Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne

Mention Sciences, Spécialité Chimie-Physique

Présentée par Sébastien REYMOND-LARUINAZ

Biomolécules et systèmes nanostructurés : Caractérisation par spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS)

Soutenue le 16 mai 2014

Rapporteurs :

Mme Sophie LECOMTE	*Directrice de recherches CNRS, Université de Bordeaux*
M. Alain MERMET	*Professeur, Université Claude Bernard, Lyon*

Examinateurs :

M. Alain DEREUX	*Professeur, Université de Bourgogne*
M. Marc LAMY DE LA CHAPELLE	*Professeur, Université Paris 13*

Directrice de thèse :

Mme Maria del Carmen MARCO DE LUCAS	*Professeur, Université de Bourgogne*

Remerciements



Cairn de la Grande Lauzière.

Un cairn est un tas de pierres créé par l'homme que l'on retrouve en montagne et dans les lieux isolés à travers le Monde. Il sert de point de repère pour le voyageur, balise le chemin, annonce le passage d'un col.

L'usage pour le voyageur qui passe à proximité est de ramasser une pierre et de l'ajouter à l'édifice. Ainsi il participe à la perpétuation du cairn et aide ceux qui le suivront à avancer dans le droit chemin. Mais au-delà, en ajoutant une pierre trouvée sur le chemin, il atteste de son passage, de sa réussite à être arrivé jusque là. Il exprime également son respect envers ceux qui l'on précédé en poursuivant leur œuvreet envers ceux qui passeront après lui et qui à leur tour apporteront leur pierre. Enfin, par ce geste il démontre sa gratitude vis à vis de la montagne qui s'est montrée dure, mais pleine de découvertes.

Une thèse que l'on écrit, c'est comme une pierre ramassée sur le chemin. On l'obtient après un long cheminement et elle ne représente qu'une petite contribution. Mais elle s'inscrit dans la continuité de la progression du savoir et atteste de la réussite du thésard à vaincre sa propre montagne...

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne de l'université de Bourgogne à Dijon. Une thèse, bien entendu, c'est un travail de longue haleine, un défi que l'on se donne à soi-même, mais c'est aussi bien plus qu'un projet scientifique, c'est une formidable aventure humaine créant des relations, des rencontres et de l'amitié. C'est donc avec un grand honneur que j'exprime mes remerciements à tous ceux qui m'ont soutenue tout au long de ces trois années.

Je tiens tout d'abord à remercier M. Gilles Bertrand et M. Alain Dereux pour m'avoir accueilli au sein de l'ICB, ainsi que Mme Sylvie Bourgeois et Bruno Domenichini, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'équipe SIOM (Surfaces et Interfaces d'Oxydes Métalliques).

Ce projet n'aurait pas eu lieu sans le soutien du conseil régional de Bourgogne, via le programme de recherche Nano2Bio.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme Sophie Lecomte et M. Alain Mermet pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour le temps accordé à la lecture et à l'évaluation de ce manuscrit. Je remercie également Alain Dereux pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Mme Maria del Carmen Marco De Lucas pour avoir assuré l'encadrement de cette thèse, pour m'avoir fait confiance, soutenu, encouragé et pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons eu. Je remercie très sincèrement M. Lucien Saviot, qui, s'il n'a pas été officiellement mon co-directeur de thèse, a accompagné mes travaux et l'écriture de ce manuscrit.

Je suis également très reconnaissant envers tous ceux avec qui j'ai travaillé au cours de cette thèse pour leur aide technique et scientifique : Jérémy Margueritat et Hélène Yockell-Lelièvre pour les échanges scientifiques, en particulier pour les synthèses de nanoparticules et leur fonctionnalisation, Antonin Ollagnier, Pierre Bramant, Alexandre Bouhelier, Eric Finot, Laurent Markey et Juan-Miguel Arocas, pour leur aide technique au sein des laboratoires du bâtiment ARCEN et la mise à disposition du matériel de l'équipe. Je remercie Frédéric Herbst pour les analyses par microscopie électronique à balayage, sa disponibilité et sa sympathie et Valérie Potin pour les analyses par microscopie électronique en transmission, le temps qu'elle m'a accordé et son grand professionnalisme. Je remercie également Julien Boudon, Frédéric Bouyer et Mathieu Varache de l'équipe MANAPI pour leur aide et la mise à disposition de leurs moyens techniques. Je remercie Luc Imhoff et Ludovic Avril pour les travaux que nous avons effectués ensemble, Tony Montesin, Steeve Desjardins et à nouveau Luc et Carmen pour les enseignements que j'ai pu réaliser grâce à eux. Enfin je remercie pour leur apport scientifique sur les protéines, Patrick Senet, Camille Loupiac et Régis Gougeon.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres des équipes SIOM, OSNC et MANAPI pour leur sympathie et m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions. Je remercie tout particulièrement Agnès Birot qui a toujours été là pour m'aider avec mes soucis administratifs.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Lamjed avec qui j'ai partagé bien plus qu'un bureau pendant ces 3 ans de thèse, merci pour ton soutien, ton aide, ta bonne humeur, les pauses cafés… Nous sommes arrivés ensemble au laboratoire et cette thèse m'a permis de gagner un ami très cher. A tout ceux avec qui j'ai fait des pauses café et passé du temps au-delà du travail, je voudrais également dire merci car ces moments ont été très importants tout au long de ma thèse. Je pense à Franck, Gilles, Linh, Roy, Oussama, Maaouia, Nawel, Hassib, Ali, Stéphane, Arnaud, Xiaowen, …. Merci aussi à tout les non permanents de l'équipe PAM de l'école Agrosup, Marie, Jean-Luc, Coralie, Fatma, Manal, Adrien, Lucie, Ashish, Nassrédine, Koy, Dat, Bao, Leila, Mia pour leur soutien, leurs conseils et leur bonne humeur qui m'ont été très précieux.

Je voudrais adresser un très grand merci à mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours soutenu dans mes objectifs et dans ce défi que je me suis fixé, en particulier à la fin de la thèse, ainsi qu'à Guillaume, Valérie, Christine et Laurent. Je tiens à remercier également ma belle famille, avec une pensée toute particulière pour Louise.

Pour terminer, je veux remercier de tout mon cœur Emilie. Sans toi, je ne serais pas arrivé jusque là. Tu m'as poussé à aller de l'avant, toujours soutenu, écouté, conseillé, accompagné. Grâce à toi je peux donner le meilleur de moi-même et la réussite de cette thèse peut t'être pour moitié attribuée. Je ne pourrai jamais te remercier assez pour tout ce que tu fais pour moi et pour tout ce que tu représentes à mes yeux.

Sommaire

Introduction 11

CHAPITRE I 17

La diffusion Raman : de l'approche classique à l'exaltation de surface 17

I.1) Principe de la spectrométrie Raman 18

I.1.1-Principe de la diffusion Raman 18

I.1.2-Modes de vibration actifs en Raman pour molécules et solides 23

I.1.3-Vibrations acoustiques dans des nanoparticules 27

I.2) Spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS) 31

I.2.1-Principe de l'effet SERS 31

I.2.1.1-Exaltation du champ local 33

I.2.1.2-Exaltation du rayonnement 38

I.2.1.3-Facteur d'exaltation électromagnétique : l'approximation en E^4 39

I.2.1.4-Exaltation chimique 40

I.2.2-Développement de la spectrométrie SERS 41

I.3) Spectrométrie SERS appliquée à la détection de protéines 44

I.3.1-Composition, structure et propriétés des protéines 45

I.3.2- Caractérisation des protéines par spectrométries IR et Raman 46

I.3.3-Spectrométrie SERS des protéines 49

I.4) Spectrométrie SERS appliquée à l'étude de films minces inorganiques 52

Chapitre II : 56

Matériel et méthodes 56

II.1) Elaboration de substrats pour la spectrométrie SERS 57

II.1.1-Synthèse des nanoparticules d'or et d'argent 57

II.1.2-Caractérisation des nanoparticules d'or synthétisées 60

II.1.3-Fonctionnalisation de substrats 63

II.1.4-Tests des substrats SERS 66

II.2) Synthèses de nanoparticules bio-conjuguées 68

II.3) Elaboration de films minces nanostructurés 72

II.3.1-Dépôts de couches minces nanocomposites TiO_2:Au par pulvérisation cathodique réactive 73

II.3.2-Dépôts de couches ultra-minces de TiO_2 par DLI-ALD sur substrats SERS 75

II.4) Techniques de caractérisation utilisées 79

II.4.1-Spectrométrie Raman 79
II.4.2-Spectrométries d'absorption UV-Visible et FTIR-ATR 81
II.4.3-Microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie électronique en transmission (MET) 82
II.4.4-Diffraction des rayons X (DRX) 83
Chapitre III : 86
Etudes de biomolécules dans des systèmes nanostructurés 86
III.1) Etudes de nanoparticules bio-conjuguées par SERS 87
III.1.1-Structures et morphologies des nanoparticules bio-conjuguées 91
III.1.1.1-Observations par microscopie électronique à balayage. 91
III.1.1.2-Observations par MET et analyse par spectrométrie EELS. 94
III.1.2-Caractérisation des nanoparticules bio-conjuguées Ag:protéine par spectrométries optique et exaltée de surface 98
III.1.2.1-Étude par spectrométrie d'absorption UV-Visible. 98
III.1.2.2-Étude par spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS) 100
III.1.2.3-Etude par spectrométrie FTIR-ATR. 106
III.1.3-Conclusions 108
III.2) Etude des polymorphes de la caféine par SERS 110
III.2.1-Les phases polymorphiques de la caféine 111
III.2.2-Dépôts de caféine sur substrats SERS 114
III.2.3-Etude par spectrométrie SERS 116
III.2.4- Conclusions 120
Chapitre IV : 123
Etudes de films minces nanostructurés : TiO_2 / Au 123
IV.1) Couches minces composites TiO_2:Au 125
IV.1.1- Analyses par spectrométrie Raman 126
IV.1.2- Caractérisation structurale par diffraction des rayons X 136
IV.1.3- Observations par microscopie électronique en transmission 138
IV.1.4- Conclusions 143
IV.2) Analyse de couches ultraminces de TiO_2 par spectrométrie SERS 144
IV.2.1- Observations par microscopie électronique à balayage 144
IV.2.2- Analyses par spectrométrie Raman 149
IV.2.3- Conclusions 155
Conclusion générale et perspectives 157

Bibliographie 162
Valorisation des travaux 175
Table des figures 176
Liste des tableaux 181

Glossaire

BSA : Bovine Serum Albumine-Protéine de type albumine, proche de la HSA (Human Serum Albumine), protéine la plus abondante dans le sérum humain.

DLI-ALD : Direct Liquid Injection-Atomic Layer Deposition. Dépôt par couche atomique.

DRX : Diffraction des Rayons X.

EDX : Energy Dispersive X-ray-Analyse dispersive en énergie

EELS : Electron Energy Loss Spectroscopy-Spectrométrie des pertes d'énergie.

FTIR-ATR : Spectrométrie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier en configuration ATR (Attenuated Total Reflectance).

MEB : Microscopie électronique à Balayage.

MET : Microscopie Electronique en Transmission.

PVD : Physical Vapor Deposition.

SERS : Surface Enhanced Raman Scattering-Exaltation de la diffusion Raman par effet de surface.

SEIRA : Surface Enhanced InfraRed Absorption-Exaltation du spectre d'absorption infrarouge par effet de surface.

Introduction

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe « Surfaces et Interfaces d'Oxydes Métalliques » du Département Nanosciences du Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB). La problématique abordée dans ce travail fait partie des axes de recherche développés au sein du Département Nanoscience dans le cadre du programme PARI SMT 1 Nano2Bio financé par le Conseil Régional de Bourgogne.

Contexte de l'étude

La spectrométrie Raman est une technique optique basée sur le phénomène de diffusion Raman. C'est une technique d'analyse vibrationnelle de la matière, comme la spectrométrie infrarouge, mais les règles de sélection qui déterminent les modes de vibration susceptibles de donner un signal Raman sont différentes de celles associées à l'absorption infrarouge. Les avancées techniques incorporées aux dispositifs Raman dans les dernières décennies ont rendu cette technique accessible à des domaines de recherche et d'applications très variés : physique, chimie, biologie, géologie, …. Cependant, la section efficace de diffusion Raman est très faible, pas seulement par rapport à la diffusion élastique, mais aussi par rapport à des phénomènes de photoluminescence. Ceci rend difficile la détection du signal Raman et limite par exemple le seuil de détection des espèces dans une solution.

Une voie pour surmonter cette difficulté est l'effet SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) mis en évidence par Fleischmann et al. en 1974 [Fleischmann (1974)], puis par Jeanmaire et Van Duyne [Jeanmaire (1977)] et Albrecht and Creighton [Albrecht (1977)]. L'exaltation du signal de diffusion Raman de molécules adsorbées à la surface de nanostructures métalliques de métaux nobles permet d'abaisser leur seuil de détection de plusieurs ordres de grandeur. Depuis les années 70, la mise en œuvre expérimentale de l'effet SERS, sa compréhension théorique et son application à la détection de molécules en solutions extrêmement diluées, ont fait l'objet de nombreuses études. L'énorme développement des nanosciences et des nanotechnologies a ouvert des nouvelles possibilités pour l'élaboration des substrats SERS notamment. Les multiples applications potentielles en biologie et médecine ont aussi stimulé fortement les travaux dans ce domaine.

Objectifs de ce travail

Dans ce travail de thèse nous nous sommes attachés à étudier la structure de systèmes nanostructurés de différentes natures : des biomolécules et des nanostructures inorganiques, par le biais de la spectrométrie Raman exaltée de surface. Le but était d'accéder à des informations sur la structure et les liaisons chimiques présentes dans ces systèmes grâce à une technique d'analyse non destructive, qui permet de travailler dans des conditions adaptées aux molécules biologiques comme par exemple les protéines. Nous avons cherché à obtenir ainsi des informations complémentaires à celles fournies par d'autres techniques comme la microscopie électronique en transmission.

Deux catégories de systèmes ont été étudiées. La première catégorie concerne des molécules d'intérêt biologique, notamment des protéines. La deuxième catégorie porte sur l'étude de systèmes nanostructurés à base de nanoparticules d'or et de dioxyde de titane. Un travail conséquent de développement de synthèse et de préparation d'échantillons a été nécessaire pour la réalisation des études entreprises.

La spectrométrie Raman, technique analytique de choix dans cette thèse, a été déclinée de différentes façons selon les caractéristiques spécifiques de chaque système et les informations recherchées.

La spectrométrie Raman conventionnelle non résonnante nous a permis par exemple d'obtenir des spectres de référence de différentes protéines sous la forme lyophilisée. L'étude de ces mêmes protéines sous la forme de systèmes bio-conjugués constitués par des nanoparticules d'argent entourées par une couche de protéines de quelques nanomètres d'épaisseur a été possible grâce à l'exaltation SERS. Ces systèmes bio-conjugués sont très intéressants car l'interaction protéine-nanoparticule métallique est directe sans aucun lien intermédiaire.

La capacité d'exaltation des substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or a été testée par spectrométrie SERRS (Surface Enhanced Resonance Raman Scattering) en utilisant des solutions très diluées de colorants comme le bleu de méthylène et une excitation résonante à la fois avec le plasmon de surface des nanoparticules et la bande d'absorption de ces colorants.

Ces substrats SERS ont été utilisés pour accéder à l'étude de matériaux sous la forme de films minces voire ultraminces Ainsi une étude préliminaire des dépôts minces de caféine, molécules d'intérêt alimentaire et pharmaceutique a été entreprise.

Le but était d'accéder, grâce à l'effet SERS, à la signature Raman de deux phases polymorphes dans le domaine des basses fréquences (<100 cm^{-1}). D'autre part, nous avons cherché à caractériser grâce à l'effet SERS, des films ultraminces de TiO_2 de quelques nanomètres d'épaisseur déposés par DLI-ALD (Direct Liquid Injection-Atomic Layer Deposition).

Des films minces nanocomposite à base de dioxyde de titane et de nanoparticules d'or, dont l'épaisseur était de quelques centaines de nanomètres, ont également été étudiés. Le but était d'utiliser la spectrométrie Raman dans le domaine des basses fréquences (<100 cm^{-1}) pour étudier la formation des nanoparticules lors d'un traitement de recuit de films contenant une faible concentration d'or dispersée dans une matrice de TiO_2 amorphe. Une excitation résonnante à été utilisée pour privilégier le signal associé aux nanoparticules d'or par rapport à celui de la matrice.

Organisation de ce mémoire

Ce document est composé de quatre parties principales :

- La première partie présente d'abord la spectrométrie Raman conventionnelle avec une approche classique couramment utilisée pour l'interprétation des spectres Raman de molécules et de solides. Le cas particulier de vibrations acoustiques dans des nanoparticules est aussi abordé dans cette partie pour son implication dans les études présentées dans le chapitre quatre. Les mécanismes donnant lieu à l'exaltation du signal Raman par des plasmons de surface, sont présentés ainsi qu'une vision panoramique sur le développement de la spectrométrie SERS. Enfin, l'utilisation de la spectrométrie SERS pour l'étude de protéines et des films utlraminces inorganiques est illustrée par des références bibliographiques.

- La deuxième partie présente d'abord les méthodes d'élaboration de nanoparticules métalliques, la fonctionnalisation de substrats pour l'exaltation SERS et la validation de leur capacité d'exaltation par la détection de colorants. Ensuite, les méthodes de synthèse de nanoparticules d'argent bio-conjuguées par des protéines sont présentées, ainsi que les méthodes d'élaboration de films minces nanocomposites à base de TiO_2 et d'or par pulvérisation cathodique magnétron et des films ultraminces de TiO_2 par ALD (Atomic Layer Deposition). Enfin, dans cette partie sont présentées les techniques de caractérisation utilisées au cours de ce travail.

- L'étude de biomolécules par spectrométrie SERS constitue la troisième partie de ce mémoire. La caractérisation de nanoparticules d'argent bio-conjuguées avec des protéines est le cœur de cette étude. Quatre protéines courantes (BSA, lysozyme, hémoglobine et cytochrome-C), ont été utilisées. L'étude par spectrométrie SERS a cherché à identifier l'état des protéines dans ces systèmes bio-conjuguées. Des observations par microscopie électronique en transmission et des analyses par spectrométrie EELS ont aussi été utilisées pour caractériser les nanoparticules bio-conjuguées synthétisées.

  Ce chapitre présente également les résultats de l'étude préliminaire de dépôts minces de caféine sur des substrats actifs SERS.

- Enfin, le dernier chapitre aborde l'étude de films minces nanostructurés à base d'or et de TiO_2 avec deux orientations très différentes. Dans la première, nous avons étudié les premiers stades de la formation de nanoparticules d'or par le traitement thermique des films de TiO_2 dopés avec une faible concentration d'or. Les modes de vibration associés aux nanoparticules d'or dans le spectre Raman aux basses fréquences ont été utilisés pour cette étude. La résonance plasmon des nanoparticules d'or a permis d'exalter le signal Raman de ces nanoparticules par rapport au signal de la matrice de TiO_2. Dans la deuxième étude, le but était d'obtenir l'exaltation du signal Raman de films ultraminces par effet SERS permettant d'accéder ainsi à la caractérisation structurale de films de quelques nanomètres d'épaisseur. Pour ceci des films ultraminces de TiO_2 ont été déposés par la technique ALD sur des substrats fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or.

CHAPITRE I

La diffusion Raman : de l'approche classique à l'exaltation de surface

I.1) Principe de la spectrométrie Raman

La spectrométrie Raman est une technique optique basée sur le phénomène de diffusion Raman. Ce phénomène fut montré expérimentalement en 1928 par le chercheur indien C. V. Raman [Raman (1928)] qui a obtenu le prix Nobel en 1930 pour ses travaux sur le sujet. C'est, à l'instar de la spectrométrie infrarouge, une technique d'analyse vibrationnelle de la matière.

I.1.1-Principe de la diffusion Raman

Lors de l'interaction d'un faisceau lumineux avec la matière, plusieurs phénomènes peuvent se produire. Une partie du faisceau lumineux est réfléchie, une partie est diffusée et une partie peut être transmise à travers l'échantillon (fig. I.1). Au cours de la propagation dans un milieu dense, différents phénomènes apparaissent : la réfraction, l'absorption, la diffusion, et éventuellement d'autres effets non-linéaires. L'absorption peut induire ensuite une photoluminescence ou des processus de désexcitation non-radiatifs.

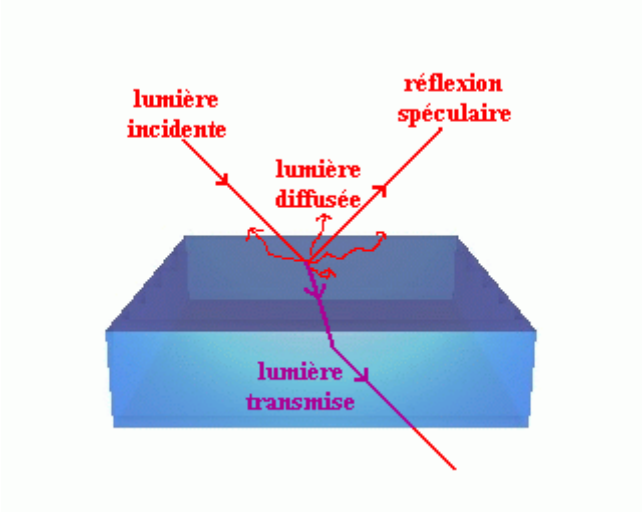


Figure I.1 : Représentation schématique de différents phénomènes produits dans l'interaction d'un faisceau lumineux avec un milieu dense.

La diffusion de la lumière se manifeste par la déviation d'une partie du faisceau lumineux dans des directions multiples. La majorité de la lumière diffusée est de même énergie que la lumière incidente. Ce phénomène de diffusion élastique est nommé diffusion Rayleigh. Cependant, une petite partie de la lumière diffusée (environ un photon sur 10^6) présente un gain ou une perte d'énergie par rapport à la lumière incidente. C'est le phénomène de diffusion Raman. Dans une approche classique, ce phénomène de diffusion inélastique s'explique par la création d'un dipôle induit qui oscille à une fréquence différente de celle de la lumière incidente. En effet, sous l'action d'une onde électromagnétique monochromatique de fréquence ω dont le champ électrique oscille selon :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega t) \tag{I.1}$$

le nuage électronique d'une molécule (ou d'un solide) peut se déformer donnant lieu à une polarisation :

$$\vec{P} = [\alpha]\vec{E} \tag{I.2}$$

$[\alpha]$ étant le tenseur polarisabilité de la molécule (ou du solide), qui représente la capacité du nuage électronique à se déformer sous l'action d'un champ électrique $\vec{E}$.

La polarisabilité est modulée par les mouvements des atomes autour de leur position d'équilibre, c'est-à-dire, par les vibrations de la molécule (ou du réseau atomique du solide). Les vibrations peuvent être représentées par la variation de la coordonnée normalisée, u, du déplacement des atomes par rapport à leur position d'équilibre, u_0, à une fréquence Ω de la forme suivante :

$$u = u_0 \cos(\Omega t) \tag{I.3}$$

Le développement au premier ordre de la polarisabilité en fonction de la coordonnée u donne :

$$[\alpha] = [\alpha_0] + \left[\frac{\partial[\alpha]}{\partial u}\right]_{u=u_0} u \tag{I.4}$$

La combinaison des équations (I.1), (I.2), (I.3) et (I.4) donne :

$$\vec{P} = [\alpha_0]\vec{E}_0 \cos(\omega t) + \left[\frac{\partial[\alpha]}{\partial u}\right]_{u=u_0} u_0 \, \vec{E}_0 \cos(\Omega t)\cos(\omega t) \qquad \text{(I.5)}$$

Or,

$$\cos(\Omega t)\cos(\omega t) = \frac{1}{2}[\cos((\omega - \Omega)t) + \cos((\omega + \Omega)t)] \qquad \text{(I.6)}$$

Donc, l'expression de la polarisation devient :

$$\vec{P} = [\alpha_0]\vec{E}_0 \cos(\omega t) + \frac{1}{2}\left[\frac{\partial[\alpha]}{\partial u}\right]_{u=u_0} u_0 \, \vec{E}_0 [\cos((\omega - \Omega)t) + \cos(\omega + \Omega)t)] \qquad \text{(I.7)}$$

Dans l'équation (I.7), le premier terme est un dipôle qui oscille à une fréquence ω, il donne lieu à la diffusion Rayleigh. L'énergie de la lumière ainsi diffusée est identique à celle de l'onde électromagnétique incidente. Les deux autres termes correspondent à deux dipôles oscillant à des fréquences ω-Ω et ω+Ω. Ils donnent lieu à la diffusion Raman Stokes et Anti-Stokes, respectivement. L'énergie de la lumière ainsi diffusée est décalée par rapport à celle de l'onde incidente d'une valeur égale à l'énergie de la vibration de la molécule.

Selon cette approche, la diffusion Stokes et la diffusion anti-Stokes seraient de même intensité. Cependant expérimentalement l'intensité de la diffusion Stokes est toujours (hors résonance) supérieure à celle de la diffusion anti-Stokes, et le rapport de leurs intensités dépend de la température. Pour expliquer cette différence, il faut analyser le phénomène de diffusion Raman dans une approche semi-classique, dans laquelle la matière est décrite par un modèle quantique, et les champs électromagnétiques de façon classique.

Le diagramme de Jablonski simplifié correspondant aux différents processus de diffusion est représenté sur la Fig. I.2.

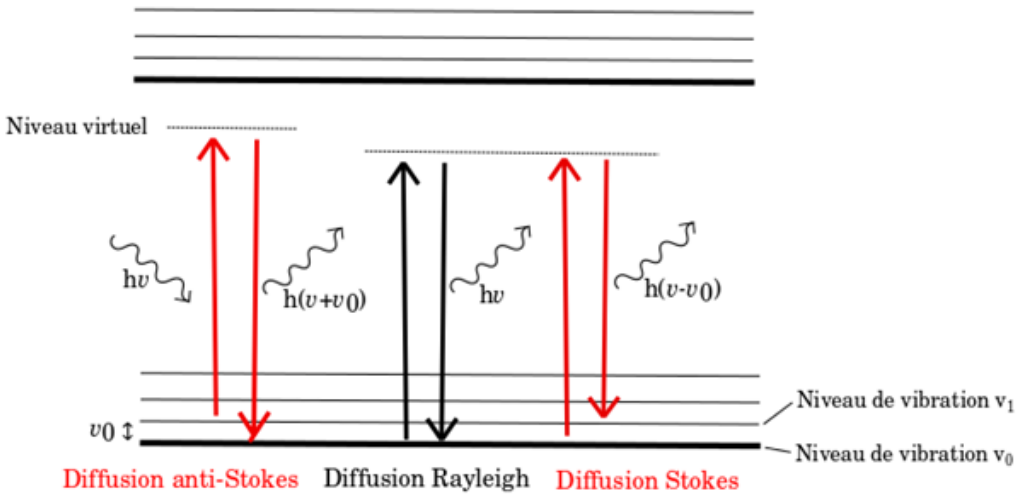


Figure I.2 : Représentation schématique des processus de diffusions Rayleigh et Raman Stokes et anti-Stokes dans une approche semi-classique.

Ainsi, l'excitation du système dans un niveau virtuel d'énergie par absorption d'un photon incident se produit en même temps qu'une désexcitation par émission d'un photon de même énergie dans le cas de la diffusion Rayleigh, et d'énergie différente dans le cas de la diffusion Raman. Dans ce dernier cas, le système va se désexciter vers un niveau d'énergie vibrationnel différent de celui de départ. Pour la diffusion Stokes, l'état final après désexcitation est un niveau vibrationnel plus excité que l'état initial. Pour la diffusion anti-Stokes, le système est au départ dans un niveau vibrationnel excité et l'état final après désexcitation est dans un état moins excité. La différence d'énergie entre le photon incident et le photon diffusé correspond donc à l'énergie d'un niveau de vibration de la molécule (ou du solide).

La probabilité que le système soit initialement dans un niveau vibrationnel excité est toujours plus faible que la probabilité qu'il soit dans le niveau fondamental, mais elle augmente avec la température selon la loi de Boltzmann. En conséquence, hors résonance, la diffusion Raman Stokes est toujours plus intense que la diffusion anti-Stokes, et le rapport de leurs intensités dépend de la température et de la fréquence de la vibration concernée (fig. I.3).

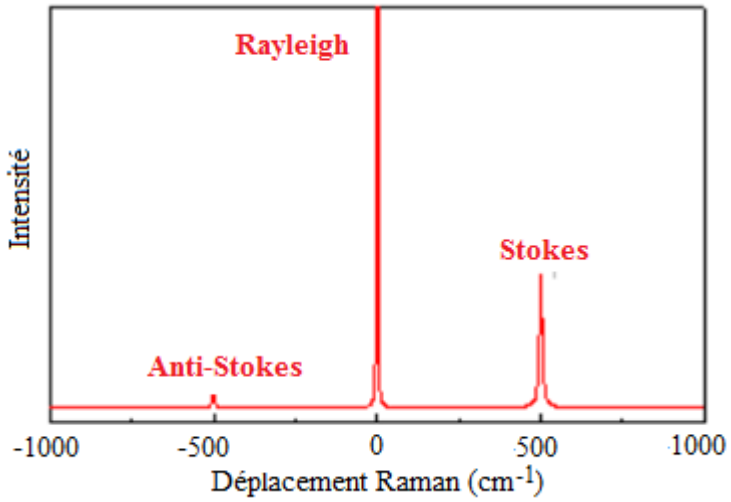


Figure I.3 : Spectre Raman montrant le rapport d'intensité théorique entre un pic Raman Stokes à 500 cm^{-1} et le correspondant pic Anti-Stokes pour une température de 300 K.

La raie Rayleigh sert d'origine pour mesurer les déplacements Raman qui sont définis comme la différence entre le nombre d'onde de la raie Rayleigh et celui de la lumière diffusée. Le déplacement Raman associé à une vibration donnée est donc indépendant de la longueur d'onde du faisceau d'excitation. En pratique, la raie Rayleigh, très intense, est supprimée à l'aide d'un filtre ou d'un monochromateur fortement dispersif, et le plus souvent seule la diffusion Stokes est observée.

Si la raie laser excitatrice coïncide avec une bande d'absorption du système, alors le signal Raman qui en résulte (diffusion Raman résonante) peut être plus intense que pour une excitation non résonante. Cet effet a été largement utilisé dans l'étude de matériaux semi-conducteurs grâce à la possibilité d'une excitation résonante dans le domaine UV-Vis. D'autre part, l'absorption du faisceau excitateur, et aussi d'une partie de la lumière diffusée, par l'échantillon limite fortement la profondeur sondée. La spectrométrie Raman devient ainsi une technique d'analyse de surfaces.

Dans ces conditions de résonance, il y a cependant un risque de photodégradation de l'échantillon si la puissance d'excitation n'est pas suffisamment faible. De plus, suite à l'absorption du faisceau d'excitation, il peut se produire une désexcitation radiative (photoluminescence) gênante pour la détection du signal Raman.

Les molécules chromophores, et les substances colorées en général, sont privilégiées pour l'observation par spectrométrie Raman résonante grâce à une excitation dans le visible ou le proche infrarouge. Les colorants sont ainsi des molécules facilement détectables à de faibles concentrations [Blackie (2008)]. Des solutions extrêmement diluées de colorants tels que la rhodamine (R6G), le cristal violet (CV), le bleu de méthylène (MB), etc. sont souvent utilisées pour étudier l'efficacité des systèmes de détection du signal Raman. Enfin, ces colorants sont aussi utilisés comme marqueurs pour la détection de molécules qui ont une faible section efficace de diffusion Raman.

I.1.2-Modes de vibration actifs en Raman pour molécules et solides

La symétrie de la molécule (ou du solide) impose des règles de sélection qui limitent les modes de vibration susceptibles de donner lieu à un phénomène de diffusion Raman. Cette influence de la symétrie intervient dans l'équation (I.7) par le biais de la dérivée de la polarisabilité par rapport à la coordonnée normale de la vibration, qui doit être non nulle à l'équilibre ($u=u_0$) pour que la vibration puisse donner lieu à la diffusion Raman :

$$\left[\frac{\partial[\alpha]}{\partial u}\right]_{u=u_0} \neq 0 \qquad \text{(I.8)}$$

Une façon simple d'évaluer cette condition dans le cas d'une molécule est d'analyser la variation du volume moléculaire au cours de la vibration autour de la position d'équilibre. Ainsi, par exemple, la vibration d'élongation d'une molécule diatomique est active en Raman. De même, la vibration d'élongation symétrique du CO_2 est active en Raman, tandis que l'élongation asymétrique ne l'est pas.

Les modes de vibration dans un solide cristallin sont très nombreux, car ils impliquent un très grands nombre d'atomes. Ils peuvent être classés en deux catégories : modes acoustiques et modes optiques. Les modes acoustiques sont ceux dont la fréquence s'annule au centre de la zone de Brillouin. Les modes optiques sont les autres.

Les modes de vibration acoustiques correspondent à des ondes sonores, c'est-à-dire, à des vibrations du réseau cristallin dans lesquelles les atomes du motif de la structure cristalline se déplacent tous dans un même sens. Les phonons acoustiques peuvent être longitudinaux (LA), si la direction de vibration des atomes est parallèle à la direction de propagation de l'onde, transversaux (TA) si la direction de vibration des atomes est perpendiculaire à la direction de propagation de l'onde, ou aucun des deux.

Contrairement aux modes optiques, la dérivée au centre de la zone de Brillouin de la fréquence des phonons acoustiques en fonction du vecteur d'onde q est non nulle. C'est la vitesse du son. (Fig. I.4).

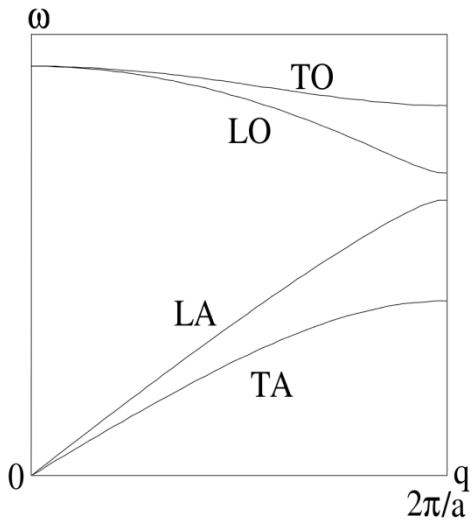


Figure I.4 : Représentation schématique des courbes de dispersion de phonons dans un cristal pour des vibrations se propageant selon la direction [100].

$$\vec{K}_{incident} = \vec{K}_{diffusé} + \vec{q} \qquad \text{(I.9)}$$

La conservation de la quantité de mouvement lors de la diffusion Raman de la lumière, implique une valeur du vecteur d'onde du phonon $q \leq 2\pi/\lambda$ (équation (1.9)), avec λ la longueur d'onde des photons incidents de l'ordre de 400-800 nm pour une excitation dans le visible. La valeur du vecteur q est très petite par rapport aux dimensions de la zone de Brillouin, qui est de l'ordre de π/a, avec a le paramètre de maille de l'ordre de quelques Angströms. En conséquence, la diffusion Raman de la lumière par un solide cristallin concerne uniquement les phonons au centre de la zone de Brillouin.

La contribution des modes acoustiques aux spectres Raman est trop proche de la raie Rayleigh pour pouvoir être résolue. Ces modes sont étudiés avec des dispositifs expérimentaux adaptés à ce domaine (spectrométrie Brillouin).

Les phonons optiques sont présents dans les solides qui comportent plusieurs atomes dans le motif qui caractérise avec la maille, la structure cristalline. Ils sont nommés « optiques » parce que dans les cristaux ioniques (comme par exemple le chlorure de sodium) ils peuvent être excités par des ondes lumineuses (dans le domaine de l'infrarouge). Ceci est dû au fait qu'ils correspondent à des modes de vibration pour lesquels les ions positifs et négatifs localisés sur des sites adjacents du réseau se rapprochent et s'éloignent les uns des autres en créant un moment dipolaire électrique oscillant avec le temps. Les phonons optiques qui interagissent de cette manière avec la lumière sont dits actifs dans l'infrarouge.

Les modes de vibration optiques ont des fréquences non nulles au centre de la zone de Brillouin (Fig. I.4) et donc ils sont susceptibles de donner lieu à des pics dans les spectres de diffusion Raman. Une analyse selon la théorie des groupes permet d'identifier la symétrie (représentation irréductible) des différents modes de vibration optiques actifs en Raman. Les phonons optiques de type longitudinaux et transverses sont fréquemment notés de façon abrégée LO et TO respectivement.

Les modes de vibration optiques d'un solide cristallin sont donc caractéristiques de l'environnement chimique et cristallographique des atomes constituant le motif cristallin.

Pour montrer comment la spectrométrie Raman permet de distinguer les différentes phases dans lesquelles peut cristalliser un composé, le dioxyde de titane, TiO_2, sera pris comme exemple. Celui-ci peut cristalliser selon différentes structures cristallographiques, l'anatase, le rutile et la brookite étant les phases les plus courantes.

Le rutile est la phase thermodynamiquement stable à température ambiante, mais les phases anatase et brookite peuvent aussi être observées à température ambiante, notamment dans le cas de poudres de taille nanométrique [Pighini (2006)] ou de films minces [Boukrouh (2008)]. La phase brookite est la moins fréquente des trois phases citées, nous n'en parlerons donc pas par la suite.

Les phases anatase et rutile sont de structure tétragonale et possèdent deux groupements TiO_2 par maille, ce qui donne lieu à 3N-3=15 branches optiques pour N=6. Pour la phase anatase, (groupe d'espace D_{4h}^{19} ($I\frac{4_1}{a}md$)) la théorie des groupes indique pour ces modes de vibration au centre de la zone de Brillouin les symétries suivantes :

$$1A_{1g}+1A_{2u}+ 2B_{1g}+ 1B_{2u}+ 3E_g+ 2E_u$$

Selon les règles de sélection, seuls les modes A_{1g}, B_{1g} et E_g sont actifs en spectrométrie Raman. Il y a donc 9 modes optiques actifs Raman pour la phase anatase de TiO_2 [Ohsaka (1978)].

De façon analogue pour la phase rutile (groupe d'espace D_{4h}^{14} ($P\frac{4_2}{m}nm$)), les 15 modes optiques au centre de la zone de Brillouin ont pour représentations irréductibles :

$$1A_{1g}+ 1A_{2g}+ 1A_{2u}+1B_{1g}+ 1B_{2g}+ 2B_{1u}+1E_g+ 3E_u$$

Selon les règles de sélection, les modes actifs en spectrométrie Raman sont les modes A_{1g}, B_{1g}, B_{2g} et E_g [Porto (1967)]. Il y a donc 5 modes optiques actifs Raman pour la phase rutile de TiO_2.

La figure I.5 montre les spectres Raman expérimentaux des deux phases, anatase et rutile, de TiO_2.

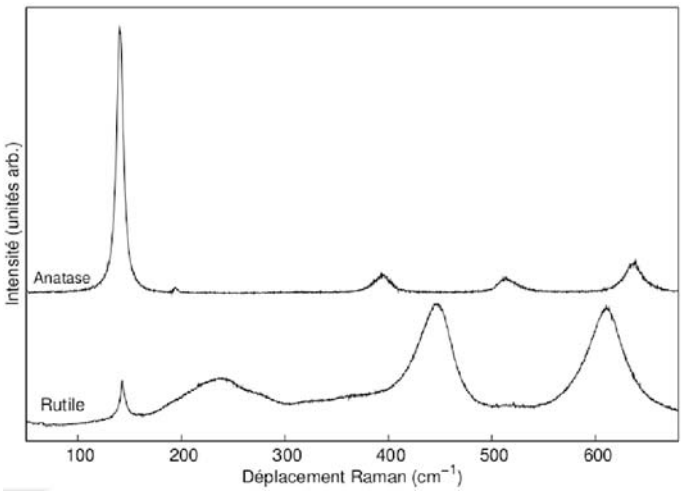


Figure I.5 : Spectres Raman de TiO_2 cristallisé dans les phases anatase et rutile. [Pighini (2006)].

Le tableau I.1 récapitule les fréquences des pics expérimentaux et leur attribution aux différents modes de vibration pour les deux formes cristallines. On peut signaler, que pour la phase rutile, le pic de faible intensité situé à 250 cm^{-1} est une contribution de second ordre attribuée à une combinaison de deux phonons. En conclusion, le spectre Raman constitue une véritable signature spectrale qui permet de différentier aisément ces deux phases cristallines.

Tableau I.1 : Fréquence des différents pics observés dans le spectre Raman pour les phases anatase et rutile de TiO_2. L'attribution aux modes actifs Raman est aussi indiquée.

Anatase [Ohsaka (1978)]		Rutile [Porto (1967)]	
Mode	**Fréquence (cm^{-1})**	**Mode**	**Fréquence (cm^{-1})**
$E_{g\,(1)}$	144	B_{1g}	143
$E_{g\,(2)}$	197	E_g	447
$B_{1g\,(1)}$	399	A_{1g}	612
A_{1g}	514	B_{2g}	826
$B_{1g\,(2)}$	514		
E_g	639		

I.1.3-Vibrations acoustiques dans des nanoparticules

Dans la partie précédente, il a été expliqué que pour les solides cristallins, les phonons acoustiques ne peuvent pas être étudiés par spectrométrie Raman même si des phonons acoustiques avec des fréquences suffisamment larges pour être observés existent. Ceci est dû aux règles de sélection du processus Raman qui imposent un vecteur d'onde quasi-nul pour les vibrations actives en Raman. Des modes acoustiques peuvent être observés dès que ces règles de sélection sont brisées. C'est par exemple le cas pour des solides désordonnés pour lesquels la symétrie de translation n'existe pas. C'est également le cas, pour la même raison, lorsqu'on considère des cristaux de très petite dimension.

Les modes observables par spectrométrie Raman résultent alors du confinement des modes de vibration acoustiques dans des particules de taille nanométrique. Ces derniers peuvent donner lieu à des signaux dans les spectres Raman dans le domaine des très basses fréquences.

Pour mieux comprendre la nature de ces vibrations acoustiques confinées dans des nanoparticules, intéressons-nous au cas simple à une dimension d'un fil d'une longueur, L, dont les deux extrémités sont fixées, comme la corde d'une guitare. Les vibrations transverses possibles dans ce fil sont des ondes stationnaires, dont la fréquence, f, dépend de la longueur L et de la vitesse de propagation du son v_s :

$$f = n\frac{v_s}{2L} \qquad (n=1, 2, \ldots) \tag{I.10}$$

La vibration de plus basse fréquence est le mode fondamental ($n=1$). Sa fréquence augmente quand la longueur du fil diminue. Pour les différentes harmoniques ($n>1$), leur fréquence est un multiple entier de celle du mode fondamental.

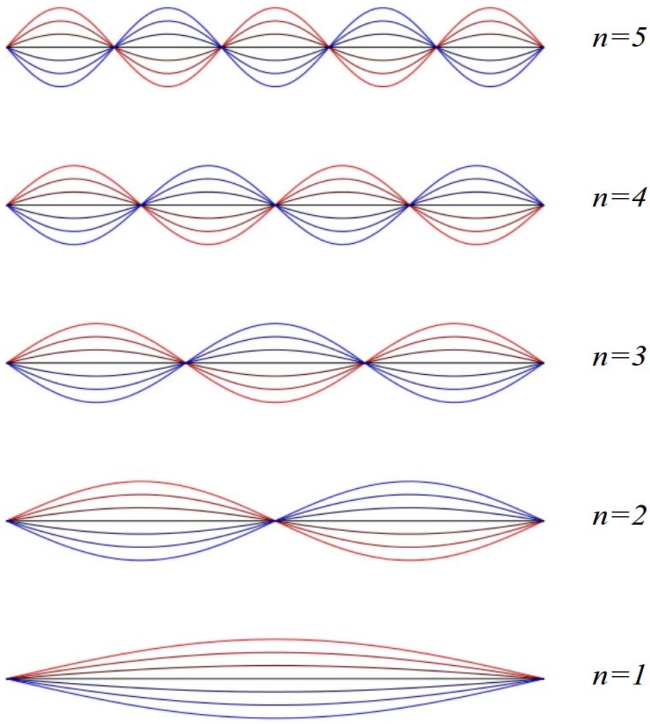


Figure I.6 : Vibrations confinées dans un fil de dimension finie et dont les deux extrémités sont fixées. La vibration fondamentale (n=1) et les 4 premiers harmoniques (n= 2 à 5) ont été représentés.

De façon analogue, les vibrations acoustiques confinées dans des particules de taille finie ont des fréquences de vibration qui dépendent de la taille de la particule et des vitesses de propagation du son dans le matériau. Ainsi par exemple des vibrations acoustiques confinées dans des nanoparticules d'or peuvent donner lieu à des pics de diffusion Raman dans le domaine des basses fréquences (<100 cm^{-1}). Pour les observer, il est nécessaire de recourir à des spectromètres Raman permettant d'accéder à ce domaine spectral.

Les vibrations de nanoparticules sphériques libres peuvent être modélisées en utilisant la théorie de l'élasticité des milieux continus isotropes à l'aide du modèle de Lamb [Lamb (1886)]. Pour des raisons de symétrie, [Duval (1992)] il y a deux familles de modes de vibration acoustiques qui contribuent au spectre Raman : les modes de respiration (caractérisés par *l=0*), et les modes quadrupolaires (caractérisés par *l=2*). La figure I.7 présente les modes fondamentaux de ces deux familles. La plupart des spectres Raman basse fréquence peut être interprétés en considérant uniquement ces modes.

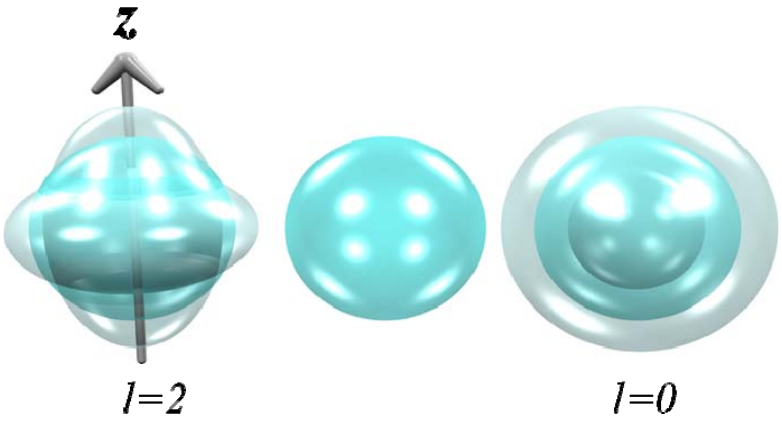


Figure I.7 : Représentation des deux modes de vibration actifs en Raman d'une nanoparticule sphérique libre (modèle de Lamb). A gauche, le mode d'élongation quadrupolaire (*l=2*), à droite le mode de respiration *(l=0*). La sphère au centre de la figure et au centre de la représentation de chaque mode correspond à la position d'équilibre. Pour chaque mode, la figure montre les déformations maximales de la sphère. Pour le mode l=2, l'élongation selon la direction z est suivie d'une contraction dans cette direction. Le mode de respiration, *l=0*, correspond à une expansion radiale suivie d'une contraction.

Le modèle de Lamb permet de calculer à la fois la déformation des nanoparticules et la fréquence des modes de vibration acoustiques. La fréquence dépend de la taille des nanoparticules et des vitesses de propagation du son dans le milieu constituant les nanoparticules:

$$f \propto \frac{v_{L,T}}{d} \qquad \text{(I.11)}$$

f étant la fréquence de la vibration, $v_{L,T}$ une des deux vitesses de propagation du son (longitudinal ou transverse), et d le diamètre de la nanoparticule. Donc, plus la vitesse de propagation du son dans le matériau est élevée et plus le diamètre de la particule est faible, plus la fréquence de vibrations sera élevée.
Le tableau I.2 récapitule les fréquences des modes de vibration acoustiques calculées à l'aide du modèle de Lamb pour des nanoparticules d'or dont le diamètre varie de 5 à 15 nm.

On peut rappeler que l'or ne possède aucun mode de vibration optique car sa structure cristalline contient un seul atome par maille. D'après la littérature, le pic Raman basse fréquence le plus intense dans le cas de l'or est le mode quadrupolaire [Bachelier (2004)]. Sa fréquence est très basse et son observation par spectrométrie Raman est difficile même pour des nanoparticules d'un diamètre de 5 nm. Nous verrons dans la suite que dans certains cas la présence d'une matrice autour des nanoparticules peut augmenter sensiblement ces fréquences.

Tableau I.2 : Fréquences calculées des modes de vibration fondamentaux acoustiques de nanoparticules d'or libres en fonction de leur taille. Vitesse du son dans l'or : v_L=3330 m/s ; v_T=1250 m/s. Coefficient de Poisson : ν=0,42

Diamètre (nm)	Mode de respiration, *l=0* f (cm^{-1})	Mode quadrupolaire, *l=2* f (cm^{-1})
5	20,8	7,1
10	10,4	3,5
15	6,9	2,3

Comme la fréquence des modes de vibration confinés dépend principalement de la taille et de la forme des nanoparticules, la spectrométrie Raman basses fréquences est une technique très appropriée pour l'étude de systèmes nanostructurés. Elle a été largement utilisée dans l'étude de nanoparticules de métaux nobles et de semi-conducteurs, mais elle a été employée aussi, par exemple, pour l'étude de verres inorganiques [Duval (1986)] et de nanopoudres de dioxyde de titane [Pighini (2007)].

I.2) Spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS)

I.2.1-Principe de l'effet SERS

Dans les parties précédentes, nous avons montré la richesse des informations qui peuvent être obtenues par spectrométrie Raman pour la caractérisation physico-chimique des solides. L'évolution technologique de dispositifs Raman expérimentaux dans les dernières décennies a amélioré leurs performances et simplifié leur utilisation. Cependant, la faible intensité des signaux Raman peut limiter l'utilisation de cette technique dans le cas de très faibles concentrations d'espèces diffusantes et/ou de très faibles sections efficaces de diffusion. Un moyen de pallier à cette limitation est l'effet SERS (Surface Enhanced Raman Scattering), c'est-à-dire, l'exaltation de surface de la diffusion Raman. L'effet SERS apparaît lorsque les molécules de l'espèce à détecter sont adsorbées à la surface d'un substrat nanostructuré d'un métal noble (or ou argent, le plus souvent). Ce substrat, qui va être excité dans sa résonance plasmon par l'onde incidente, va exalter l'intensité de diffusion Raman de la molécule et donc baisser très significativement sa limite de détection. Des études sur des molécules uniques ont ainsi été réalisées [Nie (1997)] ; [Le Ru, 2006]. Ce principe d'exaltation du signal Raman offre à la technique un regain d'intérêt croissant pour de nombreuses applications.

C'est en 1974, que Fleischman et al. firent l'expérience d'une augmentation significative du signal Raman de la pyridine adsorbée à la surface d'une électrode d'argent. Ce fut la première observation de l'effet SERS [Fleischmann (1974)].

Par la suite, de nombreux travaux sur le sujet, tels que ceux en 1977 de Albrecht et Creighton, de Jeanmaire et Van Duyne permirent de déterminer les paramètres importants de cet effet d'exaltation [Albrecht (1977)] ; [Jeanmaire (1977)] : l'état de surface du métal, la nature du métal et la longueur d'onde de la lumière excitatrice. Les travaux de Moskovits en 1978 [Moskovits (1978)] et de Billmann et *al.* en 1980 [Billmann (1980)] ont permis de montrer que l'exaltation du signal Raman par les métaux nobles était extrêmement localisée et que la présence de « points chauds », créés par des agrégats de particules à l'échelle nanométrique ou la nanorugosité du substrat, était déterminante dans l'amplification du signal. Deux contributions peuvent être distinguées dans l'exaltation SERS du signal Raman : une exaltation électromagnétique et une exaltation chimique.

La première est indépendante de la molécule sondée, tandis que le deuxième dépend fortement de la nature de celle-ci et des liaisons chimiques qu'elle forme avec le substrat SERS.

Une façon simple de comprendre l'exaltation SERS [Le Ru (2009)] s'appuie sur l'interprétation classique de la diffusion Raman (cf. I.1.1) dans laquelle l'onde électromagnétique d'excitation donne lieu à un dipôle électrique qui oscille à une fréquence différente que celle de l'onde excitatrice. La puissance émisse par ce dipôle oscillant est proportionnelle au carré de la polarisation, $\vec{P} = [\alpha]\vec{E}$. Cette émission, détectée en champ lointain, est le signal Raman. Formellement, il est possible de décrire la diffusion Raman comme un processus en deux étapes simultanées, formation du dipôle induit et re-émission.

La même description phénoménologique peut être appliquée à la diffusion Raman dans des conditions SERS, mais la proximité d'une surface métallique affecte le processus de différentes façons :

1. Le champ électromagnétique local dans la position de la molécule est modifié. Son amplitude peut être très fortement augmentée. Ce qui peut induire une exaltation du champ local.
2. La capacité du dipôle à rayonner est modifiée. Ce qui peut induire une exaltation du rayonnement re-émis.
3. Le tenseur polarisabilité peut être modifié. Ce qui fait partie de l'exaltation chimique. C'est effet est secondaire dans la majorité des cas.

L'exaltation électromagnétique est reconnue comme la contribution dominante pour l'exaltation SERS dans la majorité des cas. Donc, expliquer l'exaltation SERS requiert surtout de comprendre les deux premiers facteurs : la modification du champ local et la modification de la capacité à rayonner du dipôle.

I.2.1.1-Exaltation du champ local

Deux effets contribuent à l'exaltation locale du champ électromagnétique : l'effet de pointe (ou d'antenne) et la résonance plasmonique. Le premier est relié à la forme, et plus particulièrement à la courbure, des nano-objets. Sous l'action du champ électrique excitateur les charges électriques à la surface se déplacent et vont s'accumuler préférentiellement aux zones de fortes courbures de l'objet (fig. I.8). Les nanoparticules ont par leur taille des courbures suffisamment importantes pour générer une exaltation significative du champ électromagnétique local.

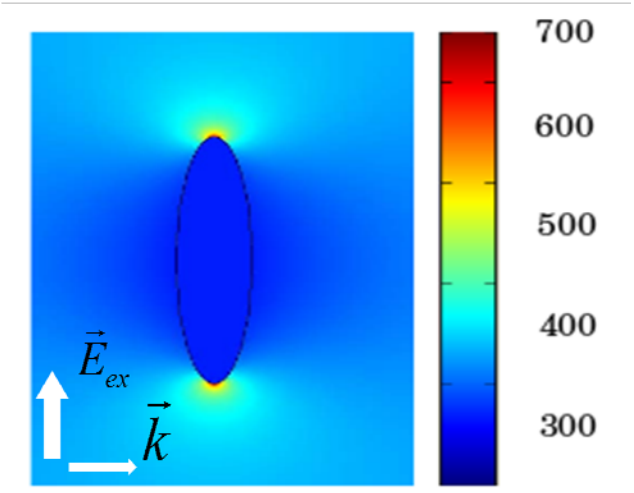


Figure I.8 : Cartographie du champ électrique local E (V/m) autour d'une particule de verre sphéroïdale (longueur d'onde d'excitation : 500 nm ; petite axe : 5 nm ; grand axe : 50 nm). [Le Nader (2010)]

La seconde contribution à l'exaltation électromagnétique est due à la réponse optique des métaux. En première approximation, un métal peut être considéré comme un réseau de cations immobiles entourés par un nuage d'électrons libres qui peut être assimilé à un plasma. Sous l'action d'une onde électromagnétique ce plasma peut subir des oscillations. Le plasmon, quasi-particule quantique, représente les excitations élémentaires, ou modes, des oscillations de densité de charge dans ce plasma d'électrons [Pines (1956)] ; [Le Ru, (2006)].

Les plasmons de surface sont des oscillations cohérentes de la densité de charge électronique à l'interface entre un métal et un diélectrique (fig. I.9). Les oscillations de la densité de charge, et les champs électromagnétiques associés, constituent les ondes plasmon-polariton de surface delocalisés dans le cas d'une interface plane, et les plasmons localisés de surface dans le cas de structures de taille nanométrique comme des nanoparticules ou des rugosités de surface (fig. I.10). Les plasmons de surface délocalisés peuvent se propager sur des distances de plusieurs micromètres, tandis que les plasmons se propagent sur des distances nanométriques. En tous les cas, l'intensité du champ électromagnétique décroit très rapidement (sur quelques dizaines de nanomètres) dans les deux milieux perpendiculairement à l'interface. Ces ondes plasmon peuvent être excitées efficacement avec la lumière visible.

Les plasmons de surface sont moins énergétiques que les plasmons de volume qui quantifient les oscillations longitudinales du nuage électroniques par rapport au réseau de cations dans le massif. Ces derniers ne peuvent pas être excités par la lumière.

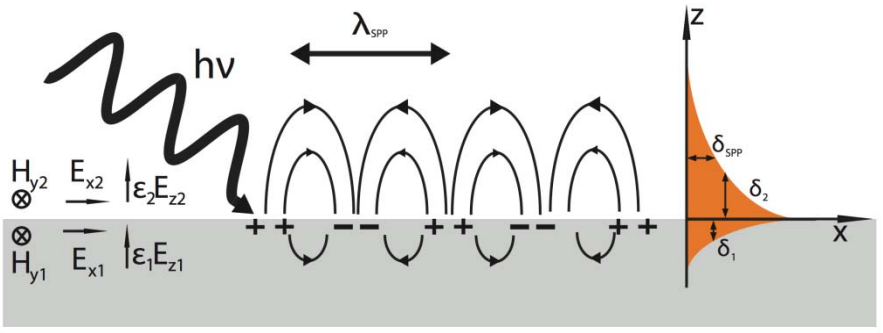


Figure I.9 : Représentation schématique d'une onde de densité électronique qui se propage à l'interface entre un métal et un diélectrique. Les oscillations de la densité de charge, et les champs électromagnétiques associés, constituent les ondes plasmon-polariton de surface. La décroissance exponentielle de l'intensité du champ électromagnétique perpendiculairement à l'interface est montrée à droite.

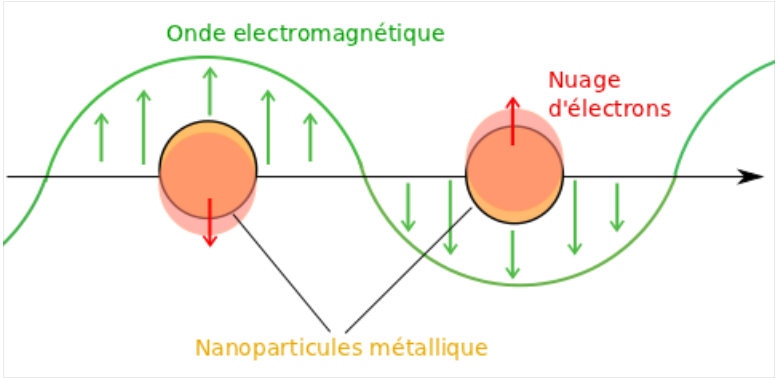


Figure I.10 : Représentation schématique visualisant les plasmons localisés de surface pour des nanoparticules métalliques sous l'action d'une onde électromagnétique. Il en résulte une oscillation du nuage d'électrons, repoussé par le champ négatif à l'extérieur de la particule, créant un champ électromagnétique local très intense.

Lorsque la taille des particules métalliques est très petite par rapport à la longueur d'onde d'une onde électromagnétique, comme c'est le cas des nanoparticules vis-à-vis de la lumière visible, leurs propriétés optiques peuvent être expliquées par l'oscillation collective des électrons de conduction (plasmon de surface localisé) due à l'interaction avec l'onde électromagnétique.

La théorie de Mie permet d'obtenir une solution analytique des équations de Maxwell pour la dispersion du rayonnement électromagnétique par des particules sphériques. Pour une nanoparticule métallique sphérique de rayon, a, très petite par rapport à la longueur d'onde d'une onde électromagnétique monochromatique, il est possible de considérer que la particule est soumise à un champ électrique excitateur $\vec{E}_0$ constant (fig. I.11).

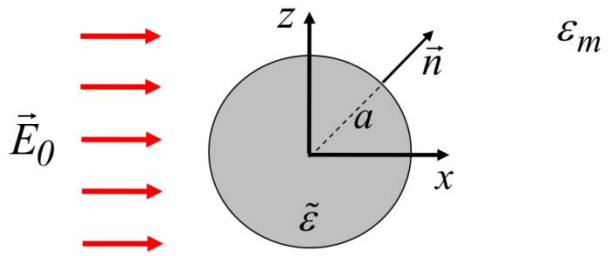


Figure I.11 : Nanoparticule métallique sphérique soumise à un champ électrostatique $\vec{E}_0$.

Alors les champs induits à l'intérieur et à l'extérieur de la particule ont pour expression [Bohren (1983) ; [Le Ru (2009)] ; [Le Nader (2010)] :

$$\vec{E}_{\text{int}} = \frac{3\varepsilon_m}{\tilde{\varepsilon} + 2\varepsilon_m}\vec{E}_0 \qquad \text{(I.10)}$$

et

$$\vec{E}_{ext} = \vec{E}_0 + a^3\left(\frac{\tilde{\varepsilon} - \varepsilon_m}{\tilde{\varepsilon} + 2\varepsilon_m}\right)\frac{3\vec{n}(\vec{n}.\vec{E}_0) - \vec{E}_0}{r^3} \qquad \text{(I.11)}$$

$\tilde{\varepsilon}$ étant la fonction diélectrique complexe du métal, ε_m, la fonction diélectrique (non complexe) du milieu environnant la nanoparticule. La décroissance en *1/r*^{3} du second terme de l'équation (I.11) montre la rapide diminution du champ électrique induit hors du métal en s'éloignant de la surface de la particule. L'intensité du champ électrique induit est maximale lorsque la somme $\tilde{\varepsilon} + 2\varepsilon_m$ est minimale, c'est-à-dire, lorsque la fonction diélectrique complexe satisfait la condition de Frölich [Johnson (1972)] :

$$\text{Re}\left[\tilde{\varepsilon}\right] = -2\,\varepsilon_m \qquad \text{(I.12)}$$

Cette condition est satisfaite à la fréquence de résonance plasmon du métal. Ainsi si l'on considère un milieu environnant tel que l'air ($\varepsilon_m = 1$) peu de métaux respectent la condition de Frölich lorsqu'ils sont excités dans le visible. L'or, l'argent et le cuivre sont les métaux qui présentent les meilleures caractéristiques. Le cuivre est rarement employé car il s'oxyde facilement et absorbe fortement dans le visible. L'or et l'argent sont généralement utilisés pour générer l'effet SERS.

L'exaltation du champ électrique local à proximité de la surface d'une sphère (de 50 nm de diamètre) est illustrée dans la figure I.12.

Dans le cas d'une sphère en verre, l'exaltation est très faible et presque indépendante de la longueur d'onde. Pour une sphère en argent, l'exaltation varie fortement avec la longueur d'onde et elle montre la résonance associée au plasmon de surface de l'argent. Ainsi l'exaltation attend un facteur proche de 500 à 360 nm. Enfin, pour une molécule située entre deux sphères en argent séparées de 2 nm, l'exaltation augmente de plusieurs ordres de grandeur. C'est le cas des « points chauds » ou hot-spots recherchés pour l'exaltation SERS.

Le champ local E_{Loc} induit un dipôle $\vec{P} = [\alpha]\,\vec{E}_{Loc}(\omega_L)$. Si ce dipôle rayonne dans le vide (non métal) l'énergie émise qui est proportionnelle à $\left|\vec{P}\right|^2$ est exaltée d'un facteur M_{Loc} :

$$M_{Loc}(\omega_L) = \frac{\left\|E_{Loc}(\omega_L)\right\|^2}{\left\|E_{Inc}\right\|^2} \qquad \text{(I.13)}$$

M_{Loc} est le facteur d'exaltation associé à l'excitation. Pour une molécule absorbante, il caractérise aussi l'exaltation de la section efficace d'absorption.

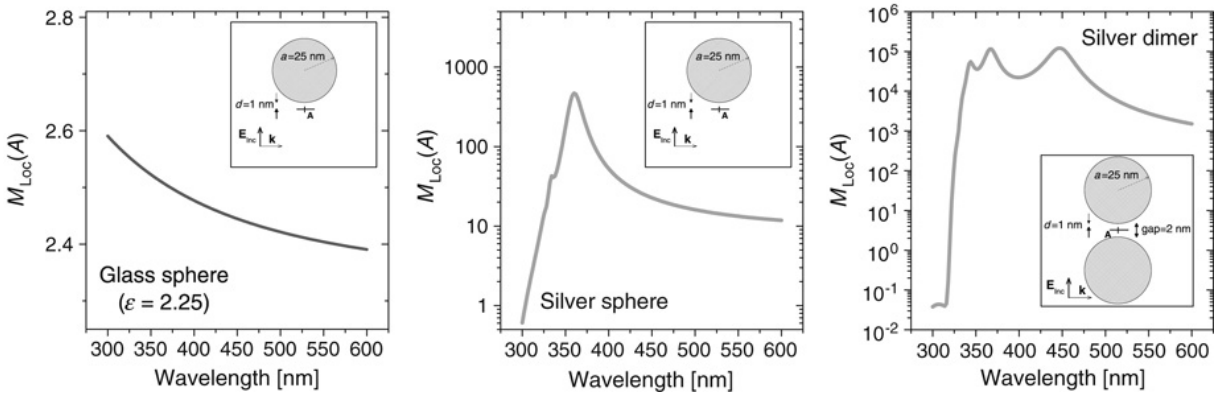


Figure I.12 : Exemples de la modification de l'intensité du champ électromagnétique local, M_{Loc} près de la surface d'une sphère de 50 nm de diamètre en verre ou en argent, et dans le gap entre deux sphères en argent proches (dimère). Calculs réalisés pour une molécule située dans le point A, à une distance d= 1 nm de la surface. [Le Ru (2009)]

I.2.1.2-Exaltation du rayonnement

Les mécanismes électromagnétiques permettent d'exalter localement, par l'excitation des plasmons localisés de surface, à la fois le champ électrique incident et le rayonnement diffusé. En effet, dans les conditions SERS, le dipôle Raman ne rayonne pas dans l'espace libre, mais tout proche de la surface d'un métal. Ceci affecte l'émission dipolaire de deux façons. La première est la possible modification de la distribution spatiale de l'émission, $dP_{Rad} = d\Omega$. La deuxième est une modification de la puissance totale émise, P_{Rad}, par rapport à celle émisse dans l'espace libre P_0. Le processus d'émission est directement affecté par la présence de la surface métallique. Ainsi, pour une amplitude d'oscillation donnée d'un dipôle, la puissance émise peut être plus élevée, de plusieurs ordres de grandeur, quand il est tout près d'une surface métallique plutôt que dans l'espace libre.

La figure I.13 [Le Ru (2009)] illustre la puissance émise par un dipôle situé à proximité (d=1 nm) d'une sphère (50 nm de diamètre), en verre ou en argent, par rapport à celle émise dans l'espace libre. Le même calcul est montré aussi pour un dipôle situé au milieu d'un gap de 2 nm entre deux sphères en argent. Deux orientations du dipôle, perpendiculaire ($\perp$) ou parallèle (//) à la surface de la sphère, ont été considérées.

Les résultats de la figure I.13 illustrent plusieurs points marquants :

- la puissance totale irradiée par le dipôle peut être augmentée ou diminuée selon la géométrie et la nature des objets à proximité, ainsi que selon l'orientation du dipôle;
- une forte exaltation de la puissance émise apparait à la fréquence de résonance des plasmons localisés de surface;
- l'exaltation augmente de plusieurs ordres de grandeur dans le gap situé entre deux nano-objets;
- le facteur d'exaltation dépend fortement de l'orientation du dipôle par rapport à la surface.

En conclusion, ce facteur d'exaltation du rayonnement du dipôle Raman associé à l'étape de re-émission du processus Raman contribue fortement à l'exaltation électromagnétique de la diffusion Raman.

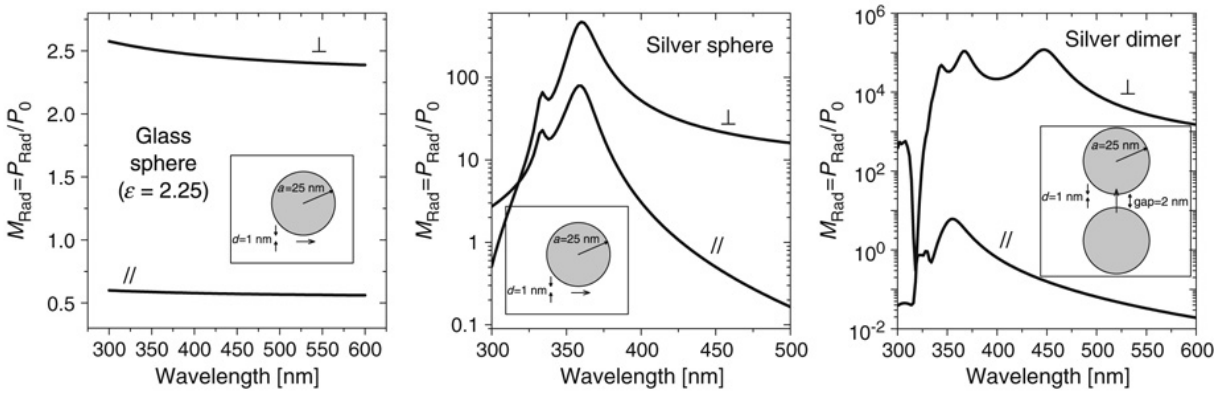


Figure I.13 : Exemples de la modification de l'émission dans l'air d'un dipôle situé à une distance d=1 nm d'une sphère : (a) en verre, (b) en argent, et (c) dans le gap entre deux particules d'argent. Exaltation de l'émission, $M_{Rad} = P_{Rad} / P_0$, pour un dipôle perpendiculaire (⊥) ou parallèle (//) à la surface. [Le Ru 2009]

I.2.1.3-Facteur d'exaltation électromagnétique : l'approximation en E^4

Les mécanismes électromagnétiques permettent d'exalter localement, par l'excitation des plasmons localisés de surface, à la fois le champ électrique incident et le champ diffusé. Le facteur d'amplification électromagnétique est donc le produit de deux facteurs d'exaltation.

$$G_{SERS}^{EM} = M_{Loc}(\omega_L) \, . \, M_{Rad}(\omega_R) \qquad \text{(I.14)}$$

Le calcul de $M_{Rad}(\omega)$ pouvant être un problème difficile à traiter, il est souvent admis que $M_{Rad}(\omega) \approx M_{Loc}(\omega_R)$. L'intensité étant proportionnelle au carré des vecteurs de champs, l'amplification totale du signal Raman devient [Le Ru (2009)]

$$G_{SERS}^{EM} \approx M_{Loc}(\omega_L) \,.\, M_{Loc}(\omega_R) \approx \left\| \frac{E_{Loc}(\omega_L)}{E_{Inc}} \right\|^2 \times \left\| \frac{E_{Loc}(\omega_R)}{E_{Inc}} \right\|^2 \qquad \text{(I.15)}$$

Cette expression, connue couramment comme l'approximation en $|E|^4$, a été largement utilisée dans la littérature. Elle permet d'estimer facilement le facteur d'exaltation électromagnétique à partir du calcul du champ local aux fréquences d'excitation et Raman. Pour des faibles valeurs du déplacement Raman, l'approximation $\omega_{exc} \approx \omega_R$ permet de considérer un facteur d'exaltation de champs commun. Ceci conduit à l'expression de l'approximation en $|E|^4$ du facteur d'exaltation SERS pour un déplacement Raman nul,

$$G_{SERS}^{EM} \approx \left\| \frac{E_{Loc}(\omega_L)}{E_{Inc}} \right\|^4 \qquad \text{(I.16)}$$

Ainsi une exaltation modérée du champ local peut engendrer une exaltation SERS très importante.

I.2.1.4-Exaltation chimique

Le mécanisme chimique d'exaltation a été sujet à controverse, tant sur son origine que sur son importance au sein de l'effet SERS.

L'explication la plus communément admise pour son origine est un transfert de charges dû à l'interaction de nature chimique qui se forme entre le substrat métallique et la molécule adsorbée. Ce transfert de charges peut entraîner une modification de la structure électronique de la molécule, et donc de sa polarisabilité. [Moskovits (1985)] ; [Otto (1984)] ; [Lombardi (1986)] ; [Creighton (1986)].

Or l'intensité de la diffusion Raman dépend de la polarisabilité de la molécule. Cet effet chimique n'est pas nécessairement positif, il peut diminuer l'intensité du signal (*quenching*) ou privilégier seulement certains modes de vibrations de la molécule.

De l'addition de ces deux effets d'exaltation, il est possible d'intensifier le signal Raman jusqu'à un facteur 10^9 [Le Ru (2009)], mais la mise en œuvre de la spectrométrie SERS est délicate pour des raisons de reproductibilité de l'analyse. Ceci car le processus d'exaltation est très localisé et que se pose le problème de la bonne répartition des points chauds et de l'adsorption de l'analyte.

I.2.2-Développement de la spectrométrie SERS

Le développement de la spectrométrie SERS se réalise principalement selon deux axes : le premier vise en priorité le développement de systèmes d'exaltation de plus en plus efficaces et reproductibles à l'aide de systèmes nanostructurés complexes. Le second axe se focalise sur le développement de méthodes d'analyse spécifiques, c'est à dire la détection et la caractérisation d'espèces spécifiques à des teneurs très faibles et avec une grande reproductibilité. Ces deux axes sont intimement liés, mais les séparer permet de mieux rendre compte des différents systèmes et projets de recherche développés dans la littérature.

Pour le premier axe, le développement de l'efficacité de l'exaltation, ce sont la physique plasmonique et la chimie des colloïdes (synthèse de nanoparticules) qui sont vecteurs des avancées technologiques. Comme décrit précédemment (cf. I.2.1), c'est grâce à la surface rugueuse d'une électrode d'argent que Fleishmann et al. [Fleischmann (1974)] observèrent pour la première fois une exaltation du signal Raman. De nombreuses études sont encore actuellement menées sur la création de nanostructures sur des surfaces métalliques pour permettre l'exaltation [Cialla (2012)], [Delhaye (2009)]. De nombreux processus permettent la formation de nanostructures [Xia (1999)] et offrent la possibilité de contrôler la forme et l'agencement des nanostructures. La grande régularité des « points chauds » ainsi créés permet une bonne reproductibilité de l'exaltation mais limite son efficacité.

En effet, si leur répartition est mieux maîtrisée, les « points chauds » ont moins de chances de produire une combinaison plasmonique exaltante (le hasard dans la création de « points chauds » peut en faire apparaître de particulièrement efficaces même s'ils sont difficilement localisables ou reproductibles) [Margueritat (2011)].

Dans le même esprit de maîtrise de la forme et de la position des nanostructures, de nombreuses équipes ont recours à la lithographie pour développer des substrats SERS [David (2010)] ; [Cialla (2012)]. Pour cela ils synthétisent ou font l'acquisition de nanoparticules d'or ou d'argent qu'ils vont déposer de manière contrôlée par lithographie UV ou RX sur un substrat neutre. Ces techniques présentent les mêmes avantages et inconvénients que dans le cas d'une surface nanostructurée. Un effort important est également porté sur la forme et la répartition des particules sur le substrat afin de maximiser l'exaltation en créant de meilleurs « points chauds » et ainsi optimiser l'efficacité de l'effet de pointe. C'est ainsi qu'une importante part de la recherche sur l'augmentation de l'efficacité des systèmes SERS porte sur le développement de la synthèse de particules d'or ou d'argent selon des formes, des tailles et des revêtements maîtrisés [Xia (2009)] ; [Sidharth Shibua (2013)] (fig. I.14).

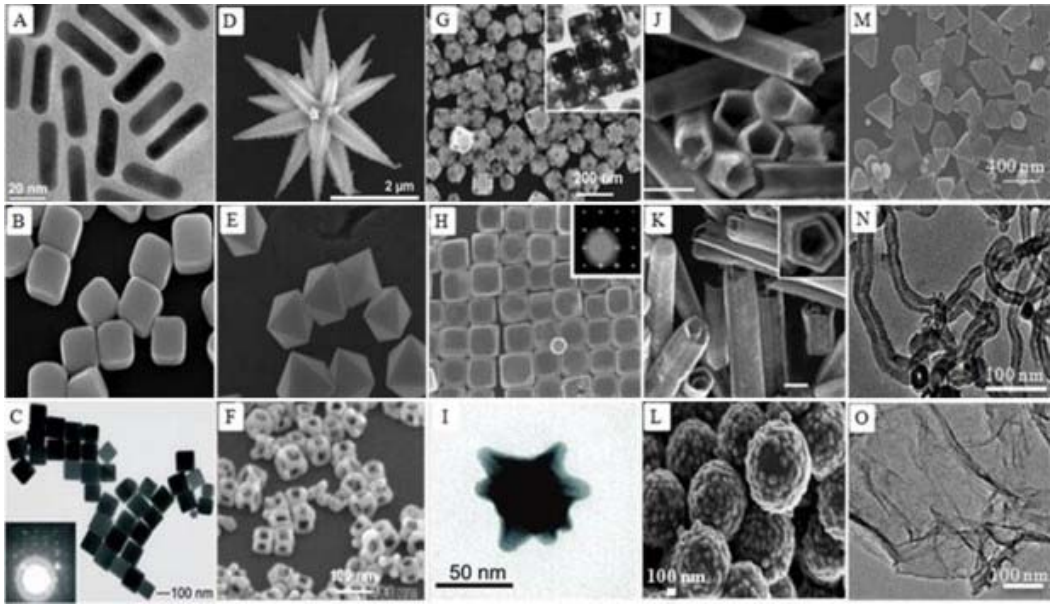


Figure I.14 : Différents types de nanoparticules métalliques [Sidharth Shibua (2013)]

Une autre voie d'obtention d'une nanostructure susceptible de produire une exaltation du signal Raman, est le « nanotrou » (nanohole). Le principe est de faire un trou de taille nanométrique (dans la largeur et l'épaisseur) sur une surface d'or ou d'argent.

La nanostructure ainsi formée est fonctionnalisée avec une molécule permettant d'accrocher l'analyte dans le trou qui par sa forme et sa taille constitue un « point chaud » d'exaltation [Wenger (2006)].

Il est possible également de creuser des nano-puits dans un substrat dont les parois sont par la suite recouvertes d'un film mince d'or ou d'argent. C'est le système des substrats commerciaux Klarite® commercialisés par Renishaw Diagnostic (fig.I.15). Les cavités ont la forme de pyramides inversées. La pointe de la pyramide est ainsi suffisamment fine pour donner lieu à une exaltation SERS au fond des puits.

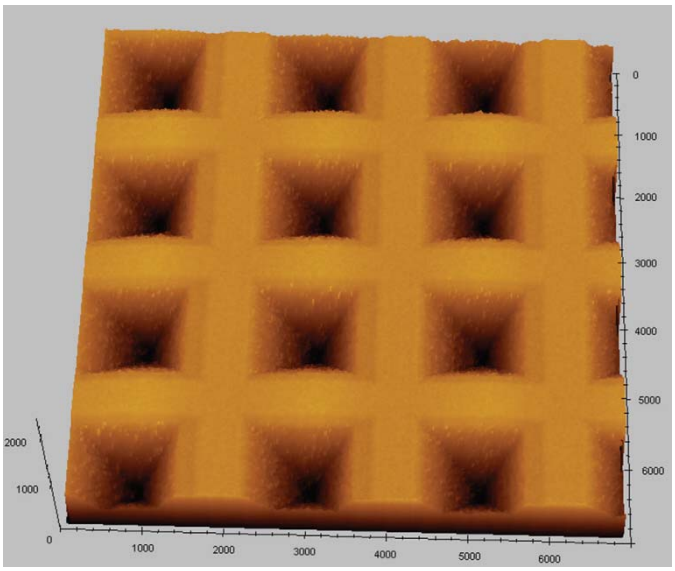


Figure I.15: Image AFM (7x7 μm^2) d'un substrat Klarite® [Degioanni (2013)].

Le second axe envisagé porte sur le développement de la technique SERS au profit de la détection spécifique de molécules d'intérêts, de biomolécules pour des applications biomédicales. Dans ce domaine, la technique est très prometteuse car elle offre la possibilité de détecter à un stade précoce des marqueurs d'une maladie (ex : cancer).

Par ailleurs la rapidité d'analyses de la spectrométrie Raman permet d'envisager une réduction considérable des temps de diagnostic [Kahraman (2008)]. La principale difficulté est alors d'obtenir une bonne interaction entre les nanostructures métalliques et les molécules d'intérêt.

Les études portent ainsi sur l'accroche spécifique de la molécule ou du type de molécule à détecter. C'est la chimie des interfaces et la biochimie qui sont donc principalement concernées, notamment pour le développement de la fonctionnalisation des nanostructures par des « linker » tels que des anticorps dans le cas de la détection de protéines [Han (2008)].

Le développement de la technique porte également sur les techniques de dépôts de l'analyte, ou l'adaptation de la technique à un milieu susceptible de respecter l'intégrité de l'échantillon. Ainsi la spectrométrie SERS en phase liquide est privilégiée pour la détection de biomolécules qui se dégraderaient hors solution [Bell (2006)] ; [Kahraman (2008)]. D'autres systèmes permettant à la fois d'avoir un milieu biologique et une application biocapteur sont en fort développement, comme c'est le cas de la microfluidique [Delhaye (2012)] ; [Schlücker (2011)].

I.3) Spectrométrie SERS appliquée à la détection de protéines

La détection et la caractérisation de biomolécules et en particulier des protéines est un enjeu majeur de la recherche [Narayanaswamy (2005)] ; [Fanti (2011)] ; [Gohring (2010)] ; [Swann (2004)], [Sanogo (2012)]. En effet, les protéines sont associées à la plupart des fonctions biologiques et sont également particulièrement importantes dans le cadre de l'agroalimentaire. [Mc Grath (2012)] Ce sont des molécules aux fonctionnalités très variées et capables d'évoluer fortement en fonction des conditions du milieu dans lequel elles se trouvent. [Sedano (2013)]

Dans le domaine de la recherche biomédicale, la caractérisation des protéines, leur dosage, leur détection permettent de sonder des processus biologiques chez un patient, de noter l'apparition ou l'évolution d'une maladie, de comprendre le fonctionnement des cellules et des organes.

La spectrométrie SERS apparaît comme une méthode d'analyse à fort potentiel pour détecter et étudier les protéines car elle permet de descendre à de très basses teneurs en analyte, elle est sensible à la structure de la protéine et elle est réalisable dans des conditions ne dégradant pas les protéines.

I.3.1-Composition, structure et propriétés des protéines

Une protéine est une molécule biologique complexe. Comme présenté sur la figure I.16, sa structure se décompose en plusieurs niveaux. La structure primaire est constituée d'une longue chaîne d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques (fig. I.17). La structure secondaire est créée par le repliement de la structure primaire sur elle-même et est stabilisée principalement par des liaisons hydrogènes. Enfin la structure tertiaire, arrangement tridimensionnel de la molécule, est stabilisée par des liaisons hydrogènes, électrostatiques, covalentes et par des ponts disulfures (S-S). Une structure quaternaire existe également pour les très grosses protéines, constituée par l'assemblage de plusieurs structures tertiaires et stabilisée principalement par des ponts disulfures (S-S).



Figure I.16 : Schéma des différents niveaux de structuration d'une protéine.

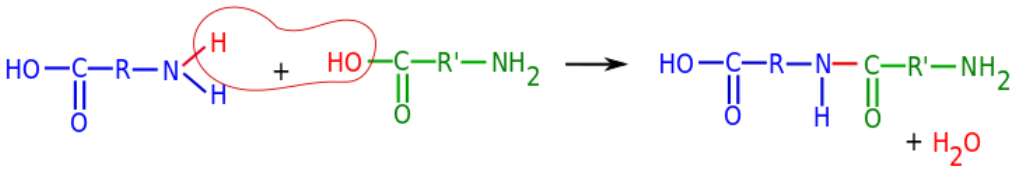


Figure I.17 : Schéma de la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés.

Par ces repliements, une protéine possède une réactivité très importante (fonctions catalytiques dans le cas des enzymes) car elle présente une très grande variété de fonctions chimiques en une zone confinée.

Les protéines participent à pratiquement toutes les fonctions du corps humain, comme le transport de l'oxygène (hémoglobine) ou la défense contre des agents extérieurs (anticorps). Elles sont également les constituants primaires de l'ADN.

Pour autant, ces structures sont très fragiles car principalement soutenues par des liaisons faibles (liaisons hydrogènes, électrostatiques) et de nombreux facteurs peuvent les détruire. Or une protéine dépliée, qui a perdu sa structure, cesse d'être active biologiquement. On dit qu'elle est dénaturée. [Fan (2008)] La température, le pH, la présence d'ions, d'espèces oxydantes ou réductrices, ne plus être en présence d'eau (destruction des liaisons hydrogène si assèchement complet de la protéine) sont quelques-uns des facteurs pouvant altérer une protéine.

I.3.2- Caractérisation des protéines par spectrométries IR et Raman

La structure des protéines a depuis longtemps été étudiée par des techniques de spectrométrie vibrationnelle, telle que la spectrométrie IR et Raman. Ces structures donnent lieu à de nombreuses bandes vibrationnelles (amide A, B et amide I-VII), pas toutes observables à la fois par spectrométrie Raman et IR [Pelton (2010] ; [Domènech (2007)]. Les plus utiles pour l'étude de la conformation des protéines sont la bande amide A ainsi que les bandes amides I et III.

La bande amide A, située à ~ 3280 cm^{-1}, est due à l'élongation de la liaison N-H. Elle est intense dans le spectre IR, mais faible en spectrométrie Raman. Sa position donne des informations sur l'intensité des liaisons hydrogène.

La bande amide I est principalement due à l'élongation de la liaison C=O, elle est observée dans les spectres IR et Raman dans le domaine 1600-1700 cm^{-1}.

La bande amide II est principalement due à la déformation de la liaison N-H et elle est active seulement en spectrométrie IR. Elle apparait dans le domaine 1510-1560 cm^{-1}. Cependant cette bande apporte peu d'information sur la structure de la protéine.

La bande amide III est principalement due à l'élongation de la liaison C-N couplée à la déformation de la liaison N-H. Elle est active en spectrométrie IR et Raman, et elle est observée dans le domaine 1200-1300 cm^{-1}. Elle contribue fortement à la caractérisation de la structure secondaire des protéines.

Le tableau I.3 récapitule les positions des bandes Raman et IR pour les bandes amide I et amide III couramment utilisées pour la caractérisation de la structure secondaire des protéines.

Tableau I.3 : Fréquences des principales bandes Raman et IR caractéristiques de la structure secondaire des protéines [Domènech (2007)].

Structure	Bandes Raman (cm^{-1})	
	Amide I	Amide III
Coude β	1632-1648 1680-1697	1260-1290
Hélice α	1650-1657	1268-1309
Structure désordonnée	1660-1666	1240-1256
Feuillet β	1667-1680	1227-1240
	Bandes IR (cm^{-1})	
	Amide I	Amide III
Coude β	1655-1675 1680-1696	1270-1290 1290-1310
Hélice α	1652-1660	1255-1259
Structure désordonnée	1640-1655	1207-1245
Feuillet β	1610-1644	

En plus des bandes amide, d'autres modes de vibration sont sensibles à la conformation des protéines. Les spectres Raman présentent ainsi une bande dans le domaine 890-945 cm^{-1} associée à l'élongation de la liaison C-C qui est caractéristique des hélices α. Pour les feuillets β, une bande caractéristique apparaît à 1020-1060 cm^{-1}.

La présence d'acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et d'acides aminés aromatiques dans la structure des protéines donnent également lieu à l'apparition de bandes spécifiques sur les spectres Raman. Pour les premiers, la formation de ponts disulfure donne lieu à plusieurs bandes Raman, notamment celle associé à l'élongation de la liaison S-S à 500-550 cm^{-1}. Les ponts disulfures sont très importants pour la structure tertiaire voire quaternaire de la protéine, étudier leur évolution permet ainsi d'étudier le niveau de structuration de la protéine.

Pour les acides aminés à chaîne latérale aromatique (phénylalanine -Phe, tyrosine -Tyr, tryptophane -Trp, histidine - Hys), le cycle aromatique donne lieu à des bandes Raman caractéristiques comme celle observée à 1005 cm^{-1} pour la vibration de respiration de la phénylalanine (Tableau I.4). Cette bande intense en Raman n'est pas sensible à l'environnement de l'acide aminé, elle peut ainsi être utilisée pour normaliser le spectre Raman. D'autres bandes caractéristiques des acides aminés aromatiques apparaissent autour de 1600 cm^{-1} (1605 cm^{-1} Phe, ~1584 cm^{-1} Phe, Tyr et Trp, 1618 Trp). Pour la tyrosine, des bandes Raman intenses majoritairement associées au cycle aromatique se trouvent à 1255, 1210, 1176, 850, 830 et 643 cm^{-1}. Le doublet de Fermi à 830 et 850 cm^{-1} indique la présence ou non de liaisons hydrogène et renseigne sur l'environnement de l'acide aminé. Pour le tryptophane, le doublet de Fermi à 1340 et 1360 cm^{-1} est un marqueur de l'hydrophobicité du milieu [Domènech (2007)].

Tableau I.4 : Fréquences habituelles des principales bandes Raman des acides aminés aromatiques dans les protéines.

Acide aminé	Fréquence (cm^{-1})
Phe	620
Tyr	640
Trp	650
Tyr	830, 850
Phe	1000, 1030
Trp	1011
Tyr, Phe	1170-1200
Trp	1340-1360
	1582
Phe,Trp	1584
Tyr	1590
Phe	1605
Trp, Phe, Tyr	1610-1616
Trp	1618-1621
His	3110-3160

I.3.3-Spectrométrie SERS des protéines

L'interaction d'une protéine avec les nanoparticules métalliques peut modifier sa structure, les modifications des conditions du milieu, parfois nécessaires à l'interaction, peuvent également la modifier. Or de nombreux modes de vibrations des protéines sont intimement liés à la conservation de leur structure. Le spectre d'une protéine peut donc être modifié à cause des conditions nécessaires pour obtenir l'exaltation de leur signal.

Les protéines sont par ailleurs de très grosses molécules, surtout dépliées, ce qui implique qu'en fonction de leur orientation, seules les fonctions chimiques d'une protéine proches des points chauds sont susceptibles d'être exaltées.

La dénaturation modifiant également l'emplacement des groupements fonctionnels (dépliement de la structure), elle peut altérer les propriétés d'adsorption des protéines et donc l'orientation des groupes fonctionnels de la protéine vis-à-vis des nanoparticules.

Des contributions spectrales peuvent ainsi être indétectables ou très faibles car non exaltées. Tous ces effets peuvent avoir pour conséquence une perte de reproductibilité des spectres SERS de protéines.

De plus, les molécules utilisées comme stabilisants des nanoparticules métalliques en suspension peuvent être une source de signaux parasites sur les spectres des protéines (la figure I.18 montre le spectre Raman du citrate de sodium, stabilisant commun de nanoparticules d'or). Si ces molécules peuvent être éliminées lorsque les nanoparticules sont déposées sur un substrat, elles ne peuvent être éliminées en solution au risque d'agréger les nanoparticules.

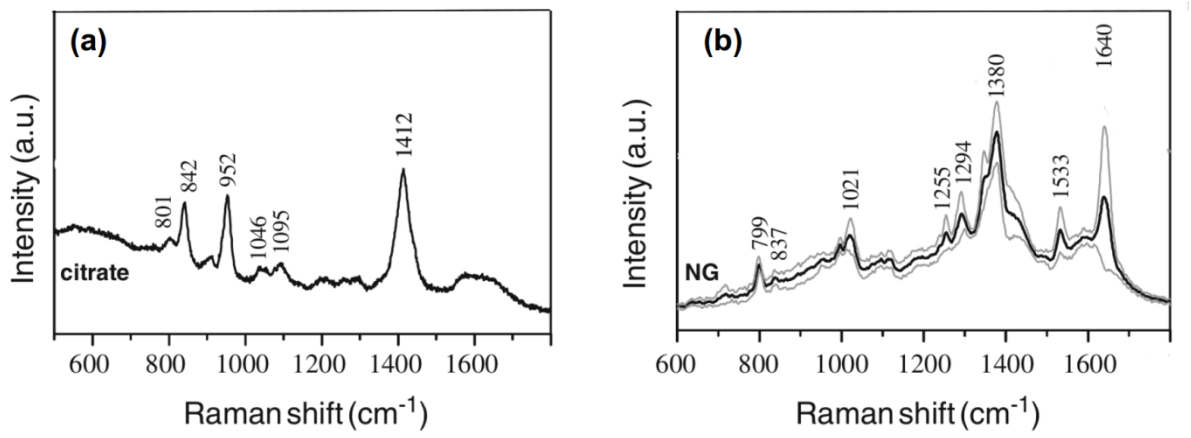


Figure I.18 : (a) Spectre Raman du citrate de sodium ; (b) Spectre SERS de nanoparticules d'or entourées stabilisées par le citrate de sodium.[Mandal (2011)].

La littérature est riche en travaux portant sur l'analyse SERS de protéines obtenues avec des systèmes variés, souvent dans l'optique d'une application spécifique biocapteur [Li (2003)] ; [David (2010)] ; [Schlücker (2011)], [Ngo (2013)].

Mais pour une même protéine, des spectres très différents sont présentés. Ils sont également souvent différents du spectre référence de la protéine obtenu en spectrométrie Raman conventionnelle (fig I.19).

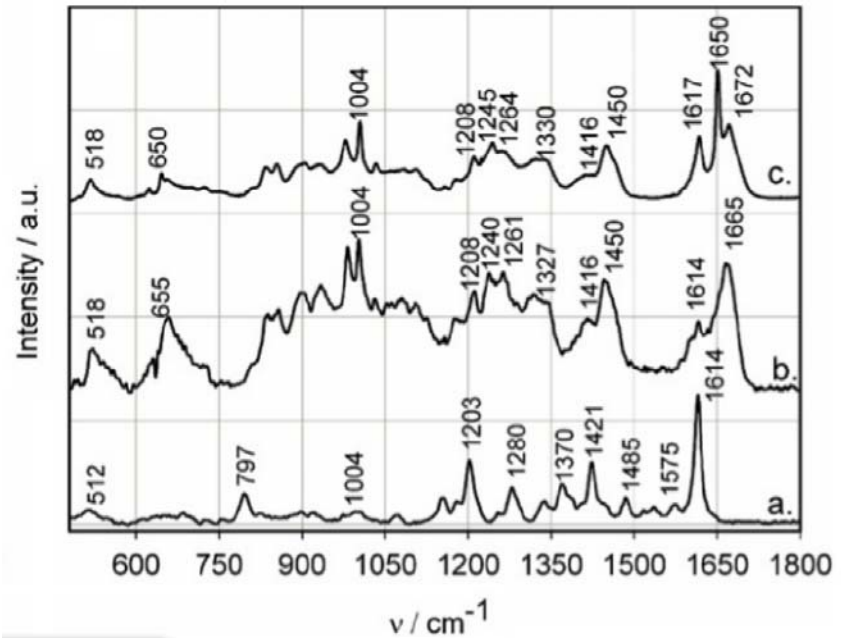


Figure I.19 : Spectres Raman de la protéine RNase-A. a) Spectre Raman d'une solution à 20 mM ; b) Spectre SERS d'une solution à 20 mM ; c) Spectre Raman de la protéine lyophilisée [David (2010)].

Pour les applications biocapteur dont le but est de détecter une protéine plutôt que d'analyser son spectre, les systèmes nanostructurés (nanoparticules, nanostructures obtenues par lithographie, etc) sont de plus souvent fonctionnalisés avec des « linkers» spécifiques facilitant l'accroche de protéines ou permettant de discriminer une protéine dans un milieu biologique (linker spécifique tel que les anticorps) [Fan (2008)].

Ces linkers peuvent avoir une forte influence sur les spectres SERS. Tout d'abord ils peuvent avoir une contribution qui s'ajoute au spectre de la protéine à détecter, et en interagissant avec la protéine, ils peuvent modifier sa structure et donc son spectre. En créant un espace entre la nanoparticule et la protéine, ils peuvent également diminuer voire empêcher l'exaltation du signal Raman de la protéine.

Par ailleurs, de nombreux travaux utilisent un chromophore pour détecter les protéines par SERS de manière indirecte par marquage [Fang (2008)]. Cela permet un meilleur signal en se plaçant dans les conditions de la spectrométrie SERS résonante (SERRS), mais modifie les conditions d'observation de la protéine, de la même façon que le « linker ».

Dans ce contexte, il est donc important de comprendre comment les nanoparticules métalliques (Au, Ag) se comportent au sein d'un milieu biologique, comment elles interagissent avec les molécules présentes et en premier lieu avec les protéines.

I.4) Spectrométrie SERS appliquée à l'étude de films minces inorganiques

La spectrométrie Raman exaltée de surface a été développée à partir de la possibilité d'adsorber des molécules de l'analyte à la surface du substrat actif SERS. La majorité des travaux utilisant cette approche se sont focalisés dans la détection et l'étude de petites molécules, protéines, de l'ADN, de l'ARN, des bactéries et même des cellules [Fang (2008)] ; [Scaffidi (2009)].

Très peu de travaux ont utilisé la spectrométrie SERS pour l'étude de nano-objets et de films ultraminces inorganiques d'épaisseur nanométrique qui demandent de techniques et des conditions d'élaboration spécifiques.

Les difficultés pour la mise en ouvre de l'effet SERS, qui nécessite une distance inférieure ou de l'ordre de 15 nm entre la matière à analyser et les nanostructures exaltantes, sont la principale raison. Deux approches ont été utilisées le plus souvent dans ce but. La première consiste à utiliser des substrats actifs SERS sur lesquels des dépôts ultraminces sont réalisés par une voie humide, notamment par la méthode sol-gel.

C'est l'approche utilisée par Nardou et al. [Nardou (2011)] et Degioanni et al. [Degioanni (2013)] qui ont étudié ainsi par SERS des couches ultraminces de TiO_2 amorphe sur des substrats SERS commerciaux Klarite®. Les recuits nécessaires pour éliminer les solvants nécessaires dans la méthode sol-gel ont été limités à une température de 200 °C pour éviter la dégradation des substrats Klarite®.

Dans ces conditions, la structure amorphe des films donne lieu à un spectre Raman (fig. I.20) qui diffère sensiblement de ceux donnés dans la littérature pour des couches minces de TiO_2 déposés par d'autres techniques (PVD par exemple). [Boukrouh (2008)]

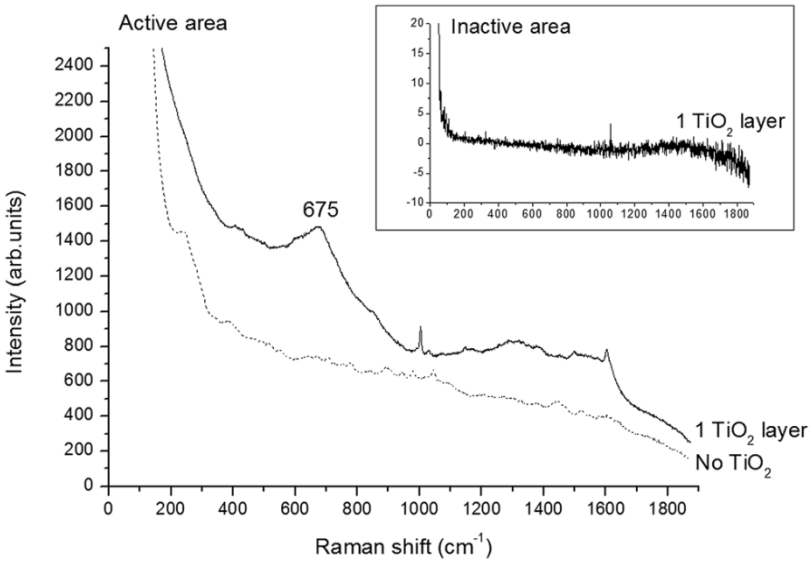


Figure I.20 : Spectres Raman des zones actives (courbe continue) et inactive (courbe discontinue) du substrat Klarite® recouvert du film sol-gel de TiO_2 de 8 nm d'épaisseur pour une excitation laser à 780 nm. [Degioanni (2013)]

La deuxième approche consiste à déposer des nanostructures d'or ou d'argent sur les nano-objets ou films à étudier. Cette méthode a été utilisée sur des nanotubes de carbone [Lefrant (2002)] et très récemment sur des films nanométriques de TiO_2 élaborés par Atomic Layer Deposition (ALD). [Lin (2012)] ; [Kawasaki (2013)] Dans ces dernières études, Lin et al. étudient des films de TiO_2 avec des épaisseurs allant de 2 à 20 nm (fig. I.21).

L'absence de pics associés au TiO_2 dans le spectre Raman conventionnel, notamment pour le film de 20 nm d'épaisseur, ainsi que les résultats obtenus par GIXRD, sont interprétés comme une conséquence de la structure amorphe des films. Cependant les spectres Raman exaltés par les nano-îlots d'or déposés à la surface des films montrent le pic $E_g(1)$ de la phase anatase de TiO_2.

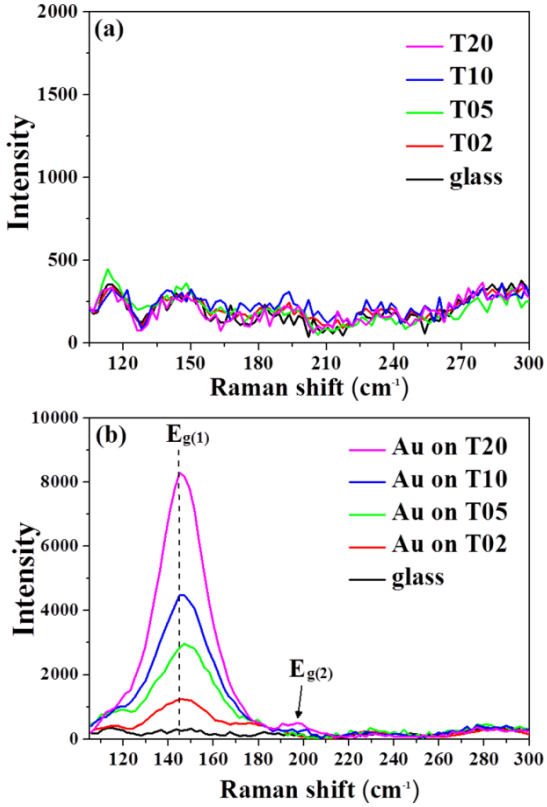


Figure I.21 : Spectres Raman (a) conventionnel et (b) SERS des films de TiO_2 déposés par ALD sur un substrat en verre. Epaisseur des films : 2, 5, 10 et 20 nm. Excitation : 532 nm. [Lin (2012)]

Dans le chapitre IV nous présentons une approche différente que nous avons développée pour résoudre ces problèmes, basée également sur la technique ALD pour le dépôt de TiO_2 à basses températures sur des substrats SERS fabriqués en laboratoire.

Synthèse du chapitre I

Dans ce chapitre nous avons posé les bases théoriques nécessaires à la compréhension des autres parties de la thèse. La spectrométrie Raman a été présentée ainsi que le cas particulier de l'étude des vibrations acoustiques dans des nanoparticules qui a été utilisé pour les études présentés dans le chapitre quatre. Les mécanismes donnant lieu à l'exaltation du signal Raman par effet SERS ont également été explicités, ainsi que le développement de la spectrométrie SERS depuis son origine. Enfin, l'utilisation de la spectrométrie SERS pour l'étude de protéines, et des films ultraminces inorganiques a été présentée pour servir de base à l'explication de nos objectifs et de nos travaux présentés dans les chapitres de résultats.

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Dans ce chapitre nous allons présenter les différents systèmes étudiés dans le cadre de cette thèse, les protocoles expérimentaux utilisés pour leur synthèse et les techniques de caractérisation employées.

II.1) Elaboration de substrats pour la spectrométrie SERS

II.1.1-Synthèse des nanoparticules d'or et d'argent

Les nanoparticules d'or et d'argent sont utilisées depuis des siècles pour les propriétés optiques et décoratives qu'elles apportent à des verres utilisés pour des vases et des vitraux. Néanmoins le concept de nanoparticules est beaucoup plus récent et l'intérêt pour les nanoparticules d'or et d'argent est intimement lié à l'exploitation de leurs propriétés plasmoniques, par exemple pour la spectrométrie SERS.

La méthode la plus simple, la plus ancienne et la plus utilisée encore actuellement pour synthétiser des nanoparticules d'or et d'argent est la méthode de Turkevich et al. [Turkevich (1951)] dont il existe de nombreuses variantes [Lee (1982)] ; [Aiken (1999)] ; [Bönnemann (2001)] ; [Xia (2009)]. Le principe consiste à mettre en contact un sel d'or ou d'argent avec un agent réducteur, le citrate de sodium, qui va réduire les ions métalliques en métal. De plus les molécules de citrate, et ses dérivés, vont se fixer sur la surface des particules en formation, jouant le rôle de stabilisant et stoppant ainsi la croissance du métal à une échelle nanométrique. En jouant sur le ratio sel métallique/citrate, il est donc possible d'obtenir des nanoparticules de tailles diverses.

L'avantage de cette méthode est l'utilisation de citrate de sodium qui agit à la fois comme agent réducteur et comme agent stabilisant lors de la synthèse, limitant ainsi au maximum le nombre de réactifs. Il est ainsi possible d'obtenir des particules de tailles très variées, monodisperses, avec une forme sphérique.

L'autre avantage de cette synthèse est que l'agent stabilisant en surface des nanoparticules, le citrate de sodium, est une molécule facile à éliminer (plasma cleaner) ou à remplacer car de nature organique et liée aux particules par une simple attraction électrostatique.

En revanche, si l'on veut disposer de nanoparticules de formes plus complexes (triangles, étoiles, …) il faut faire appel à différents agents stabilisants qui permettront la croissance de la particule selon des plans privilégiés [Grabar (1995)].

D'autres voies de synthèse existent, avec la même approche « bottom up », c'est à dire par croissance de la particule à partir d'un germe, telles que la réduction électrochimique de sels métalliques [Reetz (1994)] et la réduction à partir de composés organométalliques [Fukuoka (1999)]. Il existe également d'autres approches par enlèvement de matière d'un objet macroscopique d'or ou d'argent pour obtenir un objet de taille nanométrique, telles que la vaporisation métallique [Lin (2012)] ou l'ablation laser [Song (2007)].

Dans le cadre de notre étude, les nanoparticules d'or ont été synthétisées par la méthode de Turkevich et al [Turkevich (1951)] pour sa grande simplicité et la facilité à éliminer les citrates stabilisant les particules (facilement éliminables par plasma cleaner).

Sur la figure II.1 est schématisé le montage à reflux employé pour la synthèse des nanoparticules.

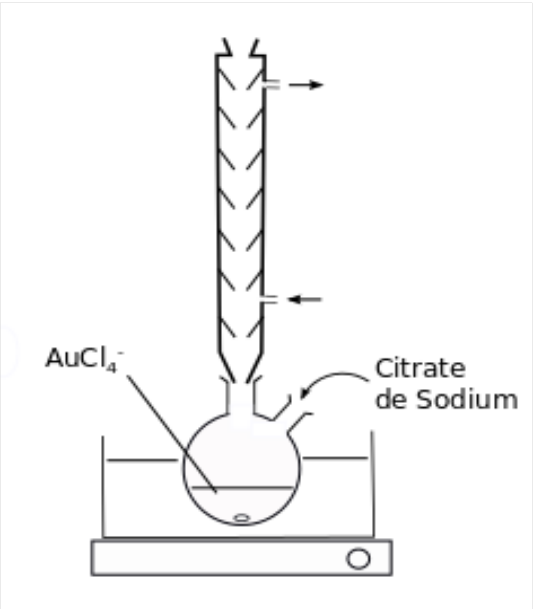


Figure II.1 : Schéma du montage à reflux utilisé pour la synthèse de nanoparticules métalliques.

Protocole de synthèse :

- La verrerie est tout d'abord nettoyée à l'eau régale (HNO_3 1:3 HCl) afin d'éliminer toutes les impuretés qui risqueraient de servir de point de germination et d'agglomération des particules en formation.

- 20 mL d'une solution à 2.10^{-3} M de sel ($HAuCl_4$, $3H_2O$ pour l'or et $AgNO_3$ pour l'argent) est mise à chauffer à 100 °C.

- Lorsque l'ébullition, contrôlée grâce à un thermocouple, est bien effective, une quantité ajustée d'une solution à 0,5 M de citrate de sodium ($C_6H_5Na_3O_7$) est rajoutée dans le milieu réactionnel. En quelques minutes, la solution devient noire, puis rouge ou violette en fonction de la taille des particules pour l'or et gris/jaune pour l'argent.

- La solution est laissée à 100 °C durant 30 minutes, puis refroidie, extraite du ballon et diluée afin que la concentration finale en métal de la suspension soit de 10^{-3} M.

- Les proportions de sels métalliques et de citrate dépendent de la taille des particules voulues. Pour la plupart des expériences réalisées les particules utilisées avaient une taille comprises entre 30-60 nm pour une proportion métal/citrate de 1/0,67.

De nombreux paramètres peuvent perturber la synthèse et en conséquence modifier la taille des particules obtenues, les rendre polydisperses ou qu'elles s'agrègent. Il faut, comme expliqué auparavant, avoir une vaisselle particulièrement propre (bien rincée également après synthèse car il reste évidemment des particules sur la verrerie) et en bon état (les rayures sur le verre sont source d'agrégation). Il est important également de bien respecter les températures de réaction et de ne pas trop diluer les espèces en présence. Selon les travaux de Kumar et al. [Kumar (2007)] (fig. II.2), cela s'explique par le mécanisme de synthèse des nanoparticules qui comporte une étape de germination, de croissance, puis de coagulation. Si la solution est trop diluée, l'étape de coagulation ne peut se produire et les particules ne peuvent grandir au delà d'une quinzaine de nanomètres.

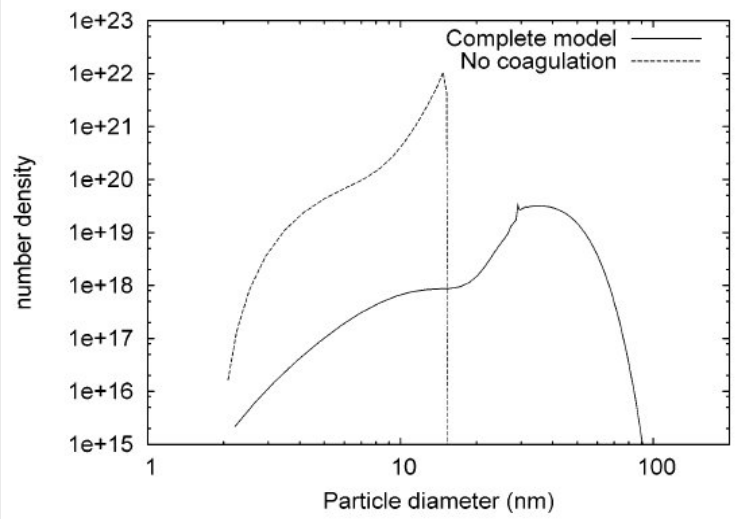


Figure II.2 : Importance de l'étape de coagulation sur la croissance des particules d'or [Kumar (2007)].

Pour les nanoparticules d'argent, il est également important de prendre en compte la lumière ambiante qui joue un rôle dans la formation des particules. Des changements de luminosité lors des synthèses peuvent produire des résultats différents de ceux attendus.

II.1.2-Caractérisation des nanoparticules d'or synthétisées

Deux méthodes d'analyse ont permis de caractériser les suspensions de nanoparticules synthétisées : la microscopie électronique à balayage (MEB) et la spectrométrie d'absorption UV-Visible.

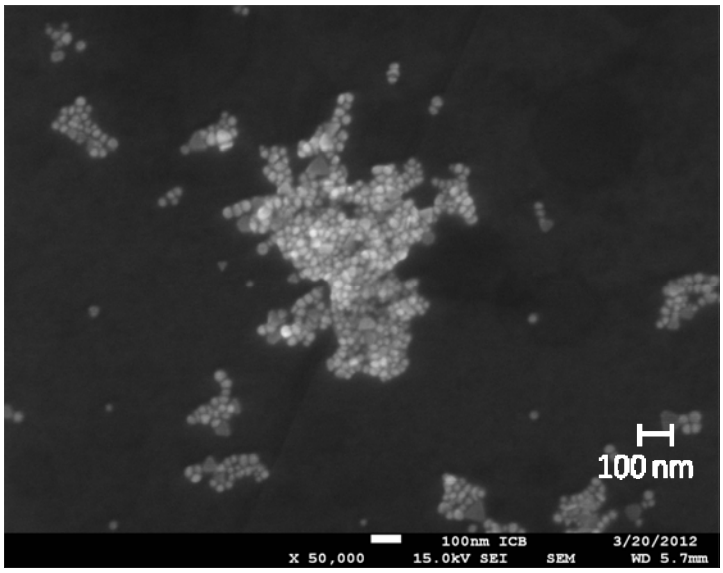


Figure II.3 : Observation au microscope électronique à balayage d'une goutte de suspension de nanoparticules d'or synthétisée déposée et séchée sur une lame de silicium.

Les images obtenues par MEB d'un dépôt de la suspension de particules sur une surface de silicium permettent d'observer la morphologie, la taille et la dispersion des nanoparticules. Comme présenté sur la figure II.3, nous avons obtenue des nanoparticules d'or relativement monodisperses en taille et en forme. La taille des particules autour de 40 nm correspond à un maximum des possibilités d'exaltation en spectrométrie SERS pour les particules d'or [Schückler 2011].

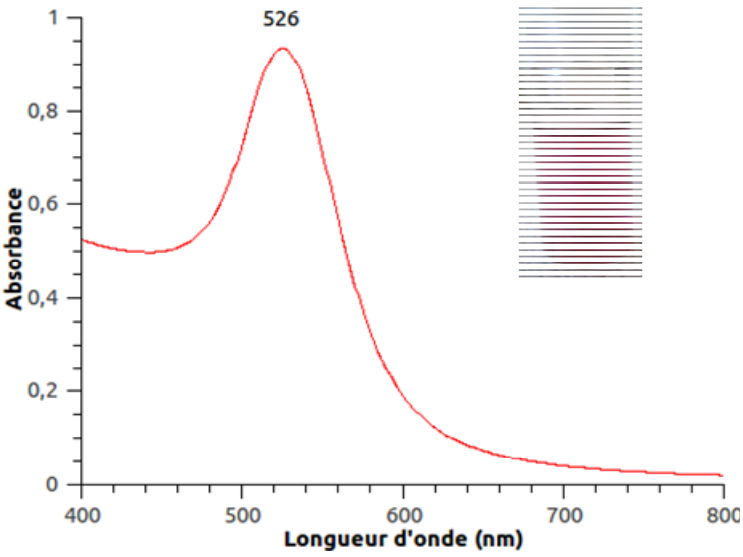


Figure II.4 : Spectre d'absorption UV-Visible d'une suspension de nanoparticules d'or dans

l'eau.

La figure II.4 montre le spectre d'absorption obtenu pour la même suspension de nanoparticules d'or et une photographie de celle-ci. La couleur de la suspension et la bande d'absorption centrée à 526 nm rendent compte de la résonance plasmon des nanoparticules d'or. La position de la bande d'absorption correspond à une taille de nanoparticules d'or d'environ 30-50 nm (fig. II.5) [Link (1999)], ce qui est en accord avec la taille observée par MEB (fig. II.3). Cependant, comme il montré dans la figure II.5, la position de la bande d'absorption varie peu pour une taille de nanoparticules allant de 10 à 50 nm. Si la position de la bande d'absorption est le premier critère de contrôle d'une suspension, l'observation par microscopie électronique permet d'affiner ce contrôle et d'évaluer la dispersion en taille des nanoparticules.

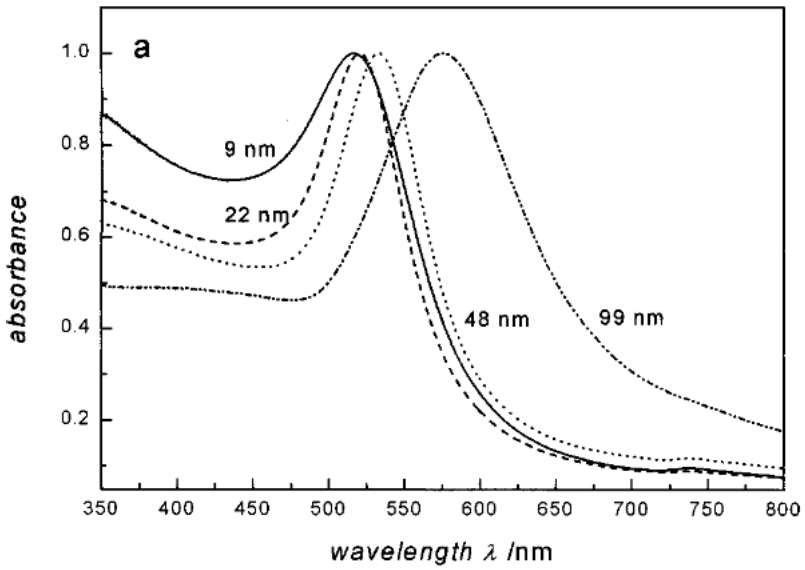


Figure II.5 : Spectres d'absorption UV-Visible de suspensions aqueuses de nanoparticules d'or avec un diamètre de 9, 22, 48, et 99 nm. La position du pic d'absorption est de 517, 521, 533, et 575 nm, respectivement. [Link 1999]

II.1.3-Fonctionnalisation de substrats

La fonctionnalisation de substrats préalable au dépôt de nanoparticules métalliques permet de fixer plus efficacement les particules sur la surface, d'utiliser moins de suspension et d'obtenir une meilleure répartition des nanoparticules sur toute la surface. Elle réduit les irrégularités en termes de relief, de formation d'agrégats et de répartition qui apparaissent si les particules sont simplement déposées sur la surface par séchage de la suspension. La fonctionnalisation des substrats se fait par la formation d'une couche auto-assemblée. Le principe est de permettre aux substances à déposer sur le substrat de se répartir sur toute sa surface, si possible en une monocouche homogène ou à défaut en un film mince et le plus régulier possible.

Il existe de nombreuses voies de fonctionnalisation en fonction du type d'échantillon et du résultat voulu (dépôt continu, couches très fines ou dépôt plus épais, espacement des molécules). [Park (1999)] ; [Brown (2008)] Dans le cas de dépôts de nanoparticules pour une application SERS, l'objectif est la création de points chauds répartis sur l'ensemble du substrat. Il faut donc éviter que les particules s'agrègent au risque de perdre leurs propriétés optiques et de créer des irrégularités de surface, mais il faut également qu'elles soient suffisamment proches (quelques nanomètres) pour produire des points chauds. Pour cela une méthode simple consiste à utiliser une molécule d'interface, un « linker » qui va se greffer sur la surface du substrat et se lier avec les nanoparticules. En fonction de la taille du « linker », de son nombre de sites d'adsorption, ou de sa répartition sur la surface, l'espacement entre les nanoparticules sera plus ou moins grand. Pour contrôler d'avantage la répartition des nanoparticules sur la surface, il est également possible de recourir à une seconde molécule, un « spacer » dont le seul rôle est d'espacer les sites d'adsorption.

Pour délimiter les zones fonctionnalisées, il est possible d'utiliser la lithographie dont le principe le plus classique est d'appliquer un masque sur le substrat, de déposer les nanoparticules à l'aide d'un « linker », puis de retirer le masque. Ainsi les nanoparticules seront présentes uniquement dans ces zones bien délimitées.

Dans le cas de notre étude, nous avons déposé nos nanoparticules sur des lames de verre ou des wafers de silicium. En surface de ces substrats apparaissent des groupements Si-OH susceptibles de former des liaisons Si-O-Si. Les nanoparticules peuvent être liées au « linker » par une liaison chimique telle que la liaison S-Au pour les nanoparticules d'or via un groupement thiol en bout de chaine du « linker » ou plus simplement par une liaison électrostatique entre un groupement chargé du « linker » et la charge inverse du stabilisant en surface des particules. C'est le principe de la silanisation que nous avons utilisé (fig. II.6). [Flink (2001)] ; [Olson (2001)].

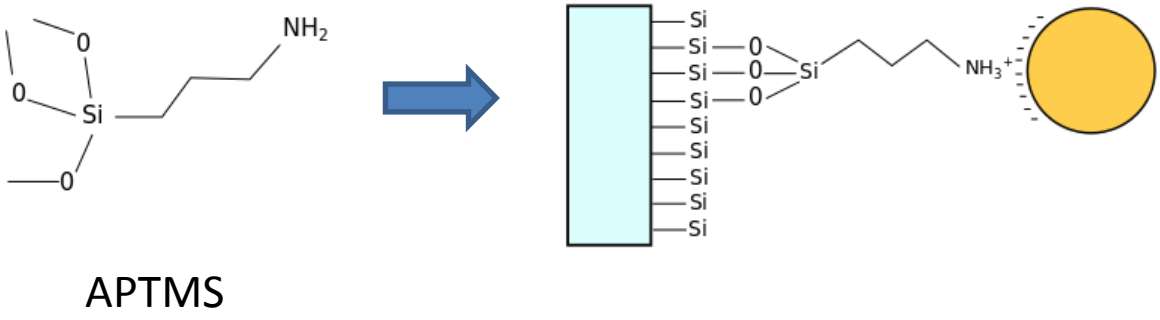


Figure II.6 : Schéma du procédé de silanisation de la surface de verre avec l'APTMS.

L'APTMS (3-aminopropyltrimethoxysilane) se fixe en créant des ponts Si-O-Si avec les silanols présents sur la surface de verre et fixe les nanoparticules grâce aux interactions électrostatiques entre son groupement NH_3^+ et les dérivés de citrate présents sur la surface des nanoparticules chargées négativement.

Protocole de silanisation :

- Préparation d'une solution à 3% (v/v) d'APTMS (ou APTES) dans l'éthanol.

- Nettoyage des lames de verre avec de l'eau régale (HNO_3 1:3 HCl) pour enlever toute impureté de la surface et l'activer (favoriser la formation de groupements silanols), puis rinçage avec de l'eau déionisée puis avec de l'éthanol.

- Plonger les lames dans la solution d'APTMS (3%) pendant 30 minutes.

- Rincer abondamment à l'éthanol.

- Plonger dans l'éthanol à 60 °C pendant 10 minutes.

- Rinçage à l'éthanol puis séchage à l'azote.

- Mise à l'étuve à 100 °C pendant 30 minutes.

Ensuite, pour fonctionnaliser avec des nanoparticules d'or ou d'argent la lame ainsi préparée, la technique employée a été de déposer une goutte de la suspension dans un réceptacle adapté à la taille du substrat, puis de déposer la lame sur la goutte afin qu'elle s'étale et que les nanoparticules s'accrochent à la surface. Après une heure de contact, la lame est nettoyée à l'eau déionisée puis séchée à l'azote.

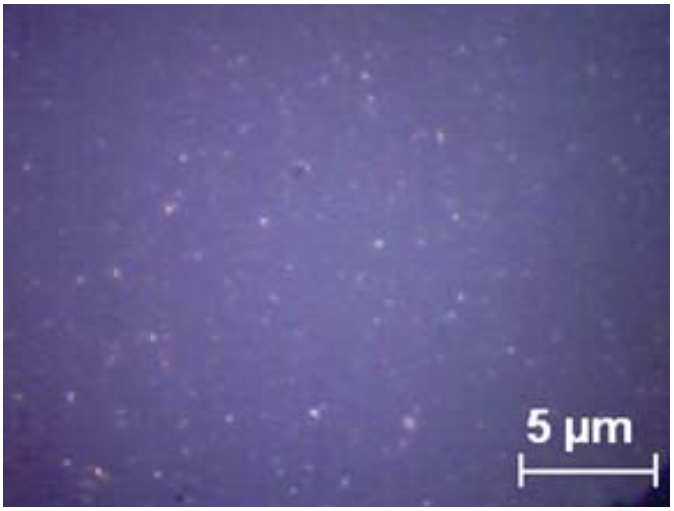


Figure II.7 : Image au microscope optique d'une surface de verre fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or.

Une fois fonctionnalisée et sèche, la lame est nettoyée au plasma cleaner afin d'éliminer tous les polluants organiques sur la surface et en particulier le citrate de sodium et ses dérivés présents sur les nanoparticules (fig. II.7). Leur présence perturbe à la fois l'accroche des analytes, et la reproductibilité des acquisitions lors des études par spectrométrie SERS (contributions spectrales des citrates).

II.1.4-Tests des substrats SERS

Afin de tester l'efficacité de nos substrats pour la spectrométrie SERS, nous avons utilisé des colorants, généralement employés comme référence en spectrométrie Raman par la possibilité d'utiliser une excitation résonante avec leur bande d'absorption. Les deux colorants utilisés dans ce travail ont été le bleu de méthylène (BM) et le cristal violet (CV) qui présentent des bandes d'absorption intenses dans le visible (fig. II.8). Il est possible donc d'utiliser une source laser d'excitation dans le rouge (avec un laser He-Ne à 633 nm par exemple) résonante à la fois avec les plasmons des nanoparticules d'or et les bandes d'absorption des deux colorants.

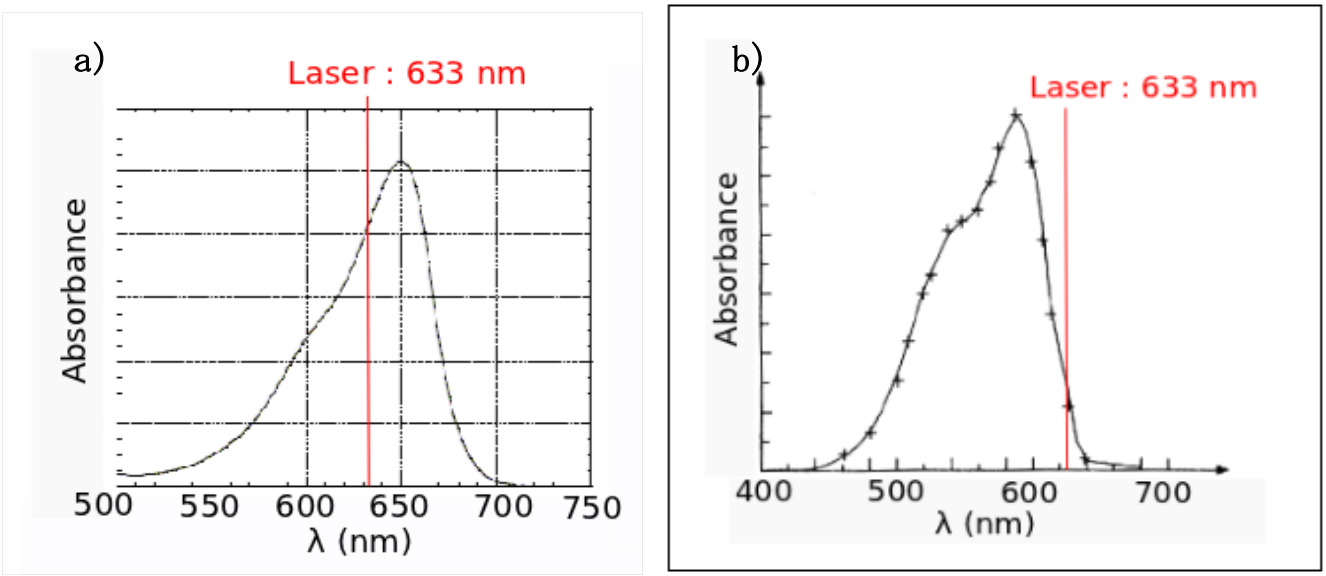


Figure II.8 : Spectres d'absorption : (a) bleu de méthylène, (b) du cristal violet.

Des solutions de ces deux colorants, BM et CV, concentrées à $0{,}5.10^{-6}$ M ont été déposées par spin-coating sur des lames de verre fonctionnalisées avec des nanoparticules d'or. La goutte d'échantillon est déposée sur la lame de verre, puis celle-ci, maintenue par un système de vide, est mise en rotation rapide afin que la goutte s'étale sur toute la surface de manière homogène et que l'excédent soit éliminé.

La quantité de matière des colorants ainsi déposée est très faible et leur présence n'est pas détectée par spectrométrie Raman conventionnelle (fig. II.9). Par effet SERS dans les zones contenant des nanoparticules d'or (points brillants sur la figure II.7), les pics caractéristiques du bleu de méthylène à 1400 cm^{-1} et 1624 cm^{-1} sont visibles malgré une faible puissance laser (1,2 µW) et un temps d'acquisition court (10 s).

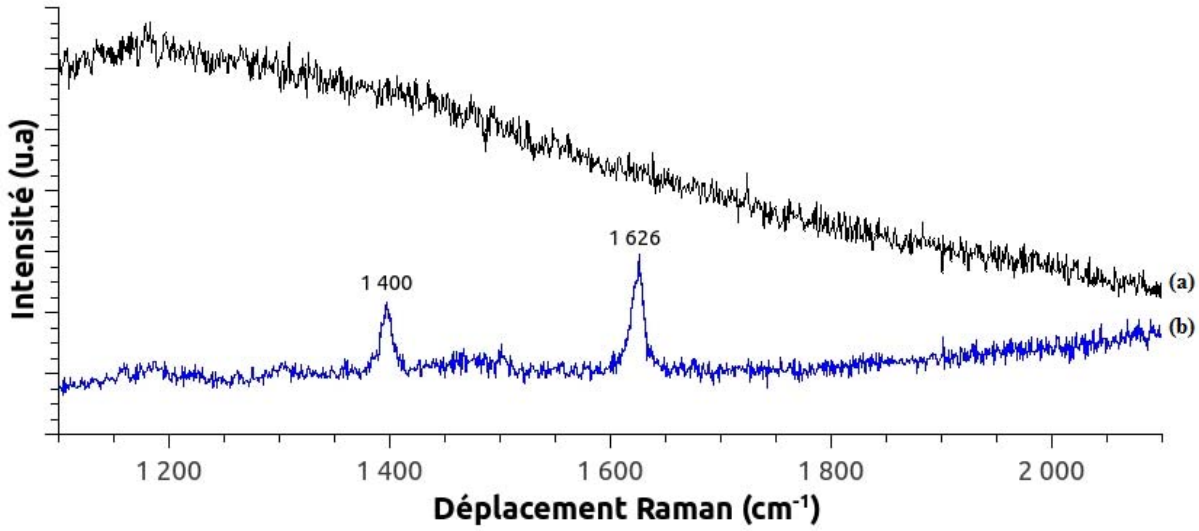


Figure II.9 : Spectres Raman obtenus pour une solution de bleu de méthylène concentrée à $0{,}5.10^{-6}$ M déposée par spin-coating sur une lame de verre fonctionnalisée avec des particules d'or. Zone analysée : (a) hors nanoparticules d'or ; (b) avec de nanoparticules d'or. Longueur d'onde d'excitation : 633 nm. Puissance laser : 1,2 µW. temps d'acquisition : 10 s.

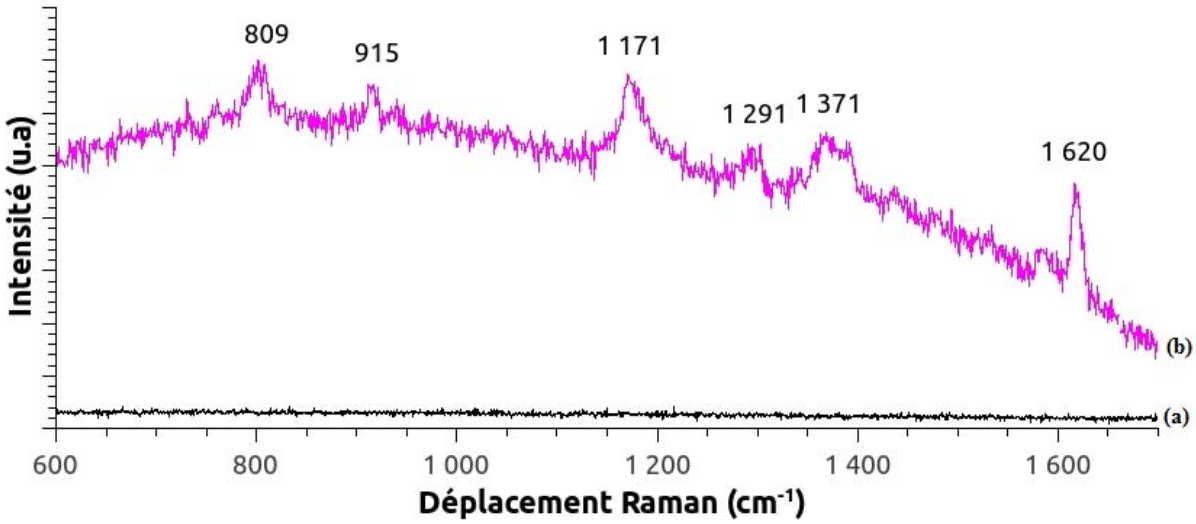


Figure II.10 : Spectres Raman obtenus pour une solution de cristal violet (CV) concentrée à $0{,}5.10^{-6}$ M déposée par spin-coating sur une lame de verre fonctionnalisée avec des particules d'or. Zone analysée : (a) hors nanoparticules d'or ; (b) avec de nanoparticules d'or. Longueur d'onde d'excitation : 633 nm. Puissance laser : 1,2 µW. temps d'acquisition : 10 s.

Les mêmes observations sont faites pour le cristal violet (fig. II.10), détectable même pour des temps d'acquisition d'une seconde. Les substrats utilisés sont donc viables pour effectuer des analyses SERS..

II.2) Synthèses de nanoparticules bio-conjuguées

La manipulation et l'analyse de protéines dans des conditions respectueuses de leur structure impose tout d'abord de les conserver dans un milieu humide pour ne pas briser les liaisons hydrogènes garantes du repliement de la protéine. D'autre part, pour les analyses par spectrométrie SERS il est également important de limiter les espèces intermédiaires entre la nanoparticule et la protéine.

Réunir ces deux conditions n'est pas simple car les suspensions de nanoparticules ne sont stables que si les nanoparticules sont entourées de molécules stabilisantes qui leur permettent de se repousser entre elles. Ces molécules constituent alors un obstacle entre la particule et la protéine. Il n'est pas possible de les éliminer puis de faire interagir les protéines avec les nanoparticules car celles-ci s'agrègent immédiatement si elles ne sont plus stabilisées.

L'adsorption des protéines sur les molécules stabilisantes peut compromettre l'exaltation de leur signal Raman. De plus, le signal exalté de la molécule stabilisante peut être superposé à celui de la protéine.

Autrement, il est envisageable de faire en sorte que la protéine puisse remplacer la molécule stabilisante en ayant plus d'affinité pour la nanoparticule. Cette solution est possible, mais nécessite de se placer dans des conditions du milieu (pH, force ionique) risquant d'altérer les protéines et d'agréger les nanoparticules. Par ailleurs, la taille importante des protéines ne garantit pas un très bon remplacement des molécules stabilisantes et surtout aucun contrôle sur le rendement de substitution.

Pour pallier à toutes ces difficultés, nous avons opté pour une approche différente dans le cadre de cette thèse : utiliser directement les protéines comme agents stabilisants lors de la synthèse des nanoparticules.

Les nanoparticules bio-conjuguées sont des nanoparticules métalliques synthétisées utilisant des protéines comme agents réducteurs et stabilisants [Singh (2005)] ; [Tom (2007)] ; [Shankara Narayanan (2008)] ; [Gautam (2013)]. A l'image de la biominéralisation, c'est-à-dire la synthèse de matériaux par des cellules, les nanoparticules ainsi formées sont stabilisées par des protéines naturellement présentes dans l'organisme. Recouvertes d'une substance conciliable avec les milieux biologiques, les nanoparticules bio-conjuguées sont donc considérées comme biocompatibles, c'est à dire qu'elles ne sont pas liées à des espèces dangereuses pour l'organisme et que celui-ci est plus susceptible de les accepter. [Bakshi (2010)] ; [Khullar (2012)]

Dans notre étude, l'intérêt majeur de fabriquer et d'étudier ces nanoparticules bio-conjuguées est d'avoir un système simple contenant une interface directe protéine/nanoparticule en solution, sans aucun élément parasite. Ainsi, les nanoparticules bio-conjuguées constituent un système modèle pour l'analyse SERS des protéines.

Par ailleurs, étudier l'évolution de la structure des protéines adsorbées à la surface des nanoparticules présente un grand intérêt pour comprendre le comportement des nanoparticules dans un milieu biologique, et notamment le fonctionnement d'interactions non spécifiques sur des nanoparticules fonctionnalisées. Plusieurs études ont démontré la formation d'une « enveloppe » de protéines autour des nanoparticules lorsque celles-ci sont placées dans un milieu biologique. Cette enveloppe influe fortement sur le comportement de la nanoparticule dans le milieu. [Lundqvist (2011)]

Comme l'interaction qui se crée entre les protéines et la nanoparticule va modifier la structure de cette dernière, entraînant une modification de sa réactivité et donc une modification de ses propriétés biologiques [Nakanishi (2001)], il est possible d'imaginer qu'une protéine ayant une fonction biologique particulière, va voir cette fonction être modifiée, voire annulée par l'interaction avec la nanoparticule. La réactivité de cette « enveloppe » de protéines peut donc avoir un impact très fort sur la capacité de la nanoparticule bio-conjuguée à pénétrer dans les cellules, se fixer spécifiquement sur certaines protéines, ou être éliminée par l'organisme.

Il est envisagé d'utiliser ces nanoparticules pour des applications telles que l'imagerie médicale ou les traitements thérapeutiques du cancer. Or si par leur réactivité ces systèmes protéines-nanoparticules ne réagissent pas de la manière attendue, ils peuvent être inutiles voire toxiques pour l'organisme. Comprendre l'interaction nanoparticule/protéine est donc un enjeu majeur pour la compréhension de la toxicité des nanoparticules. [Donaldson (2004)] ; [Barnes (2008)] ; [Mahato (2010)]. Enfin, un dernier intérêt à l'étude de ces systèmes protéines/nanoparticules bio-conjuguées est la compréhension du mécanisme de synthèse de ces particules. Actuellement il est peu connu et présente un grand intérêt à la fois pour maitriser la synthèse de ces particules, mais également pour mieux comprendre les réactions entre les protéines et les espèces inorganiques. Par l'étude de la modification de la structure de la protéine, de premiers indices sont ainsi mis en avant.

La synthèse de nanoparticules bio-conjuguées se fait selon le même principe que la méthode de Turkevich et al. [Turkevich (1951)]. Un sel métallique est utilisé comme précurseur ($AgNO_3$). Les ions métalliques sont réduits et la nanoparticule en formation est stabilisée par la protéine. Les nanoparticules synthétisées par cette méthode sont des nanoparticules d'argent notamment car l'argent est facilement réductible en présence de lumière.

De plus, les nanoparticules d'argent présentent un effet d'exaltation particulièrement important dans la gamme de longueurs d'onde laser envisagée.

Protocole de synthèse :

- 0,5 mg de protéine lyophilisée sont dissous dans 10 mL de solvant. La solution est portée à 37°C (température de l'organisme, pour activer la protéine sans la détériorer) sous agitation.

- Ajout de 100 µL d'une solution à 0,1 M de $AgNO_3$. Le milieu réactionnel est gardé sous agitation pendant 3h.

- Par la suite, afin d'améliorer le contrôle de la réaction et son rendement, cette synthèse sera réalisée dans le noir, sous l'éclairage d'une lampe UV de faible puissance (fig. II.11).

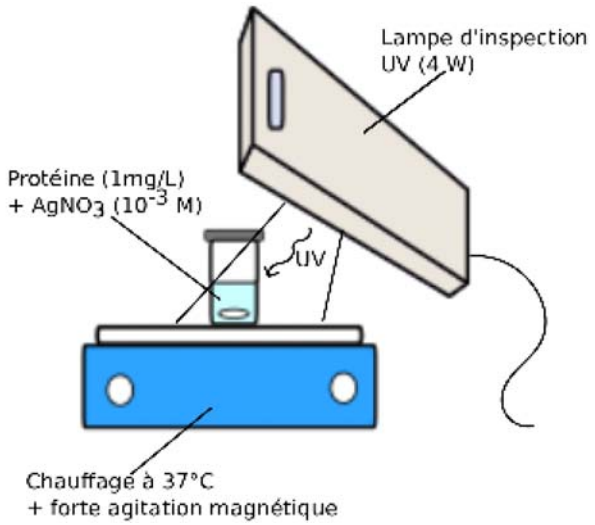


Figure II.11 : Schéma du montage utilisé pour la synthèse des nanoparticules bio-conjuguées sous UV.

La couleur de la solution de départ dépend de la nature de la protéine (rouge pour l'hémoglobine et incolore pour la BSA par exemple) et la couleur à la fin de la synthèse est jaune/gris en fonction de la couleur de la solution de la protéine de départ (toute la masse de protéine n'est pas utilisée lors de la synthèse) et du rendement de la solution (plus il y a de particules formées, plus la solution est foncée).

La lampe utilisée lors des synthèses sous UV est un modèle UVGL-25 PL commercialisée par UVP. Sa puissance est de 4 W et propose deux longueurs d'onde différentes : 365 nm et 254 nm. C'est la longueur d'onde 365 nm qui a été utilisée pour les synthèses.

Lorsque la synthèse est finie, le barreau aimanté est retiré de la solution et celle ci est stockée dans un réfrigérateur à l'abri de la lumière. La suspension de nanoparticules bioconjuguées est particulièrement stable par rapport à une solution de nanoparticules Turkevich. Elle est stabilisée à la fois par un effet électrostatique grâce aux charges des protéines et par un effet stérique dû à la taille importante des protéines.

Avant chaque analyse, 1 mL de la suspension est prélevé et centrifugée à 13,4 rpm pendant 5 minutes. La partie liquide est éliminée et remplacée par 100 µL d'eau déionisée. Pour redisperser les particules, un appareil à ultrason est utilisé. Ainsi, les espèces n'ayant pas réagi pendant la synthèse sont éliminés (protéine, ions argent et ions nitrate) et la solution est concentrée 10 fois.

Pour la synthèse de nanoparticules bioconjuguées Ag:lysozyme, le méthanol a été utilisé comme solvant car il permet une meilleure ouverture de la protéine et donc une meilleure réactivité sans pour autant la dénaturer. Cette méthode est directement inspirée de la méthode d'Eby et al. [Eby (2009)]. Les mêmes quantités de réactifs ont par ailleurs été utilisées. La réaction a lieu sous irradiation UV. La solution est centrifugée, puis redispersée dans de l'eau déionisée avant chaque analyse.

II.3) Elaboration de films minces nanostructurés

Des films minces nanostructurés à base de dioxyde de titane (TiO_2) et de nanoparticules d'or ont été élaborés avec deux objectifs différents. Dans le premier cas, des films nanocomposites ont été obtenus par recuit de films de TiO_2:Au élaborés par pulvérisation cathodique magnétron réactive contenant une faible concentration d'or. Le but était d'étudier les premiers stades de la formation de nanoparticules d'or au sein d'une matrice de TiO_2.

Ces dépôts ont été réalisés par l'équipe du Professeur F. Vaz à l'Université de Minho (Portugal) dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire ICB.

Dans la seconde étude, des films ultraminces de TiO_2 ont été déposés par DLI-ALD (Direct Liquid Injection Atomic Layer Deposition) sur des substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. Le but était la mise en œuvre de l'effet SERS pour l'étude de films ultraminces de quelques nanomètres d'épaisseur. La mise au point de procédé d'élaboration de couches ultraminces de TiO_2 par la methode DLI-ALD a fait l'objet d'une publication [Avril 2014].

II.3.1-Dépôts de couches minces nanocomposites TiO_2:Au par pulvérisation cathodique réactive

Il y a un grand intérêt dans l'utilisation de nanoparticules de métaux nobles intégrées dans des matériaux à hauts indices optiques tels que le dioxyde de titane (TiO_2) en raison de leur potentiel pour un large éventail d'applications technologiques en optoélectronique comme filtres, capteurs, matériaux photochromiques ou guides d'ondes actifs et en photocatalyse [Walters (2009)] ; [Jain (2007)]. Les propriétés intéressantes de ces nanocomposites sont essentiellement dues à la résonance plasmonique de surface des particules de métaux nobles. Cette forte bande d'absorption, habituellement dans la gamme UV-Visible, est régie par la morphologie des nanoparticules de métaux nobles, leur taille, leur forme et la constante diélectrique du milieu environnant [Sirotkin (2012)].

La croissance de films minces de TiO_2:Au peut être réalisée par différentes méthodes telles que les méthodes sol-gel [Zhao (1996)] ; [Epifani (2000)], des procédés électrochimiques [Elhajj (2010)], par implantation ionique [Alves (2012)], ou enfin par des procédés PVD (Physical Vapor Deposition) tels que la pulvérisation cathodique magnétron réactive [Torrell (2010a)]. Cette dernière approche a été utilisée par l'équipe du professeur Filipe Vaz à l'Université de Minho (Portugal) pour la réalisation de couches minces de TiO_2 contenant une concentration d'or d'environ 15 %at.

Des traitements thermiques ont conduit à la formation de nanoparticules d'or au sein de la matrice de TiO_2, donnant lieu à une structure nanocomposite [Torrell (2010a)] ; [Torrell (2010b)] ; [Torrell (2011)] ; [Macedo (2012)].

Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à étudier les premiers stades de la croissance des nanoparticules d'or. Dans ce but, des couches minces dopées avec une concentration d'or sensiblement plus faible (~5 %at) ont été étudiées.

Le principe de la pulvérisation cathodique consiste à vaporiser une cible par un processus purement physique, pour déposer le matériau cible sur un substrat (couche mince). L'application d'une différence de potentiel entre la cathode (cible à pulvériser) et l'anode (substrat) au sein d'une atmosphère raréfiée d'argon permet la formation d'une décharge électrique. La décharge électrique permet d'amorcer la formation d'un plasma d'argon. Les ions du plasma vont être accélérés par la différence de potentiel et venir percuter les atomes de la cible. Si leur énergie est suffisante, ils vont permettre l'éjection des atomes de la cible et la formation d'électrons secondaires. Les électrons secondaires vont permettre d'ioniser l'argon et entretenir le plasma. Il est possible de positionner un dispositif magnétron (ensemble de deux aimants concentriques de polarités inversées) sous la cible. Ce système permet de créer un champ magnétique intense parallèlement à la surface de la cible et donc de confiner le plasma proche de la cible. Ainsi l'augmentation du taux d'ionisation proche de la cible permet de maintenir la décharge à des pressions et des tensions plus basses que sans magnétron. Cela permet d'augmenter la vitesse de dépôt et d'améliorer la pureté et la qualité des dépôts. La présence de gaz tel que le dioxygène ou le diazote dans le mélange de gaz, permet de faire réagir chimiquement le matériau de la cible avec l'oxygène et de former un dépôt d'oxyde, de nitrures ou autre matériaux mixtes. D'autres gaz peuvent ainsi être introduits pour réaliser des dépôts mixtes. La stœchiométrie du film est alors fonction du débit de gaz réactif introduit dans le plasma.

Pour cette étude, la cible utilisée était constituée de titane (pureté 99,6%) et de huit pastilles d'or incrustées dans des zones préférentielles d'érosion du titane (au cours du processus de dépôt, la cible ne s'use pas de manière homogène ce qui peut entrainer une inhomogénéité de composition du dépôt réalisé au cours du temps). Le substrat était un wafer de silicium Si(100) et le gaz plasmogène était un mélange d'argon et d'oxygène avec des pressions partielles respectives de $3x10^{-1}$ Pa et $8x10^{-2}$ Pa.

La température du substrat était d'environ 150 °C au cours du dépôt. L'épaisseur de tous les films étudiés était d'environ 500 nm. L'affinité du titane avec l'oxygène conduit à la formation d'un dépôt de dioxyde de titane dopé par des atomes d'or.

Après la réalisation des dépôts, différents recuits ont été réalisés sur une même série d'échantillons pour étudier l'influence de la température de recuit sur la cristallisation de TiO_2 et la formation de nanoparticules d'or. Les échantillons ont été recuits à des températures allant de 200 à 800°C. Les échantillons, sous un vide secondaire d'environ 10^{-4} Pa, ont subi une montée en température de 5°/min, puis ont été maintenus 60 minutes à la température de consigne, avant de refroidir sous vide jusqu'à température ambiante.

II.3.2-Dépôts de couches ultra-minces de TiO_2 par DLI-ALD sur substrats SERS

La méthode de dépôt DLI-ALD a été utilisée pour déposer des couches ultraminces de TiO_2 de quelques nanomètres d'épaisseur sur des substrats fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or (dépôt par silanisation sur lame de silicium, cf. II.1.4). La méthode ALD permet de réaliser un dépôt par couches atomiques successives. La figure II.12 schématise les différentes étapes du procédé.

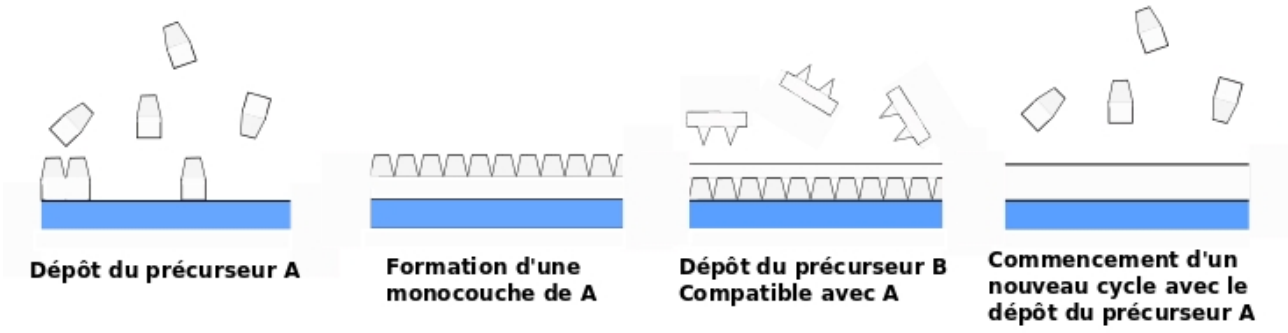


Figure II.12 : Schéma de principe du dépôt ALD.

Un premier précurseur gazeux A est introduit dans la chambre de réaction et vient se déposer sur le substrat par chimisorption ou physisorption, formant une monocouche de précurseur A.

Une purge est effectuée avec un gaz neutre afin d'éliminer l'excédent de A et les sous-produits de réaction. Puis un second précurseur B est introduit dans la chambre de réaction.

Le précurseur B ne peut réagir qu'avec la quantité de précurseur A disponible à la surface de l'échantillon, le reste est éliminé par une seconde purge. La couche ainsi réalisée sert alors de substrat pour un nouveau cycle de dépôt.

En fonction du nombre de cycles de dépôt, il est possible de contrôler l'épaisseur des dépôts au nanomètre près. Le premier avantage de cette technique est donc sa capacité à réaliser des dépôts d'une épaisseur très précise et/ou très fine. Le second avantage de la technique est que le dépôt suit le relief du substrat, ce qui est très intéressant dans le cas d'un substrat nanostructuré.

Dans notre étude, les films de TiO_2 ont été déposés sur des substrats Si(100) utilisant comme précurseurs du tétraisopropoxyde de titane ($Ti((OCH(CH_3)_2)_4$, pur à 99,99%) et de l'eau. Le système DLI-ALD utilisé est un dispositif MC-050 Annealsys (Kemstream) équipé d'injecteurs pulsés, permettant une fine atomisation de la solution du précurseur, d'un vaporisateur thermique et d'une chambre de réaction en quartz. La chambre est entourée de lampes halogènes infrarouges utilisées comme système de chauffage. Le tétratisopropoxyde de titane a été dissous dans du cyclohexane anhydre (pur à 99,99 %) avec une concentration de 5.10^{-3} M.

Du diazote (pur à 99,999 %) a été utilisé comme gaz porteur et comme gaz de purge entre deux injections de précurseurs. La vapeur d'eau, permettant l'apport d'oxygène pour la formation de l'oxyde, est maintenue dans un réservoir à température ambiante sous une pression de 3,5 bar de N_2 et sa libération est contrôlée par une vanne solénoïde.

Les substrats ont été nettoyés par ultrasons dans des solvants organiques, rincés à l'éthanol et séchés sous flux d'azote.

L'optimisation du procédé ALD pour l'élaboration de dépôt de films minces de TiO_2 cristallisé dans la phase anatase a fait l'objet de l'étude reportée dans [Avril (2014)].

Les conditions optimales ALD retenues sont les suivantes :

- Température de dépôt : 280°C
- Etapes d'un cycle ALD :
    1. Injection du précurseur de titane (TTIP): 35 ms.
    2. Purge par N_2 : 10 ms à 300 sccm.
    3. Injection de H_2O : 50 ms.
    4. Purge par N_2 : 5 ms à 300 sccm.

Dans ces conditions, l'épaisseur du dépôt est proportionnel au nombre de cycles ALD (fig. II.13). La vitesse de dépôt est de 0,018 nm/cycle. Ainsi, des dépôts de 5 et 10 nm d'épaisseur ont pu être réalisés pour un nombre de cycle ALD de 280 et de 560, respectivement.

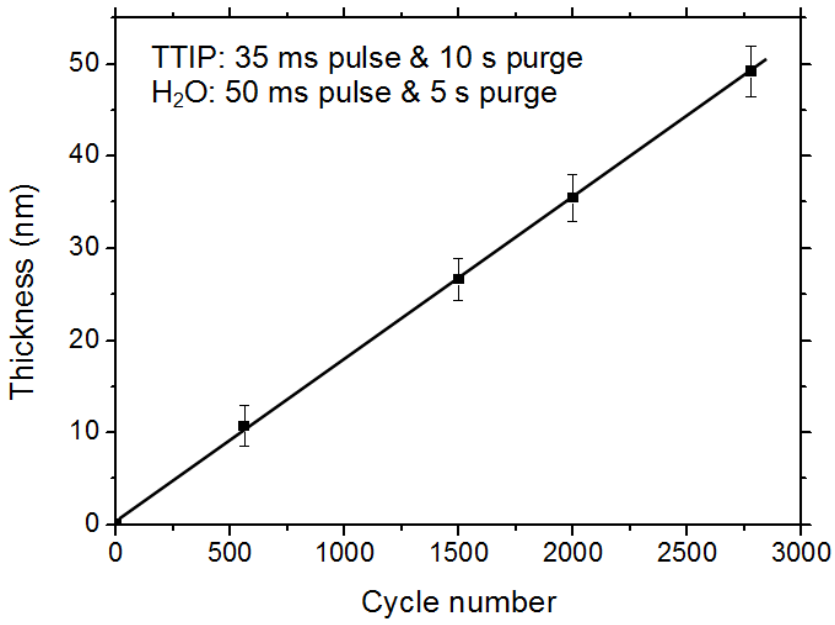


Figure II.13 : Epaisseur des films minces de TiO_2 en fonction du nombre de cycles ALD du dépôt. [Avril (2014)]

La figure II.14 montre une image obtenue par TEM de la section transverse d'un film de 30 nm d'épaisseur. Elle permet de constater que les dépôts obtenus par cette technique sont homogènes et compacts.

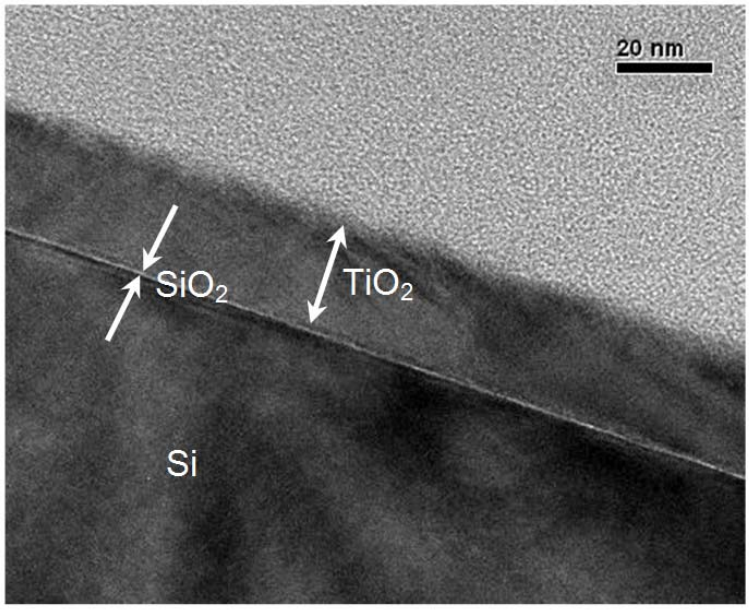


Figure II.14 : Image par microscopie électronique en transmission d'un film de TiO_2 de 30 nm d'épaisseur déposé par DLI-ALD sur un substrat Silicium (1660 cycles ALD). [Avril (2014)]

Le spectre Raman des dépôts ALD (fig. II.15) montre les pics caractéristiques du silicium et de la phase anatase de TiO_2.

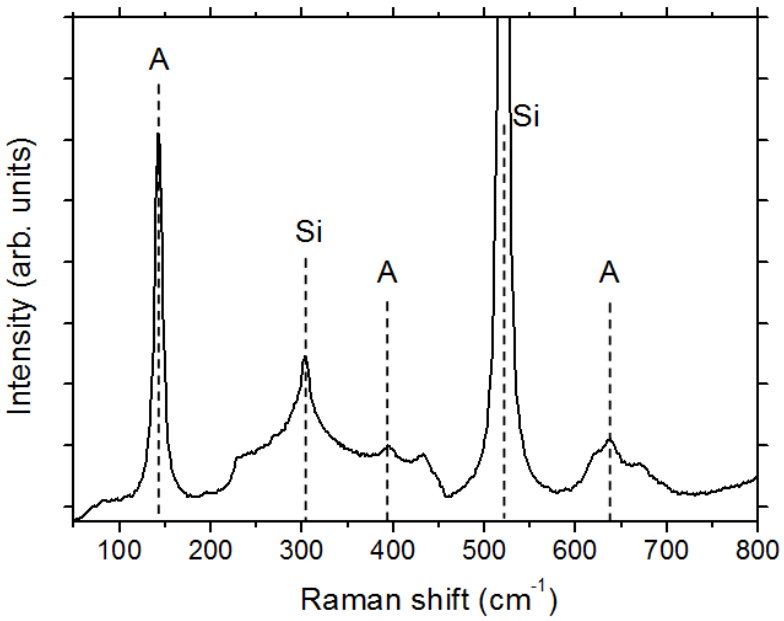


Figure II.15 : Spectre Raman d'un film d'épaisseur 30 nm (1660 cycles ALD) de TiO_2 déposé sur un susbtrat Si. (A) modes de vibration de TiO_2 cristallisé dans la phase anatase; (Si) modes de vibration du substrat Si(100). [Avril (2014)]

II.4) Techniques de caractérisation utilisées

Plusieurs techniques ont permis de caractériser les échantillons au cours de cette thèse. Des techniques spectroscopiques, la spectrométrie Raman, mais également la spectrométrie d'absorption UV-Visible et FTIR-ATR, des techniques de microscopie électronique à balayage (MEB) et en transmission (TEM) et enfin la diffraction des rayons X (DRX).

II.4.1-Spectrométrie Raman

La spectrométrie Raman est une technique qui allie rapidité d'analyse à la possibilité d'étudier la matière dans tous ses états sans préparation préalable des échantillons.

C'est une technique non destructive qui nécessite très peu de matière pour les analyses sous microscope (micro-Raman). Elle permet de faire de l'imagerie avec une résolution latérale de l'ordre du micromètre.

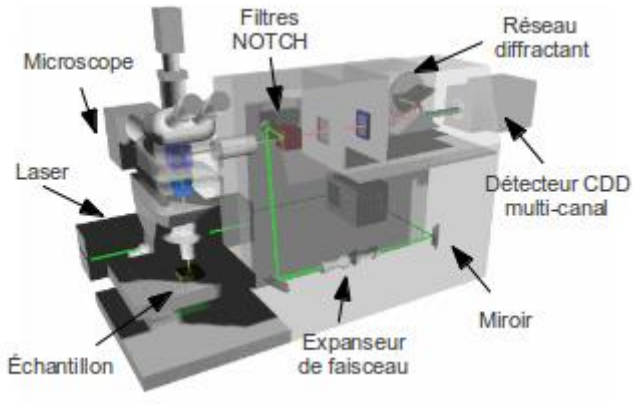


Figure II.16 : Schéma du spectromètre Raman InVia (Renishaw).

Un spectromètre micro-Raman se compose d'une ou plusieurs sources laser, de systèmes optiques pour guider le faisceau laser jusqu'à l'échantillon, d'un objectif de microscope permettant à la fois de focaliser le laser sur l'échantillon et de collecter la lumière diffusée, d'un système optique (filtre ou monochromateur) permettant de distinguer la diffusion Raman de la diffusion Rayleigh, d'un réseau de diffraction et d'un détecteur (CCD, photomultiplicateur…).

Les spectromètres micro-Raman utilisés durant cette thèse sont un spectromètre InVia commercialisé par Renishaw (fig. II.16), et un spectromètre T64000 commercialisé par Horiba. L'appareil InVia dispose de deux diodes lasers de longueurs d'onde 532 nm et 785 nm et d'un laser He-Ne de longueur d'onde 633 nm. Des filtres notch (coupure à 50 cm^{-1}) sont utilisés pour filtrer la lumière diffusée pour chaque raie laser.

De plus, l'appareil est équipé de filtres VBG (Volume Bragg Gratting) qui permettent l'acquisition de spectres Stokes et anti-Stokes jusqu'à environ 10 cm^{-1} de la raie Rayleigh pour une excitation à 532 nm.

Il fonctionne en rétrodiffusion et il est compatible avec l'utilisation de cellules de traitement thermique et sous pression. Le détecteur est une caméra CCD refroidie par effet Peltier. Il permet de faire de l'imagerie Raman avec une grande rapidité grâce au mode Streamline.

Le spectromètre T64000 (Horiba) est un dispositif micro-Raman équipé d'un laser Ar-Kr qui offre plusieurs raies d'excitation depuis 458 nm jusqu'à 647 nm, d'un triple monochromateur en configuration double soustractive avec une coupure aux basses fréquences à environ 5 cm^{-1} de la raie Rayleigh, et d'un détecteur CCD refroidi avec de l'azote liquide. Il permet faire de l'imagerie point par point.

II.4.2-Spectrométries d'absorption UV-Visible et FTIR-ATR

La spectrométrie d'absorption UV-Visible a permis de caractériser les nanoparticules synthétisées grâce à leur bande résonance plasmon, et également d'étudier les modifications de structures des protéines pour les nanoparticules bio-conjuguées. Elle a aussi permis d'estimer la quantité de protéines dans les nanoparticules bio-conjuguées.

Le spectromètre d'absorption UV-visible utilisé est un BioSpec-nano (Shimadzu) travaillant sur une gamme de longueur d'onde de 200-800 nm.

Dans le domaine infrarouge, la spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique d'analyse vibrationnelle complémentaire de la spectrométrie Raman. Son principe de fonctionnement et les règles de sélection sur les modes de vibration susceptibles d'être observés sont différentes de ceux de la spectrométrie Raman.

Ainsi, certains modes de vibration d'une molécule ou d'un solide sont observables uniquement avec une des deux techniques. La spectrométrie infrarouge a donc été utilisée dans ce travail en complément des analyses réalisées par spectrométrie Raman.

Le principe de l'ATR est d'étudier les changements d'intensité lumineuse pour un rayonnement réfléchi au contact de l'échantillon. Pour cela l'échantillon est placé au contact d'un cristal avec un très fort indice de réfraction. Lorsque l'angle d'incidence du faisceau infrarouge permet la réflexion totale dans le cristal, une onde évanescente s'étend dans l'échantillon sur une distance très courte (<5 µm). Lorsque l'énergie du faisceau infrarouge correspond à celle d'un mode de vibration d'une liaison chimique de l'échantillon, l'intensité du faisceau réfléchi est atténuée.

C'est une technique très efficace pour l'analyse de solution puisqu'il suffit de déposer une goutte de la solution sur le cristal pour avoir un bon contact entre l'échantillon et le cristal. De plus, cette technique ne nécessite que très peu d'échantillon, puisqu'il suffit d'une goutte de solution pour faire l'analyse (50 µL dans notre étude).

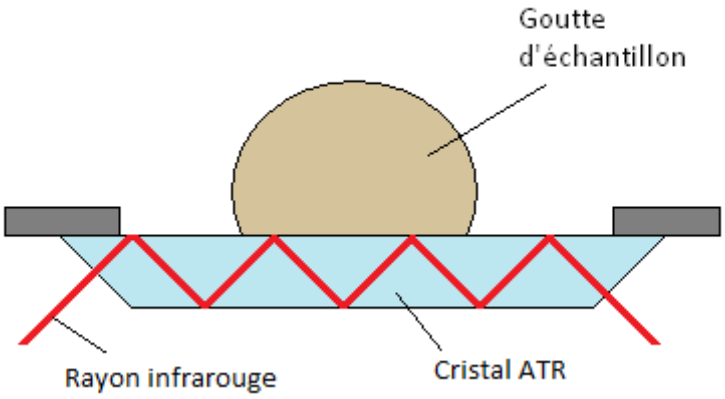


Figure II.17 : Schéma du système ATR

Les analyses par FTIR-ATR ont été réalisées en complément des analyses effectuées en spectrométrie Raman des solutions de nanoparticules d'argent bio-conjuguées avec des protéines. L'appareil qui a été utilisé est un Nicolet iS10 (Thermo-scientific) dans une gamme de nombre d'onde de 500-4000 cm^{-1}.

II.4.3-Microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie électronique en transmission (MET)

La microscopie électronique a été utilisée principalement pour étudier la morphologie et la taille des nanoparticules synthétisées. Elle a également été utilisée pour caractériser la morphologie de couches minces d'oxydes et la répartition des nanoparticules d'or dans ces couches.

Pour les analyses MEB, un appareil à émission de champ JSM-7600 F (JEOL) a été utilisé. Pour les analyses MET, un appareil JEOL 2100 FEG avec un voltage de 200 keV a été utilisé.

Pour contrôler la composition des échantillons observés par MET, les spectrométries EDX et EELS ont été utilisées.

La spectrométrie EDX est une technique d'analyse élémentaire. Elle est basée sur l'analyse spectrale du rayonnement X produit par l'échantillon en interaction avec le faisceau d'électron incident. L'identification des raies d'émission X caractéristiques de chaque élément chimique et la comparaison de leurs intensités avec un étalon, permettent une analyse élémentaire de l'échantillon.

Une autre technique d'analyse chimique couplée au TEM utilisée est la spectrométrie EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy). Par interaction avec l'échantillon, les électrons peuvent subir une diffusion inélastique, c'est à dire qu'ils peuvent perdre une partie de leur énergie cinétique. Cette quantité d'énergie perdue par les électrons rend compte des interactions spécifiques des électrons avec chaque élément. En traçant le spectre de la perte d'énergie des électrons, il est ainsi possible de faire une analyse élémentaire de l'échantillon.

Les analyses EELS ont été réalisées avec le mode STEM (Scanning Transmission Electron Microscope) de modèle Gatan Tridiem de l'appareil JEOL 2100 FEG.

II.4.4-Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X a été utilisée pour étudier les différentes phases formées dans les films TiO_2:Au après le recuit à différentes températures.

Le diffractomètre qui a été utilisé est muni d'un compteur à localisation spatiale Inel CPS 120, soit 120 degrés en 2θ, d'une anticathode au cuivre (λ = 0,154 nm) et d'un monochromateur arrière. Pour l'analyse de film d'épaisseur d'environ 500 µm, une configuration avec un faible angle d'incidence (α=2°) a été privilégiée par rapport à la configuration θ-2θ.

Synthèse du chapitre II

Ce chapitre a permis de présenter les méthodes d'élaboration de nanoparticules métalliques, la fonctionnalisation de substrats pour l'exaltation SERS et la validation de leur capacité d'exaltation par la détection de colorants. Les méthodes de synthèse de nanoparticules d'argent bio-conjuguées par des protéines sont également présentées, ainsi que les méthodes d'élaboration de films minces nanocomposites à base de TiO_2 et d'or par pulvérisation cathodique magnétron et des films ultraminces de TiO_2 par ALD (Atomic Layer Deposition). Ce chapitre a enfin permis de présenter les techniques analytiques utilisées au cours de nos travaux.

Chapitre III :

Etudes de biomolécules dans des systèmes nanostructurés

III.1) Etudes de nanoparticules bio-conjuguées par SERS

La synthèse de nanoparticules d'argent bio-conjuguées avec des protéines a été réalisée dans le but de mieux caractériser le phénomène SERS pour les protéines en solution (cf. II.2)). En effet, l'avantage est d'avoir une suspension de nanoparticules d'argent stabilisées par les protéines étudiées. Il n'y a ainsi pas de molécules intermédiaires telles que les citrates impliquées dans la synthèse de Turkevich et al [Turkevich (1951)] (cf. II.1.1) dont les signaux Raman peuvent de superposer au spectre des protéines et qui ne peuvent pas être éliminés en solution car cela briserait la stabilité de la suspension de nanoparticules. L'autre avantage de ce système est de s'affranchir d'une étape d'accroche des protéines sur les nanoparticules en solution. Les nanoparticules bio-conjuguées constituent ainsi un système d'interface nanoparticule/protéine en solution simple et sans espèce parasite. Le second objectif de cette étude est d'observer l'impact de l'interaction nanoparticule/protéine sur la structure de la protéine. Plusieurs protéines ont permis de fabriquer des nanoparticules d'argent bio-conjuguées : l'hémoglobine, la BSA, la lysozyme et le cytochrome C. Ces protéines ont été choisies pour leur importance dans les fluides biologiques et donc leur large étude dans le domaine de la recherche biomédicale [Baydemir (2013)] ; [Simon (2013)] ; [Safo (2011)]. Ainsi, ces protéines couplées aux nanoparticules d'argent permettent également d'envisager des mécanismes d'interactions non spécifiques des protéines avec les nanoparticules dans les fluides biologiques du corps humain.

Voici quelques caractéristiques de ces protéines :

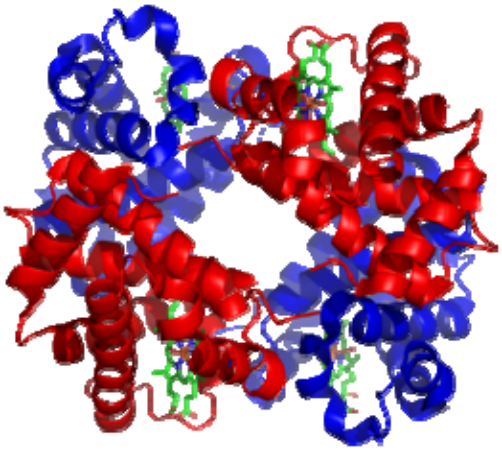


Figure III.1 : Représentation schématique en ruban de la structure de l'hémoglobine (Protein Data Bank, http://www.rcsb.org)

L'hémoglobine est une protéine des globules rouges qui permet de transporter l'oxygène dans le sang. C'est une grande protéine de 574 acides aminés chez l'homme constituée de deux groupements d'acides aminés similaires deux à deux (en rouge et bleu sur la figure III.1) possédant chacun un groupé hème, dont l'ion fer permet à la protéine de fixer l'oxygène (figure III.2).

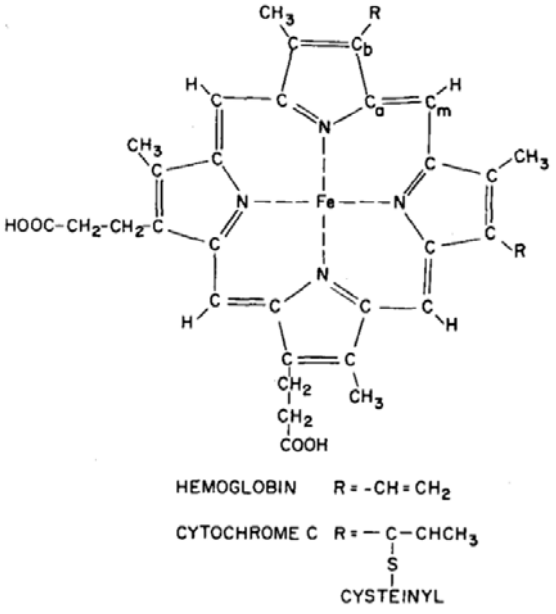


Figure III.2 : Structure du groupe hème indiquant les groupements reliés au pyrrole dans l'hémoglobine et le cytochrome C.

Le cytochrome C est une protéine de petite taille (105 acides aminés chez l'homme) dont la structure est proche de celle de l'hémoglobine puisqu'elle possède également un groupe hème permettant de produire des réactions chimiques d'oxydo-réduction au sein des membranes des cellules.

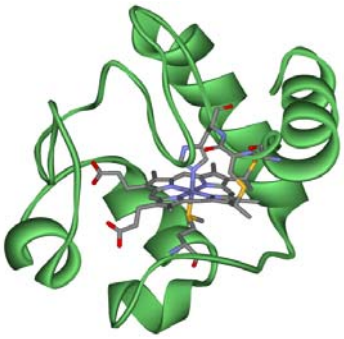


Figure III.3 : Représentation schématique en ruban de la structure du cytochrome C (Protein Data Bank, http://www.rcsb.org)

La lysozyme est une protéine qui se retrouve dans de nombreux fluides biologiques (larmes, mucus, salive…) et qui participent à la lutte antibactérienne. C'est une protéine de petite taille (129 acides aminés).



Figure III.4 : Représentation schématique en ruban de la structure de la lysozyme (Protein Data Bank, http://www.rcsb.org).

La BSA (Bovine Serum Albumine) est une albumine sérique, la classe de protéine majeure dans le sérum humain.

C'est une grosse protéine (607 acides aminés) dont la structure est proche de celle de la HSA (Human Serum Albumin). Elle est très étudiée en laboratoire car peu chère et représentative de la classe des albumines sériques.

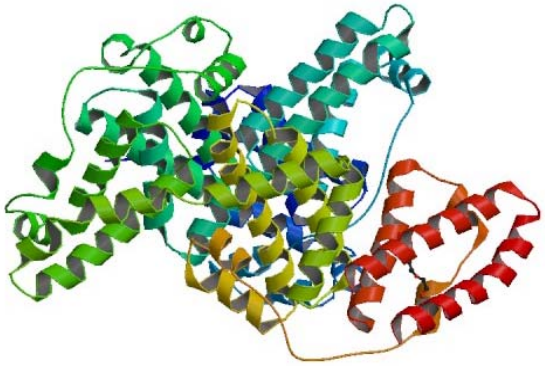


Figure III.5 : Représentation schématique en ruban de la structure de la BSA (Protein Data Bank, http://www.rcsb.org)

Nous avons ainsi choisi de travailler sur deux petites protéines (lysozyme, cytochrome C) et deux grosses protéines (hémoglobine, BSA) mais surtout deux protéines qui absorbent dans le visible (hémoglobine, cytochrome C) et deux qui n'absorbe pas (lysozyme, BSA). Cette différence sera très importante pour l'observation des spectres de ces protéines par spectroscopie Raman.

Les nanoparticules formées en présence des protéines sont beaucoup plus stables que celles stabilisées par des citrates (méthode Turkevich). En effet, quand des nanoparticules Turkevich vont s'agglomérer environ trois mois après la synthèse, les particules bio-conjuguées se sont révélées stables plus de six mois en stockage. De même, après centrifugation et resuspension dans de l'eau déionisée, elles restent dispersées pendant plusieurs jours.

Plusieurs facteurs permettent d'expliquer ce phénomène :

-Les protéines sont des espèces chargées, donc qui se repoussent entre elles [Bakshi (2010)] ; [Khullar (2012)] et agissent comme un tampon pour le pH, la force ionique et l'activité électrochimique.

-Les protéines ont une taille importante (plusieurs nanomètres) qui peut produire une stabilisation par effets stériques, empêchant d'autres nanoparticules ou espèces chimiques d'approcher de la nanoparticule à laquelle elles sont liées.

III.1.1-Structures et morphologies des nanoparticules bio-conjuguées

Afin de vérifier de vérifier le résultat des différents essais de synthèse et d'étudier la la morphologie des nanoparticules formées, les techniques de microscopie électronique à balayage (MEB) et en transmission (MET) ont été utilisées.

III.1.1.1-Observations par microscopie électronique à balayage.

Pour les analyses par MEB, avant observation, une goutte de l'échantillon de solution centrifugée (et non concentrée) de Ag:protéine est déposée sur une lame de silicium, support conducteur, et laissée à sécher. Les analyses ont été réalisées avec une puissance de seulement 1 keV afin de ne pas abîmer la couche de protéines autour des particules. La figure III.6 présente les images des nanoparticules d'argent synthétisées avec l'hémoglobine. Les nanoparticules Ag:Hémoglobine, ont été synthétisées avec et sans irradiation UV afin d'étudier l'impact de la lumière sur la réduction de l'argent.

Les nanoparticules synthétisées sans UV présentent une bonne dispersion sur le substrat de silicium. Leur taille varie entre 10 et 80 nm.

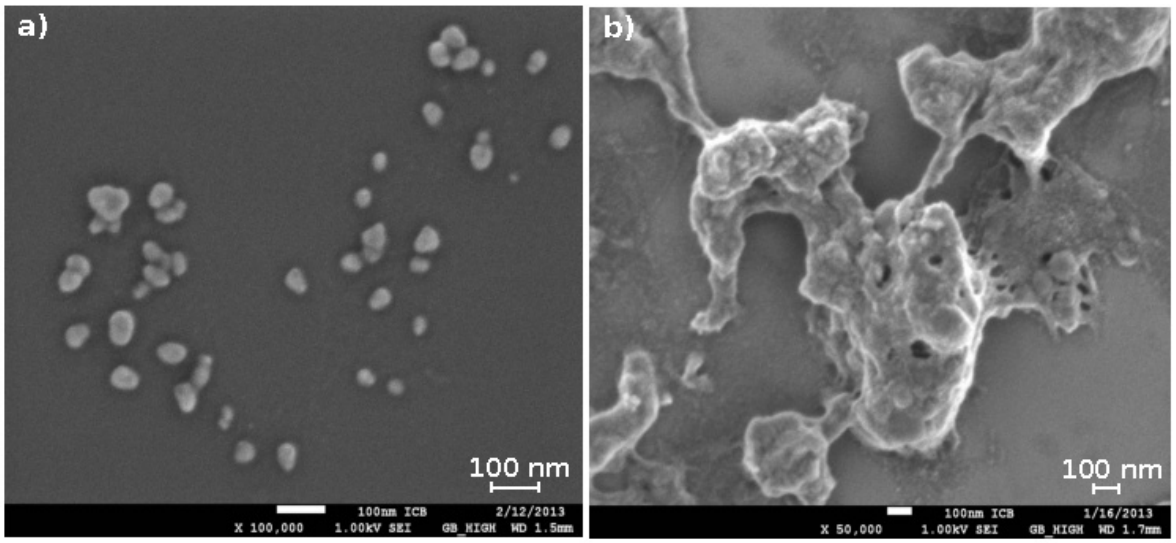


Figure III.6 : Images MEB en électrons rétrodiffusés des nanoparticules bio-conjuguées Ag:Hémoglobine. a) synthétisées sans irradiation UV ; b) synthétisées avec irradiation UV.

Un halo plus sombre est visible autour des particules. Les échantillons étant observés en électrons rétrodiffusés, ce halo sombre (qui charge sous le faisceau) peut être attribué à la présence d'éléments de plus faible numéro atomique que l'argent et le silicium (substrat). Comme il n'y a aucune autre source d'éléments légers dans l'échantillon, cette zone sombre autour des particules est attribuée à la présence de protéines (constituées principalement de carbone, hydrogène, oxygène et azote).

Pour les synthèses sous irradiation UV, les images MEB montrent des massifs qui ne sont pas constitués d'argent (contraste moins important avec le substrat. Analyses EDX confirmant la présence d'éléments légers), l'hypothèse la plus probable est une cristallisation de la protéine en larges agrégats emprisonnant les nanoparticules en son sein.

Les synthèses de nanoparticules bio-conjuguées Ag:Cytochrome C se sont avérées peu efficaces avec ou sans irradiation UV. Pour essayer d'améliorer le rendement, une synthèse dans le méthanol a été envisagée afin de déstabiliser la protéine et la rendre plus réactive. Mais le cytochrome C s'est avéré insoluble dans les solvants organiques. Les nanoparticules synthétisées avec le cytochrome C présentées figure III.7 (a) ont une taille comprise entre 30 et 100 nm. La présence de protéines est difficile à déterminer même s'il y a un fond sombre entre les nanoparticules qui pourrait être dû à la présence d'éléments légers.

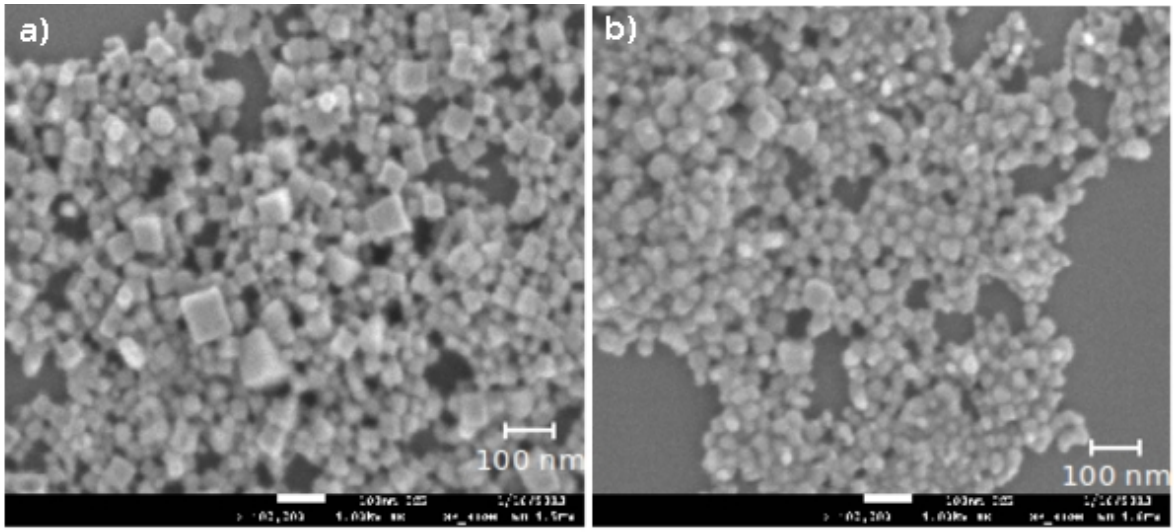


Figure III.7 : Images MEB en électrons rétrodiffusés des nanoparticules bio-conjuguées de a) Ag:Cytochrome C et b) Ag:BSA synthétisées sous irradiation UV.

Des nanoparticules bio-conjuguées Ag:BSA (fig. III.7 (b)) ont été synthétisées avec et sans UV. L'irradiation UV augmente le rendement de synthèse mais ne semble pas modifier la morphologie du système nanoparticule/protéine. Les nanoparticules ont une taille entre 20 et 80 nm.

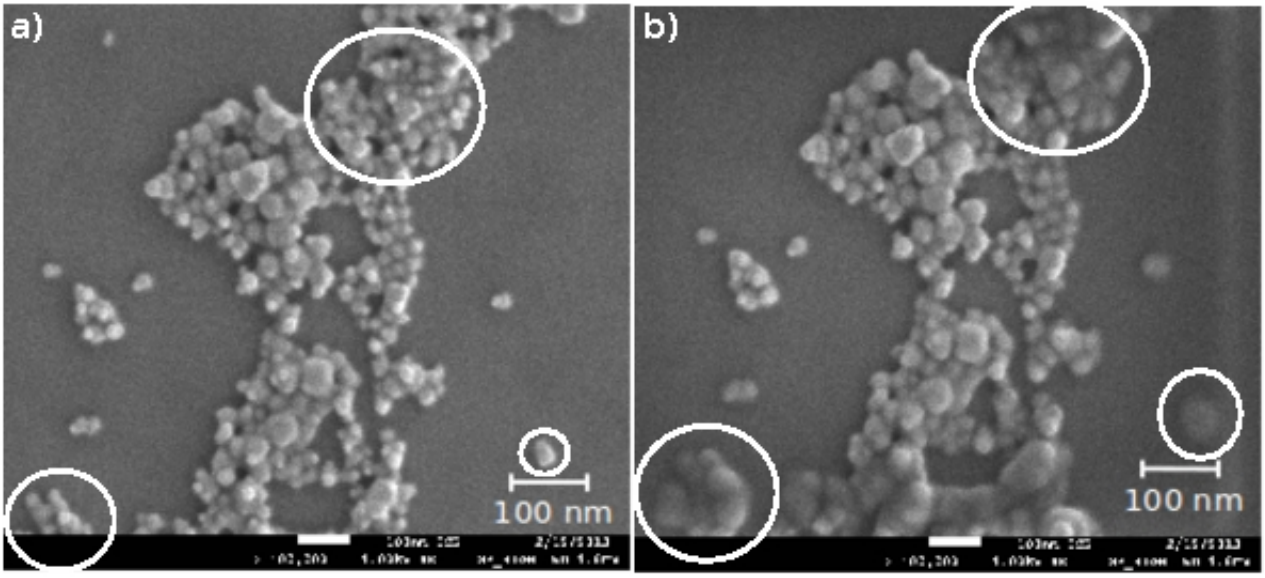


Figure III.8 : Images MEB en électrons rétrodiffusés des nanoparticules bio-conjuguées Ag:Lysozyme. a) Image prise directement après avoir le focus ; b)après une exposition de quelques secondes sous le faisceau d'électrons.

Enfin, des nanoparticules Ag:Lysozyme ont été synthétisées dans le méthanol selon la méthode de Eby et al. [Eby (2009)]. Ce changement de solvant permet une meilleure ouverture de la structure de la protéine et donc une meilleure réactivité sans dénaturer complètement la protéine. La synthèse sans irradiation UV n'a pas un rendement suffisant pour la suite des analyses. Les nanoparticules formées en présence d'UV sont présentées dans la figure III.7. Les particules ont une taille comprises entre 15 et 50 nm.

Les images (a) et (b) de la figure III.8 permettent d'observer la couverture des nanoparticules par les protéines. En effet, l'image (a) a été enregistrée immédiatement après avoir fait le focus, alors que l'image (b) a été enregistrée après quelques secondes d'exposition sous le faisceau d'électrons de l'appareil. Sur cette dernière image, un effet de gonflement des nanoparticules est observé ainsi qu'une perte de focalisation. Nous avons attribué ce phénomène à la présence d'une fine couche de matière organique autour des nanoparticules. En effet, sous le faisceau d'électrons, les molécules organiques s'échauffent et « gonflent » entrainant une perte de netteté de l'image. Comme il n'y a aucune autre source de molécules organiques, cette fine couche est certainement constituée de lysozyme. L'adsorption d'une fine couche de protéines sur les nanoparticules montrent ainsi leur rôle de dispersant et d'agent stabilisant de la suspension.

La finesse de la couche de protéine autour des particules (<10 nm) est par ailleurs appropriée pour l'exaltation du signal des protéines par effet SERS.

III.1.1.2-Observations par MET et analyse par spectrométrie EELS.

Des observations par MET ont été effectuées afin de mieux caractériser les systèmes Ag:protéines, tout particulièrement la couche de protéines autour des particules.

Une goutte diluée de la solution centrifugée de Ag:protéine est déposée sur une membrane de carbone (holey carbon grid) et laissée à évaporer.

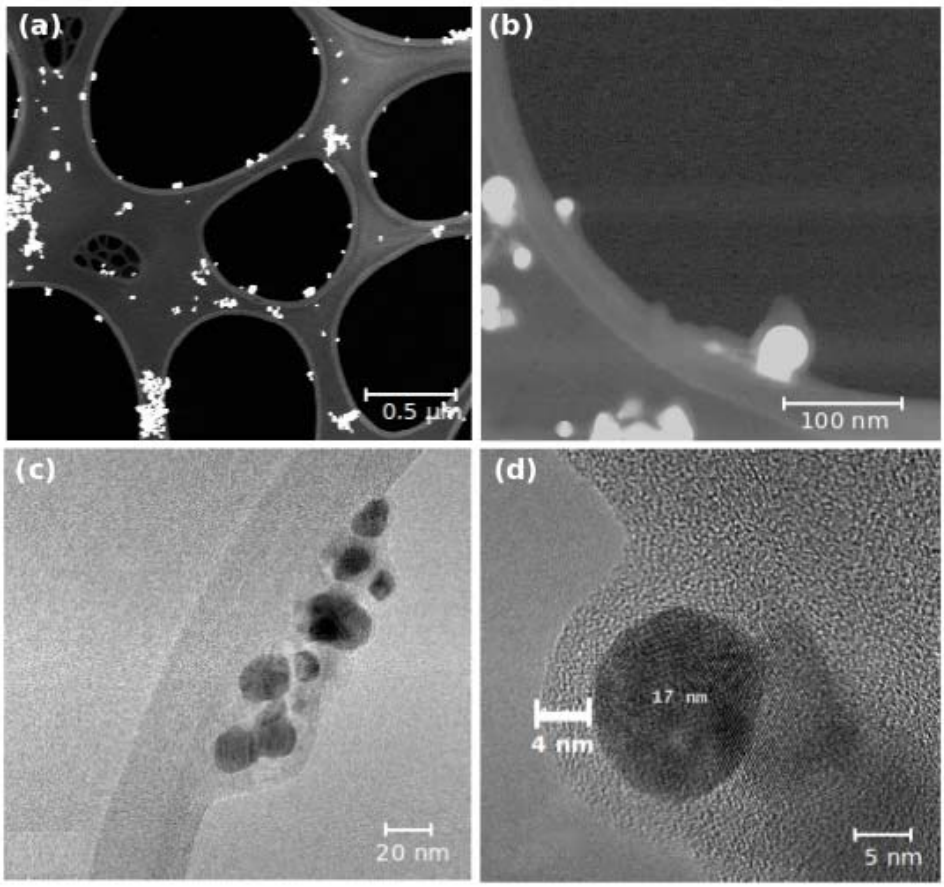


Figure III.9 : Images MET des nanoparticules Ag:Lysozyme sur une membrane de carbone. (a, b) images en champ sombre ; (c, d) images en champ clair.

Après évaporation du solvant, seules les nanoparticules en bordures de la membrane de carbone permettent de voir l'enveloppe organique qui les entoure. En effet, le contraste est trop faible entre la membrane de carbone et l'enveloppe des nanoparticules, principalement composée d'éléments légers, pour qu'elle soit visible lorsque les deux se superposent.

Dans les images en mode champ sombre (figure III.9 (a) et (b)), les nanoparticules d'argent apparaissent plus claires car l'argent est l'élément le plus lourd de l'échantillon. Dans les images (c) et (d) obtenues en champ clair et en haute résolution (HRTEM : High Resolution Transmission Electron Microscopy), les nanoparticules apparaissent en tons sombres et sont entourées d'une couche amorphe d'éléments légers dont l'épaisseur varie entre quelques nanomètres et une quinzaine de nanomètres.

Des analyses par spectrométrie EELS ont été effectuées sur un échantillon de Ag:Lysozyme (fig. III.10) afin de contrôler la nature des espèces autour de la nanoparticule.

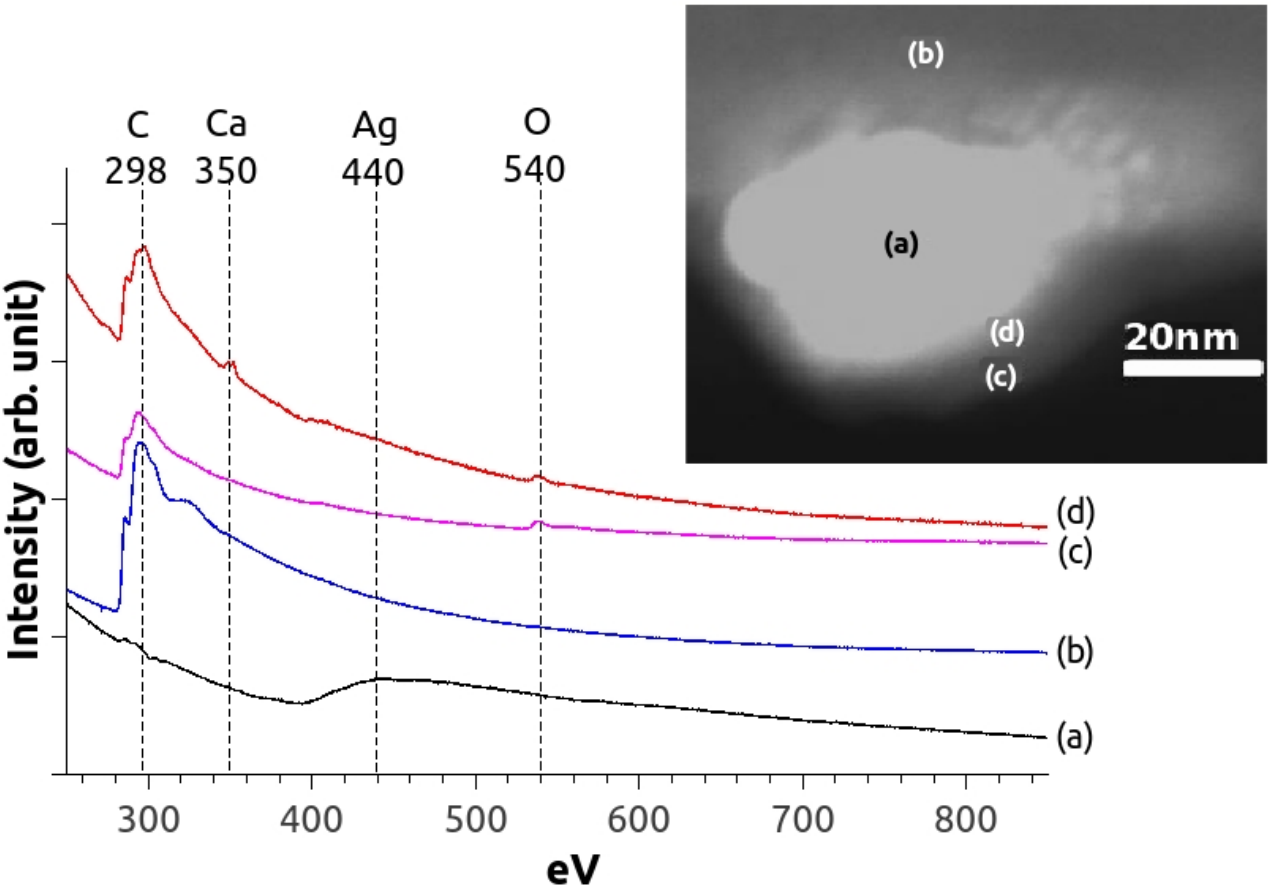


Figure III.10 : Spectres EELS à différents points d'une nanoparticule de Ag:Lysozyme observée par STEM en champ sombre.

La figure III.10 montre les spectres EELS obtenus pour différents points au centre et dans la périphérie d'une nanoparticule Les spectres EELS obtenus au centre de la nanoparticule, (spectre a) montrent une bande large à 440 eV qui peut être attribuée à l'argent. Loin de la particule (spectre b), c'est le signal du carbone à 298 eV qui ressort, ce signal provient de la membrane de carbone sur laquelle sont déposées les particules. Dans la périphérie de la nanoparticule, le spectre d montre les signaux du carbone (440 eV), de l'oxygène (540 eV) et du calcium (pic dédoublé à 350 eV). La présence de carbone et d'oxygène confirme bien la présence de molécules organiques autour de la nanoparticule d'argent. La présence de calcium est particulièrement intéressante. En effet, la lysozyme utilisée pour la synthèse des particules Ag:Lysozyme de l'échantillon provient du blanc d'œuf et sa pureté est seulement de 90%. Or les œufs contiennent une grande quantité de calcium, principalement dans leur coquille ($CaCO_3$) et la lysozyme à une forte capacité à fixer cet élément. [Imoto (1981)] ; [Brancolini

(2012)]. En absence d'autres sources significatives de calcium, nous pouvons conclure que celui ci provient de la lysozyme utilisée et que c'est bien cette protéine qui entoure et stabilise les nanoparticules d'argent.

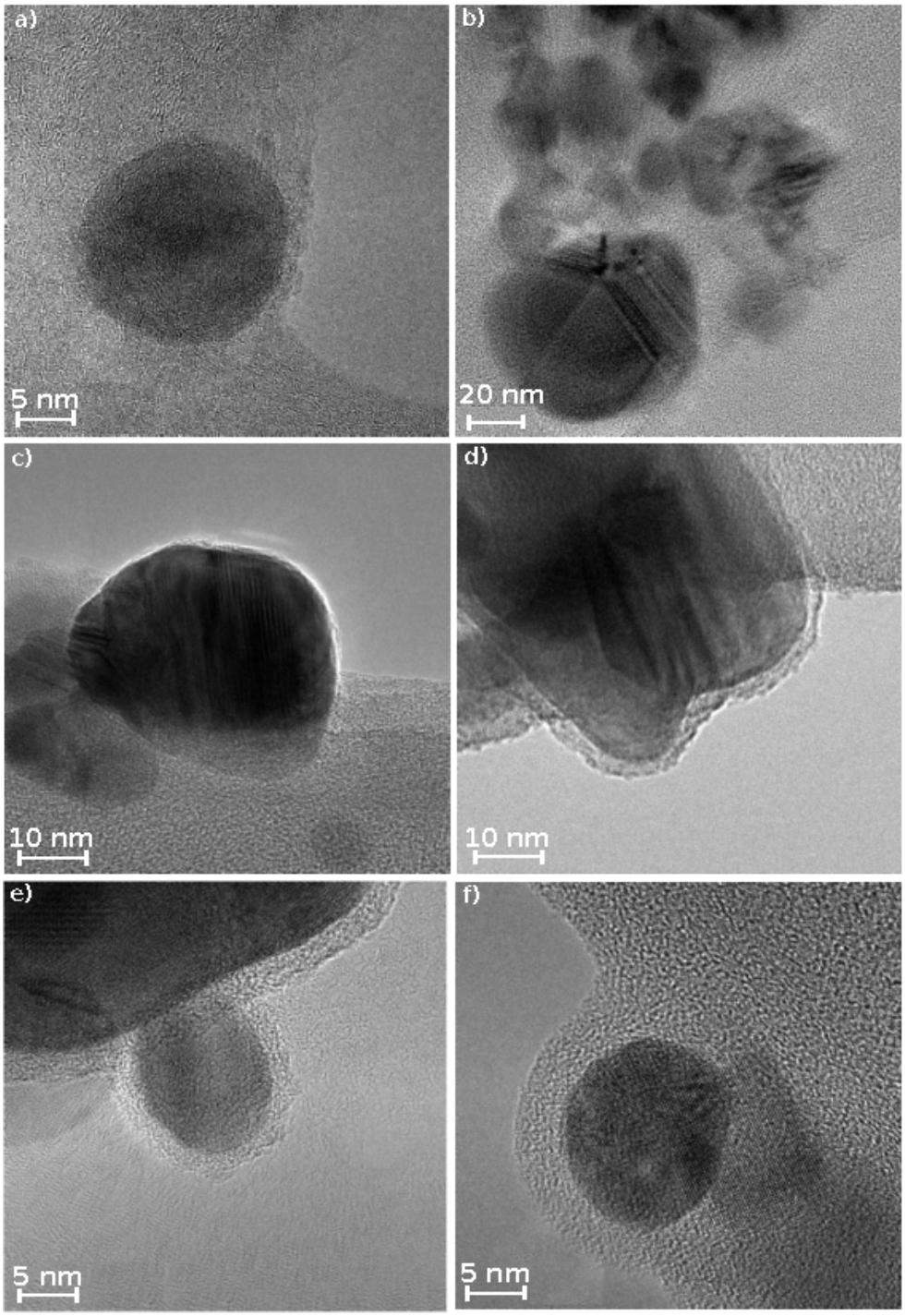


Figure III.11 : Images MET des nanoparticules bio-conjuguées. a) Ag:Hémoglobine sans UV ; b) Ag:Hémoglobine avec UV ; c) Ag:BSA sans UV ; d) Ag:BSA avec UV ; e) Ag:Cytochrome C avec UV ; f)Ag:Lysozyme avec UV.

La figure III.11 présente les images MET des nanoparticules bio-conjuguées pour les quatre protéines utilisées. Quelle que soit la protéine, les nanoparticules ont une forme globalement sphérique et des tailles de particules comprises entre 10 et 30 nm.

Elles sont entourées par une enveloppe organique de 4 à 10 nm d'épaisseur. Ces observations vont dans le sens des résultats obtenus par microscopie électronique à balayage, hormis pour Ag:Cytochrome C, et permettent d'avoir de meilleures informations sur la taille des nanoparticules obtenues (certainement surévaluée au MEB à cause de la couche organique autour des particules et de la moins bonne résolution de l'appareil).

Les analyses EELS effectuées sur les nanoparticules bio-conjuguées autre que Ag:lysozyme n'ont pas permis d'identifier la nature de la couche organique entourant les nanoparticules. En effet, la BSA ne contient aucun élément singulier et si même le cytochrome C et l'hémoglobine contiennent des ions fer, ceux-ci sont en trop petites quantités pour être détectés par spectrométrie EELS (4 atomes par molécule pour l'hémoglobine et un seul pour le cytochrome C).

III.1.2-Caractérisation des nanoparticules bio-conjuguées Ag:protéine par spectrométries optique et exaltée de surface

III.1.2.1-Étude par spectrométrie d'absorption UV-Visible.

La spectrométrie d'absorption UV-Visible a été utilisée pour étudier l'état de structure des protéines et la résonance plasmon des particules d'argent. L'absorption optique des systèmes Ag:protéines dans l'eau déionisée a été réalisé sur une gamme de longueur d'onde de 200-800 nm.

Les spectres obtenus ont été comparés aux spectres des protéines seules dans l'eau déionisée afin d'observer les modifications de l'absorption de la lumière par les protéines, ce qui est signe de modifications de leur structure, ainsi que la contribution des nanoparticules d'argent (résonance plasmon de surface).

Les solutions de protéines ont été réalisées en dissolvant la protéine lyophilisée dans l'eau déionisée, puis en diluant cette solution pour obtenir des valeurs d'absorbance acceptables (Absorbance<1) pour les bandes de la protéine.

La figure III.12 présente les spectres des quatre protéines (hémoglobine, cytochrome C, BSA, lysozyme) en solution dans l'eau (courbes rouges), comparés aux spectres des suspensions de Ag:protéines (courbes bleues).

Les protéines présentent une bande d'absorption à 208 nm, due à la fonction amide (liaison peptidique) [Pelton (2000)]. Cette bande caractéristique des protéines ne révèle pas de modifications particulières de la structure des protéines autour des nanoparticules d'argent.

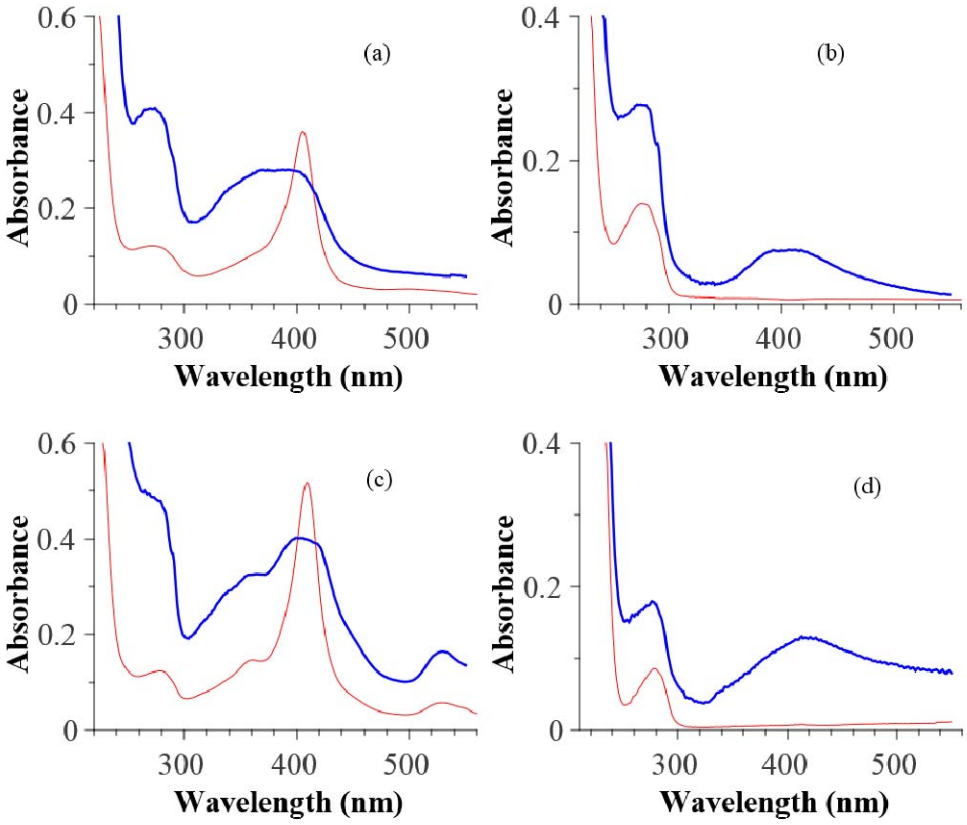


Figure III.12 : Spectres UV-Visible des suspensions de nanoparticules bio-conjuguées (bleu) comparées aux spectres de solutions diluées de protéines dans l'eau déionisée (rouge). a) Ag:Hémoglobine ; b) Ag:BSA ; c) Ag:Cytochrome C ; d) Ag:Lysozyme.

Pour l'hémoglobine et le cytochrome C, leurs spectres d'absorption montrent une bande intense vers 410 nm, connue comme la bande de Soret, et une bande plus faible vers 540 nm (bande Q). Ces bandes d'absorption sont dues à la structure moléculaire porphyrique (groupe hème (Fig. III.2)) entourant les ions fer présents dans les deux protéines : quatre ions pour l'hémoglobine et un seul ion pour le cytochrome C [Mahato (2010)].

La résonance plasmon des nanoparticules d'argent, attendue dans le même domaine spectrale, se superposerait aux bandes d'absorption dues au groupe hème pour les bioconjugués Ag:Hémoglobine et Ag:Cytochrome C. Les figures III.12 (a) et (c) montrent dans ce domaine une bande élargie par rapport aux spectres des solutions des deux protéines.

Les spectres d'absorption de BSA et de lysozyme ne présente de bande d'absorption dans ce domaine. Pour les suspensions des bioconjuguées Ag:BSA et Ag:Lysozyme il est possible d'observer une bande d'absorption due au plasmon vers 410 nm.

Les résultats montrent une conservation globale de la structure des protéines et les capacités de résonances plasmons des nanoparticules d'argent synthétisées, permettant d'envisager une exaltation SERS des spectres Raman des protéines étudiées.

III.1.2.2-Étude par spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS)

L'étude des nanoparticules bio-conjuguées Ag:protéine en suspension par spectrométrie Raman a été possible grâce à l'exaltation des signaux des protéines par effet SERS. En effet, les bandes Raman des protéines n'ont pas été observées pour des solutions de protéines dans les mêmes conditions d'analyses, y compris pour des concentrations plus importantes de protéines. Les spectres Raman des protéines lyophilisées en phase solide ont été enregistrés pour servir de comparatif aux spectres des suspensions de nanoparticules bio-conjuguées.

Le protocole d'échantillonnage pour l'étude des nanoparticules bio-conjuguées Ag:protéine en suspension est le suivant :

Une goutte de 50 µL de la solution centrifugée est prélevée et déposée sur une lame Tienta® (fig. III.13). Ce substrat qui était commercialisé par la société Tienta est constitué d'une plaque d'acier poli et d'un film mince de polymère qui la recouvre. L'acier poli sert de miroir afin de collecter plus de lumière diffusée en provenance de l'échantillon.

Le film mince de polymère permet de protéger la plaque d'acier et de rendre la surface hydrophobe. Ce type de substrat était commercialisé afin d'étudier les protéines séchées sur le substrat (substrat à usage unique). Le caractère hydrophobe permet de former une goutte localisée est d'éviter une adsorption trop rapide des protéines à la surface du substrat. Puis en séchant, le dépôt en « tâche de café » (dépôt des solutés en bordures de la goutte, laissant une marque circulaire après évaporation totale du solvant) des protéines de la solution permettait de concentrer les protéines sur la bordure de la goutte.

Dans notre cas, l'avantage de cette hydrophobicité est qu'au lieu de s'étaler sur la surface, la solution va former une goutte dans laquelle il sera plus aisé de focaliser le faisceau laser. Par ailleurs avec une goutte bien formée, il est possible d'avoir un volume de solution suffisant pour l'analyse avec un minimum de suspension (50 µL). Le caractère hydrophobe permet également de limiter l'adsorption des nanoparticules bio-conjuguées sur la surface du substrat pendant l'analyse. Pour focaliser le laser dans cette goutte, un objectif macro x5 est utilisé. Cet objectif à une grande distance focale, ce qui permet de le garder à une distance suffisante de la goutte d'échantillon et donc ne pas le salir.

Tous les spectres ont été enregistrés sur un substrat hydrophobe et réfléchissant (lame Tienta®). L'échantillon est un cristal pour les protéines lyophilisées et une goutte de 50 µL pour les suspensions de Ag:protéine.

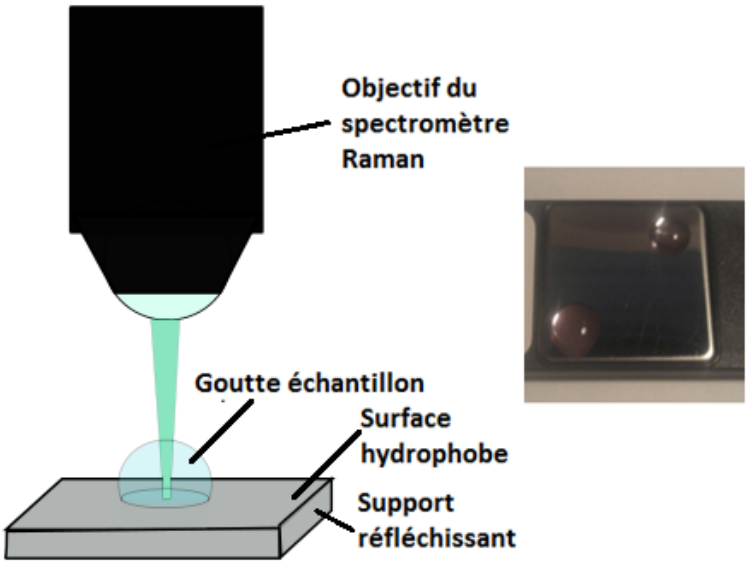


Figure III.13 : Schéma de la méthode de mesure d'une goutte de liquide par spectrométrie Raman. Photo de deux gouttes d'une suspension de nanoparticules sur une lame Tienta®.

Comme il a été indiqué dans la section précédente, deux des quatre protéines utilisées, l'hémoglobine et le cytochrome C, présentent des bandes d'absorption dans le visible qui correspondent à des transitions électroniques du groupe hème : une bande très intense à ~410 nm (bande B ou bande de Soret) et une bande plus faible autour de 540-575 nm (bande Q). Avec une excitation résonante avec ces bandes d'absorption, le spectre Raman de ces protéines est dominé par les modes de vibration dus au groupe hème [Brunner (1973)] ; [Yamamoto (1973)] ; [Spiro (1975)] ; [Yeo (2008)].

Les spectres Raman que nous avons obtenu pour ces deux protéines lyophilisées sont représentés dans les figures III.14 (spectre (a)) et III.15 (spectre (b)). Ces spectres, en bon accord avec la littérature [Spiro (1975)] ; [Yeo (2008)], montrent un pic à 1374 cm^{-1} attribué à l'élongation de la liaison C-N pour un état d'oxydation III du fer au centre du macrocycle hème.

Ce pic ce déplace à 1355 cm^{-1} dans l'état ferreux (Fe^{2+}) [Brunner (1973)] ; [Yamamoto (1973)] ; [Spiro (1975)]. Plusieurs pics dans le domaine 1500-1640 cm^{-1} sont associés aux vibrations des liaisons C=C et C=N du macrocycle du groupe hème [Brunner (1973)]. Ces bandes, exaltées par une excitation résonante, dominent sur les contributions dues aux acides aminés.

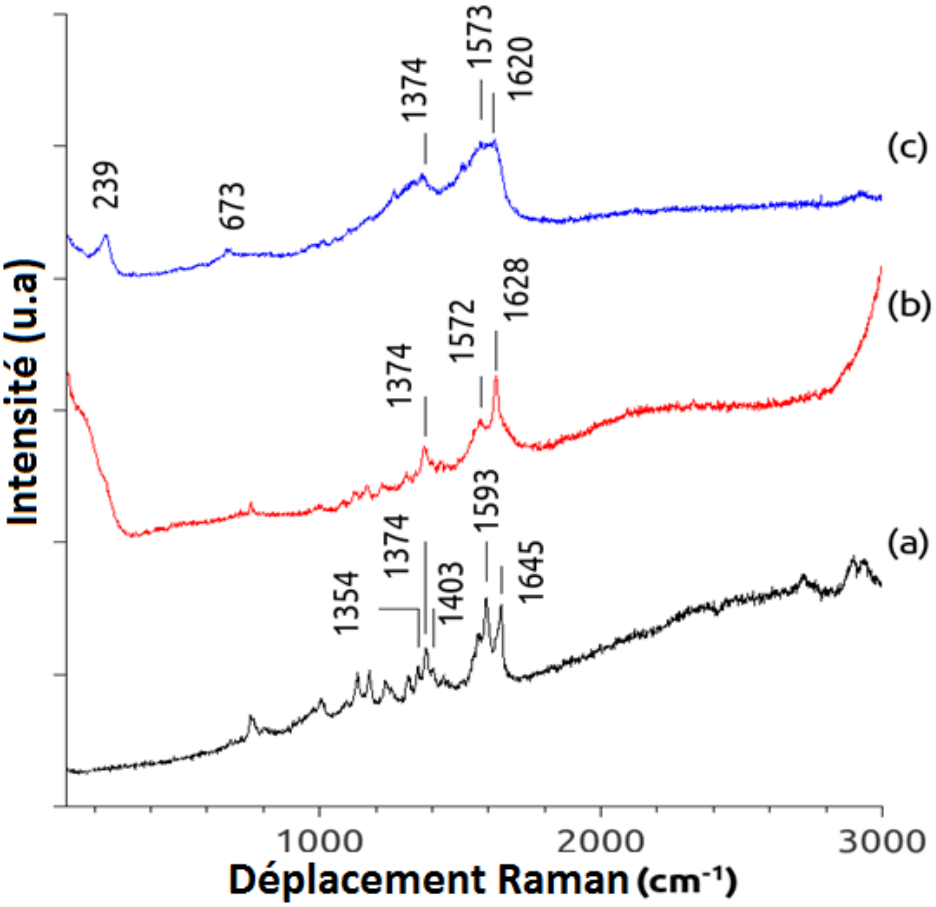


Figure III.14 : Spectres Raman de (a) hémoglobine lyophilisée ; (b, c) Ag:Hémoglobine bio-conjuguées synthétisées sans irradiation UV (b) et avec irradiation UV (c). Les spectres ont été normalisés en intensité et décalés en hauteur pour une meilleure lisibilité. Longueur d'onde laser : 532 nm ; puissance laser : 0,55 mW ; temps d'acquisition : 10 s.

Les spectres SERS des systèmes bioconjugués Ag:Hémoglobine et Ag:Cytochrome C sont représentés dans les figures III.14 (spectres (b et c)) et III.15 (spectre (a)), respectivement.

Pour les systèmes bioconjugués Ag:Hémoglobine l'effet d'une irradiation UV durant la synthèse est visible sur les spectres SERS. En absence d'irradiation UV, le spectre montre encore une majorité des pics observés dans le spectre Raman de l'hémoglobine lyophilisée. En particulier, le pic à 1374 cm^{-1} qui manifeste l'état d'oxydation III du fer. La différence la plus marqué se trouve dans le domaine 1500-1650 cm^{-1} dans lequel le pic à 1645 cm^{-1} disparait tandis qu'un pic fin apparaît à 1628 cm^{-1}.

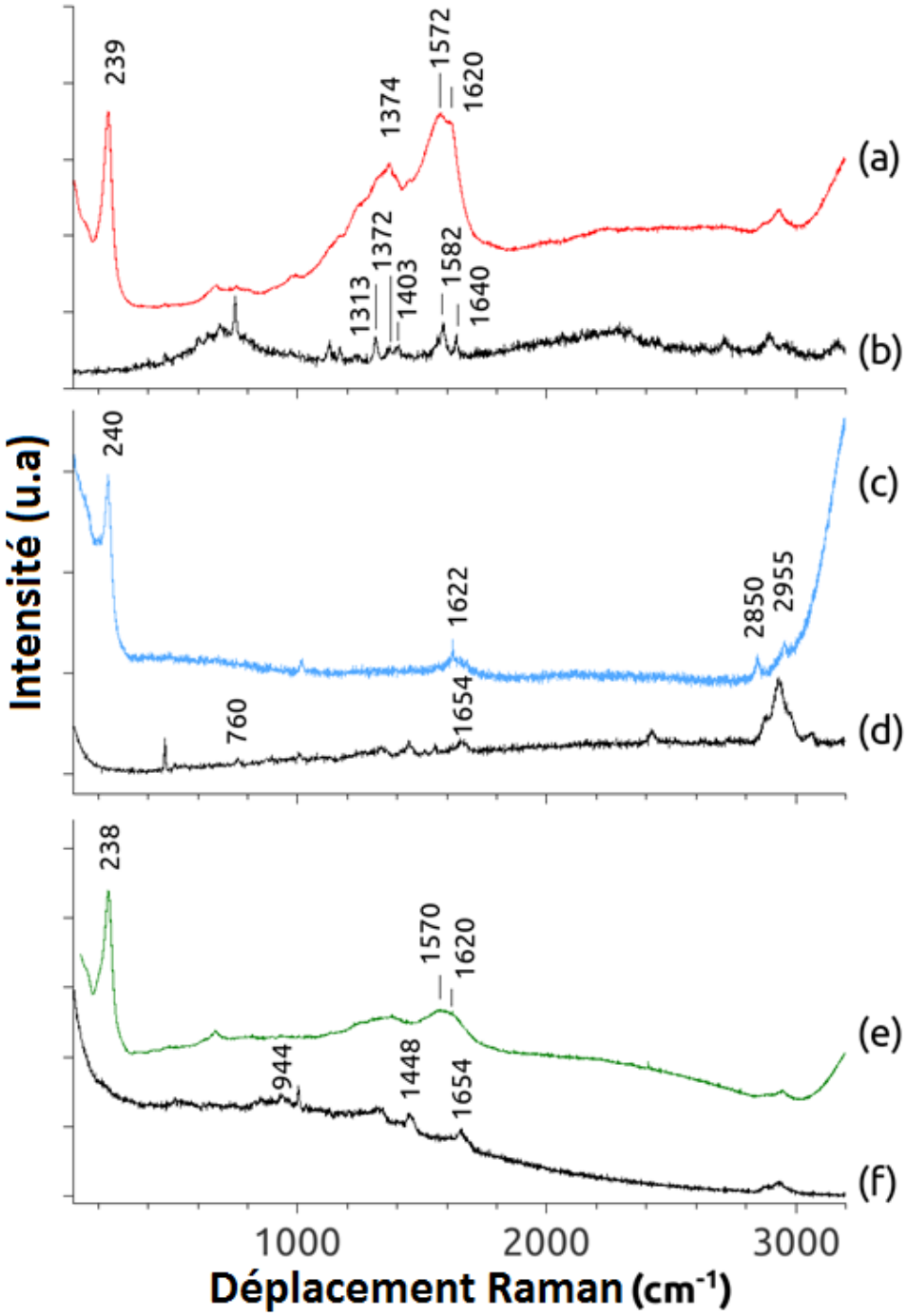


Figure III.15 : Spectres Raman de (a) Ag:cytochrome-C ; (b) cytochrome C lyophilisée ; (c) Ag:lysozyme ; (d) Lysozyme lyophilisée ; (e) Ag:BSA ; (f) BSA lyophilisée. Les nanoparticules bio-conjuguées ont été synthétisées avec UV. Les spectres ont été normalisés en intensité et décalés en hauteur pour une meilleure lisibilité. Longueur d'onde laser : 532 nm ; puissance laser : 0,55 mW ; temps d'acquisition : 10 s.

Pour les systèmes bioconjugués Ag:Hémoglobine synthétisés avec irradiation UV, le spectre SERS (Fig. III.14 spectre (c)) est similaire à celui obtenu pour les systèmes Ag:Cytochrome C (Fig. III.15 spectre (a)). Ces spectres montrent des bandes très élargies dans le domaine 1100-1700 cm^{-1}. Le pic très faible à 1374 cm^{-1} apparaît sur une bande plus large. Et dans la zone des basses fréquences, apparaît un pic bien défini à 239 cm^{-1}. Il peut être attribué à un mode de vibration d'élongation d'une liaison Ag-N impliquant la nanoparticule d'argent et l'atome d'azote terminal de la chaîne peptidique de la protéine et/ou ceux contenus dans les chaines latérales des acides aminés (incluant la lysine, le tryptophane, l'arginine et l'histidine) [Cardini (2002)] ; [Michota (2001)]. Ce résultat indiquerait une chimisorption de la protéine sur la nanoparticule d'argent.

Pour la lysozyme et la BSA, protéines qui ne contiennent pas de cycles porphyriques, les spectres Raman des protéines lyophilisées sont donnés dans la figure III.15, spectres (d) et (f), respectivement. Dans les deux spectres, un pic à ~1654 cm^{-1} peut être attribuée à la bande amide I des hélices α. Des pics associés aux différents acides aminés peuvent aussi être identifiés. Les spectres SERS des systèmes Ag:lysozyme et Ag:BSA ont également été enregistrés (Fig. III.15, spectres (c) et (e)) et comparés aux spectres Raman de la protéine lyophilisée correspondante. Le spectre des synthèses réalisées sans irradiation UV n'a pas été présenté pour Ag:lysozyme car la synthèse n'a pas permis d'obtenir une quantité suffisante de nanoparticules. Pour Ag:BSA les spectres avec et sans irradiation UV se révèlent identiques pour les deux synthèses, mais avec un meilleur rendement donc un meilleur signal pour Ag:BSA synthétisée sous irradiation UV.

Le spectre SERS obtenus pour le système Ag:BSA est similaire à ceux obtenus pour Ag:Hémoglobine synthétisée sous irradiation UV et pour Ag:Cytochrome C. Il présente deux composantes très larges dans le domaine 1100-1700 cm^{-1}: la plus intense est centrée à ~1572 cm^{-1} et présente un épaulement vers 1620 cm^{-1} ; la seconde, de plus faible intensité, est centrée à ~1370 cm^{-1}. Ces bandes peuvent être attribuées aux modes de vibration de la chaine peptidique (amide I notamment) de la protéine et aux vibrations caractéristiques des différents acides aminés. L'observation de bandes larges (plutôt que des pics fins présents dans le spectre de la protéine lyophilisée) pourrait être expliquée par l'exaltation de nombreuses contributions correspondant à différentes configurations de la protéine au contact de la surface de la nanoparticule d'argent.

D'autre part, l'analogie des spectres SERS de Ag:Hémoglobine (synthétisée sous irradiation UV) et de Ag:Cytochrome C avec celui de Ag:BSA (qui ne contient pas de macrocycle porphyrique) nous amène à conclure que les modes de vibration de la chaine peptidique et des acides aminés dominent le spectre SERS des systèmes bioconjugués à base d'hémoglobine et de cytochrome C, plutôt que les modes associés au groupe hème qui dominent sur les spectres Raman de ces deux protéines.

A plus basses fréquences, le spectre SERS du système Ag:BSA présente également un pic intense et bien résolu à 238 cm^{-1}, comme sur les spectres SERS de Ag:Hémoglobine (synthétisée sous irradiation UV) et de Ag:Cytochrome C. Ce pic a été attribué au mode de vibration d'élongation de la liaison Ag-N. L'intensité relative des bandes à 1200-1600 cm^{-1} par rapport au pic à 238 cm^{-1} est nettement plus élevée pour les bioconjugués à base d'hémoglobine et de cytochrome C, Enfin, le spectre SERS du système Ag:lysozyme (figure III.15 (c)) présente une bande principale centrée à ~1630 cm^{-1} moins large que celle observé pour les autres systèmes bioconjugués. La composante vers 1370 cm-1 est très faible dans ce cas. Le pic à 760 cm^{-1}, spécifique au spectre de la lysozyme, est sensible à l'environnement hydrophobe des résidus de tryptophane [Das (2009)]. La disparition de ce signal pourrait être un indice de l'ouverture de la structure de la lysozyme résultant en une exposition des résidus de tryptophane à l'eau.

III.1.2.3-Etude par spectrométrie FTIR-ATR.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des nanoparticules bio-conjuguées, des analyses préliminaires par FTIR-ATR ont été réalisées. Pour effectuer ces analyses, des solutions de Ag:protéines ont été réalisées dans l'eau lourde (D_2O) afin de s'affranchir des bandes d'absorption des liaisons O-H de l'eau qui masqueraient les contributions de la protéine sur le spectre [Kong (2007)]. Cette synthèse est similaire à celle effectuée dans l'eau déionisée. Avant analyse, un volume de la solution est centrifugée et le liquide est remplacé par du D_2O pur.

Une goutte est ensuite déposée sur le cristal ATR du spectrométre infrarouge pour l'analyse. L'appareil utilisé est un Nicolet iS10 (Thermo-scientific) dans une gamme de nombre d'onde de 500-4000 cm^{-1}, le nombre de scans a été fixé à 60.

L'un des principaux objectifs des analyses a été la détection d'un changement dans les bandes N-H des protéines. En effet, les spectres SERS ont montré l'existence d'un pic très intense que nous avons attribué à la formation de liaisons Ag-N dans les systèmes bio-conjugués. Il était donc probable d'observer un changement dans les modes de vibrations impliquant les atomes d'azote dans le spectre infrarouge.

La figure III.16 montre les spectres FTIR-ATR de la BSA et de Ag:BSA en solution dans D_2O. Il est intéressant de noter l'intensité des bandes du spectre de Ag:BSA comparativement à celles du spectre de la BSA. En effet, Ag:BSA a été synthétisé avec seulement 1 mg de BSA, dont la majeure partie n'a pas été impliquée dans la réaction de synthèse et a donc été éliminée par centrifugation.

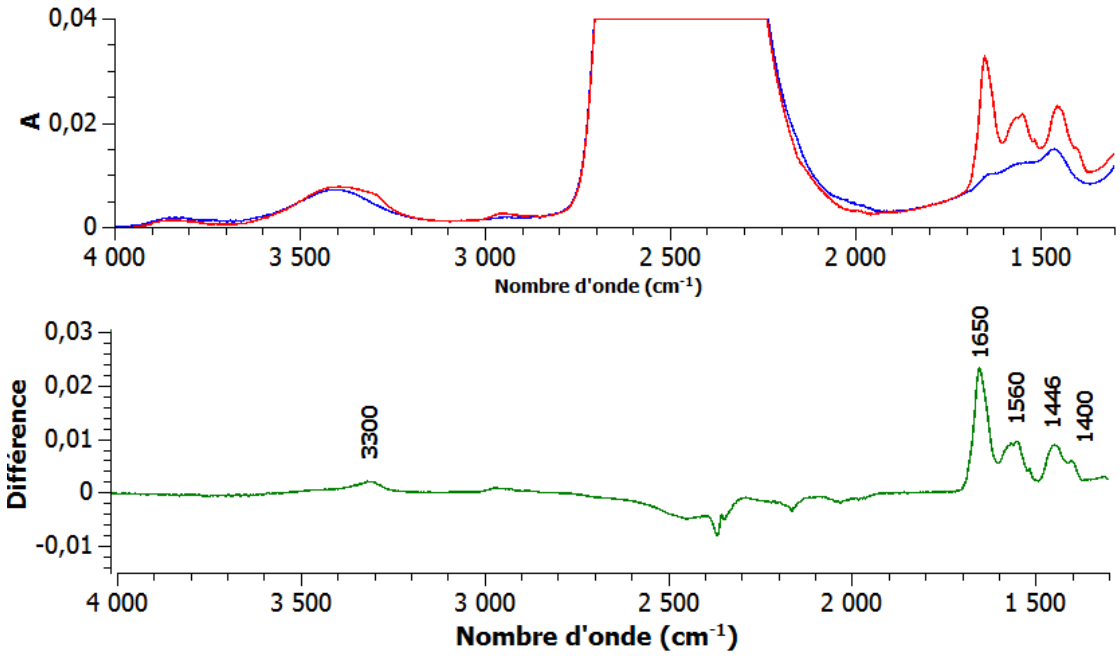


Figure III.16 : En haut : spectre de la BSA dans D_2O (60 mg/mL) (rouge) et Ag:BSA synthétisé dans D_2O (bleu). En bas : Différence arithmétique entre les deux spectres.

La solution a été concentrée 10 fois avant analyse, néanmoins, on peut estimer que la concentration finale de BSA dans la solution du système bio-conjugué est 100 fois inférieure à celle de la solution de BSA à 60 mg/mL utilisée comme comparatif. Avec une quantité aussi faible de protéine, il devrait être impossible d'observer des bandes d'absorption associées à la protéine dans le spectre FTIR en solution. Un phénomène d'exaltation de l'absorption (SEIRA: Surface Enhanced InfraRed Absorption) dû aux nanoparticules d'argent pourrait peut être expliquer une telle intensité de signal. [Aroca (2004)]

Les différences entre les spectres de la BSA et du système Ag:BSA (fig. III.16) apparaissent surtout en termes d'intensité relative des bandes à 1650, 1560, 1446 et 1400 cm^{-1}. Il y a aussi une légère modification dans l'allure du spectre vers 3300 cm^{-1}. Les pics à 1650 et 1560 cm^{-1} sont respectivement attribués aux bandes amides I et II, qui sont reliées directement à la structure de la protéine. Les bandes à 3300 et 1446 cm^{-1} sont attribuées aux modes de vibrations des bandes N-H dans D_2O [Barth (2007)].

Une analyse plus approfondie de ces spectres, notamment utilisant des méthodes décrits dans la littérature pour la desommation des différentes contributions dans le domaine des bandes amide, est nécessaire pour établir un lien avec les résultats obtenus par spectrométrie SERS. Cependant le fait d'observer un signal dû aux protéines dans les suspensions des bioconjugués est encourageante.

III.1.3-Conclusions

Les synthèses de nanoparticules d'argent bio-conjuguées ont été réalisées avec quatre protéines courantes : l'hémoglobine, le cytochrome C, la BSA et la lysozyme. Les observations effectuées par microscopie électronique en transmission notamment ont montré la formation des nanoparticules de tailles comprises entre 10 et 30 nm. Les nanoparticules d'argent sont recouvertes d'une fine couche de protéines dont l'épaisseur se situe entre environ 4 et 10 nm.

Les spectres d'absorption UV-vis de suspensions de nanoparticules bioconjugués Ag:BSA et Ag:Lysozyme ont montré clairement une bande de résonance plasmon à ~410 nm. Pour l'hémoglobine et le cytochrome C, protéines contenant des macrocycles porphyriques qui présentent une forte absorption dans ce même domaine spectrale, les spectres obtenus pour les nanoparticules bioconjugués ont montré une modification de la forme de cette bande.

Ces systèmes ont permis d'obtenir une exaltation du signal Raman (SERS) des nanoparticules bioconjugués en suspension et ainsi d'étudier l'état des protéines dans les systèmes bio-conjuguées synthétisés. Pour cela un système simple et efficace d'échantillonnage a été mis en place en centrifugeant les suspensions de nanoparticules bio-conjuguées puis en les redispersant dans l'eau déionisée pour les concentrer, puis en déposant une goutte de cette solution sur un substrat réfléchissant et hydrophobe.

Avec une excitation dans le vert, les spectres Raman des échantillons d'hémoglobine et de cytochrome C lyophilisés sont dominés par les bandes du groupe hème au détriment des modes associés aux chaînes peptidiques. Cependant, les spectres SERS des nanoparticules bioconjuguées Ag:Hémoglobine et Ag:Cytochrome C présentent des bandes larges dans le domaine 1100-1700 cm-1, similaires à celles observées dans les spectres SERS des nanoparticules bioconjuguées à base de BSA et de lysozyme, protéines qui ne contiennent pas de groupe hème. Ces bandes ont donc été associées aux modes de vibration des chaînes peptidiques et des acides aminés.

Pour tous les systèmes bioconjugués l'observation d'un pic fin à ~238 cm^{-1} attribué à l'élongation des liaisons Ag-N indique l'accroche covalente de la protéine par ses terminaisons azotées aux nanoparticules d'argent.

Des analyses préliminaires par spectrométrie FTIR-ATR des suspensions de nanoparticules bioconjugués Ag:BSA synthétisés dans D_2O ont permis d'observer les bandes d'absorption de cette protéine malgré la quantité extrêmement faible de protéines qui entoure les nanoparticules d'argent.

III.2) Etude des polymorphes de la caféine par SERS

La plupart des médicaments sont élaborés sous la forme de poudres qui présentent souvent une basse symétrie moléculaire et cristalline. Il en résulte un polymorphisme cristallin, avec des espèces métastables et des structures cristallines désordonnées [Decroix (2009)]..

Les phases amorphes et le désordre cristallin peuvent affecter la solubilité, la stabilité, les propriétés mécaniques ou encore la biocompatibilité de ces poudres [Taylor (1998)] ; [Hancock (1997)] ; [Okumura (2005)]. Leurs effets thérapeutiques ou leur libération dans l'organisme peuvent alors être considérablement réduits. Connaître le degré de désordre cristallin et la conformation structurale d'une molécule dans son état cristallin est un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique.

De nombreuses méthodes sont employées pour étudier la cristallinité des composés en phase solide telles que la diffraction des rayons X, la DSC (differential scanning calorimetry) la microcalorimétrie, la spectrométrie infrarouge (IR, NIR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie Raman [Black (1977)] ; [Otsuka (1988)] ; [Otsuka (2000)] ; [Gidley (1985)] ; [Hendra (1996)] ; [Hubert (2012)]. Parmi ces techniques, des travaux ont démontrés la grande précision de mesure de la spectrométrie Raman pour la détermination de l'ordre cristallin [Denicourt (2003)]. La spectrométrie Raman étant sensible aux vibrations des liaisons moléculaires, elle est particulièrement sensible au désordre orientationnel local. Elle peut également servir de sonde de l'ordre cristallin général du cristal par l'étude des phonons dans le domaine des basses fréquences [Hédoux (1999)].

Ce domaine des basses fréquences a été peu étudié jusque récemment en dépit de son grand intérêt pour la détermination des modifications structurales des échantillons. En effet, de nombreux produits pharmaceutiques possèdent une signature spécifique aux bases fréquences, tels que l'aspirine, l'ibuprofen ou l'acetaminophen [Moser (2010)].

Le domaine des basses fréquences est très proche de la raie laser Rayleigh. L'exaltation du signal Raman dans ce domaine de fréquence peut être une solution pour augmenter le ratio signal/bruit de fond mesuré et donc simplifier l'étude d'échantillons par spectrométrie Raman basses-fréquences.

La spectrométrie SERS a été peu utilisée dans le domaine des basses fréquences [Tripathy (2011)] ; [Margueritat (2008)]. La caféine, molécule souvent utilisée pour l'étude des polymorphismes cristallins [Hubert (2012)] ; [De Matas (1998)] ; [Manduva (2008)], est un échantillon idéal pour cette étude.

III.2.1-Les phases polymorphiques de la caféine

La caféine est une biomolécule bien connue pour ses diverses applications en agroalimentaire et dans le domaine pharmaceutique comme principe actif (stimulant nerveux). Elle a été isolée pour la première fois en 1820 par Friedrich Ferdinand Runge.

Elle fait partie de la famille des méthylxantine (fig. III.17) et se présente à l'état pur sous la forme d'une poudre cristalline blanche.

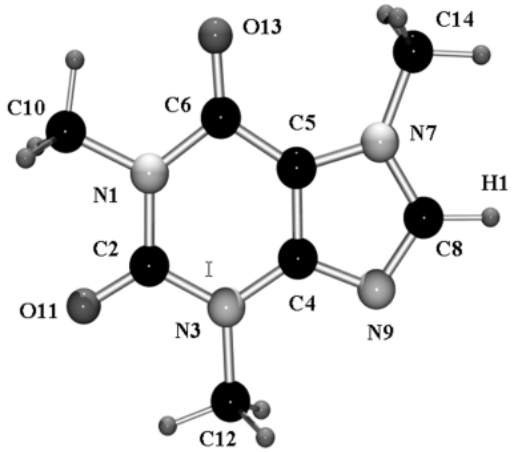
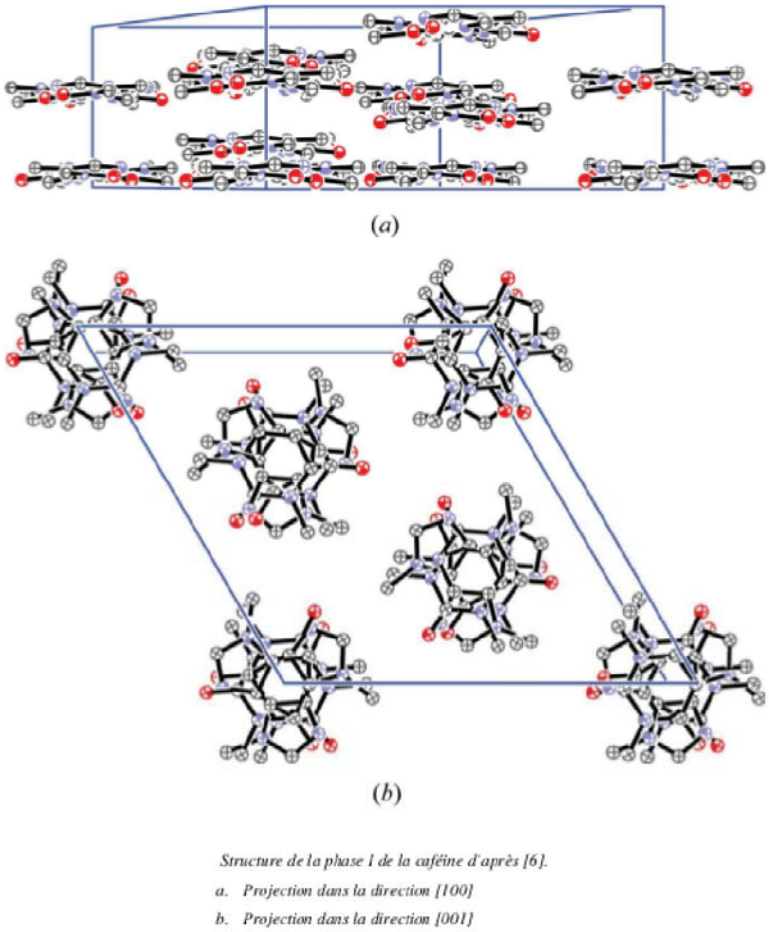


Figure III.17 : Géométrie optimisée (B3LYP/6-311+G(d, p)) de la caféine anhydre. [Pavel (2003)]

La caféine possède trois phases cristallines, une phase hydrate et deux phases anhydres polymorphiques appelées Caféine I et Caféine II. Les deux phases polymorphiques sont très difficiles à séparer et à différencier.

La phase Caféine I est métastable à température ambiante. Elle s'obtient par réchauffement de la Caféine II au dessus de 426 K et possède une structure de phase à désordre orientationnel (désordre d'orientation dynamique).

Son groupe spatial obtenu par diffraction des rayons X est R3c, pour une maille hexagonale et avec six molécules par maille. Sur chaque site, les molécules sont en rotation autour de l'axe c et peuvent occuper trois orientations préférentielles (fig. III.18).



Structure de la phase I de la caféine d'après [6].
a. Projection dans la direction [100]
b. Projection dans la direction [001]

Figure III.18 : Structure de la phase I de la Caféine. (a) Projection dans la direction [100] ; (b) Projection dans la direction [001] [Decroix (2009)]

La phase Caféine II est stable à température ambiante et sa structure n'a pas encore été clairement identifiée. Enright et al [Enright (2007)] propose une structure de maille monoclinique de groupe d'espace C2/c (fig. III.19). L'agencement des molécules est plus complexe que dans la Caféine I et possède un désordre orientationnel moins important.

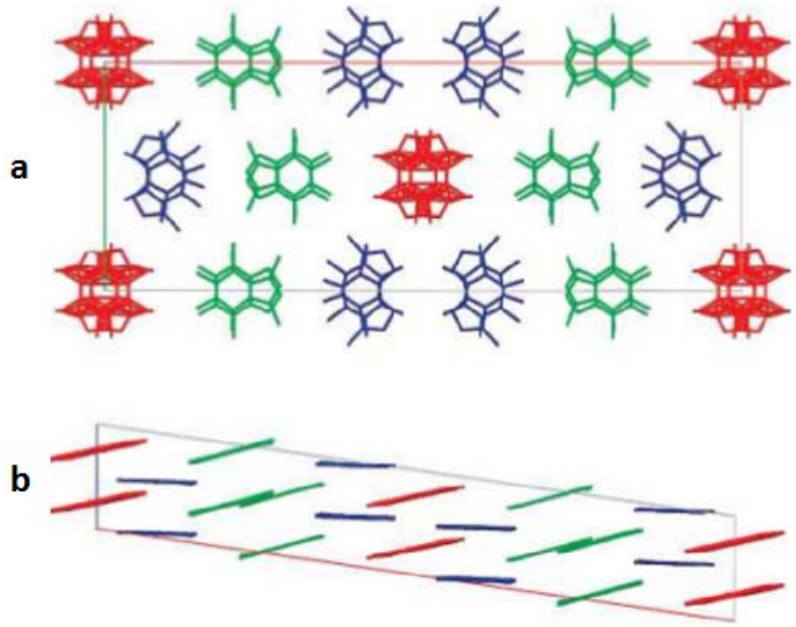


Figure III.19 : Structure de la phase II de la caféine. (a) Projection selon l'axe c avec l'axe a vertical ; (b) Projection selon l'axe b avec l'axe c vertical. En bleu, les sites désordonnés 65:35 ; en rouge, les sites désordonnés 50:50 ; en vert, les sites ordonnés [Decroix (2009)].

Les structures cristallographiques des deux formes de la caféine sont très proches et ne permettent pas de les différencier facilement. En spectrométrie Raman, seules les contributions spectrales de la caféine dans le domaine basse fréquence (associées à la rotation de la phase autour du cycle de la molécule) permettent de différencier la Caféine I de la Caféine II (fig. III.20). La Caféine I possédant un désordre orientationnel plus important, son signal basse fréquence, autour de 20 cm^{-1} est une large bosse. Pour la Caféine II, il s'agit de deux pics à 15 et 30 cm^{-1}. Par ailleurs, ce signal spécifique possède une bonne section efficace ce qui le rend aisé à détecter en spectrométrie Raman.

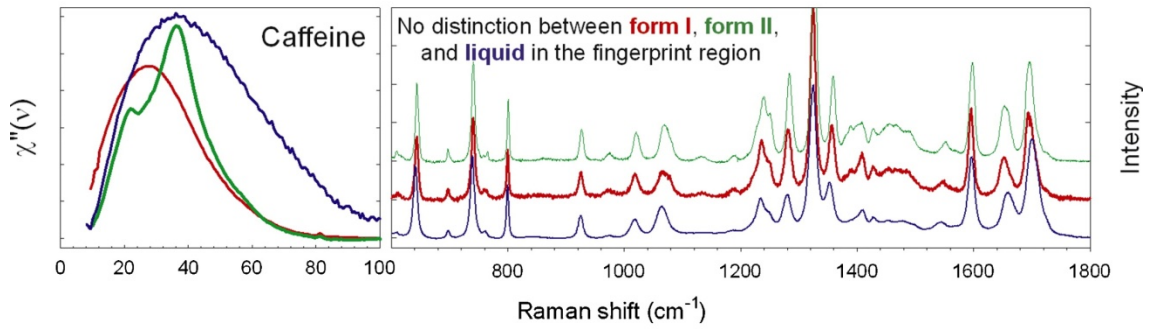


Figure III.20 : Spectres Raman des formes I et II de la caféine. Le spectre est divisé en deux régions : le domaine des basses fréquences (10-100 cm^{-1}) et le domaine des hautes fréquences (100-1800 cm^{-1}) [Hédoux (2011)].

III.2.2-Dépôts de caféine sur substrats SERS

Pour étudier les modes de vibration basses fréquences de la caféine cristallisée, nous avons déposé la caféine sur des substrats fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. Les échantillons ont été préparés en déposant des nanoparticules d'or synthétisées par la méthode de Turkevich et al, sur des lames de verre par silanisation (cf. II.1.3). Les substrats ainsi préparés ont été traités au plasma cleaner afin d'éliminer toutes traces de contaminants.

L'objectif était ensuite de déposer un film mince de caféine sur le substrat par dépôt d'une goutte de solution de caféine laissée à sécher.

Pour cela, une solution de caféine de concentration 10^{-4} M a été réalisée dans l'eau déionisée à partir d'une poudre pure de caféine I, puis une goutte de 100 µL a été déposée et laissée à séchée sur la lame de verre fonctionnalisée (fig. III.21).

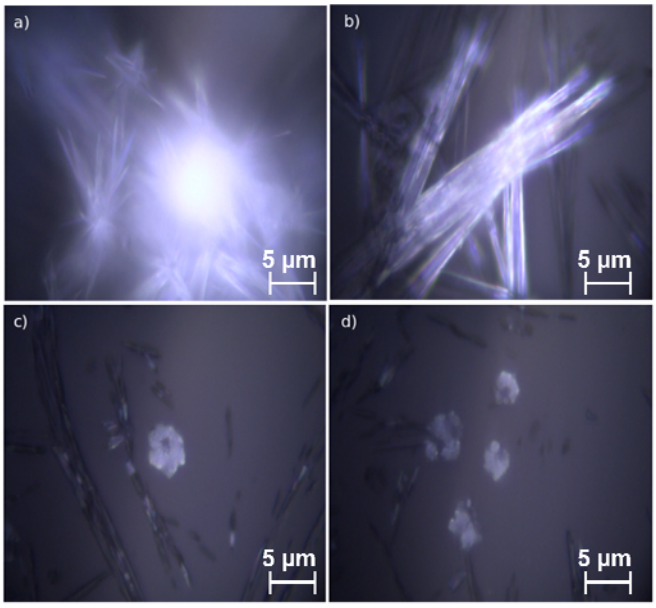


Figure III.21 : Cristallisation de la caféine sur une lame de verre fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or.

La caféine a ainsi cristallisée librement selon deux formes, de longues aiguilles (fig. III.21 (a, b)) et de petites cristallites (fig. III.21 (c, d)). Contrairement à l'objectif recherché, la caféine n'est donc pas répartie de manière homogène sur le substrat et présente une surépaisseur importante pour certaines branches cristallines (fig. III.21 (b)).

Pour mieux homogénéiser le dépôt et réduire son épaisseur, une goutte de 50 µL a été déposée sur la lame de verre fonctionnalisée, puis recouverte d'une autre lame pour étaler la solution de caféine sur la plaque (fig. III.22).

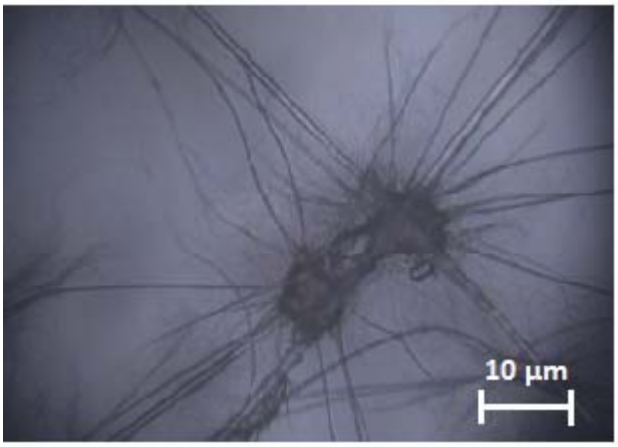


Figure III.22 : Cristallisation de la caféine sur une lame de verre fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or recouverte d'une lame de verre.

La caféine cristallisée présente alors une épaisseur moins importante, mais elle cristallise toujours librement sur la lame de verre et seulement sous la forme d'aiguilles. Des analyses ont été effectuées sur ces échantillons et ceux présentés figure III.21.

Enfin pour essayer à nouveau de mieux répartir la caféine sur le substrat SERS, des essais ont été réalisés en dissolvant la caféine dans l'éthanol plutôt que l'eau et également en déposant la caféine sur un susbtrat Klarite® (cf I.2.2). Mais ces systèmes n'ont pas donnés de résultats satisfaisants.

III.2.3-Etude par spectrométrie SERS

La figure III.21 montre que deux types de cristaux peuvent se former à la surface du substrat nanostructuré après séchage de la solution de caféine. Le premier type de cristal observé, en forme d'étoiles, s'étend en longues aiguilles sur la lame de verre. Le second type de cristal est plus petit, et prend la forme de « petites fleurs ».

La figure III.23 montre les spectres Raman associés à ces deux types de cristaux de caféine obtenus à partir des deux types de cristaux présentés sur la figure III.21 et comparés avec les spectres des cristaux purs de chacune des formes de la caféine. Dans le premier type de cristal (aiguilles de caféine), le signal basses fréquences de la caféine est une large bande centrée à environ 24 cm^{-1}. C'est le signal attendu pour la caféine I (spectre (c)), c'est-à-dire la forme la moins ordonnée de la caféine. Pour le second type de cristal (spectre (b)), le spectre obtenu à basses fréquences laisse apparaitre deux pics bien définis à 20 cm^{-1} et 38 cm^{-1}. Ce signal est caractéristique de la forme ordonnée de la caféine, la caféine II qui est la forme utilisée dans le domaine pharmaceutique (spectre (d)). Sur un même substrat, il y a donc la présence des deux formes de la caféine, ce qui était attendu compte tenu du fait que les cristaux de caféine ont été dissous, puis que la solution a été laissée sécher sans aucun contrôle.

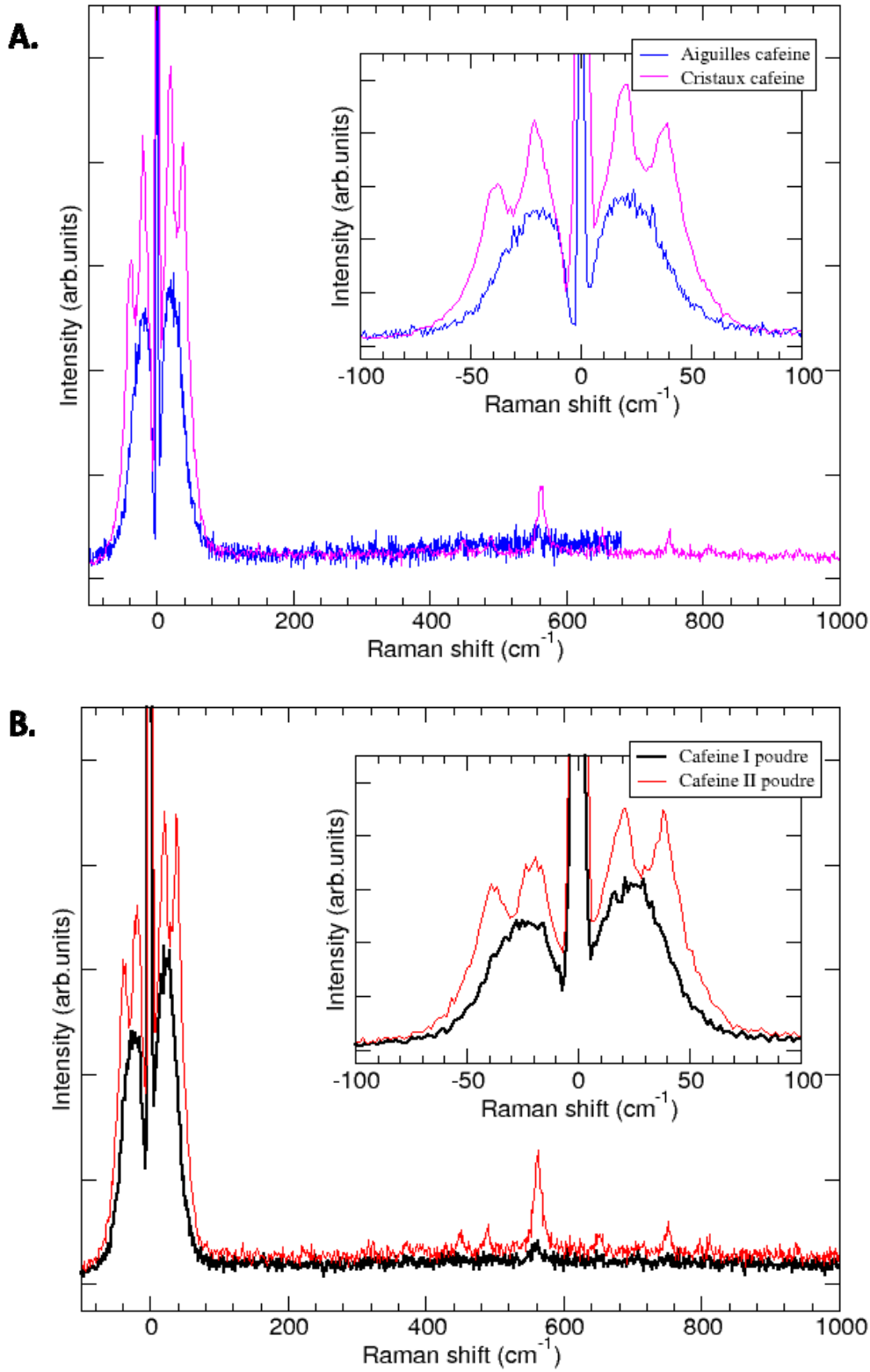


Figure III.23 : Spectres Raman : A. des deux types de cristaux observés sur la figure III.21 : cristal type 1 (aiguilles); cristal type 2 ; B. cristaux purs (poudre) de : caféine I; caféine II. Longueur d'onde laser : 532 nm ; puissance laser : 0,55 mW ; temps d'acquisition : 10 s.

La figure III.24 montre la comparaison entre les spectres obtenus sur les deux formes de la caféine pure, et l'exaltation des deux types de cristaux par les nanoparticules d'or.

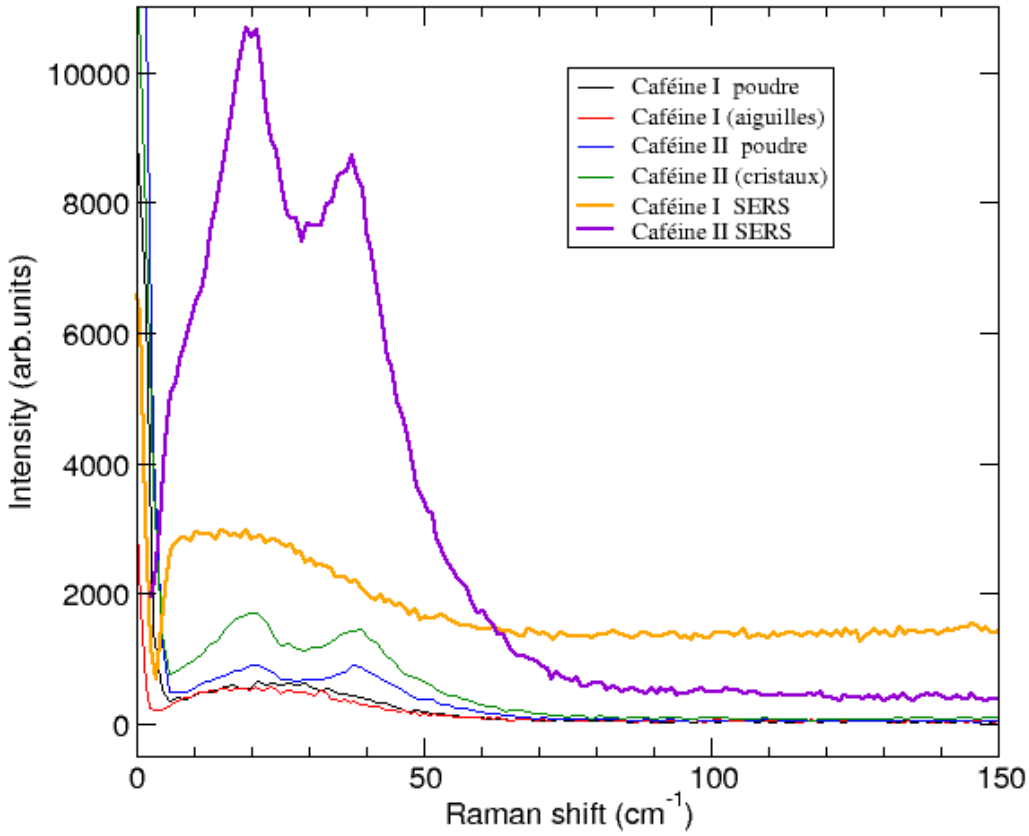


Figure III.24 : Comparaison des spectres Raman des cristaux purs de Caféine I et II, des phases cristallisées sur le substrat (aiguilles, cristaux) présentées fig. III.16 et des spectres SERS de la caféine. Longueur d'onde laser : 532 nm ; puissance laser : 0,55 mW ; temps d'acquisition : 10 s.

Le dépôt des nanoparticules d'or, comme le dépôt de la caféine sur les nanoparticules, n'est pas contrôlé (le processus de silanisation permet une répartition plus homogène des nanoparticules sur le substrat mais ne permet pas une totale maitrise de leur répartition). De ce fait, l'intensité du signal Raman du signal basse fréquence de la caféine mesuré à différents endroits du substrat est très hétérogène en termes d'intensité et n'est pas toujours exalté. De plus, la présence en un même point de la caféine et de nanoparticules d'or ne conduit pas nécessairement à une exaltation du signal Raman de la caféine. En effet, pour avoir un effet SERS, plusieurs conditions doivent être réunies. Ainsi, l'effet plasmonique n'est efficace qu'à condition que les nanoparticules soient suffisamment proches et qu'elles ne soient pas trop agglomérées [Blackie (2008)] ; [Camden (2008)].

Nos résultats montrent qu'il est plus aisé d'exalter le signal de la caféine II. Ceci peut être dû à la structure cristallographique de la Caféine II, qui est plus ordonnée que celle de la caféine I.

Mais ceci peut aussi être dû à une meilleure interaction entre les nanoparticules d'or et le cristal qui les recouvrent par la caféine II que par la caféine I, conduisant à de meilleures conditions pour l'exaltation du signal Raman (une meilleure répartition caféine/or, de meilleures interactions chimiques caféine/or).

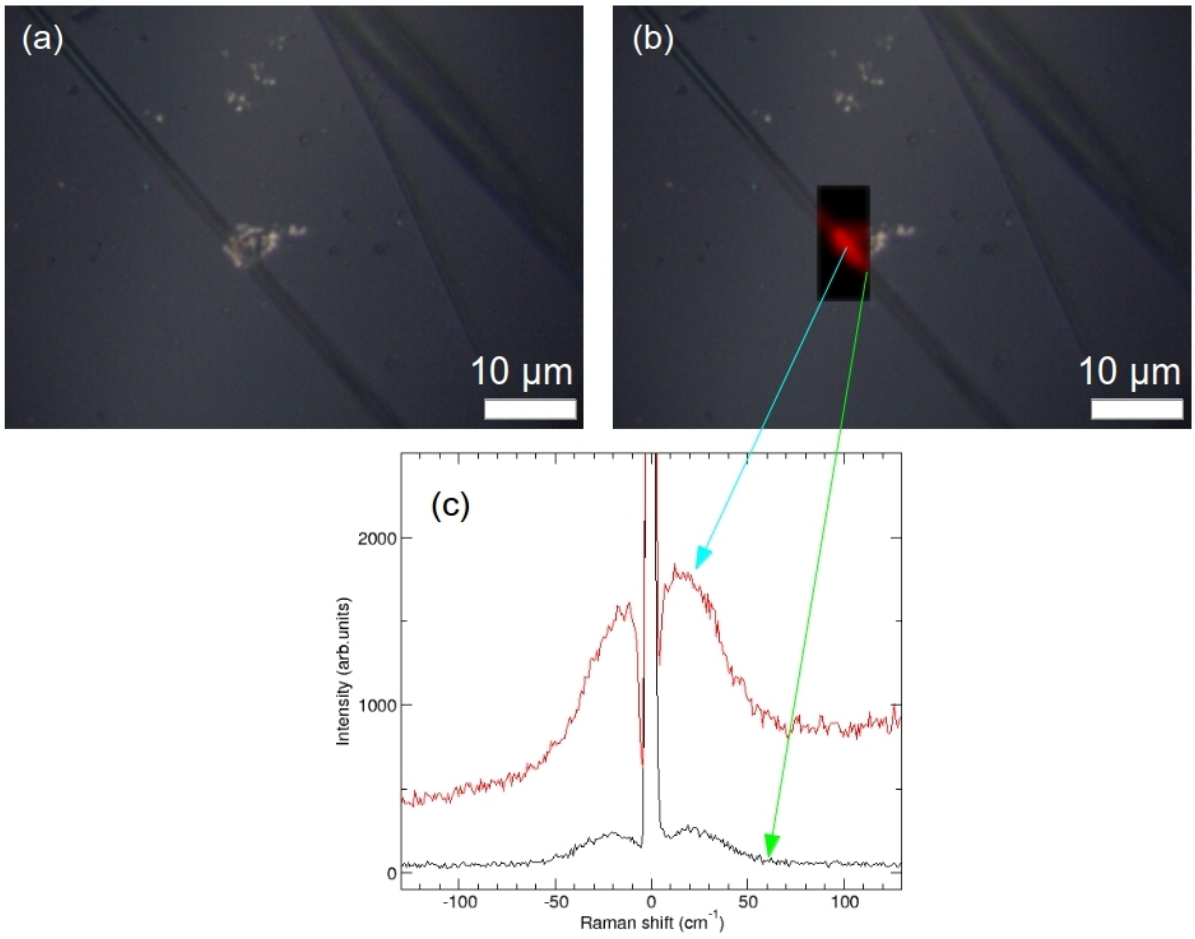


Figure III.25 : (a) Image au microscope optique d'une branche cristalline de Caféine I déposée sur une lame de verre fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or ; (b) Cartographie Raman de la zone montrée en (a) ; (c) Spectres Raman de deux points représentés dans la cartographie Raman. L'intensité intégrée du pic basse fréquence (~20 cm^{-1}) est représentée par une variation de couleur depuis le noir jusqu'au rouge. Puissance laser : 0,55 mW. Pas de mesure : 1 µm.

Une cartographie montrant l'exaltation du signal de la caféine I sur le substrat par les nanoparticules d'or a été réalisée et présentée figure III.25. Le fort contraste entre les zones d'exaltation du signal de la Caféine I en présence de nanoparticules d'or et la Caféine I sur la même aiguille cristalline mais sans nanoparticules d'or est montré dans la figure III.21 (c). Ce résultat démontre la possibilité d'exalter le signal Raman pour des modes de vibration à très basses fréquences, et ouvre la voie à l'étude d'échantillon ayant une mauvaise section efficace dans ce domaine de fréquence. Il s'agit, d'après l'état de nos connaissances, de la première expérience SERS dans ce domaine de fréquence pour des systèmes polymorphiques de molécules d'intérêt biologique.

Cela pourra permettre d'ouvrir la voie à de nouvelles études dans ce domaine et ainsi étendre les applications de la technique SERS pour l'étude des modes de vibration spécifiques de molécules, uniquement présents dans le domaine des basses fréquences.

III.2.4- Conclusions

Dans cette partie nous avons montré la possibilité d'amplifier le signal Raman d'une molécule d'intérêt biologique, la caféine, dans le domaine des basses fréquences. Les deux formes de la caféine ont pu être observées et exaltées dans des dépôts minces de cette molécule sur un substrat de verre fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or.

L'exaltation du signal Raman a été clairement démontrée dans les zones où des agrégats de nanoparticules d'or sont visibles au microscope optique. Dans le cas de la caféine II, la forme la plus ordonnée, l'exaltation du signal est plus importante que dans le cas de la caféine I, ce qui est dû probablement à une meilleure interaction des cristaux avec les nanoparticules d'or.

Enfin, la possibilité de cartographier la surface de l'échantillon pour mettre en évidence les zones d'exaltation de la caféine a aussi été démontrée.

Synthèse du chapitre III

Ce chapitre présente les résultats de l'étude de biomolécules par spectrométrie SERS. Deux études ont été réalisées : L'étude de protéines par spectrométrie SERS et leur évolution de structure dans des nanoparticules d'argent bio-conjuguées avec des protéines. Quatre protéines courantes (BSA, lysozyme, hémoglobine et cytochrome-C), ont été utilisées dans cette étude. Les résultats obtenus par spectrométrie et microscopie électronique ont permis de démontrer la validité de ces systèmes pour l'étude des interactions nanoparticules métalliques/protéines. Le système présente des nanoparticules d'argent stabilisées par une fine couche de protéine qui ne sont pas dénaturées par le processus d'interaction.

La seconde étude porte sur la caractérisation par spectrométrie SERS des signaux basses fréquences d'une biomolécules : la caféine. Les résultats montrent la possibilité d'exalter les signaux basses fréquences de la molécule et offre une possibilité de développement de cette technique pour la différenciation de phases polymorphiques proches de molécules d'intérêt biologique.

Chapitre IV :

Etudes de films minces nanostructurés : TiO_2 / Au

Le dioxyde de titane (TiO_2) est un matériau peu onéreux, très stable chimiquement et résistant mécaniquement. Il absorbe la lumière ultraviolette en dessous de 400 nm, mais il est transparent dans le domaine visible. Son indice de réfraction est élevé, il varie entre 2,3 et 2,9 à 500 nm en fonction de la phase cristalline formée [Boukrouh (2008)]. Les films minces de dioxyde de titane présentent un intérêt accru pour de nombreuses applications, que ce soit pour leurs propriétés optiques (revêtements antireflets [Natsuhara (2006)], diélectriques (applications électroniques), cellules solaires [Senthilkumar (2010)], photocatalyse [Hudec (2011)], ou pour leur biocompatibilité (revêtements de dispositifs médicaux [Huang (2009)]). Les nanoparticules d'or, grâce à leur résonance plasmon de surface présentent également des propriétés optiques remarquables. Des composites à base de nanoparticules d'or insérées dans des films minces de dioxyde de titane présentent un grand intérêt technologique par exemple en photocatalyse [Arabatzis (2003)] ; [Bannat (2009)] ou en optoélectronique [Quidant (2001)] ; [Pedrueza (2013)]).

La première partie de ce chapitre présente une étude sur les premiers stades de la formation de nanoparticules d'or dans des films de TiO_2 dopés avec une faible concentration d'or. La méthode d'élaboration par pulvérisation cathodique magnétron (PVD) conduit à la dispersion des atomes d'or dans la matrice de TiO_2. Puis les films ont été soumis à des traitements thermiques dans le but d'induire la formation de nanoparticules d'or et de donner lieu à une structure nanocomposite. La spectrométrie Raman a été utilisée dans cette étude autant dans le domaine des modes optiques de TiO_2, que dans le domaine des basses fréquences où la présence de nanoparticules peut être décelée par l'apparition de pics associés à des modes acoustiques confinés.

D'autre part, si l'effet SERS a rendu possible la détection de molécules à des concentrations extrêmement faibles, la mise en œuvre de cet effet pour l'exaltation du signal Raman de solides a été très peu explorée [Pankuch (1993)] ; [Nardou (2011)] ; [Degioanni (2013)] ; [Lin (2012)]. Le but est de pouvoir accéder à la caractérisation de nano-objets ou de couches ultraminces (de quelques nm d'épaisseur) par spectrométrie Raman grâce à l'exaltation du signal par effet SERS.

Ainsi la deuxième partie de ce chapitre se focalise sur la mise en œuvre de l'effet SERS pour la caractérisation de films ultraminces de dioxyde de titane d'une épaisseur de l'ordre de 10 nm. Ces films ont été élaborés par ALD, technique adaptée à la croissance de films de très faible épaisseur. Les dépôts ont été réalisés sur des substrats actifs-SERS élaborés par fonctionnalisation de substrats de silicium par des nanoparticules d'or.

IV.1) Couches minces composites TiO_2:Au

L'élaboration de films nanocomposites à base de nanoparticules d'or incluses dans une matrice de TiO_2 a été rapportée dans la littérature notamment par des techniques sol-gel [Zhao (1996)] ; [Epifani (2000)]. La possibilité de réaliser ce type de films nanocomposites par pulvérisation cathodique magnétron réactive, technique largement utilisée dans l'industrie pour différents types de revêtements, a été montrée par l'équipe du Professeur F. Vaz de l'Université Do Minho (Portugal) en 2010 [Torrell (2010a)] . Comme décrit dans la section II.3.1, ces dépôts sont réalisés par pulvérisation simultanée de cibles en Ti et en Au. Dans les travaux réalisés avant notre étude, la concentration d'or dans les films était élevée, de l'ordre de 15 % at. Les caractérisations réalisées ont montré la formation de nanoparticules d'or après un traitement thermique à une température supérieure à environ 300 °C et une augmentation de la taille de nanoparticules avec la température de recuit. [Torrell (2010a) (2010b) (2010c) (2011) ; [Macedo (2012)]. Cette évolution de la structure des films a été reliée avec la variation de leur coloration (fig. IV.1).

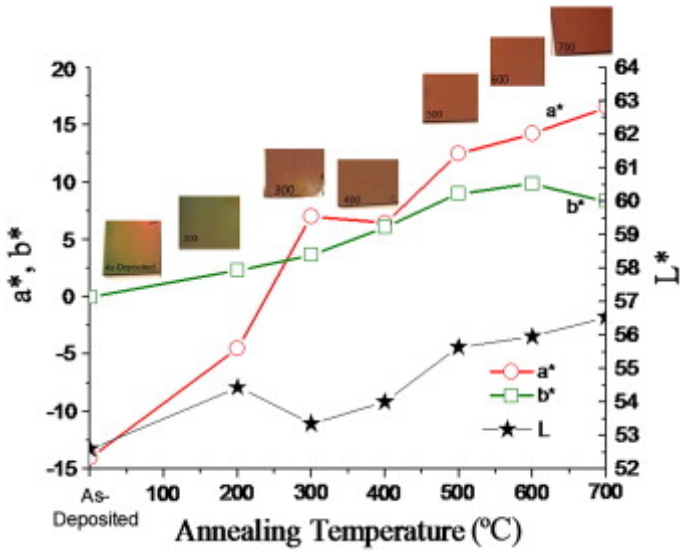


Figure IV.1 : Evolution des coordonnées de couleur (L*a*b) et de l'apparence des dépôts en fonction de la température de recuit [Torrell (2010a)]

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux premiers stades de la formation des nanoparticules d'or dans la matrice de dioxyde de titane. Dans ce but, des films dopés avec des concentrations d'or plus faibles, de l'ordre de 5 % at., ont été soumis à des recuits à des températures entre 200 et 800 °C. L'évolution de la structure des films a été étudiée notamment par spectrométrie Raman, y compris dans le domaine des très basses fréquences dans lequel des signaux associés à des nanoparticules ont été analysés. Des expériences de diffraction de rayons X (DRX) et des observations par microscopie électronique en transmission (TEM) de quelques échantillons sélectionnés ont permis de compléter cette étude.

IV.1.1- Analyses par spectrométrie Raman

La spectrométrie Raman a été utilisée pour étudier autant la modification de la structure de la matrice de TiO_2 que la formation de nanoparticules d'or induite par les traitements thermiques de recuit. Dans ce but des dispositifs permettant d'accéder au domaine de très basses fréquences ont été utilisés. D'autre part, le choix de la longueur d'onde d'excitation a été aussi déterminant pour cette étude.

La figure IV.2 montre la variation du spectre Raman des films de TiO_2:Au en fonction de la température de recuit, T_a. Les spectres ont été obtenus avec une excitation à 532 nm. Le dispositif utilisé a été le spectromètre InVia Renishaw avec des filtres VBG permettant d'accéder aux basses fréquences jusqu'à 10 cm^{-1}. Les spectres Raman ont été normalisés en utilisant la raie à 520 cm^{-1} pour $T_a \leq 300$ °C et le pic à basse fréquence pour $T_a \geq 300$ °C.

Différentes contributions peuvent être distinguées dans ces spectres Raman. La première est celle du substrat en silicium. La signature Raman du silicium est caractérisée par une bande intense et fine à 520 cm^{-1} due à la diffusion du premier ordre par des phonons optiques et un pic assez faible à 303 cm^{-1} dû à la diffusion du second ordre par des phonons acoustiques [Swick (1993)]. Le pic à 520 cm^{-1} est d'ailleurs une référence pour l'étalonnage des spectromètres Raman, à la fois pour la position du spectre en abscisse, ainsi que pour vérifier la réponse du système à l'aide de l'intensité du signal Raman.

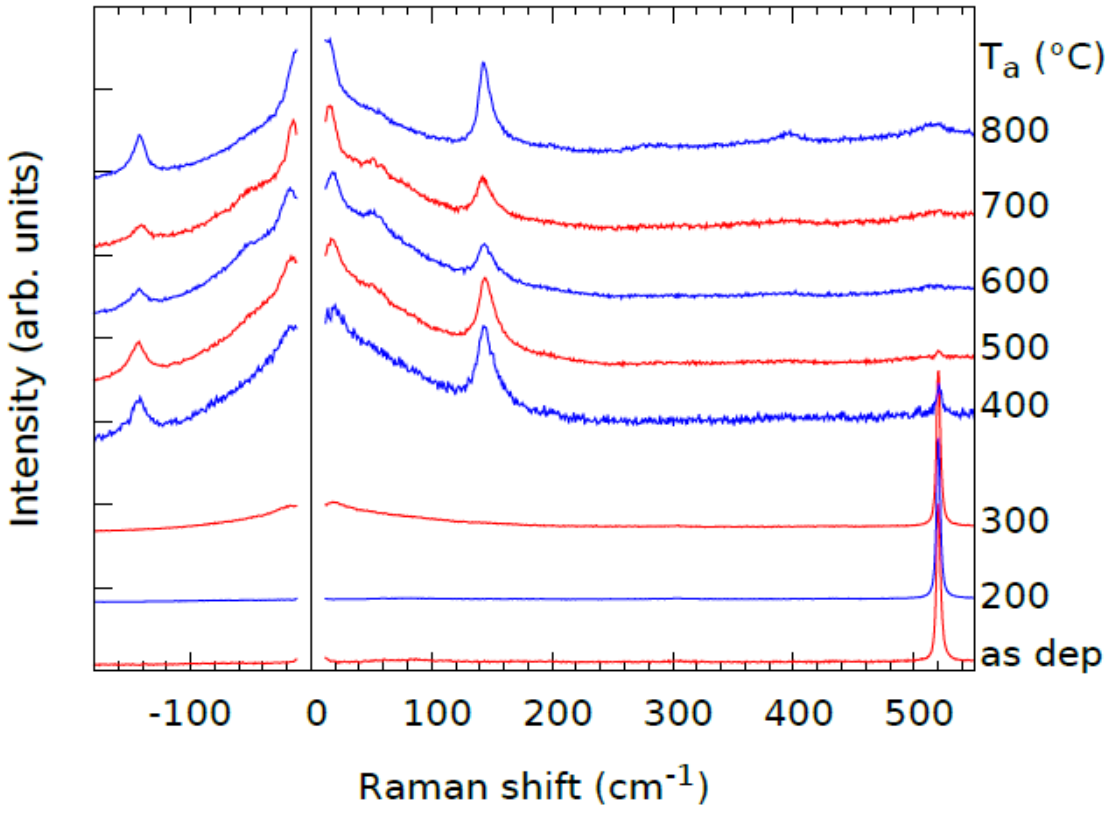


Figure IV.2 : Spectres Raman Stokes et Anti-Stokes des films de TiO_2:Au non recuit et recuits, sur substrat de silicium. En partant du bas : film non recuit et films recuits à 200, 300, 400, 500, 600, 700 et 800 °C. La raie laser d'excitation est à 532 nm. Les spectres ont été normalisés en intensité et décalés verticalement pour une meilleure lisibilité.

Le pic intense du silicium est visible sur le spectre du film non recuit et pour les échantillons recuits jusqu'à 500 °C. Pour des températures de recuit plus élevées, il est absent. Ceci révèle une forte absorption de la raie laser d'excitation, ainsi que des photons diffusés, par les films recuits à plus de 500 °C, et donc une diminution de la profondeur sondée.

La deuxième contribution est celle de la matrice de TiO_2. Le spectre Raman du film non-recuit et ceux des films recuits jusqu'à une température de 300 °C ne présentent aucun signe des pics caractéristiques de TiO_2 cristallisé. Un recuit à 400 °C est nécessaire pour observer l'apparition de pics à 144, 400 et 520 cm^{-1} qui sont attribués aux modes de vibrations optiques de la phase anatase de TiO_2 [Boukrouh (2008)].

Dans le domaine des basses fréquences (<100 cm^{-1}), seules des contributions très faibles et mal définies sont observées pour le film non recuit. Après recuit à 300 °C une contribution commence à apparaitre dans ce domaine. Pour $T_a \geq 400$ °C un pic intense et large est observé dans ce domaine de fréquence. Les pics observés en dessous de 20 cm^{-1} sont attribués aux modes acoustiques confinés dans les nanoparticules (cf. I.1.3). Donc les spectres Raman ne montrent pas la formation de nanoparticules même après un recuit à 200 °C. Il est à noter que l'apparition du pic des nanoparticules est concomitante avec l'apparition des pics de TiO_2 cristallisé dans la phase anatase, ce qui pourrait indiquer qu'il s'agit de nanoparticules de TiO_2. Cependant, l'apparition du pic des nanoparticules est également concomitante avec la diminution de l'intensité des pics du silicium jusqu'à leur disparition. La formation de nanoparticules d'or, qui absorbent dans leur résonance plasmon dans le visible, pourrait expliquer la diminution de la profondeur sondée et donc la disparition des pics Raman du substrat.

Torrell et al. [Torrell (2010b)] ont montré pour des concentrations d'or d'environ 12 % at. l'apparition d'une bande d'absorption dans le rouge après le recuit à des températures supérieures à 300 °C (fig. IV.3). Elle a été reliée à la formation de nanoparticules d'or. L'augmentation de la température de recuit induit un décalage de la bande d'absorption vers des plus grandes longueurs d'onde (fig. IV.4).

Pour estimer l'atténuation du signal Raman en fonction de la profondeur de la zone sondée, nous avons considéré l'absorption de la raie laser excitatrice ainsi que celle de la lumière diffusée par l'échantillon (pratiquement à la même longueur d'onde).

La loi de Beer-Lambert permet de calculer l'atténuation d'un faisceau d'intensité initiale I_0 en fonction de la distance parcourue dans le film :

$$I(x) = I_0 e^{-\alpha x} \qquad \text{(IV. 1)}$$

x étant la distance parcourue dans le milieu absorbant et α le coefficient d'absorption.

La figure IV.4 [Torrell (2010b)] montre une valeur du coefficient d'absorption d'environ 25 μm^{-1} au maximum de la bande d'absorption pour deux températures de recuit, 500 et 800 °C pour des films dopés avec environ 12 %. at. d'or.

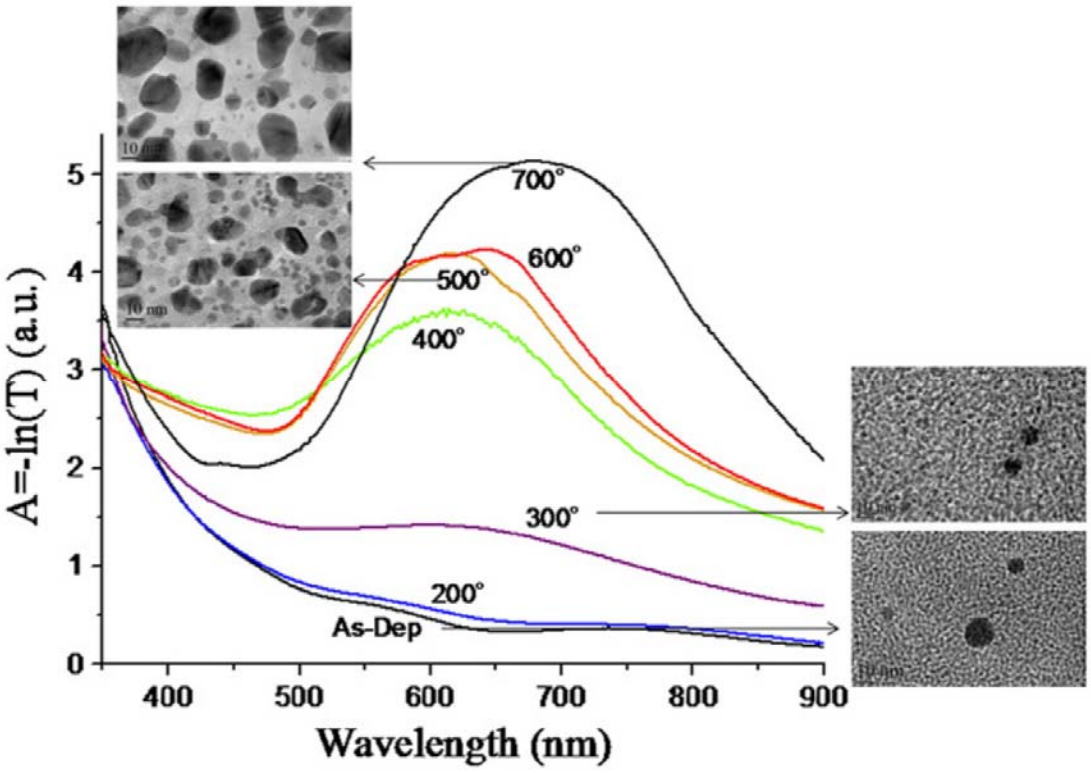


Figure IV.3 : Spectres d'absorption obtenus pour une série de films de TiO_2:Au (12 % at.) recuits à différentes températures allant de 200 à 700 °C [Torrell (2010b)].

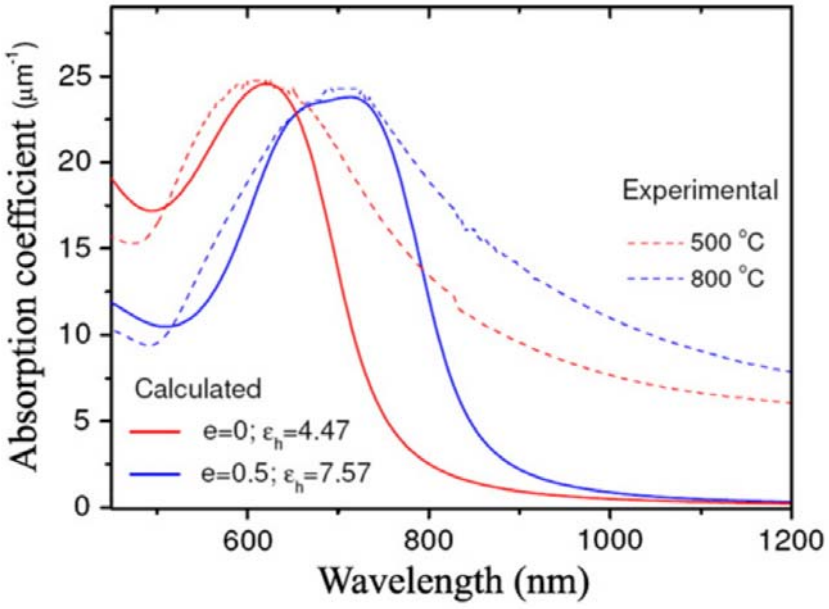


Figure IV.4 : Spectres d'absorption calculés est expérimentaux pour deux échantillons de TiO_2:Au recuits à 500 et 800 °C (concentration d'or : 12 % at.). [Torrell (2010b)]

Pour la détection du signal Raman provenant d'une profondeur *x*, il faut tenir compte d'abord de l'atténuation du faisceau excitateur jusqu'à la profondeur *x*, puis de la section efficace de diffusion Raman, et finalement de l'atténuation du signal Raman dans son trajet pour remonter jusqu'à la surface. Donc pour une profondeur *x*, la distance parcourue par la lumière est *2x*. Le facteur dû à la section efficace de diffusion Raman étant indépendant de la profondeur, il est possible de calculer l'atténuation de l'intensité Raman d'une nanoparticule située à la profondeur *x* par rapport à celle d'une nanoparticule située à la surface. C'est en effet équivalent à l'atténuation d'un faisceau lumineux d'intensité initiale I_0 dans le trajet aller-retour à une profondeur x.

La figure IV.5 montre cette atténuation en fonction de la profondeur *x* pour un coefficient d'absorption $\alpha = 25\ \mu m^{-1}$ correspondant à une concentration d'or de 12 % at. [Torrell (2010b)] et pour 5 % at. (cas de nos échantillons). Dans notre cas (pour une concentration d'or de 5 % at.), l'intensité I_0 à la surface est atténuée d'un facteur 10 pour un trajet aller-retour à une profondeur de 0,125 µm. Donc, le signal provenant de cette profondeur sera 10 fois plus faible que celui généré à la surface. Pour une profondeur de 0,250 µm le signal provenant de cette profondeur sera 100 fois plus faible que celui généré à la surface.

L'épaisseur des films étudiés étant d'environ 500 nm, il apparait donc clairement que très rapidement le signal du substrat (silicium) ne sera plus visible à mesure que la température de recuit augmente et que les nanoparticules d'or se forment.

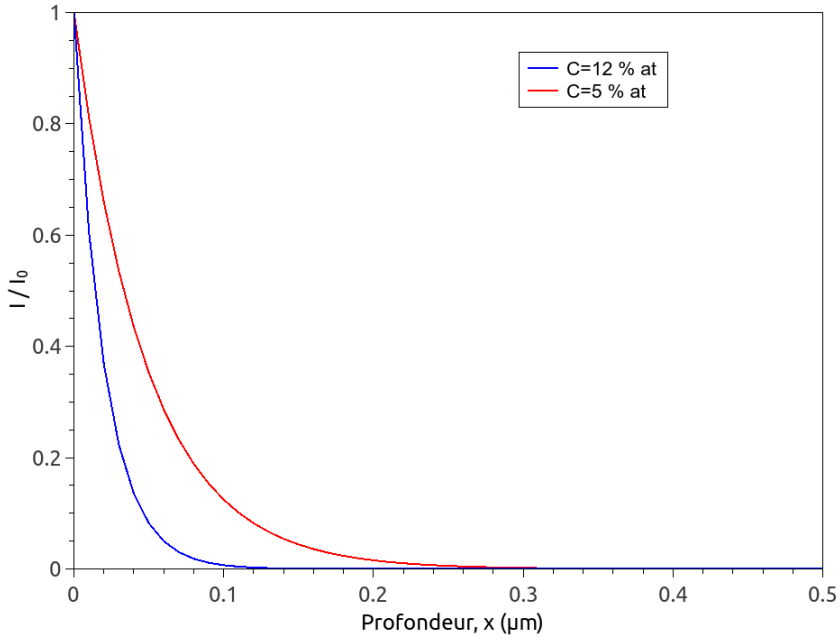


Figure IV.5 : Atténuation de l'intensité du faisceau en fonction de la profondeur atteinte dans le dépôt TiO_2:Au pour une concentration d'or de 12 %at et de 5 %at.

Les figures IV.3 et IV.4 montrent que l'excitation à 532 nm utilisée pour l'enregistrement des spectres Raman donnés dans la fig. IV.2 ne correspond pas au maximum de la bande d'absorption. En effet l'indice de réfraction élevé de l'anatase (n≈2.5) décale fortement la résonance plasmon de l'or par rapport à sa valeur dans le vide ou dans l'air (n≈1). La figure IV.6 montre le spectre d'extinction calculé à l'aide de la théorie de Mie pour des nanoparticules d'or de 3 nm de diamètre dans une matrice d'indice n=2,5. Le maximum de la résonance plasmon se situe autour de 640 nm. Dans le but d'augmenter l'intensité du signal Raman, une nouvelle série de spectres a été enregistrée avec une excitation dans le rouge à 647 nm.

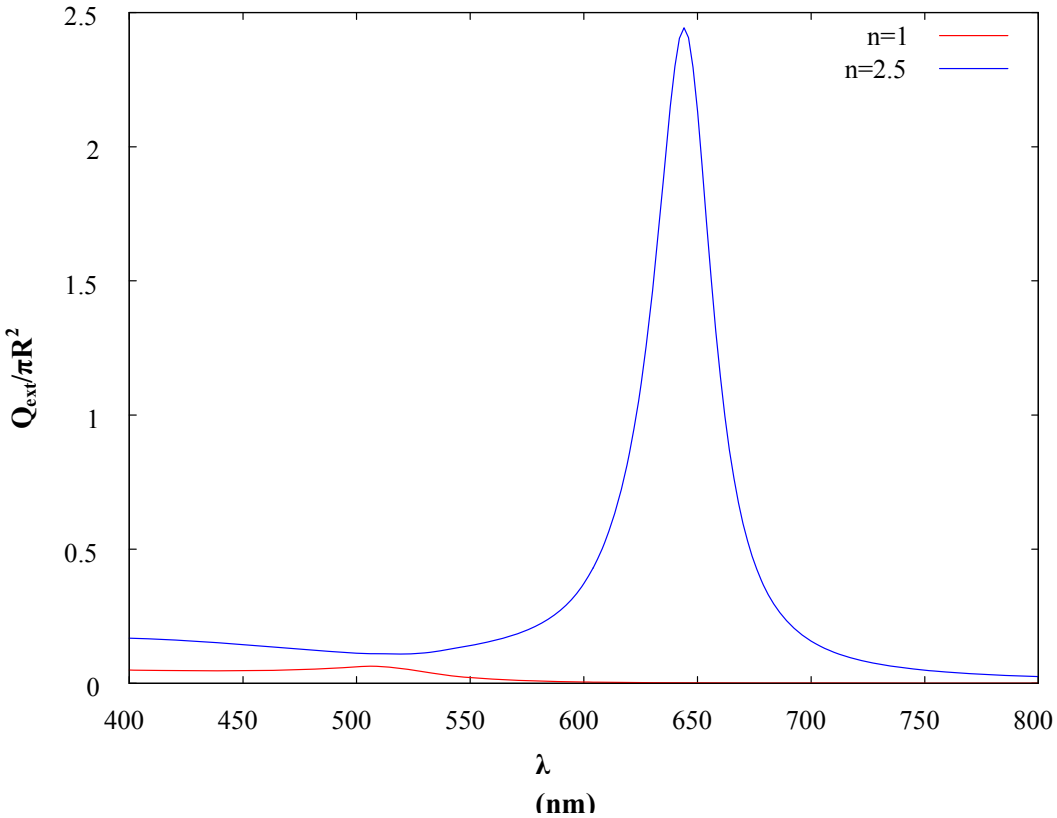


Figure IV.6 : Spectres d'extinction calculés à l'aide de la théorie de Mie pour une nanoparticule d'or (rayon R=3 nm, constantes optiques de [Johnson (1972)] dans le vide (n=1) ou dans un milieu proche de l'anatase (n=2.5).

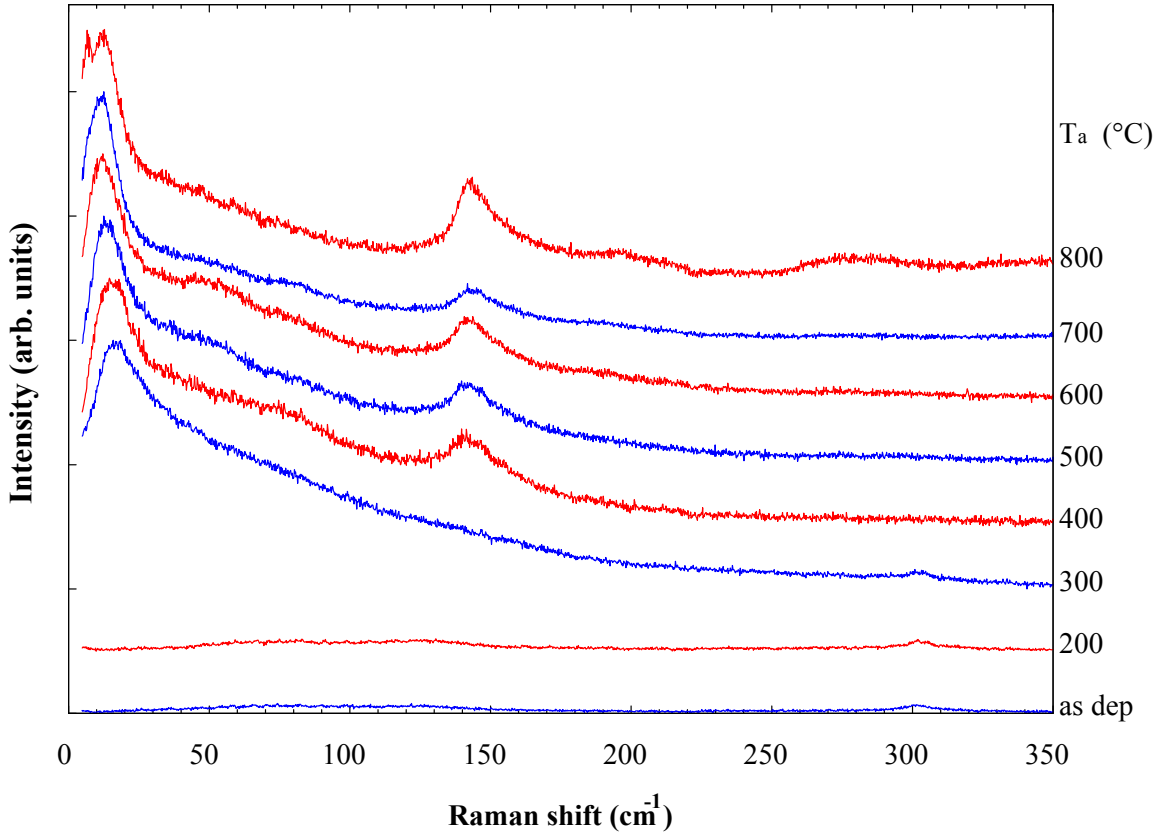


Figure IV.7 : Spectres Raman dans le domaine des basses fréquences des films TiO_2:Au. En partant du bas : film non recuit et films recuits à des températures allant de 200 à 800 °C. La raie laser d'excitation est à 647,1 nm. Les spectres ont été normalisés en intensité et décalés verticalement pour une meilleure lisibilité.

La figure IV.7 montre les spectres obtenus avec une excitation laser à 647,1 nm avec le spectromètre T64000 Horiba. Les spectres ont été normalisés en utilisant la bande du silicium à 300 cm^{-1} pour $T_a \leq 300$ °C et le pic à basse fréquence pour $T_a \geq 300$ °C. Un pic basse fréquence est clairement observé pour les échantillons recuits à des températures supérieures ou égales à 300°C. L'augmentation de signal du pic basse fréquence par rapport au signal de TiO_2 (pic Raman vers 144 cm^{-1}) lors du passage à une raie d'excitation laser résonnante avec le plasmon de l'or montre que les nanoparticules responsables de cette diffusion sont bien constituées d'or.

La fréquence des phonons acoustiques confinés est inversement proportionnelle au diamètre des nanoparticules (cf. I.1.3). Ainsi la position du pic Raman permet de déterminer la taille moyenne des nanoparticules dans les films TiO_2:Au.

Dans cette étude, la relation de proportionnalité entre la fréquence du pic basse fréquence de l'or et le diamètre moyen des nanoparticules a été calculée lorsque celles-ci sont incluses dans une matrice de TiO_2 anatase. Cette inclusion est un avantage, car il est expérimentalement difficile de mesurer le spectre Raman en dessous de 5 cm^{-1} avec suffisamment de résolution spectrale pour déterminer la position des pics. L'inclusion dans une matrice de TiO_2 permet d'augmenter la fréquence des contributions basses fréquences (Tableau I.2) et donc de faciliter la mesure.

D'après les modèles évoqués dans la section I.1.3, la fréquence (en cm^{-1}) du mode quadrupolaire fondamental (*l=2, n=1*) est reliée au diamètre, *d* (en nm), des nanoparticules par l'expression :

$$\nu = \frac{52,8}{d} \qquad \text{(IV.2)}$$

En conséquence, il est possible de remonter à la taille de nanoparticules d'or à partir de la position du pic Raman basse fréquence attribué au mode quadrupolaire. Le tableau IV.1 récapitule les résultats obtenus en fonction de la température de recuit à partir de la position du pic basse fréquence dans les spectres de la fig. IV.7.

Tableau IV.1 : Position du pic Raman basses fréquences dans les spectres de la figure IV.7 et tailles des nanoparticules en fonction de la température de recuit des films TiO_2:Au.

Température de recuit (°C)	300	400	500	600	700	800
Position du pic basses fréquences (cm^{-1})	16,4	15,5	13,3	12,1	11,2	12,25 6,9
Diamètre des nanoparticules (nm)	3,2	3,4	4,0	4,4	4,7	4,3 7,3

Pour une température de recuit de 800 °C, un doublet est visible en dessous de 20 cm^{-1}. L'apparition d'un tel doublet n'est pas explicable avec le modèle utilisé ci-dessus.

Par contre, l'apparition d'un doublet a été rapportée dans le cas de nanoparticules monodomaines du fait de l'anisotropie élastique de l'or. En effet, les vitesses du son dépendent fortement de la direction de propagation dans l'or. Cette dépendance peut être ignorée dans le cas de nanoparticules maclées (Multiply Twinned Particles (MTP)), mais pas pour des nanoparticules monodomaines. Cependant le doublet observé dans le spectre de l'échantillon recuit à 800°C ne peut pas être expliqué de cette façon.

En effet, un calcul prenant en compte l'anisotropie de l'or et la matrice de TiO_2 et utilisant la méthode développée dans la référence [Saviot (2010)] montre que si le dédoublement est bien réel, il est masqué par l'élargissement des pics. Ainsi pour une nanoparticule de 10 nm, le mode isotrope *l=2* (dégénérescence 5) est dédoublé en un mode E_g (dégénérescence 2) à 4.7 cm^{-1} (largeur à mi-hauteur 1.0 cm^{-1}) et un mode T_{2g} centré à 5.7 cm^{-1} (largeur à mi-hauteur 1.6 cm^{-1}). Ce dédoublement est complètement masqué par une faible distribution de taille. L'interprétation du dédoublement du pic est donc à chercher ailleurs. L'hypothèse retenue est que la distribution de taille en est la cause. C'est pourquoi les positions des deux pics ont été utilisées pour calculer deux tailles moyennes dans le tableau IV.1.

Les résultats obtenus montrent une augmentation de la taille des nanoparticules d'or avec l'augmentation de la température de recuit. Cette augmentation est cependant plus faible que celle obtenue par Torrell et al. [Torrell (2010b)] pour une concentration plus élevée d'or (~12 %at.) (fig. IV.8).

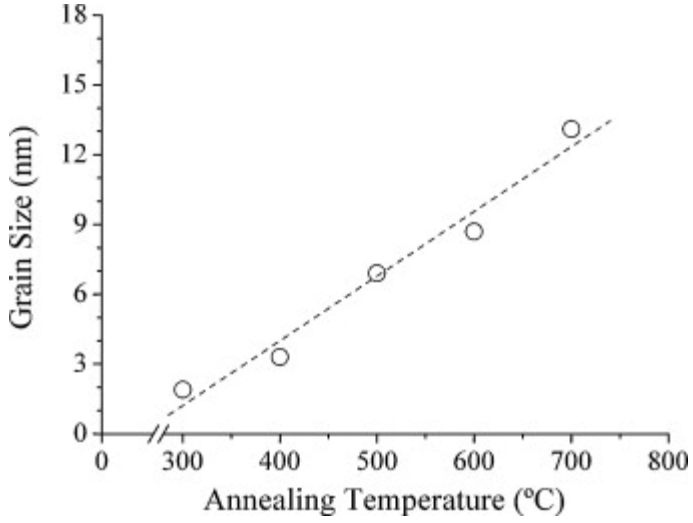


Figure IV.8 : Evolution de la taille des nanoparticules obtenue par DRX dans des nanocomposites TiO_2:Au (12 %at.) [Torrell (2010b)]

Les analyses effectuées ne sont pas suffisantes pour expliquer cette différence d'évolution de la taille des nanoparticules, ni la double distribution de taille de nanoparticules pour l'échantillon recuit à 800°C. En tout cas, il est certain que la profondeur sondée par spectrométrie Raman ne correspond pas à toute l'épaisseur des films due à l'absorption des nanoparticules d'or dans le rouge. Des analyses complémentaires par diffraction des rayons X et microscopie électronique en transmission (MET) ont donc été réalisées pour compléter la caractérisation de la structure du nanocomposite.

IV.1.2- Caractérisation structurale par diffraction des rayons X

Des analyses par diffraction des rayons X (DRX) ont été effectuées sur les échantillons recuits à 400, 600 et 800 °C avec une géométrie Bragg-Brentano, dans le but de relier l'élargissement des pics de diffraction de l'or à la taille des nanoparticules d'or. Cependant dans les diffractogrammes enregistrés aucun pic n'a pu être associé à l'or à cause de la faible épaisseur du film (500 nm) et de la faible concentration d'or (5 %at).

Des analyses avec un faible angle d'incidence, α=2°, ont également été réalisés pour les films recuits à 400, 600 et 800°C (fig. IV.9). Cette géométrie permet de ne sonder qu'une faible épaisseur de l'échantillon et donc de limiter le signal provenant du substrat. Les pics associés à la phase anatase du dioxyde de titane dominent sur tous les diffractogrammes et les pics associés à la phase rutile sont négligeables ce qui est en accord avec les résultats obtenus en spectrométrie Raman. Des pics de diffraction à 44, 64 et 77° sont associés à la structure cubique faces centrées de l'or. Le pic de diffraction correspondant au plan (111) contribue également au pic complexe à 38° comprenant plusieurs contributions de la phase anatase. Néanmoins, la taille des nanoparticules d'or ne peut pas être déterminée à partir de l'élargissement des pics de diffraction avec le dispositif disponible au laboratoire pour les acquisitions en configuration d'incidence rasante.

Malgré tout, on peut observer clairement que si la largeur des pics associés à l'or est quasiment la même pour les films recuits à 400 et 600°C, elle est presque moitié moins importante pour le film recuit à 800°C. Ceci confirme un grossissement important des nanoparticules à cette température de recuit ce qui est en accord avec les données obtenues par spectrométrie Raman.

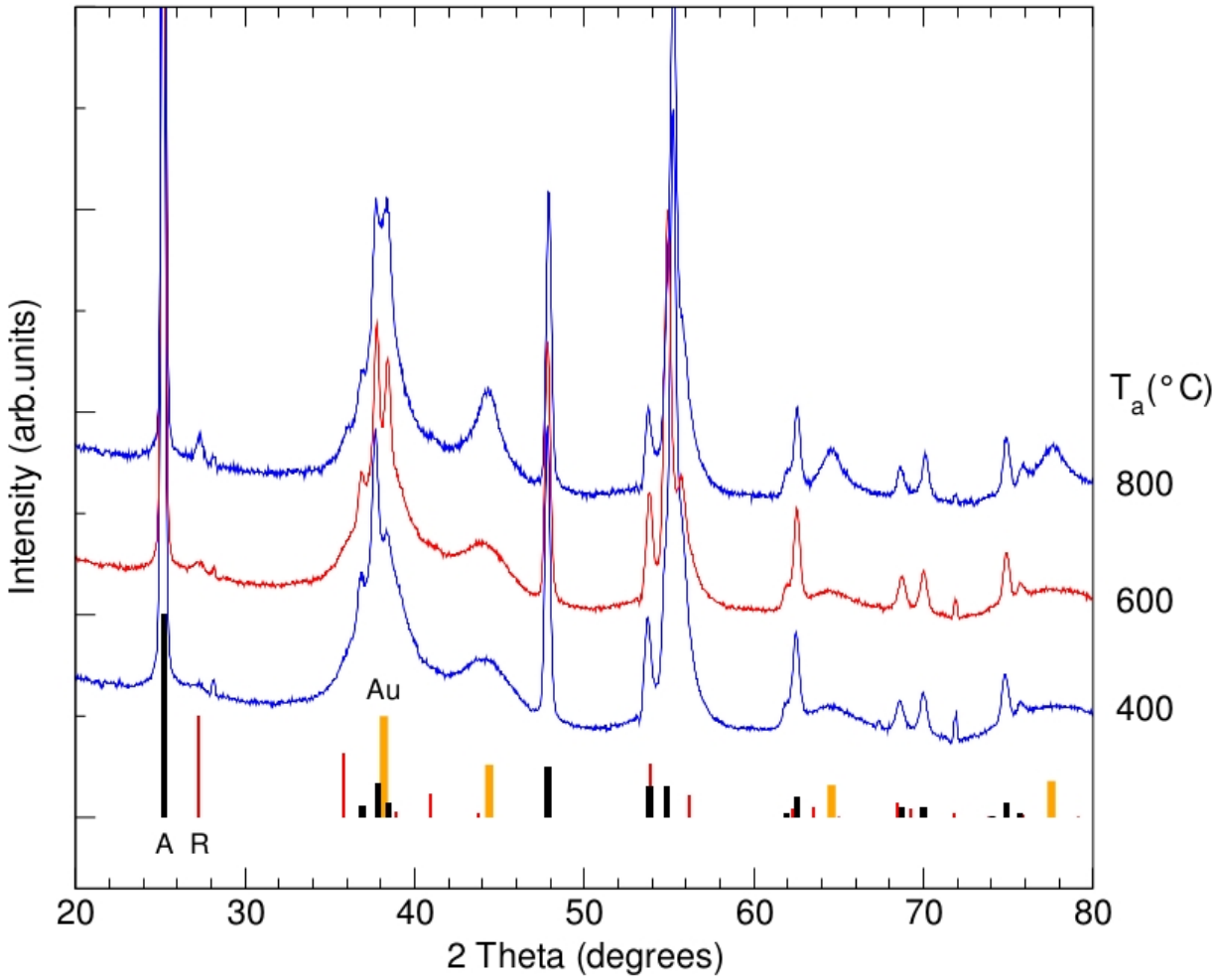


Figure IV.9 : Diffractogrammes obtenus avec un angle d'incidence rasant α=2° des films TiO_2:Au recuits à 400, 600 et 800 °C, respectivement en partant du bas. Les diffractogrammes ont été décalés verticalement pour une meilleure lisibilité. La position et l'intensité relative des pics de diffraction des phases anatase (A) (Fiche JPCPDS 01-075-2545) et rutile (R) (Fiche JCPDS 01-072-7374) du dioxyde de titane, et de l'or (Au) (Fiche JCPDS 00-004-0784) sont présentés.

IV.1.3- Observations par microscopie électronique en transmission

Les analyses par DRX n'ayant pas permis de déterminer la taille des nanoparticules d'or et leur distribution dans la matrice, des observations par MET ont été réalisées pour des films non recuits et pour ceux recuits à 400, 600 et 800 °C.

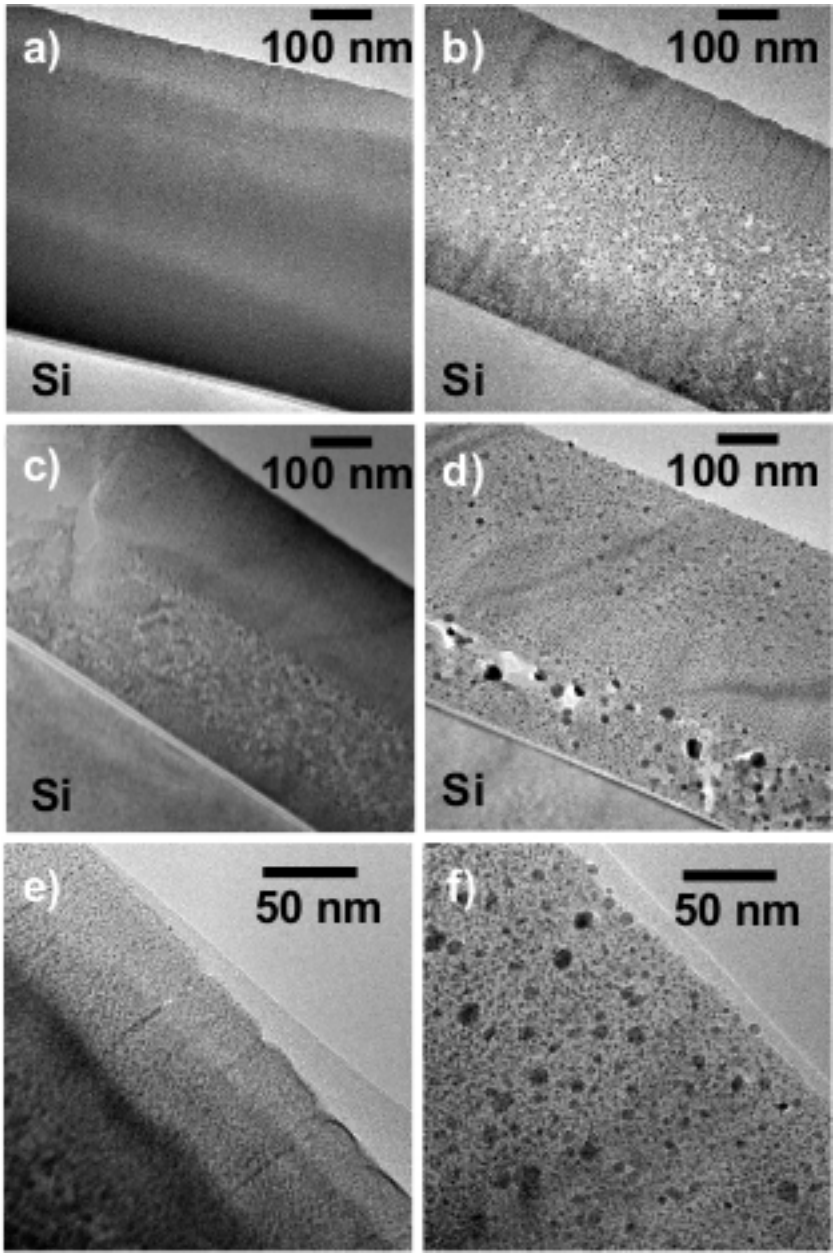


Figure IV.10 : Images TEM de la section transverse des films TiO_2:Au : (a) échantillon non recuit et (b, c, d) échantillons recuits respectivement à 400, 600 et 800 °C. Des vues zoomées de zones proches de la surface sont données pour les échantillons recuits à (e) 400 °C et (f) 800 °C.

La figure IV.10 présente les images obtenues pour des sections transverses d'un film non recuit et des films recuits à 400, 600 et 800 °C. Pour le film non recuit (fig IV.10 (a)), l'image de la section transverse montre une couche homogène dans laquelle on n'observe pas la formation de nanoparticules d'or, ce qui suggère que l'or est distribué de manière homogène dans l'ensemble du film. Les recuits modifient radicalement cet état.

Tout d'abord, la formation de nanoparticules d'or est observée pour les films recuits à 400 °C ou plus. Les nanoparticules d'or apparaissent sur les images dans une nuance plus sombre puisque le numéro atomique de l'or est plus élevé que celui du titane et de l'oxygène. La cristallisation de la matrice de TiO_2 a été mise en évidence par les diffractogrammes enregistrés, mais nous n'avons pas observé de nanograins de dioxyde de titane, ce qui est en accord avec les résultats de spectrométrie Raman et avec la cristallisation colonnaire qui est attendue pour ce type de films déposés par pulvérisation magnétron [Kim (2002)].

D'autre part, le film montre une sous-structuration en profondeur en deux sous-couches distinctes dans lesquelles la taille des nanoparticules d'or est différente. Finalement, la taille des nanoparticules d'or augmente avec la température de recuit dans les deux sous-couches.

Dans la sous-couche inférieure, pour une température de recuit de 400 °C la taille des particules est d'environ 5 nm. Elle augmente jusqu'à 20 nm pour T_a=800 °C pour les plus grosses particules. En plus, l'épaisseur de la sous-couche inférieure décroît avec l'augmentation de la température de recuit.

Dans la sous-couche supérieure, les nanoparticules d'or sont plus petites que dans la sous-couche inférieure quel que soit l'échantillon. La taille moyenne de ces particules est de 2 nm pour T_a=400 °C, et elle augmente avec la température de recuit, près de la surface. Pour l'échantillon recuit à 800 °C (figure IV.10 (d)), la taille des nanoparticules a été mesurée à partir de la figure IV.10 (f) jusqu'à une profondeur de 60 nm. La distribution obtenue est présentée dans la figure IV.11 Dans cette sous-couche, se trouvent en plus des nanoparticules très petites (~2 nm) observées aussi pour des plus basses températures de recuit, des nanoparticules d'environ 3-4 nm de diamètre et quelques particules plus grosses d'environ 6-10 nm de diamètre. La polydispersité en taille des nanoparticules observée en spectrométrie Raman est confirmée, d'autant plus que la spectrométrie Raman sonde surtout la sous-couche supérieure du film.

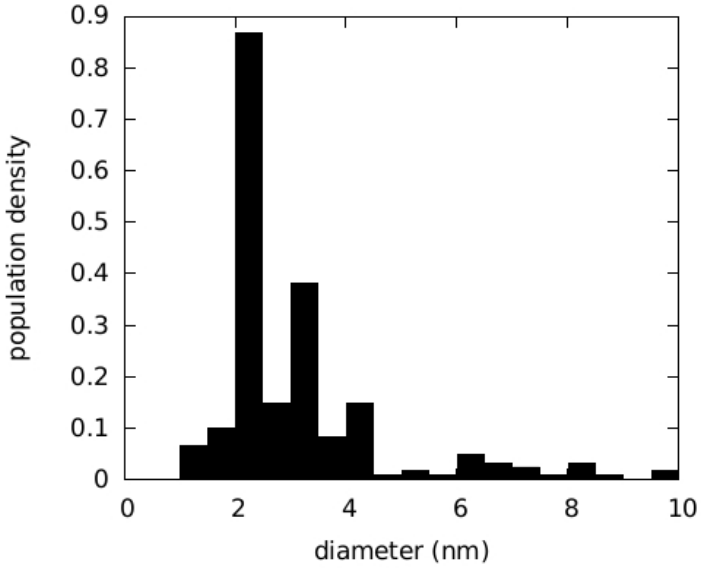


Figure IV.11 : Distribution de tailles des nanoparticules d'or dans un film de TiO_2:Au recuit à 800 °C. La taille de 250 nanoparticules a été mesurée sur l'image TEM présentée dans la figure IV.5 (f) jusqu'à une profondeur de 60 nm sous la surface du film.

L'hétérogénéité de la distribution de taille des nanoparticules dans les films recuits soulève la question de l'homogénéité du profil de concentration de l'or en profondeur dans les films. Pour répondre à cette question, des profils de compositions atomiques ont été réalisés par spectrométrie EDX en mode STEM. La figure IV.12 présente les profils de concentration de l'or et du titane obtenus pour le film non recuit et le film recuit à 800 °C. Les images STEM en champ sombre correspondant aux zones analysées sont également présentées (figure IV.12).

Pour le film non recuit, la concentration de l'or est de 5 %at et reste homogène sur toute la profondeur du film. La teneur en titane est d'environ 30 %at à proximité du substrat, ce qui correspond à la teneur stœchiométrique du titane dans TiO_2. En remontant vers la surface du film, cette teneur décroît légèrement, ceci est du probablement à l'apparition de contaminants tels que le carbone introduits pendant la phase de préparation de l'échantillon.

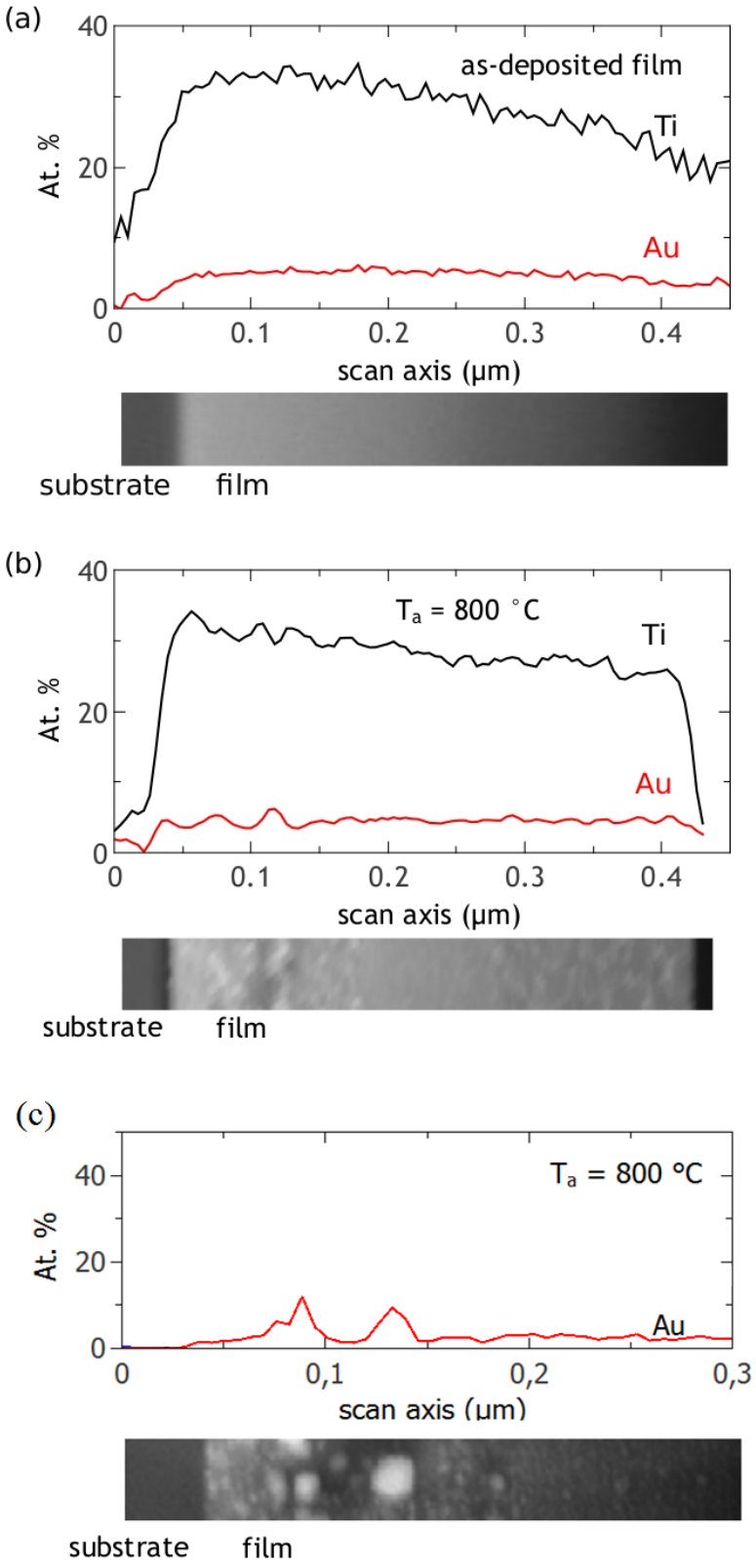


Figure IV.12 : Profils obtenus par spectrométrie EDX en mode STEM de la composition atomique en profondeur des films. (a) Film non recuit ; (b,c) film recuit à 800°C. Les images STEM en champ sombre des zones analysées sont données au-dessous de chaque profil.

Pour le film recuit à 800°C, la figure IV.12 (b) montre dans la sous-couche supérieure une concentration d'or similaire à celle observée dans le film non recuit. Dans la sous-couche inférieure, le profil montre une augmentation de la concentration d'or aux endroits où l'image STEM montre (en nuance claire) des nanoparticules. Une bonne corrélation entre le profil de concentration de l'or et l'image STEM en coupe du film est observée. Cet effet est encore plus net dans l'image IV.12 (c). La concentration atteint environ 15 %at. aux endroits où l'image STEM montre des grosses particules d'or, mais elle descend en dessous 5 %at. dans les zones plus sombres qui indiquent la présence d'éléments plus légers que l'or, voire une certaine porosité de la couche. De plus, des profils de concentration d'or obtenus par Rutherford back-scattering pour les films dopés avec 12-15 %at. d'or n'avaient pas montré de variation dans la distribution en profondeur de l'or pour des températures de recuit jusqu'au 700 °C [Macedo (2012)]. Seuls les films recuits à 800 °C montraient une augmentation de la concentration en or près de la surface et de l'interface film-substrat. Au vu de ces résultats, la structuration des films recuits en deux sous-couches n'est pas la conséquence d'un processus de diffusion de l'or depuis le haut vers le bas des films.

Nous avons montré que la formation de nanoparticules d'or et la cristallisation de la matrice d'or sont deux phénomènes concomitants. La formation de nanoparticules d'or se fait au cours des recuits par diffusion selon un processus de mûrissement d'Ostwald qui favorise la formation de particules de plus grande taille au détriment de celles plus petites [Wanner (2006)]. Il conduit à l'augmentation de la taille des particules avec l'augmentation de la température de recuit. La diffusion de l'or se fait probablement par les joints de grains de la structure colonnaire qui se forme dans la matrice de TiO_2 au cours des recuits. Dans le processus de diffusion, la microstructure de la matrice TiO_2 joue un rôle important et peut expliquer la structuration des films en deux sous-couches. Près de l'interface film-substrat les contraintes supportées par la couche sont plus élevées que celles près de la surface des films [Alhomoudi (2009)]. Au cours de la cristallisation de la matrice de TiO_2, la formation de la structure colonnaire est certainement plus difficile dans la partie inférieure de la couche. Plus de défauts et des colonnes plus petites favorisent la diffusion, et donc la formation de particules d'or de plus grande taille. La température de recuit influence la formation de la structure colonnaire et donc la diffusion de l'or et la structuration des films.

IV.1.4- Conclusions

Dans cette partie, nous avons étudié la structuration des films de TiO_2:Au élaborés par PVD et soumis à un traitement de recuit à des températures allant jusqu'à 800 °C. Dans le but d'étudier les premiers stades de la croissance des nanoparticules d'or, la concentration de cet élément a été diminuée, par rapport aux études précédentes, jusqu'à 5 %at. Les analyses par spectrométrie Raman dans le domaine des basses fréquences et les observations par MET ont montré la formation de nanoparticules d'or pour une température de recuit $T_a \geq 400$ °C. Pour ces mêmes températures de recuit, la cristallisation de la matrice dans la phase anatase de TiO_2 a aussi été démontrée.

Les observations par MET ont montré une structuration en profondeur des films recuits. Dans la sous-couche inférieure, la taille des nanoparticules d'or est plus élevée que dans la sous-couche supérieure. Leur diamètre atteint 20 nm pour T_a=800 °C. Dans la sous-couche supérieure, la taille des nanoparticules est d'environ 2-3 nm pour T_a = 400 °C, et elle augmente légèrement avec la température de recuit. Ces valeurs sont en bon accord avec les tailles de nanoparticules déterminées à partir de la position du pic Raman dans le domaine de basses fréquences. En fait, la profondeur sondée par cette technique a été limitée à la partie supérieure des films par la forte absorption de la lumière visible, notamment dans le rouge, due à la résonance plasmon des nanoparticules d'or. Pour une température de recuit de 800 °C, le dédoublement du pic Raman basse fréquence a mis en évidence une distribution de taille bimodale avec des nanoparticules d'environ 4 et 7 nm dans la partie supérieure des films. Ce résultat a été confirmé par les observations par MET.

Les profils de concentration d'or en profondeur obtenus par EDX montrent que la structuration des films en deux sous-couches n'est pas le résultat d'un processus de diffusion des atomes d'or vers la partie inférieure des films. La microstructure de la matrice, TiO_2, qui cristallise avec une structure colonnaire au cours des recuits, semble jouer un rôle clé dans la diffusion des atomes d'or et la formation de nanoparticules par mûrissement d'Ostwald. Près de l'interface film-substrat les contraintes supportées par la couche et les défauts de la structure colonnaire sont probablement bien plus élevés que dans la partie supérieure des films. Ainsi la diffusion de l'or dans les joints de grain de TiO_2 permet la formation des particules de plus grande taille dans la partie inférieure des films.

En conséquence, contrôler la cristallisation de la matrice pourrait être un moyen de créer des distributions complexes de taille de nanoparticules d'or, ce qui peut avoir un intérêt pour des applications technologiques.

IV.2) Analyse de couches ultraminces de TiO_2 par spectrométrie SERS

Dans cette partie, nous allons présenter nos travaux focalisés sur la mise en œuvre de l'effet SERS pour la caractérisation de films ultraminces d'une épaisseur d'environ 10 nm. Le but est d'accéder à la caractérisation de nano-objets ou de couches ultraminces par spectrométrie Raman grâce à l'exaltation du signal par effet SERS.

Le dioxyde de titane, TiO_2, a été choisi comme matériau modèle pour ce travail. Des films ultraminces de TiO_2 cristallisé dans la phase anatase ont été déposés sur des substrats actifs-SERS élaborés par fonctionnalisation de substrats de silicium avec des nanoparticules d'or selon le procédé de silanisation décrit dans la section II.1.3. Les films de TiO_2 ont été réalisés par ALD, technique adaptée à la croissance de films de très faible épaisseur. L'optimisation du procédé est présentée dans la section II.3.2. La possibilité de réaliser ces dépôts à une température relativement faible, 280 °C, a été une condition fondamentale pour préserver la qualité des substrats SERS.

IV.2.1- Observations par microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage a été utilisée pour vérifier d'une part la répartition des nanoparticules d'or sur le substrat, et d'autre part le bon recouvrement des substrats fonctionnalisés par le film de TiO_2.

Il est important de préciser que ces observations ont été réalisées le plus souvent après les analyses par spectrométrie Raman pour éviter toute dégradation ou contamination des échantillons qui pourrait se produire sous l'action du faisceau d'électrons. La reproductibilité de la méthode d'élaboration a été vérifiée par l'observation de plusieurs séries d'échantillons ($1x1cm^2$).

La figure IV.13 montre des images MEB enregistrées en électrons secondaires (fig. IV.13 a, c, e) et rétrodiffusés (fig. IV.13 b, d, f) de différentes zones de films de TiO_2 de 10 nm d'épaisseur déposés sur des substrats fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. L'observation via les électrons secondaires donne accès à la morphologie et au relief de la surface de l'échantillon, tandis que l'observation via les électrons rétrodiffusés donne une image liée au numéro atomique des éléments présents. L'or ayant un numéro atomique plus élevé que le titane et l'oxygène, il apparaît en blanc sur les images en électrons rétrodiffusés.

Les images fig. IV.13 (a, b), enregistrées avec un grossissement x10 000, montrent une répartition homogène des nanoparticules d'or sur la surface du substrat (fig. IV.13 b). Le relief observée sur la surface (fig. IV.13 a) correspond bien à la présence des nanoparticules d'or révélées par l'image en électrons rétrodiffusés.

Dans certaines zones, plutôt rares, il peut y avoir une accumulation de nanoparticules d'or (fig. IV.13 d). Dans une de ces zones, l'image en électrons secondaires enregistrée avec un grossissement x 25 000 montre un relief en accord avec la distribution de nanoparticules d'or (fig. IV.13 d).

Très rarement nous avons observé des défauts dans la croissance du dépôt de TiO_2 qui se caractérisent par un relief à la surface de l'échantillon qui ne correspond pas à une zone d'accumulation de nanoparticules d'or. Les figures IV.13 e), f) montrent un exemple de ces défauts.

Puisque la taille et la distance entre nanoparticules d'or sont des éléments très importants pour obtenir l'exaltation du signal Raman de la couche de TiO_2, nous avons essayé d'aller plus loin dans l'observation des nanoparticules d'or recouvertes du film de TiO_2. Pour ceci, des observations avec des grossissements allant jusqu'à x 150 000 ont été réalisées en électrons secondaires et en électrons rétrodiffusés (Fig. IV.14).

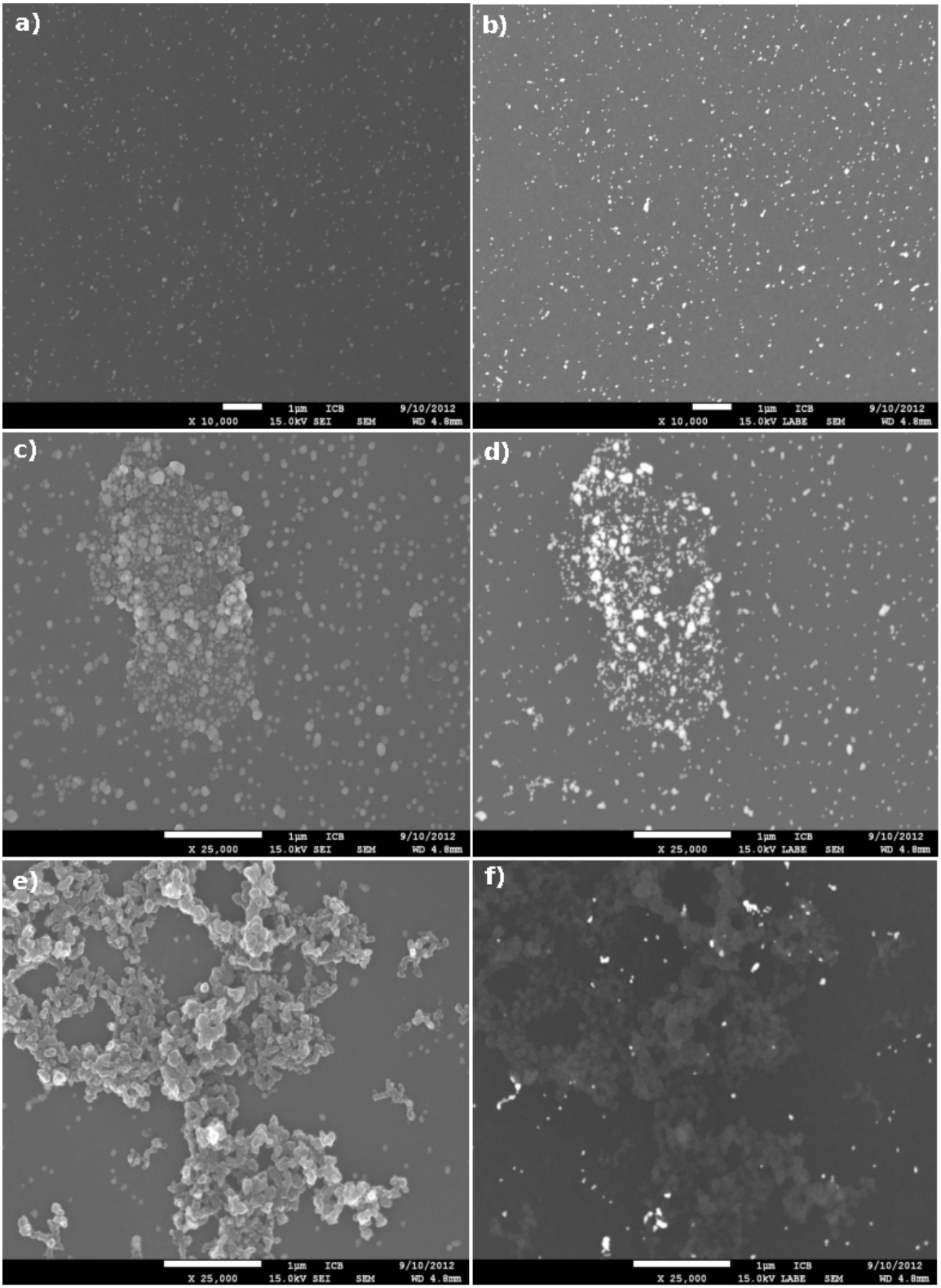


Figure IV.13 : Images MEB d'un film de TiO_2 de 10 nm d'épaisseur sur substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. (a, c, e) images enregistrées avec les électrons secondaires ; (b, d, f) images respectives enregistrées avec les électrons rétrodiffusés.

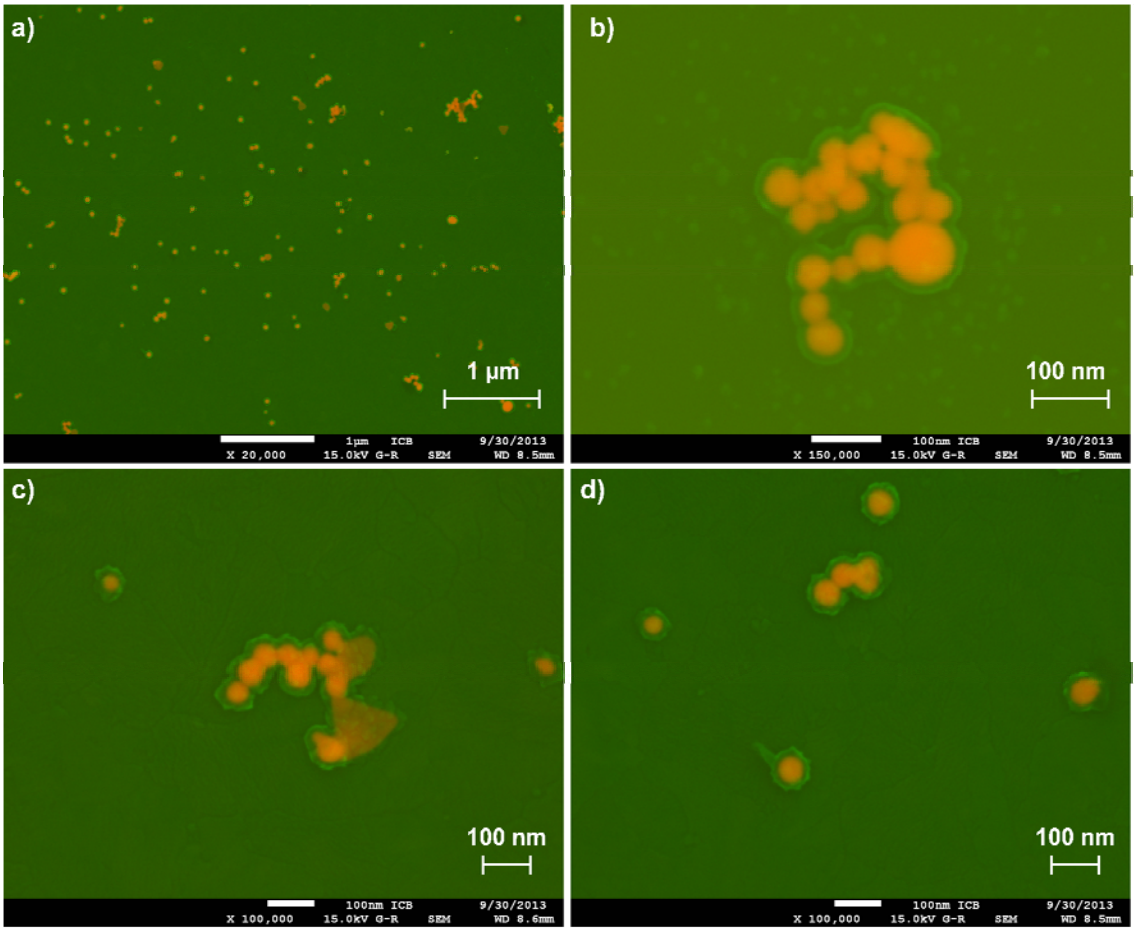


Figure IV.14 : Images MEB des couches de TiO_2 d'une épaisseur nominale de 10 nm déposées sur substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. Images acquises à la fois en électrons secondaires (en vert) et rétrodiffusés (en orange), puis superposées.

La figure IV.14 montre une superposition des images enregistrées en électrons secondaires (en vert) et rétrodiffusés (en orange). Les images montrent des particules majoritairement sphériques d'un diamètre moyen d'environ 40 nm. Quelques particules plates de forme triangulaire sont aussi observées (fig. IV.14 c). En plus de particules isolées, il y a aussi des petits agrégats dans lesquels la distance nanométrique entre particules est appropriée pour la formation de « points chauds » d'exaltation SERS. Les images à plus fort grossissement mettent en évidence également l'enrobage complet des nanoparticules d'or par la couche de dioxyde de titane (en vert) dont l'épaisseur est d'environ 10 nm, en accord avec la valeur attendue pour le nombre de cycles ALD réalisés.

Pour tester les limites de la technique d'élaboration et également de la caractérisation par SERS, un dépôt de seulement 5 nm d'épaisseur nominale a été réalisé par ALD sur un substrat fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or.

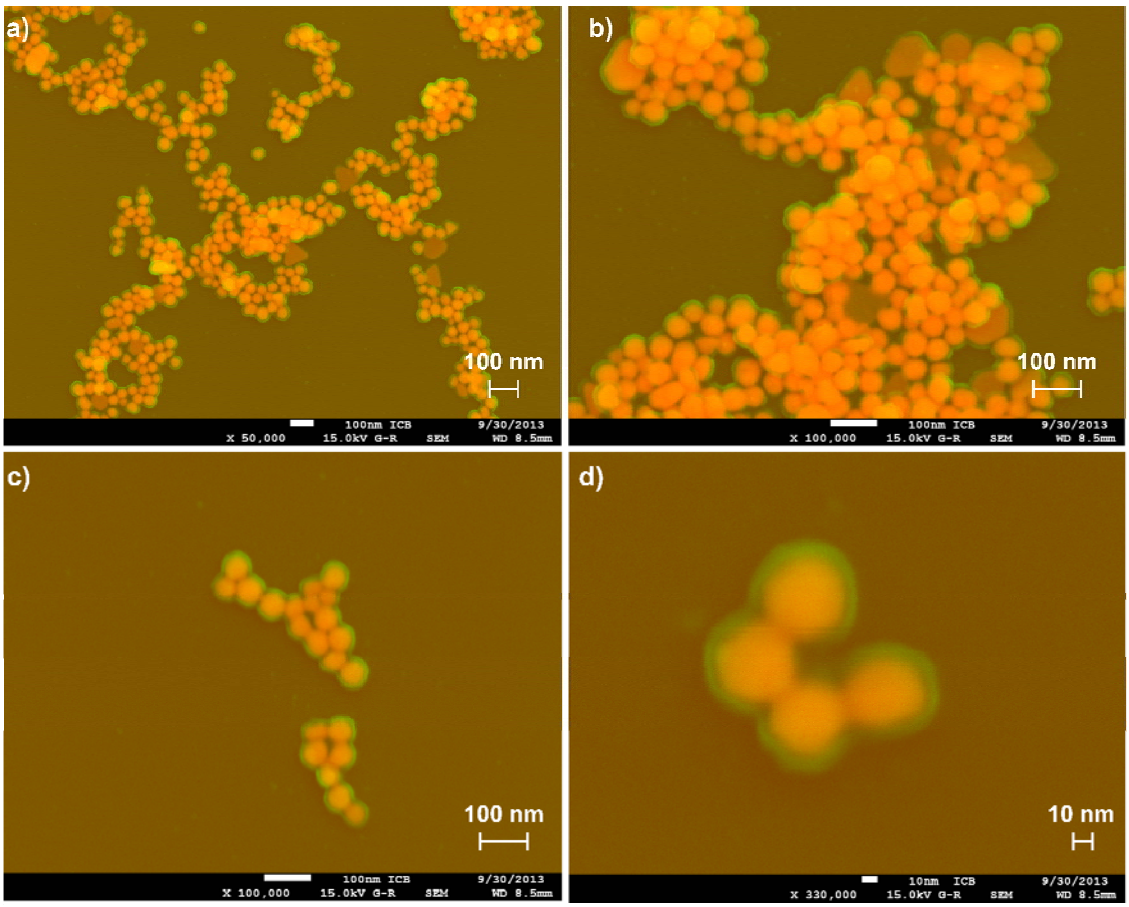


Figure IV.15 : Images MEB des couches de TiO_2 d'une épaisseur nominale de 5nm déposées sur substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. Images acquises à la fois en électrons secondaires (en vert) et rétrodiffusés (en orange), puis superposées.

La figure IV.15 présente différentes images obtenues à nouveau par superposition des images en électrons secondaires et en électrons rétrodiffusés. Le grossissement a été augmenté jusqu'à x 330 000 dans l'image fig. IV.15 (d). Les images montrent encore majoritairement des nanoparticules sphériques d'environ 40 nm de diamètre et quelques particules triangulaires. Les nanoparticules d'or sont entourées d'une couche homogène d'oxyde (en vert dans les images) dont l'épaisseur mesurée sur l'image (fig. IV.15 d) est d'environ 5-10 nm, donc en bon accord avec l'épaisseur nominale visé de 5 nm.

Les observations effectuées par MEB permettent donc de conclure que les échantillons sont conformes à nos attentes et permettent d'envisager la détection par SERS de couches ultraminces de TiO_2.

IV.2.2- Analyses par spectrométrie Raman

Les analyses par spectrométrie Raman ont été effectuées avec le dispositif InVia (Renishaw). Le substrat de silicium a été orienté de manière à minimiser l'intensité du pic Raman principal du silicium à 520 cm^{-1}. Différentes raies d'excitation (532, 633 et 785 nm) ont été testées. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'excitation à 532 nm, tandis que celle dans le rouge, à priori plus adapté à l'exaltation du signal par les nanoparticules d'or (fig. IV.3), donne lieu à un signal de fond de luminescence gênant pour l'observation du signal Raman de TiO_2. En conséquence, uniquement des résultats obtenus avec l'excitation à 532 nm seront montrés par la suite.

Pour la couche de TiO_2 de 10 nm d'épaisseur déposée par ALD sur un substrat Si(100) fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or, différentes zones de l'échantillon, visualisées par microscopie optique avec un objectif de grossissement x100, ont été analysées. Une vingtaine de spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions pour différents points de l'échantillon. La figure IV.16 présente trois spectres Raman représentatifs de la série enregistrée, plus un spectre obtenu pour une couche de TiO_2 de la même épaisseur déposée sur un substrat Si (100) non fonctionnalisé. Aucune normalisation de l'intensité n'a été réalisée, mais les spectres ont été décalés verticalement afin de superposer le signal Raman du substrat. En effet, tous les spectres montrent les pics Raman du substrat silicium : une bande très intense à 520 cm^{-1} et des composantes de second ordre entre 200 et 450 cm^{-1}, avec un pic fin à 303 cm^{-1}. Tous les spectres montrent aussi le pic $E_g(1)$ caractéristique de la phase anatase de TiO_2 à environ 144 cm^{-1}. L'intensité de ce pic varie selon la zone focalisée de l'échantillon fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or. En dehors des petits agrégats de nanoparticules d'or visibles au microscope optique, le pic de l'anatase est très faible (spectre b). Son intensité par rapport au pic du silicium à 303 cm^{-1} est similaire à celle observée pour un dépôt réalisé dans les mêmes conditions sur un substrat non fonctionnalisé (spectre a). Par contre, lorsque

le laser est focalisé sur un petit agrégat de nanoparticules d'or (spectres c, d), le signal Raman de TiO_2 est nettement plus intense.

Il y a donc une exaltation SERS due aux nanoparticules d'or. Une augmentation du signal du fond continu dû à la luminescence des particules d'or peut également survenir. De plus, nous avons parfois observé l'apparition de bandes associées à des liaisons carbone-carbone à 1353 et 1581 cm^{-1}. Ce type de contributions n'a pas été détecté dans le cas de films de la même épaisseur déposés sur des substrats non fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. Son origine peut être attribuée à des restes de citrates qui entouraient les nanoparticules d'or dans la suspension utilisée pour la fonctionnalisation des substrats. Le traitement au plasma cleaner avant le dépôt de films de TiO_2 peut également donner lieu à une faible quantité de carbone amorphe qui serait détectée grâce à l'exaltation SERS.

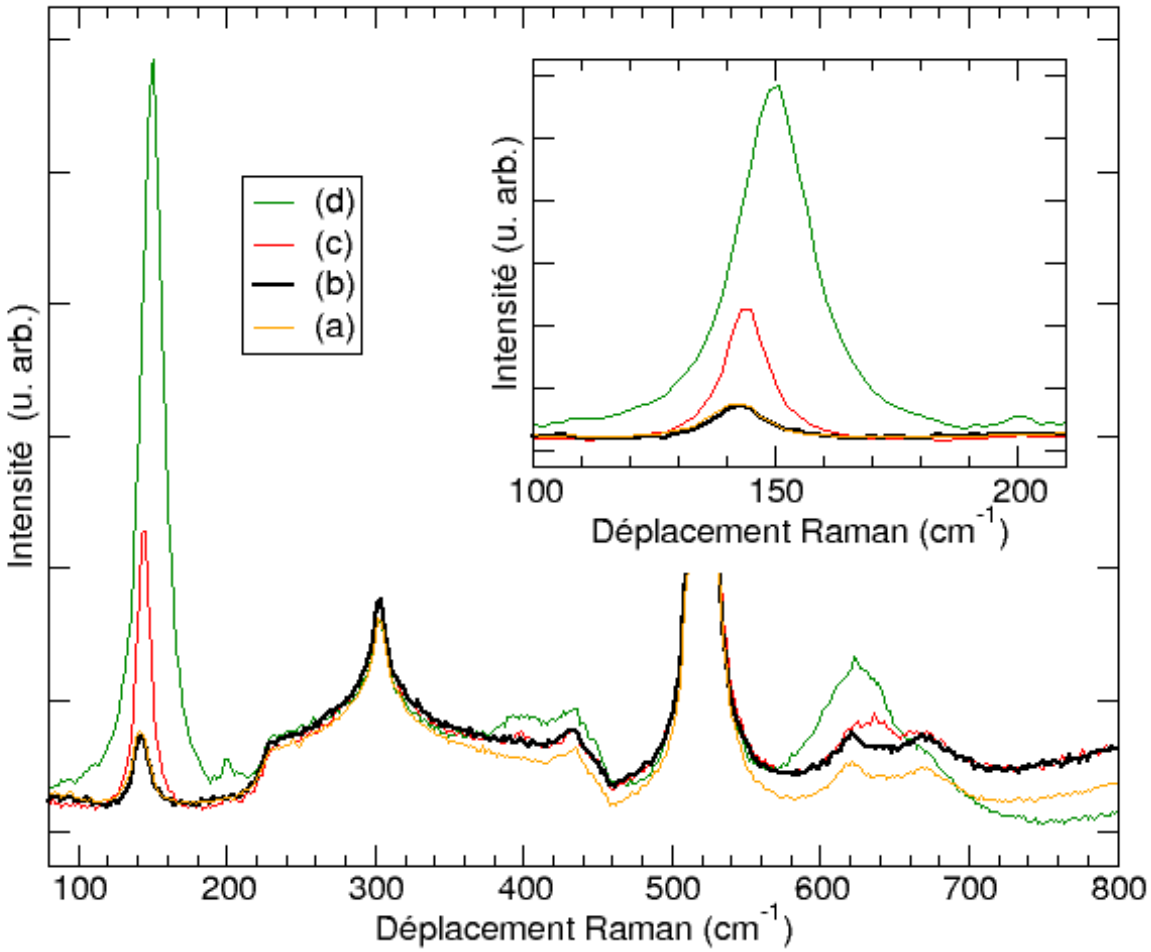


Figure IV.16 : Spectres Raman obtenus pour une couche de TiO_2 de 10 nm d'épaisseur déposée par ALD : (a) sur un substrat Si(100) non fonctionnalisé, (b,c,d) sur un substrat

Si(100) fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or. Focalisation du laser : (b) hors particules d'or, et (c,d) sur des particules d'or. Raie d'excitation : 532 nm. Puissance d'excitation: 2.8 mW. Temps d'acquisition : 10 s.

Une observation détaillée du pic $E_g(1)$ de la phase anatase (insert dans la figure IV.16) permet d'observer un léger décalage de la position de ce pic quand l'intensité de celui-ci augmente. Nous avons analysé cet effet sur toute la série de spectres enregistrés. Pour chaque spectre le pic $E_g(1)$ a été ajusté par une combinaison d'une courbe lorentzienne et d'une contribution gaussienne de faible intensité (fixée à 2%). Les valeurs obtenues pour la position du pic, sa largeur à mi-hauteur et sa surface intégrée sont représentés dans la figure IV.17. Le déplacement du pic $E_g(1)$ vers des plus grandes fréquences est clairement corrélé à une augmentation de son intensité et il s'accompagne également d'une augmentation de sa largeur. Il est important de signaler que l'exaltation de l'intensité du pic Raman atteint un facteur proche de 20. Dans ces points de forte exaltation SERS, il est possible d'imaginer une augmentation locale de la température due à l'absorption du faisceau d'excitation par les nanoparticules d'or. L'augmentation locale de la température expliquerait le déplacement de la position du pic et son élargissement [Brevet (2006)]. Le signal du substrat Si ne montre pas cet effet de réchauffement.

Par rapport aux travaux publiés récemment sur l'exaltation SERS des films de TiO_2, quelques remarques sont à signaler. Tout d'abord, la comparaison avec le travail de Degioanni et *al*. [Degioanni (2013)] qui étudie des couches amorphes de TiO_2 déposées par la méthode sol-gel sur des substrats SERS commerciaux Klarite® est difficile car les spectres Raman pour ces couches amorphes sont très différents de celui de la phase anatase. La comparaison est plus intéressante avec le travail de Lin et al. [Lin (2012)] qui a également utilisé la méthode ALD pour déposer des films ultraminces de TiO_2. Sur ces films ils ont ensuite déposé de l'or par évaporation thermique pour créer une structure de nano-îlots. Cependant ces films, déposés à 200 °C, sont majoritairement amorphes. Aucun signal Raman n'a été détecté par spectrométrie Raman conventionnelle. Les spectres SERS montrent le pic de la phase anatase de TiO_2, mais pas les autres pics associés à cette phase. De plus, le pic $E_g(1)$ est fortement élargi. Sa largeur à mi-hauteur est d'environ 30 cm^{-1} pour une couche de 10 nm d'épaisseur. Les auteurs invoquent une structure majoritairement amorphe de ces films. Cependant, il est surprenant d'observer un pic $E_g(1)$ clairement défini dans le cas de films de TiO_2 amorphes [Degioanni (2013)] ; [Boukrouh (2008)].

Dans ces différents travaux, l'exaltation observée du signal Raman des films de TiO_2 est relativement modeste par rapport aux valeurs données dans la littérature pour l'exaltation SERS du signal de molécules, mais la possibilité d'utiliser l'effet SERS pour l'étude de films inorganiques ultraminces a été démontrée. Nous avons montré aussi la possibilité de cartographier la surface de l'échantillon pour mettre en évidence les zones d'exaltation du signal du dioxyde de titane (figure IV.18).

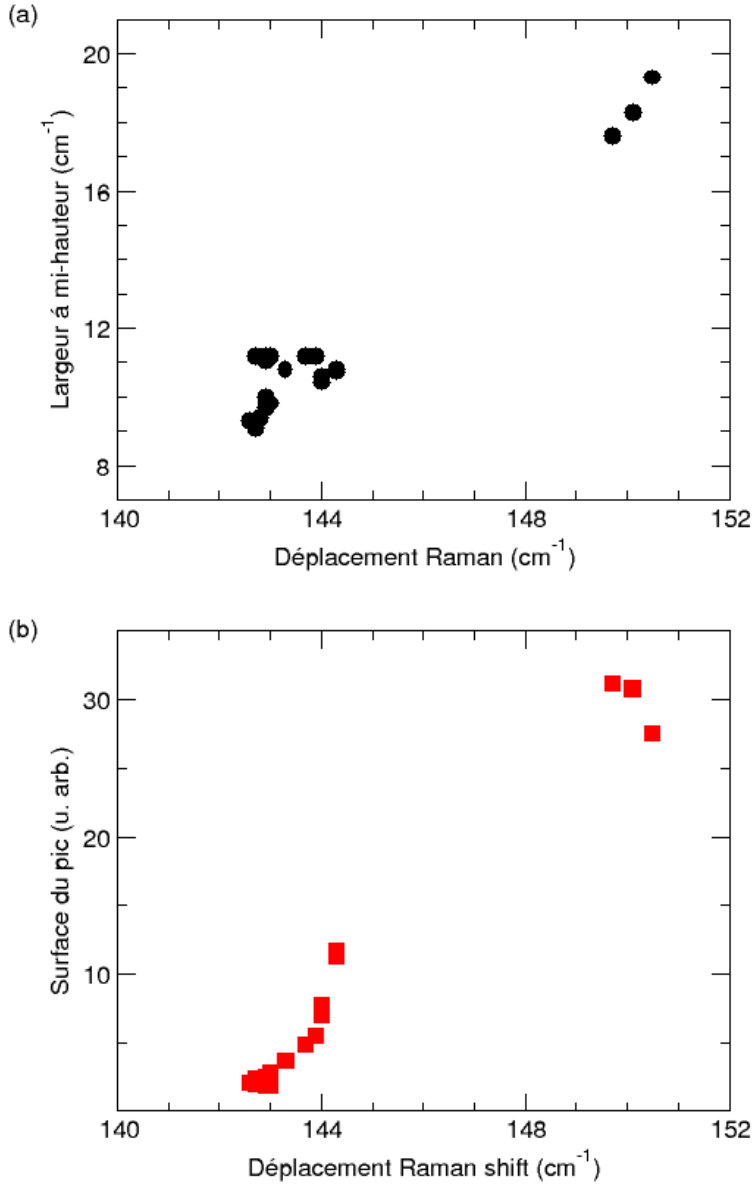


Figure IV.17 : Analyse de pic $E_g(1)$ de la phase anatase de TiO_2 dans une série de 20 spectres Raman enregistrés pour une couche de TiO_2 de 10 nm d'épaisseur déposée par ALD sur un substrat Si(100) fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or. (a) Variation de la largeur à mi-hauteur et (b) variation de l'intensité intégrée en fonction de la position du pic $E_g(1)$.

Le mode *Streamline* implémenté pour l'imagerie rapide dans notre dispositif Invia utilise une lentille cylindrique pour transformer le spot laser en une ligne, ce qui diminue la puissance laser focalisée par point. Le signal généré est déplacé sur le CCD de façon synchronisée avec le déplacement de l'échantillon ce qui permet d'enregistrer un spectre Raman pour chaque point (selon le maillage choisi) de la surface analysée. L'image Raman est ensuite générée à partir de l'ensemble des spectres enregistrés selon le critère sélectionné (surface d'un pic, position, etc). Ce mode a permis de réaliser des cartographies avec un temps considérablement réduit. La figure IV.18 montre la cartographie Raman d'une surface de 26 x 22 μm^2, dans laquelle l'intensité du pic $E_g(1)$ de l'anatase (après soustraction du fond) a été représentée. La correspondance entre l'exaltation du signal de TiO_2 et les agrégats de nanoparticules d'or observées dans l'image captée par microscopie optique est parfaite. Le fort contraste entre les zones d'exaltation du signal de TiO_2 et le reste de la surface est montré dans la figure IV.19 dans laquelle le spectre Raman correspondant à une zone d'exaltation est comparé à celui enregistré en dehors de ces zones.

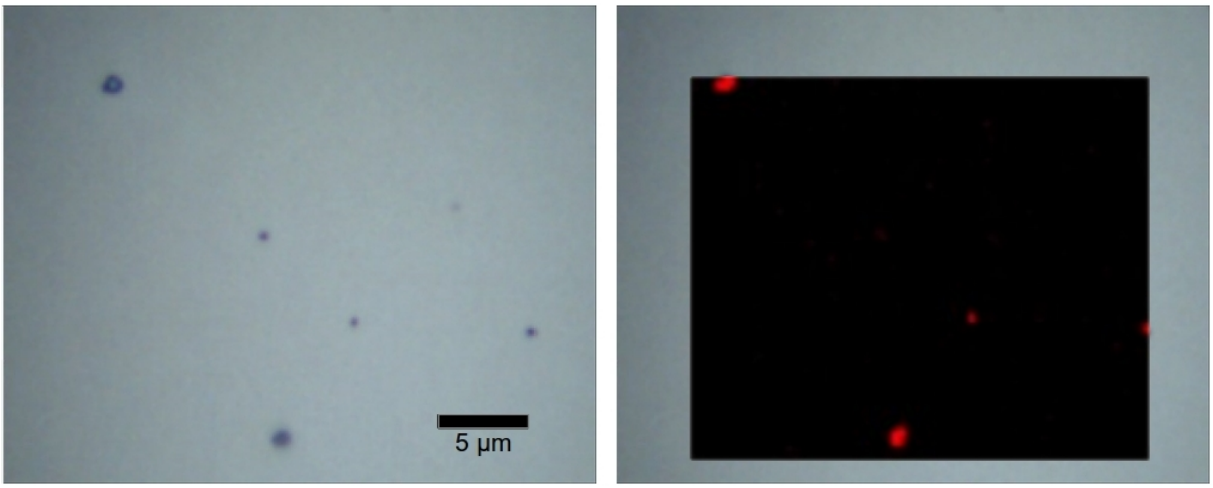


Figure IV.18 : A gauche : image au microscope optique d'une couche de TiO_2 10 nm déposée sur substrat de silicium fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or.
A droite : cartographie Raman de la zone montrée à gauche. L'intensité intégrée du pic $E_g(1)$ de la phase anatase de TiO_2 est représentée par une variation de couleur depuis le noir jusqu'au rouge. Puissance laser : 0,28 mW. Pas de mesure : 0,3 µm.

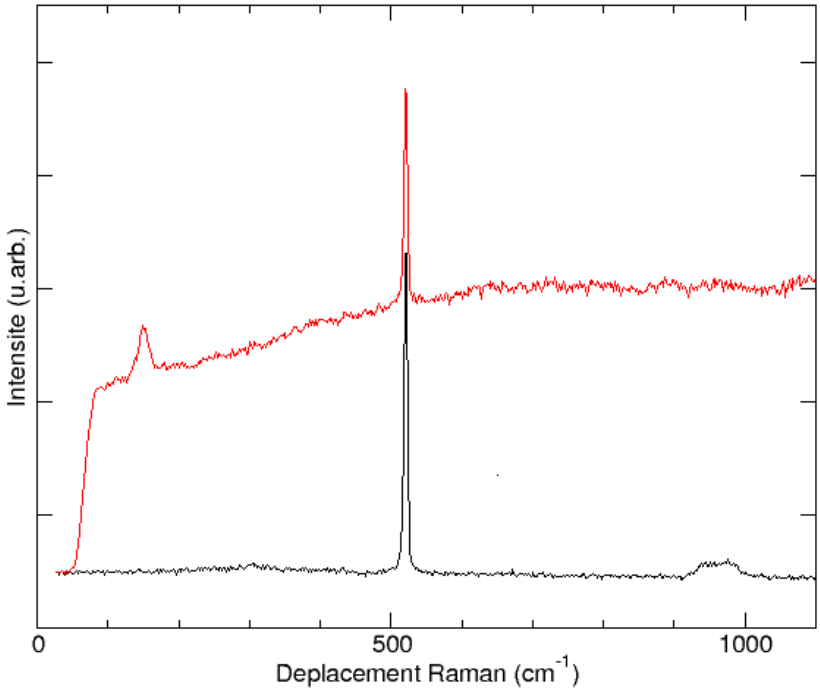


Figure IV.19 : Spectres Raman de deux points représentés dans la cartographie Raman de la figure I V. 18. En haut, spectre pour un point affiché en rouge dans la cartographie. En bas, spectre Raman d'un point affiché en noir.

Afin de tester les limites de notre méthode, nous avons étudié également les dépôts de 5 nm d'épaisseur nominale présentés dans la section précédente. Les résultats sont présentés dans la figure IV.20. Pour ces dépôts aucun signal associé au dépôt de TiO_2 n'est détecté pour une focalisation du laser hors des nanoparticules d'or (spectre a), comme pour des substrats non fonctionnalisés. Par contre, le signal de la phase anatase de TiO_2 est clairement observé pour une focalisation sur des nanoparticules d'or (spectre b), même si son intensité est très faible. Il y a clairement un effet d'exaltation du signal Raman de TiO_2 dû à la présence de nanoparticules d'or. Dans ces spectres SERS, le pic $E_g(1)$ de l'anatase est à nouveau élargi (largeur à mi-hauteur ~20 cm^{-1}) et décalé vers des plus grandes fréquences (position du pic ~151 cm^{-1}). La possibilité d'un échauffement local du film dû à l'excitation dans le plasmon de l'or est toujours à considérer. Cependant, pour une épaisseur de film aussi faible, il est également envisageable que la cristallinité de la couche soit plus faible. Enfin, un effet relié à la taille nanométrique des grains, comme dans le cas de poudres de TiO_2 lorsque la taille de grains est nanométrique [Pighini 2006] est aussi à considérer.

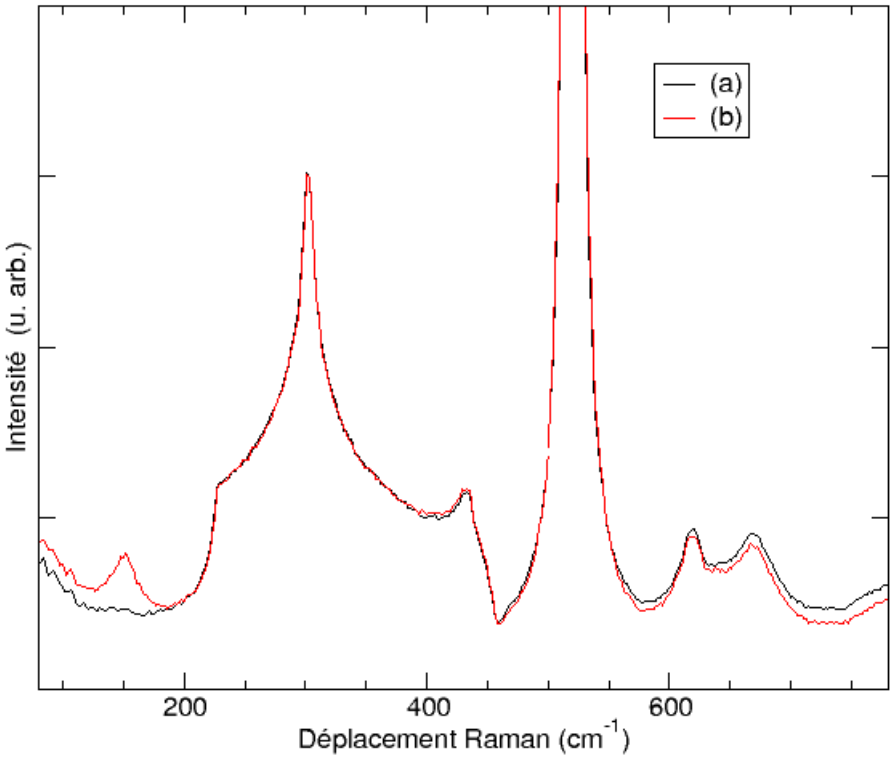


Figure IV.20 : Spectres Raman obtenus pour une couche de TiO_2 de 5 nm d'épaisseur déposée par ALD sur un substrat Si(100) fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or. D'en bas vers le haut, spectres Raman obtenus : (a) hors particules d'or, et (b,c) sur des particules d'or. Raie d'excitation : 532 nm. Puissance d'excitation: 55µW. Temps d'acquisition : 30 s.

IV.2.3- Conclusions

Dans cette partie nous avons montré tout d'abord la capacité du procédé ALD à élaborer des films ultraminces de dioxyde de titane avec une épaisseur inférieure à 10 nm et une parfaite adaptation au relief du substrat.

Des observations par microscopie électronique à balayage, combinant des images en électrons secondaires et rétrodiffusés, ont montré comment les nanoparticules d'or sont recouvertes d'une fine couche de TiO_2 dont l'épaisseur (5 à 10 nm) correspond bien à celle recherchée par le procédé d'élaboration ALD.

Pour le film de 10 nm d'épaisseur, le spectre Raman conventionnel montre avec difficulté la formation de la phase anatase de TiO_2 puisque le pic caractéristique de cette phase à 142 cm^{-1} est extrêmement faible. Ce signal n'a pas été observé pour le film de 5 nm d'épaisseur, ce qui pourrait être dû à une moindre cristallinité de ces films en plus de la très faible épaisseur du dépôt.

L'exaltation du signal Raman du film de TiO_2 a été clairement démontrée dans les zones où des agrégats de nanoparticules d'or sont visibles au microscope optique. Les spectres SERS montrent le signal de la phase anatase de TiO_2 même pour une épaisseur de seulement 5 nm. Dans les points de plus forte exaltation SERS, un léger déplacement de la position du pic $E_g(1)$ de l'anatase, accompagné d'un élargissement, suggèrent une élévation locale de la température due à la forte absorption du faisceau d'excitation par les nanoparticules d'or.

Enfin, la possibilité de cartographier la surface de l'échantillon pour mettre en évidence les zones d'exaltation du signal du dioxyde de titane a aussi été démontrée.

Synthèse du chapitre IV

Dans ce chapitre sont présentés deux études de films minces nanostructurés à base d'or et de TiO_2. Dans la première, nous avons étudié les premiers stades de la formation de nanoparticules d'or par le traitement thermique des films de TiO_2 dopés avec une faible concentration d'or. Les modes de vibration associés aux nanoparticules d'or dans le spectre Raman aux basses fréquences ont été utilisés pour cette étude. La résonance plasmon des nanoparticules d'or a permis d'exalter le signal Raman de ces nanoparticules par rapport au signal de la matrice de TiO_2. Dans la deuxième étude, le but était d'obtenir l'exaltation du signal Raman de films ultraminces par effet SERS permettant d'accéder ainsi à la caractérisation structurale de films de quelques nanomètres d'épaisseur. Pour ceci des films ultraminces de TiO_2 ont été déposés par la technique ALD sur des substrats fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or.

Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail de thèse nous nous sommes attachés à étudier différents types de systèmes nanostructurés notamment par spectrométrie Raman exaltée de surface. Le but était d'accéder à des informations sur la structure et les liaisons, complémentaires de celles qui peuvent être obtenues par exemple par microscopie électronique en transmission. Ainsi deux catégories de systèmes ont été étudiées : des biomolécules, notamment des protéines, et des couches minces nanostructurées à base de nanoparticules d'or et de dioxyde de titane.

L'étude de protéines par spectrométrie SERS a été abordé par le biais de la synthèse de nanoparticules d'argent bioconjuguées avec des protéines. Des nanoparticules d'argent ont été synthétisées en présence de quatre protéines courantes (BSA, lysozyme, hémoglobine et cytochrome-C) agissant comme molécule stabilisante de la suspension de nanoparticules. Les observations effectuées par microscopie électronique de ces suspensions ont montré la formation de nanoparticules d'argent de tailles comprises entre 10 et 30 nm. Les nanoparticules d'argent sont bien dispersées et chacune est recouverte d'une enveloppe de protéine dont l'épaisseur se situe entre environ 4 et 10 nm.

Les spectres d'absorption UV-vis de suspensions de nanoparticules bioconjugués Ag:BSA et Ag :Lysozyme ont montré clairement une bande de résonance plasmon à ~410 nm. Pour l'hemoglobine et le cytochrome C, protéines contenant des macrocycles porphyriques qui présentent une forte absorption dans ce même domaine spectrale, les spectres obtenus pour les nanoparticules bioconjugués ont montré une modification de la forme de cette bande.

L'étude par spectrométrie Raman de ces échantillons en solution à permis de montrer une exaltation du signal Raman (SERS) de la protéine et d'étudier les interactions directes protéine-argent des nanoparticules bio-conjuguées. Pour tous les systèmes bioconjugués étudiés, l'observation d'un pic fin à ~238 cm^{-1} attribué à l'élongation des liaisons Ag-N indique l'accroche covalente de la protéine par ses terminaisons azotées aux nanoparticules d'argent.

Les spectres Raman des échantillons d'hemoglobine et de cytochrome C lyophilisés sont dominés par les bandes du groupe hème au détriment des modes associés aux chaînes peptidiques. Cependant, les spectres SERS des nanoparticles bioconjuguées Ag :Hemoglobine et Ag :cytochrome C présentent des bandes larges dans le domaine 1100-1700 cm-1, similaires à celles observées dans les spectres SERS des nanoparticules bioconjuguées à base

de BSA et de lysozyme, protéines qui ne contiennent pas de groupe hème. Ces bandes ont donc été associées aux modes de vibration des chaînes peptidiques et des acides aminés.

Des analyses préliminaires par spectrométrie FTIR-ATR des suspensions de nanoparticules bioconjugués Ag:BSA synthétisés dans D_2O ont permis d'observer les bandes d'absorption de cette protéine malgré la quantité extrêmement faible de protéines qui entoure les nanoparticules d'argent.

La spectrométrie SERS dans le domaine des basses fréquences a permis de distinguer les phases formées dans des dépôts minces d'une biomolécule plus simple, la caféine, très utilisée en agroalimentaire et dans l'industrie pharmaceutique. La caféine a été déposée sur des substrats fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or et l'étude de l'intensité du signal Raman basse fréquence a révélé la possibilité d'exalter les modes de vibration associés aux deux phases polymorphes de la caféine. Des cartographies Raman ont montré une augmentation du signal de la caféine sur un même cristal, dans les zones en contraste avec des nanoparticules d'or. De cette façon, nous avons démontré la possibilité d'exalter les modes de vibration basses fréquences des deux phases polymorphes d'une biomolécule d'intérêt par effet SERS.

Les spectrométries Raman et SERS n'ont pas seulement été utilisées pour étudier des molécules, mais aussi des films minces inorganiques. La mise en œuvre de l'effet SERS pour accéder à la caractérisation structurale de nano-objets et des films ultraminces inorganiques a été très peu abordée jusqu'à présent dans la littérature. Nous avons montré la possibilité d'utiliser l'effet SERS pour étudier ainsi des films ultraminces de TiO_2 de quelques nanomètres d'épaisseur déposés par ALD (Atomic Layer Deposition) sur des substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or.

D'autre part, des minces films nanocomposites à base de dioxyde de titane et de nanoparticules d'or dont l'épaisseur était de quelques centaines de nanomètres ont également été étudiés. Le but était d'utiliser la spectrométrie Raman dans le domaine des basses fréquences (<100 cm^{-1}) pour étudier la formation des nanoparticules lors d'un traitement de recuit de films contenant une faible concentration d'or dispersée dans une matrice de TiO_2 amorphe. Une excitation résonante dans le rouge à été utilisée pour privilégier le signal associé aux nanoparticules d'or par rapport à celui de la matrice.

Perspectives des études réalisées :

L'une des perspectives de cette étude, pourrait porter sur une amélioration des substrats utilisés comme support pour l'analyse d'une goutte échantillon de suspension de nanoparticules bio-conjuguées par spectrométrie SERS (cf. III.1.2.2). En effet les lames Tienta® utilisées n'étant plus commercialisée, il a été envisagé de produire de nouveaux substrats combinant à la fois un miroir, une surface hydrophobe et qui ne produit aucun signal Raman.

Des premiers tests ont été réalisés avec des lames de titane et d'acier polies, en les recouvrant d'un film polymère. Une autre piste d'optimisation du système pourrait porter sur la géométrie du substrat, par exemple en creusant une cavité dans le substrat recouverte d'un miroir pour recueillir la goutte d'échantillon, afin de maximiser le retour de la lumière diffusée vers l'objectif.

Dans la seconde étude présentée dans le chapitre III, portant sur l'exaltation du signal basse fréquence de la caféine, les analyses ont permis de révéler la possibilité d'exalter le signal basses fréquences des deux polymorphes de la caféine et donc permettent d'envisager d'utiliser la technique pour le contrôle de phases polymorphes de molécules d'intérêt biologique. Cependant en dissolvant les cristaux de caféine pour les déposer sur le substrat nanostructuré, dans le cadre d'un système de contrôle de la cristallisation des poudres, induit une perte de l'information recherchée.

En effet, en dissolvant la caféine, celle-ci perd sa structure cristalline, puis elle recristallise sur le substrat de manière non contrôlée, donnant accès aux deux polymorphes de la caféine, la forme privilégiée étant la moins structurée (Caféine I) (cf. III.2.1). Ainsi, plutôt que de déposer la molécule échantillon sur les nanoparticules, il serait plus intéressant de venir déposer des nanoparticules sur la molécule et créer un système SERS inversé.

L'utilisation de la technique TERS (Tip Enhanced Raman Scattering), pourrait ainsi permettre d'exalter le signal Raman de poudres d'échantillon sans modifier leur nature. La technique TERS est une technique dérivée de la spectrométrie SERS et de la spectrométrie SEF

(exaltation de fluorescence) [Pozzi (2013)]. Le principe est d'amener une pointe, de taille nanométrique à son extrémité et constituée d'un métal noble (ou dont l'extrémité est une nanoparticule de métal noble), le plus proche possible de l'échantillon (quelques nanomètres). Le laser du spectromètre est focalisé sur la zone où la pointe est proche de l'échantillon. Par sa dimension et sa proximité avec l'échantillon, la pointe va produire un effet d'exaltation plasmonique très localisé, amplifiant le signal Raman de l'échantillon. En revanche, c'est une technique qui présente encore de nombreuses difficultés, comme l'oxydation rapide de la pointe, le positionnement de la pointe et de l'objectif du spectromètre dans une même zone, ou la gestion de la distance pointe-échantillon. Il n'est pas non plus envisageable actuellement d'utiliser cette technique dans le domaine des basses fréquences. Mais si la technique se développe, pour résoudre les problèmes précédemment évoqués, elle pourrait offrir un outil très efficace pour sonder l'état cristallin de poudres.

Bibliographie

-A-

Abdali S., De Laere B., Poulsen M., Grigorian M., Lukanidin E., Klingelhofer J., Journal of Physical Chemistry C **114**, p. 7274-7279, 2010.

Aiken J.D., Finke R. G., Journal of Molecular Catalysis A: Chemical **145**, 1-44, 1999.

Albrecht M. G, Creighton J. A., Journal of American Chemical Society **99**, 5215-5217, 1977.

Alhomoudi I. A., Newaz G., Thin Solid Films **517**, p. 4372, 2009.

Alves E., Franco N., Barradas N. P., Nunes B., Lopes J., Cavaleiro A., Torrell M., Cunha L., Vaz F., Nuclear Instrulents and Lethods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms **272**, p 61-65, 2012.

Arbatzis I. M., Stergiopoulos T., Andreeva D., Kitova S., Neophytides S. G., Falara P., Journal of Catalysis 220, p. 127, 2003.

Aroca R. F., Ross D. J., Domingo C., Applied Spectroscopy **58**, p. 324-338, 2004.

Avril L., Reymond-Laruinaz S., Decams J. M., Bruyère S., Potin V., Marco de Lucas M. C., Imhoff L., Applied Surface Science **288**, p. 201-207, 2014.

-B-

Bachelier G., Mlayah A., Physical Review B **69**, 205408, 2004.

Bakshi M. S., Kaur H., Banipal T. S., Singh N., Kaur G., Langmuir **26**, p. 13535-13544, 2010.

Bannat I., Wessels K., Oekermann T., Rathousky J., Bahne-Mann D., Wark M., Chemistry of Materials **21**, p. 1645, 2009.

Barnes C. A., Elsaesser A., Arkusz J., Smok A., Palus J., Lesniak A., Salvati A., Hanrahan J. P., de Jong W. H., Dziubaltowska E., Stepnik M., Rydzynski K., McKerr G., Lynch I., Dawson K. A., Howard C. V., Nano Letters **8**, p. 9, 2008.

Barth A., Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1767(9)**, p. 1073-1101, 2007.

Baydemir G., Aandaç M., Derazshamshir A., Aktas Uygun D., Omz´ alliskan E., Akgol S., Denizli A., Material Science and Engineering: C **33**, p. 532-536, 2013.

Bell S. E. J., Sirimuthu N. M. S., Journal of American Chemical Society **128(49)**, p. 15580-15581, 2006.

Billmann J., Kovacs G., Otto A., Surface Science **92(1)**, p. 153, 1980.

Black D. B., Lovering E. G., Journal of Pharmacy and Pharmacology **29**, p. 684-687, 1977.

Blackie E., Le Ru E. C., Meyer M., Timmer M., Burkett B., Northcote P., Etchegoin P. G., Physical Chemistry Chemical Physics **10**, p. 14147-14153, 2008.

Bohren C. F. H., Huffman D. R., Absorption and scattering of light by small particles, Wiley-Interscience, New-York, 1983.

Bönnemann H., Richards R. M., European Journal of Inorganical Chemistry, p. 2455, 2001.

Boukrouh S., Bensaha R., Bourgeois S., Finot E., Marco de Lucas M. C., Thin Solid Films **261**, p. 6353-6358, 2008.

Brancolini G., Kokh D. B., Calzolai L., Wade R. C., Corni S., ACS Nano **6**, p. 9863-9878, 2012.

Brevet A., Les premiers instants de la croissance de films minces d'oxydes métalliques par MOCVD : caractérisation physico-chimique de l'interface film/substrat. Thèse de doctorat (Laboratoire de Recherche sur la Réactivité des Solides, Université de Bourgogne), 2006

Brown L. O., Doom S. K., Langmuir **24**, p. 2178-2185, 2008.

Brunner H., Sussner H., Biochimica et Biophysica Acta **310**, p. 20-31, 1973.

-C-

Camden J. P., Dieringer J. A., Wang Y., Masaiello D. J., Marks L. D., Schatz G. C., Van Duyne R. P. J., American Chemical Society **130**, p. 12616-12617, 2008.

Cardini G., Muniz-Miranda M., The Journal of Physical Chemistry B **106**, p. 6875-6880, 2002.

Cialla D., März A., Böhme R., Theil F., Weber K., Schmitt M., Popp J., Analytical and Bioanalytical Chemistry **403**, p. 27-54, 2012.

Creighton J. A., Surface Science **173(2-3)**, p. 665, 1986.

Crespo-Monteiro N., Destouches N., Saviot L., Reynaud S., Epicier T., Gamet E., Bois L., Boukenter A., Journal of Physical Chemistry C **116**, p. 26857, 2012.

-D-

Das G., Mecarini F., De Angelis F., Kumar H. G. M., Candeloro P., Liberale C., Cuda G., Di Fabrizio E., Biosensors and Bioelectronics **24**, p. 1693-1699, 2009.

Das G., Mecarini F., De Angelis F., Kumar H. G. M., Candeloro P., Liberale C., Cuda G., Di Fabrizio E., Biosensors and Bioelectronics **24**, p. 1693-1699, 2009.

David C., Guillot N., Shen H., Toury T., Lamy de la Chapelle M., Nanotechnology **21**, p. 475-501, 2010.

David C., Mécanismes de réduction des ponts S-S dans les protéines étudiés par spectrométrie Raman et modélisation moléculaire. Thèse de doctorat (Laboratoire de Chimie Physique et Rayonnements, Université de Franche-Comté), 2009.

Decroix A. A., Stabilité Physique et Désordre Orientationnel dans un Cristal à Usage Thérapeutique : La Caféine. Thèse de doctorat (Laboratoire de Dynamique et Structure des Matériaux Moléculaires, Université de Lille 1), 2009.

Degioanni S., Jurdyc A. M., Bessueille F., Coulm J., Champagnon B., Vouagner D., Journal of Applied Physics **114**, 234307, 2013.

Delhaye C., Bruneel J. L., Talaga D., Guirardel M., Lecomte S., Servant L., Journal of Physical Chemistry C **116(9)**, p. 5327-5332, 2012.

Delhaye C., Spectrométrie Raman et microfluidique : Application à la diffusion Raman exaltée de surface. Thèse de doctorat (Université Bordeaux I), 2009.

De Matas M., Edward H. G. M., Lawson E. E., Shields L., York P., Journal of Molecular Structure **440**, p. 97-104, 1998.

Denicourt T., Hedoux A., Guinet Y., Willart J. F., Descamps M., Journal of Physical Chemistry B **33**, p. 8629-8636, 2003.

Domènech J., Tinti A., Torreggiani A., dans Biopolymer Research Trends, Ed. Tamas S. Nemeth, 2007 Nova Science Publishers, Inc.

Donaldson K., Stone V., Tran C. L., Kreyling W., Born J. P. A., Occupational and Environmental Medicine **61**, p. 727, 2004.

Durand H. A., Hellman O., Shibata H., Applied Surface Science **86**, p. 122, 1995.

Duran-Pachon L., Rothenberg G., Applied Organometallic Chemistry **22**, p. 288-299, 2008.

Duval E., Boukenter A., Champagnon B., Physical Review Letter **56(19)**, p. 2052-2055, 1986.

Duval E., Physical Review B **46**, p. 5795, 1992.

-E-

Eby D. M., Schaeublin N. M., Farrington K. E., Hussain S. M., Johnson G. R., ACS Nano **3(4)**, p. 984-994, 2009.

Elhajj J., Ismail M. N., Warzywoda J., Sacco A., Kurtz R., Podlaha E. J., Journal of the Electrochemical Society **157**, D5-D9, 2010.

Enright G. D., Terskikh V. V., Brouwer D. H., Ripmeester J. A., Crystal Growth and Design **7(8)**, 1406, 2007.

Epifani M., Giannini C., Tapfer L., Vasanelli L., Journal of the American Ceramic Society **83**, p. 2385-2393, 2000.

-F-

Fan X., White I. M., Shopova S. I., Zhu H., Suter J. D., Sun Y., Analytica Chimica Acta. **620**, p. 8-26, 2008.

Fang C., Agarwal A., Buddharaju K. D., Khalid N. M., Salim S. M., Widjaja E., Garland M. V., Balasubramanian N., Kwong D. L., Biosensors and Bioelectronics **24(2)**, p. 216-221, 2008.

Fanti L., Agostoni M., Gemma M., Radaelli F., Conigliaro R., Beretta L., Rossi G., Guslandi M., Testoni P. A, Digestive and Liver Disease **43**, p. 726-730, 2011.

Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J., Chemical Physics Letters **26(2)**, p. 163-166, 1974.

Flink S., Van Veggel F. C. J. M., Reinhoudt D. N., Journal of Physical Organic Chemistry **14**, p. 407-415, 2001.

Focsan M., Gabudean A. M., Canpean V., Maniu D., Astilean S., Materials Chemistry and Physics **129**, p. 939-942, 2012.

Fukuoka A., Sato A., Kodama K. Y., Hirano M., S. Komiya, Inorganica Chimica Acta **294**, p. 266, 1999.

-G-

Gautam S., Dubey P., Gupta M. N., Colloids and Surfaces: Biointerfaces **102**, p. 879-883, 2013.

Gidley M. J., Bociek S. M., Journal of American Chemical Society **107**, p. 7040-7044, 1985.

Gohring J. T., Dale P. S., Fan X., Sensors and Actuators B **146**, p.226–230, 2010.

Gotić M., Ivanda M., Sekulić A., Musić S., Popović S., Turković A., Furić K., Materials Letters **28**, p. 225, 1996.

Grabar K. C., Freeman R. G., Hommer M. B. and Natan M. J., Analytical Chemistry **67**, p. 735-743, 1995.

-H-

Han X. X., Kitahama Y., Tanaka Y., Guo J., Xu W. Q., Zhao B., Ozaki Y., Analytical Chemistry **80**, p. 6567-6572, 2008.

Han X. X., Zhao B., Ozaki Y., Analytical and Bioanalytical Chemistry **394**, p. 1719-1727, 2009.

Hancock B. C., Zografi G., Journal of Pharmaceutical Sciences **86**, p. 1-12, 1997.

Hédoux A., Decroix A. A., Guinet Y., Paccou L., Derollez P., Deschamps M., Journal of Physical Chemistry B **115(19)**, p. 5746-5753, 2011.

Hédoux A., Hernandez O., Lefebvre J., Guinet Y., Descamps M., Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics **13**, p. 9390-9395, 1999.

Hendra P. J., American Laboratory **28**, p. 17-24, 1996.

Huang C. F., Cheng H. C., Liu C. M., Journal of Alloys and Compounds **476**, p. 683, 2009.

Hubert S., Transitions de phases solides induites par un procédé de compression directe : application à la caféine et à la carbamazépine. Thèse de doctorat (Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés de Lyon, Université Claude Bernard), 2012.

Hudec B., Hušeková K., Tarre A., Microelectronic Engineering **88**, p. 1514-1516, 2011.

-I-

Imoto T., Ono T., Yamada T., Journal of Biochemistry **90**, p. 335-340, 1981.

-J-

Jain P., Huang X., El-Sayed M., El-Sayad I. H., Plasmonics **2**, p. 107-118, 2007

Jeanmaire D. L., Van Duyne R. P., Journal of Electroanalytical Chemistry, **84**, p. 1-20, 1977.
Johnson P. B., Christy R. W., Physical Review B **6(12)**, p. 4370, 1972.

-K-

Kahraman M., Yazıcı M. M., Sahin F., Culha M., Langmuir **24**, p. 894-901, 2008.

Kawasaki M., Miin-Jang C., Jer-Ren Y., Wen-An C., Makoto S., Applied Physics Letters **102(9)**, 091603, 2013.

Khullar P., Singh V., Mahal A., Dave P. N., Thakur S., Kaur G., Singh J., Kamboj S. S., Bakshi M. S., Journal of Physical Chemistry C **116**, p. 8834-8843, 2012.

Kim S. H., Choi Y. L., Song Y. S., Lee D. Y., Lee S. J., Materials Letters **57**, p. 343, 2002.

Kittel C., Poumellec M., Megy R. et Dupas C., Physique de l'état solide, Dunod, Paris, 1983.

Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I., Dasari R. R., Field M. S., Chemical Reviews **99(10)**, p. 2957-2975, 1999.

Kneipp K., Wang Y., Kneipp H., Perelman L. T., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S., Physical Review Letters **78(9)**, p. 1667, 1997.

Kong J., Yu S., Acta Biochimica et Biophysica Sinica **39**, p. 549-559, 2007.

Kumar S., Ghandi K. S., Kumar R., Industrial and Engineering Chemistry Research **46**, p. 3128-3136, 2007.

-L-

Lamb H., Proceedings of the London Mathematical Society **13**, 189, 1882.

Lee P. C., Meisel D., Journal of Physical Chemistry, **86**, p. 3391-3395, 1982.

Lefrant S., Current Applied Physics **2(6)**, p. 479-482, 2002.

Le Nader V., Approche expérimentale et théorique de la diffusion Raman exaltée : résonance des plasmons de surface et effet de pointe. Thèse de doctorat (Institut des Matériaux Jean Rouxel, Nantes), 2010.

Lerbret A., Attouard F., Bordat P., Hédoux A., Guinet Y., Descamps M., The Journal of Chemical Physics **131**, 245103, 2009.
Le Ru E. C., Etchegoin P. G., Meyer M., The Journal of Chemical Physics 125, 204701, 2006.

Le Ru E., Etchegoin P., Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Elsiever B., 2009.

Li H., Cullum B. M., SPIE Proceedings **5261**, p. 142-154, 2003.

Lin C. Y., Hu S. Z., Rush T., Spiro T. G., Journal of American Chemical Society **118**, p. 9452-9453, 1996.

Lin M. C., Nien L. W., Chen C. H., Lee C. W., Chen M. J., Applied Physics Letters **101**, p. 023112, 2012.

Link S., El-Sayed M. A., Journal of Physics Chemistry B **103**, p. 4212-4217, 1999.

Lombardi J. R., Birke R. L., Lu T., Xu J., The Journal of Chemical Physics **84(8)**, p. 4174, 1986.

Lopes M., Etude de nanoantennes optiques : application aux diffusions Raman Exaltées de Surface et par pointe, Thèse de doctorat (Université de Technologie de Troyes, Troyes), 2008.

Lundqvist M., Stigler J., Cedervall T., Berggard T., Flanagan M. B., Lynch I., Elia G., Dawson K., ACS Nano **7**, p. 7503-7509, 2011.

Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M., Cabaleiro-Lago C., Linse S., Dawson K. A., Advances in Colloid and Interface Science **134-135**, p. 167–174, 2007.

-M-

Macedo F., Vaz F., Torrell M., Jr R. T. F., Cavaleiro A., Barradas N. P., Alves E., Junge K. H., Bein B. K., Journal of Physics D: Applied Physics **45**, p. 105-301, 2012.

Mahato M., Pal P., Kamilya T., Sarkar R., Chaudhuri A., Talapatra G. B., Journal of Physical Chemistry B **114**, p. 7062-7070, 2010.

Mandal S., Bonifacio A., Zanuttin F., Sergo V., Krol S., Colloid and Polymer Science **289**, p. 269-280, 2011.

Manduva R., Kett V. L., Banks S. R., Wood J., Journal of Pharmaceutical Sciences **97**, p. 1285-1300, 2008.

Margueritat J., Gonzalo J., Afonso C. N., Van Tendeloo G., Mlayah A., Murray D. B., Saviot L., Zhou Y., Hong M. H., Luk'yanchuk B. S., Nanotechnology **19**, 375701, 2008.
Margueritat J., Gehan H., Grand J., Lévi G., Aubard J., Félidj N., Bouhelier A., Colas Des Francs G., Markey L., Marco De Lucas C., Dereux A., Finot E., ACS Nano **5**, p. 1630-1638, 2011.

McGrath T. F., Andersson K., Campbell K., Fodey T. L., Elliott C. T., Biosensors and Bioelectronics, 2012.

McQuillan A. J., Notes and Records of the Royal Society **63**, p. 105-109, 2009.

Michota A., Kudelski A., Bukowska J., Journal of Raman Spectroscopy **32**, p. 345-350, 2001.

Montagna M., Moser E., Visintainer F., Ferrari M., Zampedri L., Martucci A., Guglielmi M., Ivanda M., Journal of Sol-Gel Science and Technology **26**, p. 214, 2003.

Moser C., Havermeyer F., Proceeding of SPIE 7598, 7598OS, 2010.

Moskovits M., The Journal of Chemical Physics **69(9)**, p. 4159, 1978.

Moskovits M., Reviews of Modern Physics **57(3)**, p. 783, 1985.

Murphy S., Huang L., Kamat P. V., Journal of Physical Chemistry C **115**, p. 22761-22769, 2011.

Musić S., Gotić M., Ivanda M., Popović S., Turković A., Sekulić A., Furić K., Materials Science and Engineering B **47**, p. 33, 1997.

-N-

N. Djaker, R. Hostein, E. Devaux, T. W. Ebbesen, H. Rigneault, J. Wenger, Journal of Physical Chemistry C **114**, 16250–16256 (2010).

Nakanishi K., Sakiyama T., Imamura K., Journal of Bioscience and Bioengineering **91**, p. 233-244, 2001.

Narayanaswamy R., Wolfbeis O. S., Analytical and Bioanalytical Chemistry **381**, New York, 2005.

Nardou E., Vouagner D., Jurdyc A. M., Berthelot A., Pillonnet A., Sablonière V., Champagnon B., Optical Materials **33(12)**, p. 1907-1910, 2011.

Natsuhara H., Matsumoto K., Yoshida N., Solar Energy Materials & Solar Cells **90**, p. 2867, 2006.

Ngo Y. H., Then W. L., Shen W., Garnier G., Journal of Colloid and Interface Science **409**, p. 59-65, 2013.

Nie S., Emory S. R., Science **275**, p. 1102, 1997.

-O-

Ohsaka T., Izumi F., Fujiki Y., Journal of Raman Spectroscopy **7(6)**, p. 321, 1978.

Okumura T., Otsuka M., Pharmaceutical Research **22(8)**, 2005.

Olson L. G., Lo Y. S., Beebe T. P., Harris J. M., Analytical Chemistry **73**, p. 4268-4276, 2001.

Otsuka M., Kaneniwa N., Chemical and Pharmaceutical Bulletin **36**, p. 4026-4032, 1988.

Otsuka M., Kato F., Matsuda Y., AAPS Pharmscitech **2(1)**, 2000.

Otto A., Light Scattering in Solids IV, p. 289-418, 1984.

-P-

Pakkala M., Weisell J., Hekim C., Vepsäläinen J., Wallen E A., Stenman U. H., Koistinen H., Närvänen A., Amino Acids **39(1)**, p. 233-242, 2010.

Pankuch M., Bell R., Melendres C. A., Electrochemica Acta **38**, p.2777, 1993.

Park S. H., Im J. H., Im J. W., Chun B. H., Kim J. H., Microchemical Journal **63**, p. 71-91, 1999.

Pavel I., Szeghalmi A., Moigno D., Cinta S., Kiefer W., Biopolymers (Biospectroscopy) 72, p. 25-37, 2003.

Pedrueza E., Sancho-Parramon J., Bosch S., Valds J. L., Martinez-Pastor J. P., Nanotechnology **24**, 065202, 2013.

Pelton J. T., McLean L. R., Analytical Biochemistry **277**, p. 167-176, 2000.

Pighini C., Synthèses de nanocristaux de TiO_2 anatase à distribution de taille contrôlée. Influence de la taille des cristallites sur le spectre Raman et étude des propriétés de surface. Thèse de doctorat (Laboratoire de Recherche sur la Réactivité des Solides, Université de Bourgogne), 2006.

Pighini C. C., Aymes D., Millot N., Saviot L., Journal of Nanoparticle Research **9**, p. 309–315, 2007.

Pines D., Reviews of Modern Physics **28(3)**, p. 184, 1956.

Platzman P. M., Wolff P. A., Waves and interactions in solid state plasmas, Academic press, New-York, London, 1973.

Porto S. P. S, Fleury P. A., Damen T. C., Physical Review **154(2)**, p. 522, 1967.

Pozzi E. A., Zonntag M. D., Jiang N., Klingsporn J. M., Hersam M. C., Van Duyne R. P. J., ACS Nano **7(2)**, p. 885-888, 2013.

-Q-

Quidant R., Weeber J. C., Dereux A., Peyrade D., Colas des Francs G., Girard C., Chen Y., Physical Review E **64**,066607, 2001.

-R-

Raman C. V., Krishnan K. S., Nature **121**, p. 501-502, 1928.

Reetz M. T., Helbig W., Journal of American Chemical Society **116**, p. 7401, 1994.

Ritchie R. H., Physical Review **106(5)**, p. 874, 1957.

-S-

Safo M. K., Ahmed M. H., Ghatge M. S., Boyhiri T., Biochimica et Biophysica Acta **1814**, p. 797-809, 2011.

Sanogo Y., Conception et fabrication de capteurs et de leur technique d'interrogation pour des applications dans les domaines de la santé et de l'environnement. Thèse de doctorat (Ecole normale supérieure de Cachan), 2012.

Saviot L, Murray D. B., Duval E., Mermet A., Sirotkin S., Marco de Lucas M., Physical Review B **82**, p. 115-450, 2010.

Saviot L., Combe N., Mlayah A., Physical Review B **85**, 075405, 2012.

Scaffidi J. P., Gregas M. K., Seewaldt V., Vo-Dinh T., Analytical and Bioanalytical Chemistry **393**, p. 1135-1141, 2009.

Schlücker S., Surface Enhanced Raman Spectroscopy-Analytical, Biophysical and Life Science Application, Wyley-VCH, 2011.

Sedano A., Design computationnel de protéines pour la prédiction de structure. Thèse de doctorat (Ecole Polytechnique, ParisTech), 2013.

Senthilkumar V., Jayachandran M., Sanjeeviraja C., Thin Solid Films **519**, p. 991, 2010.

Shankara Narayanan S., Kumar Pal S., Journal of Physical Chemistry C **112**, p. 4874-4879, 2008.

Sidharth Shibua E., Hamadaa M., Murasea N., Biju V., Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews **15**, p. 53-72, 2013.

Simon M., Metzinger-Le Meuth V., Chevance S., Delalande O., Bondon A., Journal of Biological Inorganic Chemistry **18**, p. 27-38, 2013.

Singh A. V., Bangdar B. M., Kasture M., Prasad B .L. V., Sastry M., Journal of Materials Chemistry **15**, p. 5115-5121, 2005.

Sirotkin S., Cottancin E., Saviot L., Bernstein E., Mermet A., Physical Review B **85**, p. 205-435, 2012.
Song R. G., Yamaguchi M., Nishimura O., Suzuki M., Applied Surface Science **253**, p. 3093, 2007.

Spiro T. G., Biochimica et Biophysica Acta **416**, p. 169-189, 1975.

Swann M. J., Peel L. L., Carrington S., Freeman N. J., Analytical Biochemistry **329**, p. 190-198, 2004.

Swick A., Carles R., Physical Review B **48**, p. 6024-6032, 1993.

-T-

Taylor L. S., Zografi G., Pharmaceutical Research **1(5)**, 1998.

Testoni P. A, Digestive and Liver Disease **43**, p. 726-730, 2011.

Tom R. T., Samal A. K., Sreepasad T. S., Pradeep T., Langmuir **23**, p. 1320-1325, 2007.

Torrell (2010a) : Torrell M., Cunha L., Cavaleiro A., Alves E., Barradas N. P., Vaz F., Applied Surface Science **256**, p. 6536-6542, 2010.

Torrell (2010b) : Torrell M., Cunha L., Kabir M., Cavaleiro A., Vasilevskiy M., Vaz F., Materials Letters **64**, p. 2624-2626, 2010.

Torrell (2010c) : Torrell M., Machado P., Cunha L., Figueiredo N. M., Oliveira J. C., Louro C., Vaz F., Surface and Coatings Technology **204**, p. 1569-1575, 2010.

Torrell M., Kabir R., Cunha L., Vasilevskiy M., Vaz F., Cavaleiro A., Alves E., Barradas N., Journal of Applied Physics **109**, 074310 2011.

Tripathy S., Marty R., Lin V. K., Teo S. L., Ye E., Arbouet A., Saviot L., Girard C., Han M. Y., Mlayah A.,Nanoletters **11**, p. 431-437, 2011.

Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J., Discussion Faraday Society **11**, p. 55, 1951.

-V-

-W-

Walters G., Parkin I., Journal of Materials Chemistry **19**, p. 574-590, 2009.
Wanner M., Werner R., Gerthsen D., Surface Science **600**, p. 632-640, 2006.

Wenger J., Dintinger J., Bonod N., Popov E., Lenne P. F., Ebbesen T. W., Rigneault H., Optics Communications **267(1)**, p. 224-228, 2006.

Wood B. R., Asghari-Khiavi M., Bailo E., McNaughton D., Deckert V., Nano Letters **12**, p. 1555-1560, 2012.

Wu D. Y., Liu X. M., Duan S., Xu X., Ren B., Lin S. H., Tian Z. Q., Journal of Physical Chemistry C **112(11)**, p. 4195, 2008.

-X-

Xia Y., Rogers J. A., Paul K. E., Whitesides G. M., Chemical Reviews **99(7)**, p. 1823-1848, 1999.

Xia Y., Xiong Y., Lim B., Skrabalak S. E., Angewandte Chemie International Edition **48**, p. 60-103, 2009.

-Y-

Yamamoto T., Palmer G., Gill D., Salmeen I. T., Rimai L., The Journal of Biological Chemistry **248**, p. 5211-5213, 1973.

Yeo B. S., Mädler S., Schmid T., Zhang W., Zenobi R., Journal of Physical Chemistry C **112**, p. 4867-4873, 2008.

-Z-

Zhao G., Kozuka H., Yoko T., Thin Solid Films **277**, p. 147-154, 1996.

Valorisation des travaux

➢ Publications dans des revues scientifiques

- Growth and size distribution of Au nanoparticles in TiO_2:Au thin films deposited by reactive magnetron sputtering-*Thin Solid Films, Volume 553, 28 February 2014, Pages 138-143.*

S. Reymond-Laruinaz, L. Saviot, C. Lopes, F. Vaz, V. Potin and M. C. Marco de Lucas

- TiO_2 anatase films obtained by direct liquid injection atomic layer deposition at low temperature-*Applied Surface Science, Volume 288, 1 January 2014, Pages 201-207.*

L. Avril, S. Reymond-Laruinaz, J.M. Decams, M.C. Marco de Lucas, L. Imhoff

➢ Communications dans des congrès :

- **Communication orale** « Au-doped TiO_2 thin films: A low-frequency Raman study »

European Materials Research Society-Spring Meeting - Strasbourg 2013.

S. Reymond-Laruinaz, L. Saviot, F. Vaz, V. Potin, M. C. Marco De Lucas.

- **Communication orale** « Silver nanoparticle/protein bioconjugates : synthesis and SERS study » *Journées de discussion des GdR Or-Nano et PMSE* - Nantes 2013.

S. Reymond-Laruinaz, L. Saviot, M. C. Marco De Lucas.

- **Communication affichée** « Protein bioconjugated silver nanoparticles: a transmission electron mycroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy study »

European Materials Research Society-Spring Meeting - Strasbourg 2013.

S. Reymond-Laruinaz, L. Saviot, M. C. Marco De Lucas.

- **Communication affichée** « Biomolecules and nanostructured systems : Synthesis of nanoparticles by bioconjugation and analysis by SERS spectroscopy » *Journées de discusssion du GdR PMSE et 1st International Conference of Enhanced Spectroscopy* - Porquerolles 2012.

S. Reymond-Laruinaz, L. Saviot, M. C. Marco De Lucas.

- **Communication affichée** « Biomolécules et systèmes nanostructurés : Détection et caractérisation par spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS) » *Ecole thématique du CNRS Nano-Objets aux InterfaceS (NOIS)* - Anglet 2011.

S. Reymond-Laruinaz.

Table des figures

Figure I.1 : Représentation schématique de différents phénomènes produits dans l'interaction d'un faisceau lumineux avec un milieu dense. 18

Figure I.2 : Représentation schématique des processus de diffusions Rayleigh et Raman Stokes et anti-Stokes dans une approche semi-classique. 21

Figure I.3 : Spectre Raman montrant le rapport d'intensité théorique entre un pic Raman Stokes à 500 cm^{-1} et le correspondant pic Anti-Stokes pour une température de 300 K. 22

Figure I.4 : Représentation schématique des courbes de dispersion de phonons dans un cristal pour des vibrations se propageant selon la direction [100]. 24

Figure I.5 : Spectres Raman de TiO_2 cristallisé dans les phases anatase et rutile. [Pighini (2006)]. 26

Figure I.6 : Vibrations confinées dans un fil de dimension finie et dont les deux extrémités sont fixées. La vibration fondamentale (n=1) et les 4 premiers harmoniques (n= 2 à 5) ont été représentés. 28

Figure I.7 : Représentation des deux modes de vibration actifs en Raman d'une nanoparticule sphérique libre (modèle de Lamb). A gauche, le mode d'élongation quadrupolaire (*l=2*), à droite le mode de respiration *(l=0*). La sphère au centre de la figure et au centre de la représentation de chaque mode correspond à la position d'équilibre. Pour chaque mode, la figure montre les déformations maximales de la sphère. Pour le mode l=2, l'élongation selon la direction z est suivie d'une contraction dans cette direction. Le mode de respiration, *l=0*, correspond à une expansion radiale suivie d'une contraction. 29

Figure I.8 : Cartographie du champ électrique local E (V/m) autour d'une particule de verre sphéroïdale (longueur d'onde d'excitation : 500 nm ; petite axe : 5 nm ; grand axe : 50 nm). [Le Nader (2010)] 33

Figure I.9 : Représentation schématique d'une onde de densité électronique qui se propage à l'interface entre un métal et un diélectrique. Les oscillations de la densité de charge, et les champs électromagnétiques associés, constituent les ondes plasmon-polariton de surface. La décroissance exponentielle de l'intensité du champ électromagnétique perpendiculairement à l'interface est montrée à droite. 34

Figure I.10 : Représentation schématique visualisant les plasmons localisés de surface pour des nanoparticules métalliques sous l'action d'une onde électromagnétique. Il en résulte une oscillation du nuage d'électrons, repoussé par le champ négatif à l'extérieur de la particule, créant un champ électromagnétique local très intense. 35

Figure I.11 : Nanoparticule métallique sphérique soumise à un champ électrostatique $\vec{E}_0$ 35

Figure I.12 : Exemples de la modification de l'intensité du champ électromagnétique local, M_{Loc} près de la surface d'une sphère de 50 nm de diamètre en verre ou en argent, et dans le gap entre deux sphères en argent proches (dimère). Calculs réalisés pour une molécule située dans le point A, à une distance d= 1 nm de la surface. [Le Ru (2009)] 37

Figure I.13 : Exemples de la modification de l'émission dans l'air d'un dipôle situé à une distance d=1 nm d'une sphère : (a) en verre, (b) en argent, et (c) dans le gap entre deux particules d'argent. Exaltation de l'émission, $M_{Rad} = P_{Rad} / P_0$, pour un dipôle perpendiculaire (⊥) ou parallèle (//) à la surface. [Le Ru 2009] 39

Figure I.14 : Différents types de nanoparticules métalliques [Sidharth Shibua (2013)] 42

Figure I.15: Image AFM (7x7 μm^2) d'un substrat Klarite® [Degioanni (2013)]. 43

Figure I.16 : Schéma des différents niveaux de structuration d'une protéine. 45

Figure I.17 : Schéma de la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés. 46

Figure I.18 : (a) Spectre Raman du citrate de sodium ; (b) Spectre SERS de nanoparticules d'or entourées stabilisées par le citrate de sodium.[Mandal (2011)]. 50

Figure I.19 : Spectres Raman de la protéine RNase-A. a) Spectre Raman d'une solution à 20 mM ; b) Spectre SERS d'une solution à 20 mM ; c) Spectre Raman de la protéine lyophilisée [David (2010)]. 51

Figure I.20 : Spectres Raman des zones actives (courbe continue) et inactive (courbe discontinue) du substrat Klarite® recouvert du film sol-gel de TiO_2 de 8 nm d'épaisseur pour une excitation laser à 780 nm. [Degioanni (2013)] 53

Figure I.21 : Spectres Raman (a) conventionnel et (b) SERS des films de TiO_2 déposés par ALD sur un substrat en verre. Epaisseur des films : 2, 5, 10 et 20 nm. Excitation : 532 nm. [Lin (2012)] 54

Figure II.1 : Schéma du montage à reflux utilisé pour la synthèse de nanoparticules métalliques. 58

Figure II.2 : Importance de l'étape de coagulation sur la croissance des particules d'or [Kumar (2007)]. 60

Figure II.3 : Observation au microscope électronique à balayage d'une goutte de suspension de nanoparticules d'or synthétisée déposée et séchée sur une lame de silicium. 61

Figure II.4 : Spectre d'absorption UV-Visible d'une suspension de nanoparticules d'or dans l'eau. 61

Figure II.5 : Spectres d'absorption UV-Visible de suspensions aqueuses de nanoparticules d'or avec un diamètre de 9, 22, 48, et 99 nm. La position du pic d'absorption est de 517, 521, 533, et 575 nm, respectivement. [Link 1999] 62

Figure II.6 : Schéma du procédé de silanisation de la surface de verre avec l'APTMS. 64

Figure II.7 : Image au microscope optique d'une surface de verre fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or. 65

Figure II.8 : Spectres d'absorption : (a) bleu de méthylène, (b) du cristal violet. 66

Figure II.9 : Spectres Raman obtenus pour une solution de bleu de méthylène concentrée à $0{,}5.10^{-6}$ M déposée par spin-coating sur une lame de verre fonctionnalisée avec des particules d'or. Zone analysée : (a) hors nanoparticules d'or ; (b) avec de nanoparticules d'or. Longueur d'onde d'excitation : 633 nm. Puissance laser : 1,2 µW. temps d'acquisition : 10 s. 67

Figure II.10 : Spectres Raman obtenus pour une solution de cristal violet (CV) concentrée à $0{,}5.10^{-6}$ M déposée par spin-coating sur une lame de verre fonctionnalisée avec des particules d'or. Zone analysée : (a) hors nanoparticules d'or ; (b) avec de nanoparticules d'or. Longueur d'onde d'excitation : 633 nm. Puissance laser : 1,2 µW. temps d'acquisition : 10 s. 68

Figure II.11 : Schéma du montage utilisé pour la synthèse des nanoparticules bio-conjuguées sous UV. 71

Figure II.12 : Schéma de principe du dépôt ALD. 75

Figure II.13 : Epaisseur des films minces de TiO_2 en fonction du nombre de cycles ALD du dépôt. [Avril (2014)] 77

Figure II.14 : Image par microscopie électronique en transmission d'un film de TiO_2 de 30 nm d'épaisseur déposé par DLI-ALD sur un substrat Silicium (1660 cycles ALD). [Avril (2014)] 78

Figure II.15 : Spectre Raman d'un film d'épaisseur 30 nm (1660 cycles ALD) de TiO_2 déposé sur un susbtrat Si. (A) modes de vibration de TiO_2 cristallisé dans la phase anatase; (Si) modes de vibration du substrat Si(100). [Avril (2014)] 78

Figure II.16 : Schéma du spectromètre Raman InVia (Renishaw). 79

Figure II.17 : Schéma du système ATR..... 82

Figure III.1 : Structure de l'hémoglobine selon la Protein Data Bank. 88

Figure III.2 : Structure du groupe hème indiquant les groupements reliés au pyrrole dans l'hémoglobine et le cytochrome C. 88

Figure III.3 : Structure du cytochrome C selon la Protein Data Bank. 89

Figure III.4 : Structure de la lysozyme selon la Protein Data Bank. 89

Figure III.5 : Images MEB en électrons rétrodiffusés des nanoparticules bio-conjuguées Ag:Hémoglobine. a) synthétisées sans irradiation UV ; b) synthétisées avec irradiation UV. 92

Figure III.6 : Images MEB en électrons rétrodiffusés des nanoparticules bio-conjuguées de a) Ag:Cytochrome C et b) Ag:BSA synthétisées sous irradiation UV. 93

Figure III.7 : Images MEB en électrons rétrodiffusés des nanoparticules bio-conjuguées Ag:Lysozyme. a) Image prise directement après avoir le focus ; b)après une exposition de quelques secondes sous le faisceau d'électrons. 93

Figure III.8 : Images MET des nanoparticules Ag:Lysozyme sur une membrane de carbone. (a, b) images en champ sombre ; (c, d) images en champ clair. 95

Figure III.9 : Spectres EELS à différents points d'une nanoparticule de Ag:Lysozyme observée par STEM en champ sombre. 96

Figure III.10 : Images MET des nanoparticules bio-conjuguées. a) Ag:Hémoglobine sans UV ; b) Ag:Hémoglobine avec UV ; c) Ag:BSA sans UV ; d) Ag:BSA avec UV ; e) Ag:Cytochrome C avec UV ; f)Ag:Lysozyme avec UV. 97

Figure III.11 : Spectres UV-Visible des suspensions de nanoparticules bio-conjuguées (bleu) comparées aux spectres de solutions diluées de protéines dans l'eau déionisée (rouge). a) Ag:Hémoglobine ; b) Ag:BSA ; c) Ag:Cytochrome C ; d) Ag:Lysozyme. 99

Figure III.12 : Schéma de la méthode de mesure d'une goutte de liquide par spectrométrie Raman. Photo de deux gouttes d'une suspension de nanoparticules sur une lame Tienta®. 102

Figure III.13 : Spectres Raman de (a) hémoglobine lyophilisée ; (b, c) Ag:Hémoglobine bio-conjuguées synthétisées sans irradiation UV (b) et avec irradiation UV (c). Les spectres ont été normalisés en intensité et décalés en hauteur pour une meilleure lisibilité. Longueur d'onde laser : 532 nm ; puissance laser : 0,55 mW ; temps d'acquisition : 10 s. 103

Figure III.14 : Spectres Raman de (a) Ag:cytochrome-C ; (b) cytochrome C lyophilisée ; (c) Ag:lysozyme ; (d) Lysozyme lyophilisée ; (e) Ag:BSA ; (f) BSA lyophilisée. Les nanoparticules bio-conjuguées ont été synthétisées avec UV. Les spectres ont été normalisés en intensité et décalés en hauteur pour une meilleure lisibilité. Longueur d'onde laser : 532 nm ; puissance laser : 0,55 mW ; temps d'acquisition : 10 s. 104

Figure III.15 : En haut : spectre de la BSA dans D_2O (60 mg/mL) (rouge) et Ag:BSA synthétisé dans D_2O (bleu). En bas : Différence arithmétique entre les deux spectres. 107

Figure III.16 : Géométrie optimisée (B3LYP/6-311+G(d, p)) de la caféine anhydre. [Pavel (2003)]..... 111

Figure III.17 : Structure de la phase I de la Caféine. (a) Projection dans la direction [100] ; (b) Projection dans la direction [001] [Decroix (2009)] 112

Figure III.18 : Structure de la phase II de la caféine. (a) Projection selon l'axe c avec l'axe a vertical ; (b) Projection selon l'axe b avec l'axe c vertical. En bleu, les sites désordonnés 65:35 ; en rouge, les sites désordonnés 50:50 ; en vert, les sites ordonnés [Decroix (2009)]..... 113

Figure III.19 : Spectres Raman des formes I et II de la caféine. Le spectre est divisé en deux régions : le domaine des basses fréquences (10-100 cm^{-1}) et le domaine des hautes fréquences (100-1800 cm^{-1}) [Hédoux (2011)]..... 114

Figure III.20 : Cristallisation de la caféine sur une lame de verre fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or. 115

Figure III.21 : Cristallisation de la caféine sur une lame de verre fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or recouverte d'une lame de verre..... 115

Figure III.22 : Spectres Raman : A. des deux types de cristaux observés sur la figure III.17 : cristal type 1 (aiguilles); cristal type 2 ; B. cristaux purs (poudre) de : caféine I; caféine II. Longueur d'onde laser : 532 nm ; puissance laser : 0,55 mW ; temps d'acquisition : 10 s..... 117

Figure III.23 : Comparaison des spectres Raman des cristaux purs de Caféine I et II, des phases cristallisées sur le substrat (aiguilles, cristaux) présentées fig. III.16 et des spectres SERS de la caféine. Longueur d'onde laser : 532 nm ; puissance laser : 0,55 mW ; temps d'acquisition : 10 s. 118

Figure III.24 : (a) Image au microscope optique d'une branche cristalline de Caféine I déposée sur une lame de verre fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or ; (b) Cartographie Raman de la zone montrée en (a) ; (c) Spectres Raman de deux points représentés dans la cartographie Raman. L'intensité intégrée du pic basse fréquence (~20 cm^{-1}) est représentée par une variation de couleur depuis le noir jusqu'au rouge. Puissance laser : 0,55 mW. Pas de mesure : 1 µm. 119

Figure IV.1 : Evolution des coordonnées de couleur (L*a*b) et de l'apparence des dépôts en fonction de la température de recuit [Torrell (2010a)]..... 126

Figure IV.2 : Spectres Raman Stokes et Anti-Stokes des films de TiO_2:Au non recuit et recuits, sur substrat de silicium. En partant du bas : film non recuit et films recuits à 200, 300, 400, 500, 600, 700 et 800 °C. La raie laser d'excitation est à 532 nm. Les spectres ont été normalisés en intensité et décalés verticalement pour une meilleure lisibilité. 127

Figure IV.3 : Spectres d'absorption obtenus pour une série de films de TiO_2:Au (12 % at.) recuits à différentes températures allant de 200 à 700 °C [Torrell (2010b)]..... 129

Figure IV.4 : Spectres d'absorption calculés est expérimentaux pour deux échantillons de TiO_2:Au recuits à 500 et 800 °C (concentration d'or : 12 % at.). [Torrell (2010b)]..... 130

Figure IV.5 : Atténuation de l'intensité du faisceau en fonction de la profondeur atteinte dans le dépôt TiO_2:Au pour une concentration d'or de 12 %at et de 5 %at. 131

Figure IV.6 : Spectres d'extinction calculés à l'aide de la théorie de Mie pour une nanoparticule d'or (rayon R=3 nm, constantes optiques de [Johnson (1972)] dans le vide (n=1) ou dans un milieu proche de l'anatase (n=2.5). 132

Figure IV.7 : Spectres Raman dans le domaine des basses fréquences des films TiO_2:Au. En partant du bas : film non recuit et films recuits à des températures allant de 200 à 800 °C. La raie laser d'excitation est à 647,1 nm. Les spectres ont été normalisés en intensité et décalés verticalement pour une meilleure lisibilité..... 133

Figure IV.8 : Evolution de la taille des nanoparticules obtenue par DRX dans des nanocomposites TiO_2:Au (12 %at.) [Torrell (2010b)] 135

Figure IV.9 : Diffractogrammes obtenus avec un angle d'incidence rasant α=2° des films TiO_2:Au recuits à 400, 600 et 800 °C, respectivement en partant du bas. Les diffractogrammes ont été décalés verticalement pour une meilleure lisibilité. La position et l'intensité relative des pics de diffraction des phases anatase (A) (Fiche JPCPDS 01-075-2545) et rutile (R) (Fiche JCPDS 01-072-7374) du dioxyde de titane, et de l'or (Au) (Fiche JCPDS 00-004-0784) sont présentés. 137

Figure IV.10 : Images TEM de la section transverse des films TiO_2:Au : (a) échantillon non recuit et (b, c, d) échantillons recuits respectivement à 400, 600 et 800 °C. Des vues zoomées de zones proches de la surface sont données pour les échantillons recuits à (e) 400 °C et (f) 800 °C. 138

Figure IV.11 : Distribution de tailles des nanoparticules d'or dans un film de TiO_2:Au recuit à 800 °C. La taille de 250 nanoparticules a été mesurée sur l'image TEM présentée dans la figure IV.5 (f) jusqu'à une profondeur de 60 nm sous la surface du film. 140

Figure IV.12 : Profils obtenus par spectrométrie EDX en mode STEM de la composition atomique en profondeur des films. (a) Film non recuit ; (b,c) film recuit à 800°C. Les images STEM en champ sombre des zones analysées sont données au-dessous de chaque profil. 141

Figure IV.13 : Images MEB d'un film de TiO_2 de 10 nm d'épaisseur sur substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. (a, c, e) images enregistrées avec les électrons secondaires ; (b, d, f) images respectives enregistrées avec les électrons rétrodiffusés. 146

Figure IV.14 : Images MEB des couches de TiO_2 d'une épaisseur nominale de 10 nm déposées sur substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. Images acquises à la fois en électrons secondaires (en vert) et rétrodiffusés (en orange), puis superposées. 147

Figure IV.15 : Images MEB des couches de TiO_2 d'une épaisseur nominale de 5nm déposées sur substrats de silicium fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or. Images acquises à la fois en électrons secondaires (en vert) et rétrodiffusés (en orange), puis superposées. 148

Figure IV.16 : Spectres Raman obtenus pour une couche de TiO_2 de 10 nm d'épaisseur déposée par ALD : (a) sur un substrat Si(100) non fonctionnalisé, (b,c,d) sur un substrat Si(100) fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or. Focalisation du laser : (b) hors particules d'or, et (c,d) sur des particules d'or. Raie d'excitation : 532 nm. Puissance d'excitation: 2.8 mW. Temps d'acquisition : 10 s. 150

Figure IV.17 : Analyse de pic $E_g(1)$ de la phase anatase de TiO_2 dans une série de 20 spectres Raman enregistrés pour une couche de TiO_2 de 10 nm d'épaisseur déposée par ALD sur un substrat Si(100) fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or. (a) Variation de la largeur à mi-hauteur et (b) variation de l'intensité intégrée en fonction de la position du pic $E_g(1)$. 152

Figure IV.18 : A gauche : image au microscope optique d'une couche de TiO_2 10 nm déposée sur substrat de silicium fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or. 153

A droite : cartographie Raman de la zone montrée à gauche. L'intensité intégrée du pic $E_g(1)$ de la phase anatase de TiO_2 est représentée par une variation de couleur depuis le noir jusqu'au rouge. Puissance laser : 0,28 mW. Pas de mesure : 0,3 µm. 153

Figure IV.19 : Spectres Raman de deux points représentés dans la cartographie Raman de la figure I V. 18. En haut, spectre pour un point affiché en rouge dans la cartographie. En bas, spectre Raman d'un point affiché en noir. 154

Figure IV.20 : Spectres Raman obtenus pour une couche de TiO_2 de 5 nm d'épaisseur déposée par ALD sur un substrat Si(100) fonctionnalisé avec des nanoparticules d'or. D'en bas vers le haut, spectres Raman obtenus : (a) hors particules d'or, et (b,c) sur des particules d'or. 155

Raie d'excitation : 532 nm. Puissance d'excitation: 55µW. Temps d'acquisition : 30 s. 155

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Fréquence des différents pics observés dans le spectre Raman pour les phases anatase et rutile de TiO_2. L'attribution aux modes actifs Raman est aussi indiquée. 27

Tableau I.2 : Fréquences calculées des modes de vibration fondamentaux acoustiques de nanoparticules d'or libres en fonction de leur taille. Vitesse du son dans l'or : v_L=3330 m/s ; v_T=1250 m/s. Coefficient de Poisson : ν=0,42 30

Tableau I.3 : Fréquences des principales bandes Raman et IR caractéristiques de la structure secondaire des protéines [Domènech (2007)]. 47

Tableau I.4 : Fréquences habituelles des principales bandes Raman des acides aminés aromatiques dans les protéines..... 49

Tableau IV.1 : Position du pic Raman basses fréquences dans les spectres de la figure IV.7 et tailles des nanoparticules en fonction de la température de recuit des films TiO_2:Au..... 134

Résumé

Le développement des nano et biotechnologies pousse à la recherche de techniques de caractérisation adaptées à l'étude des systèmes nanostructurés. La spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS) est une technique d'analyse en plein essor dans ce domaine.

Dans ce travail de thèse nous nous sommes attachés à étudier, par cette technique, différents types de systèmes nanostructurés : des biomolécules et des films minces inorganiques. Le but était d'accéder à des informations sur la structure et les liaisons chimiques présentes dans ces systèmes. L'étude a été complétée par des observations par microscopie électronique en transmission notamment.

Dans un premier temps, a été réalisée l'étude de molécules d'intérêt biologique. L'objectif était la compréhension des modes d'interaction nanoparticules métalliques/protéines menée sur des nanoparticules d'argent bio-conjuguées avec des protéines depuis leur synthèse jusqu'à leur caractérisation. Les résultats ont montré la chimisorption des protéines à la surface de nanoparticules d'argent possiblement par leurs terminaisons azotées. La technique SERS a également été expérimentée dans le domaine des basses fréquences pour caractériser la structure de dépôts minces de caféine, molécule d'intérêt pharmaceutique.

Dans un second temps, l'étude de couches minces nanostructurées par spectrométrie Raman et SERS a été réalisée. Des couches minces nanocomposites TiO_2:Au, ont été étudiées pour décrire les premières étapes de croissance des nanoparticules sous l'effet de la température dans ces matériaux. Des films ultraminces de TiO_2 d'épaisseur contrôlée ont été déposés sur substrats fonctionnalisés avec des nanoparticules d'or pour étudier leur exaltation par effet SERS.

Mots Clefs : Spectrométrie Raman-SERS-Protéines-Biomolécules-Nanostructures-TiO_2-Couches minces.

Abstract

This work addressed the study of several kinds of nanostructured systems, biomolecules and inorganic thin films, mainly by Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). The aim was to investigate the structure and the chemical bonds. Transmission electron microscopy (TEM) was also used to complete the structural characterization of the different samples.

Firstly, the study was conducted on molecules of biological interest. The aim was to study the interaction between silver nanoparticles and proteins. With this aim, silver nanoparticles bioconjugated with different proteins (hemoglobin, cytochrome C, BSA and lysozim) were synthesized. SERS results allowed concluding that proteins are chemisorbed on the silver nanoparticules surface. SERS was also used in the low frequency range to characterize the structure of thin deposits of caffeine, a molecule of pharmaceutical interest.

Raman spectroscopy and SERS were also used to study nanostructured TiO_2:Au thin films. The first stages of the growth of gold nanoparticles in Au doped TiO_2 thin films under annealing treatments were studied by low frequency Raman spectroscopy and TEM. Finally, it was shown that SERS effect can be used for the characterization of ultra-thin TiO_2 films. With this aim, ultra-thin TiO_2 films were deposited by Atomic Layer Deposition on Si substrates functionalized with gold nanoparticles and studied by SERS.

Keywords: Raman spectroscopy–SERS–Proteins– Biomolecules–Nanostructures–TiO_2-Thin films