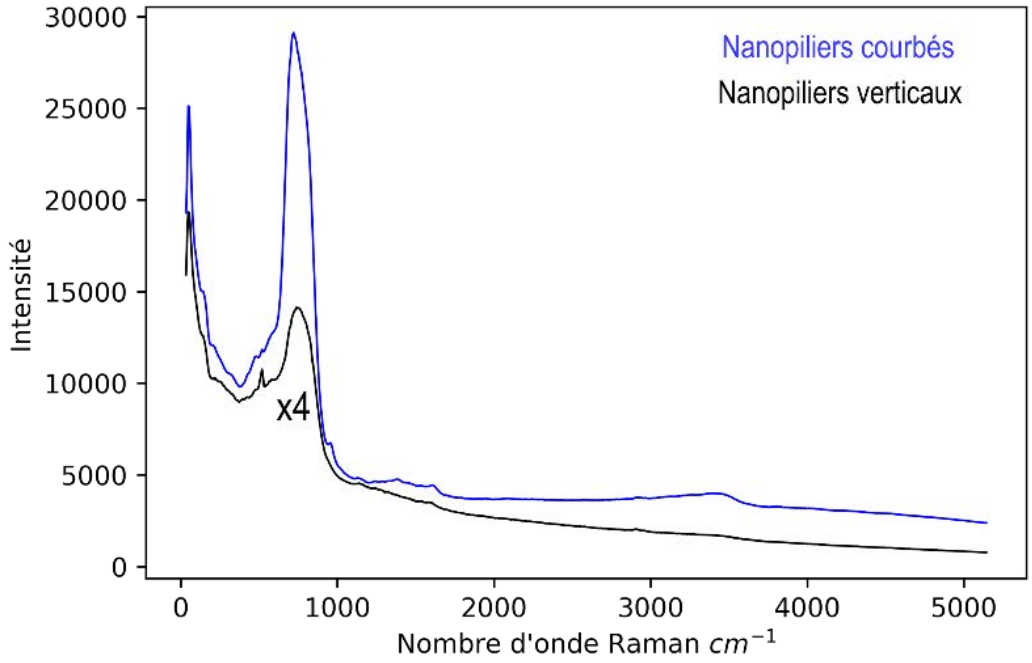


Figure 15 Spectre Raman moyen des surfaces dont les nano-piliers sont verticaux (noir) ou ont été courbés (bleu) par évaporation d'eau DI.

On peut constater que la structure où les nano-piliers ont été courbés présente un pic vers 740 cm^{-1} d'intensité supérieure à la structure « nano-piliers verticaux ». Le rapport des intensités moyennes entre ces deux courbes pour le pic à 740 cm^{-1} est de 8. Ce pic attribué aux nanoparticules d'argent formées sur et autour des nano-piliers est donc exalté de manière plus intense lorsque les piliers sont courbés et forment des petits groupes de piliers en proche proximité spatiale (voir chapitre 2). Nous concluons que la courbure des nano-piliers qui est inéluctable dès qu'une goutte

sera évaporée sur la surface des dispositifs est donc favorable à l'obtention de facteurs d'exaltation plus importants.

2.3 Résonance plasmonique

Nous avons donc cherché à mieux caractériser les résonances plasmoniques à l'origine de l'exaltation du signal Raman sur nos surfaces. La résonance plasmonique localisée de surface (LSPR) est généralement caractérisée par l'obtention d'un spectre d'extinction qui caractérise l'absorption et la diffusion inélastique de la surface en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente. Pour ce faire, il convient de réaliser une expérience de spectroscopie en transmission. En analysant la lumière transmise d'une source à travers un échantillon, l'absorption et la diffusion de celui-ci peuvent être caractérisées et par conséquent, son extinction. Dans le cas d'un substrat 2D en silicium, il n'est pas possible de réaliser cette expérience en transmission dans le visible. On utilise alors une expérience de microscopie en champ sombre. Concrètement dans le cas qui nous intéresse en normalisant le spectre de la lumière diffusée par la structure silicium noir (BSi ou Black Silicon) recouvert d'argent par le spectre de la lumière diffusée par le silicium noir (BSi), il est possible de déterminer la réponse optique propre aux nanoparticules d'argent et donc les résonances plasmoniques de ces nanoparticules.

La figure 16 est le spectre caractéristique de la réponse optique de nanoparticules d'argent en champ sombre pour une surface dont les nano-piliers ont été courbés. Il caractérise les propriétés plasmoniques de la surface. On observe un creux très large dans la courbe autour de 650 nm. Cette résonance très large est la signature du désordre des nanoparticules d'Ag à la surface de l'échantillon qui sont, comme nous l'avons vu au chapitre 2 dispersées en taille. De plus le spectre de la figure 16 correspond à une configuration de nano-piliers courbés ce qui introduit une autre dispersion dans les configurations inter-nanoparticules et donc dans les résonances.

Les pointillés vert, jaune et rouge correspondent respectivement aux longueurs d'onde des lasers disponibles sur le spectromètre Raman (532 nm, 638nm et 785nm).

A l'inverse donc d'une suspension colloïdale d'argent monodisperse pour laquelle les nanoparticules ont une dispersion en taille faible et donc une résonance plasmonique à bande étroite, la structure développée présente une résonance plasmonique large bande. En effet, le caractère aléatoire de la gravure sans masque crée une dispersion en taille de nano-piliers qui, elle-même, crée une dispersion en taille mais aussi en morphologie des dômes d'argent déposés au sommet des nano-piliers ou sur leurs flancs. Dès lors, il est possible d'obtenir des résonances plasmoniques qui s'étendent du visible au proche infrarouge. Une autre information importante que nous pouvons tirer de cette courbe et que, en sélectionnant la longueur d'onde excitatrice du laser Raman, nous ne sommes pas en résonance avec les mêmes sites de la surface. Ainsi, il est probable que le choix de cette longueur d'onde induit une sélection de points chauds différents sur la surface. Dans l'absolu, afin de maximiser le nombre d'événements de coïncidence entre les molécules et un point chaud de la surface il faudrait empiler les spectres obtenus à plusieurs longueurs d'onde. Dans la suite de ce travail, nous n'avons pas réellement mis en œuvre cette démarche et nous avons sélectionné la longueur d'onde de 532 nm qui correspond à un bon couplage avec les nanoparticules d'argent.

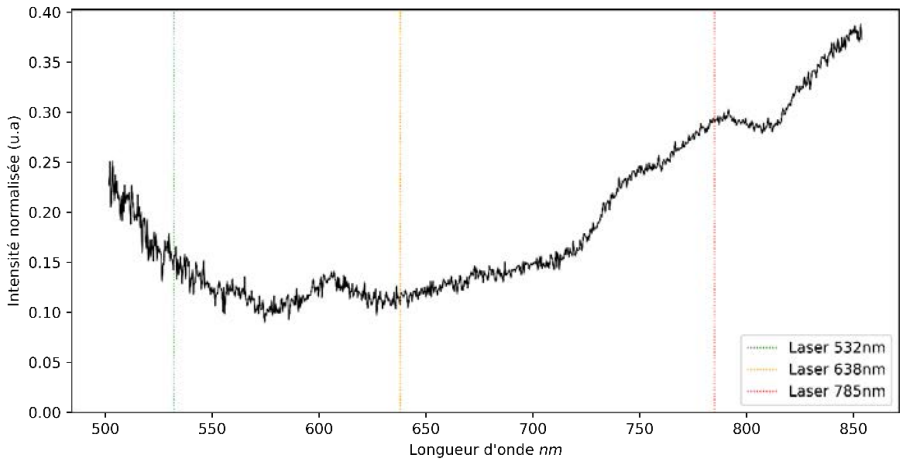


Figure 16 Spectre de la réponse optique de nanoparticules d'argent obtenue microscopie optique en champ sombre. Les raies des lasers disponibles sur le banc de mesure Raman sont représentées en pointillés.

2.4 Caractérisation par microscopie de fluorescence

Les nanostructures métalliques, grâce aux plasmons localisés de surface, peuvent exalter non seulement l'effet Raman mais aussi la fluorescence[16]. Une expérience simple est proposée ici afin d'obtenir l'estimation de la densité surfacique de points chauds par μm^2 au niveau du piédestal analytique. Cette caractérisation est basée sur l'exaltation de la florescence par des nanostructures métalliques (MEF).

Une surface de silicium noir (BSi), recouverts de nanoparticules d'Ag (épaisseur nominale du film d'Ag égale à 100 nm) après avoir été rincée avec de l'eau DI ultra-Pure (nano-piliers courbés) est observée en microscopie à épifluorescence (objectif x50 NA = 0.5, cube mCherry 550nm). Cette surface est représentative de la configuration obtenue sur un piédestal analytique après une expérience d'évaporation. On constate alors expérimentalement que des points lumineux intenses apparaissent et disparaissent spontanément sur la surface. Ce clignotement incessant du signal est attribué à des événements d'adsorption et de désorption moléculaire à la surface de l'échantillon. En effet, certains de ces événements moléculaires se produisent à proximité des points d'exaltation de la surface et on observe alors une tâche luminescente intermittente. Notre hypothèse afin de déterminer la densité de sites d'exaltation électromagnétique de la surface est donc de compter tous les sites de la surface sur lesquels on peut observer une tâche de luminescence. Dans notre expérience, afin de bien vérifier que ce phénomène de clignotement est dû à nos nanoparticules d'argent, deux surfaces différentes sont imagées : la première a été localement rayée à l'aide d'une pince (décapage local des nano-piliers et des nanoparticules métalliques) tandis que la seconde est intacte. Des vidéos de 250 images (100 ms d'exposition) ont été enregistrées. La figure 17 montre la projection de tous les points de la surface présentant un maximum local d'intensité sur les 250 images de la pile. Ainsi la projection des maximums d'intensité est présentée pour la surface rayée en figure 17a) et pour la surface intacte en figure 17b). Sur la figure 17a), la rayure peut être clairement distinguée. Sur le côté de la rayure, on peut observer des points lumineux distribués de façon homogène. En revanche, en b), où il n'y a pas de rayure, toute la surface est couverte de points lumineux distribués de manière homogène. La figure 17b) est donc utilisée afin d'obtenir une estimation du nombre de points chauds par μm^2. Pour

cela, la fonction "Analyser les particules" du logiciel ImageJ [17]est utilisée. Nous pouvons compter grâce à cette fonction, 15 483 "hotspots" sur 17 503 μm^2, ce qui signifie que nous avons environ 0,9 hotspot par μm^2.

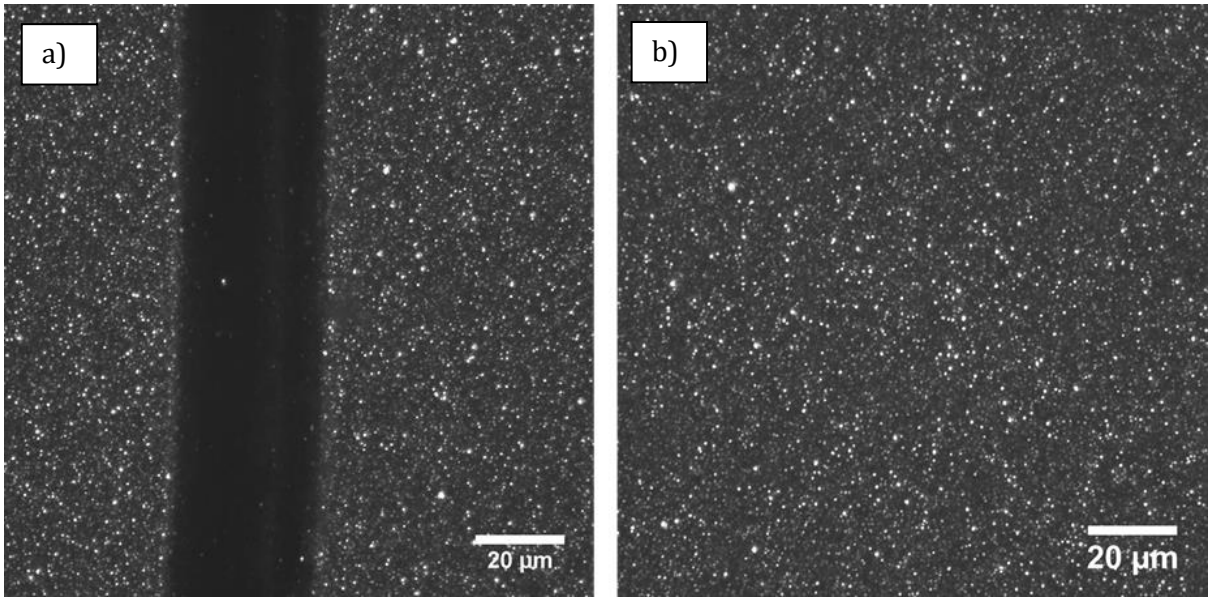


Figure 17 Observation de la surface BSi- Ti- 5nm - Ag 100nm en microscopie de fluorescence (cube mCherry 550 nm) avec un objectif x50 NA =0.8 exposition 100ms. Réalisation d'une vidéo de 250 images avec une image prise toutes les 250ms. a) Image réalisée par projection du maximum d'intensité des pixels pour une surface qui a subi une détérioration. On constate qu'il n'y presque pas de points lumineux à l'endroit de la détérioration. b) Image réalisée par projection du maximum d'intensité des pixels pour une surface intacte. Des points lumineux sont présents de façon homogène sur la totalité de la surface.

Les surfaces exaltatrices élaborées par notre procédé et sélectionnées pour les études Raman ultérieures présentent donc une densité de points chauds d'environ 1 point chaud par μm^2. Cette estimation montre qu'avec une source laser focalisée à travers un objectif x100, (taille du point de focalisation d'environ 1 µm), il est possible de sonder au moins un point chaud par impact laser. Retenons ici qu'il s'agit d'une estimation indirecte. Nous faisons l'hypothèse que la vision des sites d'exaltation de la fluorescence pour une longueur d'onde excitatrice comprise entre 518 et 573 nm) est représentative des points chauds actifs pour le Raman à une longueur d'onde étroite de 638 nm.

2.5 Discussion

La caractérisation du silicium noir (BSi) recouvert de nanoparticules d'Ag a permis de mettre en exergue à la fois ses performances d'exaltation locale du champ électromagnétique mais aussi la criticité du procédé mis en œuvre. Il convient de revenir dans la suite sur ces deux points. Concernant ce dernier tout d'abord, la gravure RIE sans masque permet de créer des nanostructures de silicium sur l'entièreté d'un wafer, en une étape de procédé et ce de manière répétitive. Cependant, les nanostructures présentent un caractère aléatoire. En effet, la caractérisation des nano-piliers montre bien (cf chapitre 2) que leur taille se répartit sous une forme gaussienne avec une aire au sommet de $0.018\mu m^2 \pm 6.3x10^{-4}\ \mu m^2$. Cette variabilité associée à la variabilité de la dimension des nanoparticules

d'Ag formées lors de la fragmentation du film mince d'Ag sur les nano-piliers ainsi que la variabilité des phénomènes de flexion des nano-piliers après passage d'un ménisque à la surface entraine de facto une résonance plasmonique large bande, comme observé par microscopie en champ sombre. Parmi toutes ces sources de variation, la principale provient selon nous, de la fabrication des nano-piliers par gravure ionique réactive. En effet c'est la configuration précise en nano-piliers qui dicte après dépôt d'Ag la configuration finale des nanoparticules en surface et donc des sites et des facteurs d'exaltation. Nous avons constaté qu'une légère variation dans les paramètres du réacteur ICP-RIE entraine un changement drastique dans les caractéristiques des nanostructures : les nano-piliers peuvent parfois prendre l'allure de nano-cônes. Or, l'exaltation SERS dépend de la distance entre les nanoparticules[18] ; le fait d'avoir des nano-piliers en proche proximité permet donc d'avoir une meilleure exaltation Raman[19]. Dans le cas de nano-cônes, la distance entre eux est plus grande et leur flexibilité est moindre. Ceci se traduit par l'obtention de surfaces très médiocres en termes d'exaltation du signal SERS.

Cette sensibilité aux paramètres machine fait du silicium noir (nano-piliers verticaux) un procédé difficile à transposer d'un réacteur ICP-RIE à l'autre. De même, une attention particulière doit être portée à la propreté du réacteur avant utilisation ainsi qu'à l'historique d'utilisation de celui-ci. Le procédé de gravure plasma sans masque n'est pas exempt de possibles dérives qui nécessitent parfois des réajustements du procédé de gravure. Au cours de cette thèse nous avons dû réajuster le procédé de gravure à deux reprises (passant de 35 sccm de SF_6 à 36.5 pour finir à 38 sccm).

La réponse plasmonique large bande permet d'utiliser un large panel de longueurs d'onde des lasers. La réponse Raman d'un échantillon étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde puissance quatre il est intéressant d'utiliser un laser à 532 nm pour effectuer les mesures. De même comme discuté auparavant afin de maximiser le nombre d'événements de coïncidence entre les molécules concentrées sur le piédestal et un point chaud de la surface il faudrait en réalité travailler à plusieurs longueurs d'onde.

L'expérience de clignotement de la luminescence nous permet d'obtenir une estimation du nombre de points chauds. Notons que le nombre de points chauds déterminé par cette méthode est tout de même limité par la résolution optique du microscope de fluorescence utilisé : selon le critère de Rayleigh, nous ne pouvons pas distinguer deux points séparés d'une distance $d_{min} = \frac{0.61\lambda}{NA}$. Tel que nous avons travaillé la résolution est autour du µm, ce qui prouve que la densité que nous avons obtenue (1 point chaud/µm^2) est une valeur par défaut. La densité réelle est supérieure et nécessiterait des expériences en microscopie ultra-résolue pour en avoir la véritable vision à l'échelle nanoscopique.

Pour ce qui est de l'origine du clignotement de la luminescence, deux explications complémentaires peuvent être apportées. La première, comme nous l'avons expliqué, est que des composés moléculaires luminescents présents dans l'environnement gazeux de la surface viennent s'adsorber et se désorber sur la surface. La seconde réside dans le fait qu'en présence de l'oxygène de l'air, les nanoparticules d'argent s'oxydent. Cette couche d'AgO est photoactivée à température ambiante pour produire des nanoclusters d'Ag_n (n de l'ordre 2-8 atomes d'argent), qui ont des propriétés de photoluminescence.[20–22]

3 Spectroscopie Raman exaltée sur les surfaces produites

3.1 Système expérimental de Micro Raman

La spectroscopie Raman n'a pu devenir une méthode de caractérisation routinière dans les années 1960 qu'avec l'apparition des lasers. Les années 1970-1980 ont été marquées par l'apparition des capteurs CCD et la dernière avancée technologique majeure date des années 1990 avec l'apparition de la spectroscopie micro Raman qui consiste à combiner un spectromètre Raman avec un microscope optique. [23]

La figure 18 illustre le schéma de principe d'un microscope confocal couplé à un spectromètre qui sert de base au système de micro-Raman. Il est composé d'un laser et d'un spectromètre permettant d'éclairer l'échantillon et d'analyser la lumière émise respectivement. Le miroir dichroïque permet de séparer l'excitatrice des photons Raman.

L'intérêt d'utiliser un objectif de microscope est de pouvoir focaliser la lumière dans un spot micrométrique (généralement de 0.6 à 20 µm) et ainsi sonder localement l'échantillon.

Le trou d'ouverture (pinhole) est aussi central : il permet de bloquer la lumière hors focus et hors de l'axe d'excitation donc provenant de l'extérieur du volume sondé[24].

Le dernier élément est la platine piézoélectrique, qui permet de coupler information spectroscopique et information spatiale. Ainsi, à la fin de l'évaporation d'une goutte chargée en analytes sur la surface, il est possible avec ce type de dispositif, de venir sonder l'entièreté du piédestal et possiblement sa proche périphérie.

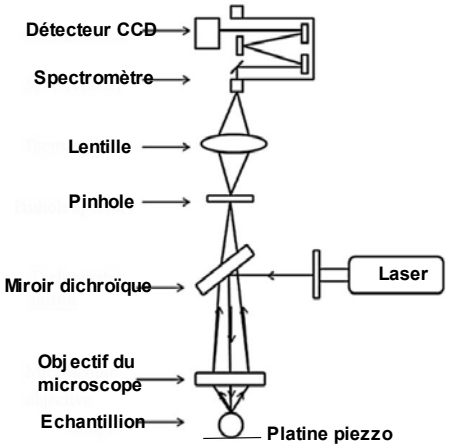


Figure 18 Schéma de principe d'un microscope confocal couplé à un spectromètre adapté de [25]

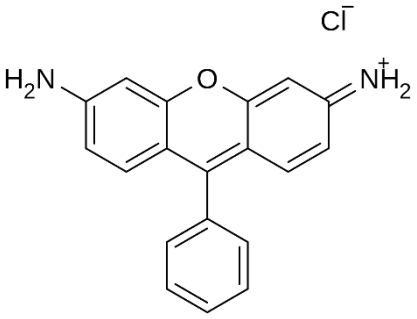
Le spectromètre Raman que nous avons utilisé est un HORIBA Jobin Yvon de la gamme Xplora, il est notamment équipé d'un microscope optique Olympus BXF avec trois objectifs (x100 NA 0.9, x50, NA 0.5 et x10 NA 0.2). L'acquisition se fait en mode rétrodiffusé, c'est-à-dire que l'objectif sert à la fois de focalisateur et de collecteur. Le laser Nd : YAG 532nm d'une puissance de sortie de 10 mW est focalisé, dans un spot de 2 µm de diamètre, sur la surface à travers l'objectif x 50 (ouverture numérique NA = 0.5). Des filtres neutres permettent de diminuer l'intensité à 0.1 mW sur l'échantillon. La lumière diffusée par l'échantillon est envoyée après dispersion, sur un réseau de 600 fentes par mm sur une caméra CCD 1024x256 pixels et refroidie à -60°C par un module Peltier, ce qui permet de diminuer le bruit. L'utilisation de ce laser et de ce réseau en particulier permet en une acquisition d'obtenir un spectre sur une fenêtre spectrale s'étendant de 100 à 5000 cm^{-1},

Une seule acquisition est effectuée par spectre à un temps d'intégration de 250ms. La taille des pixels de la cartographie est 1.5x1.5µm. Il est ainsi possible de réaliser la cartographie du piédestal en acquérant 2200 spectres en 20 minutes environ.

Ces paramètres ont été utilisés pour mener les premières expériences avec un colorant : la rhodamine B.

3.2 Spectroscopie Raman exaltée de la Rhodamine B

La rhodamine est une famille de composés organiques hétérocycliques fluorescents. Ces composés sont grandement étudiés en SERS car ils présentent une section efficace importante les rendant facilement détectables.



La rhodamine B de formule chimique $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ est utilisée dans l'industrie de la céramique, du textile, du papier mais aussi comme colorant. Or, ce composant est potentiellement génotoxique et cancérigène pour les animaux[26] ; aussi, sa présence dans les aliments est interdite[27]. Cette molécule peut également servir au marquage de l'ADN[28,29], ce qui fait de cette molécule une cible d'analyse idéale pour tester le dispositif.

Figure 19 Structure chimique de la Rhodamine B

Afin de connaître les capacités de détection de notre dispositif, des solutions de Rhodamine B à des concentrations de 1 mM (10^{-3} mol/L) à 1 aM (10^{-18} mol/L) ont été réalisées par dilution en cascade d'un facteur 10 en utilisant de l'eau dé-ionisée produite par l'installation de la salle blanche.

Pour les concentrations allant de 100 nM à 1 aM, une goutte a été déposée par concentrateur et laissée évaporer à température ambiante dans l'environnement de la salle blanche.

Le piédestal de chaque dispositif a ensuite été cartographié en utilisant les conditions susmentionnées, à l'exception des concentrations 100 nM et 10 nM pour lesquelles les paramètres étaient les suivants : respectivement 250 ms d'acquisition et 0.01 mW de puissance sous l'échantillon ; 100 ms d'acquisition et 0.1 mW de puissance sous l'échantillon. En effet, pour les concentrations de 100 nM à 1 nM, le signal émis par l'échantillon amenait le détecteur à saturer ; il a donc fallu diminuer soit la durée d'exposition soit la puissance du laser.

Les figures 21 et 22 présentent un spectre représentatif pour chaque concentration. Pour chacun de ces spectres, au moins trois pics peuvent être assignés à la rhodamine B[30] en se basant sur l'assignation des pics donnée en figure 20.

Sur ces figures, le pic correspondant à l'étirement de la liaison C-C de l'anneau de xanthène situé à 1646 cm^{-1} est visible sur tous les spectres.

RhB[a] SERS, cm^{-1}	RhB (Normal) SERS, cm^{-1}	RhB (Abnormal) SERS, cm^{-1}	Assignment[b]
618	620	619	C_X–C_X–C_X bend
		679	
773	763		C_X–H out-of-plane bend
	931		C_X–C_X–C_X bend
	1075		C_M–H bend
1131			C_X–H in-plane bend
1183			C_X–C_X str
	1191		
		1258	
	1277	1279	
1311			C_X–H bend
1362	1355	1343	C_X–C_X str
		1390	C_X–N str
1426	1430		C_X–C_X str + CC_X–H bend
		1449	C_E–H bend
1512	1504		C_X–C_X str
1532	1526		
1572	1560	1585	C_X–C_X str
1599	1594		C_X–C_X str
		1604	C_X–C_X str
1649	1644		C_X–C_X str

[a] SERS of RhB [36].
[b] Assignments [36, 37].
X—xanthene ring, M—methyl, E—diethylamino group.

Les premières expériences menées avec de la rhodamine B permettent de démonter qu'il est possible de détecter au moins un spectre de cette molécule jusqu'à une concentration attométrique.

Figure 20 Liste des pics de la rhodamine B pour différents types de surface SERS. Extrait de [30]

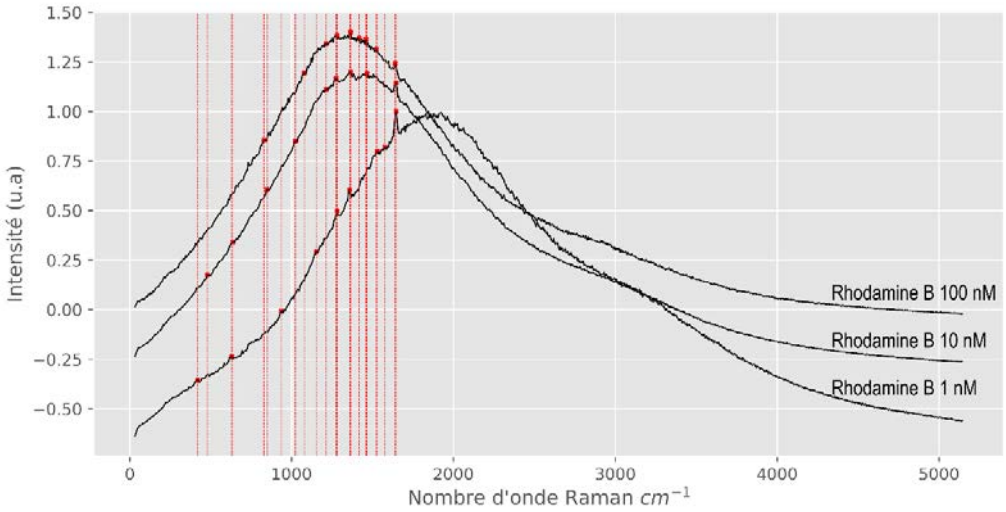


Figure 21 Spectres SERS de la rhodamine B pour des concentrations allant de 100 nM à 1 nM. Des courbes caractéristiques de la fluorescence peuvent être observées avec des pics caractéristiques de la rhodamine dépassant du signal de fluorescence.

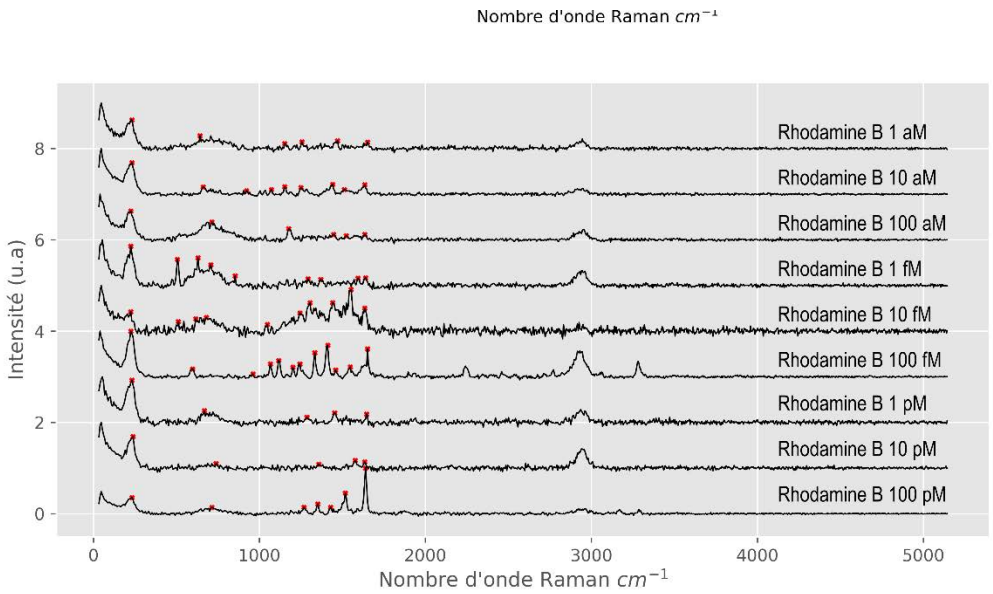


Figure 22 Spectres SERS de la rhodamine B pour des concentrations allant de 100 pM à 1 aM (les croix rouges symbolisent les pics détectés par l'algorithme).

RhB100nM	RhB10nM	RhB1nM	RhB100pM	RhB10pM	RhB1pM	RhB100fM	RhB10fM	RhB1fM	RhB100aM S	RhB10aM	RhB1aM
420.0	479.5	828.8	232.2	239.0	232.2	239.0	225.4	225.4	225.4	232.2	232.2
629.9	636.4	1079.0	713.9	739.5	668.8	597.4	512.4	505.8	713.9	662.3	642.9
936.0	847.8	1213.7	1268.2	1358.2	1286.3	1066.7	616.9	629.9	1177.2	923.5	1152.7
1152.7	1023.3	1280.2	1352.3	1576.4	1453.3	1122.1	681.7	707.4	1447.4	1072.9	1256.1
1280.2	1213.7	1364.2	1429.6	1634.5	1646.0	1256.1	1048.1	854.1	1523.9	1152.7	1471.0
1358.2	1274.2	1417.8	1518.0			1411.8	1244.0	1292.3	1634.5	1250.0	1651.8
1529.7	1364.2	1459.2	1640.2			1634.5	1304.3	1370.2		1441.5	
1576.4	1465.1	1523.9					1441.5	1593.9		1512.1	
1646.0	1646.0	1640.2					1553.1	1640.2		1634.5	
							1634.5				

Figure 23 Liste des pics de la rhodamine B pour les spectres présentés en figure 20-21

3.3 Discussion

3.3.1 L'exaltation du signal Raman et ses problématiques

La caractérisation SERS du dispositif en utilisant la rhodamine B comme molécule-référence nous permet d'affirmer que dans des conditions d'expérimentation optimales, c'est-à-dire en diluant de la rhodamine B dans une eau que l'on peut considérer comme ultra pure, il est possible de détecter sur le piédestal la présence de cette molécule jusqu'à la concentration de 1 aM.

L'analyse du piédestal avec un temps d'acquisition de 250 ms permet de limiter la photodégradation des molécules de rhodamine B. En effet, la puissance du spot laser est de 100 μW. Les phénomènes d'exaltation locale du champ électrique font que les molécules organiques peuvent facilement être dégradées, ce qui résulte en l'apparition des bandes G et D du carbone amorphe sur

le spectre SERS. Dans nos conditions expérimentales nous n'observons pas de telles signatures indiquant la préservation des molécules de rhodamine B. D'autre part, ce temps d'exposition permet d'acquérir 1680 spectres dans un délai relativement court.

Les spectres acquis avec des temps d'acquisition inférieurs à la seconde sont soumis à des phénomènes d'intermittence dans l'apparition des pics : le SERS comme la fluorescence sont soumis à ce qui est communément appelé le clignotement ou « blinking » en littérature anglo-saxone.

Eric C. Le Ru et Pablo G. Etchegoin[31] ont bien résumé la problématique du « blinking » dans le cadre du SERS : il s'agit avant tout d'un problème de sémantique, si bien que l'on devrait plutôt parler d'intermittence. En effet, le terme « blinking » vient de la spectroscopie de fluorescence. Ce phénomène se caractérise par une émission de lumière saccadée qui, dans le cas des fluorophores organiques, peut apparaitre en raison d'une isomérisation réversible de l'orbitale π du système conjugué qui conduit à la création d'un isomère non fluorescent.[32]

Le clignotement observé vient de la réversibilité du processus. Ce n'est pas la seule explication permettant d'appréhender ce phénomène. Ce phénomène n'existe pas dans le cas du SERS : l'émission du photon se fait instantanément et il ne peut pas être « éteint ». L'intermittence de l'apparition de pics sur des spectres SERS peut donc s'expliquer de deux manières dont les origines sont très éloignées du « blinking » de la fluorescence. La première est la diffusion thermique d'une molécule unique, amenant la molécule à proximité ou non du point chaud. Une variation de quelques nanomètres de la position de la molécule par rapport au point chaud a une influence non négligeable sur le spectre SERS. La seconde est un changement de géométrie de la surface sous l'influence du laser. Ce changement induit une modification dans la nature du point chaud et par conséquent, dans le spectre SERS. Si la première explication traduit le « blinking » en SERS comme un phénomène affectant une molécule unique, le second traduit plutôt un « blinking » qui affecterait plusieurs molécules. Aussi, le « blinking » du SERS conduit à des spectres présentant une grande variation, que ce soit au niveau de la ligne de base ou de la position des pics (légère fluctuation) ou de l'intensité de ceux-ci ou encore de leur présence ou non. La figure 20 issue de la publication[30] « Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study on Rhodamine B adsorbed on different substrates » illustre bien les problématiques rencontrées en SERS. Sur cette figure sont listés les pics de la rhodamine B pour trois types de substrat SERS. Le premier correspond à une suspension colloïdale d'argent, le second à une structure 2D ZnO/Ag et enfin le dernier à une structure ZnO. Si pour les deux premières structures, les pics de la rhodamine B, malgré de légers décalages fréquentiels, semblent être en bonne concordance, il n'en est rien concernant la position des pics pour la dernière structure. Or, c'est la position des pics qui permet d'identifier un composé en Raman, la question qui se pose est donc la suivante : comment la même molécule (Rhodamine B) peut-elle avoir des spectres différents en SERS ? Dans l'article, les auteurs expliquent que le phénomène est dû à un changement dans l'orientation spatiale de la molécule et au mécanisme de transfert de charges entre la molécule et la surface. En effet, si la molécule s'adsorbe via son groupe amine au lieu du cycle xanthène, il semble compréhensible que la liaison C_x-N soit plus exaltée et apparaisse comme dominante tandis que les liaisons C_x-C_x sont « quenchées ». Plus fondamentalement, c'est dans les mécanismes de « blinking »[33] qu'il faut également trouver les raisons des fluctuations des spectres SERS d'une même molécule. La diffusion de surface activée thermiquement par l'excitation laser peut amener la molécule à changer d'orientation ou de proximité avec le point chaud, entrainant des modifications saccadées dans les spectres SERS.

Les spectres SERS de la rhodamine B réalisés après concentration sur nos dispoitifs et présentés en figure 21 et 22 présentent des variations à la fois dans la position des pics mais également dans l'intensité et la présence ou non de certaines d'entre eux ; ils sont caractéristiques du « blinking » en

SERS. Par ailleurs, certains décalages dans la position des pics peuvent être dûs à la résolution du spectromètre qui est de l'ordre de 10 cm^{-1}.

Finalement, la surface développée peut être comparée aux surfaces analogues – c'est-à-dire combinant effet SERS et surface superhydrophobe – de la littérature.

Le tableau 2 fait la synthèse des références mentionnées dans le chapitre 2 avec en entrée le titre de la publication, la concentration minimale pour laquelle la rhodamine B a été détectée ainsi que les paramètres utilisés.

La comparaison montre que le concentrateur hiérarchique SH présenté dans cette thèse permet d'obtenir des résultats similaires aux meilleures surfaces de la littérature : la Rhodamine est détectable à 10^{-18} M. Par ailleurs, les temps d'acquisition avec le dispositif présenté sont plus faibles que pour les autres structures, ce qui pourrait être le fait d'un facteur d'exaltation plus important en moyenne.

Tableau 2 Comparaisons des différentes sources bibliographiques faisant état d'une surface superhydrophobe/SERS et analysant de la Rhodamine

Référence	**Rhodamine concentration minimale détectée**	**Paramètres**
Gentile, F. *et al.* Tailored Ag nanoparticles/nanoporous superhydrophobic surfaces hybrid devices for the detection of single molecule. *Microelectronic Engineering* 97, 349–352 (2012).	Gamme 10^{-15} M	Objectif x20-50 Laser : 514 nm 0.18 mW 20 s
Gentile, F. *et al.* Superhydrophobic Surfaces as Smart Platforms for the Analysis of Diluted Biological Solutions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4, 3213–3224 (2012).	10^{-18} M	Objectif : x20 Laser 514 nm 0.18 mW 20 s 10 µL
Song, W., Psaltis, D. & Crozier, K. B. Superhydrophobic bull's-eye for surface-enhanced Raman scattering. *Lab Chip* 14, 3907–3911 (2014).	10^{-15} M	Objectif : x50 Laser : 532 nm 0.24 mW 30 s 20 µL
Wang, A. *et al.* Low-adhesive superhydrophobic surface-enhanced Raman spectroscopy substrate fabricated by femtosecond laser ablation for ultratrace molecular detection. *J. Mater. Chem. B* 5, 777–784 (2017).	10^{-14} M	Objectif : x50 Laser : 0.02 mW 10 s 3 accumulation 20 µL
Chu, F. *et al.* A Simple Laser Ablation-Assisted Method for Fabrication of Superhydrophobic SERS Substrate on Teflon Film. *Nanoscale Research Letters* 13, 244 (2018).	10^{-14} M	Laser : 633 nm 10 mW 20 s 5 µL
Pavliuk, G. *et al.* Ultrasensitive SERS-Based Plasmonic Sensor with Analyte Enrichment System Produced by Direct Laser Writing. *Nanomaterials* 10, 49 (2020).	10^{-12} M	Laser : 488 – 785 nm 0.9 mW/µm^2 5 µL
Luo, X. *et al.* Atto-Molar Raman detection on patterned superhydrophilic-superhydrophobic platform via localizable evaporation enrichment. *Sensors and Actuators B: Chemical* 326, 128826 (2021).	10^{-18} M	Objectif : x50 Laser 633nm 4mW 8s 5accumulation 5µL

Guan, X. & Feng, G. Patterned superhydrophobic/superhydrophilic SERS sensors fabricated by femtosecond laser for precise positioning and ultra-sensitive detection. *Chemical Physics Letters* 783, 139065 (2021).	10^{-13} M	Objectif : x20 Laser : 532 nm 0.05 mW 10 s 2 µL
Extremely Sensitive SERS Sensors Based on a Femtosecond Laser-Fabricated Superhydrophobic/-philic Microporous Platform | ACS Applied Materials & Interfaces. https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsami.2c10381.	10^{-17} M	Objectif : x50 Laser : 532 nm 0.5 mW 3 s 5 µL
Yang, H. *et al.* Femtosecond laser patterned superhydrophobic/hydrophobic SERS sensors for rapid positioning ultratrace detection. *Opt. Express, OE* 29, 16904–16913 (2021).	10^{-14} M	Objectif : x50 Laser : 633 nm 0.5 mW 3 s 5 µL
Dispositif d'analyse moléculaire basé sur une surface superhydrophobe couplée à des nano-piliers de silicium couvert d'argent. Ce travail.	**10^{-18} M**	**Objectif : x50** **Laser : 532 nm** **0.1 mW** **250 ms** **6 µL**

3.3.2 Influence de la fluorescence

La figure 24 montre le spectre d'absorption et d'émission de la rhodamine B[34]. L'utilisation du laser à 532 nm pour effectuer les mesures fait que la fluorescence de cette molécule est excitée. Cela se traduit jusqu'à une concentration de 10 pM par l'apparition d'un fond continu intense présentant un maximum d'émission dans notre fenêtre spectrale sur les spectres SERS. En dessous de cette concentration critique, ce phénomène n'apparait plus distinctement. A faible concentration les molécules de rhodamine B du piédestal sont majoritairement à proximité de la couche métallique d'argent et la fluorescence de ces molécules est donc « quenchée ». A plus haute concentration, les spectres obtenus ne sont pas réellement exaltés et correspondent à l'émission de molécules finalement déposées loin de la surface d'argent (agrégats 3D) c'est-à-dire à une situation comparable à de la rhodamine B en solution et par conséquent fluorescente.

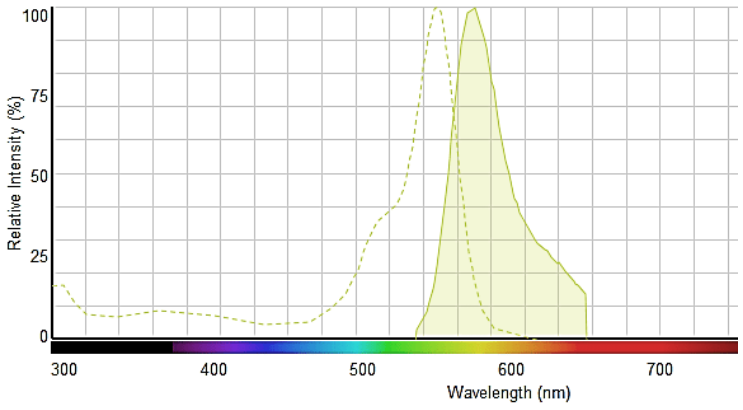


Figure 24 Spectre d'absorption (pointillé) et d'émission (plein) de la Rhodamine B d'après [34]

Par ailleurs, on peut constater un décalage fréquentiel du maximum de fluorescence de la rhodamine lorsque la concentration est diminuée.

Le déplacement du pic de fluorescence vers les longueurs d'onde plus grandes avec l'augmentation de la concentration s'explique par le fait que la partie du rayonnement de fluorescence à courte longueur d'onde peut être réabsorbé. Plus la concentration augmente, plus ce phénomène est important et par conséquent, la fluorescence collectée devient plus faible dans cette gamme de longueur d'onde[35] (figure 25).

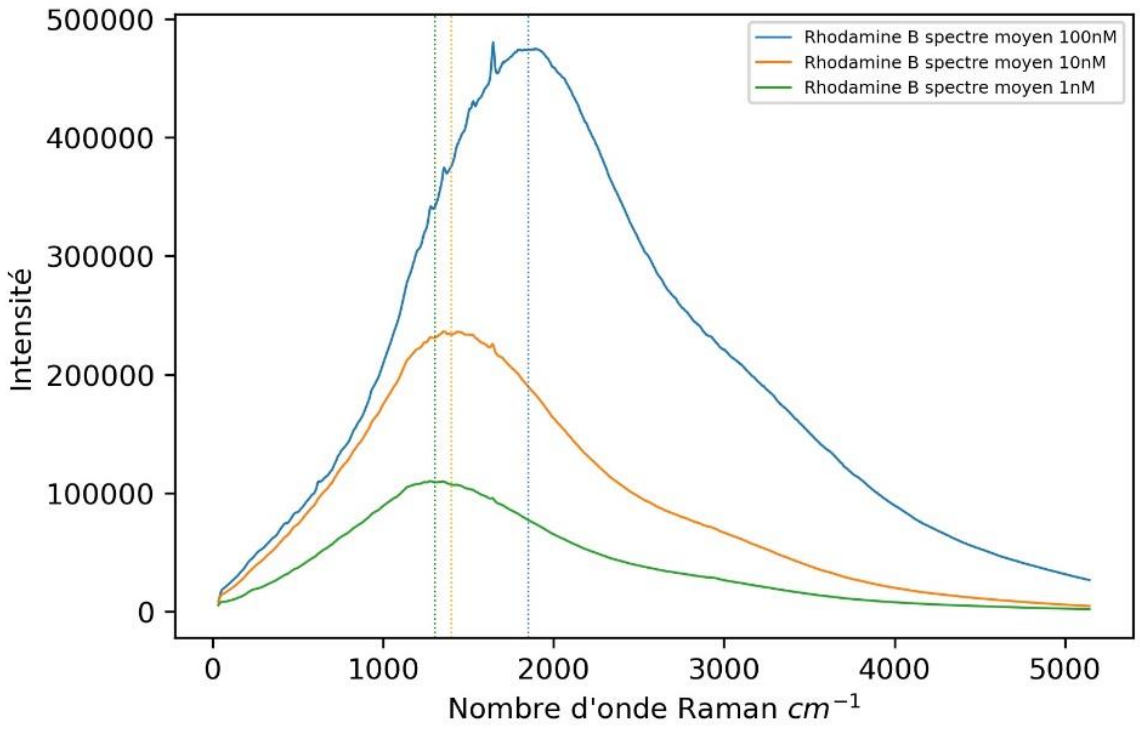


Figure 25 Spectres moyens de la Rhodamine B obtenus après évaporation de gouttes de 6 µL concentrées à 100 nM, 10 nM et 1 nM. Un décalage fréquentiel vers le bleu peut s'observer pour des concentrations réduites.

Résumé du chapitre

Le chapitre 3 a permis de mettre en exergue les capacités du dispositif combinant une surface superhydrophobe hiérarchique et des nano-antennes métalliques en argent.

La surface superhydrophobe permet de concentrer les analytes de manière déterministe et contrôlée sur un piédestal analytique de 80 µm de diamètre. L'aspect plasmonique est porté par des nano-piliers de silicium recouverts de nanoparticules d'argent. La structure développée permet d'avoir une densité de points chauds homogène et élevée (au moins environ 1 point chaud par μm^2). De plus, le fait que les nano-piliers de silicium puissent se courber est important : cela permet de

rapprocher les nanoparticules métalliques d'argent, et donc d'obtenir une meilleure exaltation du signal Raman[36]. En outre, le caractère aléatoire de la morphologie des nano-piliers permet d'obtenir une résonance plasmonique large autorisant une large gamme d'excitations fréquentielles. Finalement, c'est par l'analyse SERS de la rhodamine B comme molécule modèle sur nos concentrateurs SH que l'ensemble des briques élémentaires du dispositif a pu être testé et comparé à la littérature. La détection de rhodamine B à 1 aM a été démontrée, ouvrant la porte à la détection d' « atto-traces ». Toutefois, si le SERS permet la détection d'analytes à très faibles concentrations, le « blinking » complexifie l'interprétation des spectres et peut limiter certains types applications. Aussi, pour aller plus loin, il est nécessaire de développer de nouvelles méthodes de traitement des spectres SERS afin de pouvoir traiter le grand nombre de spectres (environ 1600) qui sont acquis durant la cartographie du piédestal. Le chapitre 4 sera dédiée à cette étude.

Bibliographie

1. Cerf, A., Thibault, C., Geneviève, M. & Vieu, C. Ordered arrays of single DNA molecules by a combination of capillary assembly, molecular combing and soft-lithography. *Microelectronic Engineering* **86**, 1419–1423 (2009).
2. Bensimon, A. *et al.* Alignment and Sensitive Detection of DNA by a Moving Interface. *Science* (1994) doi:10.1126/science.7522347.
3. Ciasca, G. *et al.* Controlling DNA Bundle Size and Spatial Arrangement in Self-assembled Arrays on Superhydrophobic Surface. *Nanomicro Lett* **7**, 146–151 (2014).
4. Michelot, N. *et al.* Impact of a Saharan dust outbreak on PM10 ground levels in Southeastern France. *Climatologie* 65 (2016) doi:10.4267/climatologie.1129.
5. Mitsumoto, K., Yabusaki, K. & Aoyagi, H. Classification of pollen species using autofluorescence image analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **107**, 90–94 (2009).
6. Chen, X. *et al.* Evaporation of Droplets on Superhydrophobic Surfaces: Surface Roughness and Small Droplet Size Effects. *Phys. Rev. Lett.* **109**, 116101 (2012).
7. Song, J., Cheng, W., Cheng, J. & Zhou, W. Superhydrophobic SERS Substrates based on Plasmonic Hierarchical Micro-nanostructures. in *Frontiers in Optics / Laser Science* JTu3A.82 (OSA, 2018). doi:10.1364/FIO.2018.JTu3A.82.
8. Zhizhchenko, A., Kuchmizhak, A., Vitrik, O., Kulchin, Y. & Juodkazis, S. On-demand concentration of an analyte on laser-printed polytetrafluoroethylene. *Nanoscale* **10**, 21414–21424 (2018).
9. Pavliuk, G. *et al.* Ultrasensitive SERS-Based Plasmonic Sensor with Analyte Enrichment System Produced by Direct Laser Writing. *Nanomaterials* **10**, 49 (2020).
10. Zhang, X. *et al.* A critical review on challenges and trend of ultrapure water production process. *Science of The Total Environment* **785**, 147254 (2021).

11. Kulakov, L. A., McAlister, M. B., Ogden, K. L., Larkin, M. J. & O'Hanlon, J. F. Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1548–1555 (2002).
12. Fornells, E., Hilder, E. F. & Breadmore, M. C. Preconcentration by solvent removal: techniques and applications. *Anal Bioanal Chem* **411**, 1715–1727 (2019).
13. Jin, B. *et al.* The mechanism of pollination drop withdrawal in Ginkgo biloba L. *BMC Plant Biology* **12**, 59 (2012).
14. Mugnaini, S., Nepi, M., Guarnieri, M., Piotto, B. & Pacini, E. Pollination Drop in Juniperus communis: Response to Deposited Material. *Ann Bot* **100**, 1475–1481 (2007).
15. Uchinokura, K., Sekine, T. & Matsuura, E. Raman scattering by silicon. *Solid State Communications* **11**, 47–49 (1972).
16. Geddes, C. D. Metal-enhanced fluorescence. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 19537 (2013).
17. ImageJ. https://imagej.nih.gov/ij/index.html.
18. Arbuz, A., Sultangaziyev, A., Rapikov, A., Kunushpayeva, Z. & Bukasov, R. How gap distance between gold nanoparticles in dimers and trimers on metallic and non-metallic SERS substrates can impact signal enhancement. *Nanoscale Advances* **4**, 268–280 (2022).
19. Jeon, T. Y., Kim, D. J., Park, S.-G., Kim, S.-H. & Kim, D.-H. Nanostructured plasmonic substrates for use as SERS sensors. *Nano Convergence* **3**, 18 (2016).
20. Peyser, L. A., Vinson, A. E., Bartko, A. P. & Dickson, R. M. Photoactivated Fluorescence from Individual Silver Nanoclusters. *Science* **291**, 103–106 (2001).
21. Wu, X. & Yeow, E. K. L. Fluorescence blinking dynamics of silver nanoparticle and silver nanorod films. *Nanotechnology* **19**, 035706 (2007).
22. Peyser, L. A., Lee, T.-H. & Dickson, R. M. Mechanism of Agn Nanocluster Photoproduction from Silver Oxide Films. *J. Phys. Chem. B* **106**, 7725–7728 (2002).

23. Hollricher, O. Raman Instrumentation for Confocal Raman Microscopy. in *Confocal Raman Microscopy* (eds. Dieing, T., Hollricher, O. & Toporski, J.) 43–60 (Springer, 2011). doi:10.1007/978-3-642-12522-5_3.
24. Zhu, X., Xu, T., Lin, Q. & Duan, Y. Technical Development of Raman Spectroscopy: From Instrumental to Advanced Combined Technologies. *Applied Spectroscopy Reviews* **49**, 64–82 (2014).
25. Das, R. S. & Agrawal, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy* **57**, 163–176 (2011).
26. Jain, R., Mathur, M., Sikarwar, S. & Mittal, A. Removal of the hazardous dye rhodamine B through photocatalytic and adsorption treatments. *Journal of Environmental Management* **85**, 956–964 (2007).
27. Wang, H. *et al.* Optimized core–shell Au@Ag nanoparticles for label-free Raman determination of trace Rhodamine B with cancer risk in food product. *Food Chemistry* **188**, 137–142 (2015).
28. Islam, Md. M. *et al.* Binding of DNA with Rhodamine B: Spectroscopic and molecular modeling studies. *Dyes and Pigments* **99**, 412–422 (2013).
29. Fang, C. *et al.* DNA detection using nanostructured SERS substrates with Rhodamine B as Raman label. *Biosensors and Bioelectronics* **24**, 216–221 (2008).
30. Sun, C. H., Wang, M. L., Feng, Q., Liu, W. & Xu, C. X. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study on Rhodamine B adsorbed on different substrates. *Russ. J. Phys. Chem.* **89**, 291–296 (2015).
31. Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **63**, 65–87 (2012).
32. Zheng, Q. & Blanchard, S. C. Single Fluorophore Blinking. in *Encyclopedia of Biophysics* (ed. Roberts, G. C. K.) 2322–2323 (Springer, 2013). doi:10.1007/978-3-642-16712-6_483.
33. Wang, Z. & Rothberg, L. J. Origins of Blinking in Single-Molecule Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **109**, 3387–3391 (2005).

34. Silverio, V., Cardoso, S. & Moreira, A. L. N. Laser induced fluorescence thermometry to characterize flow boiling instabilities in silicon microchannel heatsinks for microsystems cooling. in (2016).
35. Fonda, G. R. The Fluorescence of Rhodamine. *J. Opt. Soc. Am., JOSA* **26**, 316–322 (1936).
36. Schmidt, M. S., Hübner, J. & Boisen, A. Large Area Fabrication of Leaning Silicon Nanopillars for Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Adv. Mater.* **24**, OP11–OP18 (2012).

Chapitre 4 : Le SERS comme méthode analytique ?

Table des matières

Chapitre 4 : Le SERS comme méthode analytique ? *131*

Introduction *131*

1 Clustering de corrélation hiérarchique *135*

1.1 La corrélation **135**

1.2 Méthodes de classification **139**

1.3 Détection de pics **145**

1.3.1 Des méthodes simples 145

1.3.2 Une méthode plus élaborée : la transformée en ondelettes 146

2 Application de la méthode du clustering de corrélation hiérarchique pour sélectionner l'information *150*

3 Discussion *153*

3.1 Le problème de la ligne de base **153**

3.2 Méthode d'extraction de la ligne de base **154**

4 Optimisation du clustering de corrélation hiérarchique *156*

4.1 Spectres Simplifiés **156**

4.2 Choix du taux de corrélation **158**

5 Résultats *160*

5.1 Analyse des spectres exaltés de la Rhodamine B **160**

5.2 Analyse des spectres exaltés du Bleu de méthylène **165**

6 Aspect quantitatif de la méthode *169*

7 Cas d'une détection « Bi-Analyte » *171*

Discussion générale *173*

Bibliographie *176*

Chapitre 4 : Le SERS comme méthode analytique ?

Introduction

Le dispositif SH-SERS permet de concentrer localement les analytes sur une surface de 5000 μm^2 environ. C'est en sondant la totalité de cette surface en micro-Raman que nous pouvons détecter les analytes. Or, sonder une telle surface, représentant environ un millier de spectres, nous amène à devoir considérer les méthodes pour leur analyse. Une des caractéristiques des spectres SERS réside dans leurs fluctuations. Celles-ci sont caractérisées par une modification de la position, de la forme des pics mais aussi par l'apparition ou la disparition de ces derniers [1]. En outre, cela requiert l'analyse d'une grande quantité de données ; c'est pourquoi il est intéressant de se pencher sur les méthodes algorithmiques utilisées en spectroscopie Raman et SERS.

Depuis l'apparition des capteurs CCD, l'augmentation constante de la puissance de calcul et de la mémoire des ordinateurs, la capacité à enregistrer et traiter de la donnée – notamment des spectres Raman – s'est considérablement accrue.

Le SERS, et plus généralement la spectroscopie Raman, n'a pas échappé à la tendance à l'utilisation d'algorithmes dits d'apprentissage automatique (machine learning) pour des applications spécifiques.

Ces algorithmes peuvent être divisés en trois catégories : les algorithmes dits supervisés, les algorithmes dits non supervisés et les algorithmes dits de renforcement que l'on laissera de côté dans le cadre de cette étude. Les adjectifs supervisés et non supervisés caractérisent l'apprentissage. Ainsi, dans la catégorie supervisée, l'algorithme est « entraîné » sur des données pour lesquelles une analyse humaine en amont a effectué une classification. Une fois l'algorithme entraîné, un jeu de données inconnues est ensuite analysé par l'algorithme et classifié sur la base de ce que l'algorithme a appris.

Dans la catégorie non-supervisée, l'algorithme n'est pas entrainé en amont. Celui-ci va chercher dans les données des structures permettant de regrouper les données en familles de données présentant les mêmes caractéristiques.

L'utilisation de ces techniques pour la technique Raman n'est pas nouvelle. Dès 1997, Nelson W. Daniel et al.[2] ont étudié des méthodes supervisées et non supervisées pour classer des spectres Raman en deux catégories. Trois méthodes ont été évaluées : deux non supervisées et une supervisée. Les deux premières sont la PCA (principal component analysis) et le SOM (self-organized map neural networks).

La PCA est une méthode de réduction de dimensions d'un jeu de données en un jeu de données plus petit mais qui contient la plupart de l'information (en l'occurrence, il s'agit de la variance) du jeu de départ. Les spectres Raman sont dans cet article réduits en deux composantes principales PC1 et PC2. Tous les spectres peuvent être représentés en traçant la PC1 en fonction de la PC2 pour chaque spectre. Ainsi, si les données présentent des similitudes, des groupes de points vont apparaitre sur le graphe ou bien des clusters.

Dans la même idée, le SOM utilise un réseau de neurones pour réduire un jeu de données de grandes dimensions en un jeu de données de faibles dimensions, généralement deux, tout en essayant de préserver la topologie de la structure des données. Les données ainsi projetées sur une carte peuvent représenter des clusters.

La dernière méthode utilisée dans l'article est le BPNN (back-propagation neural network). Cette méthode est utilisée pour entrainer un réseau de neurones. Dans un tel réseau, chaque neurone est pondéré ; un « poids » lui est attribué. Trouver le bon poids pour chacun se fait en entrainant le réseau à diminuer une fonction dit de coût.

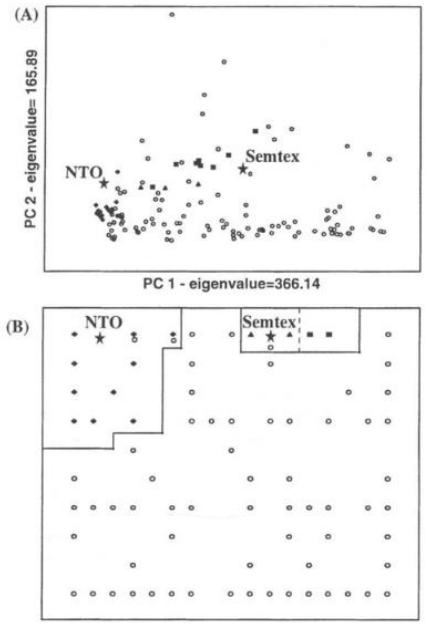


Fig. 1. **A** PCA and **B** SOM of explosives and non-explosives. Filled diamonds – nitro-aromatics filled squares – nitrate esters; filled triangles – nitramines; open circles – non-explosives

La figure 1 nous montre les résultats obtenus pour les méthodes PCA et SOM. Sans rentrer dans les détails, la cartographie donnée par la méthode PCA ne permet pas de faire apparaitre facilement des clusters permettant l'identification de molécules d'explosifs, alors que c'est possible avec le SOM.

Les auteurs concluent aussi sur le BPNN : celui-ci permettrait de bien identifier les explosifs usuels mais pas les plus rares. En effet, dans les algorithmes supervisés, le jeu de données d'entrainement est primordial. S'il manque des données, l'algorithme aura du mal à classer les éléments qu'il n'a « jamais vus ».

Figure 1 A) PCA et B) SOM pour des explosifs et des composés non explosifs recopié de [1]

Dans le cas du SERS, les premiers papiers d'utilisation d'algorithmes de classification d'après le « Web of Science » remontent à 2010. Ce sont les domaines de la détection qui ont le plus bénéficié de ces techniques algorithmiques. En effet, les spectres SERS étant complexes à analyser, l'utilisation de ces techniques permet d'utiliser le SERS non pas comme une technique de caractérisation, mais plutôt comme une méthode de classification et ce dans des domaines tels que l'analyse alimentaire, la médecine légale, l'analyse de bactéries et de virus ou bien encore le diagnostic médical. Te-Kang Jan et al. [3] et Chung-Yueh Huan et al.[4] ont par exemple développé des méthodes de détection de bactéries causant la méningite. Jae-young Lim et al.[5] proposent une méthode pour détecter de nouvelles souches du virus de la grippe. La surface SERS est une lamelle de verre sur laquelle ont été déposées des nanoparticules d'or de 80 nm. Les auteurs déposent sur ces lamelles des cellules d'une lignée cellulaire HEK 293T qui ont été transfectées par de l'ADN qui encode pour les protéines de l'enveloppe virale de la grippe. La figure 2 résume les expériences menées. En obtenant le spectre SERS de la membrane de cellules qui miment l'infection par deux souches de grippe et les spectres de la membrane d'une cellule contrôle, les auteurs démontrent qu'en utilisant la PCA ils peuvent séparer les données en trois groupes distincts : le groupe contrôle, le groupe virus de la grippe et le groupe

nouveau virus émergeant. De fait, ces derniers présentent des similitudes avec les virus déjà présents, ce qui se caractérise par la superposition des clusters dans la cartographie PCA de la figure2.

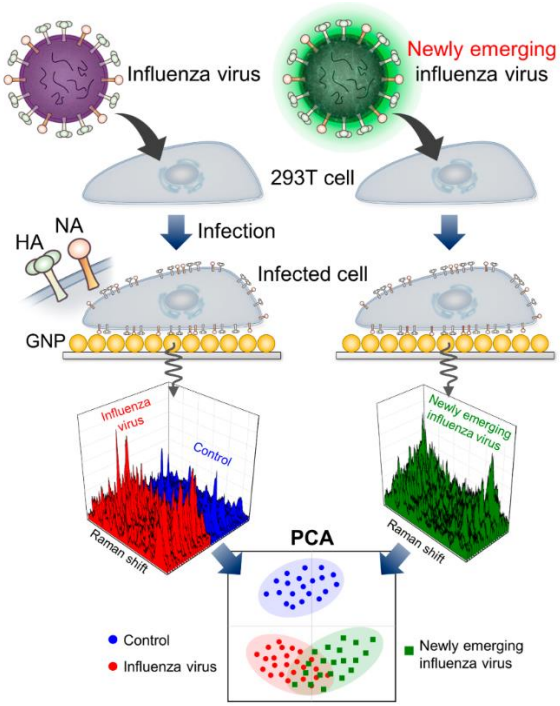


Figure 2 Schéma du procédé d'identification de cellules infectées avec de nouveaux virus de la grippe. Les spectres SERS sont obtenus à l'interface entre les nanoparticules d'or et l'enveloppe virale. La PCA permet d'extraitre les caractéristiques principales afin de distinguer les virus. Recopié de[5]

Raju Botta et al.[6] , quant à eux ont utilisé le SERS pour discriminer la tuberculose entre des sérums sanguins sains et contaminés. Wansum Kim et al.[7] ont développé une surface SERS sur du papier composé de nanofils d'oxyde de zinc décorés avec des nanoparticules d'or. Ces surfaces ont été utilisées pour analyser le liquide amniotique dans l'optique de détecter des infections intra-amniotiques ainsi que l'accouchement prématuré. Le procédé se déroule en quatre étapes comme schématisé dans la figure 3. Il s'agit de prélever le liquide amniotique, de le déposer sur la surface puis d'obtenir des spectres Raman. Enfin, l'utilisation d'une méthode de bio-classification basée sur des statistiques multivariées et entraînées par l'apprentissage automatique permet d'émettre un diagnostic.

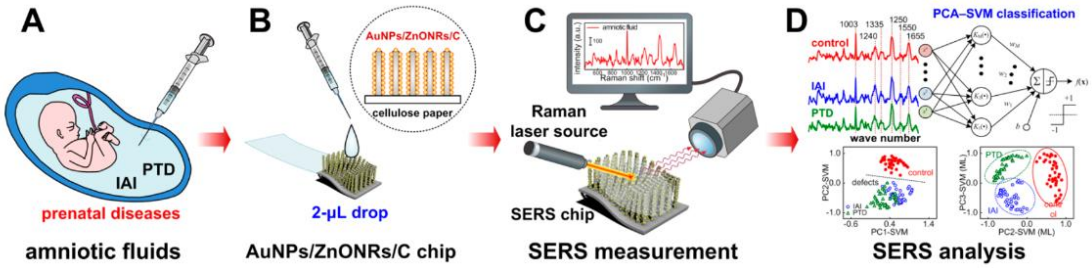


Figure 3 Schéma de principe permettant la détection de maladies prénatales basée sur le SERS. A) Le liquide amniotique est prélevé B) une goutte de 2µL du liquide est déposée sur la surface SERS. C) Les spectres SERS sont enregistrés. D) Le diagnostic est établi par une méthode de bioclassification. Recopié de [7]

William John Thrift et al.[8] ont eu une approche similaire pour développer une boussole olfactive basée sur un réseau de surface SERS formant une grille (a grid). Ce réseau permet à la fois l'identification de l'analyte olfactif mais aussi de déterminer sa provenance. Les molécules de BZT (benzenethiol) et de MBZT (3-methoxybenzenethiol) sont disposées dans une enceinte de part et d'autre du capteur. Au bout de 15 minutes, le capteur est analysé en SERS *ex situ*. Sur chaque surface une cartographie est effectuée. Les spectres sont ensuite pré-traités et divisés en un jeu de données d'entrainement et un jeu de données de validation. La figure 4 illustre le principe de fonctionnement de ce dispositif.

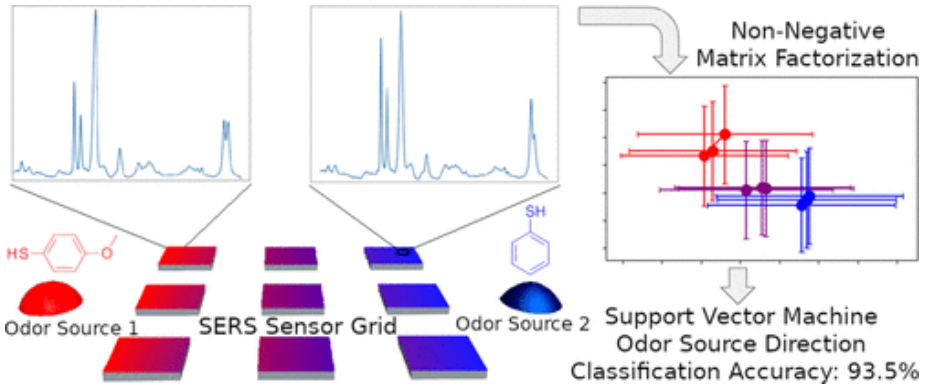


Figure 4 Principe de la boussole olfactive. Des molécules de BZT et MBZT sont disposées de part et d'autre d'une matrice de capteur SERS. Un algorithme permet d'identifier la molécule et de déterminer la direction de provenance. Recopié de [8]

Nariman Banaei et al. [9] quant à eux, ont développé un dispositif microfluidique de diagnostic de cancers par biopsie liquide. Leur dispositif est une plateforme de détection de biomarqueurs protéiques par SERS. Deux algorithmes d'apprentissage automatique (des k plus proches voisins et « arbre de classification ») sont utilisés pour améliorer la reproductibilité et la spécificité du test. Selon les auteurs, le problème de la détection de cancers par biopsie liquide réside dans le manque de spécificité des biomarqueurs. Leur approche algorithmique améliorerait l'identification d'un cancer spécifique.

Dans les exemples illustrés ci-dessus, les méthodes utilisées se basent la plupart du temps sur la PCA pour réduire le jeu de données et sur une méthode de clustering pour les séparer. Une approche en vogue est l'utilisation d'algorithmes d'apprentissage basés sur des réseaux de neurones. Par exemple, Alexis Lebrun et al.[10] ont développé un réseau de neurones convolutifs (CNN) pour classer

les spectres SERS de cinq espèces d'acides biliaires. Bien que ces acides aient des signatures Raman proches, l'algorithme a permis de les classer de manière fiable et ce même à de faibles concentrations.

Zhaoyi Chen et al.[11] ont eux aussi utilisé un CNN dans l'optique de détecter des composés à l'état de trace et ce en temps réel en utilisant un spectromètre Raman portable.

Le parti que nous avons pris dans notre travail est de ne pas utiliser les algorithmes dit supervisés en ce qu'ils invisibilisent la complexité inhérente à notre objet d'étude : le SERS. En effet, cette approche cible des applications de détections bien particulières, telles que la discrimination entre des cellules saines et des cellules cancéreuses.

Au contraire, ce qui est recherché dans notre travail est la mise en lumière de l'information qui sera ensuite jugée pertinente par l'utilisateur aguerri, par exemple un spécialiste d'exobiologie.

Au lieu de passer par une méthode basée sur la PCA, l'idée de ce chapitre est d'introduire dans le cas de la spectroscopie SERS une méthode de classification hiérarchique de corrélation, c'est-à-dire basée sur la similitude des spectres entre eux.

Au-delà de la spécificité de notre application, le fait de ne pas utiliser des algorithmes d'intelligence artificielle est également motivé par une éthique de responsabilité écologique. Il n'est plus à démontrer que la dématérialisation n'est qu'une illusion et que l'intelligence artificielle est intensivement consommatrice de matière et d'énergie. Aussi, tous les spectres ont été traités avec un ordinateur portable standard. Par ailleurs pour un travail d'analyse, il est éthiquement souhaitable d'expliquer simplement la méthode de catégorisation. De ce point de vue, le système « expert » avec des décisions qui reposent sur la définition explicite de critères et de seuils est préférable, de notre point de vue à la « boîte noire » (que constitue bien souvent un algorithme IA). Finalement ce que nous proposons et avons utilisé par la suite peut être qualifié de système expert explicite.

1 Clustering de corrélation hiérarchique

1.1 La corrélation

Le coefficient de corrélation de Pearson est un indicateur qui mesure le degré de corrélation linéaire de deux variables. Il est défini comme :

$$\rho_{xy} = \frac{cov(X,Y)}{\sigma_X \sigma_Y} \; avec \; -1 \geq \rho_{xy} \geq 1$$

Avec :

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{n} x_i$$

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2$$

$$\mathrm{COV(X,Y)} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

Pour notre application la variable x représente le nombre de coups détectés sur chaque canal (un canal est un pixel du CCD qui correspond à un nombre d'onde) du spectromètre Raman pour une position donnée du laser excitateur sur notre surface d'analyse. Avec une résolution spectrale de 10 cm^{-1}, sur une plage d'intérêt pour les molécules organiques allant typiquement de 1000 cm^{-1} à 1800 cm^{-1}, cela représente 124 canaux et donc n=124. La variable y correspond à la même chose mais pour une autre position du faisceau laser sur le même détecteur ou pour une acquisition du même type sur un autre détecteur. Ainsi le coefficient de ρ_{xy} permet d'estimer la ressemblance entre les spectres obtenus à 2 positions différentes de la surface analysée, ou entre des spectres issus de deux expériences différentes.

Ce coefficient (ρ) est compris entre -1 et 1. ρ = 1 signifie que les spectres sont positivement corrélés de manière parfaite (les pics Raman se superposent). ρ = -1 indique que les spectres sont parfaitement anti-corrélés négativement : les pics de l'un correspondant parfaitement aux creux de l'autre.

Entre ces deux extrêmes, les corrélations ne sont que partielles et ne traduisent que des tendances. Il est à noter qu'un taux de corrélation de 0 indique que les variables ne sont pas corrélées.

Cette métrique peut être utilisée dans le cas de spectres Raman pour qualifier le degré de similarité. En effet, si deux spectres ont un taux de corrélation de 1, cela signifie qu'ils sont à un facteur près similaires et qu'ils sont donc produits par les vibrations de la même substance moléculaire.

Lors d'une expérience d'évaporation d'une micro-goutte sur nos détecteurs, nous devons au final balayer pixel par pixel toute la surface du piédestal où se sont concentrés tous les éléments non volatiles contenus dans la goutte. Dans nos expériences et tenant compte du diamètre du faisceau laser excitateur de 2 µm, la dimension typique d'un pixel est de 1.75 µm et le balayage total de la zone analytique génère environ 1680 spectres (dans le cas des expériences de la Rhodamine B la taille du pixel était fixée à 1.5µm générant un total de 2200 spectres environ)

En utilisant le langage de programmation python et la bibliothèque de fonction pandas, tous ces spectres Raman peuvent être rangés sous forme de DataFrames. Ces Dataframes sont des tableaux bidimensionnels comportant des lignes et des colonnes. Les lignes sont indexées selon les nombres d'ondes Raman. Chaque colonne correspond à un des spectres de la cartographie ; le nom de la colonne fait donc référence à une expérience particulière et à une adresse qui représente le pixel de la surface qui a été analysé. En pratique ce qui est donc renseigné au niveau de chaque colonne est le nom de la solution qui est en train d'être analysée, sa concentration et enfin un indicateur numérique qui repère la position sondée à la surface du piédestal analytique.

L'objet DataFrames permet d'utiliser toute une liste de fonctions établies, approuvées et éprouvées par la communauté des utilisateurs Python. Parmi ces fonctions, la fonction corr() , permet de calculer tous les coefficients de corrélation de Pearson deux à deux sur toutes les entrées du DataFrame. Elle renvoie au final une matrice NxN avec N le nombre de colonnes du DataFrame. C'est une matrice diagonale et symétrique. En effet, soient deux spectres x et y, alors $\rho_{xy} = \rho_{xy}$. De plus, si

$x = y$ alors $\rho_{xx} = 1$. Lorsqu'on empile tous les spectres issus d'une seule expérience d'évaporation N = 2200, mais lorsque, comme nous le verrons par la suite, nous empilons tous les spectres issus d'expériences différentes ce nombre croît en proportion et la matrice des coefficients de corrélation croît comme le carré de cette proportion.

La figure 6, à titre d'exemple représente la matrice de corrélation pour 20 spectres tirés au hasard du DataFrame issus de l'expérience mentionnée au chapitre III d'évaporation d'une goutte 6 µL de rhodamine B concentrée à 100 nM. Les spectres correspondants sont représentés de manière habituelle (intensité en fonction du décalage spectral) sur la figure 5.

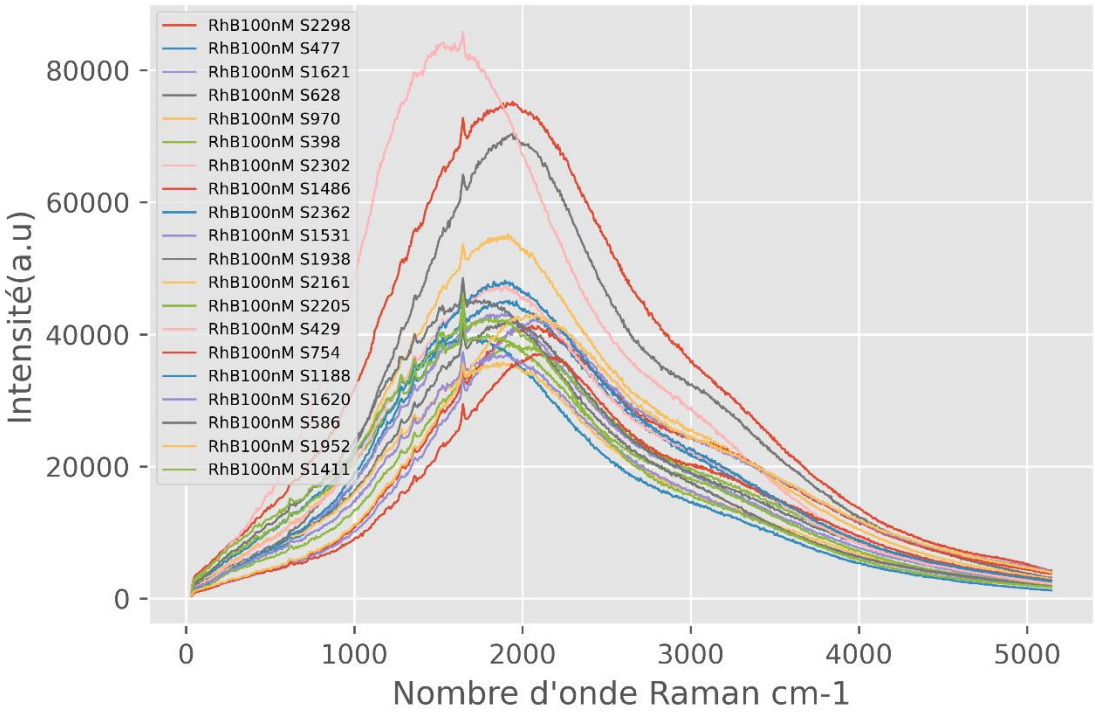


Figure 5 Spectres (20) SERS de la rhodamine B concentrée à 100nM tirés au hasard parmi la totalité des spectres acquis. Appelons ce DataFrame DF-e1

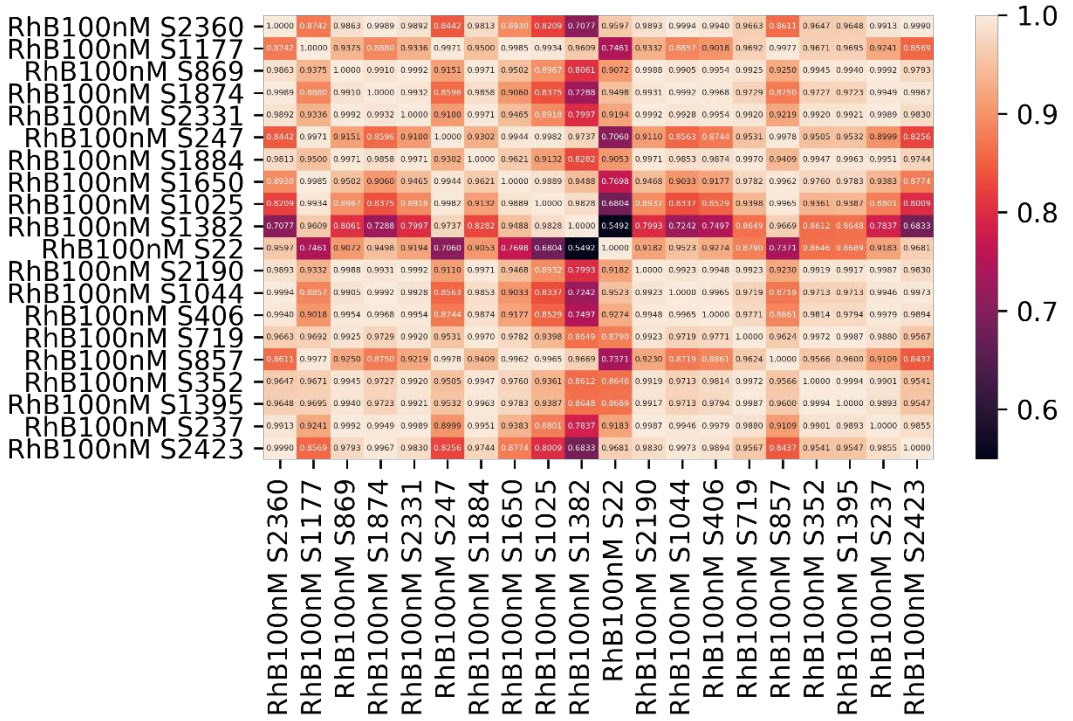


Figure 6 Matrice des coefficients de corrélation de Pearson pour les spectres montrés en figure 5. Cette matrice est diagonale et symétrique. Le code couleur représente les valeurs (toutes positives) du coefficient.

Ces spectres correspondent à une morphologie tout à fait similaire et caractéristique de la florescence de la rhodamine B, ce qui se traduit par des coefficients de corrélation élevés, compris entre 0.55 et 1.

La figure 7 représente les spectres caractéristiques pour les deux coefficients de corrélation de Pearson situés aux extrema soit deux spectres dont les corrélations sont de 0.9987 (7a) et deux dont les corrélations sont de 0.55 (7b).

S'il est évident que ρ = 0 marque une absence de corrélation, il n'y a pas vraiment un critère numérique qui remarque simplement ce qu'est une « bonne » corrélation entre deux variables. A l'analyse « visuelle », à partir de quel ρ un scientifique juge-t-il que deux variables se « ressemblent » ? Il y a une part de subjectivité dans une telle appréciation. Parfois, selon les domaines, on dira que |ρ| > 0.7 est une marque de bonne corrélation. L'intérêt du calcul systémique est de s'affranchir de cette ambiguïté en catégorisant les variables selon leur cross-corrélation et, dans un ensemble de variables complexes (~2200 spectres par cartographie dans notre cas), de classer les spectres par cluster de plus forte corrélation. On peut ensuite analyser la pertinence de ces classifications, pour voir par exemple, si des clusters similaires sont reproduits lors d'expériences identiques. Nous décrivons maintenant ces techniques de clustering.

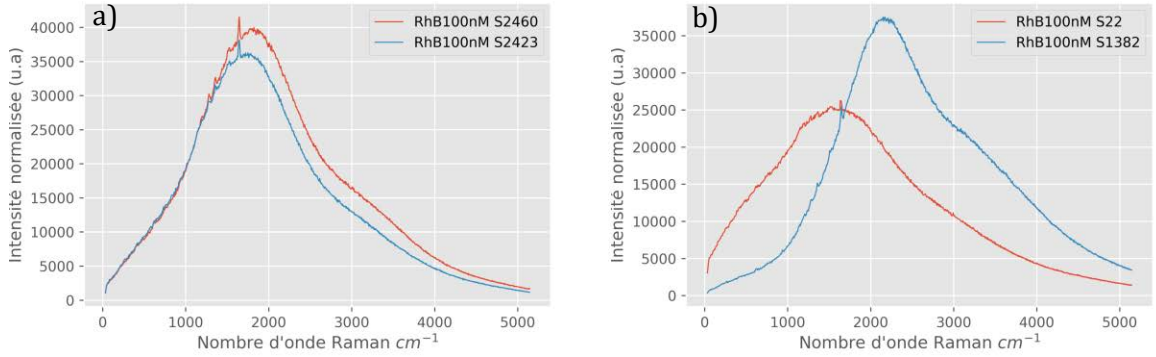


Figure 7a) Deux spectres de la Rhodamine B concentrée à 100nM, leur taux de corrélation de Pearson est de 0.9987. En 7b) deux spectres de la rhodamine B concentrée à 100nM ayant un taux de corrélation de 0.55 sont représentés.

1.2 Méthodes de classification

La classification hiérarchique des données est une méthode de partitionnement des données. Elle consiste en une série de partitions des données qui peut être effectuée de deux manières différentes : par agglomération ou par division.[12] Rappelons ici que ce que nous appelons clusters sont donc des groupes de spectres Raman qui sont rassemblés sur la base de leur corrélation mutuelle.

La figure 8 représente ces deux méthodes de partition. Dans la première, chaque spectre de la pile formant une dataframe constitue un cluster singulet ; ces clusters sont fusionnés successivement dans des clusters contenant de plus en plus de spectres en relâchant progressivement la métrique qui permet de les rassembler (pour nous la valeur du coefficient de corrélation retenue afin de juger similaires deux spectres distincts). Le dernier cluster formé, correspondant donc à un seuil de corrélation suffisamment bas, contient tous les spectres de la pile.

A l'inverse, la méthode dite par division commence par un cluster contenant tous les éléments et procède en augmentant progressivement le seuil de corrélation, ce qui subdivise progressivement les clusters formés pour finir avec autant de clusters de 1 élément que de spectres dans la pile. La représentation des clusters se fait sous forme de dendrogrammes, qui est une structure ramifiée s'apparentant aux arbres d'évolution.

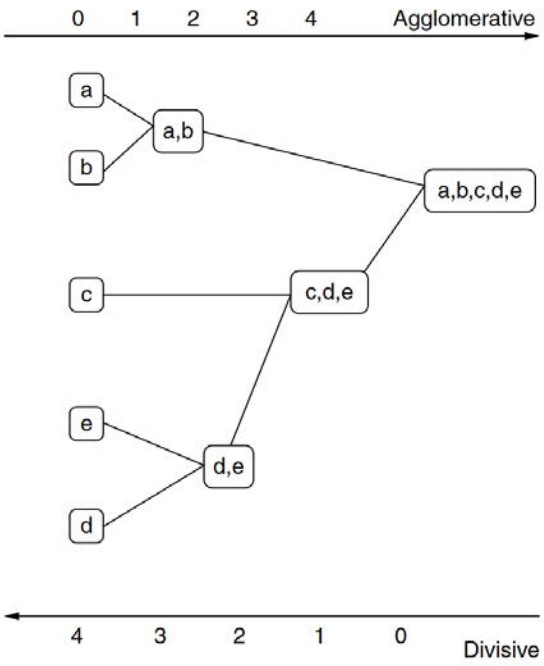


Figure 8 Représentation d'un dendrogramme et des deux manières de le concevoir : agglomérative approche bottom up et par division approche top down. Recopié de [13]

La méthode agglomérative est la plus utilisée ; c'est donc elle qui a été choisie pour cette étude. A chaque étape de la méthode, l'algorithme calcule la distance entre les éléments suivant la métrique déterminée et rassemble les éléments les plus proches les uns des autres. Dans cette étude, la métrique est la corrélation de Pearson, c'est pour cela que l'on parle de clustering de corrélation hiérarchique. La matrice de dissimilarité entre les spectres peut être calculée comme la différence entre la matrice identité et la valeur absolue de la matrice de corrélation. Pour deux spectres X et Y, la distance peut être calculée comme suivant :

$$d(X,Y) = 1 - \left|\rho_{X,Y}\right|$$

L'algorithme fonctionne donc de la manière suivante. Au début chaque spectre constitue un cluster singulet. Dans un premier temps, la matrice de dissimilarité (NxN) permet de former les premières branches du dendrogramme reliant les deux éléments les plus semblables ; ces branches forment un cluster. Un fois ce premier cluster construit, une nouvelle matrice des distances (N-1xN-1) est recalculée. Dans cette nouvelle matrice seule les distances entre les éléments et le nouveau cluster sont calculées. Il existe plusieurs méthodes pour calculer la distance des éléments au cluster. La figure 9 représente les trois plus courantes.

Notons X_1, X_2, …, X_n les éléments du cluster noté C_1 et Y_1 un élément distant de ce cluster alors la distance $d(Y_1, c_1)$ peut-être calculée des manières suivantes :

1. $d(Y_1, c_1) = \min_i d(Y_1, X_i)$ est la distance minimale entre Y_1 et le cluster C_1
2. $d(Y_1, c_1) = \max_i d(Y_1, X_i)$ est la distance maximale entre Y_1 et le cluster C_1
3. $d(Y_1, c_1) = d(Y_1, \bar{X})$ est la distance entre Y_1 et la moyenne des distances aux éléments du cluster C_1

Nous avons choisi la deuxième option car elle permet de s'assurer qu'un élément ne va pas être rajouté dans un cluster juste parce qu'il a un degré de corrélation important avec un élément du cluster.

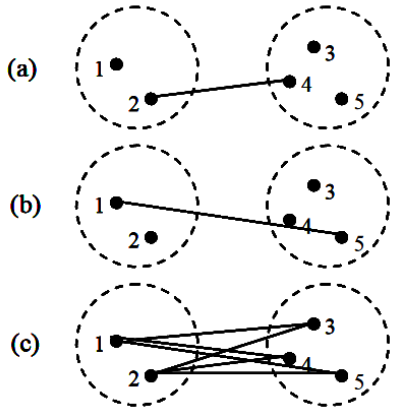


Figure 9 a) représentation de la distance « simple » entre clusters, b) de la distance complète et c) de la distance moyenne. Recopiée de[14]

Cette procédure est ensuite réitérée jusqu'à ce que tous les spectres se retrouvent assemblés les uns aux autres.

Un exemple de dendrogramme est donné en figure 10. Les clusters sont construits à partir de celui-ci. Un seuil de similarité permet de sectionner le dendrogramme pour les former.

Dans l'exemple ci-dessous, le seuil de similarité (1- dissimilarité) a été fixé à 0.9. Ce seuil sectionne le dendrogramme en trois points et définit donc trois clusters.

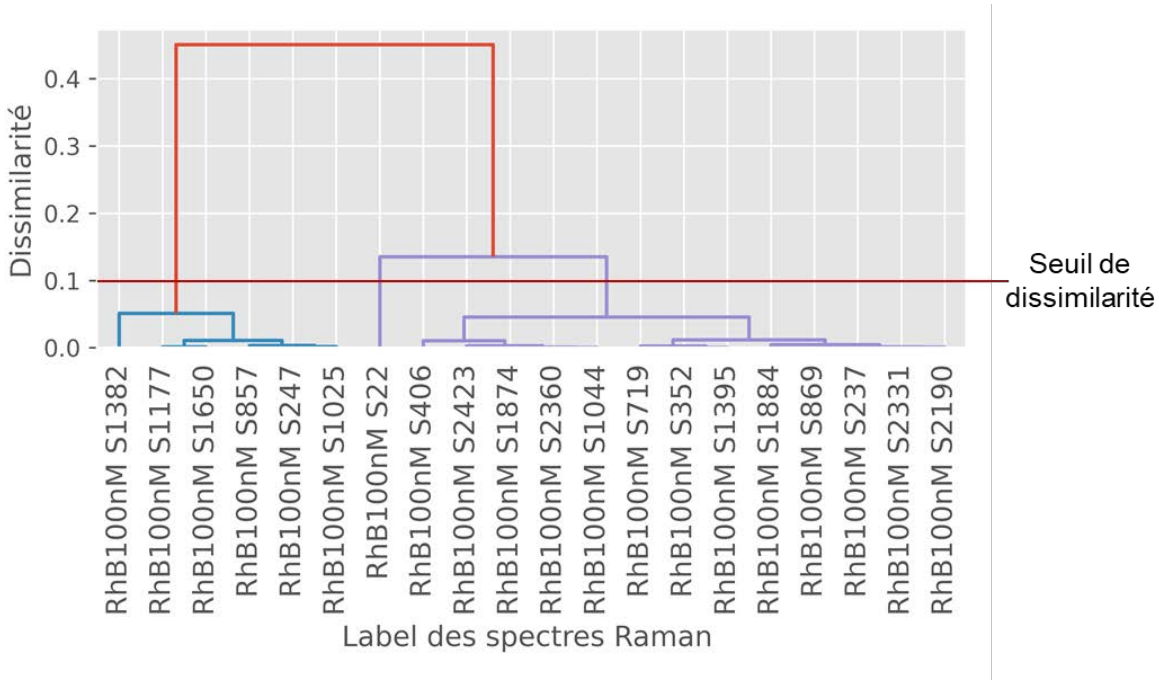


Figure 10 Exemple de dendrogramme basé sur les données de la figure 6. Un seuil de dissimilarité permet de sectionner le dendrogramme et de réaliser des clusters. Avec un seuil de dissimilarité de 0.1, soit une corrélation de 0.9, trois clusters sont créés.

Ces clusters sont représentés en figure 11. La figure 12 est la matrice des coefficients de corrélation de Pearson réagencés pour faire apparaitre les clusters encadrés en rouge. Le cluster numéro 3 ne comporte qu'un élément. En effet, si l'on s'en tient à la définition de la distance sélectionnée alors celui-ci est distant de 0.45 (ρ=0.55) avec le cluster 1 et de 0.14 (ρ=0.86) avec le cluster 2.

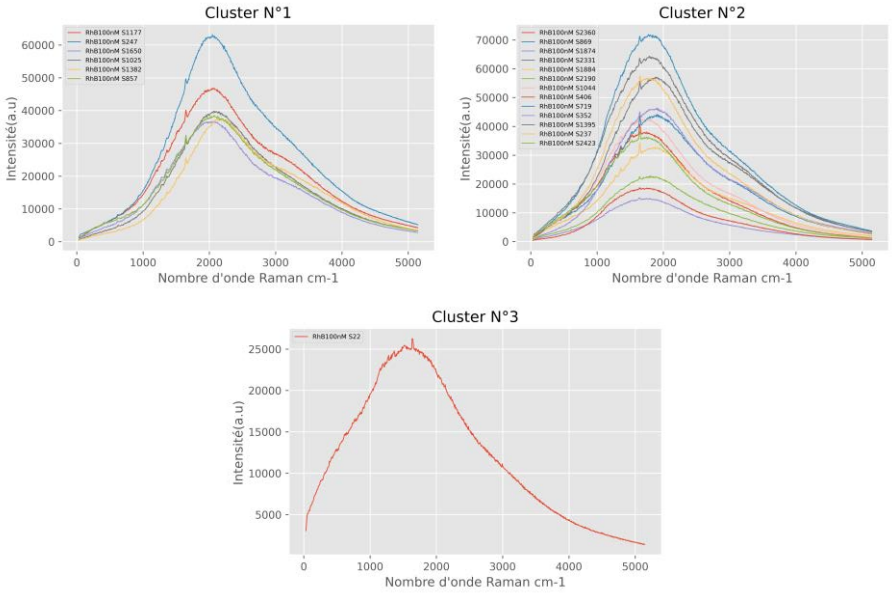


Figure 11 Représentation des trois clusters issus du dendrogramme présenté en figure 10. Le cluster numéro 2 contient 6 éléments, le deuxième contient 13 éléments et enfin le troisième ne contient qu'un élément. Nous retrouvons bien les 20 spectres de départ.

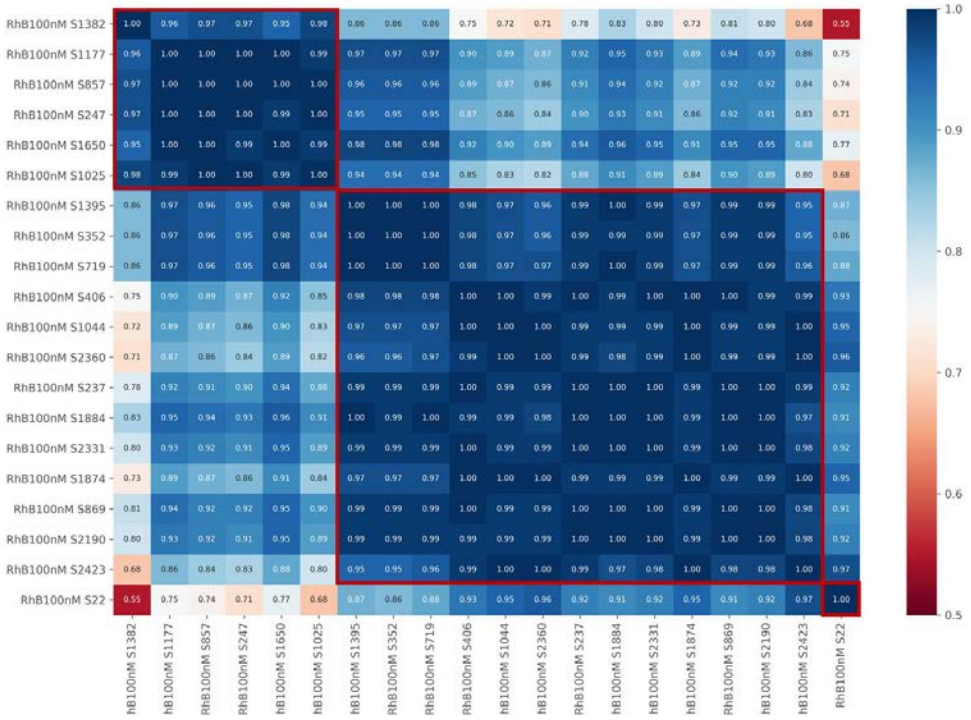


Figure 12 Matrice des coefficients de corrélation de Pearson réarrangée. En encadré rouge sont représentés les différents clusters.

Nous discutons maintenant la procédure que nous avons progressivement établie au cours de cette thèse et qui a été réfléchie afin de répondre à la question cruciale de la pureté du solvant qui est utilisé pour disperser les molécules que nous souhaitons analyser en SERS. En effet nous avons vu aux chapitres précédents que lorsqu'on évapore une goutte d'eau ultrapure, qui nous sert souvent de solvant dans nos expériences, un résidu sec est formé sur le piédestal analytique. Ainsi, une solution de concentration nulle en analyte (par exemple en rhodamine B) va générer des spectres Raman signant les vibrations moléculaires générés par les éléments constituant ce résidu. L'information que nous recherchons lors de l'analyse d'une goutte d'eau ultrapure contenant une molécule (la rhodamine B par exemple) à une concentration non nulle doit donc être distincte de celle portée par tous les spectres dits résiduels générés par une goutte d'eau ultrapure. Pour sélectionner dans une expérience uniquement les spectres significativement différents de ceux obtenus avec une goutte d'eau ultrapure nous procédons donc de la manière suivante. Nous constituons une pile de spectres qui rassemblent les spectres issus de l'expérience et les spectres issus d'une expérience contrôle avec une goutte de solvant pur (Eau DI ultrapure). Nous effectuons ensuite le clustering hiérarchique sur l'ensemble de ces spectres empilés. A l'issue de la classification (pour un seuil de corrélation donné que nous discuterons dans la suite) nous ne retiendrons que les clusters qui ne rassemblent que des spectres issus de l'expérience et qui ne contiennent AUCUN spectre issu de l'expérience contrôle avec une goutte d'eau ultrapure. Cette méthode très sélective nous permet d'accroître significativement notre confiance dans la sélection des spectres pertinents et non suspects de provenir des contaminants inévitables pouvant perturber une expérience.

Cette méthode est illustrée dans la figure 13 dans le cas où nous cherchons à détecter des molécules de rhodamine B diluées à différentes concentrations dans de l'eau ultrapure. Tous les spectres issus des différentes expériences avec des solutions à différentes concentrations nominales (de l'aM à 100 nM) sont empilés avec les spectres obtenus avec de l'eau ultrapure sans rajout de rhodamine B. Les données empilées sont rangées dans un DataFrame pour lequel les coefficients de Pearson deux à deux sont calculés. Le clustering de corrélation est ensuite effectué, puis la sélection drastique des clusters pertinents est entreprise. Tous les clusters dans lesquels seront présents un ou plusieurs spectres issus de l'expérience contrôle avec de l'eau ultrapure seront abandonnés. Ces clusters ne seront pas pris en compte pour la suite de l'étude en ce qu'ils pourraient correspondre à des contaminants présents soit dans l'eau, soit dans l'atmosphère, soit sur la surface avant le dépôt de la goutte.

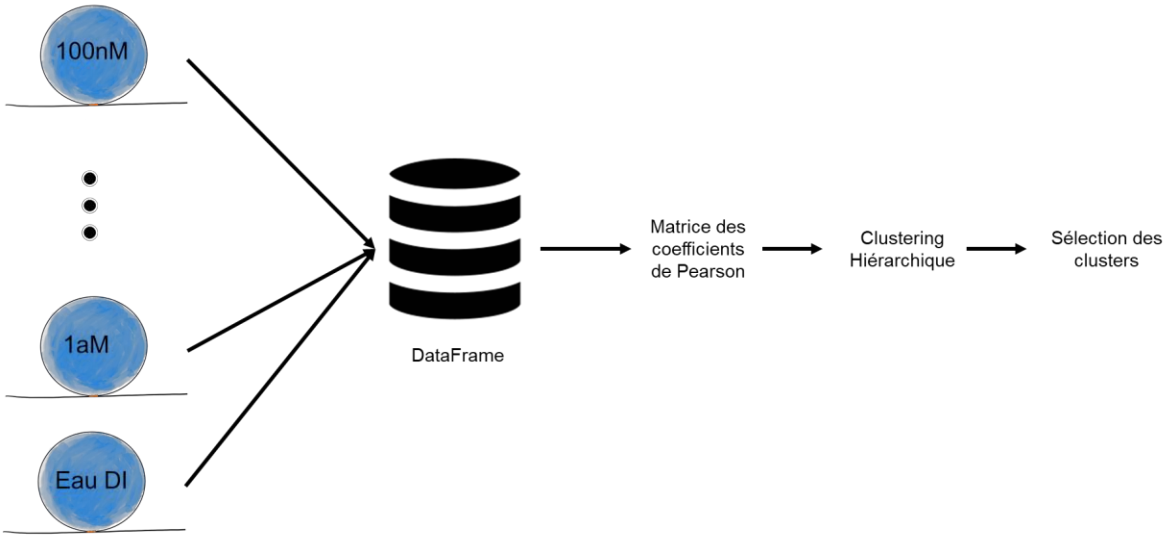
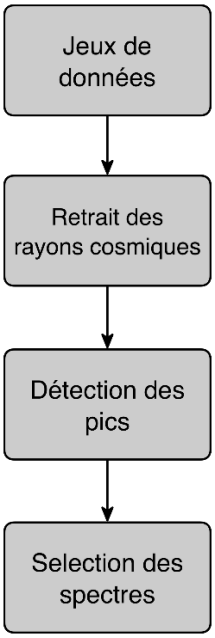


Figure 13 Diagramme explicatif de la méthode mise en œuvre pour analyser les spectres de la Rhodamine B. Tous les spectres acquis de la Rhodamine B sont concaténés avec les spectres issus de l'expérience contrôle (spectres issus de l'évaporation d'une goutte d'eau dé-ionisée ultra-pure) dans un même DataFrame. Les coefficients de Pearson sont ensuite calculés pour cette pile complète. Le clustering hiérarchique est ensuite effectué. Pour l'algorithme sélectionne les clusters dans lesquels seuls des spectres labélisés « rhodamine B » apparaissent.

Dans ce type d'expériences le DataFrame comprenant toutes les expériences comporte environ 29 000 entrées. La dimension matrice des coefficients de Pearson est donc de 29000 x 29000 soit 841 000 000 entrées.

Le temps de calcul pour obtenir cette matrice devient dès lors non négligeable et de surcroît, cette matrice, dans un fichier .csv, occuperait plus de 15 Go. Or, certains spectres n'ont pas d'intérêt car trop bruités pour être pertinents. Aussi, il convient d'éliminer ces spectres pour diminuer la quantité de données à traiter.

L'information SERS est portée par la position des pics Raman. La région 1000 - 1800 cm^{-1} correspond à la région des liaisons organiques.



Dans l'optique d'identifier des composants organiques, il faut d'une part déterminer la position des pics sur les spectres et d'autre part, sélectionner les spectres pour lesquels ceux-ci présentent des pics dans la région susmentionnée.

Le diagramme en figure 14 représente les étapes nécessaires à la sélection des spectres SERS. Un premier traitement est effectué pour éliminer les rayons cosmiques présents sur les spectres.

Ces rayons sont un type de bruit apparaissant de façon aléatoire sur les spectres Raman. Les caméras CCD sont en effet très sensibles aux rayons de haute énergie provenant de l'espace – d'où l'appellation cosmique. Ce type de rayonnements, en rencontrant le détecteur CCD, génère des électrons, ce qui se traduit par l'apparition d'un pic très intense sur un ou quelques pixels.

L'algorithme utilisé est une adaptation python par Nicolas Cage[15] de l'algorithme R présenté par Darren A. Whitaker et al.[16] dans leur papier « A simple algorithm for despiking Raman spectra ».

Figure 14 Diagramme de sélection des spectres basée sur la détection de pics.

Une fois les pics issus des rayons cosmiques enlevés, il faut, sur chaque spectre, utiliser un algorithme de détection de pics.

1.3 Détection de pics

1.3.1 Des méthodes simples

Plusieurs algorithmes rendent possible la détermination de la position des pics ; l'un d'entre eux est issu de la bibliothèque Scipy[17]. Cette fonction appelée « find_peaks »[18], prend un tableau 1-D et trouve tous les maximas locaux par simple comparaison des valeurs voisines. Pour obtenir une détection fiable, plusieurs paramètres doivent être renseignés : la distance entre deux pics, un seuil de hauteur, la proéminence du pic ainsi que sa largeur.

La figure 15 est un exemple de détection de pics sur un électrocardiogramme. Les paramètres ont été représentés par des barres. Avec les paramètres renseignés, deux pics ont été trouvés par l'algorithme. Or, on constate qu'il y a plusieurs pics sur ce graphe qui n'ont pas été sélectionnés.

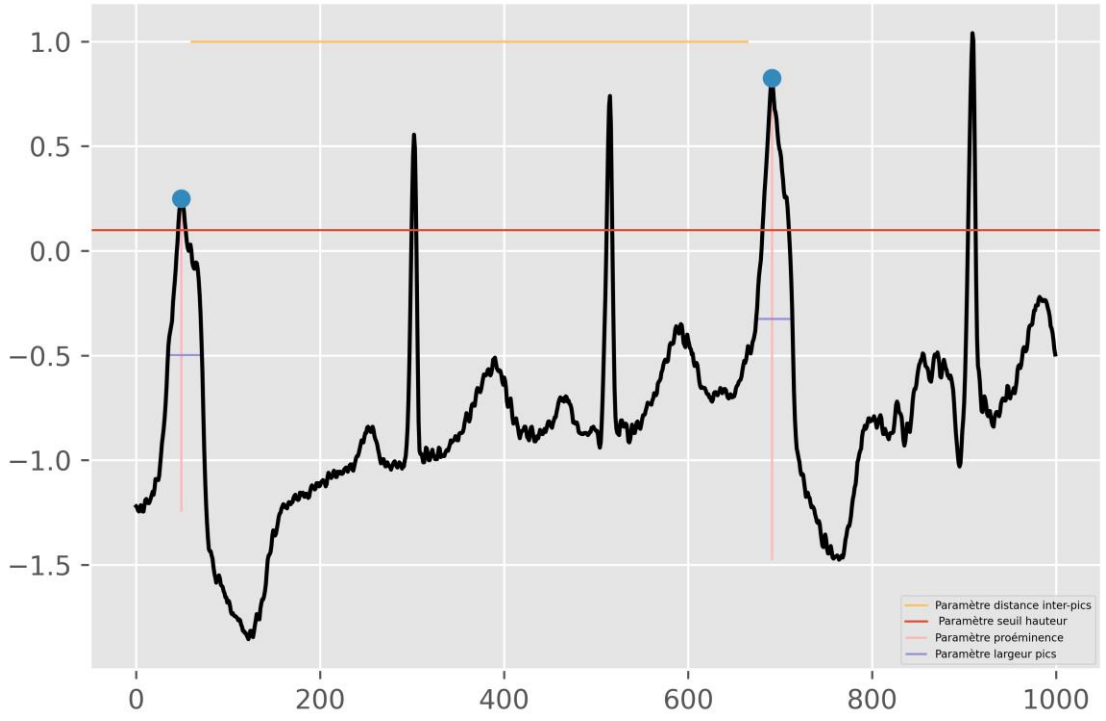


Figure 15 Exemple de détection de pics en utilisant la fonction python « find_peaks » issue de la bibliothèque ScyPy. Les pics détectés sont représentés par un point bleu. Les différents paramètres nécessaires au fonctionnement de l'algorithme sont représentés par des barres de couleur.

Le problème de cette méthode est qu'elle est manuelle, dans le sens où il faut pour chaque spectre, ajuster les paramètres afin de limiter les faux positifs. Lorsque les spectres sont similaires, il suffit de les optimiser une fois pour traiter les lots de spectres. Quand la quantité de spectres devient trop importante – notamment lorsque le signal de fond (background) fluctue entre chaque spectre, ce qui est le cas dans le cadre du SERS – alors cette méthode de détection de pics n'est plus du tout adaptée.

1.3.2 Une méthode plus élaborée : la transformée en ondelettes

En 2015, Zhang et al. ont mis au point une méthode de détection des pics basée sur la transformée en ondelettes du signal.

Les ondelettes sont une famille de fonctions construites par translation et dilatation d'une fonction mère Ψ (t). Elles sont définies par [19] :

$\Psi_{a,b}(t) = \frac{1}{\sqrt{|a|}}\Psi\left(\frac{t-b}{a}\right)\ a, b \in \mathbb{R}, a \neq 0$ a est le degré de compression de l'onde et b le paramètre de translation.

Pour pouvoir être utilisée dans l'analyse de fonction, la fonction mère doit avoir des propriétés spécifiques et en particulier la propriété suivante :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \Psi(t)\, dt = 0$$

Cette condition impose que la fonction mère soit une fonction oscillante dont la moyenne est nulle.[19]

Dans l'article de Zhang et al., la détection de pics appelée « multiscale peak detection », (MSPD) utilise une fonction mère de Ricker qui peut s'écrire analytiquement de la manière suivante :

$$\Psi(t) = \frac{2}{\sqrt{3\delta}\pi^{\frac{1}{4}}}(1-\frac{t^2}{\delta^2})e^{\frac{-t^2}{2\delta^2}}$$

La figure 16 représente l'évolution de la fonction de Ricker en fonction du paramètre delta. Celui-ci détermine sa largeur.

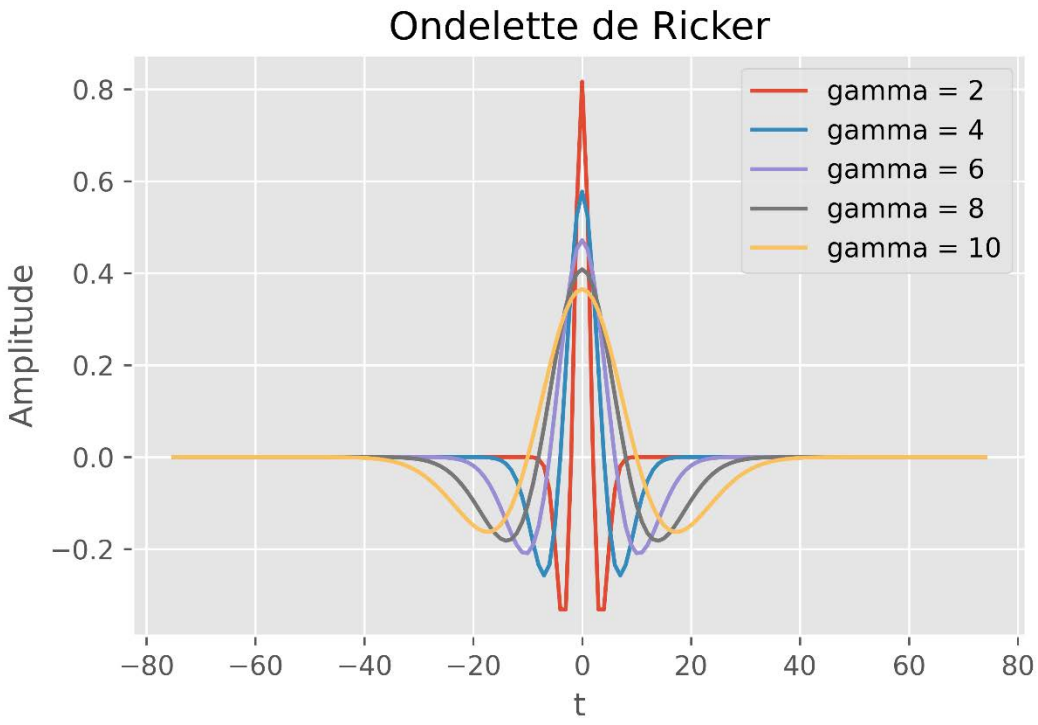


Figure 16 Variation de la fonction de Ricker en fonction du paramètre gamma.

Cette ondelette est utilisée pour faire une transformée en ondelettes continue du signal (CWT) (Continuous Wavelet Transform) :

$$W_s(a,b) = \frac{1}{\sqrt{a}}\int_{-\infty}^{+\infty} s(t)\Psi^*\left(\frac{t-b}{a}\right)dt$$

Avec a les largeurs de l'ondelette et b sa translation, Ψ^* est le complexe conjugué de l'ondelette de référence, t est le paramètre dont dépend le signal et $W_s(a,b)$ la représentation du signal en fonction des largeurs de l'ondelette et de sa translation.

La CWT est une corrélation croisée entre un signal s(t) et une ondelette.

Pour ce qui concerne l'analyse de spectres SERS, le signal est fonction du décalage Raman et donc la variable t des équations précédentes est le décalage fréquentiel.

La figure 17 représente un spectre Raman fictif composé de trois lorentziennes centrées en 100, 600 et 800 cm^{-1}. Une ligne de base linéaire ainsi que du bruit gaussien ont été ajoutés pour rendre le signal plus réaliste.

Pour détecter les pics, l'algorithme MSPD effectue la transformée en ondelettes en utilisant la fonction de Ricker. Fondamentalement ce que l'on trace est $W_s(b)$ en fonction de « a » que l'on fait varier entre 1 et 40. pour des largeurs entre 1 et 40.

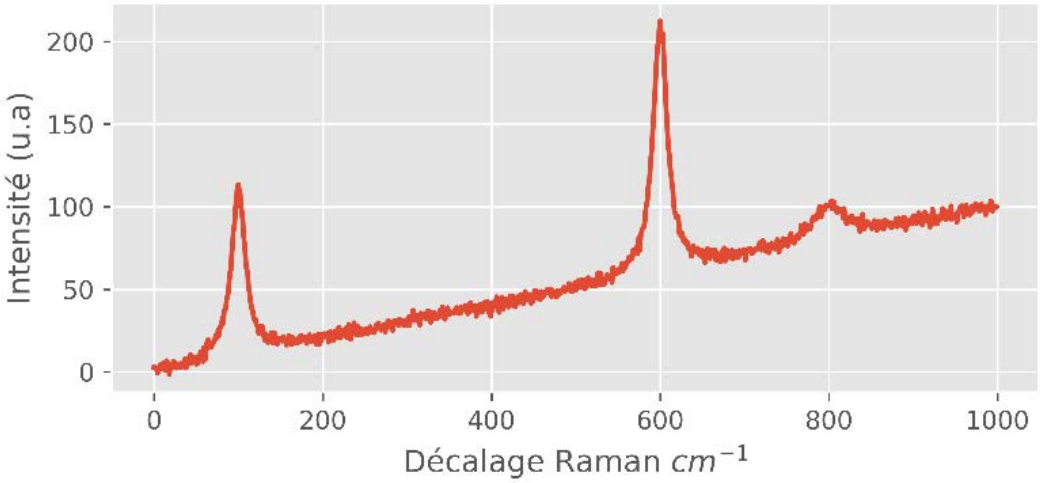


Figure 17 Spectre Raman fictif ; trois pics sont simulés par des fonctions lorentziennes. Du bruit ainsi qu'une ligne de base ont été ajoutés pour plus de crédibilité.

La figure 18 représente les 40 transformées en ondelettes en fonction de la largeur de l'ondelette de Ricker. Lorsque l'ondelette a une largeur de 1, la transformée du signal ne permet pas de distinguer de pics hormis un effet de bord en 1000 cm^{-1}. Puis à partir d'une largeur de 2, deux variations en 100 et 600 cm^{-1} apparaissent. La largeur de ces deux signaux varie positivement avec la largeur de l'ondelette. Pour une ondelette d'une largeur de 6, le pic à 800 cm^{-1} commence à être observable.

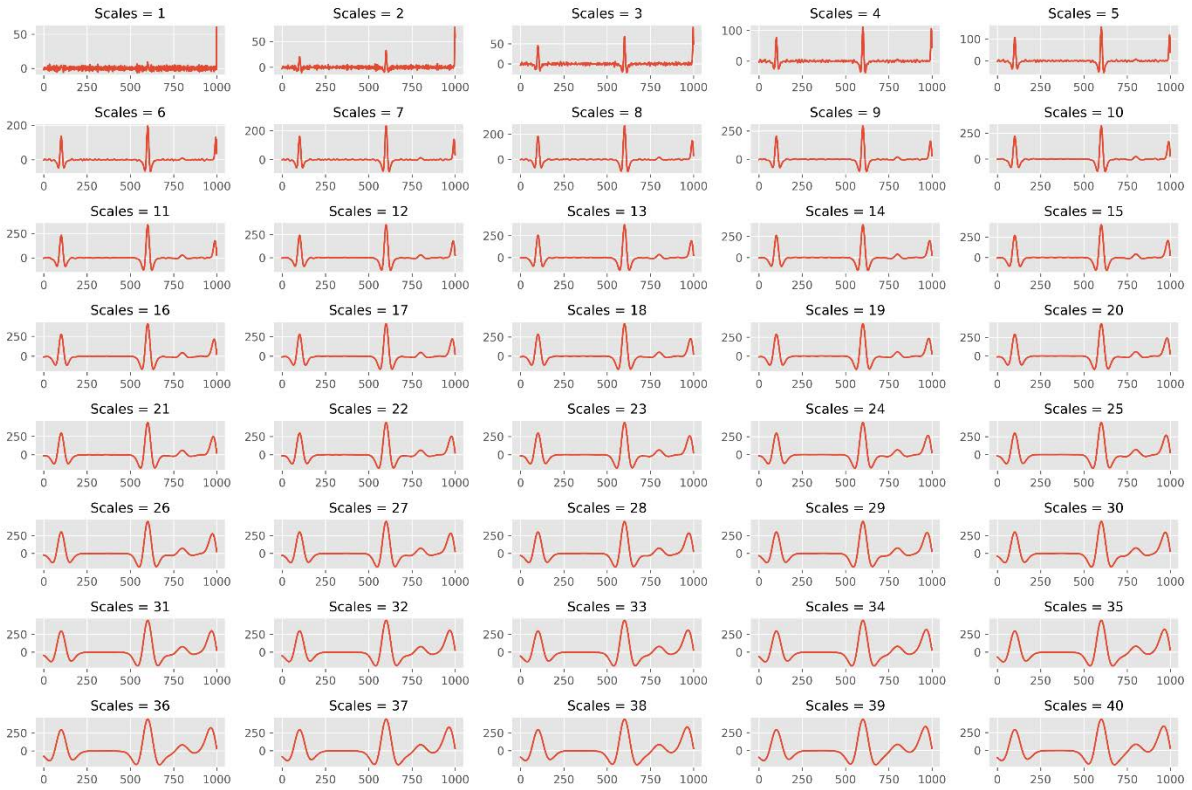


Figure 18 Transformées en ondelettes en fonction de la largeur de celle-ci soit la représentation de W(b) pour différentes valeurs de a (largeur des ondelettes)

La figure 19a) est la représentation de ces graphes lorsqu'ils sont compilés dans une représentation 2D. Pour détecter des pics, il faut donc que la largeur de l'ondelette soit similaire à la largeur du pic observé. L'algorithme MSPD détecte les pics à partir de la transformée en ondelettes en utilisant des fonctions valley, zero crossing et ridge (non détaillées ici) qui sont justifiées par la forme spéciale de la CWT au voisinage d'un pic.

La figure 19b représente le spectre Raman fictif pour lequel des pics ont été détectés grâce à l'algorithme MSPD.

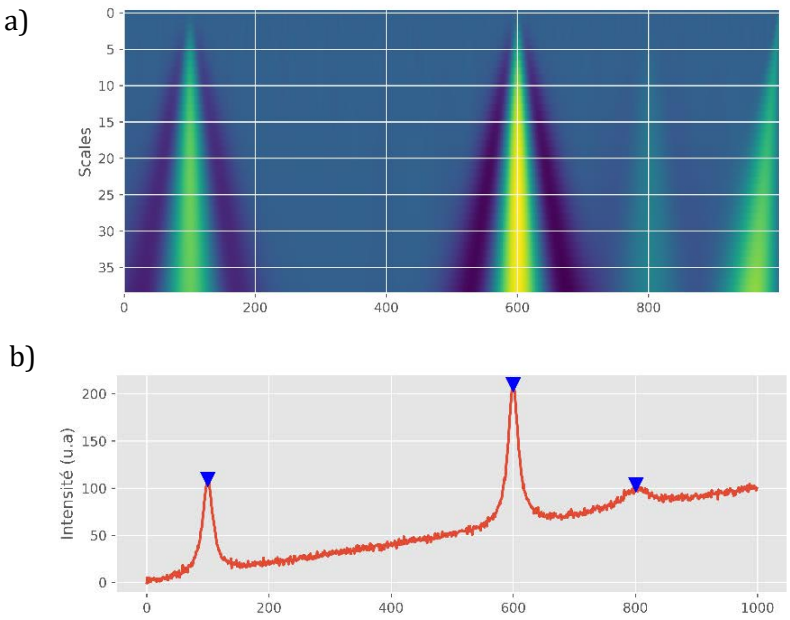


Figure 19a) représentation de la transformée en ondelettes continues 2D. b est suivant l'axe et a est suivant l'axe y , la valeur de la CWT est codée par les couleurs (bleu foncé négatif, bleu nul et jaune intense) 19b) Spectres Raman fictifs et pics détectés par l'algorithme MSPD.

2 Application de la méthode du clustering de corrélation hiérarchique pour sélectionner l'information

Dans un premier temps la pile de spectres (DataFrame) comporte 29000 entrées correspondant par exemple à 13 expériences d'évaporations (12 évaporations de la Rhodamine B pour des concentrations allant de 100nM à 1 aM et une évaporation d'eau dé-ionisée) et au scan pixel par pixel des 13 zones où les analytes ont été concentrés. Après détection des pics de chacun des spectres obtenus, nous ne retenons pour analyse que les spectres présentant au moins deux pics dans la région 1000 – 1800 cm^{-1}, il ne reste alors que 7665 spectres, dont nous jugeons qu'ils peuvent éventuellement contenir de l'information intéressante. Ces spectres sélectionnés nourrissent alors l'algorithme de classification hiérarchique. La figure 20 représente le nombre de clusters obtenus en fonction du taux de corrélation et ce pour trois conditions :

- Le nombre de clusters dans lesquels il y a plus d'un spectre et pour lesquels il n'y a pas de spectres issus de l'expérience contrôle (évaporation d'eau ultrapure).
- Le nombre de clusters dans lesquels il n'y a pas de spectres issus de l'expérience contrôle, on conserve ici les clusters ne contenant qu'un seul spectre
- Le nombre de clusters total (quel que soit le nombre de spectres à l'intérieur et la provenance de ces spectres c'est-à-dire de l'expérience contrôle ou pas).

En 20b, chaque courbe a été normalisée pour avoir une meilleure visibilité.

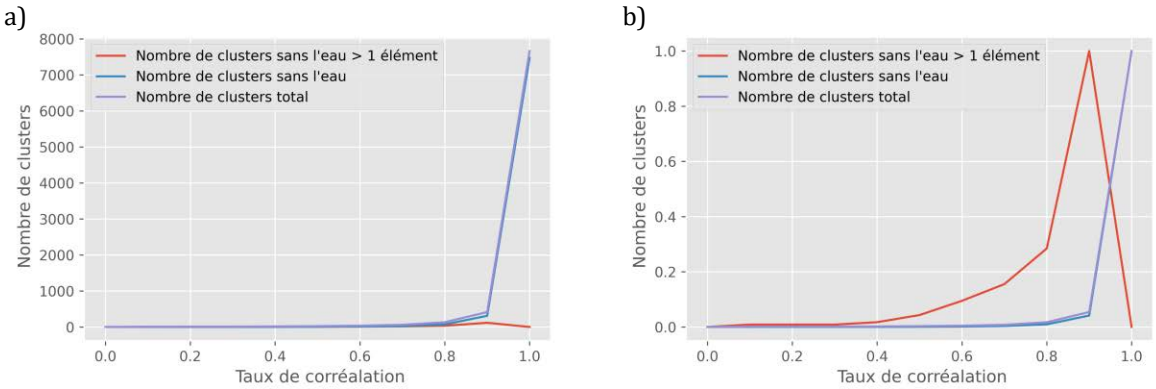


Figure 20 Évolution du nombre de clusters en fonction du taux de corrélation a) et b) représentation normalisée.

On peut constater sur ces courbes que lorsque le taux de corrélation est compris entre 0 et 0.6, il n'y a qu'un cluster dans lequel aucun spectre n'est corrélé avec l'eau. Lorsque le taux de corrélation seuil est augmenté, le nombre de clusters total augmente, ce qui signifie que le nombre de spectres dans ces clusters diminue. Le nombre de clusters dans lesquels il n'y pas de spectre de l'expérience contrôle augmente de façon similaire au nombre total de clusters.

La courbe la plus intéressante est celle du nombre de clusters dans lesquels il n'y a pas de spectres issus de l'expérience contrôle et qui en plus, contiennent plus d'un spectre par cluster. Cette courbe augmente avec le taux de corrélation, passe par un maximum pour un taux de corrélation de 0.9 et revient à 0 lorsque le taux de corrélation est de 1. En effet, dans ce cas, tous les spectres sont dans des clusters différents qui ne contiennent qu'un seul élément. Chaque spectre étant parfaitement corrélé avec lui-même uniquement.

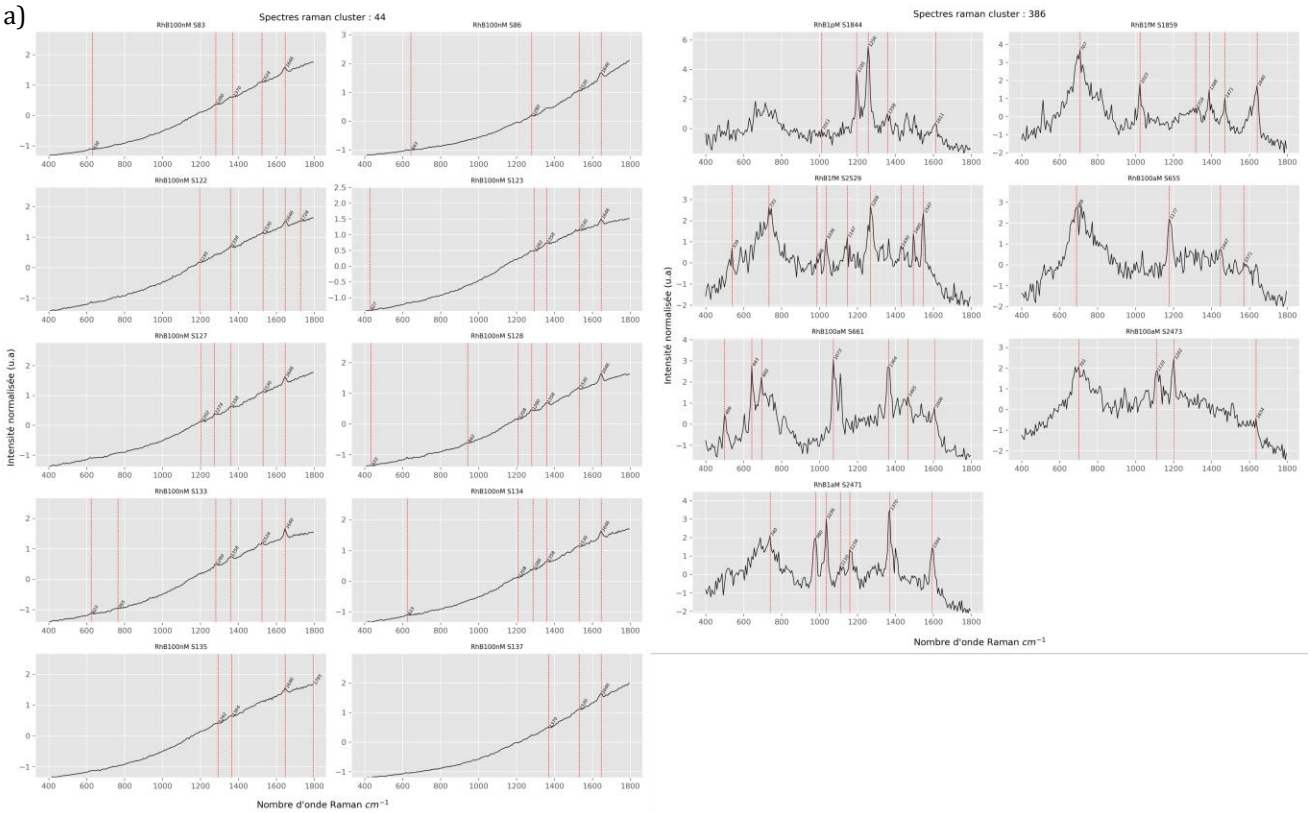
Nous avons donc sélectionné comme valeur de seuil 0.9 afin de classifier nos spectres.

La figure 21a) représente quelques clusters dans lesquels aucun spectre n'est issu de l'expérience contrôle. Le cluster 44 est composé de 881 spectres (seul 10 sont affichés), tous issus de l'expérience à 100 nM. Le cluster 386 est quant à lui composé de 7 spectres issus des expériences à 1 pM, 1 fM,100 aM et 1 aM.

Ainsi, il est possible d'assembler les spectres provenant de différentes expériences dans des clusters dont les signatures Raman sont différentes de toutes les signatures possiblement observées lors d'une expérience contrôle réalisée avec le solvant « pur ». Il faut après ce traitement vérifier la « cohérence physique » de ces clusters, c'est-à-dire rechercher les signatures vibrationnelles communes qu'ils contiennent et possiblement les identifier.

La figure 21b) est la liste des pics trouvés pour les spectres contenus dans le cluster 386. La conclusion qui s'impose est que les positions des pics des spectres dans ce cluster ne sont pas souvent concordantes. Ce cluster n'a donc, pour nous, aucune signification physique intéressante.

a)



b)

	Cluster 386						
	RhB1pM S1844	**RhB1fM S1859**	**RhB1fM S2529**	**RhB100aM S655**	**RhB100aM S661**	**RhB100aM S2473**	**RhB1aM S2471**
1	232	219	225	225	219	219	232
2	1011	707	539	688	387	701	740
3	1195	1023	733	1177	499	1110	980
4	1256	1316	986	1447	643	1202	1036
5	1358	1388	1036	1571	695	1634	1110
6	1611	1471	1147		1073		1159
7		1640	1268		1364		1370
8			1430		1465		1594
9			1495		1606		
10			1547				

Figure 21 Représentation de deux clusters après clustering de corrélation hiérarchique pour une valeur du coefficient de corrélation égale à 0.9, l'intensité a été normalisée pour une meilleure lecture a), b) pics associés pour les 7 spectres du cluster 386.

Ces premiers résultats exposent une méthode de « clusterisation » des spectres SERS de la rhodamine B basée sur les coefficients de corrélation de Pearson. Avant d'aller plus loin dans l'analyse des données, il convient de la discuter.

3 Discussion

3.1 Le problème de la ligne de base

Le clustering de corrélation hiérarchique est une méthode algorithmique qui permet de regrouper les spectres en clusters basés sur le coefficient de corrélation de Pearson.

Le taux de corrélation sélectionné a une influence considérable – c'est celui-ci qui détermine le nombre de clusters. Cependant, cette méthode souffre pour son utilisation dans l'analyse des spectres Raman, d'un défaut d'envergure lié à la présence d'un fond continu dans le signal Raman enregistré. Ce défaut est illustré en figure 22.

En 22a) est représentée la ligne de base (« baseline ») du spectre S352. Cette ligne de base a été assimilée à un spectre fictif, puis ce dernier a été rajouté dans la pile de spectres DF1 de manière artificielle (ici il s'agit d'un cas d'école, un spectre ne contenant pas de pics qui ne pourrait se retrouver dans le jeu de données, nous court-circuitons ici la sélection des spectres sur la base de la détection d'au moins deux pics dans la région d'intérêt) comme s'il s'agissait d'un spectre réel. En figure 22b) les spectres SERS de ce nouveau DataFrame appelé DF2 sont affichés. Enfin, en figure 22c) la matrice des coefficients de corrélation de Pearson est présentée. Le spectre « baseline » a un taux de corrélation minimum de 0.8, ce qui dans certain cas, est supérieur à ce que peuvent obtenir des spectres réels entre eux. Cela signifie qu'algorithmiquement parlant, ce spectre, de par sa similitude sur la ligne de base générale des spectres va fortement influencer le processus de classification.

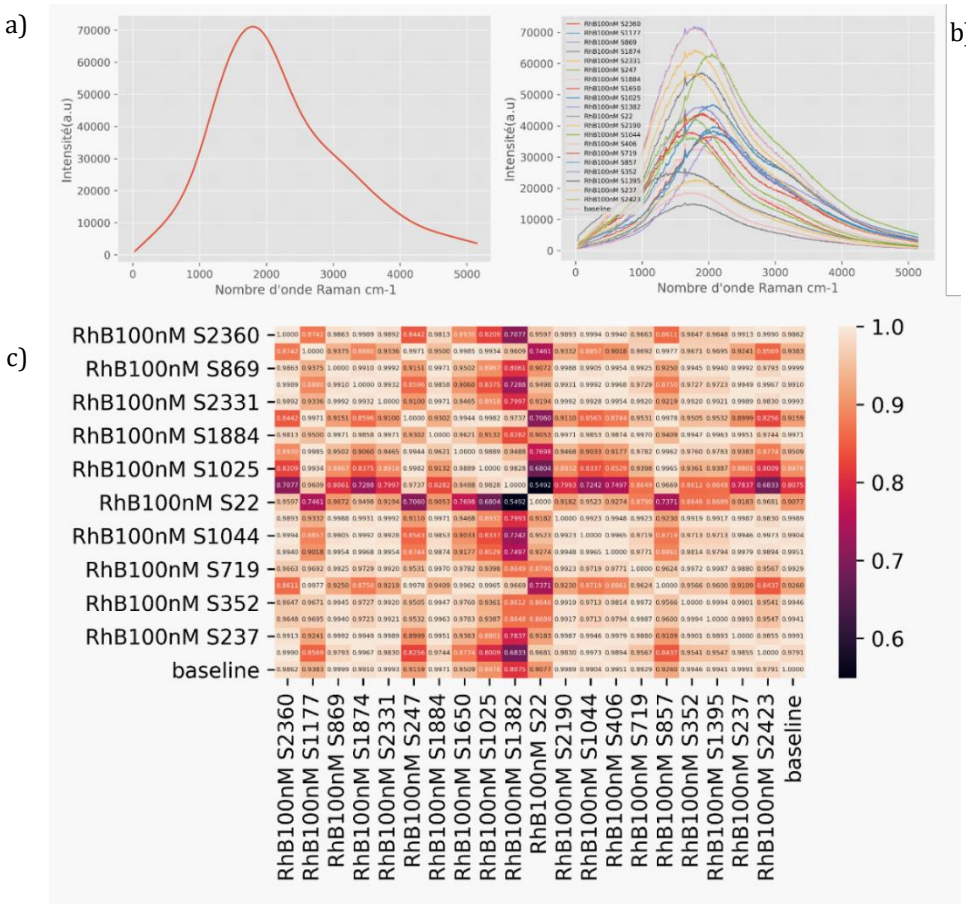


Figure 22 En a) est représentée la ligne de base du spectre 352. b) Cette ligne de base est ajoutée à la pile de spectres initiale DF1. c) Matrice du coefficient de corrélation de Pearson pour ce nouveau DataFrame DF2 comprenant la ligne de base notée « baseline ». La ligne (ou la colonne) Baseline présente de forts coefficients de corrélation avec tous les autres spectres de la pile.

Autrement dit, cela signifie que la ligne de base des spectres joue un rôle primordial dans le traitement des données. Des spectres avec des lignes de base similaires mais des pics positionnés à des endroits différents peuvent avoir des taux de corrélation élevés bien que ne révélant pas du tout la même espèce chimique. Nous avons observé que ce phénomène est à l'origine du manque de significativité physique des clusters issus de l'algorithme de « clusterisation » si ce dernier est opéré à partir des spectres bruts. Nous avons donc cherché une nouvelle procédure permettant de s'affranchir de l'influence de la ligne de base.

3.2 Méthode d'extraction de la ligne de base

La ligne de base est l'enveloppe continue du signal. Cette partie du signal ne contient pas d'information d'origine vibrationnelle et ne permet donc pas d'identifier les liaisons chimiques du composé moléculaire excité par le laser. Pourtant sa présence influence fortement la classification par corrélation, nous avons donc décidé de supprimer cette enveloppe avant de détecter les pics des spectres et de classifier les spectres sélectionnés. Cette étape d'élimination de la ligne de base peut donc être considérée comme un pré-traitement du signal[20] avant analyse.

Retirer cette ligne de base signifie créer un modèle liant la ligne de base et le signal d'intérêt. Le modèle simple, que nous avons choisi est de décomposer le signal mesuré de la manière suivante :

$$y = y_R + b + \varepsilon$$

avec y le signal mesuré, y_R le signal d'intérêt pour le Raman, b la ligne de base et ε le bruit. L'idée est donc d'estimer la ligne de base pour ensuite la soustraire du signal observé.

La bibliothèque python « pybaselines » propose plus de 50 algorithmes de correction du fond continu adaptés directement de la littérature.[21] Une des méthodes consiste à ajuster une fonction polynomiale qui définira la ligne de base. Cette fonction peut s'écrire sous la forme $p(x) = \sum_{j=0}^{m} \beta_j x^j$ avec β la matrice des coefficients du polynôme. Ces derniers sont calculés par la méthode des moindres carrés. Bien que ces méthodes soient dites automatiques, il faut, dans le cas de la fonction polynomiale, *a minima* définir l'ordre du polynôme. Il en est de même pour beaucoup des algorithmes proposés dans la bibliothèque « pybaselines ». De plus, il faut paramétrer ces algorithmes avec précaution afin d'éviter qu'un surajustement (overfitting) de la ligne de base ne se produise. Avec des spectres Raman ne présentant pas de grandes variations de signal de fond, l'optimisation d'un algorithme pour traiter tous les spectres est réaliste. En revanche dans le cas du Raman exalté, les fluctuations de la ligne de base des spectres SERS est très importante. Ceci implique qu'il est quasiment impossible ou très délicat de trouver un algorithme qui permettrait de retirer la ligne de base de façon optimale sur tous les spectres et ce de manière automatique. Dès lors, il faudrait ajuster les paramètres manuellement en fonction de la morphologie des spectres, ce qui n'est pas souhaitable dans le cas des grandes quantités de spectres que nous avons à traiter. Cette influence de la ligne de base sur la corrélation de Pearson a été mise en évidence par Ashok Zachariah Samuel et al.[22] dans leur article "On Selecting a Suitable Spectral Matching Method for Automated Analytical Applications of Raman Spectroscopy". Les auteurs concluent que la corrélation de Pearson n'est pas une méthode fiable pour classifier des spectres et ce à cause de l'influence de la fluctuation de la ligne de base. La ligne de base et ses fluctuations en SERS en revanche, n'influence pas la détection des pics telle que nous la pratiquons par une transformée en ondelettes. La méthode de détection de pics basée sur la transformée en ondelettes est donc un choix judicieux dans le cas de spectres aux lignes de base changeantes.[23]

Le clustering de corrélation hiérarchique ne pouvant pas se faire sur les spectres bruts, dès lors deux options étaient envisageables. La première était de traiter les spectres individuellement de manière à extraire une ligne de base d'un spectre à l'autre, la seconde était d'utiliser uniquement l'information de la position des pics pour effectuer la classification par corrélation. Il est clair que la première méthode est fastidieuse : il faut pour chaque spectre, ou tout du moins pour des groupes de spectres, trouver l'algorithme optimal puis le paramétrer pour retirer la ligne de base. Le réglage des paramètres est de plus soumis à un biais dû à l'expérimentateur. L'information moléculairement pertinente contenue dans les spectres SERS repose en grande partie sur la position des pics. Utiliser cette information recueillie à l'aide de l'algorithme de détection des pics par analyse de la transformée en ondelettes pour nourrir le clustering hiérarchique de corrélation semble être la méthode la plus pertinente – c'est tout du moins ce que nous tenterons de démonter par la suite. Dans cette nouvelle approche les spectres seront groupés par similarité sur la position de leurs pics Raman et non plus par une quelconque similarité inintéressante avec un fond continu difficilement exploitable d'un point de vue physique.

4 Optimisation du clustering de corrélation hiérarchique

Pour corréler les données sur la position des pics au lieu de les corréler sur la ligne de base, l'idée est de créer pour chaque spectre brut, un spectre « simplifié » correspondant.

4.1 Spectres Simplifiés

La figure 23a) montre huit spectres tirés au sort parmi le DataFrame utilisé précédemment. En figure 23b) les spectres simplifiés associés aux huit spectres tirés au sort sont affichés. Chaque spectre simplifié construit correspond à la somme de fonctions portes centrées sur la position des pics. La largeur de la porte est arbitrairement définie comme la résolution du spectromètre soit 10 cm^{-1}.

Seul les pics compris entre 1000 cm^{-1} et 1800 cm^{-1} sont pris en compte. En effet, comme mentionné précédemment, c'est dans cette gamme de décalage fréquentiel que les liaisons des molécules organiques apparaissent. De plus, cela nous permet d'éliminer des pics structuraux, par exemple liés au substrat ou aux nanoparticules d'argent. Ces pics qui apparaissent de manière répétée sur les spectres, augmenteraient le taux de corrélation alors qu'ils ne présentent aucun intérêt pour l'application analytique.

Les matrices des coefficients de Pearson pour les spectres originels et les spectres simplifiés sont représentés en figures 23c) et 23d) respectivement.

Les coefficients de corrélation pour les spectres originels sont compris entre 0.5 et 0.9 alors qu'ils sont compris entre -0.1 et 0.56 pour les spectres simplifiés. Cette différence est facilement compréhensible dans le sens où la corrélation après simplification exige une correspondance forte sur certains pics très étroits du spectre et ne se base plus du tout sur l'intensité réelle mesurée dans chaque canal d'acquisition. C'est une forme de corrélation beaucoup plus « exigeante » mais, selon nous, beaucoup plus représentative de l'information que nous recherchons.

L'hypothèse forte que nous formulons est donc qu'en utilisant le clustering de corrélation hiérarchique sur les spectres simplifiés, nous allons pouvoir classer les spectres sur la position des pics et non sur les fluctuations de la ligne de base. La méthode que nous allons employer est la même que dans la partie précédente ; mais cette fois-ci la corrélation se fera sur les spectres simplifiés, réduits à des fonctions en créneaux d'égale intensité et d'égale largeur (10 cm^{-1}). Après classification, afin de regarder la cohérence physique des clusters, qui faisaient défaut avec la méthode précédente, il convient bien sûr d'afficher les spectres originels dont l'intensité sera simplement normalisée sur la fenêtre d'observation.

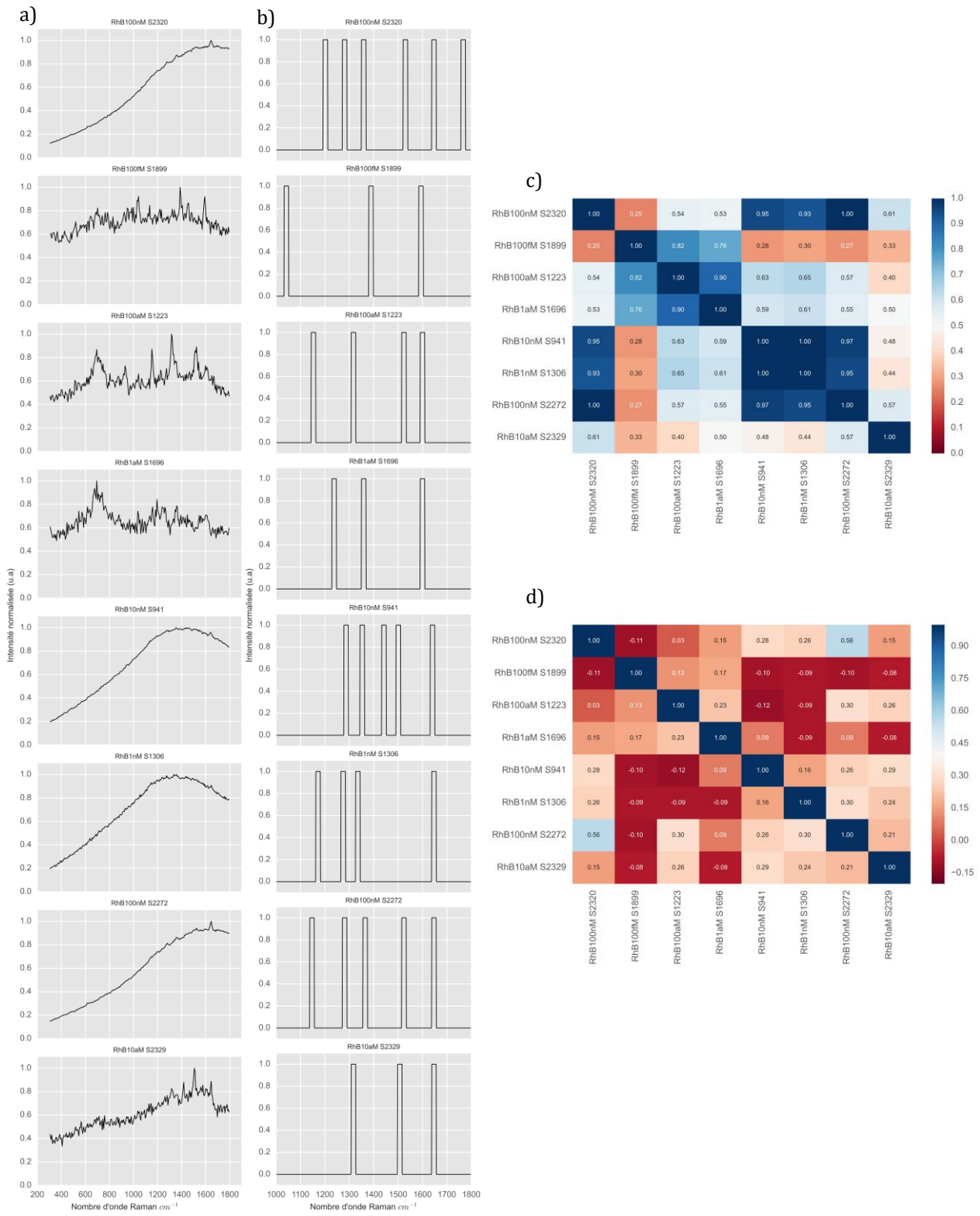


Figure 23 a) 8 spectres SERS issus du DataFrame comprenant toutes les données des expériences menées avec de la Rhodamine B et b) spectres simplifiés associés c) et d) matrices des coefficients de Pearson associés à ces deux jeux de données (spectres originaux en c) et spectres simplifiés en d))

4.2 Choix du taux de corrélation

Avec les spectres simplifiés, le taux de corrélation de Pearson renseigne sur la proximité de la position des pics. A titre d'exemple, deux spectres simplifiés sont créés de toutes pièces sur l'intervalle [1000 – 1800] cm^{-1} et nous analysons le taux de corrélation entre eux en fonction du nombre de pics qui présentent un recouvrement entre eux. La figure 24 récapitule les différents taux de corrélation obtenus en fonction du nombre de pics pour les spectres, le nombre de pics en commun en distinguant ceux qui se recouvrent parfaitement ou partiellement. Par partiellement, nous attendons des fonctions portes qui ne sont pas exactement centrées. Dans l'exemple, un décalage de 5 cm^{-1} entre les deux fonctions portes a été mis en œuvre pour illustrer l'impact que cela peut avoir sur le taux de corrélation.

Nombre pics spectre 1	Nombre Pics spectre 2	Nombre de pics en commun	Taux de corrélation
3		0	-0.08
		1	0.28
		2	0.64
		3	1
		1 dont 1 partiellement	0.18
		2 dont 2 partiellement	0.45
		3 dont 3 partiellement	0.71
		2 dont 1 partiellement	0.54
		3 dont 1 partiellement	0.9
		3 dont 2 partiellement	0.8
4		0	-0.1
		1	0.17
		2	0.45
		3	0.72
		4	1
		1 dont 1 partiellement	0.09
		2 dont 2 partiellement	0.3
		3 dont 3 partiellement	0.5
		4 dont 4 partiellement	0.7
		2 dont 1 partiellement	0.37
		3 dont 1 partiellement	0.65
		3 dont 2 partiellement	0.578
		4 dont 1 partiellement	0.92
		4 dont 2 partiellement	0.856
		4 dont 3 partiellement	0.78

Figure 24 Évolution du taux de corrélation pour deux spectres simplifiés en fonction du nombre de pics en commun en distinguant ceux qui se recouvrent parfaitement ou partiellement.

Si nous prenons deux spectres ayant chacun trois pics, alors s'ils ont seulement deux pics en commun, leur taux de corrélation sera de 0.64. S'ils ont trois pics en commun mais seulement partiellement le taux sera alors de 0.71.

Avec des spectres à quatre pics chacun, le taux est 0.7 pour quatre pics partiellement identiques et de 0.5 pour seulement trois pics partiellement identiques. Pour avoir des taux de corrélation élevé (supérieur à 0.7), il faut donc avoir au moins trois pics parfaitement identiques.

Cette simulation a pour objectif de montrer que si l'on choisit un taux de corrélation, admettons de 0.8, il faudrait que tous les pics des spectres soient concordants. Or, un taux de corrélation entre les spectres implique de favoriser des clusters avec des spectres qui ont un minimum de pics en commun. La figure 25 représente un spectre 0 (rouge) ayant trois pics positionnés en 1202 cm^{-1}, 1298 cm^{-1}, 1405 cm^{-1} et un spectre 1 (bleu) ayant des pics en 1200 cm^{-1}, 1300 cm^{-1}, 1400 cm^{-1}, 1595 cm^{-1}, 1650 cm^{-1}. Ces deux spectres ont un taux de corrélation de 0.62. Or, au vu de la résolution du spectromètre (environ 10cm^{-1}), il conviendrait de les mettre dans un cluster unique.

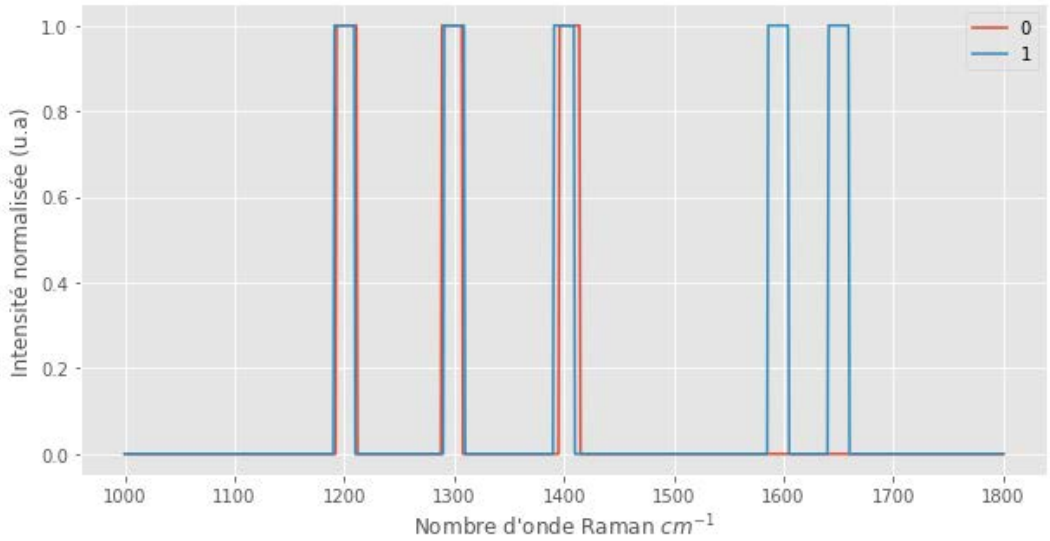


Figure 25 Deux spectres simplifiés imaginés pour l'exemple sont représentés ; le premier noté 0 possède 3 pics positionnés en 1202, 1298, 1405 cm^{-1}, le seconde noté 1 possède 5 pics en 1200, 1.300, 1400, 1595, 1650 cm^{-1}. Le taux de corrélation de ces deux spectres est de 0.62.

Le taux de corrélation pour effectuer les clusters à partir des spectres simplifiés a été fixée à 0,6. Cette valeur a été obtenue de manière empirique. Elle semble réaliser un bon compromis entre une exigence corrélative trop forte (qui tend à dépeupler les clusters et à augmenter leurs nombres) et une assurance que les spectres regroupés dans un même cluster possèdent des pics vibrationnels en correspondance.

Au global, la méthode que nous avons mise au point et que nous utilisons pour la suite de ce travail de thèse est résumée sur la figure 26. A nouveau nous insistons sur le fait qu'elle est totalement explicite à partir de méthodes mathématiques standard.

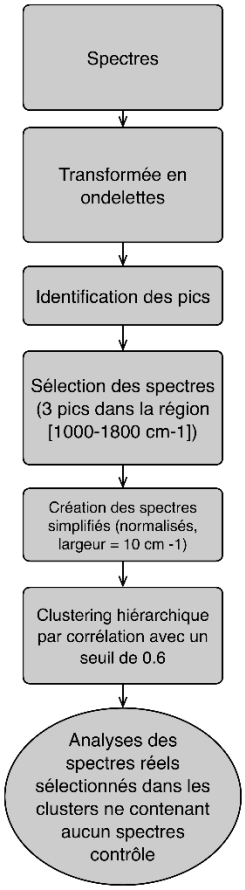


Figure 26 Résumé de la méthode algorithmique permettant la sélection des spectres. Toutes les règles de sélection y sont reportées.

5 Résultats

Deux molécules ont été testées : la rhodamine B précédemment mentionnée et le bleu de méthylène.

5.1 Analyse des spectres exaltés de la Rhodamine B

Les spectres de la rhodamine B ont été acquis en utilisant les paramètres suivants sur le spectromètre Raman HORIBA Jobin Yvon de la gamme Xplora

- Laser Nd : YAG 53 2nm 0.1 mW sur l'échantillon à travers un objectif x50 sur spot de 2 µm de diamètre
- Le réseau est de 600 fentes par mm

- Fenêtre spectrale 100 à 5000 cm^{-1}
- Temps d'acquisition 250 ms.

Le jeu de données de la rhodamine B comporte 7665 spectres. Après « clusterisation », ces spectres ont été répartis dans 2211 clusters dont 2030 ne comportent pas de spectre « contrôle ».

Enfin, 1432 clusters ne comportent pas de spectre « contrôle » et ont un nombre d'éléments les composant supérieur à 2.

La distribution de la composition de ces clusters est donnée dans la figure 27. On peut observer qu'il y a beaucoup de clusters avec peu d'éléments (en haut à gauche dans le graphe) ainsi que peu de clusters avec beaucoup d'éléments (en bas à droite dans le graphe).

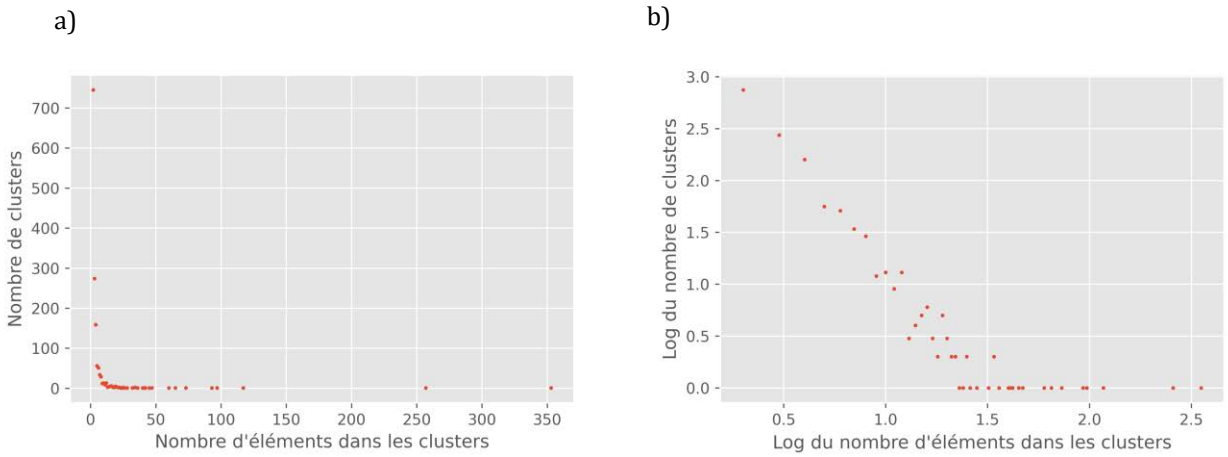


Figure 27 a) Évolution du nombre de clusters (sélectionnés en fonction du nombre d'éléments les composant pour la Rhodamine B b) représentation log-log

Les figures 28, 29 et 30 représentent des spectres issus de certains clusters sélectionnés après le clustering de corrélation hiérarchique. La concentration de rhodamine B correspondant à un spectre affiché est donnée dans le titre du spectre. Par exemple le titre : RhB100fMS915 correspond au 915ième spectre acquis sur le piédestal analytique d'un dispositif sur lequel une goutte de rhodamine B à la concentration de 100 fM avait été évaporée. On observe clairement comme cela était attendu que dans ces clusters, les spectres ont au moins trois pics en commun dans la région fréquentielle 1000-1800 cm^{-1} et ceci malgré de très fortes variations de la ligne de base qui parfois masquent complètement la similitude entre les pics.

Les clusters présentés sur cette figure ont été choisis dans la mesure où l'on peut retrouver un spectre provenant de chaque concentration de rhodamine B.

La rhodamine B, en raison de ses cycles aromatiques, présente un grand nombre de pics en Raman dans la région 1000 - 1800 cm^{-1}.

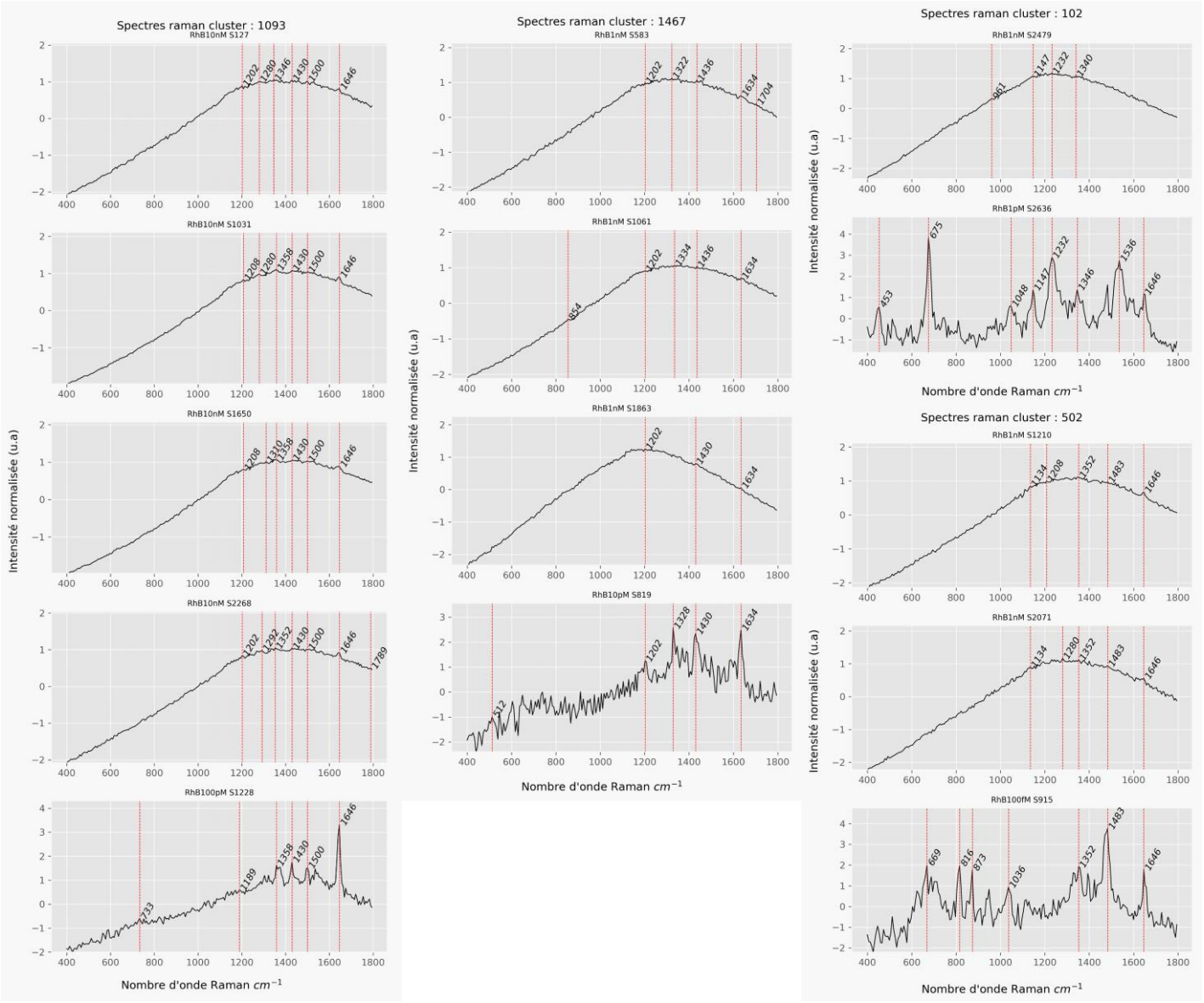


Figure 28 Les spectres issus de 4 clusters sont représentés : 1093, 502 102,1467. La position des pics détectés par l'algorithme est directement affichée sur les spectres originels.

Dans le cluster 1093, un spectre à 100 pM est représenté. Il possède cinq pics de la Rhodamine B : 1189, 1358 (élongation C-C du xanthène), 1430 (élongation C-C et déformation C-C-H), 1500 (élongation C-C du xanthène), 1646 (élongation C-C du xanthène) cm^{-1}.

La famille de spectres la plus remarquable est donnée dans la figure 30 (cluster 1988). Dans ce cluster on retrouve des spectres à 100 nM, 10 nM et 1 spectre à 1 aM. Le spectre de la rhodamine à 1 aM a en relation quatre pics avec les spectres à 100 nM et 10 nM : 1280, 1364 (élongation C-C du xanthène), 1465 (déformation $C_{diethylamine}$-H), 1646 (élongation C-C du xanthène) cm^{-1}.

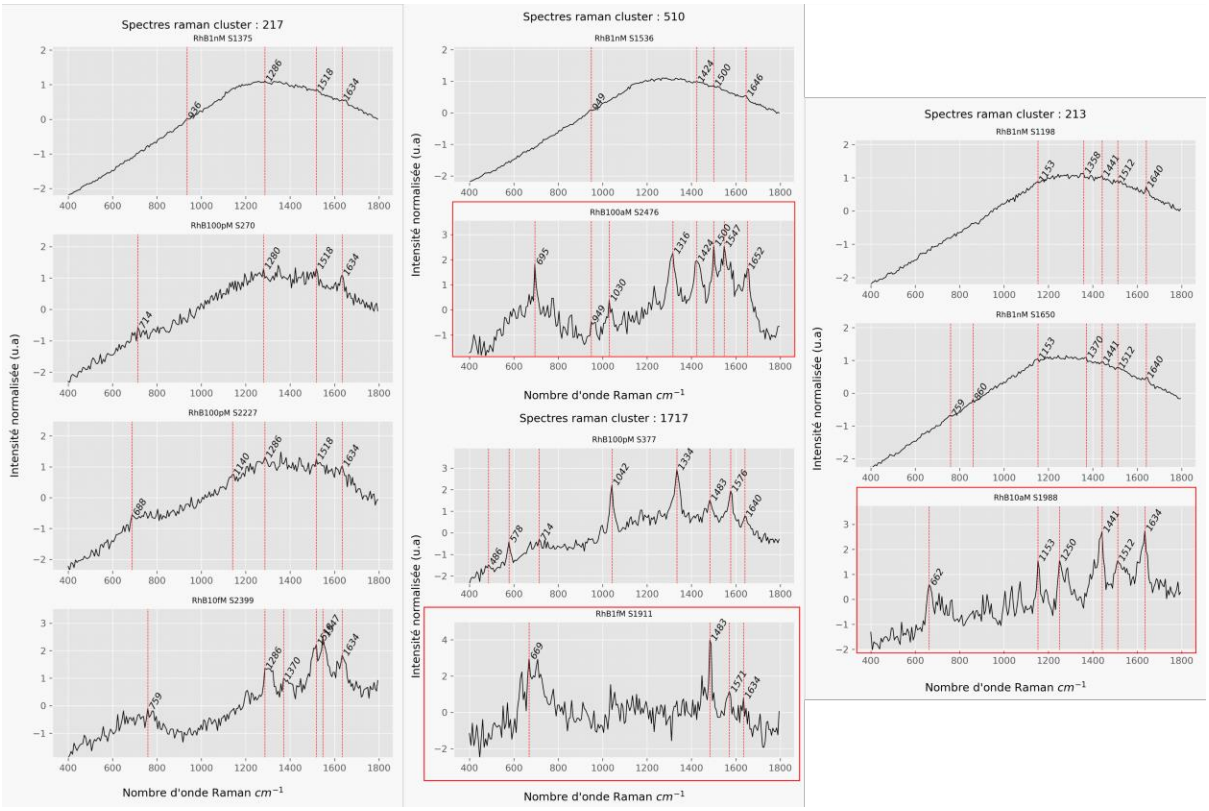


Figure 29 Les spectres issus de 4 autres clusters sont représentés : 217, 510 1717, 213. La position des pics détectés par l'algorithme est directement affichée sur les spectres. En rouge sont encadrés les spectres de rhodamine B ≤ 1fM

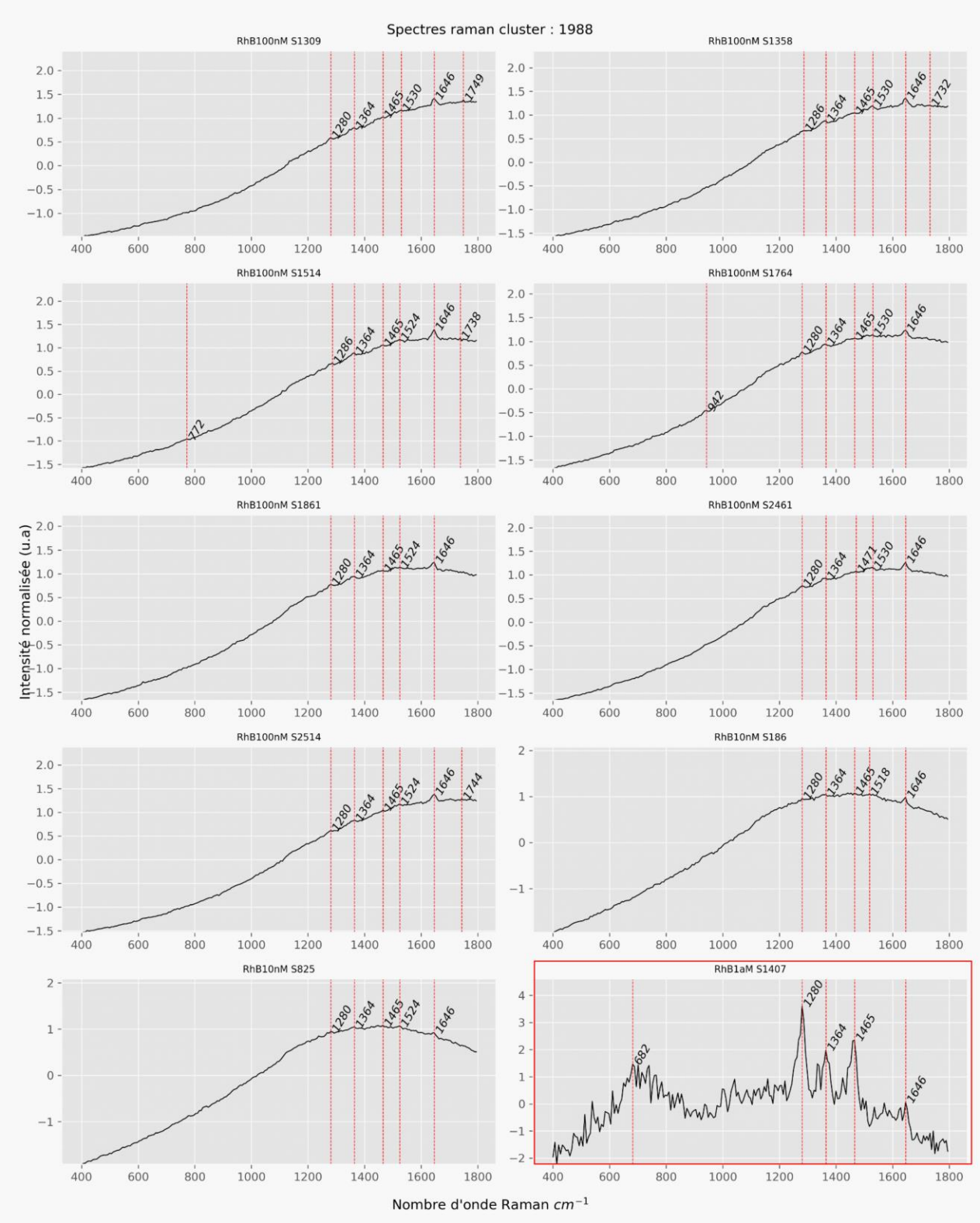
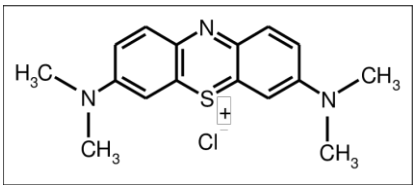


Figure 30 Représentation des spectres issus du cluster n°1988. En rouge sont encadrés les spectres de rhodamine B ≤ 1fM

5.2 Analyse des spectres exaltés du Bleu de méthylène



Le bleu de méthylène, ou chlorure de méthylthioninium, est un colorant et un médicament. Sa formule chimique est $C_{16}H_{18}ClN_3S$. Cette molécule est souvent utilisée comme molécule sonde pour caractériser les substrats SERS.[24]

Figure 31 Formule chimique du bleu de méthylène

Les solutions de bleu de méthylène ont été préparées à des concentrations allant de 1 µM à 1 aM dans de l'eau DI (ultrapure). Les conditions d'acquisition sont similaires à celles utilisées pour la rhodamine B : une seule acquisition est effectuée par spectre à un temps d'intégration de 250ms. La taille des pixels de la cartographie est 1.75x1.75µm. Il est ainsi possible de réaliser la cartographie du piédestal en acquérant 1680 spectres en 15 minutes environ.

Des gouttes de 6 µL pour chaque concentration ont été évaporées sur plaque chauffante à 30° en salle blanche sur les dispositifs SH-SERS. Une goutte contrôle d'eau déionisée a aussi été évaporée.

Le fait de chauffer légèrement le substrat permet de diviser le temps d'évaporation par un facteur trois environ.

La figure 32 est extraite de la publication « *Surface-enhanced Raman scattering of methylene blue adsorbed on cap-shaped silver nanoparticles* »[25]. Il s'agit d'une liste avec assignation des pics du bleu de méthylène en fonction de la surface SERS utilisée.

Solid MB powders (cm^{-1})	On nanocaps with 10 nm Ag (cm^{-1})	On nanocaps with 16 nm Ag (cm^{-1})	On nanocaps with 20 nm Ag (cm^{-1})	Reported results[a] (cm^{-1})	Band assignments[b]
1618 (s)	1617 (s)	1614 (s)	1613 (s)	1617 (s)	ν(C–C) ring
	1593 (w)	1592 (w)	1592 (w)	1597 (w)	ν(C–C) ring
1544 (w)			1563 (w)	1513 (w)	ν_{asym}(C–C)
1441 (w)	1430 (s)	1433 (s)	1420 (s)	1442 (m)	ν_{asym}(C–N)
1396 (m)	1398 (s)	1410 (s)		1396 (m)	α(C–H)
1331 (w)	1304 (s)	1315 (s)	1307 (s)		
1272 (w)			1265 (w)	1301 (m)	
1181 (m)	1226 (s)	1219 (m)	1205 (m)	1184 (m)	ν(C–N)
	1122 (s)	1119 (s)	1119 (s)	1121 (m)	γ(C–H)
1067 (w)	1070 (w)	1070 (w)	1070 (w)		
	1036 (m)	1033 (m)	1032 (m)	1030 (m)	β(C–H)
	885 (m)	897 (m)	890 (m)		
768 (w)	724 (w)	724 (w)	724 (m)		
677 (w)	675 (w)		684 (w)	670 (w)	γ(C–H)
	610 (m)		615 (m)	612 (m)	δ(C–S–C)
497 (w)			502 (w)	502 (m)	δ(C–N–C)
445 (s)	450 (s)	465 (s)	444 (s)	449 (m)	δ(C-N-C)
	246 (m)	253 (m)	249 (m)	246 (m)	ν(Ag–N)

Abbreviations: s, strong; m, medium; w, weak; ν, stretching; α, in-plane ring deformation; β, in-plane bending; γ, out-of-plane bending; and δ, skeletal deformation.

Figure 32 Liste avec assignation des pics du bleu de méthylène en fonction de différentes surfaces SERS utilisées. Recopié de [25]

La méthode d'analyse est la même que précédemment : tous les spectres acquis sont assemblés dans un DataFrame incluant les spectres issus de l'expérience de contrôle avec l'eau pure. Les pics sont détectés par l'algorithme puis seuls les spectres ayant au moins trois pics dans la zone fréquentielle 1000 – 1800 cm^{-1} sont sélectionnés, soit 5101 spectres.

Des spectres simplifiés correspondant à la position des pics sont ensuite générés ; la largeur de la fonction porte est fixée à 10 cm^{-1}.

Le clustering de corrélation hiérarchique est appliqué sur ces spectres fictifs avec un seuil de clustering fixé à 0.6.

Les clusters ne comportant pas d'éléments issus de l'expérience de contrôle et ayant plus de deux éléments sont sélectionnés.

Les 5010 spectres sont rangés dans 1684 clusters dont 820 ont plus de deux éléments et ne comportent pas de spectre de l'expérience contrôle.

L'évolution du nombre de clusters en fonction du nombre d'éléments qu'ils contiennent est donnée en figure 33.

Les variations sont similaires à ce qui a été observé pour la rhodamine B, à savoir un grand nombre de clusters comportant peu d'éléments (plus de 500 clusters ayant deux éléments) et très peu ayant beaucoup d'éléments (6 clusters ayant plus de 50 éléments).

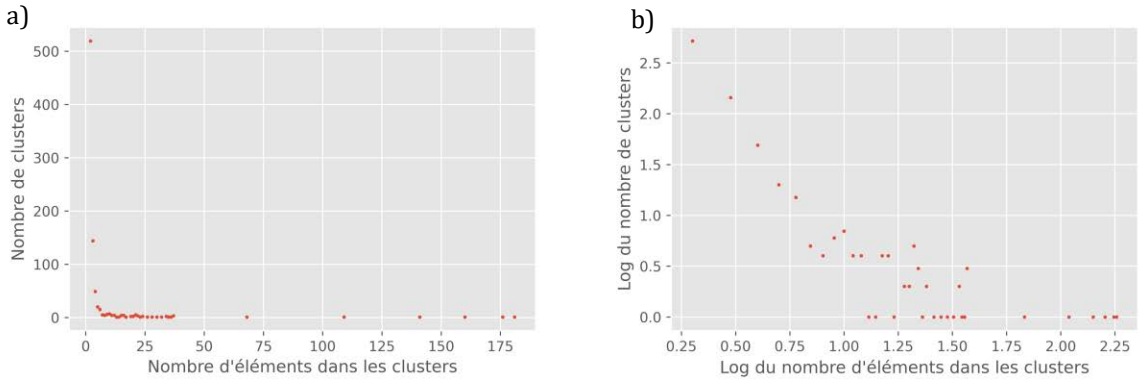


Figure 33 a) Évolution du nombre de clusters sélectionnés en fonction du nombre d'éléments les composant pour le bleu de méthylène b) représentation log-log

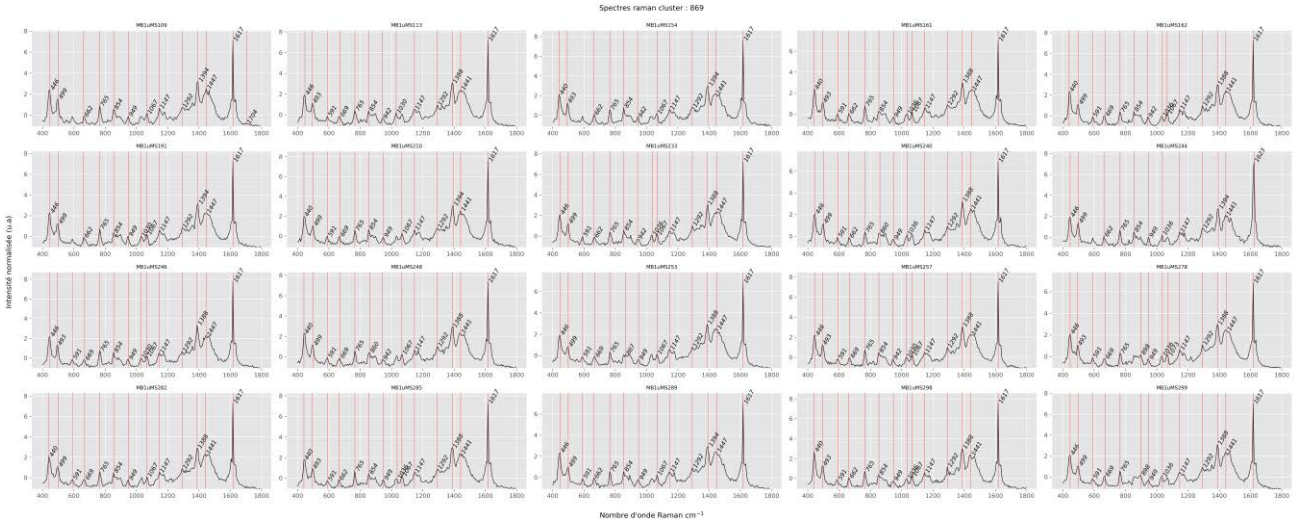


Figure 34 : Spectres originels issus du Cluster numéro 869. Seulement 20 spectres ont été affichés sur un total de 181.

La figure 34 représente vingt spectres originels issus du cluster numéro 869. Il est composé en totalité de spectres du bleu de méthylène à 1 µM. La concentration de bleu de méthylène correspondant à un spectre affiché est donnée dans le titre du spectre. Par exemple le titre : MB1µMS285 correspond au 285ième spectre acquis sur le piédestal analytique d'un dispositif sur lequel une goutte de bleu de méthylène à la concentration de 1 µM avait été évaporée.

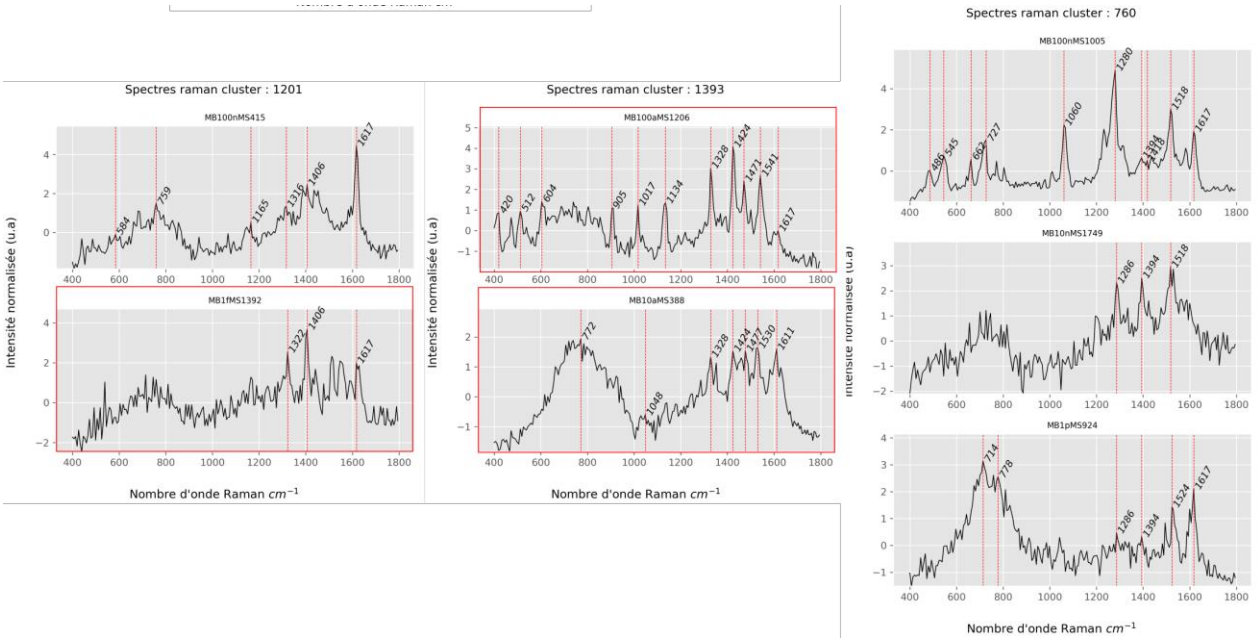


Figure 35 Spectres originels issus des clusters 1201, 1393, 760. Des spectres du bleu de méthylène sont observables notamment à des concentrations nominales faibles de 1fM, 100aM et 10aM. En rouge sont encadrés les spectres de bleu de méthylène ≤ 1fM

Les figures 35,36 et 37 représentent différents clusters dans lesquels des spectres du bleu de méthylène sont observables. Des spectres aux concentrations de 1 fM, 100 aM, 10 aM et 1 aM se trouvent dans les clusters 1202, 1293 et 194. Ces spectres ont plusieurs pics caractéristiques de cette molécule, notamment le pic à 1617 cm^{-1} qui correspond à l'élongation de la liaison C-C du cycle aromatique. Le pic autour de 1450 cm^{-1} peut être assigné à une élongation asymétrique de la liasion C-N. En 1520 cm^{-1}, c'est une élongation asymétrique d'une laison C-C qui peut être observée tandis que la liaison à 1128 cm^{-1} présente notamment sur les spectres à 10 aM et 100 aM peut correspondre à un pliage dans le plan d'une liaison C-H.

Les liaisons autour de 1320 cm^{-1} – 1350 cm^{-1} n'ont pas pu être assignées sur la base de la figure 32. Sur la base des travaux de Sannak Dutta Roy et al.[26], ces liaisons peuvent être assignées à l'élongation de la liaison C-C et au pliage dans le plan d'une liaison C-H.

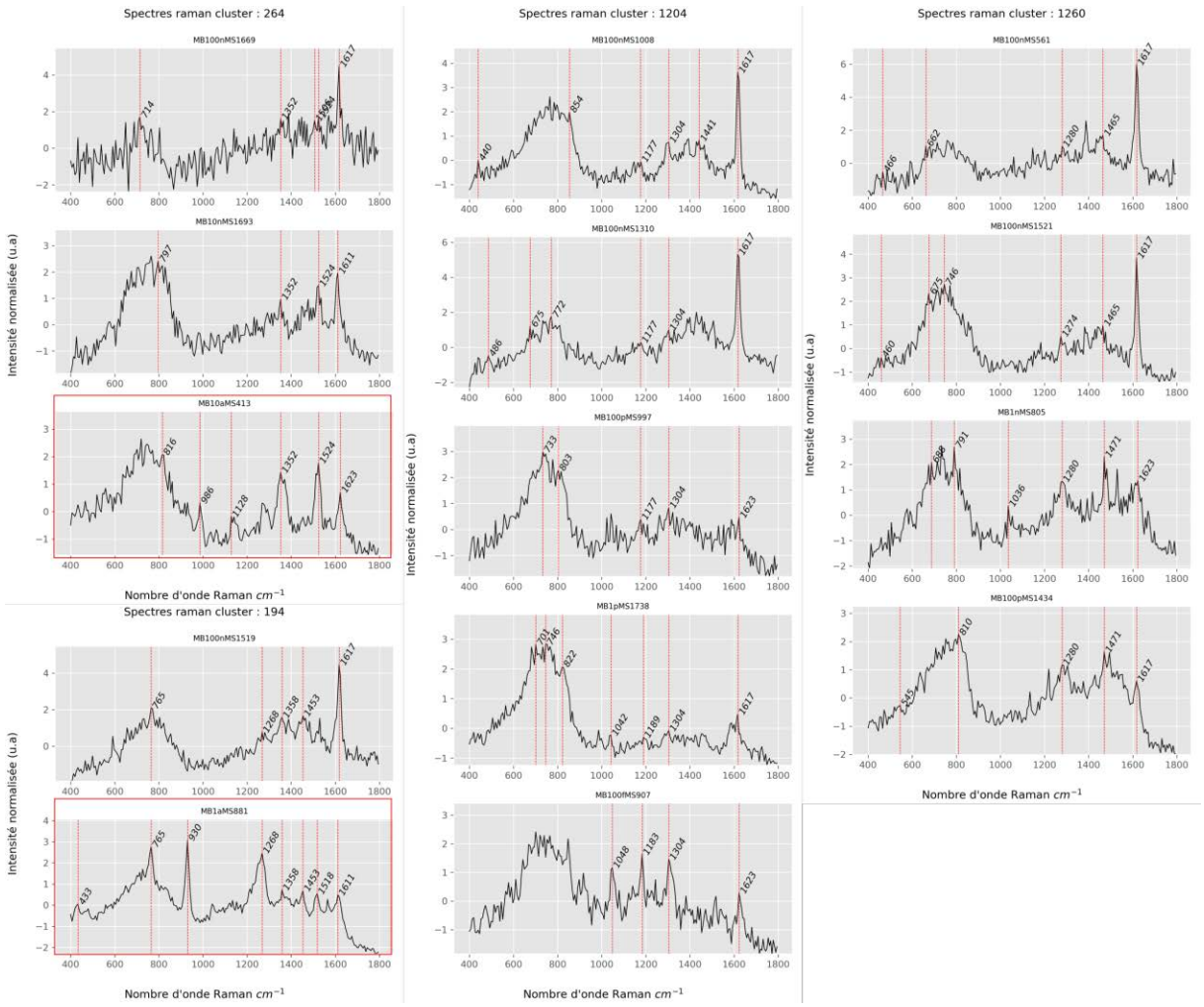


Figure 36 Spectres originels issus des clusters 264, 194, 1204 et 1260. En rouge sont encadrés les spectres de bleu de méthylène ≤ 1fM

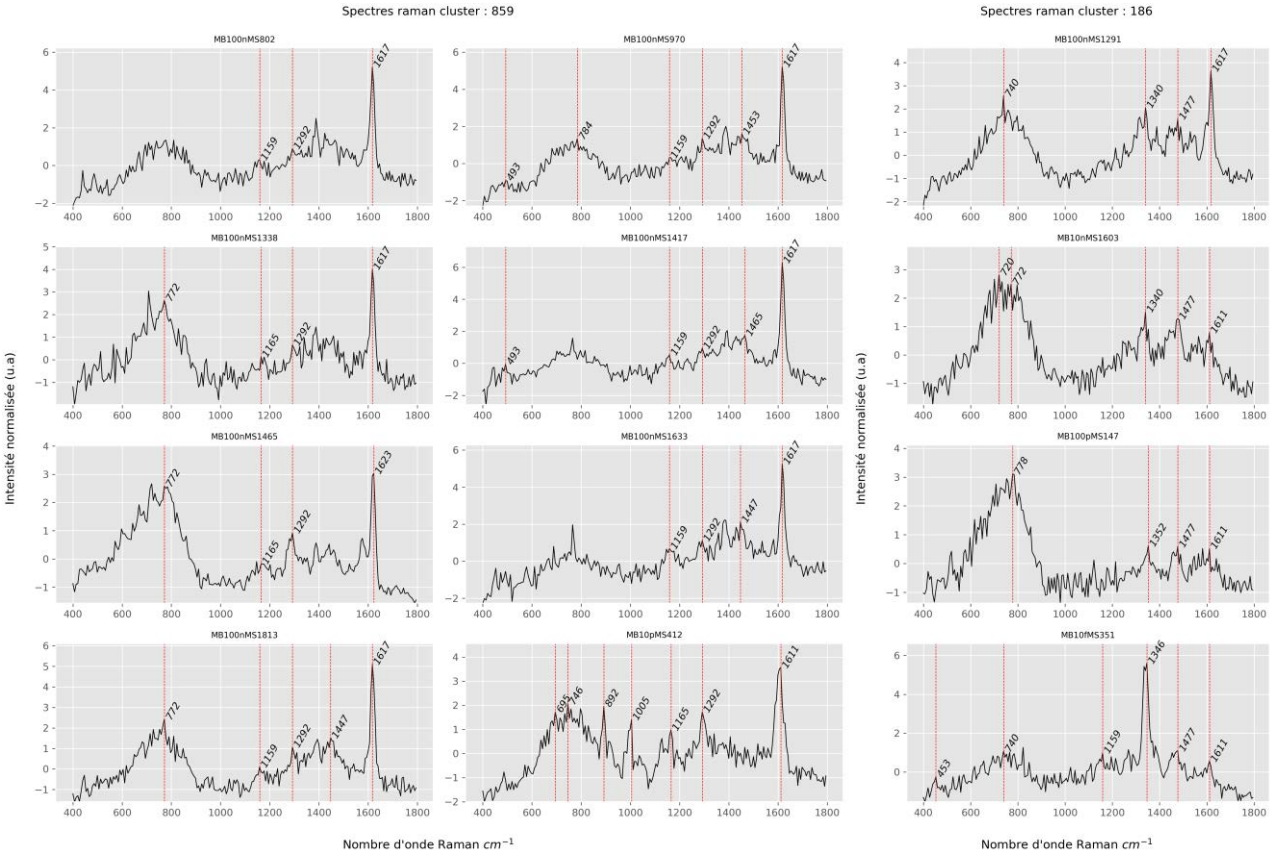


Figure 37 Spectres originels issus des clusters 859 et 186.

Les expériences menées avec le dispositif SH-SERS avec de la Rhodamine B et du bleu de méthylène couplées au clustering de corrélation hiérarchique permettent donc de détecter ces molécules à des concentrations proches de l'attomolaire.

Seule la détection a été envisagée jusqu'alors et nous n'avons pas abordé une difficulté du SERS, à savoir la quantification.

6 Aspect quantitatif de la méthode

La complexité de la spectroscopie Raman exaltée de surface est qu'il est difficile d'en faire une méthode analytique.

Généralement, pour réaliser une étude quantitative, il convient de réaliser une courbe de calibration qui permet de relier la concentration à la variation d'une métrique. Dans le cas du Raman, la métrique est l'intensité ou l'aire d'un pic d'intérêt en particulier. La ligne de base du signal est donc de première importance. En effet, elle peut modifier significativement la valeur de l'intensité d'un pic.

En l'espèce, nous essayons d'esquisser une nouvelle méthode d'analyse quantitative en SERS, mais au lieu de se baser sur l'intensité d'un pic, nous allons regarder la quantité de spectres représentatifs de la molécule présents dans les clusters en fonction de la concentration.

La figure 38 représente l'évolution du nombre total de spectres représentatifs de la rhodamine B (au moins 3 pics de la molécule) contenus dans les clusters sélectionnés en fonction du logarithme de la concentration.

Pour les concentrations allant de 100 nM à 10 nM, on constate qu'il n'y a pas d'évolution très significative de ce nombre de spectres. Entre 10 nM et 100 pM, une décroissance rapide du nombre de spectres dans les clusters est visible. A partir de 100 pM, nous observons un plateau du nombre de spectres représentatifs avec une légère remontée à 100 aM.

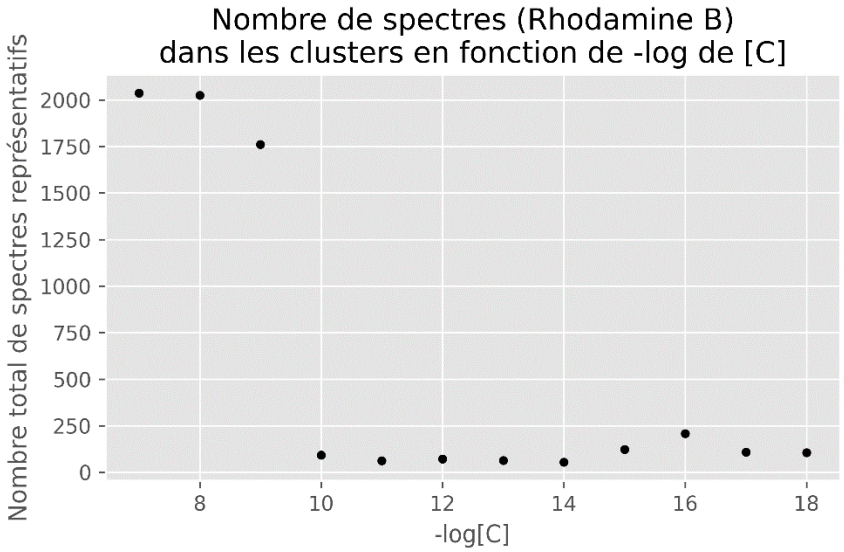


Figure 38 Évolution du nombre total de spectres représentatifs de la Rhodamine B dans les clusters sélectionnés en fonction de -log de la concentration nominale

La figure 39 est analogue à la figure 38 et représente l'évolution du nombre total de spectres représentatifs dans les clusters de bleu de méthylène en fonction du logarithme de la concentration. De 1 µM à 1 nM, on observe une décroissance du nombre de spectres dans les clusters. Entre 100 pM et 10 aM, le nombre oscille entre 39 et 167. Enfin, on constate une augmentation du nombre dans les clusters pour la concentration 1 aM.

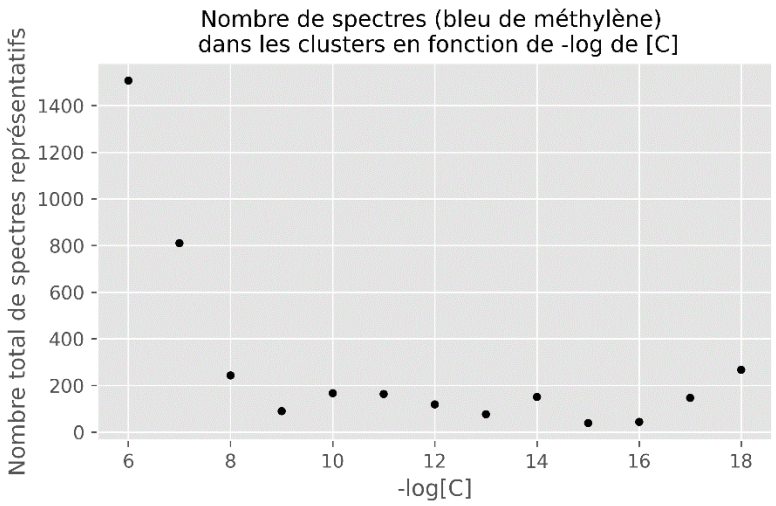


Figure 39 Évolution du nombre total de spectres représentatifs du bleu de Méthylène dans les clusters sélectionnés en fonction de -log de la concentration nominale.

Dans le cas de ces colorants, deux zones distinctes peuvent être observées. La première correspond à une zone de décroissance du nombre total de spectres représentatifs. A partir d'une concentration critique, un plateau apparait. La première zone est la zone de quantification. Dans cette zone, il est théoriquement possible d'établir une relation entre la concentration et le nombre de spectres dans les clusters. Dans la seconde zone, il n'est plus réellement possible de quantifier ; seule la détection par analyse des spectres est possible.

Notre hypothèse est que cette deuxième zone signe le régime de la molécule unique. Le dépôt final sur le piédestal conduit à ces concentrations très faibles, à une répartition aléatoire de molécules individuelles sur le piédestal. Dès qu'il y a coïncidence entre un événement d'adsorption moléculaire et un point d'exaltation (un point chaud) un spectre représentatif peut être enregistré. Le nombre de spectres représentatifs enregistrés est donc fortement dépendant de cette probabilité de coïncidence. La dispersion des facteurs d'exaltation locaux, l'hétérogénéité morphologique des points chauds et la diversité des conformations moléculaires résultant de l'adsorption ont finalement autant d'importance que la concentration de la solution. Notons également que dans ces figures nous avons reporté la concentration nominale issue du protocole de dilutions successives. Cette courbe est donc entachée d'incertitudes sur les concentrations réelles des gouttes évaporées sur les dispositifs.

7 Cas d'une détection « Bi-Analyte »

La méthode de clustering de corrélation hiérarchique permet de détecter de la rhodamine B ainsi que du bleu de méthylène à des concentrations proches de l'attomolaire. Il convient de se pencher maintenant sur des solutions non plus « pures » mais sur des mélanges de molécules. La rhodamine B a été mélangée à du bleu de méthylène (ratio 1 :1) ; la solution obtenue est concentrée à 100 aM de chacun des composés. Une goutte de 6 µL de la solution est évaporée sur le dispositif SH-SERS puis cartographiée dans les mêmes conditions que le bleu de méthylène.

Le clustering de corrélation hiérarchique avec la méthode des spectres simplifiés est utilisée pour détecter des spectres de Rhodamine B ainsi que des spectres du bleu de méthylène. La méthode n'est pas modifiée mais la construction du DataFrame diffère quelque peu. En effet, pour lever l'indétermination sur la molécule, des spectres issus des expériences à 100 aM de la rhodamine B et du bleu de méthylène sont ajoutés au contrôle ainsi qu'au mélange.

Plusieurs types de clusters sont possibles. Par type de clusters, il faut comprendre que l'on parle ici des labels des spectres qui les composent. Le label est l'identifiant d'un spectre qui est défini par son origine (RhB, MB ou MB-RhB) selon qu'il provient, respectivement, de la solution de rhodamine B, de bleu de méthylène, ou du mélange. On ajoute à l'origine du spectre un indicateur numérique (SXXX) qui correspond à la position du spectre dans la cartographie. De fait, on pourra trouver des clusters dans lesquels tous les spectres sont labélisés RhB ou MB. Les clusters qui nous intéressent sont ceux qui contiennent à la fois des spectres avec au moins un label rhodamine B ou bleu de méthylène et des spectres avec au moins un label rhodamine B / bleu de méthylène. Dans ces clusters particuliers on pourra assigner les spectres labelisés rhodamine B / bleu de méthylène soit à la rhodamine B soit au bleu de méthylène.

En figure 40a) sont montrés les spectres issus d'un cluster contenant un spectre issu d'une solution de bleu de méthylène ainsi qu'un spectre venant du mélange. Ces spectres ont au moins quatre pics en commun. Il semble donc que nous ayons identifié du bleu de méthylène au sein du mélange et ce à très faible concentration (100 aM). En 40b) le cluster représenté est composé d'un spectre issu de la solution de rhodamine B et un spectre venant du mélange. Ces spectres ont trois pics en commun. On peut donc détecter les deux composés même mélangés à des concentrations de100 aM chacun.

L'utilisation du clustering hiérarchique de corrélation entre un mélange et plusieurs composés purs pour faire l'identification des molécules composant le mélange constitue une nouvelle méthode.

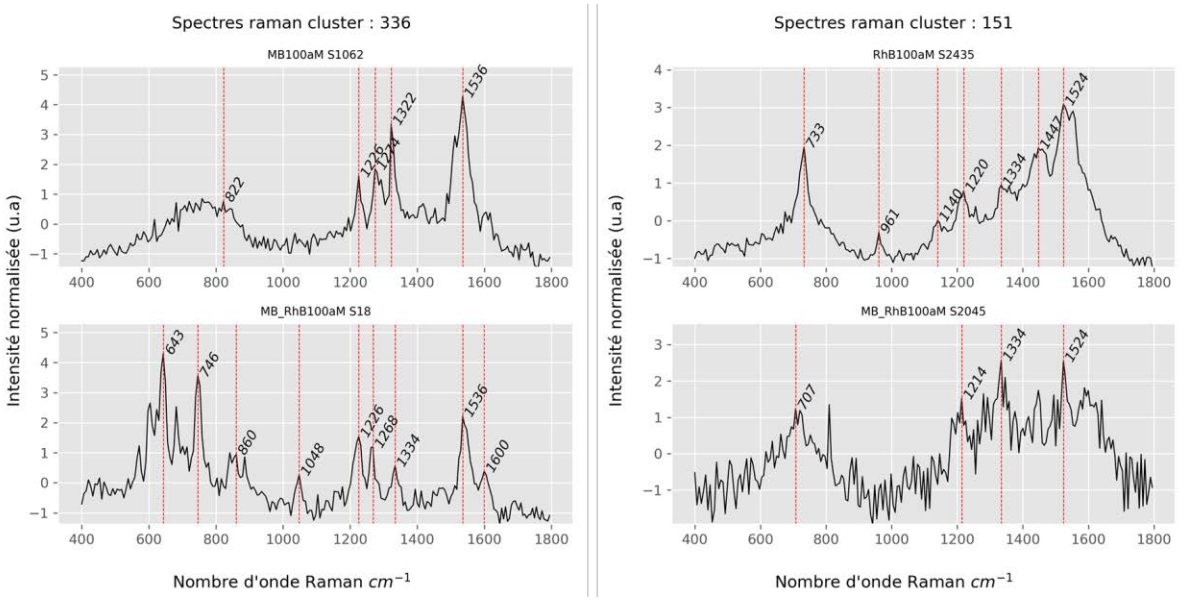


Figure 40 a) Cluster n°336 contenants un spectre de bleu de méthylène et un spectre venant du mélange. b) Cluster n°151, le cluster contient un spectre de la Rhodamine B et un spectre du mélange.

Discussion générale

P.G. Etchegoin et E.C. Le Ru[27], dans un article de perspective, distinguent deux aspects de l'approche « molécule unique » en SERS. La première est la détection de molécules uniques, tandis que la seconde correspond à l'analyse des molécules uniques. Ils identifient trois scénarii en fonction de ces deux approches. Le premier correspond à la démonstration de la possibilité de détecter des molécules uniques ; il est un prérequis pour investiguer les suivants. Le deuxième correspond à l'identification d'un nombre important d'événements permettant d'étudier la nature des hotspot, la distribution du facteur d'exaltation ainsi que les propriétés de la molécule. Le dernier correspond à la détection de toutes les molécules d'un type spécifique et ce, dans un but analytique. Ainsi, il faudrait pouvoir positionner précisément les molécules sur des points chauds. Ce problème n'a pour l'heure pas trouvé de solution satisfaisante.

Trois expériences existent pour répondre aux deux premières problèmatiques. La première est l'analyse de solutions très faiblement concentrées. La simplicité de la méthode est selon ces auteurs sa plus grande faiblesse. En effet, ils estiment qu'une faible proportion de la surface contribue à l'exaltation du signal et que par conséquent, « la convolution des "sites rares" avec des concentrations ultra-faibles produit une fiabilité statistique très faible ».

La deuxième expérience est l'analyse de films Langmuir-Blodgett en SERS. Dans les films Langmuir-Blodgett, la concentration des analytes est parfaitement contrôlée. Cette méthode permet de déposer des couches uniques de molécules. L'analyse de ce type de films permet de répondre à la question de la détection de la molécule unique.

Finalement, la dernière expérience proposée est le bi-analyte SERS. Cette méthode est une approche statistique qui permet, en analysant l'intensité relative de deux molécules, d'en déduire si la nature du signal est de type molécule unique indépendamment de la distribution du facteur d'exaltation. Le principe de cette méthode consiste à mélanger deux analytes dans des faibles concentrations. En des concentrations très faibles, des événements venant d'une seule des deux molécules doivent être observés. A cette concentration, la statistique est pauvre. Il faut donc augmenter la concentration des deux analytes pour rentrer dans le régime mixte qui correspond à la concentration optimale pour laquelle il est possible d'observer soit un spectre d'une molécule, soit un spectre de l'autre molécule, soit un spectre mixte. Le nombre d'évènements à cette concentration augmente. Cette méthode permet donc de répondre à l'approche de détection de la molécule unique ainsi qu'à l'approche analytique.

Si nous devions situer notre travail par rapport à cette perspective, il est clair que l'on se placerait dans le champ de la détection de molécules à de faibles concentrations. En effet, la méthode d'analyse des données peut être considérée comme une méthode de tri permettant de mettre en lumière l'information pertinente pour l'utilisateur. Il faut distinguer la méthode de détection qui tend à détecter tous les évènements, de la méthode algorithmique permettant de trier ces événements. A des concentrations très faibles en dessous de 10 pM, on peut considérer que l'on se trouve dans le régime de la molécule unique. Nous entendons par molécule unique en SERS le fait qu'une seule molécule (ou une partie de cette molécule) est adsorbée au sein du volume exalté au voisinage d'un point chaud (volume d'environ 1 aL). En effet, à la concentration de 1 pM, il n'y a plus que trois millions de molécules d'intérêt dans la goutte d'eau, si bien qu'à la fin de l'évaporation, si toutes les molécules se retrouvent déposées de façon homogène sur le piédestal, il ne devrait y avoir que 300 molécules par μm^2. Le point chaud étant extrêmement localisé sur la surface, on peut considérer qu'avec cette densité surfacique de molécules, seules quelques-unes d'entre elles vont interagir avec

celui-ci. Le système ainsi étudié correspond à l'interaction du laser avec la surface et ces quelques molécules. La conformation des molécules avec la surface peut être ainsi sondée, ce qui s'exprime par le caractère changeant des spectres.

L'aspect quantitatif introduit dans ce chapitre est un aspect innovant de l'analyse SERS. En effet, titrer une solution sur le nombre de spectres détectés et non sur une donnée spectrale est une nouveauté par rapport à la littérature. Deux aspects peuvent limiter cette approche. Le premier est l'aspect concentrateur du dispositif qui va imposer une limite basse aux concentrations possiblement mesurables. En effet, pour des concentrations élevées, le piédestal de la structure est saturé en molécules. Dès lors, la totalité des spectres enregistrés correspond à la molécule étudiée. Le second réside dans la molécule en elle-même, et plus particulièrement dans la section efficace Raman de celle-ci. Une molécule avec une section efficace Raman importante, comme la molécule de Rhodamine B, est facilement détectable, ce qui abaisse encore le seuil de détection en concentration.

La figure 41 propose une hypothèse de ce que pourrait être une courbe de quantification en SERS basée sur l'analyse du nombre de spectres représentatifs dans les clusters sélectionnés. On y distingue trois régimes : le régime de saturation compris en 100 mM et 10 µM, le régime de quantification entre 1 µM et 1 pM et enfin, le régime de détection soit le régime de la molécule unique.

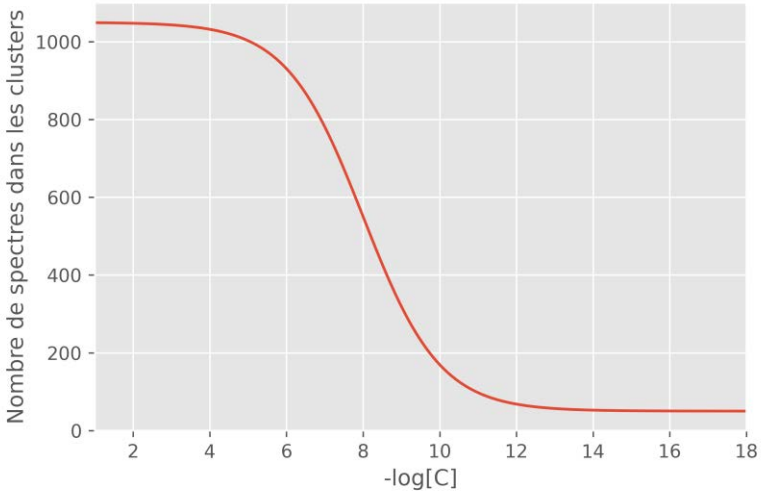


Figure 41 Spéculation sur ce que pourrait être le cas général de l'évolution du nombre de spectres représentatifs dans les clusters en fonction du logarithme de la concentration.

Bien que le SERS ne soit pas la méthode optimale pour réaliser de la quantification, avec le dispositif présenté, si l'on souhaite quantifier des solutions qui sont dans le régime de saturation, il suffit de les diluer d'un facteur connu pour arriver dans le régime de quantification.

Finalement, la méthode algorithmique a été utilisée dans le cas de solutions comprenant deux molécules, et ce pour essayer de les détecter au sein d'un mélange. Il a été montré que cette méthode permet de séparer les spectres dans des clusters.

Les molécules testées ne sont pas optimales en ce qu'elles présentent des fonctions chimiques similaires (cycle aromatique par exemple). Par conséquent, leurs pics Raman sont semblables. Une étude approfondie de cette méthode exigerait l'utilisation de molécules dont les spectres Raman sont très dissemblables, ce qui lèverait beaucoup d'incertitudes.

Ce chapitre charnière permet de mettre en évidence les forces et les faiblesses de la technologie étudiée. Le SERS permet la détection de molécules jusqu'à des concentrations proches de l'attomolaire. Cependant, ce n'est pas la molécule qui est sondée mais un système complexe résultant de l'association de la molécule et du système de nano-antennes que constitue la surface. La conformation de cette association, par exemple la manière avec laquelle la molécule s'est déposée sur les nano-antennes, est à priori extrêmement variable. Cela influe sur le signal SERS, qui par sa nature est sensible aux moindres variations d'une des composantes constituant le système, ce qui se traduit par des variations importantes sur les spectres. Ces variations peuvent être un frein à l'utilisation de cette méthode spectroscopique.

La détection de traces de vie dans des solutions complexes passe donc forcément par la création d'un catalogue de molécules d'intérêt. C'est en utilisant ce catalogue en appui de la méthode algorithme qu'il pourra être possible détecter les-dites traces.

Le prochain chapitre sera consacré à cette étude.

Bibliographie

1. Merlen, A. *et al.* Spectral fluctuation in SERS spectra of benzodiazepin molecules: The case of oxazepam. *J Raman Spectrosc* **51**, 2192–2198 (2020).
2. Daniel, N. W., Lewis, I. R. & Griffiths, P. R. Supervised and Unsupervised Methods of Classification of Raman Spectra of Explosives and Non-Explosives. in *Progress in Fourier Transform Spectroscopy* (eds. Mink, J., Keresztury, G. & Kellner, R.) 281–282 (Springer, 1997). doi:10.1007/978-3-7091-6840-0_58.
3. Jan, T.-K. *et al.* Cost-Sensitive Classification on Pathogen Species of Bacterial Meningitis by Surface Enhanced Raman Scattering. in *2011 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine* 390–393 (2011). doi:10.1109/BIBM.2011.133.
4. Huang, C.-Y. *et al.* Hybrid SVM/CART classification of pathogenic species of bacterial meningitis with surface-enhanced Raman scattering. in *2010 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)* 406–409 (2010). doi:10.1109/BIBM.2010.5706600.
5. Lim, J. *et al.* Identification of Newly Emerging Influenza Viruses by Detecting the Virally Infected Cells Based on Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Anal. Chem.* **91**, 5677–5684 (2019).
6. Botta, R. *et al.* Tuberculosis determination using SERS and chemometric methods. *Tuberculosis* **108**, 195–200 (2018).
7. Kim, W. *et al.* Paper-Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Diagnosing Prenatal Diseases in Women. *ACS Nano* **12**, 7100–7108 (2018).
8. Thrift, W. J. *et al.* Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Odor Compass: Locating Multiple Chemical Sources and Pathogens. *ACS Sens.* **4**, 2311–2319 (2019).
9. Banaei, N. *et al.* Machine learning algorithms enhance the specificity of cancer biomarker detection using SERS-based immunoassays in microfluidic chips. *RSC Adv.* **9**, 1859–1868 (2019).

10. Lebrun, A. *et al.* Pushing the Limits of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) with Deep Learning: Identification of Multiple Species with Closely Related Molecular Structures. *Appl Spectrosc* **76**, 609–619 (2022).
11. Chen, Z. *et al.* Coupling enhanced SERS substrates and 1D dilated convolutional neural network: A new model to improve trace detection and identification. *Optics Communications* **525**, 128830 (2022).
12. Hierarchical Clustering. in *Cluster Analysis* 71–110 (John Wiley & Sons, Ltd, 2011). doi:10.1002/9780470977811.ch4.
13. Introduction. in *Finding Groups in Data* 1–67 (John Wiley & Sons, Ltd, 1990). doi:10.1002/9780470316801.ch1.
14. Aho, K. Multivariate clustering for objective classification of vegetation data. *Montavesta Rd* **3134**, (2022).
15. N. Cage. Removing Spikes from Raman Spectra with Anomaly Detection. *Medium* https://towardsdatascience.com/removing-spikes-from-raman-spectra-8a9fdda0ac22 (2020).
16. Whitaker, D. A. & Hayes, K. A simple algorithm for despiking Raman spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **179**, 82–84 (2018).
17. SciPy documentation — SciPy v1.9.3 Manual. https://docs.scipy.org/doc/scipy/index.html.
18. scipy.signal.find_peaks — SciPy v1.9.3 Manual. https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.signal.find_peaks.html.
19. Debnath, L. The Wavelet Transform and Its Basic Properties. in *Wavelet Transforms and Their Applications* 361–402 (Birkhäuser Boston, 2002). doi:10.1007/978-1-4612-0097-0_6.
20. Giguere, S., Carey, C., Boucher, T., Mahadevan, S. & Dyar, M. D. An Optimization Perspective on Baseline Removal for Spectroscopy. 8.
21. *pybaselines: A library of algorithms for the baseline correction of experimental data.*

22. Samuel, A. Z. *et al.* On Selecting a Suitable Spectral Matching Method for Automated Analytical Applications of Raman Spectroscopy. *ACS Omega* **6**, 2060–2065 (2021).
23. Du, P., Kibbe, W. A. & Lin, S. M. Improved peak detection in mass spectrum by incorporating continuous wavelet transform-based pattern matching. *Bioinformatics* **22**, 2059–2065 (2006).
24. Esmaeilzadeh, M., Dizajghorbani-Aghdam, H. & Malekfar, R. Surface-Enhanced Raman scattering of methylene blue on titanium nitride nanoparticles synthesized by laser ablation in organic solvents. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **257**, 119721 (2021).
25. Xiao, G.-N. & Man, S.-Q. Surface-enhanced Raman scattering of methylene blue adsorbed on cap-shaped silver nanoparticles. *Chemical Physics Letters* **447**, 305–309 (2007).
26. Dutta Roy, S., Ghosh, M. & Chowdhury, J. Adsorptive parameters and influence of hot geometries on the SER(R) S spectra of methylene blue molecules adsorbed on gold nanocolloidal particles. *Journal of Raman Spectroscopy* **46**, 451–461 (2015).
27. Etchegoin, P. G. & Le Ru, E. C. A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6079 (2008).

Chapitre 5 : Vers un « catalogue » de spectres SERS d'intérêt

Table des matières

Chapitre 5 : Vers un « catalogue » de spectres SERS d'intérêt 181

Introduction 181

1 Protocole mis en œuvre pour la création d'un catalogue 181

2 Spectres SERS de référence de l'acide désoxyribonucléique (ADN) du phage Lambda. 182

2.1 Solutions d'ADN à des concentrations de 100 fM jusqu'à1 fM 183

2.2 Solutions d'ADN à des concentrations de 100 fM jusqu'à 1 aM 185

3 Spectres SERS de référence de l'adénosine 5' monophosphate (AMP) 189

4 Spectres SERS de référence de la glycine 192

4.1 Solution de glycine à des concentrations de 1 µM et 100 aM 193

4.2 Solution de glycine à des concentration de 1 µM et 10 fM 194

5 Spectres de référence SERS de la L-lysine 195

Conclusion 198

Bibliographie 200

Chapitre 5 : Vers un « catalogue » de spectres SERS d'intérêt

Introduction

Le dispositif a été caractérisé du point de vue fluidique et spectroscopique (chapitre III) et un protocole algorithmique basé sur le clustering de corrélation hiérarchique (chapitre IV) a permis de mettre au point une méthode automatique de traitement de manière à sélectionner avec confiance l'information d'intérêt. Il a été possible d'identifier avec certitude et de manière algorithmique (sans intervention subjective d'un opérateur) des spectres de la rhodamine B et du bleu de méthylène au sein de solutions ultra-diluées (aM). Une des difficultés du SERS, dont nous avons déjà longuement discuté, est l'extrême sensibilité de la réponse Raman en fonction du substrat d'exaltation utilisé. Un des paradoxes de la méthode réside dans le constat que plus les points chauds exaltent le signal et plus importante est la variabilité ou les fluctuations du signal (en position fréquentielle et en intensité). Aussi, bien qu'il existe des bases de données en Raman, elles ne sont que difficilement exploitables en SERS (Raman exalté). Chaque développement d'une nouvelle plateforme SERS implique la création d'un catalogue de spectres associé car les spectres obtenus pour chaque type de substrat SERS, bien que proches des spectres Raman de référence, présentent leurs propres spécificités (sections efficaces variables, pics absents, décalage des pics …).

Nous proposons ici, dans le cadre de cette thèse, de commencer ce catalogue par quelques molécules qui ont un intérêt dans le cadre de l'exobiologie. Ce travail ne vise pas l'exhaustivité mais vise surtout à établir un protocole sûr et versatile afin d'obtenir un spectre de référence d'une molécule d'intérêt qui pourra être dès lors identifiée en SERS sur nos dispositifs typiques. Si d'aventure un substrat SERS venait à être spatialisé, il faudrait réaliser un catalogue des plus exhaustifs pour pouvoir permettre l'identification d'un large panel de molécules dans des solutions inconnues.

L'adénosine monophosphate (AMP), l'acide désoxyribonucléique (ADN), la glycine et la lysine ont été étudiés comme les premières pages de ce futur catalogue.

1 Protocole mis en œuvre pour la création d'un catalogue

Des solutions à différentes concentrations des molécules dont nous voulons faire le spectre de référence SERS ont été réalisées par dilutions successives en utilisant de l'eau déionisée provenant de l'installation de la salle blanche du LAAS-CNRS. Les évaporations de ces solutions sur les dispositifs SH hiérarchiques équipés de nano-antennes d'argent (épaisseur nominale du film d'argent de 100 nm) ont toutes été effectuées dans l'environnement de la salle blanche afin de diminuer les

potentielles contaminations adverses. Les mesures SERS ont été réalisées avec le spectromètre Horiba Xplora. Les paramètres d'acquisition ont été fixés à 250 ms d'acquisition par spectre. La puissance du laser est fixée à 0.1 mW. La résolution spectrale est d'environ 10 cm^{-1}. La totalité du piédestal a été cartographiée puis la méthode algorithmique développée au chapitre IV a été utilisée pour sélectionner des spectres d'intérêt. La méthode de traitement des données est donc exactement celle décrite au chapitre IV. Tous les spectres présentés dans ce catalogue sont normalisés en soustrayant la moyenne de la série et en divisant par l'écart-type (Standard normal variate transformation).

En toute rigueur, il convient de noter que les paramètres d'acquisition ont varié au gré des aléas techniques et de l'évolution de mes résultats de thèse, notamment la longueur d'onde du laser excitateur. Nous avons cependant vu au chapitre III que la résonance plasmonique large bande produite par les nano-antennes permet d'utiliser aussi bien les lasers émettant à 532 nm et à 638 nm. La polyvalence du système doit donc être soulignée, même si en toute rigueur il conviendrait de réaliser un catalogue complet à plusieurs longueurs d'onde d'excitation.

2 Spectres SERS de référence de l'acide désoxyribonucléique (ADN) du phage Lambda.

L'ADN est un polymère constitué de deux chaînes de polynucléotides qui s'apparient l'une à l'autre de façon antiparallèle pour former une double hélice. Chaque chaîne est constituée de quatre nucléosides différents (2'-désoxyadénosine (A), 2'-désoxyguanosine (G), 2'-désoxycytidine (C) et thymidine (T)) liés entre eux par des liaisons phosphodiesters. La figure 1 schématise la structure de l'ADN double brin. Les phosphates et les oses servent d'ossature à cette molécule tandis que les bases s'assemblent de façon complémentaire (A-T, G-C) d'un brin à l'autre en formant des liaisons hydrogène.

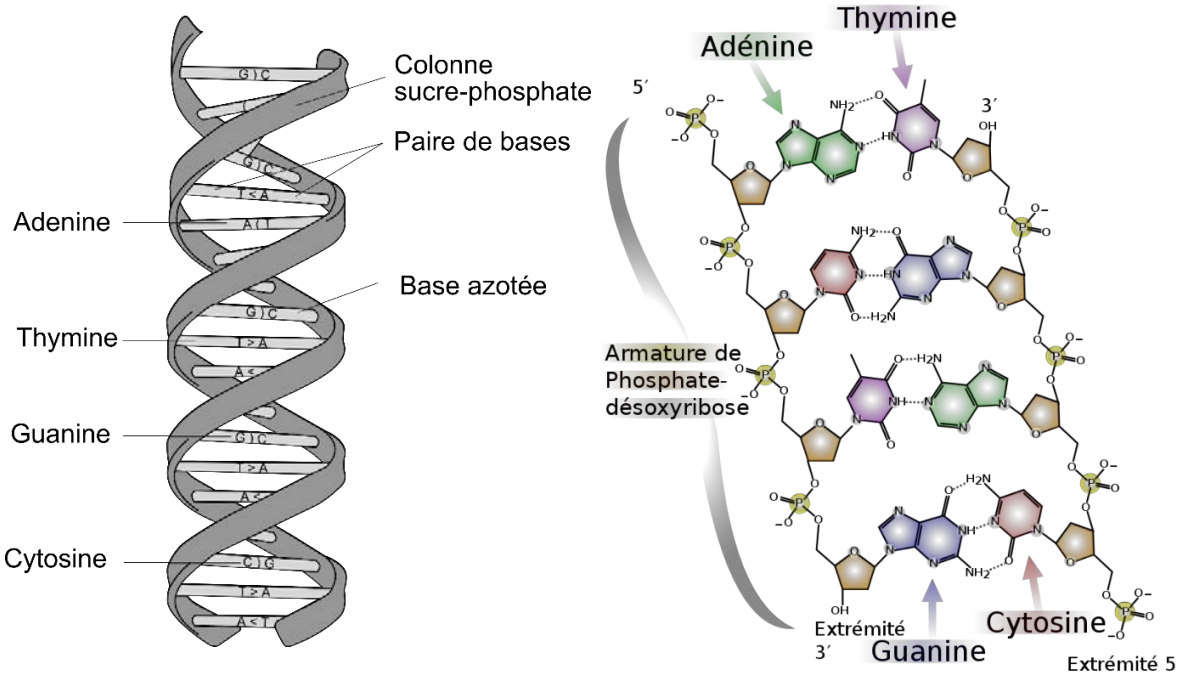


Figure 1 A gauche structure d'un ADN bicaténaire en formation hélicoïdale. A droite représentation chimique de cette même molécule. Le phosphate et le désoxyribose forment la structure de la molécule, les bases nucléiques s'assemblent deux à deux en formant des liaisons hydrogènes. Extrait de[1]

Cette molécule est a priori présente dans tous les êtres vivants sur Terre. Elle est donc une des molécules de première importance dans la quête de la recherche de traces de vie extraterrestre ou au sein d'environnements terrestres hostiles ou oligotrophiques. Pour étudier cette molécule en SERS, nous avons utilisé de l'ADN de phage lambda. Le phage lambda est un virus dit bactériophage. Son ADN double brin linéaire mesure 48502 paires de bases soit 16 µm environ.[2] Deux campagnes d'expérimentation ont été menées avec cette molécule. Dans la première, un laser à 532 nm a été utilisé pour étudier des solutions d'ADN de concentrations allant de 1 fM à 100 fM. La seconde campagne a permis d'étudier l'ADN à des concentrations allant de 100 fM à 1 aM en utilisant cette fois-ci un laser à 638 nm. Les solutions d'ADN ont été réalisées à partir d'une solution mère d'ADN de phage lambda concentrée à 1.41 x 10^{-10} M. Des dilutions en cascade avec de l'eau déionisée de salle blanche ont permis d'obtenir des solutions d'ADN allant de 100 fM à 1 aM. L'assignation des pics Raman (SERS) s'est faite sur la base de deux articles : « local raman spectroscopy of DNA »[3] et « fabrication of higly rough Ag nanobud substrates and surface-enhanced raman scattering of λ-DNA molecules »[4]. Les désignations A, T, C, G représentent des liaisons que l'on peut trouver dans les quatre bases nucléiques de l'ADN soit l'adénine, la thymine, la cytosine et la guanine.

2.1 Solutions d'ADN à des concentrations de 100 fM jusqu'à1 fM

La première campagne de mesure a été réalisée avec un laser à 532 nm. Trois concentrations ont été étudiées : 100 fM, 10 fM et 1 fM. La figure 2 représente trois spectres typiques issus du processus final de traitement de la pile de spectres, pour des évaporations de solution d'ADN à 100 fM, 10 fM et 1 fM. Ces spectres présentent des pics Raman bien définis qui ont été assignés à des pics de l'ADN dans la table 1.

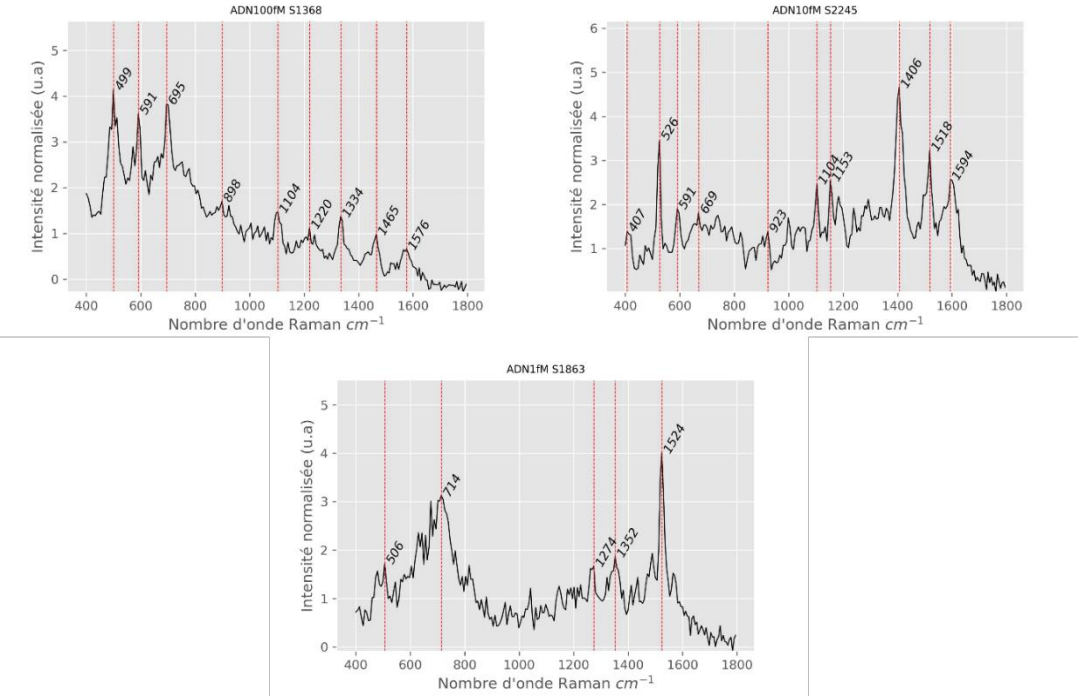


Figure 2 Spectres SERS représentatifs de l'ADN de phage lambda pour des concentrations de 100 fM à 1 fM. Temps d'acquisition 250 ms, laser 532nm, 1mW.

Sur ces spectres, on peut observer à la fois des pics de l'ossature de la molécule – soit le sucre – mais aussi des pics caractéristiques des bases nucléiques, notamment le pic à 1524 cm^{-1}, présent sur les spectres à 10 fM et 1 fM, qui peut être assigné soit à une base d'adénine, soit de cytosine. Le spectre à 100 fM a des pics très bien définis, notamment trois pics à 1324 cm^{-1}, 1465 cm^{-1} et 1576 cm^{-1} qui peuvent être assignés respectivement à de l'adénine, du désoxyribose et de l'adénine ou de la guanine. Sur cette base d'identification « classique », nous pouvons dire que les spectres présentés ont 7, 9 et 4 pics assignables à des pics caractéristiques de l'ADN en Raman.

ADN 100fM	ADN 10 fM	ADN 1fM	Assignation
	407		
499		506	d
	526		A
591	591		C;G
	669		T;G;A
695			G
		714	
898			d
	923		d
1104	1104		d
	1153		d

1220			
		1274	T,C,A
1334			A
		1352	A,G
	1406		T ; d(CH2)
1465			d(CH2)
	1518	1524	A,C
1576			A,G
	1594		A,G

Table 1. Positions des pics SERS et assignation sur la base de 3 et 4 pour des concentrations d'ADN de 100 fM à 1 fM. Les décalages spectraux sont exprimés en cm-1.

La figure 3 représente le nombre de spectres de l'ADN dans les clusters façonnés par l'algorithme de corrélation hiérarchique en fonction du logarithme de la concentration. Une décroissance linéaire avec la concentration est observable, indiquant que nous sommes dans le régime de quantification de la concentration (voir chapitre IV).

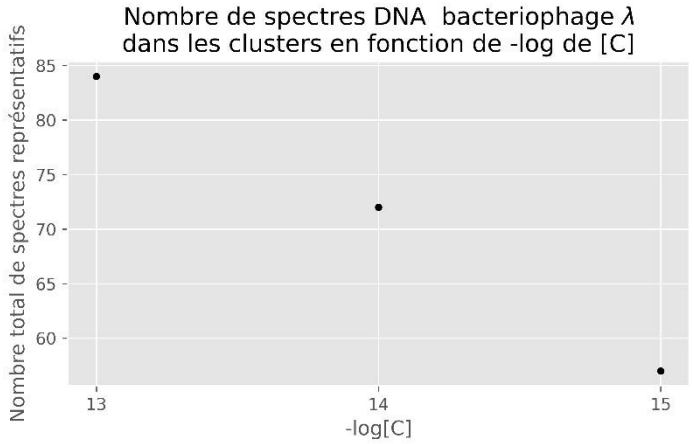


Figure 3 Évolution du nombre de spectres représentatifs de l'ADN dans les clusters (cf. chapitre IV) en fonction du logarithme de la concentration nominale de 100 fM à 1 fM.

2.2 Solutions d'ADN à des concentrations de 100 fM jusqu'à 1 aM

La deuxième campagne de mesure s'est effectuée cette fois-ci avec le laser à 638nm pour des concentrations allant de 100 fM à 1 aM. Des spectres caractéristiques extraits des spectres sélectionnés par la procédure de clusterisation sont représentés en figure 4 à titre d'exemple pour chacune de ces concentrations.

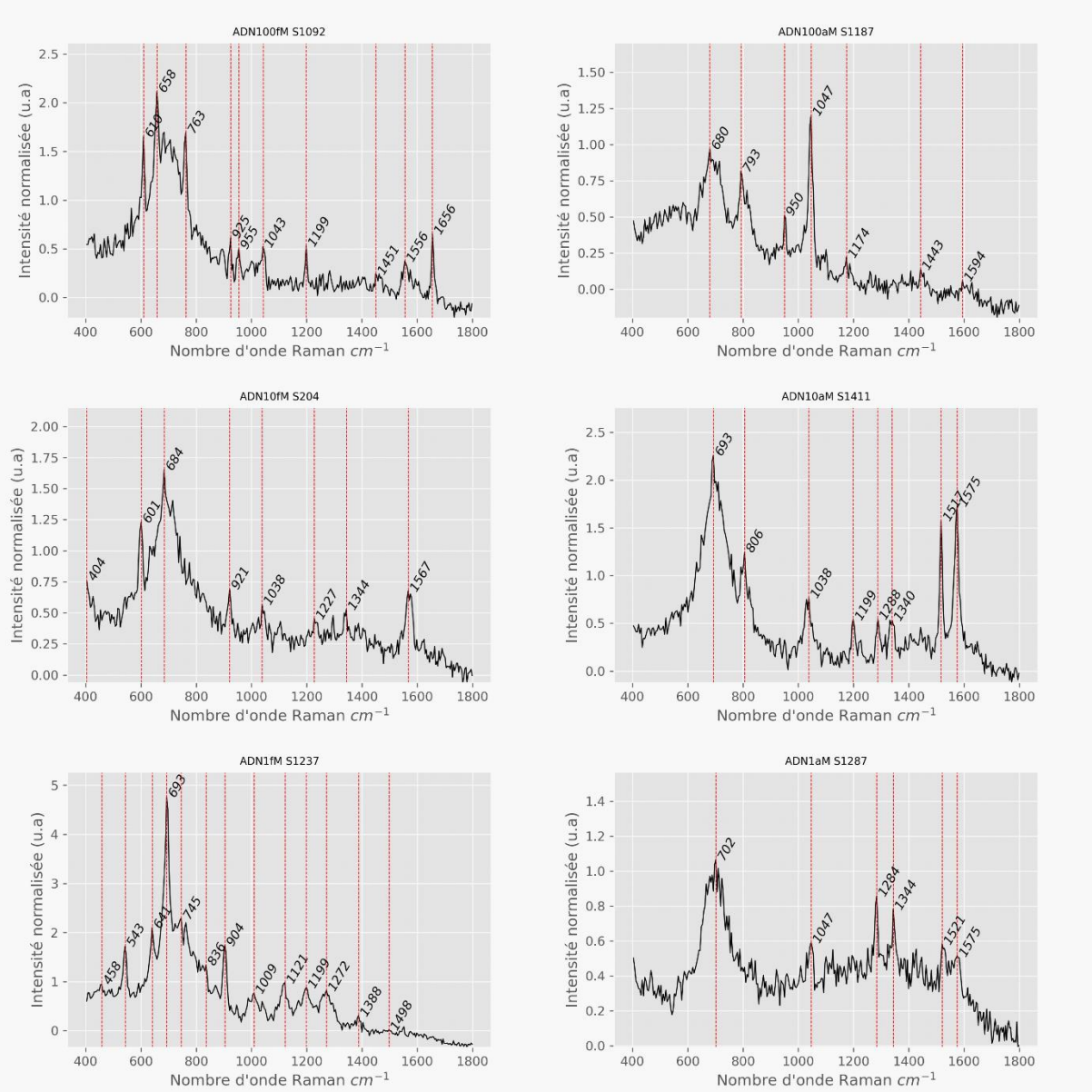


Figure 4 Spectres SERS représentatifs de l'ADN de phage lambda pour des concentrations de 100 fM à 1 aM. Temps d'acquisition 250 ms, laser à 638 nm, 1 mW.

Comme pour la première campagne de mesure, nous avons tenté d'assigner ces pics à des composants de l'ADN. La table 2 donne l'assignation des pics pour chaque spectre présenté en figure 4. Les spectres ont plusieurs pics assignables à l'ADN. Nous retrouvons des pics caractéristiques de l'ossature de la molécule mais aussi des pics caractéristiques des bases nucléiques. Dans la région 900 - 1000 cm^{-1}, nous trouvons des pics du ribose tandis que dans les régions 1300 -1400 et 1500 -1700 cm^{-1}, ce sont des pics caractéristiques de l'ADN qui sont observables. Les spectres 10 aM et 1 aM sont remarquables dans la mesure où ils ont quatre pics en stricte coïncidence.

ADN 100fM	ADN 10 fM	ADN 1fM	ADN 100aM	ADN 10 aM	ADN 1aM	Assignation
	404					
		458				
		543				
610	601					C,G
658		641				T,G,A
	684	693	680	693	702	G
763		745				T,d
			793	806		C
		836				PO^{2-}
		904				d
925	921					
955			950			d
		1009				d
1043	1038		1047	1038	1047	PO^{2-}
		1121				
			1174			d
1199		1199		1199		T,C
	1227					
		1272		1288	1284	C,A
	1344			1340	1344	A,G
		1388				T,A,G
1451			1443			d,CH_2
		1498				
				1517	1521	A
1556						
	1567			1575	1575	A,G
1656						T,G

Table 2 Positions des pics SERS en cm^{-1} et assignation sur la base de [3] et [4] pour des concentrations d'ADN de 100 fM à 1 aM. Les décalages spectraux sont exprimés en cm^{-1}.

Là encore, nous pouvons tracer l'évolution du nombre de spectres dans les clusters en fonction de la concentration – évolution présentée en figure 5. Une décroissance est observée entre 100 fM et 100 aM. On observe à 10 aM une anomalie qui peut s'apparenter à un point aberrant. L'ADN pourrait donc être quantifié jusqu'à 100 aM en suivant cette méthode.

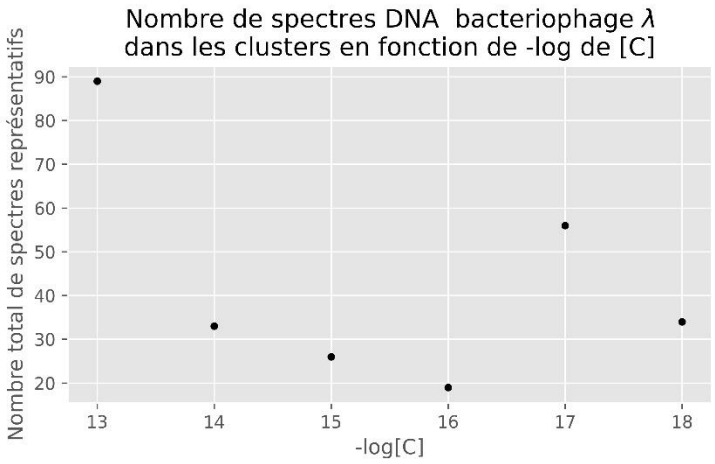


Figure 5 Evolution du nombre de spectres représentatifs de l'ADN dans les clusters (cf. chapitre IV) en fonction du logarithme de la concentration nominale de 100 fM à 1 aM.

Il semblerait que l'on observe une plus grande diversité de pics SERS aux plus faibles concentrations. En comparant la table 1 et la table 2, on constate que de nombreux pics sont communs. Cependant, à « forte » concentration (comprise entre 100 fM et 1 fM), seuls 3 pics ne sont pas facilement assignables (407 cm^{-1}, 714 cm^{-1} et 1220 cm^{-1}). En revanche, à « faible » concentration (en dessous de 1fM), 7 ne le sont pas (404 cm^{-1}, 458 cm^{-1}, 543 cm^{-1},921-925 cm^{-1}, 1121 cm^{-1}, 1498 cm^{-1}, 1656 cm^{-1}). Un seul pic « SERS » inconnu est commun à ces deux listes. Ces nouveaux pics observés en SERS sont-ils liés à une photo-dégradation partielle des molécules ? à des interactions avec les nanoparticules d'argent ou leur couche d'oxyde superficielle ? à d'autres phénomènes plus complexes ? Le but de cette étude n'est pas de tenter de répondre à ces questions mais de noter la présence possible de ces pics SERS au sein de solutions d'ADN du phage Lambda fortement diluées.

L'ADN, bien que longue (on parle ici d'une molécule de 45 kilos paires de bases) et répétitive dans sa composition est une molécule que l'on peut qualifier de complexe à analyser en SERS. De plus, celle-ci peut être facilement dégradée sous l'influence de rayons ionisants que l'on peut rencontrer sur des planètes à faible atmosphère. Dès lors, la découverte d'ADN en milieu spatial peut s'avérer difficile. La recherche de nucléotides peut être une alternative intéressante ; c'est pourquoi nous avons étudié dans un second temps l'adénosine monophosphate (AMP).

Dans le cas de l'ADN, nous avons utilisé une nomenclature d'assignation basée sur la structure de la molécule. Ce ne sont pas les liaisons chimiques qui ont été assignées mais plutôt les fonctions, et ce en comparant avec la littérature.

La nomenclature utilisée pour assigner les pics Raman des prochaines molécules sera de nature vibrationnelle – en indice il peut être indiqué si la liaison est symétrique (s) ou asymétrique (as) – suivie de la liaison impliquée. Les vibrations sont notées: ω hochement (wagging), δ deformation, γ flexion hors plan (out of plane bending), ν élongation (stretching), τ torsion (twisting), ρ rotation (rocking), β flexion dans le plan (in plane bending).

3 Spectres SERS de référence de l'adénosine 5' monophosphate (AMP)

L'adénosine monophosphate est une molécule composée de trois parties : l'adénine, l'ose et le phosphate. Une vue 3D en est fournie par la figure 6.

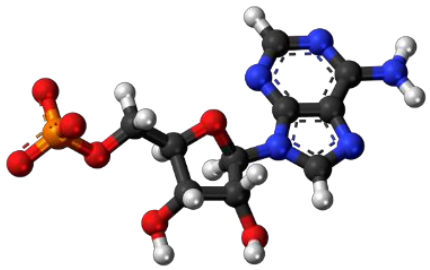


Figure 6 Représentation 3D de l'adénosine monophosphate. (noir : carbone, blanc : hydrogène, bleu : azote, rouge : oxygène, orange : phosphate)

Abréviation	Formule chimique	Nom chimique	Poids moléculaire (g/mol)
AMP	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	adénosine 5'-monophosphate	347,221

Figure 7 Information sur l'Adénosine MonoPhosphate

Des solutions de cette molécule dans l'eau à des concentrations comprises entre 1 µM et 1 aM ont été étudiées en utilisant le laser à 532nm du spectromètre Raman. La figure 8 représente un spectre caractéristique pour chaque concentration étudiée. La position des pics a été assignée en se basant sur les travaux de Sánchez-Cortés et al. [5], d'Hirakawa et al. [6] et de Miljanić, S et al[7]. La table 3 résume la position des pics ainsi que l'assignation possible de ceux-ci. La partie adénine de la molécule est composée d'un cycle pyrimide (cycle composé de quatre carbones et deux azotes) et d'un cycle imidazole (cycle composé de trois carbones et de deux azotes), ce qui en fait une purine. En outre, elle dispose aussi d'une fonction amine. On retrouve des vibrations de ces cycles (pyrimide et imidazole) entre 1400 – 1600 cm^{-1}. On retrouve notamment un pic Raman à 1576 cm^{-1} sur les spectres à 1 fM et à 1 aM qui peut être assigné à une élongation dans le cycle pyrimide. La majorité des vibrations du désoxyribose se trouvent entre 1000 et 1200 cm^{-1}. Le groupe phosphate a quant à lui, une vibration autour de 1000 cm^{-1}.

Les spectres présentés ont au moins cinq vibrations assignables à de l'adénine monophosphate. La majorité de ses pics sont dûs à l'adénine, ce qui pourrait s'expliquer par une adsorption sur la surface préférentiellement via cette partie de la molécule.

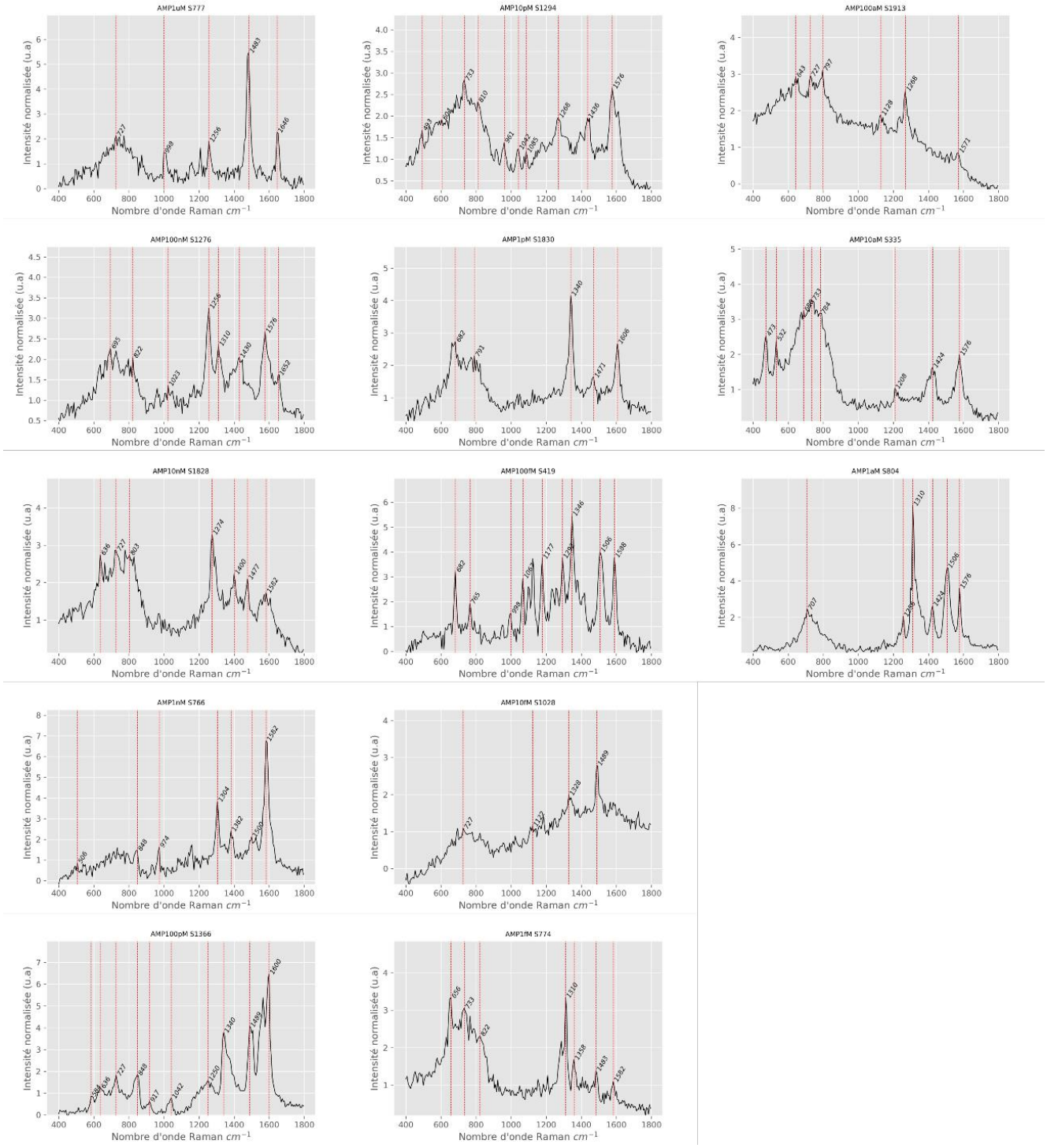


Figure 8 Spectres SERS représentatifs de l'AMP pour des concentrations nominales de 1 µM à 1 aM. Temps d'acquisition 250 ms, laser 532 nm, 1 mW.

AMP1 uM S777	AMP100 nM S1276	AMP10 nM S1828	AMP 1nM S766	AMP 100pM S1366	AMP 10pM S1294	AMP 1pM S1830	AMP 100fM S419	AMP 10fM S1028	AMP 1fM S774	AMP 100aM S1913	AMP 10aM S335	AMP 1aM S804	Assignation
											473		
			506		493								
											532		
				584									
					604								
		636		636					656	643			
	695					682					688	707	β(C-O-H) (rib)
727		727		727	733			727	733	727	733		ν ring
							765						
						791				797	784		ν(pyr)
	822	803			810				822				
			848	848									ω(NH2)
				917									ν(C-O), ν (C-C)(Rib)
998			974		961		998						ν(PO_3)
	1 023			1 042	1 042								ν(C-O), ν(C-C) (Rib
					1 085		1 067						ν(C-O), ν(C-C) (Rib)
								1 122		1 128			ν (C-O)(Rib)
							1 177						ν(C-O), ν(C-C)(Rib)
											1 208		
1 256	1 256	1 274		1 250	1 268					1 268		1 256	ν (C-NH_2)
	1 310		1 304				1 292		1 310			1 310	ν (pyr)
				1 340		1 340	1 346	1 328	1 358				ν(pyr) β(C-H)
		1 400	1 382										β(O-H)(Rib)
	1 430				1 436						1 424	1 424	ν(Im)
1 483		1 477		1 489		1 471		1 489	1 483				ν(pyr)
			1 500				1 506					1 506	ν (pyr)
	1 576	1 582	1 582		1 576		1 588		1 582	1 571	1 576	1 576	ν(pyr)
				1 600		1 606							δ(NH2)
1 646	1 652												ν(C-C), ν(C-N)

Table 3 Positions des pics SERS en cm^{-1} et assignation sur la base de [7] pour des concentrations d'AMP de 1µM à 1aM. (pys : pyrimique, Im : imidazole, Rib : cycle du ribose, ring : cycle de l'adénine).

Nous constatons ici que dans la gamme 1000 cm^{-1} – 1700 cm^{-1}, aucun pic observé en SERS ne peut recevoir d'assignation spécifique. Malgré une potentielle faible section efficace Raman, cette molécule est identifiable à des concentrations allant jusqu'à l'attomolaire.

4 Spectres SERS de référence de la glycine

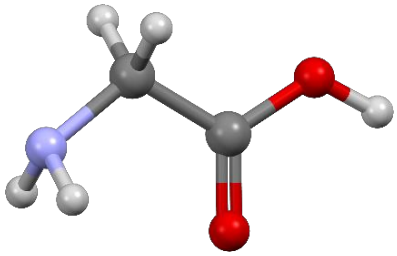


Figure 9 Représentation 3D de la glycine (gris : carbone, blanc : hydrogène, violet : azote, rouge : oxygène)

Abréviation	Formule chimique	Nom chimique	Poids moléculaire (g/mol)
Gly, G	$C_2H_5NO_2$	acide 2-aminoéthanoïque	75,066

Figure 10 Informations générales concernant la glycine

La glycine est composée d'un acide carboxylique et d'un groupe amine en position alpha. Il fait partie des vingt-deux acides aminés qui composent les protéines fabriquées par le vivant. En plus d'être un composant essentiel pour la formation des protéines, cette molécule est impliquée dans des réactions chimiques nécessaires au vivant. En effet, la synthèse du collagène, de la créatine mais aussi de l'acide urique nécessitent de la glycine. Cette molécule a fait l'objet de plusieurs études SERS. A. Parameswari et al.[8] ont étudié l'orientation de la glycine sur des nanoparticules d'argent en SERS. L'orientation perpendiculaire de la glycine adsorbée à la surface des nanoparticules d'argent est déterminée par l'exaltation des modes vibrationnels d'étirement des liaisons C-H et C=O. Ces mêmes A. Parameswari et al.[9] ont, en 2016, étudié cette molécule en SERS et en Raman théoriquement et expérimentalement. La glycine, avec ses dix atomes, possède vingt-quatre modes de vibrations (dix-sept dans le plan et sept hors plan) tous actifs en Raman mais aussi en infrarouge. La glycine peut s'adsorber chimiquement sur la surface par le groupe amine ou le groupe carboxylique selon deux modalités parallèles ou perpendiculaires à la surface. Selon l'absorption de la molécule sur la surface, le spectre SERS sera différent. Les auteurs concluent que le groupe amine et CH_2 s'adsorbent parallèlement à la surface d'Ag tandis que le groupement carboxyle s'adsorbe perpendiculaire à la surface. L'étude de la glycine a été conduite à trois concentrations. La concentration 1 µM a été étudiée en utilisant les lasers à 532 nm et 638 nm tandis que les concentrations de 10 fM et 100 aM l'ont été seulement avec le laser à 532nm et 638nm respectivement. L'intérêt d'étudier des solutions à des concentrations si différentes est, qu'à forte concentration, nous sommes sûrs de détecter la molécule d'intérêt. En couplant ces données avec les données à plus faible concentration, il est possible, en utilisant la procédure algorithmique décrite dans le chapitre précédent, de trouver les spectres ayant des pics Raman identiques. Ainsi, le degré de fiabilité des résultats annoncés nous semble supérieur à celui d'un spectre choisi dans le jeu de données sans utiliser cette procédure.

4.1 Solution de glycine à des concentrations de 1 µM et 100 aM

La figure 11 représente deux spectres de la glycine aux concentrations de 1 µM et 100 aM. La table 4 donne la position des pics SERS ainsi qu'une assignation possible pour les différents pics. La glycine à 1 µM possède sept pics que nous pouvons assigner aux différentes liaisons de la molécule. La vibration à 614 cm^{-1} est la plus importante et peut être assignée à au groupement carboxyle. A 912 cm^{-1}, un pic large bande peut être assignée au groupement carboxyle ou au groupement -CH_2. Enfin, dans la région 1300 – 1700 cm^{-1}, on retrouve du -CH_2 mais aussi le groupement amine.

Le spectre à 100 aM a cinq pics que l'on peut assigner à la glycine. Il possède en outre quatre pics en commun avec le spectre à 1 µM. On peut observer un pic à 917 cm^{-1} assigné au groupement carboxyle ou au groupe -CH_2. Deux pics assignables au groupe amine se trouvent en 1482 cm^{-1} et 1655 cm^{-1}.

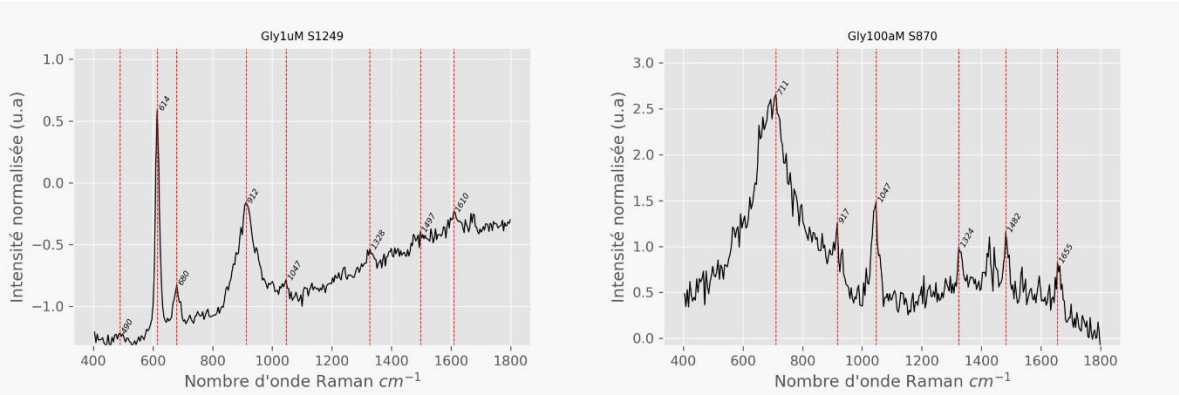


Figure 11 Spectres représentatifs de la glycine à 1 µM (gauche) et spectre de la glycine à 100 aM (droite)

Gly 1µM S1249	Gly 100aM S870	Assignation possible
	711	
614		ω(COO^-)
680		δ(COO^-), ν(C–C)
912	917	γ(COO^-), ρ(CH_2)
1047	1047	ν(C-N)
1328	1324	ω(CH_2)
1497	1482	δ_s(NH_3^+)
1610		δ_{as}(NH_3^+)
	1655	δ_{as}(NH_3^+)

Table 4 Positions des pics SERS en cm^{-1} et assignation sur la base de [9,10] pour la glycine à 1 µM et 100 aM

Si l'on s'en tient à ces deux spectres, on pourrait conclure qu'à forte concentration les deux parties de la molécule sont visibles tandis qu'à faible concentration, le groupe amine est préférentiellement

sondé à cause d'une orientation particulière de la molécule sur les nanoparticules d'Argent (via l'Amine).

4.2 Solution de glycine à des concentration de 1 µM et 10 fM

Les spectres de la glycine à 1 µM et 10 fM acquis avec le laser à 532nm sont représentés sur la figure 12. La position des pics et leur assignation possible sont listées en Table 5. Ces spectres ont trois pics en commun à 1250, 1316 et 1580 cm^{-1}. Ils peuvent être assignés respectivement au -CH_2 pour les deux premiers et à la fonction amine pour le dernier. En outre, le spectre à 1 µM présente un pic intense à 829 cm^{-1} qui n'a pas été assigné sur la base des travaux de A. Parameswari et al.

Le spectre à 10 fM possède en plus des pics caractéristiques du groupement carboxyle en 623 et 1441 cm^{-1}.

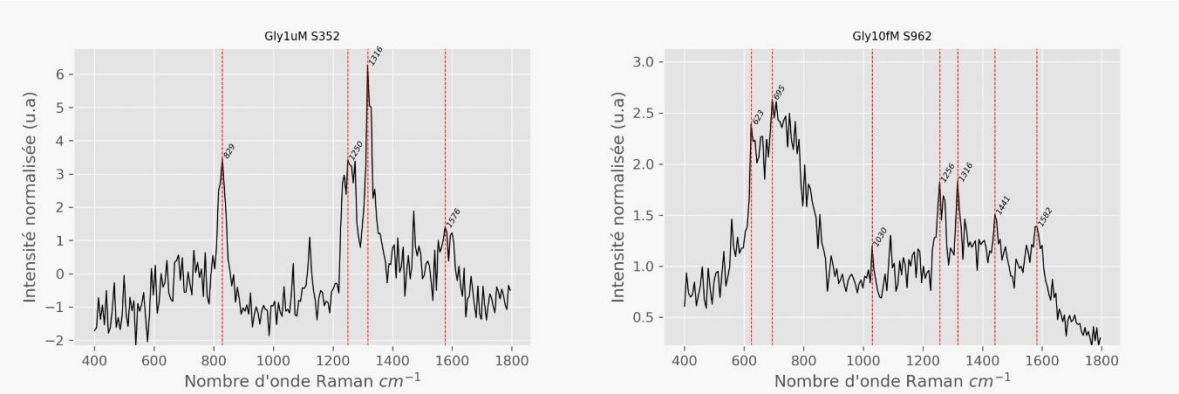


Figure 12 Spectres représentatifs de la glycine à 1 µM (gauche) et à 10 fM (droite)

Gly 1µM S1249	Gly 10fM S962	Assignation possible
	623	ω(COO^-)
	695	δ(COO^-), ν(C–C)
829		
	1030	ν(C-N)
1250	1256	τ(CH_2)
1316	1316	ω(CH_2)
	1441	δ(CH_2), ν_{as}(COO^-)
1576	1582	δ_s(NH_3^+)

Table 5 Positions des pics SERS en cm^{-1} et assignation sur la base de [9] pour la glycine à 1 µM et 10 fM

5 Spectres de référence SERS de la L-lysine

La L-Lysine, tout comme la glycine, fait partie des acides aminés protéinogéniques. La figure 13 est un visuel 3D de cette molécule ; la figure 14 quant à elle, résume des données la concernant. Cette molécule est composée d'une fonction carboxylique ainsi que d'une fonction amine liée au carbone α noté 2 sur la figure 13. Ce carbone α est ensuite relié à une chaîne linéaire composée de quatre groupes CH_2 et qui se finit par une autre fonction amine.

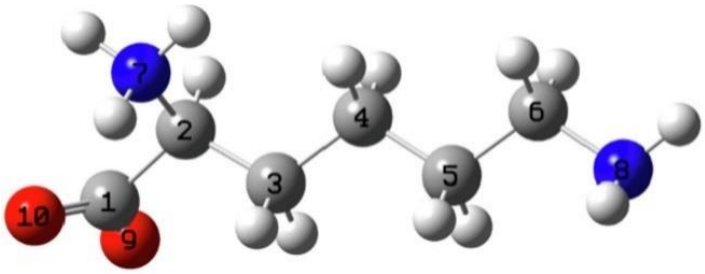


Figure 13 Représentation 3D de la Lysine. Extrait de [11]. (gris : carbone, blanc : hydrogène, bleu : azote, rouge, oxygène)

Abréviation	**Formule chimique[12]**	**Nom chimique**	**Poids moléculaire (g/mol)[12]**
LYS, K	$C_6H_{14}N_2O_2$	Acide 2,6-diaminohexanoïque	146.19

Figure 14 Informations concernant la L-Lysine

Cette molécule a la particularité de ne pas pouvoir être synthétisée directement dans le corps humain. Elle doit donc s'incorporer via la nutrition. L'étude de cette molécule s'est conduite selon les modalités d'acquisition précédentes en utilisant cependant un objectif x100 ainsi que le laser à 638 nm. Seules les concentrations allant de 1 µM à 1 nM ont été analysées. La figure 15 représente un spectre pour chaque concentration étudiée. La Table 6 donne la position des pics et leur assignation sur la base des travaux de Guohua Yao et al.[11] et de A.M Petrosyan et al.[13] Sur chacun de ces spectres on peut assigner au moins six pics à de la L-lysine. On retrouve notamment toutes les fonctions qui constituent cette molécule : le groupement carboxyle, le groupe amine et les -CH_2.

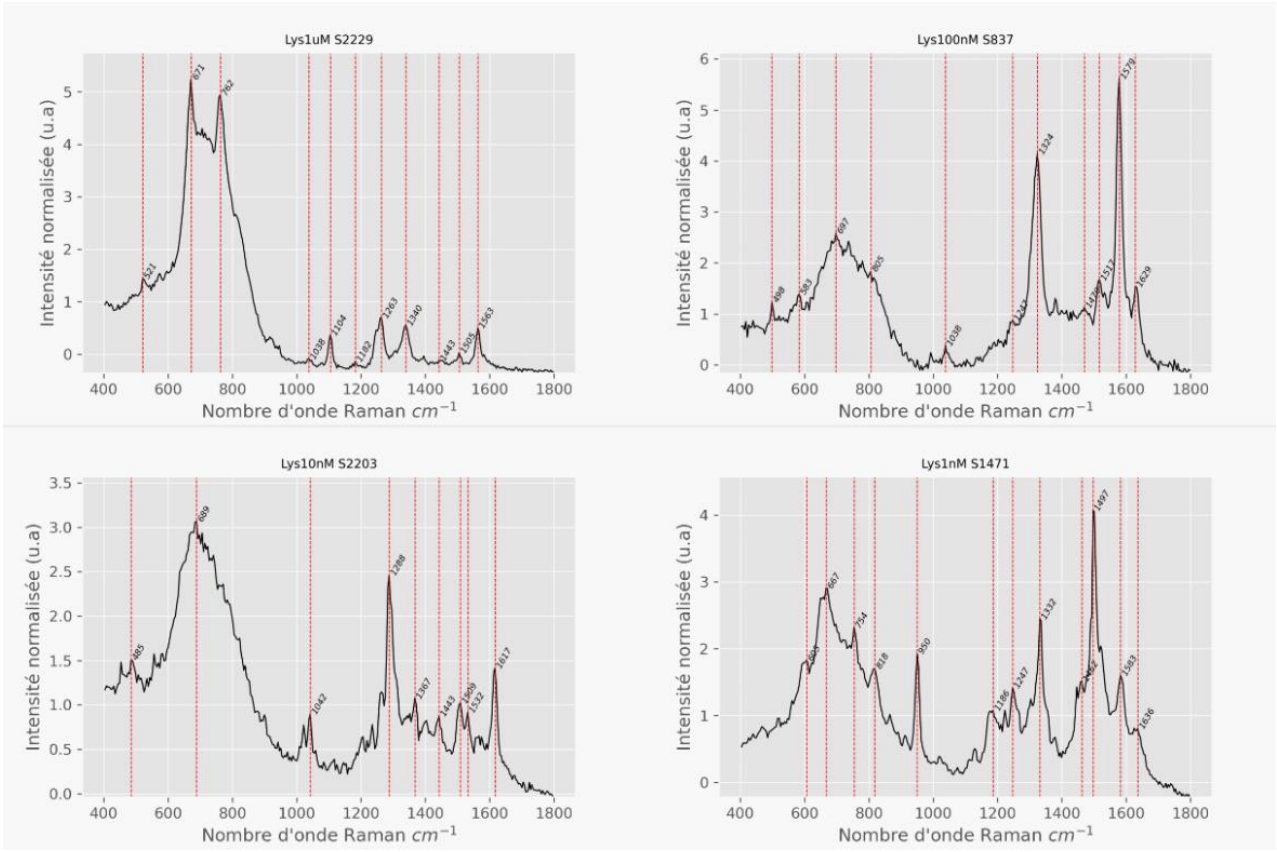


Figure 15 Spectres représentatifs de la L-Lysine pour des concentrations allant de 1µM à 1nM.

Lys 1µM S2229	**Lys 100nM S837**	**Lys 10nM S2203**	**Lys 1nM S1471**	**Assignation possible**
	498	485		
521				Si attice vibrations from bulk Si crystal
	583			
671			667	ω(COO^-)
	697	689		ω(COO^-)
762			754	ρ(CH_2)
	805		818	
			950	ν(C-C)
1038	1038	1042		ν(C-N)
1104				ν(C-N)
1182			1186	ρ(NH_3^{+})
1263			1247	τ(CH_2)
		1288		
	1324		1332	ω(CH_2)
1340		1367		ω(CH_2)
1443		1443	1462	δ(CH_2)
	1479			δ(CH_2)
1505	1517		1497	δ_s(NH_3^+)
		1532		δ_{as}(NH_3^+)
1563	1579		1583	δ_{as}(NH_3^+)
	1629	1617	1636	ν_{as} (COO^-)

Table 6 Positions des pics SERS en cm^{-1} et assignation sur la base des travaux de Guohua Yao et al.[11] et de A.M Petrosyan et al.[13] pour la L-Lysine de 1 µM à 1 nM

Conclusion

L'objet de ce chapitre était de présenter une première ébauche de catalogue de spectres SERS obtenus sur nos dispositifs à partir de solutions pures contenant des molécules de potentiel intérêt pour l'exobiologie. Les éléments choisis ont tous un intérêt fort dans la quête de recherche de vie lors de missions spatiales. En effet, l'AMP est une molécule présente dans l'ADN ; elle est donc un constituant essentiel du vivant. Cette molécule contient de surcroit de l'adénine – un élément particulièrement intéressant en ce qu'il se retrouve dans la composition d'un grand nombre de molécules nécessaires au métabolisme, comme l'adénosine triphosphate qui fournit l'énergie à la machinerie cellulaire. L'adénine est de plus, utilisée comme molécule test pour déterminer s'il est possible de détecter des traces de vie extraterrestre. Stefano Caporali et al.[14] se sont servis de cette molécule pour voir s'ils étaient capables de la détecter en Raman et en SERS sur des échantillons de météorites martiennes. L'adénine n'a pas pu être détectée en Raman ; cependant, l'ajout de nanoparticules d'argent a permis sa détection en SERS. Chahrazade El Amri et al. [15] ont quant à eux étudié l'adsorption et le rejet d'adénine à laquelle ont été ajoutés là encore à des échantillons de météorites (Zagami). Sun Hwa Jung[16] se sont penchés sur les mécanismes prébiotiques permettant la synthèse d'adénine par oligomérisation en phase gazeuse de HCN. D'après eux, « Les énergies d'activation des différentes étapes d'oligomérisation sont de quelques centaines de kilojoules par mole, ce qui empêche une synthèse efficace de l'adénine dans l'espace interstellaire ou dans l'atmosphère de Titan. » Si la synthèse d'adénine n'est pas triviale de façon prébiotique, cela renforce son caractère important pour la recherche de traces de vie extraterrestre.

Il est évident que la détection d'ADN lors de missions extra-planétaires serait un signe fort de la présence de vie présente ou passée sur la planète en question. Le rapport de l'ESA[17] (agence spatiale européenne) « exobiology in the solar system and the search for life on Mars » de 1999 est éclairant sur les limites que rencontre la vie dans des conditions extrêmes et notamment sur les propriétés des molécules à résister à des températures élevées ou faibles. Ainsi, si l'ADN, l'ARN (acide ribonucléique) et des métabolites tels que l'ATP sont facilement dégradés à haute température (environ 110°C), à l'inverse, certaines protéines sont capables de résister à des températures allant jusqu'à 140°C. A noter que certaines formes de vie extrémophiles ont développé des mécanismes d'adaptation pour vivre dans des environnements dans lesquels les températures sont élevées.

L'étude de la glycine et de L-lysine s'inscrit dans l'étude des protéines. En effet, ces deux molécules sont des acides aminés protéinogènes. La glycine étant le plus simple des acides aminés, bon nombre d'efforts se sont concentrés sur sa détection. Ainsi, J. Michelle Kotler et al. [18] ont détecté la présence de cette molécule dans des jarosites terriennes. Or, depuis la mission Mars Exploration Rover Opportunity, nous savons qu'il y a sur Mars ce type de minerai – d'où l'intérêt d'étudier une telle molécule. Par ailleurs, il a été démontré que cette molécule peut se trouver dans des météorites. En effet, la recherche de composés organiques dans les météorites n'est pas nouvelle. Jeffrey L. Bada et al.[19] ont par exemple démontré la présence de glycine, de sérine et d'alanine dans la partie carbonée de la météorite martienne ALH84001 par HPLC (high performance liquid chromatography).

Ici encore, il est important de souligner la difficulté de l'analyse des spectres SERS, notamment si l'on regarde des molécules comme la glycine ou la L-lysine. Toutes deux présentent quatre groupes - CH_2 et la différence réside dans le fait que la L-lysine comporte un groupe amine sur sa chaine latérale. Dès lors, les pics Raman qui les composent sont proches les uns des autres.

La complexité de l'ADN est toute autre ; elle est contenue dans sa structure qui repose sur quatre bases. Ainsi, lorsque l'on sonde localement, c'est la base la plus proche du point qui fournit la réponse

et ce en fonction de sa conformation avec celui-ci, ce qui augmente grandement le nombre de spectres possibles que l'on peut acquérir.

La liste de ces premières molécules étudiées est loin d'être exhaustive. Pour compléter cette étude partielle, il conviendrait en effet d'inclure des spectres des lipides mais aussi des sucres et autres pigments tel le carotène. Il est nécessaire d'avoir une vision exhaustive des grandes familles de molécules composant le vivant et ce à fortes et faibles concentrations. L'avantage des surfaces développées est la possibilité de multiplexer le dépôt de gouttes pour ensuite analyser chaque évaporation en SERS.

Ce chapitre permet de démontrer que l'on peut analyser des solutions composées d'éléments connus à des concentrations variées. Le prochaine et dernier chapitre de ce manuscrit sera l'occasion d'aborder l'étude d'une solution complexe contenant des éléments de la météorite de Murchison.

Bibliographie

1. Acide désoxyribonucléique. *Wikipédia* (2022).
2. Becker, A. & Murialdo, H. Bacteriophage lambda DNA: the beginning of the end. *J Bacteriol* **172**, 2819–2824 (1990).
3. Gorelik, V. S., Krylov, A. S. & Sverbil, V. P. Local Raman spectroscopy of DNA. *Bull. Lebedev Phys. Inst.* **41**, 310–315 (2014).
4. Deng, C., Ma, W. & Sun, J.-L. Fabrication of Highly Rough Ag Nanobud Substrates and Surface-Enhanced Raman Scattering of λ-DNA Molecules. *Journal of Nanomaterials* **2012**, (2012).
5. Sánchez-Cortés, S. & García-Ramos, J. V. SERS of AMP on different silver colloids. *Journal of Molecular Structure* **274**, 33–45 (1992).
6. Hirakawa, A. Y., Okada, H., Sasagawa, S. & Tsuboi, M. Infrared and Raman spectra of adenine and its 15N and 13C substitution products. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **41**, 209–216 (1985).
7. Miljanić, S., Dijanošić, A. & Matić, I. Adsorption mechanisms of RNA mononucleotides on silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **137**, 1357–1362 (2015).
8. Parameswari, A. & Benial, A. M. F. Orientation of glycine on silver nanoparticles: SERS studies. *AIP Conference Proceedings* **1728**, 020374 (2016).
9. Parameswari, A., Premkumar, S., Premkumar, R. & Milton Franklin Benial, A. Surface enhanced Raman spectroscopy and quantum chemical studies on glycine single crystal. *Journal of Molecular Structure* **1116**, 180–187 (2016).
10. Sabur, A., Havel, M. & Gogotsi, Y. SERS intensity optimization by controlling the size and shape of faceted gold nanoparticles. *Journal of Raman Spectroscopy* **39**, 61–67 (2008).

11. Yao, G. & Huang, Q. Theoretical and experimental study of the infrared and Raman spectra of L-lysine acetylation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **278**, 121371 (2022).
12. PubChem. Lysine. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5962.
13. Petrosyan, A. M. & Ghazaryan, V. V. Vibrational spectra of l-lysine monohydrochloride dihydrate and its two anhydrous forms. *Journal of Molecular Structure* **917**, 56–62 (2009).
14. Caporali, S. *et al.* SERS investigation of possible extraterrestrial life traces: Experimental adsorption of adenine on a Martian meteorite. *Meteoritics & Planetary Science* **47**, 853–860 (2012).
15. El Amri, C., Baron, M.-H. & Maurel, M.-C. Adenine adsorption on and release from meteorite specimens assessed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **35**, 170–177 (2004).
16. Jung, S. H. & Choe, J. C. Mechanisms of Prebiotic Adenine Synthesis from HCN by Oligomerization in the Gas Phase. *Astrobiology* **13**, 465–475 (2013).
17. *Exobiology in the solar system and the search for life on Mars: report from the ESA Exobiology Team Study, 1997-1998*. (ESA Publications Division, 1999).
18. Kotler, J. M., Hinman, N. W., Yan, B., Stoner, D. L. & Scott, J. R. Glycine Identification in Natural Jarosites Using Laser Desorption Fourier Transform Mass Spectrometry: Implications for the Search for Life on Mars. *Astrobiology* **8**, 253–266 (2008).
19. Bada, J. L., Glavin, D. P., McDonald, G. D. & Becker, L. A Search for Endogenous Amino Acids in Martian Meteorite ALH84001. *Science* **279**, 362–365 (1998).

Chapitre 6 : Application du dispositif de détection et de la méthode d'analyse SERS à l'étude de météorites

Table des matières

Chapitre 6 : Application du dispositif de détection et de la méthode d'analyse SERS à l'étude de météorites *205*

Introduction *205*

1 Traitement des échantillons Murchison & WIS 91600 ..... *210*

1.1 Protocole d'extraction de la phase organique **210**

1.2 Evaporation et analyse EDX **210**

2 Etudes des parties hydrosolubles des météorites en spectroscopie Raman exaltée de surface *212*

2.1 Murchison **213**

2.2 WIS96100 ..... **215**

3 Recherche de glycine dans les météorites *216*

Discussion sur l'analyse SERS d'extraits organiques de météorites *220*

Bibliographie *222*

Chapitre 6 : Application du dispositif de détection et de la méthode d'analyse SERS à l'étude de météorites

Introduction

L'idée que de la matière extraterrestre puisse atteindre la Terre n'est pas si ancienne que cela. En effet, avant le XIX^{e} siècle, la communauté scientifique discréditait largement cette hypothèse et ce n'est qu'en 1803 que l'origine extraterrestre des météorites fut attestée avec la documentation de la chute de météorites près de L'Aigle en France par Jean-Baptiste Biot[1]. La définition d'une météorite donnée par l'« international Meteor Organization » est la suivante : « A natural object of extraterrestrial origin (meteoroid) that survives passage through the atmosphere and hits the ground. »[2] La plupart des météorites sont des fragments d'astéroïde projetés hors de la ceinture d'astéroïdes sous l'effet gravitationnel de Jupiter[3]. Les premiers systèmes de classification des météorites se fondaient sur la distinction entre les météorites ferreuses, pierreuses et mixtes (mélange de fer et de pierre)[4]. Ce type de classification repose sur l'abondance de métal au sein de la météorite et non sur les processus de formation des roches. Addi Bischoff [5] propose une classification des météorites, représentée en figure 1. Dans cette classification se trouvent deux types de météorites : les différenciées et les non-différenciées. La première inclut les météorites pauvres en métal (achondrites), les météorites riches en métal et les météorites mixtes. La seconde catégorie des non différenciées regroupe les météorites pierreuses : les chondrites. Les chondres sont des sphérules silicatées ferromagnésiennes ignées[6]. Plusieurs types de chondrites peuvent être distingués, parmi lesquels les chondrites carbonées qui sont des météorites avec un fort taux de carbone autre que le carbone libre (diamant et graphite)[7]. La météorite Murchison ainsi que la météorite WIS 91600 qui ont été l'objet de notre étude font partie de ce type de chondrites.

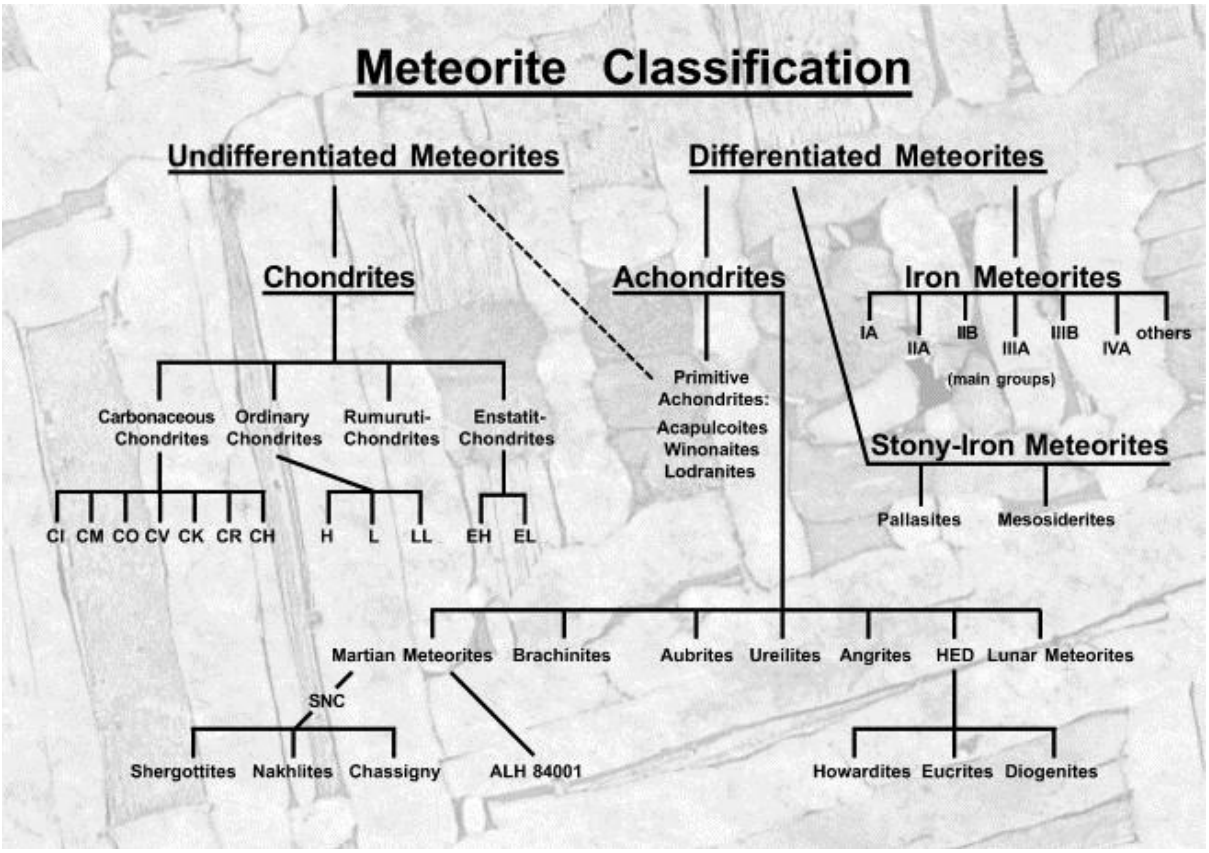


Figure 1 Classification des météorites. Division des météorites en roches différenciées et non différenciées. Omission des météorites uniques et non groupées. Extrait de [5]

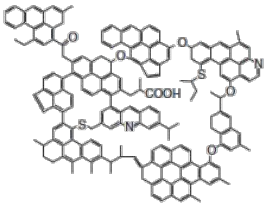
La compréhension que l'on a de la matière organique dans les météorites vient en grande partie de l'étude de la météorite Murchinson. La météorite Murchison (que l'on abrégera par Murchison), est tombée en Australie en 1969 proche du village éponyme de Murchison. Cette météorite d'une centaine de kilogrammes environ est classée dans la catégorie II des chondrites carbonées (C2) qui sont des météorites composées principalement d'un mélange de minéraux anhydres (avec une dominante pour l'olivine et le pyroxène)[8]. Murchison est composée de 97.5% wt de minéraux – dont le pyroxène (silicate d'aluminium) et l'olivine (sulfure de fer et silicate de magnésium) et de l'oxyde de fer – et de 2.5% wt de matière carbonée [9]. Dans une perspective d'exobiologie c'est cette dernière qui nous intéresse. Dès 1971, les premières analyses de Murchison ont permis de mettre en évidence la présence d'acides aminés, d'hydrocarbones aliphatiques et aromatiques [10]. Des fullerènes de 60 à 400 carbones ont également été détectés[11]. Peter G. Stoks et al.[12] ont démontré en 1982 la présence de composés hétérocycliques nitrogénés dans la météorite de Murchison. G Cooper et al. [13] ont montré que la météorite Murchison est composée de composés polyhydroxylés dans des proportions similaires aux acides aminés. Or, ces composés, parmi lesquels se trouvent les sucres, les acides sucrés et les polyols, sont nécessaires aux formes de vie telles que nous les connaissons. En effet, nous les retrouvons à la fois dans les acides nucléiques – qui composent l'ADN et l'ARN – mais aussi dans les membranes des cellules et encore comme forme d'énergie. Sandra Pizzarello[14] a égalemnet détecté du cyanure d'hydrogène à une concentration de 10 ppm par gaz chromatographie – spectrométrie de masse.

Depuis 1972 et l'article de Cyril Ponnamperuma[15] donnant la composition de la partie organique de Murchison, les analyses se sont affinées. Sandra Pizzarello et al [16,17] ont étudié la composition de la partie carbonée de Murchison. Celle-ci peut être séparée en deux parties, insoluble et soluble. La partie insoluble est souvent assimilée à du kérogène car comme pour le kérogène terrestre, il s'agit de macromolécules insolubles donc la composition n'est pas connue en détail et dont le nombre moyen d'éléments est $C_{100}H_{46}N_{10}O_{15}S_{4.5.}$ La partie soluble quant à elle, est composée d'un grand nombre de molécules. La figure 2a) regroupe les différents types de molécules que l'on peut rencontrer dans ces deux parties. La partie soluble est composée en outre d'acides aminés, de purines et de pyrimidines ainsi que de sucres. La figure 2b) nous donne la composition de la partie soluble : les hydrocarbones aliphatiques, les hydrocarbones aromatiques et les acides aminés sont donc les classes de molécules les plus présentes dans la partie soluble de Murchison. Il est à noter que la partie insoluble de Murchison représente plus de 90% de la matière carbonée dans cette météorite.

La météorite WIS 91600 d'une masse 184,1g a été découverte en 1991 en Antarctique (sa chute n'a pas été observée). Cette chondrite carbonée a tout d'abord été classée parmi les chondrites de type C2 et ce en étudiant sa pétrologie. Cependant, cette météorite diffère de ces dernières en ce qu'elle ne contient que peu de carbonates. En outre, la tochilinite en est absente et les phyllosilicates et la magnétite framboïdale se retrouvent en abondance[18]. Cette météorite a notamment été étudiée pour rechercher des acides pyridine-carboxyliques par chromatographie liquide couplée à de la détection UV et de la spectrométrie (LC-UV / MS)[19]. Plus généralement, ce sont les méthodes de chromatographique couplées à la spectrométrie de masse qui sont le plus utilisées dans l'étude des météorites. Il est cependant intéressant de se pencher sur la littérature de l'étude de la matière carbonée issue de météorites en spectroscopie Raman.

a)

Table 1. Classes of organic compounds in the Murchison meteorite.

Compound Class	Structure & Example Molecule	
Carboxylic acids	$H_3C-COOH$	Acetic acid
Amino acids	$H_3C-CH(NH_2)-COOH$	Alanine
Hydroxy acids	$H_3C-CH(OH)-COOH$	Lactic acid
Ketoacids	$H_3C-C(=O)-H$	Pyruvic acid
Dicarboxylic acids	$HOOC-CH_2-COOH$	Succinic acid
Sugar alcohols & acids	$H_2C(OH)-CH(OH)-CHO$	Glyceric acid
Aldehydes & Ketones	$H_3C-C(=O)-H$	Acetaldehyde
Amines & Amides	$H_3C-CH_2-NH_2$	Ethyl amine
Pyridine carb. acids		Nicotinic acid
Purines & Pyrimidines		Adenine
Hydrocarbons:		
Alyphatic	$H_3C-CH_2-CH_3$	Propane
Aromatic		Naphthalene
Polar		Isoquinoline
		Insoluble Material (estimated)

b)

Compounds	Abundances (%)	Abundances µg g^{-1} (ppm)
Macromolecular material	1.45	
Carbon dioxide		106
Carbon monoxide		0.06
Methane		0.14
Hydrocarbons: aliphatic		12–35
aromatic		15–28
Acids: monocarboxylic		332
dicarboxylic		25.7
α-hydroxycarboxylic		14.6
Amino acids		60
Alcohols		11
Aldehydes		11
Ketones		16
Sugar-related compounds		~60
Ammonia		19
Amines		8
Urea		25
Basic N-heterocycles (pyridines, quinolines)		0.05–0.5
Pyridinecarboxylic acids		>7
Dicarboximides		>50
Pyrimidines (uracil and thymine)		0.06
Purines		1.2
Benzothiophenes		0.3
Sulfonic acids		67
Phosphonic acids		1.5

Figure 2 Composition de la météorite de Murchison. a) Représentation des différentes classes de molécules composant la météorite de Murchison. Extrait de [17] b) Composition de la partie organique de la météorite de Murchison. Extrait de [3]

Plus récemment donc, Chahrazade El Amri et al.[20] ont réalisé des cartographies en micro Raman directement sur des grains de Murchison de 4 mm^2 mais aussi sur des poudres de la météorite. Les cartographies de 100 µm^2 ont permis de mettre en évidence la présence d'olivine, de pyroxène d'oxides de fer mais aussi de carbone. Ce dernier apparait sous la forme de deux larges bandes centrées en 1350 et 1600 cm^{-1}. Ces bandes sont caractéristiques de carbone amorphe et peuvent être issues de la photo décomposition de molécules carbonées. B. Wopenka et al.[21] ont analysé 103 grains présolaires carbonés individuels provenant de trois fractions de densités différentes de la météorite Murchison. Ils ont observé des spectres Raman typiques du carbone non cristallin, c'est-à-dire organique. Ce carbone se rencontre par exemple dans les kérogènes terrestres. La figure 3 représente les différents types de spectres Raman du carbone en fonction de la liaison carbone-carbone. On peut observer que le graphite (sp^2) et le diamant (sp^3) ont des pics Raman particulièrement fins, ce qui est caractéristique des structures cristallines. La bande G (pour graphite) à 1582 cm^{-1} est caractéristique du premier ordre de la liaison sp^2 du graphite. La bande D (pour désordre) à 1331 cm^{-1} est caractéristique du désordre qu'il peut y avoir dans le graphite. Le kérogène qui est organique, est caractérisé par des bande G et D large. Queenie H.S. Chan et al.[22] ont étudié les carbonates dans 5 chondrites – dont Murchison et WIS 91600 – à l'aide de la spectroscopie Raman. Les carbonates identifiés dans les météorites sont de la calcite. Là encore, les bandes G et D du carbone ont été observées.

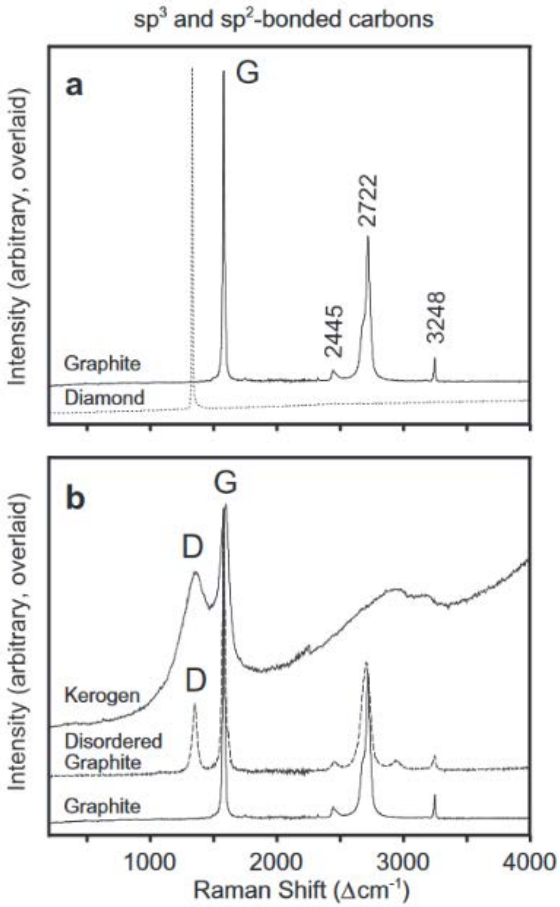


Figure 3 Spectres Raman pour différents matériaux à liaison carbone-carbone. Ils ont été obtenus à partir d'échantillons terrestres : une alliance en diamant, du graphite de Ceylan, du graphite dans une roche métamorphique et un échantillon de kérogène précambrien. (a) Différences entre le carbone à liaison sp^2 et le carbone à liaison sp^3. Le diamant bien cristallisé à liaison sp^3 présente un pic à 1331 cm^{-1}, alors que le graphite bien cristallisé à liaison sp^2 présente un fort pic de 1er ordre (pic G pour "graphite") à 1582 cm^{-1}, et des pics de 2ème ordre à 2445, 2722 et 3248 cm^{-1}. (b) Différences entre les différents carbones à liaison sp^2 : un graphite parfaitement cristallin, un graphite légèrement désordonné et un carbone organique amorphe à liaison sp^2. Les graphites désordonnés ont en plus du pic G, un pic de premier ordre appelé D (pour désordre) en 1350 cm^{-1}. En comparaison, les matériaux carbonés amorphes à liaison sp^2 présentent des pics d'ordre 1 extrêmement larges, les pics d'ordre 2 sont inexistants ou très atténués). Extrait de [21]

Ce bref aperçu de la littérature nous montre donc que si la spectroscopie Raman a été utilisée pour détecter des minéraux et la matière carbonée, cette technique n'a pas permis de déterminer la présence ou non de biomolécules dans Murchison. En effet, c'est par l'intermédiaire des bandes G et D que la présence de carbone organique a été décelée, mais cette information ne permet pas d'aller plus loin dans l'analyse. L'analyse d'échantillons complexes en SERS – dont les météorites font partie – souffre donc d'un cruel manque de littérature. En effet, une recherche dans le web of science avec les termes « surface-enhanced Raman spectroscopy meteorite SERS » ne sort que trois résultats. Il est à noter que ces trois travaux discutent de la détection d'adénine dont nous avons souligné au chapitre V l'importance pour les études en exobiologie. Afin de tester notre dispositif et notre méthode de traitement des spectres SERS nous avons donc pensé intéressant de les confronter à l'étude de la partie organique de météorites historiques comme Murchinson et Wisconsin 91600. Les résultats obtenus lors de cette étude, s'ils sont probants en termes d'identification moléculaire, apporteraient donc une nouveauté à l'état de l'art des méthodes de spectroscopie Raman pour l'étude des météorites, et d'autre part pourraient servir de preuve de concept pour valider la méthode dans une perspective d'explorations planétaires ultérieures.

Les échantillons analysés dans cette partie ont été fournis par l'intermédiaire de Véronique Vuitton de l'IPAG (Institut de Planétologie et d'Astrophysique de Grenoble) et de Hassan Sabbah de l'IRAP (Institut de Recherche en Astrophysique et Planétologie). Nous les remercions pour ces échantillons qui nous ont permis d'effectuer des expériences sur du matériel d'origine extraterrestre.

1 Traitement des échantillons Murchison & WIS 91600

1.1 Protocole d'extraction de la phase organique

Les phases organiques des météorites Murchison et WIS91600 ont été extraites selon le procédé suivant : les échantillons (61.65 mg Murchison / 78.20 mg WIS 91600) ont tout d'abord été broyés puis lavés pendant quatre heures dans 1.5 mL d'eau dans des tubes en PP (polypropylène) de 2 mL. Un échantillon d'eau de lavage a aussi été constitué dans un tube en PP ; cet échantillon correspond au blanc appelé par la suite contrôle. Durant cette phase de solubilisation, les tubes ont été agités par un agitateur vortex. Ils ont ensuite été centrifugés pendant dix minutes à 10 000 tours. Les surnageants contenant les parties organiques des météorites ont été extraits et conservés dans des tubes en verre, de même que l'échantillon de contrôle. Le protocole d'analyse mis en place dans les chapitres précédents de cette thèse nécessite d'évaporer une goutte de l'échantillon à analyser et une goutte du contrôle. Dès lors, une goutte de 6 µL de chaque solution (extrait organique surnageant et solution contrôle) a été évaporée sur les surfaces SH-SERS. Toutes les évaporations sur les dispositifs ont été implémentées dans les conditions ambiantes de la salle blanche.

1.2 Evaporation et analyse EDX

La figure 4 présente des images en microscopie électronique après évaporation de la solution contrôle (4a) et de la phase hydrosoluble de Murchison (4b) ainsi que de la phase hydrosoluble de WIS 91600. Les résultats de ces évaporations sont des dépôts 3D de morphologies différentes. Le dépôt final est bien centré sur le piédestal que l'on peut distinguer dans le cas du solvant. Les morphologies des deux dépôts sont différentes. Dans le cas du solvant, le dépôt semble boursouflé tandis qu'il semble sédimentaire dans le cas de Murchison. Il n'en demeure pas moins que les deux dépôts sont volumineux, tri-dimensionnels et excèdent largement en taille la dimension du piédestal analytique de nos dispositifs.

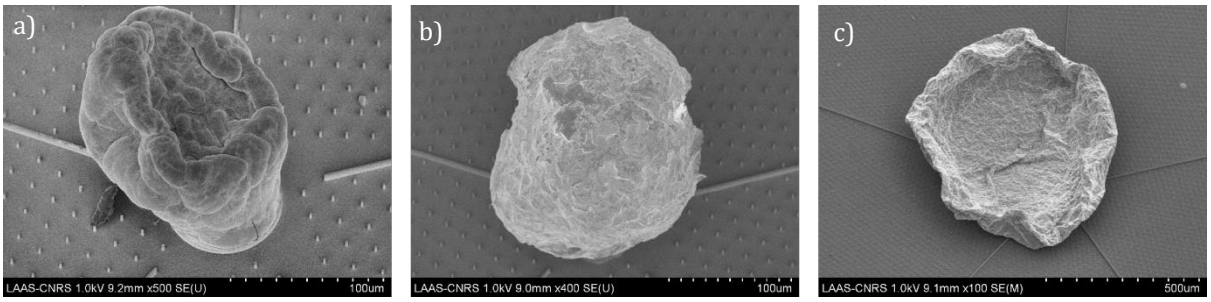


Figure 4 Images au microscope électronique à balayage (MEB) des dépôts après évaporation des solutions de météorites a) solution contrôle, b) phase hydrosoluble de Murchison, c) phase hydrosoluble de WIS 91600

Afin de poursuivre l'analyse, la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX) a été effectuée à 10 KeV *in situ* à l'intérieur du microscope électronique à balayage en focalisant le faisceau d'électrons sur les résidus obtenus. Cette analyse élémentaire nous permet d'en apprendre un peu plus sur la composition de la matière sèche de l'échantillon.

La figure 5 résume les résultats obtenus. En 5a) est représentée une image MEB de l'échantillon contrôle non incliné et sur laquelle figurent les différents points de mesure. Les figures 5b et c) sont analogues à la 5a) mais pour les échantillons « Murchison » et « WIS 91600 ».

La figure 6 représente des spectres EDX pour les différents échantillons. En 6a) les spectres pris aux points 4 et 5 de la figure 5a). Le point 4 correspond à une acquisition sur le dépôt. Les éléments majoritaires que l'on peut sonder sur ce point sont l'oxygène, le sodium et le silicium, de l'azote et du chlore. Le point 5 est le point contrôle obtenu en dehors du dépôt sec. Sur ce point nous allons sonder la surface ; aussi nous retrouvons des éléments composant la surface, soit du silicium, de l'argent et de l'oxygène. La figure 6b nous donne respectivement les spectres pour les points 1 (situé sur le dépôt) et 8 (hors du dépôt). Sur le point 1, cinq éléments sont observables : l'oxygène, le sodium, le magnésium, l'aluminium et le soufre. Sur le point contrôle, le silicium, l'oxygène et l'argent sont détectables. Enfin, sur la figure 6c) ce sont les spectres pour les points 1 et 9 qui sont représentés. Dans le spectre 1 (situé sur le dépôt), les éléments observables sont les suivants : azote, oxygène, sodium, magnésium silicium, souffre, chlore et calcium. Le silicium, l'argent, l'oxygène mais aussi le titane et le fluor sont observables sur le spectre du point contrôle (9).

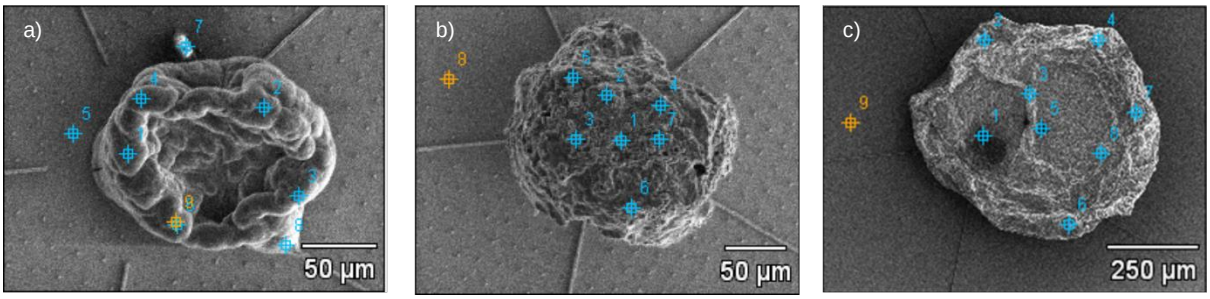


Figure 5 Images Images au microscope électronique à balayage (MEB) des différents dépôts et points de mesure EDX associés a) solution contrôle b) phase hydrosoluble de Murchison c) phase hydrosoluble de WIS 91600

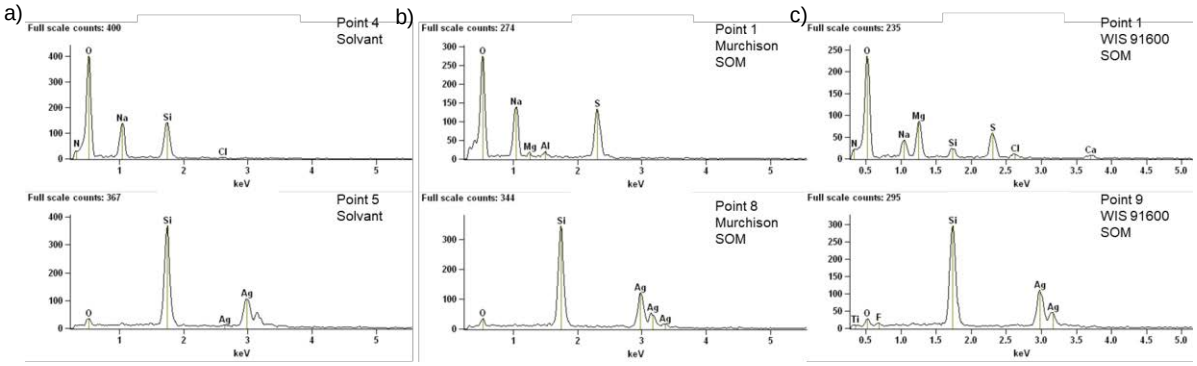


Figure 6 Spectres EDX (10KeV) donnant la composition élémentaire des différents résidus secs. En haut, les mesures sont prises sur les dépôts ; en bas, il s'agit des mesures contrôles effectuées hors dépôt. a) analyse du solvant, b) phase hydrosoluble de Murchison, c) phase hydrosoluble de WIS 91600

Le dépôt résultant de l'évaporation du solvant sur nos surfaces SH hiérarchiques est important sur le piédestal ; l'analyse EDX de celui-ci nous apprend qu'il est composé d'éléments tels que le sodium, le chlore, le silicium et de l'azote. Ces éléments, et particulièrement le silicium et le sodium, pourraient provenir du contenant en verre. En effet, les verres borosilicatés présentent ces éléments qui sont susceptibles de diffuser dans l'eau.

L'analyse élémentaire du dépôt effectué par l'évaporation de la phase organique de Murchison donne un résultat très différent en comparaison de l'analyse de référence du contrôle. En effet, outre le soufre qui peut être présent dans des composés organo-soufrés, nous retrouvons du magnésium et de l'aluminium. Alexander Ruf et al.[23] ont montré qu'il pouvait y avoir des organo-métalliques contenant du magnésium dans les chondrites. Il semble cependant improbable qu'avec une méthode de détection peu sensible comme l'EDX, nous ayons pu détecter de tels composés. Le magnésium et l'aluminium sont en revanche des éléments contenus dans le pyroxène et l'olivine et donc potentiellement présents dans la solution après extraction.

En ce qui concerne WIS, on retrouve également des éléments très différents en comparaison de l'analyse de référence du solvant d'extraction. Des atomes comme l'azote, le silicium le chlore et le calcium se trouvent en plus de ce que l'on trouve dans Murchison. L'aluminium n'est cependant pas détecté dans cet échantillon.

La résolution du détecteur EDX utilisé ne nous permet pas de sonder des éléments légers tels que le carbone. Dès lors, il est normal de ne pas détecter de traces carbonées avec cette méthode. Il semble plus probable que la majorité des éléments détectés avec cette méthode aient pour origine les matériaux de la phase non organique. Nous allons donc essayer de détecter les composés organiques de la solution par notre méthode SERS. Cependant, le dépôt macroscopique sur le piédestal ne nous permet pas d'effectuer cette analyse SERS. L'amas tri-dimensionnel formé masque complètement les points chauds et aucune exaltation Raman n'est possible en l'état. Pour s'en affranchir nous avons donc simplement dilué les solutions initiales dans de l'eau DI ultrapure jusqu'à un facteur de dilution permettant l'obtention d'un résidu sec homogène et bi-dimensionnel recouvrant toute la surface du piédestal.

2 Etudes des parties hydrosolubles des météorites en spectroscopie Raman exaltée de surface

L'étude de Murchison en SERS ne peut se faire qu'après dilution de la phase hydrosoluble de cette météorite. Nous avons utilisé l'eau issue de l'installation de la salle blanche pour effectuer les dilutions. La phase hydrosoluble de Murchison ainsi que le solvant utilisé pour l'extraire ont été dilués par un facteur 10 000 (quatre dilutions successives d'un facteur 10). Une goutte de chaque composé (l'eau de salle blanche, Murchison diluée et le solvant dilué) a ensuite été évaporée sur 3 dispositifs SH-SERS dans les conditions ambiantes de la salle blanche. Une cartographie de chaque dépôt a été effectuée en utilisant le spectromètre HORIBA Xplora dans les conditions d'acquisitions suivantes : laser 638 nm, 0.1 mW, résolution 10 cm^{-1} (réseau 600 l/mm), objectif x50, 250 ms d'exposition.

La méthode d'analyse est celle décrite dans le chapitre IV : les données générées ont été assemblées dans un DataFrame et les spectres ont été sélectionnés selon le critère du nombre de pics dans la région 1000-1800 cm^{-1}, puis des clusters ont été générés en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson sur des spectres simplifiés ayant comme unique information la position spectrale des pics.

La composition des clusters peut être la suivante :

- Des spectres uniquement issus de l'évaporation de Murchison diluée
- Des spectres uniquement issus de l'évaporation du solvant dilué

- Des spectres uniquement issus de l'évaporation de l'eau de salle blanche
- Un mélange de spectres.

Nous ne nous attarderons que sur les clusters dont les spectres sont issus de l'évaporation de Murchison et ce, quel que soit le nombre de spectres dans les clusters. Le protocole mis en place pour l'étude de Murchison est aussi mis en œuvre pour l'étude de WI596100.

2.1 Murchison

La figure 7 représente trois spectres issus du clustering de la météorite Murchison. Nous avons choisi ces spectres en particulier en ce qu'ils sont pourvus de nombres de pics Raman pertinents. Dans la figure 7a) le spectre S1416 présente huit pics Raman. Parmi ces pics, nous observons trois pics à 1583, 1606 et 1648 cm^{-1}. La figure 7b) dispose de neuf pics dans la zone 1000 -1800 cm^{-1}. Deux sortent du lot en 1187 et 1231 cm^{-1}. Trois sont présentés en 1540, 1580 et 1602 cm^{-1}. Le spectre de la figure 7c) peut être décomposé en deux parties : entre 400 et 1200 cm^{-1}, sept pics sont présents tandis que nous observons trois pics en 1540, 1610, 1648 cm^{-1}. Une plage sans pic se situe entre 1200 et 1500 cm^{-1}.

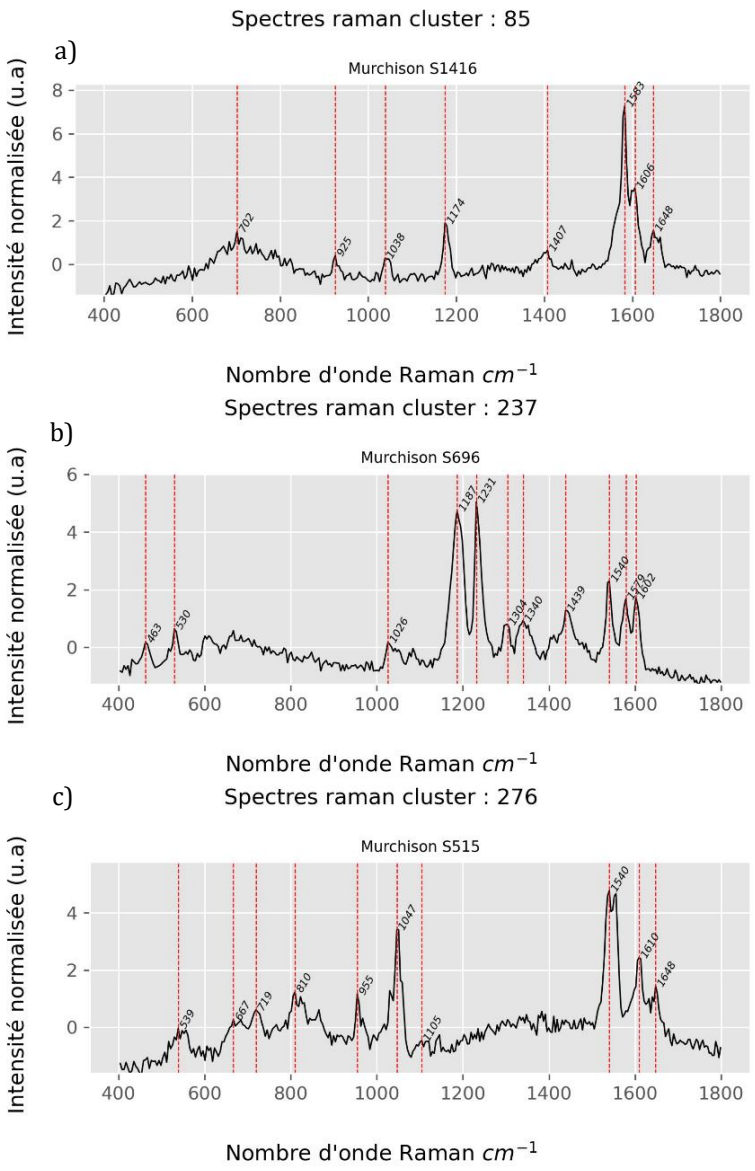


Figure 7 Spectres SERS représentatifs de le partie organique hydrosoluble de Murchison

En fonction de la position des pics Raman, nous pouvons chercher à faire une identification du ou des composés détecté(s). Cette étude est spéculative ; aussi, le conditionnel sera de rigueur. L'assignation des pics s'est faite sur la base du livre de George Socrates « Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, 3rd Edition »[24]. Sur tous les spectres, nous observons trois pics dans la zone 1540 -1650 cm^{-1}. Dans cette zone, nous retrouvons principalement les liaisons chimiques suivantes : C=N, C=C, C=0 et N-H. Aussi, nous pouvons être confiants quant à la détection de molécules organiques sur la surface. Pour le spectre en figure 7a), en plus de ces liaisons, un pic en 1407 cm^{-1} peut être identifié comme une liaison O-H dans un acide carboxylique ou un liaison C-N dans une amide primaire. Le pic en 1174 cm^{-1} pourrait correspondre à une liaison C-C-N. Finalement, la liaison 1038 cm^{-1} pourrait correspondre à une liaison C-NH_2 dans une amine et la liaison à 925 cm^{-1}, à une vibration d'une fonction CH_2. Le spectre 7b) quant à lui, a deux pics très intenses en 1187 et 1231 cm^{-1} pouvant être assignés à une liaison C-N dans une amine aromatique. Le pic à 1304 cm^{-1} peut être assigné à une liaison CH_2 ou à une liaison SO_2 dans des sulfones. Les pics

à 1440 et 1438 cm^{-1} peuvent être assignés à des vibrations d'une fonction carboxyle. En outre, il possède sept pics dans la région 500 - 1100 cm^{-1}. Parmi les plus intenses, nous retrouvons un pic à 1047 cm^{-1} pouvant correspondre à une liaison C-NH_2. Le pic à 955 cm^{-1} peut être assimilé à un cycle aromatique. Celui à 810 cm^{-1} pourrait correspondre à une liaison dans une amine primaire. Sur cette base nous pourrions identifier le spectre comme appartenant à la catégorie des acides aminés aromatiques. La région 550 - 1200 cm^{-1} du spectre 7c) est composée de plusieurs pics avec notamment un pic à 810 cm^{-1} qui peut être assigné à une amine primaire mais aussi à des vibrations de la fonction benzène. Le pic à 954 cm^{-1} peut correspondre aux vibrations d'un cycle aromatique mais aussi à une liaison de P-O-C dans des composés organophosphorés.

2.2 WIS96100

Le clustering des données de l'évaporation de la partie organique de la météorite WIS 961000 permet d'obtenir les spectres qui ne sont pas contenus dans l'eau utilisée pour la dilution. La figure 8 représente 3 spectres SERS issus de ce clustering. Les spectres 8a et 8b ont quatre pics dans la région 1150 -1350 cm^{-1}. Pour le spectre 8a), les pics à 1190 cm^{-1} et 1243 cm^{-1} peuvent être assignés à des vibration de la fonction SO_3H d'un acide sulfonique mais aussi à des liaisons C-N dans des amines aromatiques. Le pic à 1462 cm^{-1} peut venir d'une fonction CH_2 ou CH_3 dans des composés aliphatiques. Le pic à 1500 cm^{-1} peut être une vibration d'une liaison N-H dans une amide secondaire mais aussi une vibration d'un cycle benzène dans des composés aromatiques. Le pic à 776 cm^{-1} peut être assigné à une amine primaire. Parmi les plus intenses du spectre 8b), nous retrouvons un pic à 1063 cm^{-1} pouvant être caractéristique d'une amine primaire aliphatique mais aussi d'un acide sulfonique. Le pic à 1260 cm^{-1} peut venir d'une fonction phosphate mais aussi amine aromatique. Le pic à 1328 cm^{-1} est caractéristique d'une fonction carboxyle tandis que le pic à 1489 cm^{-1} peut être dû à un amide secondaire ou à un cycle benzène. Le spectre représenté en 8c) a cinq pics caractéristiques des acides carboxyliques dont 4 peuvent être associés à des modes de vibration du groupe carboxyle (605 cm^{-1}, 662 cm^{-1}, 1335 cm^{-1} et 1563 cm^{-1}) tandis que le dernier (1407 cm^{-1}) peut être associé à la liaison O-H dans la liaison carboxyle. Les liaisons en 1133, 1211 cm^{-1} peuvent être des vibrations d'une fonction amine.

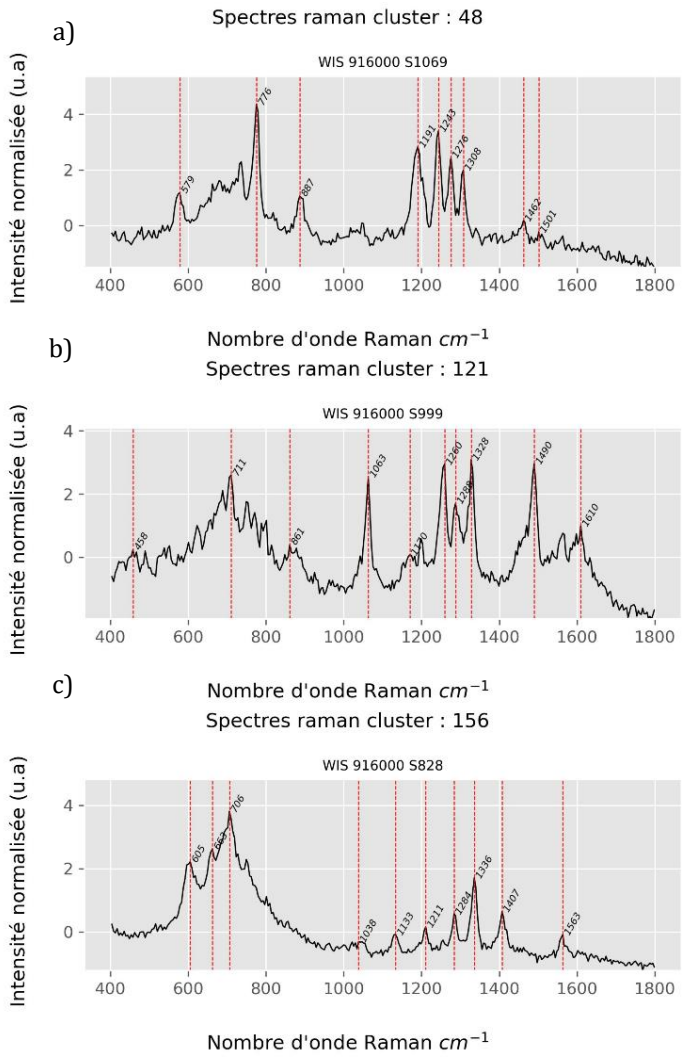


Figure 8 Spectres SERS représentatifs de le partie organique hydrosoluble de WIS 91600

Bien que nous puissions détecter des pics caractéristiques de liaisons chimiques présentes au sein de composés organiques, il est difficile de faire une identification même partielle de molécules précises. Dès lors, nous allons essayer de nous pencher sur la détection d'un composé en particulier dans ces météorites en utilisant notre catalogue.

3 Recherche de glycine dans les météorites

Nous avons vu au chapitre IV une méthode algorithmique permettant de séparer les spectres issus d'une solution contenant deux analytes mélangés. En s'inspirant de cette méthode, nous empilons au sein d'une même DataFrame (pile de spectres) les spectres acquis avec la solution inconnue issue de la météorite et ceux acquis avec une solution « pure » d'un analyte dont on veut chercher la trace dans

la phase hydrosoluble de la météorite. Nous avons réalisé cette expérience en recherchant la glycine. Le clustering hiérarchique de corrélation permet alors de créer des clusters dans lesquels sont présents des spectres issus de la solution contenant la glycine et des spectres issus de l'extrait de météorite. Ce type de cluster va permettre d'identifier des spectres de l'extrait organique de la météorite ayant des similitudes fortes avec des spectres de la glycine.

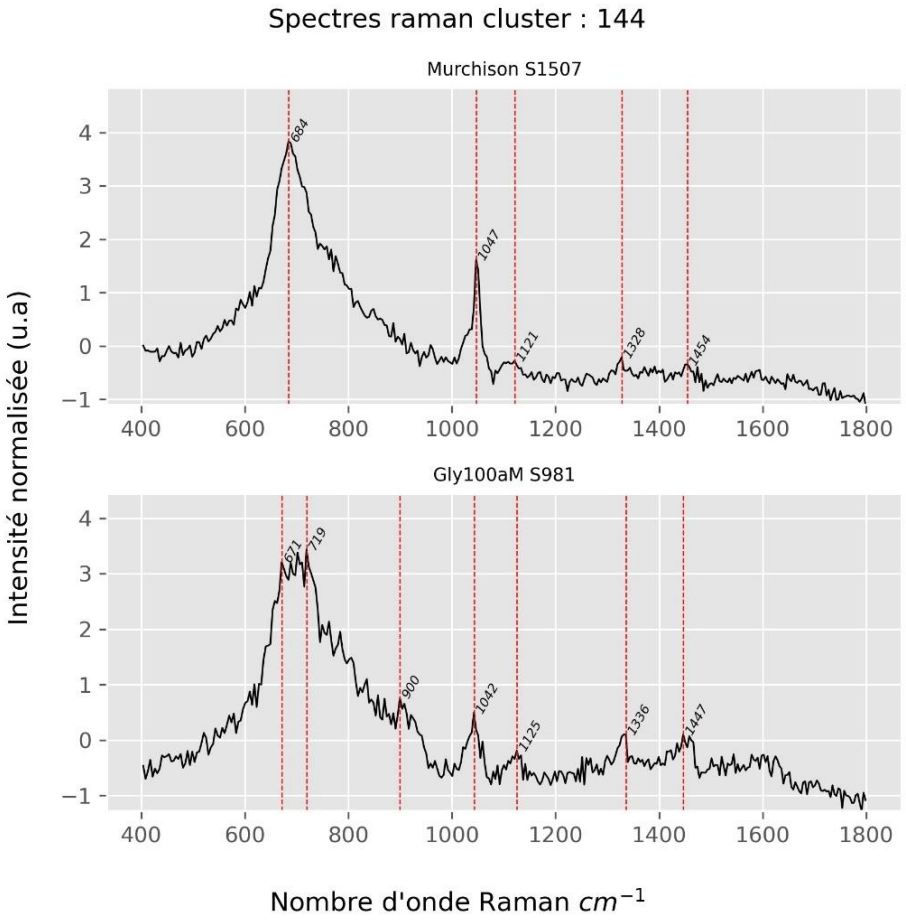


Figure 9 Deux spectres SERS issus d'un Cluster (n°144) contenant des spectres de Murchison et des spectres issus d'une solution « pure » de Glycine à la concentration nominale de 100 aM/L.

La figure 9 représente deux spectres représentatifs issus du clustering de corrélation hiérarchique. Le premier provient du dépôt laissé par l'évaporation de la phase hydrosoluble de Murchison et le second du dépôt laissé par l'évaporation de la solution de glycine diluée dans de l'eau DI à une concentration nominale de 100 aM.

La figure 10 récapitule la position des pics et leur assignation possible pour les deux spectres.

Murchison	Glycine	Assignation possible
684	671	$\delta(COO^-)$, ν(C–C)
	719	
	900	$\gamma(COO^-)$, $\rho(CH_2)$
1047	1042	ν(C-N)
1125	1121	tCH2, ρNH3
1328	1336	$\omega(CH_2)$
1454	1447	$\delta(CH_2)$, $\nu_{as}(COO^-)$

Figure 10 Liste des pics (décalage fréquentiel en cm^{-1}) détectés automatiquement au sein des spectres montrés en figure 9 et leur assignation possible. Les pics Raman sont assignés à des liaisons de la Glycine. La nomenclature est donnée au chapitre V.

Nous retrouvons 5 pics dans le spectre de Murchison qu'il est possible d'assigner à des vibrations de la glycine – notamment le pic en 1328 cm^{-1} et 1454 cm^{-1} qui sont assignés à la fonction -CH_2 pour le premier et à la fonction carboxyle ou -CH_2 pour le second.

L'expérience a été réitérée mais cette fois-ci avec la météorite WIS91600. La figure 11 représente deux spectres appartenant à un même cluster regroupant des spectres issus de l'extrait organique de météorite et des spectres issus de la solution « pure » de glycine. Le premier (Figure 11a)) est un spectre de la météorite WIS91600 tandis que le second est un spectre de glycine. La liste des pics de ces deux spectres est donnée dans la figure 12 avec leurs assignations possibles. Le spectre de la météorite présente six pics que l'on peut assigner à des liaisons de la glycine. On peut notamment observer un pic intense en 667 cm^{-1} pouvant être assimilé à une liaison C-C ou une liaison du groupe carboxyle. Les liaisons en 934 et 1587 cm^{-1} confortent la détection, la première pouvant venir du -CH_2 ou de la fonction carboxyle tandis que la seconde est assignée à la fonction amine.

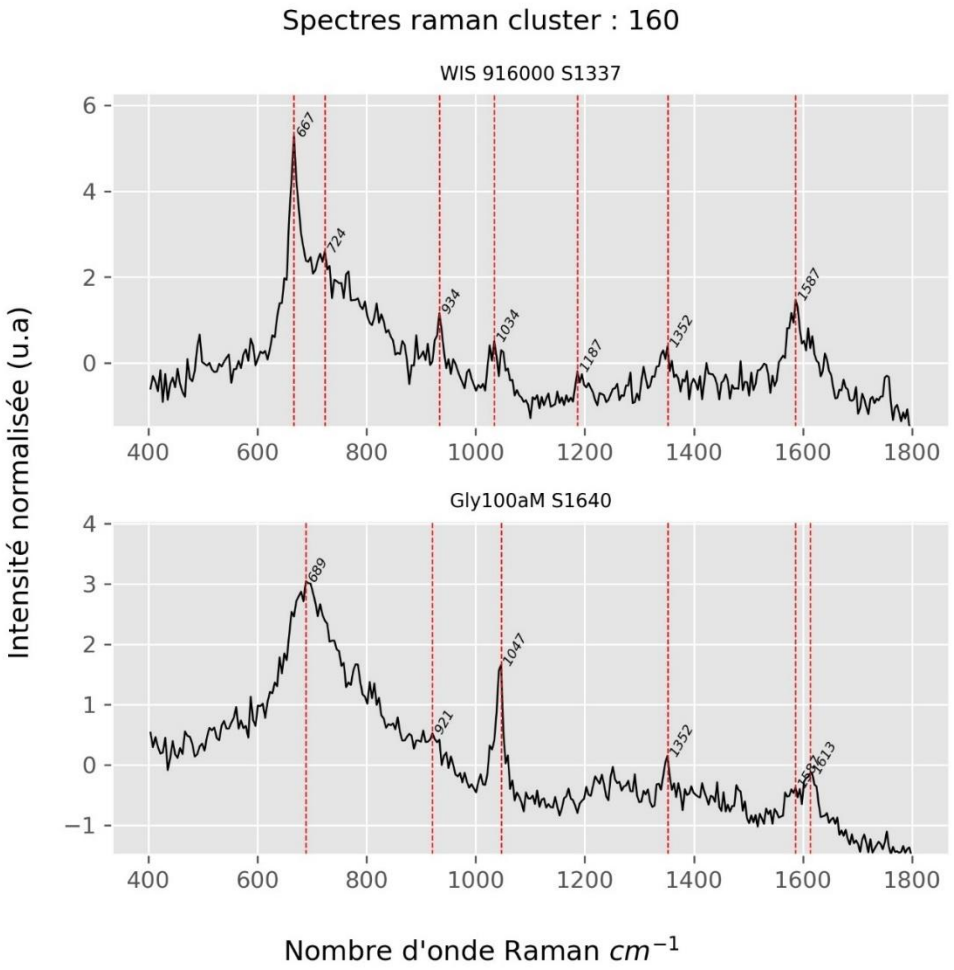


Figure 11 Deux spectres SERS issus d'un Cluster (n°160) contenant des spectres de WIS 91600 et des spectres issus d'une solution « pure » de Glycine à la concentration nominale de 100 aM/L.

WIS 91600	**Glycine**	**Assignation possible**
667	689	δ(COO^-), ν(C–C)
724		
934	921	γ(COO^-), ρ(CH_2)
1034	1047	ν(C-N)
1187		
1352	1352	
1587	1587	$\delta_s(NH_3^+)$
	1613	$\delta_{as}(NH_3^+)$

Figure 12 Liste des pics (décalage fréquentiel en cm^{-1}) détectés automatiquement au sein des spectres montrés en figure 11 et leurs assignations possibles. Les pics Raman sont assignés à des liaisons de la Glycine. La nomenclature est donnée au chapitre V.

Discussion sur l'analyse SERS d'extraits organiques de météorites

Les parties solubles des météorites de Murchison et WIS960000 ont été évaporées sur les dispositifs SH-SERS. Nous avons vu que le dépôt résultant de l'évaporation de ces parties organiques est centré sur le piédestal avec une conformation 3D. Avec ce genre de dépôts, l'analyse SERS n'est pas possible dans la mesure où les analytes sondés sont en amas volumineux qui masquent les antennes exaltatrices du champ électro-magnétique. Il s'agit là d'une limite à la méthode. En effet, le fait de vouloir tout concentrer dans un espace le plus petit possible entraîne la formation de dépôts épais qui ne peuvent donc pas être sondés en SERS. Aussi, le protocole mis en place dans une telle situation consiste à diluer la solution par un facteur déterminé empiriquement. Par empiriquement, on entend faire l'évaporation en diluant d'un facteur 10, 100, 1000 etc. et faire la cartographie de ces échantillons avec les paramètres d'acquisition que nous avons définis précédemment. Lorsque la solution n'est pas suffisamment diluée, nous n'obtenons que très peu de spectres informatifs. Il existe cependant une dilution optimale qui permet de sonder les antennes plasmoniques et les analytes attenants. L'avantage d'utiliser une méthode de dilution avec une eau ultra pure est la facilité de ladite méthode. De fait, il est tout à fait possible de concevoir une puce microfluidique spatialisable permettant de préparer l'échantillon avant analyse, mais il est nécessaire d'emporter l'eau servant à la dilution. Cependant, cette méthode palliative au trop riche contenu de solutions complexes entraine de fait un inconvénient majeur : s'il n'y a que très peu de molécules d'intérêt dans l'échantillon mère, alors il est possible que sous l'effet de cette dilution on puisse passer à côté, c'est-à-dire n'en récupérer aucune dans la microgoutte finale de 6 µL. Il est malgré tout possible d'augmenter les probabilités de détection en multiplexant le nombre d'expériences d'un nombre égal à ce coefficient de dilution.

Par ailleurs, nous démontrons de nouveau au travers de ce chapitre final, les capacités de concentration de nos dispositifs. Pour des applications dont les analytes sont précieux – ce qui est le cas du spatial – pouvoir n'utiliser qu'une infime fraction de la solution de départ pour pouvoir faire l'analyse nous semble être un avantage par rapport à d'autres méthodes d'analyse plus gourmandes en quantité de matière initiale.

L'analyse SERS des parties solubles dans l'eau des météorites Murchison et WIS960000 est une nouveauté. Deux méthodes d'analyse des spectres sont proposées après leur sélection par clustering de corrélation hiérarchique. La première peut être qualifiée d'analyse directe des spectres ; elle repose sur l'expertise spectroscopique de l'expérimentateur. En identifiant les pics à des liaisons chimiques, nous pouvons obtenir une connaissance de l'élément chimique ayant émis le signal. Cette connaissance ne peut toutefois être que parcellaire : une liaison n'est qu'une partie d'un système plus complexe. Ainsi, un même pic Raman peut être attribué à plusieurs liaisons. Dès lors, nous ne pouvons pas identifier les composés moléculaires avec certitude. Dans l'analyse que nous avons faite des pics pour les spectres de Murchison et de WIS91600 représentés en figures 8 et 9, des fonctions chimiques semblent sortir du lot, notamment des fonctions amides, amines, carboxyles, sulfoniques. L'analyse des spectres SERS réalisée de cette manière permet de conforter la présence de molécules organiques dans une région spectrale d'intérêt donné pour l'exobiologie mais elle conduit à des difficultés pour l'identification précise d'une molécule donnée. Nous avons donc proposé une seconde méthode qui met en lumière tout l'intérêt d'avoir réalisé au préalable un catalogue SERS des molécules potentiellement intéressantes pour l'exobiologie.

Cette seconde méthode de détection peut être qualifiée d'indirecte : il s'agit de comparer les spectres résultant de l'analyse du dépôt laissé par l'évaporation de la partie hydrosoluble des

météorites à des spectres de référence. En utilisant le clustering de corrélation hiérarchique développé au chapitre IV sur un Dataframe compilant les expériences des météorites, de la glycine ou de toute autre molécule cible et de l'eau ultrapure, il est possible de trouver des clusters comprenant des spectres des météorites et des spectres de la cible recherchée. Pour illustrer cette méthode nous avons ciblé la glycine. Les spectres issus de deux météorites différentes présentés dans ce chapitre et issus de notre traitement de sélection présentent plusieurs pics en commun avec la glycine, qui peuvent être assignés à des vibrations de celle-ci. Nous pouvons dès lors avancer que nous avons détecté des composés ayant des similitudes avec la glycine dans ces météorites, potentiellement un acide aminé donc. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où nous savons, par la littérature, que des acides aminés sont présents dans ces chondrites[25] ; mais il a pour vertu de démontrer l'applicabilité de notre méthodologie et l'importance de construire une base de données de spectres SERS.

Ce chapitre est l'aboutissement de cette thèse. En effet, il regroupe tous les éléments que nous avons vus dans les chapitres précédents pour les mettre en lumière sur un exemple concret d'exobiologie : l'étude de météorites.

Bibliographie

1. Botta, O. & Bada, J. L. Extraterrestrial Organic Compounds in Meteorites. *Surveys in Geophysics* **23**, 411–467 (2002).
2. Glossary | IMO. https://www.imo.net/resources/glossary/.
3. Sephton, M. A. Organic compounds in carbonaceous meteorites. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 292–311 (2002).
4. Sears, D. W. G. & Dodd, R. T. *Overview and classification of meteorites. Meteorites and the Early Solar System* 3–31 (1988).
5. Bischoff, A. Meteorite classification and the definition of new chondrite classes as a result of successful meteorite search in hot and cold deserts. *Planetary and Space Science* **49**, 769–776 (2001).
6. Soulié, C. Formation des chondres et relation avec leurs auréoles de matrice à grains fins. (Université de Lorraine, 2014).
7. Mason, B. The carbonaceous chondrites. *Space Sci Rev* **1**, 621–646 (1963).
8. Clayton, R. N. & Mayeda, T. K. The oxygen isotope record in Murchison and other carbonaceous chondrites. *Earth and Planetary Science Letters* **67**, 151–161 (1984).
9. Fuchs, L. H., Olsen, E. & Jensen, K. J. Mineralogy, Mineral-Chemistry, and Composition of the Murchison (C2) Meteorite. (1973).
10. Oró, J., Gibert, J., Lichtenstein, H., Wikstrom, S. & Flory, D. A. Amino-acids, Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in the Murchison Meteorite. *Nature* **230**, 105–106 (1971).
11. Becker, L., Poreda, R. J. & Bunch, T. E. Fullerenes: An extraterrestrial carbon carrier phase for noble gases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2979–2983 (2000).
12. Stoks, P. G. & Schwartz, A. W. Basic nitrogen-heterocyclic compounds in the Murchison meteorite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **46**, 309–315 (1982).

13. Cooper, G. *et al.* Carbonaceous meteorites as a source of sugar-related organic compounds for the early Earth. *Nature* **414**, 879–883 (2001).
14. Pizzarello, S. Hydrogen Cyanide in the Murchison Meteorite. *The Astrophysical Journal* **754**, L27 (2012).
15. Ponnamperuma, C. Organic compounds in the Murchison meteorite. *Ann N Y Acad Sci* **194**, 56–70 (1972).
16. Pizzarello, S. The chemistry that preceded life's origin: a study guide from meteorites. *Chem Biodivers* **4**, 680–693 (2007).
17. Pizzarello, S. & Shock, E. The Organic Composition of Carbonaceous Meteorites: The Evolutionary Story Ahead of Biochemistry. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002105 (2010).
18. Yabuta, H., Alexander, C. M. O., Fogel, M. L., Kilcoyne, A. L. D. & Cody, G. D. A molecular and isotopic study of the macromolecular organic matter of the ungrouped C2 WIS 91600 and its relationship to Tagish Lake and PCA 91008. *Meteoritics & Planetary Science* **45**, 1446–1460 (2010).
19. Smith, K. E., Callahan, M. P., Gerakines, P. A., Dworkin, J. P. & House, C. H. Investigation of pyridine carboxylic acids in CM2 carbonaceous chondrites: Potential precursor molecules for ancient coenzymes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **136**, 1–12 (2014).
20. Amri, C. E., Maurel, M.-C., Sagon, G. & Baron, M.-H. The micro-distribution of carbonaceous matter in the Murchison meteorite as investigated by Raman imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **61**, 2049–2056 (2005).
21. Wopenka, B., Xu, Y. C., Zinner, E. & Amari, S. Murchison presolar carbon grains of different density fractions: A Raman spectroscopic perspective. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **106**, 463–489 (2013).
22. Chan, Q. H. S., Zolensky, M. E., Bodnar, R. J., Farley, C. & Cheung, J. C. H. Investigation of organo-carbonate associations in carbonaceous chondrites by Raman spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **201**, 392–409 (2017).

23. Ruf, A. *et al.* Previously unknown class of metalorganic compounds revealed in meteorites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 2819–2824 (2017).
24. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, 3rd Edition | Wiley. *Wiley.com* https://www.wiley.com/en-us/Infrared+and+Raman+Characteristic+Group+Frequencies%3A+Tables+and+Charts%2C+3rd+Edition-p-9780470093078.
25. Cronin, J. R. & Moore, C. B. Amino Acid Analyses of the Murchison, Murray, and Allende Carbonaceous Chondrites. *Science* **172**, 1327–1329 (1971).

Conclusion générale

La thèse intitulée « Méthode d'analyse moléculaire à l'aide d'un dispositif combinant une surface superhydrophobe et la spectroscopie Raman exaltée pour des applications en exobiologie » s'inscrit dans le champ disciplinaire de l'exobiologie. Elle est avant tout une contribution technologique et méthodologique à ce domaine et plus particulièrement en ce qui concerne les disciplines se questionnant sur les modalités d'apparition de la vie sur Terre et dans l'Univers. Pour conclure nous allons donc retraverser les six chapitres pour évaluer l'apport de cette thèse dans ce domaine particulier.

La question « qu'est-ce que la vie ? » a tout d'abord était abordée d'un point de vue conceptuel, presque philosophique. Aucune définition ne permet de déterminer ce qu'elle est de manière complète et sans ambiguïté ou flou dans les termes choisis. Cependant la littérature du domaine s'accorde à penser que toute forme de processus vivant, présent ou passé laisse au sein de son environnement matériel des traces spécifiques. Si ces traces peuvent être indirectes – présence de CO_2 dans l'atmosphère par exemple – nous avons plutôt axé notre recherche sur les traces laissées par le vivant sous forme biomoléculaire. Plusieurs techniques sont à l'étude dans le domaine spatial pour détecter ces biomolécules à des niveaux infinitésimaux (sub femto-molaire). Parmi elles, la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) nous semble prometteuse en ce que le domaine du spatial a déjà une bonne connaissance de la spectroscopie Raman conventionnelle et déjà des pratiques instrumentales dédiées. L'hypothèse que nous formulons dans ce travail de recherche est que le couplage d'une surface SERS et d'une surface superhydrophobe permet d'imaginer un système de biodétection ouvert à tous types de traces biomoléculaires et capables d'atteindre de telles limites de détection.

Un développement technologique utilisant les procédés conventionnels de la microélectronique a ainsi été développé ab-initio afin de concevoir un dispositif superhydrophobe dit hiérarchique (c'est-à-dire présentant deux niveaux de structuration de surface, l'un à l'échelle micrométrique, l'autre à l'échelle nanométrique). Cette imbrication topographique permet de concentrer localement la totalité des analytes contenus dans un micro-volume de solution (6 µL) sur une zone dédiée de 80 µm de diamètre appelée le piédestal analytique couvrant une surface typique de 5000 μm^2 environ. Cette surface analytique est recouverte de nano-piliers de silicium sur lesquels une couche d'argent est déposée et par fragmentation spontanée du film mince métallique, les nano-piliers se trouvent décorés de nanoparticules constituées d'un métal noble. Ce sont ces structures dites plasmoniques qui exaltent le signal Raman qui permettra au final de détecter les composés faiblement concentrés initialement présents dans la solution, puis acheminés lors de l'évaporation sur le piédestal. Nous avons conçu cette surface pour qu'elle soit à la fois fiable, robuste, productible en série et polyvalente avec des résolutions de fabrication non critiques. Si les deux briques élémentaires composant ce développement technologique (surfaces Superhydrophobes hiérarchiques, et nano-antennes métalliques sur des nano-piliers de silicium) ne sont pas elles-mêmes des innovations majeures, leur intégration dans un dispositif unique constitue en revanche une nouveauté.

Les deux aspects de la surface ont été caractérisés indépendamment l'un de l'autre. La surface superhydrophobe permet de concentrer précisément sur le piédestal central les analytes tandis que les nano-antennes qui associent une densité de points chauds élevée et une résonance plasmonique large bande permettent d'exalter le signal Raman. Ces deux aspects ont été étudiés notamment en utilisant une molécule utilisée dans la communauté SERS, la rhodamine B. La cartographie totale du piédestal en micro-Raman a démontré son intérêt : elle aboutit à la détection de cette molécule à une concentration de l'ordre de l'atto-molaire. Cependant, cela nous a conduit à nous interroger sur le SERS et plus particulièrement sur le phénomène d'intermittence associé à cette technique qui complexifie grandement l'analyse des données.

Une méthode algorithmique de traitement des données a donc été développée afin de permettre à l'expérimentateur d'obtenir une information fiable. Cette méthode repose à la fois sur la sélection de spectres contenant de l'information – en se basant sur la détection des pics par transformée en ondelettes – et sur un clustering de corrélation hiérarchique modifié. La corrélation ne s'effectue pas sur les données brutes mais sur des spectres modifiés dans lesquels seule l'information sur la position des pics est conservée. Aucune information n'est attribuée dans cette méthode à l'intensité des pics, ce choix nous permet de nous affranchir de la grande hétérogénéité des facteurs d'exaltation communément reportée dans le cas de nanoparticules exaltatrices désordonnées. Notre méthode permet de corréler les spectres uniquement sur la position des pics. En empilant les spectres acquis à différentes concentrations avec les spectres acquis lors d'une évaporation d'une goutte contrôle contenant le solvant utilisé pour les dilutions, cette méthode permet de ne sélectionner que les spectres significativement différents de ceux issus de l'expérience contrôle et de regrouper les spectres par similarités de position des pics. Il a été mis en évidence que le nombre de clusters est directement relié à la concentration de la solution analysée, et ce dans une gamme bien spécifique. Dès lors cette méthode ouvre la voie à l'utilisation du SERS comme méthode analytique, ce qui constitue, à notre avis, un apport majeur dans le domaine. Une méthode de séparation des spectres dans une solution complexe par comparaison avec des spectres de référence a aussi été présentée.

Dans la spectroscopie Raman exaltée de surface, c'est la réponse d'un système composée de la molécule, d'une surface exaltatrice et du laser qui est interrogée. Aussi, cette méthode de détection est dépendante de la surface utilisée. Bien connaître la surface développée est un prérequis nécessaire mais non suffisant pour analyser des solutions complexes. La réponse que nous proposons vis-à-vis de cette problématique est la création d'un catalogue de spectres SERS, obtenus sur nos propres évaporateurs pour des molécules de référence sélectionnées pour leur intérêt pour l'exobiologie, et qui servira de point de comparaison pour analyser des solutions complexes inconnues.

Finalement, les aspects technologiques et méthodologiques développés dans cette thèse ont été mis en pratique pour analyser des objets propres au champ du spatial : des météorites (Murchison et Wisconsin Range 91600) et plus particulièrement la phase hydrosoluble de celles-ci. L'étude de leur phase hydrosoluble a permis de comprendre les avantages et les limites de la technologie développée. Si le SERS a pour avantage la facilité d'utilisation, aucun traitement de l'échantillon n'étant nécessaire en amont de l'expérimentation, le couplage de celui-ci avec une surface superhydrophobe le rend plus complexe à manier. En effet, l'efficacité du concentrateur est à la fois une force et une faiblesse : lorsque l'échantillon à analyser est riche en molécules, ce qui est souvent le cas pour des solutions complexes, alors à la fin de l'évaporation, le piédestal devient le support d'un cristal macroscopique 3D. Cette observation s'est faite avec différentes eaux prélevées dans la nature (rivière, source minérale, neige, mer profonde), avec des échantillons de laboratoire mais aussi avec les phases hydrosolubles des météorites. Pour pallier ce problème, nous proposons une méthode basée sur la dilution de la solution à analyser en utilisant de l'eau ultrapure. Cette méthode a l'avantage de la simplicité mais comme inconvénient d'être non sélective : les composés sont tous dilués d'un même facteur. Dès lors, une molécule infinitésimalement présente pourrait ne pas se retrouver dans la solution à analyser. Après dilution, des spectres caractéristiques des phases hydrosolubles des deux météorites ont été acquis. Pour chacune des deux météorites, un spectre évocateur de la glycine ou plus généralement d'un composé de type acide aminé a ensuite pu être présenté, et ce en comparant ces spectres avec les spectres de référence de cette molécule issue de notre catalogue.

Pour apprécier ce travail, il convient de regarder les objectifs initiaux ; le point de départ ainsi que celui d'arrivée. L'objectif principal de cette thèse résidait dans l'étude et la conception d'un capteur sans a priori permettant de détecter des biomolécules à des concentrations sub-femtomolaires. Préalablement, un stage de master I avait permis de mettre en évidence l'intérêt de coupler surface

superhydrophobe et spectroscopie SERS. À l'heure où nous écrivons ces lignes, un dispositif SH-SERS permettant la détection de composés aux concentrations visées ainsi qu'une méthode de travail ont été conçus, fabriqués et validés. En cela, les objectifs initiaux sont atteints.

Bien que les objectifs nous semblent remplis, le chemin à parcourir avant d'avoir un dispositif intégrable dans une expédition d'exploration planétaire est encore long. Ainsi, la continuité de ce travail sera terrestre et passera nécessairement par l'étude à la fois d'éléments venus de l'espace mais aussi des régions du globe où les conditions climatiques sont les plus extrêmes, tel l'Antarctique ou le désert de l'Atacama. Des développements sont déjà à l'étude pour intégrer le surface SH-SERS dans un dispositif de mesure portable. Celui-ci intégrera un spectromètre confocal Raman miniature ainsi qu'un distributeur de gouttes et un étage microfluidique de dilution des échantillons.

La méthode de développement du dispositif sous forme de briques technologiques permet de les utiliser indépendamment les unes des autres, ce qui, par conséquent, augmente les possibles applications, et notamment hors champ de l'exobiologie. Nous pouvons par exemple citer une application relative au champ de la santé ou encore de l'environnement. Dans la première application, c'est la détection d'ARN viral sans PCR qui est visée et ce en utilisant la capacité de concentration de la surface superhydrophobe. La seconde quant à elle cherche à détecter des perturbateurs endocriniens dans l'environnement.

Enfin, d'autres développements technologiques pourront être envisagés, notamment l'utilisation d'aluminium en lieu et place de l'argent. Les premières études de la littérature nous montrent que ce matériau peut être employé pour faire du SERS en excitant la surface dans l'Ultra-Violet. Or, le spectromètre SHERLOC embarqué dans Perseverance pour la mission Mars 2020 fonctionne dans cette gamme de longueurs d'onde. Ainsi, la polyvalence de notre dispositif nous permet de suivre les avancés instrumentales des astrophysiciens.

Ce travail de thèse a fait pour l'instant l'objet d'une publication scientifique dans le journal Langmuir et de deux interventions orales dans des congrès internationaux. D'autres publications sont à venir.