
Impact de la valeur seuil d'émission d'un laser sur l'analyse quantitative en spectrométrie Raman

David Siniscalco¹, Nicolas Delorme¹, Patrick Simon²,
Jean-François Bardeau¹

1. Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM-UMR CNRS 6283)
Université du Maine, av. Olivier Messiaen, 72085 Le Mans Cedex, France
Jean-françois.bardeau@univ-lemans.fr

2. CEMHTI UPR CNRS 3079, Université d'Orléans
45071, 1D av. de la recherche scientifique, 45071 Orléans Cedex 2, France

RÉSUMÉ. *Durant une expérience de spectroscopie Raman, l'intensité du signal Raman dépend à la fois de la longueur d'onde d'excitation, de la puissance laser et du temps d'exposition. Il est généralement admis que le signal Raman double avec le doublement de la puissance laser. Cependant, nous montrons dans cet article que pour des valeurs faibles de puissance, la prise en compte de la valeur indiquée par la diode de sortie du laser peut engendrer des erreurs dans l'exploitation quantitative des signaux. Nous montrons notamment cet impact sur l'analyse de deux matériaux en indiquant les précautions à prendre pour comparer des résultats avec une grande précision lorsque des analyses sont effectuées dans des conditions différentes. Une méthode de calibration est alors proposée.*

ABSTRACT. *During a Raman spectroscopy experiment, measurement can be affected both by the excitation wavelength, the laser power and the exposure time. It is generally accepted that the Raman signal will be doubled if the laser power is doubled. However, we show in this paper that for low values of power if we take into account the value indicated by the output laser diode, it can cause dramatic errors in the quantitative comparison of Raman signal. We evidence this impact particularly on the analysis of two materials and we indicate the precautions to be taken to compare results with high reliability specifically when Raman spectra are recorded under different conditions. A simple calibration method is then proposed.*

MOTS-CLÉS : *spectroscopie Raman, précision, puissance laser, temps, longueur d'onde.*

KEYWORDS: *Raman spectroscopy, reliability, laser power, time, wavelength.*

DOI:10.3166/I2M.15.1-2.121-136 © 2016 Lavoisier

1. Introduction

1.1. Spectroscopie Raman

En 1928, en Inde, Sir C.V. Raman a été le premier (et presque simultanément avec Léonid Isaakovitch Mandelstam) à mettre en évidence expérimentalement un phénomène d'émission lumineuse inélastique lorsqu'un échantillon est soumis à une onde électromagnétique monochromatique (Raman, 1958).

Le phénomène physique peut s'expliquer simplement. Les photons incidents sont tout d'abord absorbés par des molécules puis diffusés majoritairement avec des photons de même fréquence (diffusion Rayleigh) que ceux du rayonnement incident, et dans une plus faible proportion (un photon sur un million) avec des photons de fréquences différentes. L'analyse de ces variations de fréquence permet de caractériser chaque matériau et donne notamment accès à des informations qualitatives et quantitatives relatives aux modes vibrationnels et rotationnels de la matière. Sir C.V. Raman a obtenu le prix Nobel de Physique en 1930 pour cette découverte et cette spectroscopie a commencé à se répandre dans les laboratoires car cette technique permettait, en complément de la spectroscopie infrarouge alors très répandue, d'obtenir des informations sur la composition chimique et les caractéristiques physiques de la matière sondée sans contact direct avec la matière et donc sans risque de contamination

Le développement des lasers (amplification de lumière par émission stimulée de radiation) dans les années 1960 (Scalow *et al.*, 1958) bénéficie grandement à cette technique. En effet, un laser génère une lumière monochromatique très cohérente avec une polarisation bien définie, un faisceau étroit non divergent qui peut être focalisé à l'aide de lentilles ou d'objectifs de microscope. Cette source de lumière devient donc une source idéale pour les expériences Raman. De nouveaux équipements intègrent alors ces avancées technologiques et l'étude de la composition chimique et de la structure moléculaire d'échantillons à l'état solide, liquide ou gazeux s'en trouve simplifiée.

Le développement de spectromètres compacts, plus facile d'utilisation par des opérateurs moins spécialisés, intégrant les sources laser et les détecteurs refroidis, a permis à cette technique non-destructive et non-invasive de se répandre plus facilement dans les secteurs industriels. C'est ainsi que l'on retrouve aujourd'hui des spectromètres Raman pour contrôler les matières premières sur les lignes de production, suivre les étapes de fabrication et faire des contrôles qualité en complément d'autres techniques comme la DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) et les analyses par rayons X.

L'utilisation d'un microscope confocal couplé à un système motorisé en XYZ ou encore à une platine piézoélectrique offre alors la possibilité de générer des cartographies chimiques de répartition de composés ou d'états de contrainte avec

une résolution latérale inférieure à 500 nm et ce sur un volume de quelques microns cube.

Ces avancées technologiques permettent aujourd'hui d'en faire un outil très puissant pour analyser des quantités infimes de concentration de molécules et c'est notamment le cas dans l'étude de pigments d'œuvres anciennes (Idone *et al.*, 2013) ou de systèmes biologiques (Hedegaard, 2006) mais aussi pour détecter des composants chimiques spécifiques d'explosifs ou de drogues (Staymates *et al.*, 2011) ou encore d'identifier des substances incluses dans des produits alimentaires (Li *et al.*, 2010 ; Nerrin *et al.*, 2013 ; Strege *et al.*, 2009) dans le cadre d'un contrôle qualité.

Cette technique est également utilisée pour étudier avec une plus grande facilité les propriétés physiques d'objets de taille nanométrique (El Mendili *et al.*, 2011) le comportement structural de films ultra-minces de polymères (< 70 nm) (Vignaud *et al.*, 2005) en température, les propriétés structurales de surfaces fonctionnalisées (Baptiste *et al.*, 2004) et de systèmes biologiques (Hedegaard, 2006). La microspectrométrie Raman a été par ailleurs appliquée dans le domaine biomédical (Barhoumi *et al.*, 2008 ; Jess *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2008 ; Lorincz *et al.*, 2004 ; Taleb *et al.*, 2006 ; Wei *et al.*, 2008) du fait de sa plus faible sensibilité (comparée à la forte absorption en spectroscopie infrarouge) à la présence d'eau dans les échantillons biologiques. Bien que l'analyse qualitative des spectres Raman permette généralement d'identifier rapidement la nature chimique des groupes fonctionnels à l'origine de la diffusion, l'analyse quantitative reste, quant à elle, délicate car les caractéristiques physico-chimiques des matériaux étudiés peuvent évoluer en fonction des conditions d'irradiation. En effet, il a été récemment montré qu'il était possible dans certaines conditions de modifier la structure de matériaux en surface sous irradiation laser et générer à plus forte densité d'énergie des transitions de phase. Ces travaux ont démontré que ces phénomènes localisés étaient dus à un effet thermique (El Mendili *et al.*, 2011 ; 2012) et qu'il était crucial de contrôler les puissances laser utilisées et les temps d'irradiation pour conserver à la fois le caractère quantitatif de cette technique et non perturbateur même à des échelles nanométriques.

Par conséquent, compte tenu de ces résultats récents, il nous semble nécessaire de rappeler dans cet article l'importance de bien contrôler les puissances laser et les temps d'irradiation et de montrer comment comparer ensuite quantitativement et sans faire d'erreur, des analyses spectrales effectuées dans des conditions expérimentales différentes. On comprend alors aisément l'importance de ce dernier point dans le cadre de diagnostics pour des domaines pharmaceutiques et médicaux qui nécessitent une extrême rigueur dans les dosages et les concentrations déduites des analyses spectroscopiques (Jess *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2008 ; Lorincz *et al.*, 2004 ; Taleb *et al.*, 2006).

1.2. Phénomène d'exaltation optique

Etant associé à un phénomène de faible intensité, la spectroscopie Raman est une technique qui peut s'avérer peu sensible, surtout pour analyser des solutions très diluées ou des matériaux de basse dimensionnalité (nanoparticules, films minces, monocouches moléculaires auto-assemblées) ou en très faible quantité.

Le développement d'une nouvelle méthodologie d'analyse basée sur l'utilisation de surfaces rugueuses ou de nanoparticules métalliques de taille nanométrique appelée « Diffusion Raman Exaltée de Surface (DRES ou SERS de l'acronyme anglais « Surface Enhanced Raman Scattering ») a permis d'apporter à cette technique un gain de sensibilité de l'ordre de 10^3 à 10^8 indispensable pour la détection de quantités infimes de l'ordre de la ppb (Guerrini *et al.*, 2009), voire dans des cas très favorables de détection d'une seule molécule.

Ce phénomène d'exaltation optique a été observé pour la première fois par Fleischmann *et al.* en 1974 (Fleischmann *et al.*, 1974) lors d'une étude Raman de pyridine sur une surface d'argent. A l'époque, une première analyse des résultats ne montra pas d'effet nouveau mais les auteurs avancèrent une hypothèse suivant laquelle l'électrode utilisée avait subi de nombreux cycles d'oxydo-réduction et que l'augmentation de la rugosité, et donc de la surface spécifique en interaction avec les molécules sondées, pouvait expliquer l'augmentation du signal Raman. Il faut attendre 1977 avec les travaux de Jeanmaire et Van Duyne (Jeanmaire et Van Duyne, 1977) sur la pyridine en solution saturée (dite « de manière classique ») et de la pyridine sur une électrode d'argent pour mettre en évidence un phénomène nouveau d'exaltation. Aucun signal exalté n'ayant été observé sur des électrodes polies, un moyen d'obtenir un effet DRES à l'époque est donc d'utiliser des surfaces d'or ou d'argent présentant une rugosité de surface.

A l'aide d'un microscope, l'analyse Raman est effectuée très localement, sur une zone micrométrique délimitée par la résolution optique due à l'ouverture numérique de l'objectif et de la longueur d'onde incidente. Lors d'une analyse Raman, s'il y a un effet d'exaltation, les signaux Raman diffusés proviennent d'un nombre de molécules qu'il est alors difficile de quantifier. En effet, il est délicat de déterminer le rapport d'exaltation dû à l'effet DRES car la population sondée n'est peut-être pas la même lorsqu'on obtient un signal de manière dite « classique ». De plus ce rapport d'exaltation n'est pas nécessairement exactement le même pour toutes les molécules sondées. C'est pour cela que dans les années 1990, Kneipp (Kneipp *et al.*, 1997) et Nie (Nie *et al.*, 1997) travaillèrent à l'obtention du spectre Raman d'une molécule unique. Ils utilisèrent respectivement du cristal violet et de la rhodamine 6G dans des solutions très diluées ($2 \cdot 10^{-11}$ M) afin de n'avoir qu'une seule molécule absorbée sur une structure métallique. L'analyse a ainsi pu montrer que sur des points particuliers, le facteur d'exaltation peut atteindre des valeurs supérieures à dix ordres de grandeur par rapport au signal « classique ». La particularité de ces points leur confèrera le nom de « points chauds ». Ces expériences fondamentales ont donc permis de mieux connaître le facteur réel que pouvait entraîner l'effet DRES.

Finalement, la variation observée du signal Raman dépend à la fois de l'espèce chimique étudiée et des caractéristiques physiques des différents substrats utilisés. Deux effets cumulatifs permettent d'obtenir un signal exalté : un effet électromagnétique et un effet chimique. La théorie chimique s'appuie sur la modification très importante de la polarisabilité de la molécule adsorbée sur une surface (ou à proximité de la surface) *via* l'existence d'un état de transfert de charge, résultant des interactions spécifiques entre la molécule et le substrat ou même la formation d'un complexe sur le substrat, qui rendrait l'excitation résonnante. Ce transfert de charge peut induire l'apparition de nouveaux états électroniques qui permettent ensuite dans certains cas d'avoir une exaltation de signal Raman. La communauté scientifique s'accorde cependant sur le fait qu'il est moins important que l'effet électromagnétique car il ne provoque qu'une exaltation d'un facteur 100 ou 1 000. L'effet électromagnétique lui est principalement expliqué par deux phénomènes : la géométrie du substrat et les plasmons de surface. Les modèles théoriques traitant du mécanisme électromagnétique sont basés sur l'excitation de plasmons de surface localisés (excitations localisées du plasma d'électrons libre) à l'intérieur de petites structures d'une dizaine de nanomètres, comme par exemple des nanoparticules métalliques ou des singularités de surface de certaines structures et induisent alors un champ électromagnétique local très fort sur une centaine de nanomètres dans l'air et de quelques dizaines de nanomètres dans le métal. L'une des voies possibles de désexcitation est celle du transfert d'énergie vers les molécules absorbées en surface. Ces phénomènes d'exaltation optiques nécessitent la maîtrise de l'utilisation de substrats spéciaux basés le plus souvent sur l'exploitation du confinement du champ électromagnétique entre nanoparticules ou nanostructures métalliques élaborées sur des supports adaptés aux domaines applicatifs.

L'exaltation électromagnétique est parfois tellement importante entre les architectures nanométriques que les substances à détecter peuvent être dénaturées ou détériorées ou tout simplement entraîner la saturation du détecteur. Pour toutes ces raisons, il est souvent nécessaire de modifier la puissance de l'irradiation incidente ou le temps de mesure. Par ailleurs, d'un point de vue technologique, de nouveaux besoins en imagerie performante, en méthode de détection chimique et biochimique ultra-sensible et en caractérisation sélective (et sans marquage) de systèmes sous très haute dilution ou de molécules individuelles ont motivé récemment de nouvelles recherches dans ce domaine. Au cours des dernières années, le marché de l'instrumentation analytique a connu un bouleversement important avec l'apparition d'équipements portables de nouvelle génération avec des capacités et sensibilités remarquables. Parallèlement au développement technologique, l'analyse et le traitement de données ont beaucoup progressé et des méthodes telles que la chimiométrie (méthode statistique) permettent aujourd'hui d'extraire des informations difficilement exploitables de signaux Raman complexes.

Toutes ces avancées ne seraient rien, si l'utilisateur de ces techniques n'était pas sensibilisé aux erreurs d'interprétation pouvant être générées par une simple analyse basée sur la comparaison des intensités de raies vibrationnelles de spectres Raman enregistrés avec des puissances laser et des temps différents. C'est pour cela que dans de nombreux domaines des méthodes de calibration sont nécessaires pour limiter les erreurs. Geng *et al.* (Geng *et al.*, 2015) montrent que l'étalonnage d'un capteur chimique est nécessaire car les signaux enregistrés peuvent varier en fonction des conditions environnementales dans lesquelles sont faites les expériences. Fernandes *et al.* (Fernandes *et al.*, 2016) montrent eux aussi que la calibration est une étape nécessaire car les données peuvent évoluer en fonction de la température à laquelle l'expérience est faite. Hubert *et al.* montrent eux aussi qu'une méthode d'étalonnage est nécessaire pour des capteurs d'humidité (Hübert *et al.*, 2016). La chimiométrie (ou analyse multivariable) en instrumentation consiste à modéliser les variations d'un certain nombre de variables en ayant pris soin au préalable de corriger les différences provenant de l'enregistrement des données. Bocklitz *et al.* (Bocklitz *et al.*, 2016) montrent dans leur travail qu'il est nécessaire d'appliquer des corrections lorsque par exemple des spectres Raman ont été enregistrés à des longueurs d'onde différentes mais aussi d'effacer les différences de spectres qui peuvent exister entre les différents spectromètres. Cette méthode a l'avantage d'être très précise mais nécessite un certain nombre d'expériences et de calcul.

2. Théorie de l'effet Raman

Lorsqu'il y a une interaction entre une molécule et le champ électrique d'un faisceau laser, le nuage électronique de la molécule est déformé provoquant alors un moment dipolaire induit de la forme :

$$\vec{\mu}_{induit} = \alpha \vec{E} \quad (1)$$

Dans l'équation (1) α désigne le tenseur de polarisabilité et \vec{E} le champ électrique du laser. Dans le cas d'un laser le champ peut s'écrire sous la forme :

$$\vec{E} = E_0 \cos(\omega_L t) \quad (2)$$

Donc le moment dipolaire devient :

$$\vec{\mu}_{induit} = \alpha E_0 \cos(\omega_L t) \quad (3)$$

Si on suppose alors que la molécule que l'on étudie vibre à la fréquence ω_{vib} , et que Q traduise le déplacement de la molécule par rapport à sa position d'équilibre (sans excitation), on a alors :

$$Q = Q_0 \cos(\omega_{vib} t) \quad (4)$$

Pour de faibles amplitudes Q de vibration la variation du tenseur de polarisabilité peut s'écrire par un développement en série de Taylor sous la forme :

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q \quad (5)$$

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q_0 \cos(\omega_{vib}t) \quad (6)$$

En remplaçant α (6) dans la définition du moment induit (3), on obtient alors :

$$\vec{\mu}_{induit} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_L t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_L t) \cos(\omega_{vib}t) \quad (7)$$

Or,

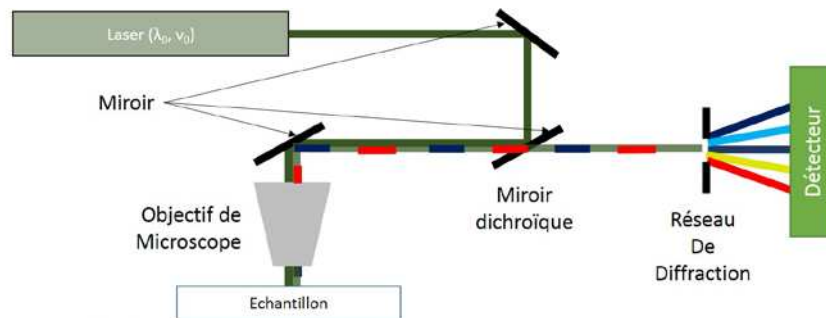
$$\cos(A) * \cos(B) = \frac{1}{2} [\cos(A - B) + \cos(A + B)] \quad (8)$$

En utilisant l'équation (8) dans l'équation (7), on obtient :

$$\vec{\mu}_{induit} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_L t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q_0 \vec{E}_0 [\cos((\omega_L - \omega_{vib})t) + \cos((\omega_L + \omega_{vib})t)] \quad (9)$$

Cette dernière équation montre que le dipôle induit par l'excitation laser est la somme de trois dipôles. Le premier terme correspond à la diffusion Rayleigh (sans perte d'énergie), puis le terme correspondant à un rayonnement de fréquence $(\omega_L - \omega_{vib})$ inférieure à la fréquence initiale du laser est appelé diffusion Raman Stokes. Le dernier terme de fréquence $(\omega_L + \omega_{vib})$ est appelé diffusion anti-Stokes.

La technique Raman permet d'enregistrer une signature vibrationnelle unique pour chaque molécule. Le schéma de principe de cette technique est présenté figure 1.



Diffusion inélastique de la lumière = Raman

Figure 1. Schéma de principe de la spectroscopie Raman

3. Matériels et méthodes

3.1 Préparation des échantillons

Des échantillons de silicium <100> non traités ont été utilisés comme surfaces réfléchissantes de référence. Des échantillons de polystyrène d'épaisseur millimétrique ont été choisis comme matériaux d'analyse pour compléter l'étude spectroscopique avec des échantillons réfléchissants. Ces échantillons proviennent de boîtes de Petri préalablement coupées et soigneusement nettoyées au soxhlet en utilisant de l'éthanol chauffé à 80 °C pendant 3 heures.

3.2. Analyses Raman

Les expériences Raman ont été effectuées, sur deux spectromètres T64000, de chez Jobin-Yvon/Horiba (figure 2), équipé d'un réseau de 600 traits/mm et d'une caméra CCD refroidie à l'azote liquide. Les spectres ont été enregistrés sous microscope (Olympus BX41) avec un objectif 100x focalisant un faisceau laser de 514.5 nm et 647.1 nm provenant dans les deux spectromètres d'un laser Argon-Krypton (Coherent, Innova). Dans la suite du manuscrit, on distinguera les deux lasers par « laser 1 » et par « laser 2 ». Le spot laser a une taille estimée à 0.8 μm et la résolution spectrale est de l'ordre de 2 cm^{-1} . Tous les spectres ont été enregistrés entre 300 cm^{-1} et 3 700 cm^{-1} avec des puissances nominales de 5 mW à 40 mW, contrôlée par le boîtier de commande externe du laser.

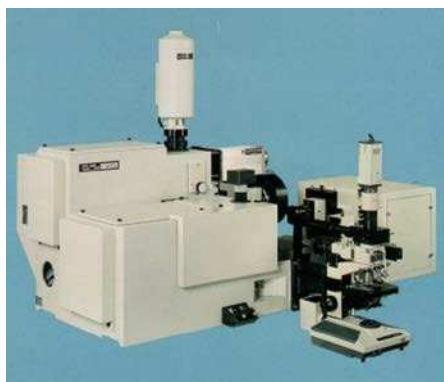


Figure 2. Spectromètres Raman T6400 (Jobin-Yvon/Horiba)

4. Résultats expérimentaux

L'intensité du signal Raman est connue pour dépendre du temps d'analyse et de la puissance du laser qui génère le faisceau incident appliqué sur l'échantillon. Elle

est proportionnelle au nombre de photons reçus, le temps et la puissance étant censés l'être également. Il est donc d'usage de 1) moduler ces deux derniers paramètres pour ne pas saturer le signal enregistré sur la caméra CCD, 2) acquérir des spectres Raman avec le meilleur rapport signal/bruit et 3) appliquer si nécessaire un facteur de proportionnalité pour comparer les spectres réalisés dans des conditions (temps, puissance) différentes.

Dans le cadre de notre étude, nous avons souhaité vérifier que quelles que soient les conditions d'analyse choisies, le rapport des puissances laser était directement proportionnel à l'intensité intégrée de modes de vibrations caractéristiques des matériaux étudiés. Pour cela, deux types d'échantillons ont été étudiés, pour lesquels nous avons gardé constant le temps d'analyse (et modifié les valeurs des puissances laser). La figure 3 présente des spectres Raman enregistrés à 514,5 nm et 647,1 nm (laser 1) à faible puissance (6 mW) et puissance plus élevée (20 mW) sur polystyrène (PS) et silicium (Si). Sur cette figure est présenté également un spectre calculé (en noir) à partir du spectre obtenu à faible puissance multiplié par le rapport des deux puissances.

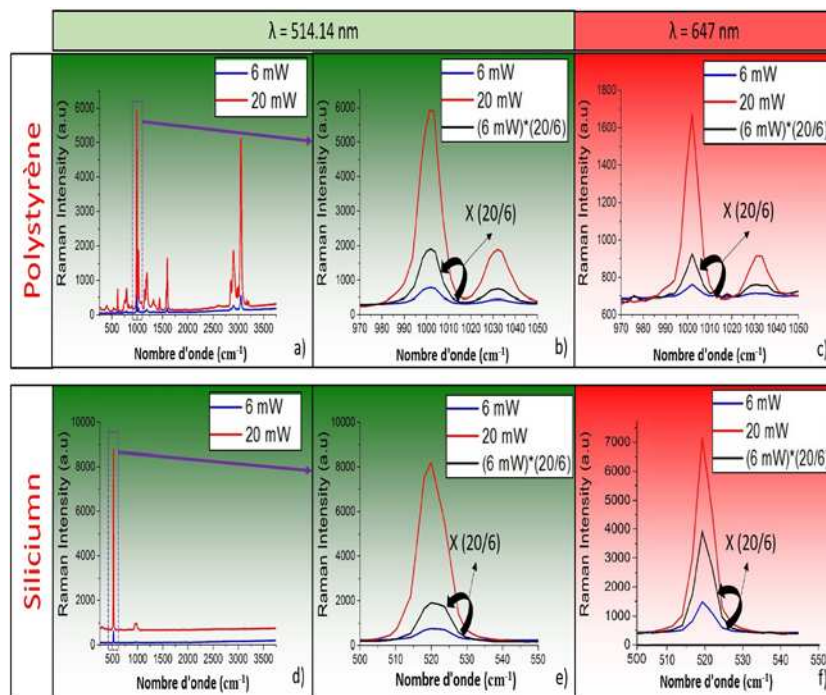


Figure 3. Spectres du polystyrène (a,b) à $\lambda = 514.5$ nm (c), $\lambda = 647.1$ nm et spectre du silicium (d,e) à $\lambda = 514.5$ nm, (f) $\lambda = 647.1$ nm, enregistrés avec différentes puissances laser et le même temps d'exposition. Le spectre en noir représente le produit du spectre à plus basse puissance multiplié par le rapport des deux puissances (laser 1)

On peut observer sur la figure 3 que le spectre calculé (noir) à partir du spectre à basse puissance est différent du spectre enregistré à plus forte puissance (rouge) et l'erreur commise peut alors être supérieure à 50 %. La figure 3 montre que ce résultat est indépendant de la nature du matériau et de la longueur d'onde utilisée ; la valeur du pourcentage d'erreur dépend en revanche des deux paramètres.

Afin de s'assurer qu'aucun composant placé sur le trajet optique ne peut générer de telles erreurs, nous avons effectué des relevés de puissance laser (figure 4) à l'aide d'un puissance-mètre (Fieldmax II, OP2-Vis) sous l'objectif du microscope des deux spectromètres Raman. La figure 4 représente les puissances mesurées en fonction de la puissance (affichée sur le boîtier de contrôle) de sortie de deux lasers. Les points expérimentaux peuvent être résumés par une droite de régression linéaire simple avec un coefficient de détermination $R^2 > 0,999$.

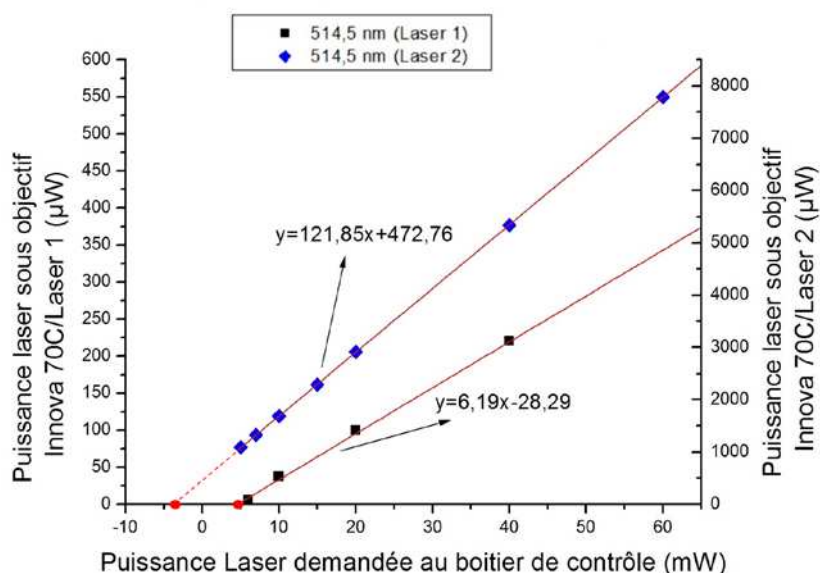


Figure 4. Evolution de la puissance laser sous objectif (μW) en fonction de la puissance laser affichée sur le boîtier de contrôle (mW) de deux lasers Innova 70 (laser 1, laser 2)

Pour réaliser cette expérience, nous avons indiqué une puissance laser sur le boîtier de contrôle et placé un puissance-mètre sous l'objectif pour mesurer l'intensité qui arrivait sur l'échantillon. La puissance nominale du boîtier a été augmentée progressivement entre 5 et 60 mW. Les « laser 1 » et « laser 2 » sont les deux lasers Innova 70 C qui équipent chacun un spectromètre Raman. On peut remarquer que les puissances reçues par l'échantillon (sous objectif) sont différentes d'un spectromètre à l'autre car l'un des spectromètres contient un banc de prisme

supplémentaire pour limiter la présence de raies plasmas dans le faisceau incident. Indépendamment de cette première observation, on peut remarquer que la puissance mesurée sous objectif varie linéairement avec la puissance délivrée par le laser et qu'aucun élément optique n'entraîne une variation non linéaire de l'intensité en fonction de la puissance laser utilisée. Sur la figure 4, on peut observer que les deux courbes ne passent pas par l'origine et coupent l'axe des abscisses à 5 mW pour le laser 1 et -4,8 mW pour le laser 2. Cette puissance négative n'a bien évidemment aucun sens physique et montre très clairement que la valeur à l'origine varie d'un laser à un autre en fonction de l'étalonnage de la diode en nez de laser. Ces résultats, qui sont indépendants de la longueur d'onde incidente, montrent donc que l'intensité Raman n'est pas proportionnelle à la puissance nominale affichée sur le boîtier et au temps d'irradiation, mais qu'un autre paramètre est à prendre en compte.

Ces premiers résultats ont été confirmés par des analyses Raman effectuées sur les échantillons de silicium en fonction du temps d'irradiation et de la puissance laser nominale (figure 5) affichée sur chacun des boîtiers des lasers 1 et 2. La figure 5a) montre la variation de l'intensité intégrée du pic à 520 cm^{-1} en fonction du temps d'exposition (pour des puissances laser constantes entre 5 mW et 20 mW). Les courbes représentant l'évolution des intensités intégrées (pour les deux lasers) passent toutes par l'origine, ce qui montre ainsi la proportionnalité entre l'intensité Raman et le temps d'exposition.

Sur la figure 5b), on a représenté l'évolution de l'intensité intégrée du pic à 520 cm^{-1} en fonction de la puissance affichée sur le boîtier des lasers 1 et laser 2 avec des temps d'exposition constants entre 5 s et 15 s. L'évolution des intensités Raman avec l'utilisation du laser 1 coupent toutes l'axe des abscisses à une valeur de 5 mW conformément à ce qui avait été montré sur la figure 4. Les résultats obtenus avec le laser 2, montrent une évolution linéaire des intensités mesurées avec des courbes qui coupent l'axe des abscisses à -4.8 mW.

Compte tenu de ces résultats, l'intensité Raman I , ne peut pas s'exprimer par l'équation suivante (10) car les courbes ne passent pas par l'origine.

$$I = b \times P \times t \quad (10)$$

Dans cette équation, P représente la puissance nominale affichée sur le boîtier de commande, t représente le temps d'exposition et b une constante liée au matériau et à la longueur d'onde de travail.

Pour rendre compte des résultats des figures 4 et 5, nous pouvons utiliser l'équation (11) qui prend en compte le décalage à l'origine de la puissance d'émission P_0 (valeur qui varie en fonction des lasers) et qui conserve la proportionnalité des intensités Raman en fonction du temps d'exposition.

$$I = b \times (P - P_0) \times t \quad (11)$$

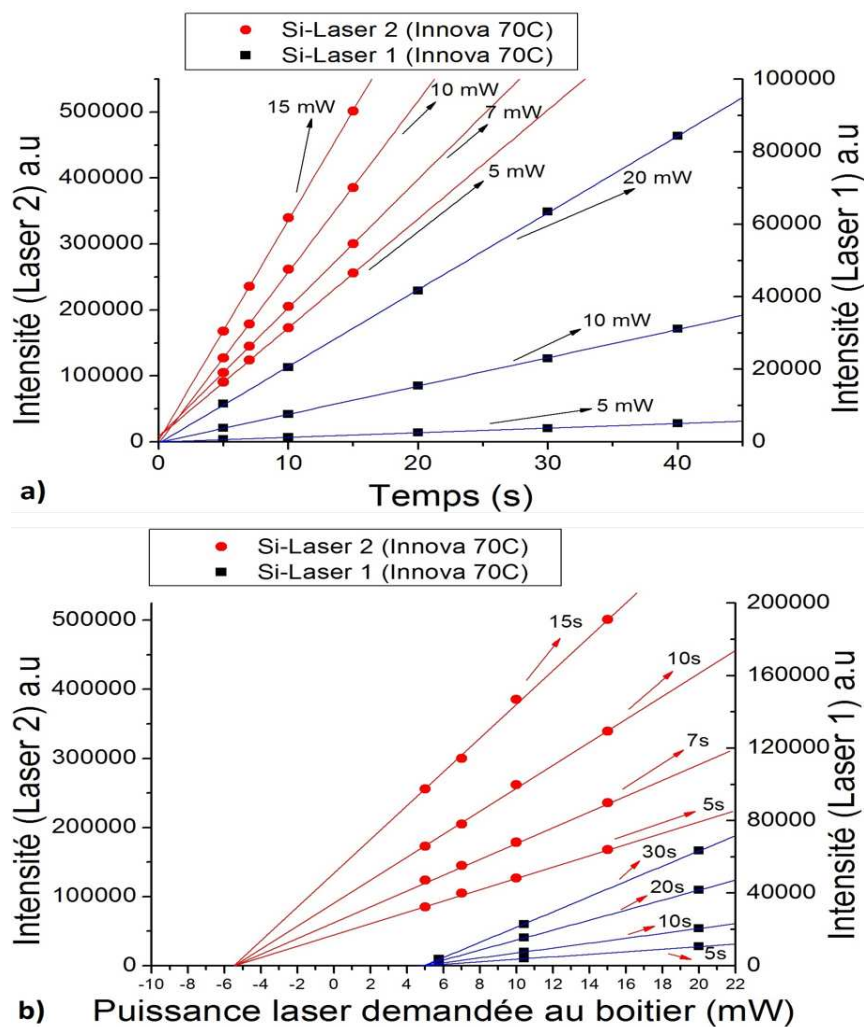


Figure 5. Evolution de l'intensité Raman intégrée du pic à 520 cm^{-1} en fonction
 a) de la puissance laser affichée sur le boîtier de commande, b) du temps
 d'exposition pour les deux lasers Innova 70C

Nos analyses effectuées sur les échantillons de silicium, et vérifiées sur les échantillons de polystyrène, mettent en évidence que pour pouvoir effectuer des analyses quantitatives et comparatives sur des matériaux avec des puissances laser et des temps d'exposition différents, il faut au préalable déterminer expérimentalement (suivant la méthode proposée sur la figure 4) la puissance de décalage des lasers à l'origine. En tenant compte de ce paramètre qui est variable d'un laser à l'autre, il est alors possible de recalculer l'intensité à haute puissance à partir d'un spectre de

basse puissance (figure 6) ; l'erreur sur les intensités est alors estimée à moins de 2 %, en moyennant les écarts relatifs des intensités calculées par rapport aux intensités expérimentales.

Une imprécision de réglage liée à l'étalonnage de la courbe courant-tension de la diode en sortie de laser est très probablement à l'origine de ce problème. Alors que ce paramètre est particulièrement important à faible puissance il devient négligeable pour des puissances plus élevées lorsque les échantillons ne nécessitent pas de précautions particulières.

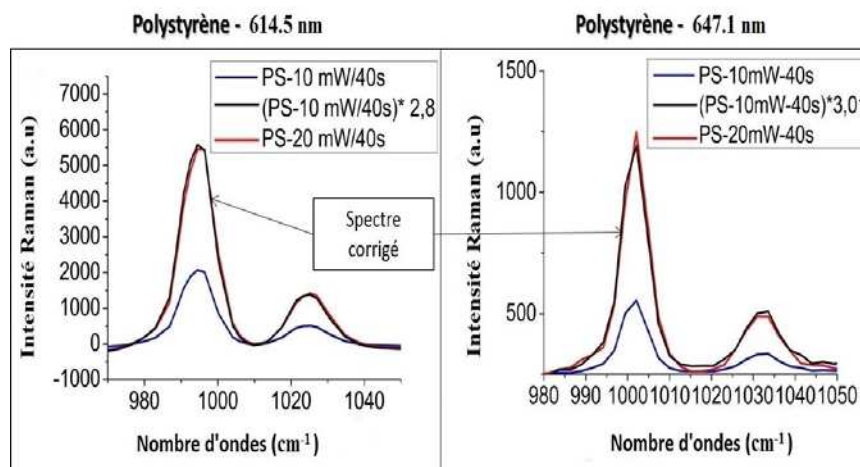


Figure 6. Spectres Raman du polystyrène enregistrées à 514.5 nm et 647.1 nm avec des puissances laser de 10 et 20 mW. Les temps d'exposition sont fixés à 40 s. Le spectre en noir est calculé à partir de l'équation (11) en prenant en compte le produit du spectre à plus basse puissance par le rapport des deux puissances à comparer

On voit clairement sur la figure 6 que l'équation (11) permet de comparer 2 spectres Raman enregistrés dans des conditions différentes. On peut également visualiser ces résultats en construisant un graphique en trois dimensions dans lequel on représente l'ensemble des intensités intégrées en fonction de la puissance et du temps (plan vert). Sur la figure 7, nous avons représenté en rouge les prédictions d'intensité Raman selon les équations (10) et (11).

La figure 7 montre très clairement que la modélisation de l'équation (11) (*i.e* quadrillage rouge) sur les points expérimentaux (*i.e* dégradés surface verte) est parfaite ($R^2 > 0,999$) alors qu'elle n'est que partielle sur la partie a) qui ne prend pas en compte la puissance de décalage du laser.

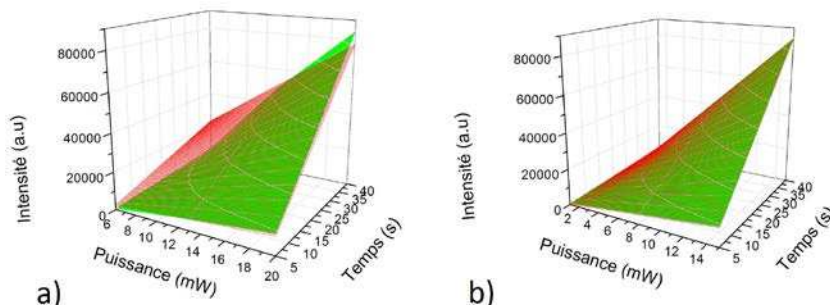


Figure 7. En vert est représenté l'ensemble des valeurs expérimentales obtenues en intégrant le pic Raman du silicium à 520 cm^{-1} (sous irradiation 514.5 nm), modélisées en rouge par a) l'équation (10) et b) l'équation (11)

5. Conclusion

En conclusion, ce travail a permis de montrer que pour analyser quantitativement des spectres Raman enregistrés à des temps et/ou puissances différents, une courbe d'étalonnage précise doit être déterminée pour prendre en compte la valeur seuil d'émission du laser. En effet, le fait de ne pas prendre en compte la valeur du décalage d'émission du laser P_0 peut induire une très forte erreur dans l'analyse des données lorsque l'on travaille sur de faibles puissances laser. Notre étude montre aussi clairement qu'il ne faut pas se fier à la valeur de puissance affichée sur le boîtier car elle n'est 1) qu'indicative et 2) en mode « light », elle ne sert que de régulation de puissance constante sur l'échantillon. Pour déterminer la valeur du décalage P_0 , il faut impérativement construire une courbe d'étalonnage en mesurant la puissance délivrée sous l'objectif en fonction de la puissance affichée sur le boîtier de commande selon la procédure expliquée dans ce travail. Une fois cette valeur déterminée, nous pouvons alors utiliser l'équation (11) pour comparer quantitativement et avec une grande précision des données spectroscopiques Raman avec des temps d'analyse et des puissances laser différentes. Pour ce faire nous proposons une méthode simple pour déterminer cette valeur. En effet, dans le cadre des analyses décrites dans ce travail, une courbe d'étalonnage suffit car P_0 ne varie jamais de plus d'1 mW d'une journée à une autre. Une puissance-mètre est nécessaire pour tracer la courbe de puissance sous objectif en fonction de la puissance en sortie laser. Cette courbe expérimentale permet de déterminer facilement, en modélisant les points expérimentaux par une droite, la valeur seuil d'émission du laser. La précision obtenue par cette méthode sera suffisante pour les analyses Raman mais pour d'autres analyses optiques des modélisations tridimensionnelles pourraient être nécessaires.

Bibliographie

- Baptiste A., Bulou A., Bardeau J.F., Nouet J., Gibaud A., Wen K., Hoepfener S., Maoz R., Sagiv J. (2004). Substrate-Induced Modulation of the Raman Scattering Signals from Self-Assembled Organic Nanometric Films », *Langmuir*, vol. 20, p. 6232-6237.
- Barhoumi A., Zhang D., Tam F., Halas N.J. (2008). « Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA », *J Am Chem Soc.*, vol. 130, p.5523-5529.
- Bocklitz T.W., Dörfer T., Heinke R., Schmitt M., Popp J., (2015) Spectrometer calibration protocol for Raman spectra recorded with different excitation wavelengths », *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 149, p. 544-549.
- El Mendili Y., Bardeau J.F., Randrianantoandro N., Gourbil A, Greneche J.M., Mercier A-M., Grasset F. (2011). New evidences of in situ laser irradiation effects on γ -Fe₂O₃ nanoparticles: a Raman spectroscopic study » *J Raman Spectrosc.*, vol. 42, p. 239-242.
- El Mendili Y., Bardeau J.-F., Randrianantoandro N., Grasset F., Greneche J.-M. (2012). Insights into the mechanism related to the phase Transition from γ -Fe₂O₃ to α -Fe₂O₃ nanoparticles induced by thermal treatment and laser irradiation. *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, p. 23785-23792.
- Fernandes L., Guney S., Gutierrez-Galvès A., Marco S. (2016). Calibration transfer in temperature modulated gas sensor arrays. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 231, p. 276-284.
- Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J. (1974). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.*, vol. 26, p. 163-166.
- Geng Z., Yang F., Chen X., Wu N. (2015). Gaussian process based modeling and experimental design for sensor calibration in drifting environments. *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 216, p. 321-331.
- Guerrini L., Garcia-Ramos J.V., Domingo C., Sanchez-Cortes S. (2009). Nanosensors Based on Viologen Functionalized Silver Nanoparticles: Few Molecules Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Interparticle Hot Spots. *Anal. Chem.*, vol. 81, p. 1418-1425.
- Hedegaard C. (2006). Molluscan shell pigments: an in situ resonance Raman study. *J. Molluscan Stud*, vol. 72, p.157-162.
- Hübert T., Tiebe C., Detjens M., Majewski J. (2016). On-site calibration system for trace humidity sensors. *Measurement*, vol. 91, p. 251-257.
- Idone A., Gulmini M., Henry A-I., Cadadio F., Chang L., Appolonia L., Van Duyne R.P., Shah N.C. (2013). Silver pastes for dye analysis of reference and historical textile fibers using direct, extractionless, non-hydrolysis surface-enhanced Raman spectroscopy. *The Analyst*, vol. 138, p.5895-5904.
- Jeanmaire D.L. et Van Duyne R.P. (1977). « Surface raman spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 84, p. 1-20.
- Jess P.R.T., Smith D.D.W., Mazilu M., Dholakia K., Riches A.C., Herrington C.S. (2007). Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *Int J Cancer*, vol. 121, p. 2723-2728.

- Kim B.S., Lee C.C.I, Christensen J.E., Huser T.R., Chan J.W., Tarantal A.F. (2008). Growth, differentiation, and biochemical signatures of rhesus monkey mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, vol. 17, p. 185-198.
- Kneipp K., Wang Y, Kneipp H., Perelman L.T., Itzkan I., Dasari R.R., Feld M.S. (1997). « Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.*, vol. 78, p. 1667-1670.
- Li J.F., Huang Y.F., Ding Y., Yang Z.L., Li S.B., Zhou X.S., Fan F.R., Zhang W., Zhou Z.Y., Wu D.Y., Ren B., Wang Z.L., Tian Z.Q. (2010). Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nature*, vol. 464, p. 392-395.
- Lorincz A., Haddad D., Naik R., Naik V., Fung A., Cao A., Manda P., Pandya A., Auner G., Rabah R., Langerburg S.E., Klein M.D. (2004). Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: a pilot study. *J Pediatr Surg.*, vol. 39, p. 953-956.
- Nerrin C., Alfaro P., Aznar M., Domeno C. (2013). The challenge of identifying non-intentionally added substances from food packaging materials: A review. *Anal. Chim. Acta*, vol. 775, p. 14-24.
- Nie S. (1997). Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science*, vol. 275, p. 1102-1106.
- Raman CV. (1928). A new radiation. *Indian J Phys* 2, p. 387-398.
- Scawlow A.L., Townes C.H. (1958). Infrared and optical masers. *Phys. Rev.* vol. 112, p. 1940-1949.
- Staymates J.L., Grandner J., Gillen G. (2011). Fabrication of adhesive coated swabs for improved swipe-based particle collection efficiency. *Anal. Methods* 3, p. 2056-2061
- Strege M.A. (2009). Total Residue Analysis of Swabs by Ion Mobility. *Anal. Chem*, vol. 81, p. 4576-4580.
- Taleb A., Diamond J., McGarvey J.J., Beattie J.R., Toland C., Hamilton P.W. (2006). Raman Microscopy for the Chemometric Analysis of Tumor Cells. *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, p. 19625-19631.
- Vignaud G., Bardeau J.F., Gibaud A., Grohens Y. (2005). Multiple Glass-Transition Temperatures in Thin Supported Films of Isotactic PMMA as Revealed by Enhanced Raman Scattering. *Langmuir*, vol. 21, p. 8601-8604.
- Wei F., Zhang D., Halas N.J., Hartgerink J.D. (2008). Aromatic Amino Acids Providing Characteristic Motifs in the Raman and SERS Spectroscopy of Peptides. *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, p. 9158-9164.