UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

OPTIMISATION ET VALIDATION DE LA SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY POUR LA DÉTECTION DES TRACES CHIMIQUES SUR LE TERRAIN

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR

SAMUEL DAVIAU

DÉCEMBRE 2022

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je prends l'opportunité accordé ici pour remercier les personnes qui m'ont accompagné et soutenu tout au long du processus qu'est la réalisation d'une maitrise en chimie.

Premièrement, je tiens à remercier tous les membres de ma famille : ma mère (Pascale), mon père (Michel) et mes frères (Benjamin, William et Zachary) qui ont toujours été là pour moi malgré la distance qui nous sépare. Vous m'avez permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui, mes réalisations sont vos réalisations, la réussite de ce projet est, entre-autres, grâce à vous et à vos sacrifices que vous avez fait tout au long de mon parcours scolaire.

Nécessairement, je remercie également mon directeur de recherche, Cyril Muehlethaler, sans qui, je n'aurais pas eu l'opportunité de m'enrichir intellectuellement et de découvrir en profondeur le monde de la recherche scientifique dans tout sa subtilité. Non seulement, tu as su satisfaire ma curiosité scientifique innée en tant que professeur de criminalistique au cours de mon parcours au baccalauréat, mais tu m'as aussi guidé dans la résolution de problème perpétuelle, qui est, selon moi, la définition même de la recherche scientifique.

J'en profite également pour remercier tous les membres du Département de chimie, biochimie et physique, dont les techniciens de laboratoire : Amy, Francis, JP, Jocelyn et Vickie. Vous êtes des modèles de ce que représente un technicien de laboratoire dans un cadre académique et de ce qui est possible d'accomplir en tant que personnel de soutien pour l'enseignement. J'anticipe déjà le futur où nous pourrons unir nos forces et fournir aux étudiants un milieu de vie et d'apprentissage unique.

Pour finir, je tiens à souligner le soutien de Camille qui, j'en suis sûr, ne tiens pas particulièrement à être mise de l'avant ni remerciée. Je sais que je n'ai pas toujours été à ton écoute, mais je tiens à te dire que je t'aime. Je n'aurais pas accompli mes réalisations sans toi qui as toujours été là pour me soutenir, me motiver et m'accompagner dans mes moments de faiblesse. Je me considère privilégié de t'avoir à mes côtés.

DÉDICACE

« Under Bayes' theorem, no theory is perfect. Rather, it is a work in progress, always subject to further refinement and testing. »

- Nate Silver

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ii

DÉDICACE iii

LISTE DES FIGURES vi

LISTE DES TABLEAUX x

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES xii

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS xiii

RÉSUMÉ xiv

ABSTRACT xv

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 Spectroscopie Raman 5

1.1 Historique et applications 5

1.2 Principe 6

1.2.1 Règles de sélection en Raman 10

CHAPITRE 2 « Surface-Enhanced Raman Spectroscopy » (SERS) 13

2.1 Historique de la SERS 13

2.2 Principe 15

2.2.1 Amplification électromagnétique (EM) 16

2.2.2 Amplification chimique (CE) 20

2.2.3 Propriétés optiques des métaux 23

2.3 Substrats SERS 28

2.3.1 Fabrication des substrats SERS 30

CHAPITRE 3 Méthodologie 36

3.1 Optimisation de la synthèse d'AgNPs 36

3.1.1 Réactifs 36

3.1.2 Synthèse des nanoparticules d'argent 36

3.1.3 Caractérisation par spectrophotométrie UV-VIS 37

3.1.4 Caractérisation par microscopie électronique à transmission (TEM) 37

3.1.5 Traitement de données UV-vis et TEM 37

3.2 Validation de la méthode SERS 38

3.2.1 Réactifs 38

3.2.2 Activation des AgNPs 38
3.2.3 Prise de mesures Raman et SERS 39
3.2.3.1 Spectromètre CORA 5500™ 39
3.2.3.2 Spectromètre DXR³ ™ 39
3.2.4 Évaluation de la précision au niveau de la répétabilité 40
3.2.5 Évaluation de la précision au niveau de la reproductibilité 40
3.2.6 Estimation de la limite de détection du fentanyl et du TNT 41
3.2.7 Estimation du facteur d'amplification (EF) 41
3.2.8 Traitement de données des spectres Raman et SERS 42

CHAPITRE 4 Résultats et discussion 43

4.1 Optimisation de la synthèse d'AgNPs 43

4.2 Validation de la méthode SERS 50

4.2.1 Évaluation de la précision au niveau de la répétabilité 51
4.2.2 Évaluation de la précision au niveau de la reproductibilité 61
4.2.2.1 4-ATP 61
4.2.2.2 Fentanyl 64
4.2.2.3 TNT 72
4.2.3 Estimation de la limite de détection 79
4.2.3.1 Fentanyl 80
4.2.3.2 TNT 82
4.2.4 Estimation du facteur d'amplification (EF) 84

4.3 Discussion générale 86

CHAPITRE 5 CONCLUSION 90

BIBLIOGRAPHIE 93

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Représentation schématique de la fluorescence (gauche) et de la diffusion Raman (droite). La diffusion Raman implique 4 alternatives aux molécules excitées par le laser (υ_i): a) Diffusion par résonance (si υ_i coïncide avec un niveau vibrationnel de la couche électronique (S_1) de la molécule excitée, b) Diffusion anti-Stokes ($\upsilon_i<\upsilon_{as}$ perte d'énergie dans le cas d'une molécule d'énergie vibrationnelle préalablement excitée (ν_1), c) Diffusion de Rayleigh (le cas le plus fréquent lorsque $\upsilon_i=\upsilon_R$ où il n'y a aucun gain ni perte d'énergie), d) Diffusion de Stokes ($\upsilon_i>\upsilon_S$ gain d'énergie caractéristique des vibrations permises par la molécule)..... 8

Figure 2.1 M_{loc} et M_{Rad} d'une molécule (A), placée à une distance de 1 nm de la surface de la sphère dans l'air, en fonction de la longueur d'onde. L'amplification est présentée pour une sphère de verre (a et d), une sphère d'argent (b et e) et un dimère de sphère d'argent. M_{Rad} est dépendant de l'orientation du dipôle (// parallèle à la surface et $\perp$ perpendiculaire à la surface). Reproduit avec permission de (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). 18

Figure 2.2 Représentation du phénomène de transfert de charge pour un complexe [molécule-métal] impliqué dans le mécanisme d'amplification chimique CE : **a)** Transfert d'électron entre la couche HOMO et LUMO via un couplage indirect avec le niveau de Fermi du métal, **b)** Énergie incidente provenant du laser est en résonance avec la transition électronique du complexe [molécule-métal]. Reproduit avec permission de (Chu *et al.*, 2017). 21

Figure 2.3 Diagramme des résonances observées dans le système de Cystal Violet- Nanoparticules d'argent : Résonance plasmonique de surface (SPR) en **rouge**, résonance moléculaire (S_0-S_1(π-π*)) en **bleu**, et transfert de charge en **noir**. Noter le chevauchement entre les trois contributions vers une longueur d'onde de 575 nm. Reproduite avec permission de (Lombardi et Birke, 2009). 23

Figure 2.4 Présentation de la coupe de Lycurgue composée de nanoparticules d'argent et d'or dans la matrice de verre. Le dichroïsme provient de (a) la diffusion des nanoparticules d'argent lorsqu'éclairé de l'extérieur (vert) et de (b) l'absorption des nanoparticules d'or lorsque la lumière la traverse (rouge) (Loos, 2015). 24

Figure 2.5 Représentation de la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR) à la surface des nanoparticules d'argent (AgNPs). Inspiré de figure 7 (Pilot, R. *et al.*, 2019). 28

Figure 2.6 Propriétés des métaux communément utilisés en SERS : Ag **(noir)**, Cu **(rouge)**, Au **(jaune)** et Al **(bleu)**. Composante réelle Re [$\varepsilon(\omega)$] **(a)** et composante imaginaire Im [$\varepsilon(\omega)$] de la constante diélectrique **(b)** en fonction de la longueur d'onde. Le facteur de qualité (Q_{LSPR}), dépendamment de la longueur d'onde **(c)**, permet de discriminer les zones d'intérêt de chacun des métaux, $Q_{LSPR} > 5$ **(d)**. Reproduit avec permission de (Pilot, Roberto *et al.*, 2018). 29

Figure 2.7 Schéma de différents types de fonctionnalisation des nanoparticules d'argent (AgNPs) : a) AgNPs + ligand anticorps pour la détection d'antigène spécifique, b) AgNPs cationique (+) d'affinité électrostatique pour les **molécules anioniques**, c) AgNPs stabilisés avec des anions citrate **(-)** d'affinité électrostatique pour les **molécules cationiques**, d) AgNps + ligand apolaire C_xH_y d'affinité pour les **molécules hydrophobes**. 31

Figure 2.8 Facteur d'amplification électromagnétique (EM) pour six configurations d'AgNPs différentes : a) AgNPs de forme sphérique et b) AgNPs de forme polygonale. La longueur d'onde incidente est de 514,5 nm avec une polarisation verticale et les AgNPs ont toutes un diamètre maximal de 90 nm. Noter l'échelle logarithmique de couleur chaude (EM élevé) vers une couleur froide (EM faible) couvrant l'intervalle : [10^0-10^8]. La première rangée représente une nanoparticule isolée. Le dimère de la troisième rangée est séparé d'une distance de 1 nm alors que celle du milieu est de 5,5 nm. Reproduite avec permission de (Xu *et al.*, 2000). 32

Figure 3.1 Structure chimique des analytes utilisés dans le cadre ce projet : **a)** le trinitrotoluène (TNT), **b)** le fentanyl et **c)** le 4-aminothiophénol (4-ATP). 38

Figure 4.1 Spectres UV-visible des solutions d'AgNPs synthétisées. Les spectres sont tous sur une échelle commune et n'ont pas été normalisés. 43

Figure 4.2 Représentation graphique du design expérimental avec deux facteurs : temps de chauffage (s) et niveau de puissance et cinq niveaux (2^5). Trois facteurs de réponse ont été évalués : A) l'absorbance, B) la position du maxima (nm) et C) la largeur de la bande à mi-hauteur (FWHM) (nm). Les conditions jugées pertinentes pour l'optimisation de la synthèse se distinguent par le trait oblique (\) (coin supérieur droit). La décision finale des conditions optimales correspond aux coordonnées du résultat encadré en rouge (Temps de chauffage de 120 s et niveau de puissance de 9). 45

Figure 4.3 Résultats du design expérimental pour **A)** la position du maxima, **B)** la largeur de la bande à mi-hauteur (FWHM), **C)** l'absorbance et **D)** la perte de volume. Reproduit avec permission à partir de (Lux *et al.*, 2019) 47

Figure 4.4 Illustration des AgNPs synthétisés aux conditions optimales sélectionnées (120 s et P9) par TEM (Grossissement de 217000x à un voltage de 110 kV) accompagnée de l'histogramme de la distribution du diamètre 49

Figure 4.5 Transformation du DMAB (**a)** et **c)**) à partir du 4-ATP (**b)** et **d)**), adsorbé sur une électrode d'argent, lors d'une mesure SERS. Reproduit avec permission à partir de (Huang *et al.*, 2010). 52

Figure 4.6 Spectre Raman brut du 4-ATP. La structure moléculaire du 4-ATP accompagne également le spectre à titre informatif. La bande identifiée * n'est pas assignée au spectre du 4-ATP, mais plutôt à la contribution du DMAB. 53

Figure 4.7 Spectre SERS brut du 4-ATP. Les bandes observées sont expliquées par la transformation chimique du 4-ATP via un couplage oxydatif en DMAB. La structure moléculaire du DMAB accompagne également le spectre à titre informatif. 54

Figure 4.8 Dynamique de l'évolution de l'intensité des bandes du spectre du 4-ATP pour chacun des réplicas (a), b), c)) avec comparaison du spectre Raman et SERS du 4-ATP (d)) 56

Figure 4.9 Dynamique de l'évolution du spectre Raman vers le spectre SERS du 4-ATP dans le cadre de l'évaluation de la répétabilité 58

Figure 4.10 Dynamique de l'évolution du spectre Raman traité par un lissage asymétrique des moindres carrés vers le spectre SERS du 4-ATP dans le cadre de l'évaluation de la répétabilité 59

Figure 4.11 Illustration de l'amélioration de la précision du spectre SERS brut du 4-ATP (a) avec le prétraitement SNV (b). La moyenne des spectres est représentée par le trait plein alors que la région ombragée alentour du spectre correspond à la déviation standard. 60

Figure 4.12 Spectre SERS moyen des 15 spectres mesurés du 4-ATP dans le cadre de l'étude de la reproductibilité 62

Figure 4.13 Comparaison du spectre SERS (**rouge**) avec le spectre Raman (**noir**) du fentanyl. Les nouvelles bandes issues de la SERS sont marquées avec *. La mise à l'échelle des spectres a été réalisée en normalisant l'intensité de la bande marquée (t). Reproduit avec permission de (Leonard *et al.*, 2017). 65

Figure 4.14 Comparaison du spectre SERS (**noir**) et Raman (**rouge**) mesuré dans les mêmes conditions (hormis la présence d'AgNPs et de KNO_3) du fentanyl. Le spectre Raman des AgNPs (**vert**) est également illustré pour présenter la contribution potentielle du substrat métallique au spectre SERS. Une comparaison des spectres normalisés est jointe pour faciliter l'illustration du spectre Raman. 66

Figure 4.15 Spectre SERS moyen des 15 spectres mesurés du fentanyl dans le cadre de l'étude de la reproductibilité au spectromètre CORA 5500^{TM}. La bande associée à la contribution du KNO_3 est marquée pour éviter une mauvaise interprétation lors de l'assignation..... 68

Figure 4.16 Comparaison des spectres moyens SERS mesurés **a)** au spectromètre CORA 5500^{TM} et **b)** au spectromètre DXR$^{3\ TM}$ du fentanyl. 70

Figure 4.17 Spectre SERS du a) TNT, b) 2,4-DNT et c) 1,3-DNB. La bande associée à l'élongation symétrique du groupement nitro (R-NO2), caractéristique des composés nitroaromatique, est identifiée. Reproduit avec permission de (Sylvia *et al.*, 2000) 73

Figure 4.18 Comparaison du spectre SERS (**noir**) et Raman (**rouge**) mesuré dans les mêmes conditions (hormis la présence d'AgNPs et de KNO_3) du TNT. Le spectre Raman des AgNPs (**vert**) est également illustré pour présenter la contribution potentielle du substrat métallique au spectre SERS. Une comparaison des spectres normalisés est jointe pour faciliter l'illustration du spectre Raman. 74

Figure 4.19 Spectre SERS moyen des 15 spectres mesurés du TNT dans le cadre de l'étude de la reproductibilité au spectromètre CORA 5500^{TM}. 76

Figure 4.20 Comparaison des spectres moyens SERS mesurés a) au spectromètre CORA 5500^{TM} et b) au spectromètre DXR$^{3\ TM}$ du TNT. 77

Figure 4.21 Spectre SERS prétraité par SNV des solutions du fentanyl à différentes concentrations (100, 50, 25 et 10) ppm avec un diagramme à boite de l'intensité de la bande à 1000 cm^{-1} corrigé par lissage asymétrique des moindres carrés. Le spectre des AgNPs est également ajouté permettant de distinguer les spectres SERS de celui du substrat métallique. 80

Figure 4.22 Spectre SERS brut des solutions du fentanyl à différentes concentrations (100, 50, 25 et 10) ppm avec un diagramme à boite de l'intensité de la bande à 1000 cm^{-1} corrigé par lissage asymétrique des moindres carrés. Le spectre des AgNPs est également ajouté permettant de distinguer les spectres SERS de celui du substrat métallique. 81

Figure 4.23 Spectre SERS prétraité par SNV des solutions du TNT à différentes concentrations (1000, 100, 10 et 1) ppm avec un diagramme à boite de l'intensité de la bande à 800 cm^{-1} corrigé par lissage asymétrique des moindres carrés. Le spectre des AgNPs est également ajouté permettant de distinguer les signaux des spectres SERS de ceux du substrat métallique. 82

Figure 4.24 Spectre SERS brut des solutions du TNT à différentes concentrations (1000, 100, 10 et 1) ppm avec un diagramme à boite de l'intensité de la bande à 800 cm^{-1} corrigé par lissage asymétrique des moindres carrés. Le spectre des AgNPs est également ajouté permettant de distinguer les spectres SERS de celui du substrat métallique 83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Fréquence de plasma (ω_p) et début de la fréquence de transition interbande (ω_{inter}) de principaux métaux utilisés en SERS (West *et al.*, 2010). 27

Tableau 4.1 Sommaire des données simulées pour la position du maxima (λ_{max}) et le coefficient d'extinction molaire (ε) des AgNPs de différentes tailles. Reproduit avec permission à partir de (Paramelle *et al.*, 2014) 49

Tableau 4.2 Assignation des bandes principales observées dans le spectre Raman et SERS du 4-ATP. Les bandes sélectionnées du spectre Raman et SERS pour l'étude de la répétabilité sont représentées en **gras.** L'assignation des bandes a été effectuée par comparaison avec celle effectuée par Huang et ses collaborateurs (2012) 55

Tableau 4.3 Comparaison des valeurs de %RSD des bandes principales sélectionnées du 4-ATP entre le spectre SERS brut et SNV du 4-ATP 60

Tableau 4.4 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du 4-ATP. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. 63

Tableau 4.5 Assignation et comparaison des bandes principales du fentanyl sélectionnées du spectre SERS mesuré avec celles du spectre de référence de Leonard (2017). La bande caractéristique du fentanyl considérée comme davantage pertinente à son identification est accentuée en **gras**. 68

Tableau 4.6 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du spectre SERS du fentanyl mesuré au spectromètre CORA 5500™. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. La bande caractéristique du fentanyl considérée comme davantage pertinente à son identification est accentuée en **gras**..... 69

Tableau 4.7 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du spectre SERS du fentanyl mesuré au spectromètre DXR^3 ™. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. La bande caractéristique du fentanyl considérée comme davantage pertinente à son identification est accentuée en **gras**..... 71

Tableau 4.8 Assignation et comparaison des bandes principales du TNT sélectionnées dans le spectre SERS mesuré avec celles du spectre de référence de Sylvia (2000). Les deux bandes caractéristiques du TNT considérées comme davantage pertinentes à son identification sont accentuées en **gras**. 75

Tableau 4.9 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du spectre SERS mesuré au spectromètre CORA 5500™ du TNT. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. Les deux bandes caractéristiques du TNT considérées comme davantage pertinentes à son identification sont accentuées en **gras**. 77

Tableau 4.10 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du spectre SERS mesuré au spectromètre DXR^{3} ™ du TNT. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. Les deux bandes caractéristiques du TNT considérées comme davantage pertinentes à son identification sont accentuées en **gras**. 78

Tableau 4.11 Estimation du facteur d'amplification pour chacun des analytes employés dans le cadre de ce projet. Les valeurs d'I_{SERS} et I_{Raman} correspondent à celles de la bande principale respective à chaque analyte. Les valeurs de c_{SERS} et c_{Raman} correspondent à la concentration de chacun des analytes lors de l'acquisition des spectres. 85

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

%RSD	*Déviation standard relative / Relative standard deviation*
4-ATP	*4-aminothiophénol / 4-aminothiophenol*
Abs	*Absorbance*
AgNPs	*Nanoparticules d'argent / Silver nanoparticles*
AuNPs	*Nanoparticules d'or / Gold nanoparticles*
c.-à-d.	*c'-est-à-dire*
CCD	*Dispositif à couplage de charge / Charge-coupled device*
CE	*Amplification chimique / Chemical amplification*
c_{Raman}	*Concentration en Raman / Raman concentration*
c_{SERS}	*Concentration en SERS / SERS concentration*
DMAB	*4,4'-dimercaptoazobenzène / 4,4'-dimercaptoazobenzene*
EF	*Facteur d'amplification / Enhancement factor*
EF_{CE}	*Facteur d'amplification chimique / chemical factor amplification*
EM	*Amplification électromagnétique / Electromagnetic amplification*
FWHM	*Largeur à mi-hauteur / Full width at half maxima*
IR	*Infrarouge / Infrared*
I_{Raman}	*Intensité du signal en Raman / Raman signal intensity*
I_{SERS}	*Intensité du signal en SERS / SERS signal intensity*
KNO_3	*Nitrate de potassium / Potassium nitrate*
LSPP	*Polaritons-plasmon de surface localisée / localized surface plasmon polaritons*
LSPR	*Résonance plasmonique de surface localisée / Localized surface plasmon resonance*
NA	*Ouverture numérique / Numerical apperture*
p. ex.	*par exemple*
PSPP	*Polaritons-plasmon de surface de propagation / Propagating surface plasmon polaritons*
PTFE	*Polytétrafluoroéthylène / Polytetrafluoroethylene*
rad	*Dose de radiation absorbée / Radiation absorbed dose*
S/N	*Ratio signal sur bruit de fond / Signal-to-noise ratio*
SERS	*Spectroscopie Raman exaltée de surface / Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*
SNV	*Standard normal variate*
SPP	*Polaritons-plasmon de surface / Surface plasmon-polaritons*
SPR	*Résonance plasmonique de surface / Surface plasmon resonance*
Tab	*Tableau / Table*
TEM	*Microscopie électronique à transmission / Transmission electronic microscopy*
TNT	*Trinitrotoluène / Trinitrotoluene*
UV	*Ultraviolet*

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

% (p/v)	*Pourcentage massique / Mass percentage [Unité de concentration]*
% (v/v)	*Pourcentage volumique / Volume percentage [Unité de concentration]*
cm^{-1}	*Nombre d'onde / Wavenumber [Unité de fréquence spatiale]*
α	*Polarisabilité moléculaire / Molecular polarisability [$C^2N^{-1}m$]*
$\varepsilon(\omega)$	*Constante diélectrique / Dielectric constant [Fm^{-1}]*
λ	*Longueur d'onde / Wavelength [nm]*
µL	*Microlitre / Microliter [Unité de volume]*
µm	*Micromètre / Micrometer [Unité de grandeur]*
μ	*Moment dipolaire induit / Induced dipole moment [C·m]*
σ	*Section efficace / cross section [m^2]*
ω_{inter}	*Fréquence de transition interbande / Interband transition frequency [s^{-1}]*
ω_L	*Fréquence d'excitation / Excitation frequency [s^{-1}]*
ω_p	*Fréquence de plasma (aussi appelé fréquence de Langmuir) / Plasma frequency [$rad \cdot s^{-1}$]*
ω_r	*Fréquence d'émission / Emission frequency [s^{-1}]*
F	*Farad [Unité de capacité électrique]*
J	*Joule [Unité d'énergie]*
K	*Kelvin [Unité de température]*
k_B	*Constante de Boltzmann / Boltzmann constant [JK^{-1}]*
kV	*Kilovolt [Unité de tension électrique]*
m	*Mètre / meter [Unité de grandeur]*
M	*Molaire / Molar [Unité de concentration]*
min	*Minute [Unité de temps]*
mL	*Millilitre / Milliliter [Unité de volume]*
mm	*Millimètre / Millimeter [Unité de grandeur]*
mM	*Millimolaire / Millimolaire [Unité de concentration]*
ms	*Milliseconde / millisecond [Unité de temps]*
P	*Puissance/Power [W]*
ppm	*Partie par million / Part per million [Unité de concentration]*
Px	*Pixels [Unité de grandeur]*
RPM	*Tour par minute / Revolutions per minute [Unité de vitesse de rotation]*
s	*Seconde / Second [Unité de temps]*
T	*Température / Temperature [K]*
W	*Watt [Unité de puissance]*

RÉSUMÉ

La Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) a démontré sa pertinence pour le domaine de la science forensique à de multiples reprises par sa polyvalence et sa sensibilité. Ce projet propose une méthode analytique SERS-portable limitant les dépenses associées à la production d'un substrat SERS par l'optimisation de la synthèse de nanoparticules d'argent (AgNPs) à l'aide d'un four à micro-ondes conventionnel. Un design expérimental à deux facteurs (niveau de puissance (W) et temps de chauffage (s)) a permis de sélectionner les conditions de chauffage optimales, soit une puissance de 1080 W pendant 120 s. Ces conditions permettent d'obtenir une solution d'AgNPs de concentration élevée et dont les nanoparticules sont monodispersées supportant une stabilité pertinente de plusieurs mois pour un déploiement en routine.

La fiabilité de cette méthode a également été évaluée par une validation qualitative partielle au niveau de la précision. La variabilité au sein des mesures associée à la répétabilité a été évaluée à l'aide de la déviation standard relative (%RSD) d'une molécule contrôle, le 4-aminothiophénol (4-ATP), dont la contribution équivaut à [2-15] %. La variabilité due à l'hétérogénéité de surface du substrat métallique a été étudiée via la reproductibilité des mesures pour le 4-ATP et deux molécules d'intérêt forensique : le fentanyl, un opioïde synthétique, et un explosif commun, le trinitrotoluène. Des valeurs de %RSD de 11% pour la bande principale du TNT et de 21% pour celle du fentanyl, certainement élevées comparées à celles du 4-ATP de [6-9] %, supportent tout de même une reproductibilité acceptable. L'estimation de la limite de détection permet de s'assurer qu'une identification, sur la base du critère proposé dans la littérature de ratio signal sur bruit de fond (S/N) supérieur à 3, jusqu'à 10 ppm de fentanyl et 1 ppm de TNT demeure envisageable.

Mots-clés: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), validation, optimisation, science forensique, fentanyl, TNT.

ABSTRACT

Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) has shown multiple times its relevance for forensic science with its versatility and sensibility. This project proposes a portable SERS analytical method which will limit the expense associated with the production of the substrate by optimizing the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) with a conventional microwave. A two factors design (Power level (W) and heating time (s)) made possible the selection of the optimal conditions: a power of 1080 W during 120 s. These conditions give a AgNPs solution of high concentration and whose nanoparticles are monodispersed which support a relevant long-term stability of several months for a routine deployment.

The reliability of this method has been evaluated by means of a partial qualitative validation process, particularly at the precision level. Varability within the measurements associated with repeatability has been evaluated using the relative standard deviation (%RSD) of a standard, 4-aminothiophenol (4-ATP), whose contribution is equivalent to [2-15] %. Variability due to the surface heterogeneity of the substrate was studied via the reproducibility of measurements with 4-ATP and two molecules encountered in a forensic context: fentanyl, a synthetic opioid, and a common explosive, TNT. %RSD values of 11% for the main band of TNT and 21% for the band of fentanyl, which are higher than those of 4-ATP of about [6-9] %, still support an acceptable reproducibility. The estimation of the detection limit ensures that an identification, based on the criterion proposed in the literature of signal to background ratio (S/N) greater than 3, of 10 ppm for fentanyl and 1 ppm for TNT remains possible.

Keywords: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), validation, optimization, forensic science, fentanyl, TNT.

INTRODUCTION

> « *[...] Physical evidence cannot be wrong, it cannot perjure itself, it cannot be wholly absent. Only human failure to find it, study and understand it, can diminish its value. »* (Kirk, 1953)

Il s'agit de la version présentée par Kirk de son interprétation du principe de Locard qui est souvent résumé et réduit à : « Tout contact laisse une trace » (Locard, 1920). Le principe de Locard est au cœur même du travail d'observation, d'analyse et d'interprétation de tout investigateur d'une scène d'incident. Il justifie la constatation qu'après un acte criminel, il y aura forcément des traces pertinentes présentes sur les lieux d'un crime permettant d'en retirer des informations sur la source et l'activité à l'origine. Nos limitations inhérentes en tant qu'être humain peuvent tout de même nous restreindre dans l'objectif de les détecter: notre capacité d'observation, notre perception, nos biais cognitifs, les renseignements disponibles, etc. Le tout ne se limite pas seulement à l'être humain, mais également, par extension, aux techniques de détection employées. Ces outils ne remplacent pas la tâche d'observation, de raisonnement et de perception des techniciens en scène de crime, mais ils sont tout de même susceptibles de les influencer par leurs propres limitations (précision, sensibilité, spécificité, etc.). D'où l'importance de poursuivre la recherche scientifique dans le développement de nouvelles techniques innovantes et de proposer des solutions efficaces aux limitations des méthodes présentement utilisées en pratique.

Actuellement, les techniciens de scène de crime intervenant sur les lieux d'un incident utilisent des tests présomptifs ou d'orientation, par exemple des tests colorimétriques, pour détecter les traces chimiques telles que des stupéfiants et des explosifs. Ces tests ont l'avantage d'être simples, rapides, portatifs et peu coûteux. Cependant, ils sont tous susceptibles à des taux élevés de faux positifs et de faux négatifs dus à un manque global de sensibilité et de spécificité (Cuypers *et al.*, 2016; Philp et Fu, 2018). Par conséquent, ils ne permettent que d'acquérir des informations de classe chimique et doivent être accompagnés d'un test confirmatoire, tel que la spectrométrie de masse, qui offre une identification d'un spécimen sur la base d'une sélectivité à la structure moléculaire. Ces techniques d'analyse demeurent limitées physiquement au laboratoire, sont dispendieuses et nécessitent une formation relativement avancée pour l'emploi et l'entretien. La nécessité de recourir à une seconde analyse de confirmation en laboratoire suivant une analyse par test présomptif préalablement réalisée sur le terrain renchérit la surcharge de travail des techniciens de laboratoire, le temps d'attente des analyses et le coût associé au processus judiciaire.

Il existe actuellement une alternative pour tenter de contrer les limites des tests présomptifs. Elle consiste à utiliser des instruments portatifs employant la technologie Raman ou proche-Infrarouge qui offre une amélioration de la limite de détection des analyses tout en demeurant rapide. La spectroscopie vibrationnelle (IR et Raman) dispose d'une haute spécificité par son habilité à fournir un spectre unique à chaque composé. De plus, la spectroscopie Raman possède l'avantage d'être rapide, de posséder très peu ou aucune préparation d'échantillon, d'être non-destructive et de nécessiter qu'une faible surface d'échantillon à analyser. La diffusion Raman de l'eau est également très faible et son interférence est considérée comme étant négligeable. Ceci est particulièrement pertinent au domaine de la science forensique où plusieurs spécimens chimiques peuvent contenir de l'eau. Également, le développement de sonde optique offre la possibilité d'effectuer des mesures au travers de sacs ou de contenants en plastique et en verre. La spectroscopie Raman a démontré son potentiel pour l'analyse de spécimens chimiques sur le terrain dans un contexte forensique à plusieurs reprises et demeure à ce jour une technique de choix (Hargreaves *et al.*, 2008; Moore et Scharff, 2009; Vandenabeele, P. *et al.*, 2014). Néanmoins, son emploi demeure limité pour plusieurs raisons. Notamment, la sensibilité de la spectroscopie Raman, bien que supérieure aux tests colorimétriques, ne rejoint pas celle des tests confirmatoires tels que la spectrométrie de masse. De plus, elle est susceptible à la fluorescence parasite des spécimens, particulièrement dans le cas des matériaux à base de colorants (c.-à-d. peintures, plastiques, etc.). D'ailleurs, les stupéfiants peuvent être contaminés par l'ajout d'adultérant et d'agent de coupage. Ceux-ci peuvent venir masquer les bandes caractéristiques des composés d'intérêt et nuire à leur identification. La miniaturisation de l'instrumentation Raman implique des compromis tels que la perte du microscope (généralement inclus dans les spectromètres Raman de laboratoire), le sacrifice de la résolution spectrale et un choix limité de la source laser d'excitation (Vandenabeele, P. *et al.*, 2014). Il est crucial dans un contexte d'application forensique lorsque le spécimen d'intérêt est à l'état de trace, nécessairement contaminé par son environnement physique, de développer une méthode rapide, très sensible, hautement spécifique et non destructive. Cette méthode innovante, une fois adéquatement optimisée et validée, permettra d'obtenir des résultats fiables quant à la détection et à l'identification des traces chimiques à l'extérieur du laboratoire (p. ex. stupéfiants, explosifs, pesticides, accélérants d'incendie) permettant de ne pas nécessiter une analyse subséquente en laboratoire, sauvant ainsi du temps et des ressources attribuées au processus judiciaire.

Dans le cadre de ce projet, la méthode employée est basée sur la « Surface-Enhanced Raman Spectroscopy » (SERS). Découvert dans les années 1970, la popularité du phénomène SERS a augmenté

significativement dans les années qui ont suivi, notamment due à l'optimisation de l'instrumentation Raman, mais également par la publication d'articles impliquant la détection d'une seule molécule « Single-molecule detection » sous l'effet SERS (Kneipp *et al.*, 1997; Nie et Emory, 1997). À la base de la spectroscopie Raman, la technique SERS permet, en s'assurant de mettre en contact les molécules d'intérêt avec un substrat métallique (généralement l'or ou l'argent), d'amplifier significativement l'intensité des signaux Raman généralement de l'ordre de 10^6-10^8. La pertinence de cette technique prend tout son intérêt dans un contexte forensique où la quantité de matière typiquement retrouvée sous forme de traces chimiques est faible (p. ex. cocaïne sur un billet de banque, résidus d'explosifs sur un objet, etc.). La technique SERS permet d'ailleurs de combler un inconvénient majeur de la spectroscopie Raman, soit son manque de sensibilité et sa prédisposition à la fluorescence parasite, tout en conservant la haute spécificité associée à l'obtention d'une « signature chimique » sous forme de spectre.

L'un des objectifs principaux de ce projet est de proposer une synthèse d'un substrat SERS qui est simple, accessible et abordable. Le substrat SERS pourrait d'ailleurs être employé par des laboratoires de recherche tout comme par des laboratoires judiciaires. Les suspensions colloïdales d'argent respectent ces critères considérant qu'elles sont le type de substrat le plus simple à synthétiser. Leur synthèse a été proposée initialement par Lee et Meisel (1982) et elles sont demeurées les plus largement utilisées dans la littérature. Au fil des années, plusieurs publications ont suggéré des améliorations, dont celle de Leona qui mentionne l'utilisation d'un four à micro-ondes pour la synthèse des colloïdes. Les colloïdes synthétisés sont reconnus comme étant monodispersés, uniformes et stables pour plusieurs mois (Leona, 2009). Dans le cadre de ce projet, le chauffage est réalisé avec un four à micro-ondes conventionnel, plutôt qu'un système de digestion de recherche, permettant à la synthèse de colloïdes de demeurer abordable et accessible à tous types de laboratoires. Bien que le contrôle de la température ne soit pas aussi performant qu'un système de digestion, certains fours à micro-ondes conventionnels, notamment ceux de Panasonic possédant la technologie Inverter, fournissent un chauffage continu et un contrôle ajusté de la puissance. Néanmoins, l'optimisation de la synthèse des colloïdes à l'aide d'un four à micro-ondes conventionnel subsiste afin de s'assurer d'obtenir des colloïdes aux propriétés désirables : stabilité, monodispersion et uniformité du diamètre. La proposition d'une synthèse de colloïdes optimisée avec un four à micro-ondes conventionnel permettra de populariser l'emploi d'un substrat SERS simple, accessible et abordable.

Une validation de la méthode SERS avec un spectromètre Raman portable permet de s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus. Comme mentionné précédemment, la miniaturisation de l'instrumentation

Raman implique des compromis sur les paramètres instrumentaux, notamment la résolution spectrale. De plus, les modalités d'analyse sur le terrain, telles que la préparation des échantillons, devront être adaptées en contraste des analyses typiquement réalisées en laboratoire. Avant d'être utilisée dans un cadre judiciaire, la méthode SERS-portable devra répondre aux critères de validation des méthodes analytiques qualitatives : précision au niveau de la répétabilité et de la reproductibilité (Trullols *et al.*, 2004). Une estimation de la limite de détection est également réalisée dans le cadre de ce projet dans le but d'attester l'efficacité de la méthode SERS-portable à détecter des traces chimiques typiquement retrouvées sur des scènes d'incidents (c.-à-d. TNT, fentanyl). Cette étape renseignera les praticiens du potentiel et des limites de la méthode SERS-portable comme technique de détection et d'identification des traces chimiques pertinentes au domaine de la science forensique.

Le projet de recherche proposé est ainsi séparé en deux volets : (1) l'optimisation d'une synthèse des colloïdes d'argent simple, accessible et abordable au four à micro-ondes conventionnel et (2) la validation de la fiabilité de la méthode SERS-portable pour la détection de traces chimiques. Le présent document est séparé en cinq chapitres distincts. Premièrement, la spectroscopie Raman est brièvement abordée pour introduire le principe qui gouverne cette technique fondamentale. Sa lecture permet de simplifier et concrétiser les termes et notions élémentaires nécessaires pour explorer le chapitre suivant qui porte sur une technique avancée de la spectroscopie Raman. Ce deuxième chapitre permet d'approfondir la « Surface-Enhanced Raman Spesctroscopy » (SERS) qui est la technique au cœur même de ce projet de recherche. L'historique de la SERS, le principe derrière l'amplification observée et les substrats métalliques exploités dans le domaine seront abordés. Le troisième chapitre porte ensuite sur la partie expérimentale dans lequel les procédures effectuées pour obtenir les résultats sont décrites. Le chapitre quatre présente les résultats obtenus et la discussion de leur interprétation, leur signification et leur implication pour le domaine d'application de la SERS en science forensique. Le chapitre final conclu brièvement le travail effectué en présentant les résultats importants et les perspectives pour la SERS et son application dans le domaine de la science forensique.

CHAPITRE 1

Spectroscopie Raman

1.1 Historique et applications

Le phénomène de la diffusion Raman a été découvert pour la première fois par Chandrasekhara Venkata Raman en Inde (Raman et Krishnan, 1928). Il a d'ailleurs reçu le prix Nobel de physique en 1930 pour cette découverte. La spectroscopie Raman est définie comme étant une technique spectroscopique étudiant la diffusion inélastique de la lumière (lumière monochromatique d'un laser). Le terme *inélastique* indique que la fréquence des photons émis est différente de celle des photons incidents à la suite de l'interaction entre la matière et la lumière. L'intérêt de l'étude de la diffusion Raman est que les photons émis par la matière, à la suite de son interaction avec la lumière, nous renseignent sur les fréquences permises par les vibrations moléculaires caractéristiques du composé. Ainsi, la spectroscopie Raman permet de fournir une « empreinte moléculaire » du composé étudié permettant son identification, mais aussi de fournir une analyse quantitative à l'aide de l'intensité des signaux. Cependant, étant donné les inquiétudes engendrées par la faible sensibilité et l'interférence de la fluorescence, la spectroscopie Raman n'a pas connu une popularité aussi importante que sa technique complémentaire rivale : la spectroscopie infrarouge. Des avancées technologiques subséquentes dans l'instrumentation, notamment le laser monochromatique, le détecteur « Charge-coupled device » (CCD) et la miniaturisation de l'équipement ont tout de même permis à la spectroscopie Raman de gagner en popularité avec le temps (Kuhar *et al.*, 2018). D'ailleurs, la spectroscopie Raman demeure reconnue comme étant non-destructive, ne requiert aucune préparation pour l'analyse d'échantillon qu'il soit solide, liquide ou gazeux et permet d'analyser directement un spécimen dans un contenant de verre ou même solubilisé dans l'eau (l'eau et le verre sont de faibles diffuseurs Raman). Par conséquent, les champs d'application de la spectroscopie Raman sont vastes allant du domaine des arts et de l'archéologie (Ropret et Madariaga, 2014; Vandenabeele, Peter *et al.*, 2007), de la biologie (Kuhar *et al.*, 2018), de la pharmaceutique (Li et Church, 2014; Vankeirsbilck *et al.*, 2002) à la science forensique (De Gelder *et al.*, 2005; Izake, 2010; Lepot *et al.*, 2008), etc.

1.2 Principe

Plusieurs phénomènes peuvent se produire lorsque la lumière interagit avec la matière. L'un des phénomènes le plus étudiés est celui de l'absorption où l'interaction avec un photon permet d'exciter une molécule à un niveau d'énergie supérieur. C'est le phénomène à la base de la spectroscopie UV-visible plus communément appelé absorption électronique, étant donné qu'il y a promotion d'un électron du niveau d'énergie fondamental à un niveau d'énergie supérieur. Ce processus se réalise dans la région de l'ultraviolet (200-400nm) pour la plupart des molécules alors que certaines molécules, telles que les colorants, absorbent dans la région du visible (400-800 nm). Il existe également le phénomène d'absorption dans l'infrarouge, excitation d'un électron du même niveau d'énergie électronique à un niveau d'énergie vibrationnelle plus élevé. Ce principe est à la base de la *spectroscopie infrarouge* et permet de distinguer cette technique de celle de la spectroscopie Raman, dont le principe repose sur la diffusion de la lumière. La complémentarité et la différence entre ces deux techniques vont bien au-delà de cette simple comparaison et seront davantage approfondies ultérieurement (Section 1.2.1, p. 10).

Le dernier phénomène brièvement discuté avant d'entreprendre la diffusion Raman est celui de la fluorescence. L'étude de ce phénomène est préconisée lorsque la spectroscopie Raman est envisagée, à la fois parce que le principe derrière la fluorescence est très similaire à celui de la diffusion Raman, mais également parce qu'il s'agit de l'une des interférences les plus fréquemment rencontrées en spectroscopie Raman (Aroca, 2006; Le Ru, E. et Etchegoin, 2008; Smith et Dent, 2019) . La fluorescence est un type de luminescence, soit un phénomène caractérisé par l'absorption et l'émission subséquente de photons. Le principe de la fluorescence comporte trois étapes principales :

1. Il y a promotion d'un électron du niveau électronique fondamental de la molécule à un niveau électronique supérieur à la suite de l'acquisition d'un photon incident.
2. Cet électron, maintenant promu, va subir une relaxation vibrationnelle jusqu'au plus faible niveau vibrationnel.
3. Il s'en suit une relaxation radiative de l'électron à son niveau électronique fondamental qui est réalisée grâce à l'émission spontanée d'un photon.

L'énergie du photon émis est inférieure à celle du faisceau incident et la différence entre les deux maximas du spectre d'excitation et d'émission correspond au décalage de Stokes. Le spectre d'émission sera, par conséquent, toujours à une longueur d'onde plus élevée, donc moins élevée en énergie.

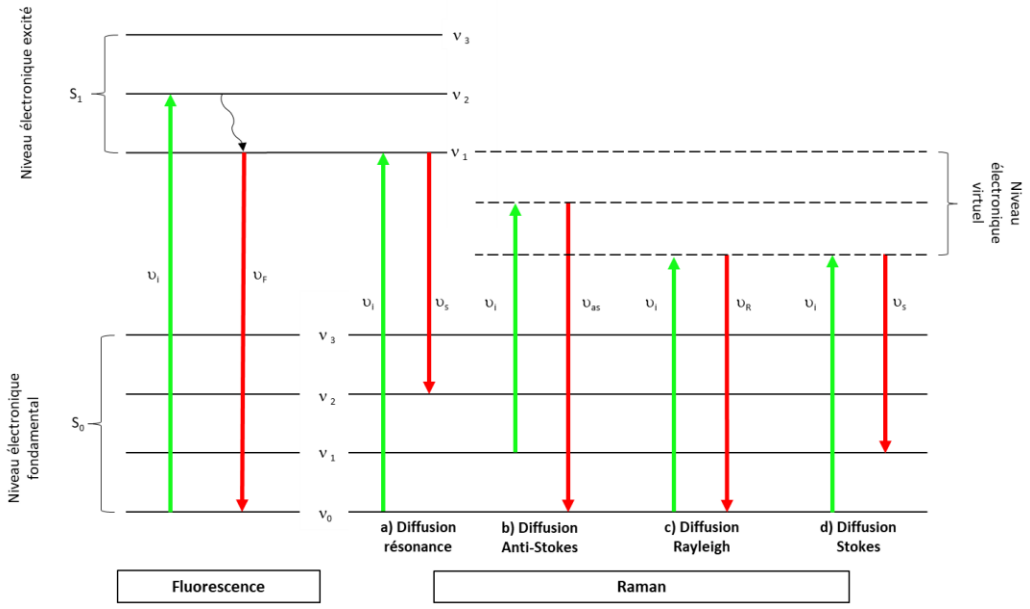
Comme mentionné précédemment, la fluorescence est un problème majeur en spectroscopie Raman. Le problème vient du fait que le phénomène Raman est rare contrairement à celui de la fluorescence. Ainsi, si une molécule est apte à effectuer de la fluorescence, elle va avoir tendance à entreprendre cette voie plutôt que celle de la diffusion Raman (Smith et Dent, 2019).

La diffusion se distingue des autres phénomènes optiques par le fait qu'elle impose l'absorption d'un photon incident et l'émission simultanée d'un autre photon. Ainsi, ce n'est pas toute l'énergie du photon qui est absorbée par la molécule puisqu'un photon d'énergie inférieure est immédiatement émis. Il existe deux types de diffusion, l'une connue en tant que *diffusion élastique* et l'autre en tant que *diffusion inélastique* qui correspond essentiellement à la diffusion Raman. La *diffusion élastique* implique que le photon incident et celui diffusé possèdent la même énergie, communément référée sous le nom de *diffusion de Rayleigh*, alors que la diffusion inélastique implique que le photon diffusé possède une énergie différente de celle du photon incident. La diffusion est typiquement simplifiée par la représentation d'un niveau d'énergie intermédiaire virtuel, supérieur au niveau d'énergie fondamentale de la molécule, dans le but de faciliter la représentation du phénomène initial d'absorption. Dans le cas où le niveau d'énergie intermédiaire virtuel coïncide avec un niveau d'énergie électronique réel de la molécule, il s'agit d'un processus de *diffusion en résonance* qui est observé permettant d'augmenter significativement l'efficacité de la diffusion (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). La diffusion Raman existe également sous deux processus différents tout deux dépendants de la différence entre l'énergie du photon incident et l'énergie du photon diffusé :

- Le premier cas, le plus commun et le plus fréquemment étudié en contexte avec la spectroscopie Raman dans l'identification d'une molécule, est la *diffusion Stokes*. Ce processus intervient lorsque l'énergie du photon diffusé Stockes (υ_s) est plus faible que le photon incident (υ_i) ($\upsilon_i > \upsilon_s$). Dans ce cas, l'électron sera promu du niveau d'énergie vibrationnelle fondamental (ν=0) à un niveau d'énergie vibrationnelle plus élevé (ν=1). L'énergie caractéristique de la vibration moléculaire impliquée dans la transition correspond à la différence entre l'énergie du photon incident et l'énergie du photon diffusé (υ_i-υ_s) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).
- Le second cas implique que le photon diffusé anti-Stockes (υ_{as}) possède une énergie supérieure à celle du photon incident ($\upsilon_i < \upsilon_{as}$). Ce processus dénommé *diffusion anti-Stokes* est possible seulement si la molécule est dans un état d'énergie vibrationnelle excité (ν=1) préalablement à la réception du faisceau d'énergie incident. L'énergie caractéristique de la vibration moléculaire

impliquée dans la transition correspond, dans ce cas-ci, à la différence entre l'énergie du photon diffusé et l'énergie du photon incident (υ_{as}-υ_i) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).

Figure 1.1 Représentation schématique de la fluorescence (gauche) et de la diffusion Raman (droite). La diffusion Raman implique 4 alternatives aux molécules excitées par le laser (υ_i): a) Diffusion par résonance (si υ_i coïncide avec un niveau vibrationnel de la couche électronique (S_1) de la molécule excitée, b) Diffusion anti-Stokes (υ_i<υ_{as} perte d'énergie dans le cas d'une molécule d'énergie vibrationnelle préalablement excitée (ν_1), c) Diffusion de Rayleigh (le cas le plus fréquent lorsque υ_i=υ_R où il n'y a aucun gain ni perte d'énergie), d) Diffusion de Stokes (υ_i>υ_S gain d'énergie caractéristique des vibrations permises par la molécule).



Notez la ressemblance entre le schéma de la fluorescence et celui de la diffusion Raman dans la figure 1.1, plus particulièrement la diffusion Stokes. Les deux phénomènes comportent des étapes similaires : soit l'absorption de l'énergie incidente du laser à un niveau d'énergie supérieur, puis une relaxation radiative vers un niveau d'énergie inférieur. La principale différence entre les deux phénomènes consiste en la simultanéité de la relaxation et de l'absorption (le niveau électronique supérieure est virtuel et ne permet qu'à représenter le phénomène) pour la diffusion Raman. En aucun cas la molécule se retrouve réellement dans un état excité en diffusion Raman alors que la fluorescence permet à la molécule d'atteindre l'état excité pendant une certaine durée avant d'effectuer sa relaxation radiative.

La perte ou le gain d'énergie demeure caractéristique des vibrations permises par la molécule. Cependant, l'efficacité de la diffusion Raman est significativement inférieure à celle de la fluorescence (seulement 1 photon sur 10^6 est diffusé pour fournir un signal en spectroscopie Raman). Ainsi, en pratique, si aucun traitement n'est effectué pour réduire l'interférence inévitable des molécules étant aptes à effectuer de

la fluorescence, les signaux caractéristiques Raman des molécules seront très faibles. L'une des alternatives est d'optimiser la longueur d'onde du laser pour obtenir de la diffusion en résonance, améliorant considérablement l'intensité des signaux obtenus en spectroscopie Raman. Il est également possible de sélectionner un laser de plus faible énergie, donc de longueur d'onde plus élevée s'éloignant du domaine du visible (p. ex. 785 nm au lieu de 532 nm) réduisant ainsi la vraisemblance que les molécules produisent de la fluorescence.

La diffusion de Rayleigh est le phénomène le plus intense et le plus fréquent en spectroscopie Raman malgré le fait qu'il ne permet pas d'obtenir d'informations sur la composition moléculaire (aucun gain ni perte d'énergie observable caractéristiques des vibrations permises par la molécule). La diffusion Raman (Stokes et anti-Stokes) est un processus rare où seulement 1 sur 10^6 photons diffusés fournira un signal Raman. Le processus anti-Stokes, à température pièce, est encore plus faible étant donné que la majorité des molécules seront dans leur état fondamental (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). Le facteur de Boltzmann permet de représenter le ratio de probabilités entre l'état excité et l'état fondamental à une température donnée :

$$\frac{P_v}{P_0} = e^{\frac{(E_v - E_0)}{k_b T}}$$

Où P_v correspond à la probabilité d'observer les molécules dans l'état excité, P_0 de les observer dans leur état fondamental, E_v-E_0 à la différence d'énergie entre les deux états, k_B à la constante de Boltzmann [JK^{-1}] et T à la température [K]. Ainsi, lorsque les molécules se retrouvent à la température de la pièce, la probabilité de retrouver une molécule dans son état excité est relativement faible et les signaux observés en diffusion anti-Stokes sont proportionnellement inférieurs à ceux observés en diffusion Stokes. La diffusion anti-Stokes demeure une solution envisageable concernant la problématique inhérente à la fluorescence. En effet, la fluorescence est absente dans le cas de la diffusion anti-Stokes puisque l'énergie du photon diffusé est supérieure à celui incident ($\upsilon_i < \upsilon_s$) alors que c'est toujours l'inverse avec la fluorescence ($\upsilon_i > \upsilon_F$). Cependant, les signaux observés sont d'une intensité tellement faible qui empêche concrètement l'emploi de la diffusion anti-Stokes dans l'identification des vibrations caractéristiques d'une molécule.

Typiquement, par souci d'uniformité, l'énergie perdue par le photon diffusé est appelée *décalage Raman*, toujours caractéristique des modes de vibration permis par la molécule, et est déterminée par la différence

entre l'énergie du photon incident (E_0) et l'énergie du photon diffusé (E_s). Le décalage Raman sera donc positif pour la diffusion Stokes et négatif pour la diffusion anti-Stokes. La convention d'un spectre Raman est de rapporter les décalages Raman en nombre d'ondes (cm^{-1}) sur l'abscisse et l'intensité Raman sur l'ordonnée. Le décalage Raman est directement proportionnel à l'énergie. Par conséquent, les vibrations nécessitant une énergie plus élevée posséderont un nombre d'ondes davantage important. Les différentes bandes représentées dans un spectre Raman correspondent aux différents modes vibrationnels de la molécule. Ils seront plus ou moins intenses en fonction de leur respect des règles de sélection Raman (Smith et Dent, 2019).

1.2.1 Règles de sélection en Raman

Toute technique de spectroscopie vibrationnelle implique une ou des règles de sélection permettant de discriminer quelles transitions sont permises ou restreintes pour les molécules. Ces règles de sélection permettent ainsi de prédire quels modes de vibration d'une molécule vont pouvoir fournir un signal. L'énergie d'une molécule peut être séparée en 3 niveaux : l'énergie de translation, l'énergie de vibration et l'énergie de rotation. Les énergies de translation et de rotation sont respectivement représentées en trois degrés de liberté dans l'espace (x,y,z) à l'exception des molécules linéaires qui ne possèdent que 2 axes de rotation. Il est donc possible de prédire le nombre de degrés de liberté vibrationnels d'une molécule possédant N atomes avec la règle suivante : 3N-6 (3N-5 pour une molécule linéaire). Davantage de règles de sélection s'appliquent et ce n'est pas la totalité des vibrations qui sont nécessairement actives en Raman (Smith et Dent, 2019).

La principale règle de sélection associée aux vibrations actives en spectroscopie Raman est basée sur une modification de la polarisabilité moléculaire (α). La polarisabilité est considérée comme étant la susceptibilité à laquelle un nuage électronique est perturbé par son interaction avec un champ électrique externe, tel qu'un rayonnement électromagnétique :

$$\mu = \alpha E_0$$

Où μ correspond au moment dipolaire induit [C·m] par un champ électromagnétique incident (E_0) provenant du laser [N/C] en fonction de la polarisabilité moléculaire α [$C^2N^{-1}m$]. Celui-ci est, par conséquent, proportionnel à la polarisabilité moléculaire α et à l'intensité du champ électromagnétique incident E_0. La puissance Raman enregistrée au détecteur du spectromètre équivaut au carré du moment

dipolaire induit $|\mu|^2$ (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). L'interaction entre le champ électromagnétique et la molécule cause la vibration des atomes qui la composent. En fonction des modes de vibration impliqués, la modification de la polarisabilité moléculaire sera plus ou moins importante tout comme l'intensité des bandes correspondantes.

Dans une configuration typique en spectroscopie Raman, un laser d'une certaine puissance est dirigé sur une région contenant les molécules. Pour les molécules, c'est la densité surfacique de puissance (S_{inc}) [Wm^{-2}] qui permet de déterminer le nombre de photons disponibles à interagir. La section efficace σ [m^2] d'une molécule peut être rapportée selon l'équation suivante et permet de faire le lien entre la puissance du signal P (W) et la densité surfacique de puissance incidente S_{inc} [Wm^{-2}] (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008):

$$P = \sigma S_{inc}$$

Elle permet d'obtenir une mesure de l'efficacité du processus optique étudié qui dépend de la longueur d'onde d'excitation ainsi que de l'indice de réfraction de l'environnement (solvant). Une grande section efficace permet à un nombre plus élevé de photons d'interagir avec la molécule permettant ainsi d'effectuer le processus optique. Elle est à la base de la comparaison de l'efficacité entre différentes techniques optiques (p. ex. Raman contre fluorescence). La section efficace en spectroscopie Raman est définie pour chaque mode de vibration et elle va également dépendre de l'orientation de la molécule. En pratique, plusieurs molécules d'orientation aléatoire sont présentes et le signal mesuré correspond à une moyenne (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).

En spectroscopie IR, la principale règle de sélection est basée sur une modification du moment dipolaire à l'intérieur de la molécule. Par conséquent, les deux techniques sont considérées comme étant complémentaires étant donné qu'elles ne possèdent pas la même règle de sélection. Par exemple, la vibration symétrique du dioxyde de carbone (CO_2) permet de fournir un signal intense en Raman (inexistant en IR) alors que sa vibration asymétrique est intense en IR (faible en Raman). La règle d'exclusion mutuelle stipule que pour une molécule avec un centre de symétrie, les vibrations qui sont actives en Raman sont nécessairement inactives en infrarouge et vice-versa. Généralement, les vibrations symétriques vont fournir des signaux intenses en spectroscopie Raman en contraste aux vibrations asymétriques qui ont tendance à être davantage actives en spectroscopie IR (Smith et Dent, 2019). En pratique, il est ainsi possible de prédire quelles liaisons seront actives en Raman ou en IR. La spectroscopie IR est particulièrement utile pour identifier les groupements fonctionnels des molécules organiques tels

que les groupements carbonyles (C=O) qui possèdent un fort moment dipolaire susceptible d'être modifié. Pour sa part, la spectroscopie Raman permet de complémenter la spectroscopie IR en fournissant des informations sur le squelette de carbones et la structure moléculaire.

Davantage de règles de sélection s'appliquent plus particulièrement en lien avec la symétrie des molécules et les degrés de liberté associés aux vibrations permises. L'application de ces règles va au-delà de la pertinence de ce travail, mais les lecteurs sont tout de même invités à consulter des sources de référence pour en apprendre davantage : (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008; Smith et Dent, 2019).

CHAPITRE 2

« Surface-Enhanced Raman Spectroscopy » (SERS)

2.1 Historique de la SERS

La première observation du phénomène SERS a été attribuée à Fleischmann et ses collaborateurs (1974) lors de leur travail sur l'adsorption de la pyridine sur une électrode d'argent à l'aide de la spectroscopie Raman. Ils ont observé une variation dans la fréquence et l'intensité de certaines bandes. Initialement, cette variation de signal a été expliquée par la présence d'une rugosité sur l'électrode d'argent qui permettait d'augmenter la surface de contact avec les molécules. Néanmoins, l'équipe de Jeanmaire et de Van Duyne ainsi que l'équipe de Albrecht et de Craighton ont publié simultanément et indépendamment des articles permettant de réfuter cette théorie. Ils mentionnent que l'attribution de cette augmentation significative du signal, calculée à environ 10^5 - 10^6, ne peut pas être due uniquement à la surface de contact et qu'il existe un effet secondaire en jeu (Albrecht et Creighton, 1977; Jeanmaire et Van Duyne, 1977). C'est en 1978 que Moskovich proposa que cette augmentation significative du signal fût l'effet de l'excitation des plasmons de surface, marquant le début d'une période importante de recherche fondamentale sur le nouveau phénomène dénommé « Surface-Enhanced Raman Scattering » (Moskovits, M., 1978).

Les années qui ont suivi la découverte de ce nouveau phénomène ont été marquées par de multiples études au niveau fondamental. Au cours des dernières décennies, une augmentation drastique de l'intérêt pour la SERS a été observée et attribuée à plusieurs facteurs dont :

- L'implication de la détection d'une molécule unique « Single-molecule detection » par deux articles indépendants (Kneipp *et al.*, 1997) (Nie et Emory, 1997).

- Le développement et l'avancée technologique de l'instrumentation Raman : détecteur CCD, laser monochromatique puissant et abordable à de multiples longueurs d'onde, miniaturisation et diminution des prix d'un spectromètre Raman (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).

- Développement et innovation de la nanotechnologie : applications au niveau de la conception de nouveaux substrats métalliques SERS (Pilot, Roberto *et al.*, 2018).

Il est également intéressant de constater l'évolution de l'accessibilité de la SERS passant de domaines d'application spécifiques, tels qu'au niveau des études fondamentales de la plasmonique, à aujourd'hui où les domaines d'application sont variés.

Plusieurs domaines d'application peuvent être regroupés sous une même classe dénommée : « Spectroscopie Raman améliorée ». En effet, la spectroscopie Raman, étant considérée comme une spectroscopie vibrationnelle, possède l'avantage indéniable d'être de haute sélectivité par le fait que chaque molécule fournit un signal Raman qui lui est propre dont les bandes caractéristiques du spectre permettent son identification. L'exploitation d'une technique permettant d'obtenir cette « empreinte moléculaire » est fortement pertinente dans plusieurs domaines d'application où la détection de molécule est primordiale : chimie analytique, biochimie, biomédical, science forensique, etc. Cependant, la spectroscopie Raman possède un inconvénient majeur, soit sa faible sensibilité. Cette faible sensibilité vient du fait que la diffusion Raman est un phénomène rare (1 photon sur 10^6 établit une diffusion Raman) (Smith et Dent, 2019). Cette constatation n'implique pas également les règles de sélection de la spectroscopie Raman qui influencent particulièrement le signal obtenu, dont la polarisabilité moléculaire. (Section 1.2.1, p.10). Ainsi, l'attrait d'une technique comme la SERS, qui augmente exponentiellement la sensibilité combinée avec la haute spécificité de la spectroscopie Raman, est indéniable.

Des domaines d'application comme la biochimie et la science forensique sont fortement impliqués dans l'exploitation de la SERS particulièrement au niveau de l'analyse de traces. Par exemple, des molécules pertinentes aux domaines d'application de la biochimie telles que le glucose (Shafer-Peltier *et al.*, 2003), les protéines (Han, X. X. *et al.*, 2009), l'acide nucléique (Kneipp *et al.*, 1998) ont été évaluées avec la SERS. Des molécules pertinentes à la science forensique telles que les stupéfiants, les explosifs, les encres, les microtraces (fibres, peintures), les fluides biologiques, etc. ont également été évaluées à l'aide de la technique SERS (Muehlethaler *et al.*, 2016a).

Ce qui distingue ce type d'application des autres, comme l'étude fondamentale du phénomène SERS, est le fait que la molécule d'intérêt à détecter est non-ciblée. L'objectif devient dès lors d'optimiser les paramètres instrumentaux (choix du substrat SERS, longueur d'onde d'excitation, etc.) afin d'obtenir un signal satisfaisant (ratio signal sur bruit de fond (S/N) élevé) pour la molécule d'intérêt par l'amélioration de la sensibilité et de la spécificité de la méthode (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). C'est l'exemple typique dans le domaine de la science forensique lorsqu'on souhaite détecter la présence d'une substance illicite

qui ne possède pas, a priori, un signal Raman significatif permettant son identification. Ainsi, la stratégie de l'opérateur devient d'exploiter ses connaissances (chimie, biochimie, physique) et les renseignements à disposition (type de scène de crime, hypothèses d'enquête, témoignages, etc.) dans le but de favoriser l'affinité entre la molécule d'intérêt et le substrat métallique pour, éventuellement, obtenir une identification fiable du composé.

2.2 Principe

L'amplification de l'intensité du signal Raman à la base du phénomène SERS est basée sur deux mécanismes: l'amplification électromagnétique (EM) (1) et l'amplification chimique (CE) (2). Le mécanisme EM est reconnu comme étant la source majeure de l'amplification du signal observée en SERS avec des valeurs typiques de facteur d'amplification (EF) de l'ordre de 10^6-10^8 alors que celles du mécanisme CE sont généralement de l'ordre de 10^2-10^4. Il est à noter que des valeurs d'EF de l'ordre de 10^{10}-10^{12} ont été observées dans des conditions optimales (Le Ru, E. C. *et al.*, 2007). Ces valeurs élevées sont entre autres attribuées à un problème important évoqué dans la littérature, soit une variabilité importante dans la définition de l'EF et la façon dont il est calculé (Natan, 2006). Le phénomène à la base du mécanisme EM est reconnu comme étant la résonance plasmonique de surface (SPR) « Surface plasmon resonance ». Le mécanisme CE doit sa contribution au phénomène de transfert de charge entre la molécule et le métal ainsi qu'à la résonance moléculaire. La combinaison de l'un ou plusieurs de ces phénomènes est à la base même de l'amplification des signaux Raman en SERS (Lombardi et Birke, 2009). Un choix adéquat de la longueur d'onde d'excitation a d'ailleurs permis la détection d'une seule molécule unique de Crystal Violet par la superposition adéquate des phénomènes de résonance avec la longueur d'onde d'excitation (Cañamares *et al.*, 2008).

Plusieurs considérations sont à envisager afin de s'assurer d'obtenir des facteurs d'amplification considérables en SERS pour l'identification de traces chimiques. Notamment, il est reconnu qu'une molécule doit être adsorbée ou se retrouver très près du substrat métallique (distance maximale de 10 nm) pour pouvoir bénéficier du mécanisme EM. Étant de nature purement électromagnétique, le mécanisme EM est indépendant de la nature de la molécule. En revanche, le mécanisme CE repose sur une interaction physico-chimique (physisorption et chimisorption) entre la molécule et le substrat métallique. Par conséquent, le mécanisme CE est considéré comme étant dépendant de la nature de la molécule (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).

Toutes molécules qui se retrouvent à proximité du substrat métallique vont pouvoir bénéficier du mécanisme EM (pas nécessairement de celui CE). Cette considération est importante dans un contexte forensique où les traces chimiques d'intérêt présentes en faible quantité, dont on souhaite amplifier le signal Raman, sont nécessairement partielles, dégradées et contaminées (adultérants, agents de coupage, environnement physique). Un travail important en SERS demeure de favoriser l'adsorption spécifique des molécules d'intérêt avec le substrat métallique afin d'éviter l'interférence des contaminants ou de composés secondaires qui peuvent entrer en compétition en fonction de leur affinité respective.

Une autre considération importante en SERS est que l'interaction entre les molécules et le substrat métallique cause des modifications dans les règles de sélection. Ainsi, un spectre SERS d'une molécule peut posséder de nouvelles bandes absentes dans le spectre Raman alors que d'autres bandes présentes dans le spectre Raman peuvent être complètement absentes dans le spectre SERS (Moskovits, M. et Suh, 1984). L'un des exemples couramment rencontrés est la modification de la symétrie d'une molécule lors de son interaction avec le substrat métallique en fonction de son orientation (Gao *et al.*, 1990). Par conséquent, une banque spectrale contenant les spectres Raman de composés chimiques communs (drogues, explosifs, etc.) ne peut pas être exploitée directement avec un spectre SERS obtenu à partir d'un spécimen. De plus, si un substrat SERS favorise l'adsorption spécifique de molécules d'une certaine orientation, il ne sera pas possible de comparer les signaux obtenus avec un autre substrat. Ce manque de reproductibilité, non seulement au sein des mesures effectuées, mais également en fonction des résultats obtenus entre différents articles est l'une des raisons cruciales pour laquelle la SERS n'est pas typiquement reconnue malgré son potentiel.

2.2.1 Amplification électromagnétique (EM)

Tel que mentionné précédemment dans le chapitre sur la spectroscopie Raman, un moment dipolaire (μ) est induit lorsqu'une molécule est excitée par une radiation incidente d'un laser monochromatique d'énergie (E_L) (Section 1.2.1, p.10). Le facteur influençant l'amplitude de la diffusion Raman est appelé polarisabilité (α). Cependant, lorsqu'une molécule se retrouve très près d'un substrat métallique, il lui est possible de profiter de deux contributions distinctes notamment :

1. L'amplification du champ électromagnétique locale à la position de la molécule.
2. L'amplification de la radiation Raman des molécules.

C'est la présence de la résonance plasmonique de surface (SPR) du substrat métallique qui est la source majeure de ces deux phénomènes. La surface métallique doit posséder une certaine rugosité afin de fournir une composante perpendiculaire aux plasmons de surface et permettre un phénomène de diffusion qui soit détectable. Sous illumination du laser, l'énergie emmagasinée à l'intérieur des plasmons permet de fournir l'énergie nécessaire afin de causer la diffusion Raman dans la molécule à proximité. Par la suite, l'énergie provenant des photons émis par la molécule est transmise de nouveau aux plasmons, moins l'énergie fournie au noyau via le processus Raman. L'énergie transférée aux plasmons est ensuite réémise avec un décalage caractéristique du processus Raman permis par la molécule vers le détecteur (McNay *et al.*, 2011).

L'amplification du champ électromagnétique locale (E_{loc}) provient de la présence des plasmons de surface du substrat métallique. Elle est dépendante de la fréquence d'excitation de la radiation incidente (ω_L) et peut varier considérablement du champ électromagnétique incident (E_0). La magnitude de E_{loc} à l'interface du substrat métallique est considérablement plus élevée que E_0. L'optimisation de la longueur d'onde en fonction de la SPR et de la formation des « hot-spots » peut particulièrement augmenter les valeurs de E_{loc}. Le moment dipolaire induit (μ) par E_0 sera, par conséquent, amplifié selon le facteur suivant, appelé *facteur d'amplification du champ électromagnétique local (M_{loc})* (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008) :

$$M_{loc}(\omega_L) = \frac{|E_{Loc}(\omega_L)|^2}{|E_0|^2}$$

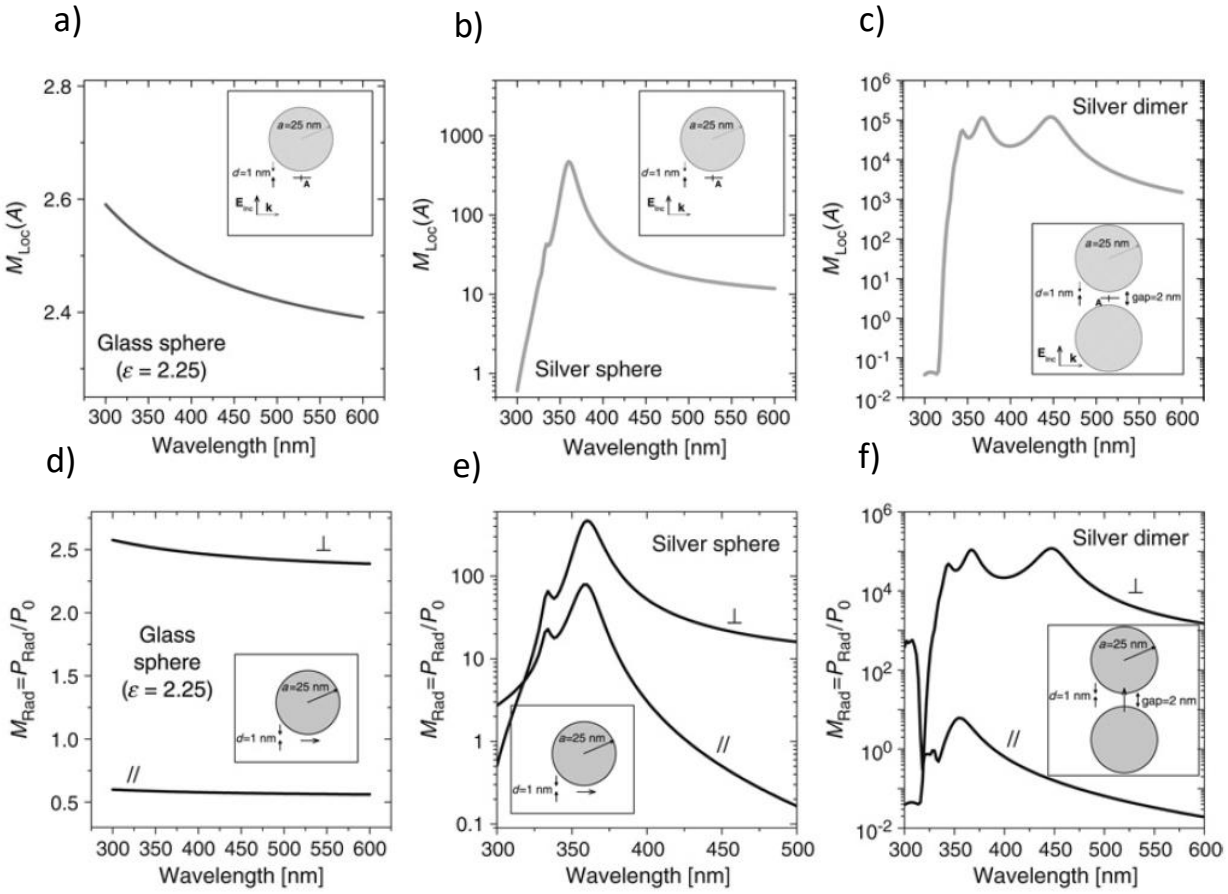
Le *facteur d'amplification de radiation Raman* (M_{Rad}) provient, quant à lui, du fait que la puissance d'un dipôle est considérablement affectée par son environnement (dans ce cas-ci, le substrat métallique) selon l'équation ci-contre :

$$M_{Rad} = \frac{P_{Rad}}{P_0}$$

Où P_{Rad} correspond à la puissance totale d'émission du dipôle alors que P_0 correspond à sa puissance dans l'espace vide. La présence d'un substrat peut alors amplifier ou diminuer la puissance émise par le dipôle. Ce phénomène est en fonction de la géométrie du substrat, de sa nature, mais également de l'orientation et de la fréquence d'émission du dipôle (ω_r) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). La figure 2.1 présente la dépendance à la longueur d'onde du facteur d'amplification du champ électromagnétique locale (M_{loc}) et

de radiation (M_{Rad}) pour une molécule (A) à une distance dans l'air de 1 nm de la surface d'une sphère, dont le rayon est de 25 nm. Cette sphère est soit constituée d'un matériau diélectrique, comme le verre, ou d'un matériau non diélectrique : l'argent.

Figure 2.1 M_{loc} et M_{Rad} d'une molécule (A), placée à une distance de 1 nm de la surface de la sphère dans l'air, en fonction de la longueur d'onde. L'amplification est présentée pour une sphère de verre (a et d), une sphère d'argent (b et e) et un dimère de sphère d'argent. M_{Rad} est dépendant de l'orientation du dipôle (// parallèle à la surface et ⊥ perpendiculaire à la surface). Reproduit avec permission de (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).



Il est possible de constater à l'aide de l'illustration que :

- La variation de M_{loc} avec la sphère de verre (a) est négligeable en fonction de la longueur d'onde.
- Dans le cas d'une sphère d'argent, l'existence d'une résonance plasmonique de surface localisée justifie la forte dépendance à la longueur d'onde de M_{loc} et M_{Rad}. Une forte résonance vers 360 nm permet d'obtenir des facteurs d'amplification M_{loc} et M_{Rad} significatifs (b et e). Il est également possible d'observer l'effet de l'orientation du dipôle sur M_{Rad}. Lorsque celui-ci est perpendiculaire (⊥) à la surface, les valeurs de M_{Rad} sont davantage élevées comparativement à celui-ci lorsqu'il est orienté parallèlement (//). Cette observation est justifiée par le fait qu'un dipôle orienté perpendiculairement irradie davantage d'énergie dans le champ lointain « far-field » vers le détecteur. Cet effet est davantage prononcé dans le cas d'un dimère d'argent (f).
- Les valeurs obtenues de M_{loc} (c) et M_{Rad} (f) pour un dimère d'argent sont davantage pertinents dans l'application de la SERS. Dans les conditions appropriées, une molécule se retrouvant dans l'interstice entre deux colloïdes d'argent va pouvoir bénéficier de facteurs d'amplification M_{loc} et M_{rad} pouvant franchir 10^4 alors qu'ils sont dans les alentours de 100-1000 pour une sphère isolée b) et e). Cet exemple permet de bien représenter l'effet des « hot-spots » dont l'exploitation est visée lors d'une mise en application en SERS dont le sujet sera approfondi dans une prochaine section (Section 2.3.1, p. 30).

L'une des expressions les plus importantes en SERS est l'approximation E^4 ((Le Ru, E. et Etchegoin, 2008; Pilot, R. *et al.*, 2019; Pilot, Roberto *et al.*, 2018). Elle permet d'estimer l'ordre de magnitude du facteur d'amplification d'une molécule. Considérant que l'amplification électromagnétique EM provient uniquement des deux contributions décrites précédemment (M_{loc} et M_{Rad}), il est possible de décrire le facteur d'amplification électromagnétique EF_{EM} comme suit (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008) :

$$EF_{EM} = M_{loc}(\omega_L)M_{Rad}(\omega_R)$$

Étant donné que M_{loc} et M_{Rad} ont une origine physique semblable, soit un champ électromagnétique couplé à la résonance plasmonique de surface localisée du substrat métallique, il peut être estimé que $M_{Rad}(\omega_R) \approx M_{loc}(\omega_R)$ de sorte que :

$$EF_{EM} = M_{loc}(\omega_L)M_{loc}(\omega_R) = \frac{|E_{Loc}(\omega_L)|^2}{|E_0|^2}\frac{|E_{Loc}(\omega_R)|^2}{|E_0|^2}$$

D'ailleurs, il est possible d'observer dans la figure 2.1 (b contre e) et (c contre f) que le patron des graphiques entre M_{loc} et M_{Rad} est très similaire. M_{Rad} peut donc être reconsidéré comme étant M_{loc} avec une radiation incidente de fréquence ω_R plutôt que ω_L. De plus, une seconde approximation peut être apportée en assumant que le décalage Raman est faible et que $\omega_R \approx \omega_L$. Il est alors possible d'exprimer l'approximation E^4 selon un décalage Stokes nul « Zero-Stokes shift » (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008) :

$$EF_{EM} = \frac{|E_{Loc}(\omega_L)|^4}{|E_0|^4}$$

Il s'agit de la fameuse expression en SERS qui permet d'estimer l'ordre de grandeur du facteur d'amplification d'une molécule unique dans des conditions spécifiques. La théorie et le mécanisme derrière l'amplification électromagnétique sont acceptés dans la littérature scientifique entourant la SERS. Toutefois, le prochain mécanisme (CE) a été et demeure sujet à controverse dans la littérature SERS.

2.2.2 Amplification chimique (CE)

Le mécanisme CE est reconnu comme étant significativement plus faible au niveau de sa contribution dans l'amplification observée en SERS (10^2-10^4 pour CE contre 10^6-10^8 pour EM). Néanmoins, il demeure important à considérer puisqu'il affecte, jusqu'à un certain point, le patron et l'intensité relative des bandes spectrales en fonction des sections efficaces des vibrations respectives. La cause est que l'interaction, via une physisorption ou une chimisorption entre la molécule et le substrat métallique, crée une modification dans la polarisabilité moléculaire de la molécule impliquée. Dans le cas d'une physisorption, ce sont les forces de Van der Waals qui favorisent l'adsorption avec le substrat et la polarisabilité moléculaire va être légèrement modifiée. Une perturbation supérieure est attendue dans le cas d'une chimisorption, où une nouvelle liaison covalente est créée entre la molécule et le substrat (Pilot, R. *et al.*, 2019). Il est important de considérer que la modification de la polarisabilité peut affecter positivement ou négativement l'effet SERS tout dépendant de la situation. Par exemple, une modification dans l'orientation d'une molécule, une fois celle-ci adsorbée sur le substrat métallique, peut réduire les sections efficaces de certains modes de vibration et empêcher leur observation. La distance entre la molécule et le substrat métallique doit être très faible (quelques Angströms) et le mécanisme CE va nécessairement dépendre de la nature de la molécule. Un anion (chargé négativement) va posséder une attraction électrostatique pour un colloïde d'argent chargé positivement alors qu'il sera, au contraire,

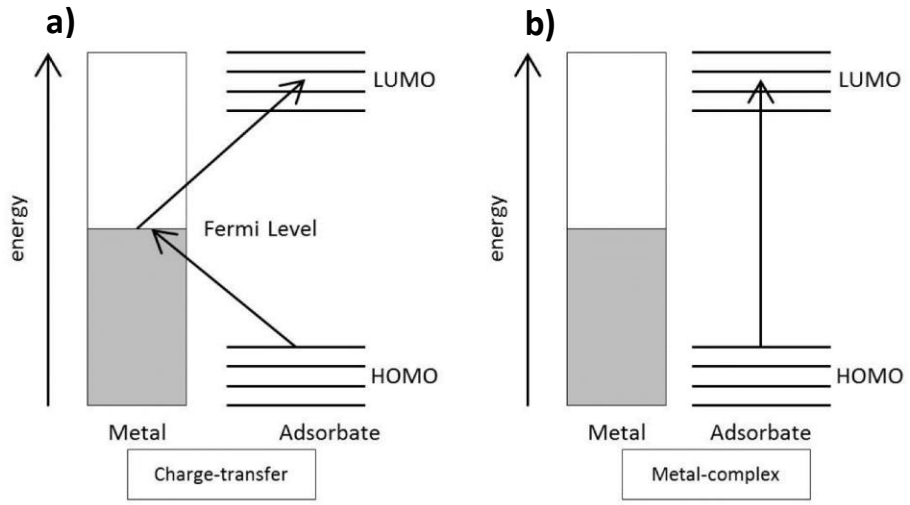
répulsé si le colloïde était chargé négativement (répulsion électrostatique). L'équation pouvant définir le facteur d'amplification chimique (EF_{CE}) est la suivante (Aroca, 2006):

$$EF_{CE} = \frac{\sigma_k^{ads}}{\sigma_k}$$

Où σ_k^{ads} correspond à la section efficace du mode de vibration k lorsque la molécule est adsorbée au substrat métallique et σ_k à la section efficace du mode de vibration k de la même molécule libre dans l'espace. EF_{CE} est ainsi amélioré lorsque l'adsorption de la molécule sur le substrat métallique augmente sa section efficace pour un mode de vibration spécifique k.

L'une des contributions significatives pour le mécanisme CE est le phénomène de transfert de charge où la liaison covalente entre la molécule et le substrat métallique crée un nouveau complexe. Ce complexe [molécule-métal] permet une excitation des électrons de l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (« Highest occupied molecular orbital » (HOMO)) vers l'orbitale moléculaire vacante de plus basse énergie (« Lowest unoccupied molecular orbital » (LUMO)) via un couplage indirect avec le niveau de Fermi du métal :

Figure 2.2 Représentation du phénomène de transfert de charge pour un complexe [molécule-métal] impliqué dans le mécanisme d'amplification chimique CE : **a)** Transfert d'électron entre la couche HOMO et LUMO via un couplage indirect avec le niveau de Fermi du métal, **b)** Énergie incidente provenant du laser est en résonance avec la transition électronique du complexe [molécule-métal]. Reproduit avec permission de (Chu *et al.*, 2017).

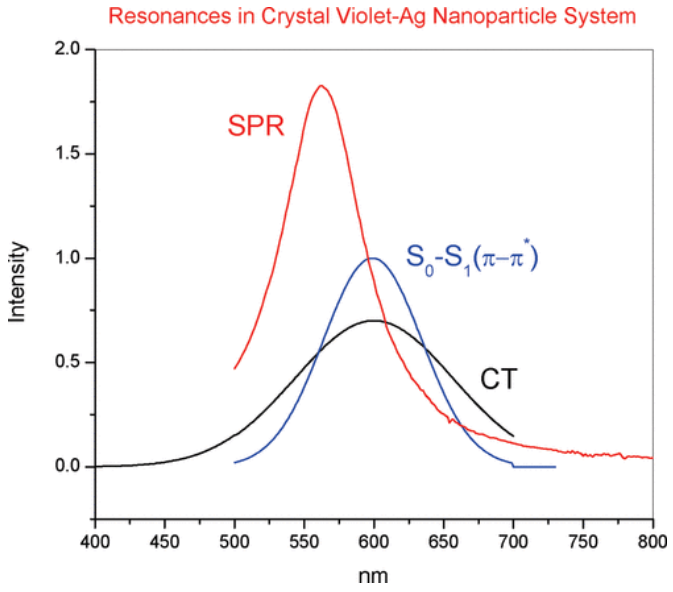


La condition est qu'il faut que le niveau de Fermi soit présent à proximité entre les couches frontalières HOMO et LUMO. Ainsi, une molécule intégrée dans le complexe [molécule-métal] va pouvoir profiter du niveau de Fermi comme intermédiaire et effectuer une transition électronique qui, autrement, nécessite plus d'énergie que permise avec une source d'excitation dans le domaine du visible (λ typique d'un laser en spectroscopie Raman). Également, l'énergie incidente du laser peut être en résonance permettant une transition électronique directe pour le complexe. Par conséquent, la polarisabilité moléculaire de la molécule est modifiée, permettant l'observation d'une amplification des signaux en SERS attribuée au mécanisme CE.

L'existence du mécanisme CE demeure un sujet de controverse dans la littérature SERS (Chen *et al.*, 2016; Le Ru, E. et Etchegoin, 2008; Moskovits, Martin, 2013). Moskovits (1978), l'un des pionniers de la découverte de la SERS, mentionne d'ailleurs dans son article qu'il s'oppose particulièrement à l'existence d'un mécanisme CE et propose même son abandon. Il supporte que le mécanisme EM basée sur la résonance plasmonique de surface, reconnu sans équivoque comme étant la source majeure de l'amplification observée en SERS, devrait être considéré comme l'unique facteur d'amplification en SERS. L'abandon du mécanisme CE permettrait ainsi d'orienter les études sur davantage d'opportunités d'innovation sur la technique (Moskovits, Martin, 2013).

Plusieurs auteurs supportent tout de même l'existence du mécanisme CE. Notamment, Lombardi et Birke ont d'ailleurs publié un article : « A Unified View of Surface-Enhanced Raman Scattering » qui supporte l'existence des trois contributions au phénomène SERS : la résonance plasmonique de surface (SPR), le transfert de charge et la résonance moléculaire propre à certaines molécules (2009) :

Figure 2.3 Diagramme des résonances observées dans le système de Cystal Violet- Nanoparticules d'argent : Résonance plasmonique de surface (SPR) en **rouge**, résonance moléculaire (S_0-S_1(π-π*)) en **bleu**, et transfert de charge en **noir**. Noter le chevauchement entre les trois contributions vers une longueur d'onde de 575 nm. Reproduite avec permission de (Lombardi et Birke, 2009).

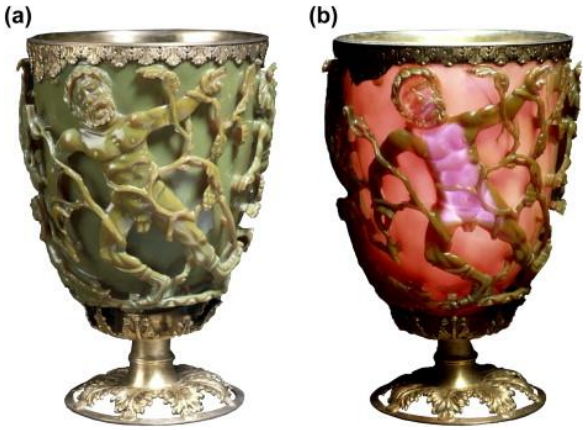


Lombardi et Birke mentionnent que, typiquement, ces trois contributions sont traitées de façon indépendante. Cependant, ils ont démontré par leur expérimentation qu'il est impossible de décrire complètement les signaux SERS observés sans considérer les trois contributions et que celles-ci devraient être considérées comme étant intimement liées. Il est justement proposé que c'est par la sélection appropriée d'un laser avec une longueur d'onde aux alentours de 600 nm qu'il est possible de bénéficier d'un chevauchement des trois contributions et, par conséquent, d'obtenir des facteurs d'amplification extrêmement élevés pouvant justifier la détection d'une molécule unique de Cristal Violet en SERS. L'existence du mécanisme CE est supportée dans le cadre de ce projet selon la définition fournie par Lomardi et Birke (2009).

2.2.3 Propriétés optiques des métaux

Les propriétés optiques des métaux tels que l'or (Au), l'argent (Ag), l'aluminium (Al) et le cuivre (Cu) sont reconnues depuis longtemps comme étant intéressantes. La coupe de Lycurgue, datant de l'époque des Romains, maintenant affichée au *British Museum*, ayant la particularité de changer de couleur en fonction de son exposition à la lumière, est un exemple d'exploitation de la nanotechnologie des métaux :

Figure 2.4 Présentation de la coupe de Lycurgue composée de nanoparticules d'argent et d'or dans la matrice de verre. Le dichroïsme provient de (a) la diffusion des nanoparticules d'argent lorsqu'éclairé de l'extérieur (vert) et de (b) l'absorption des nanoparticules d'or lorsque la lumière la traverse (rouge) (Loos, 2015).



Le dichroïsme (présence de deux couleurs) observé est dû à la présence de nanoparticules d'argent et d'or dispersé à travers la matrice de verre. La couleur verdâtre opaque provient de la diffusion de la lumière extérieure par les nanoparticules d'argent alors que la couleur rougeâtre translucide est issue de l'absorption des nanoparticules d'or lorsque la lumière est éclairée à travers la coupe (Freestone *et al.*, 2007).

La réputation des métaux provient également de leur capacité à réfléchir efficacement la lumière dans le domaine du visible ainsi que de leur conductivité électrique et thermique. Ces phénomènes sont attribués à la présence d'électrons libres de conduction issue d'une liaison métallique. D'après le modèle de Drude (Drude, 1900), les électrons de conduction sont libres d'être partagés de façon délocalisée (nuage électronique) autour des noyaux fixes cationiques des atomes de métaux. Il est possible, sous une définition électromagnétique, de considérer le tout comme un plasma à l'état solide étant donné que les électrons sont libres d'osciller alentour des ions fixes (noyau) permettant une charge globale neutre (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).

Lorsqu'un faisceau incident de lumière interagit avec les électrons de conduction d'un métal, ceux-ci vont osciller collectivement selon une certaine fréquence. Le terme plasmon a été attribué à ce phénomène. Historiquement, le terme plasmon a été introduit pour la première fois par Pines : « We introduce the term "plasmon" to describe the quantum of elementary excitation associated with this high frequency collective motion ». dans un article étudiant la perte d'énergie collective dans un film solide (1956). Ainsi, un plasmon est une quasi-particule quantifiant la densité de charge dans un plasma. Par analogie, il est

possible d'associer le plasmon à la densité de charge d'un plasma tout comme un photon est associé à la quantification d'un rayonnement électromagnétique (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).

Lorsqu'un photon propagé par une onde électromagnétique interagit avec les électrons d'un métal, celui-ci devient couplé aux degrés internes de liberté des électrons de conduction et une nouvelle définition lui est attribuée : polariton. Dans le cas de l'interaction d'un métal avec un rayonnement électromagnétique du domaine du visible ou de l'infrarouge, l'onde électromagnétique résultante dans le métal est appelée polariton de plasmon. En 1957, Ritchie prédit l'existence d'un nouveau type de plasmon correspondant à la propagation longitudinale de la densité de charge à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique (Ritchie, 1957). Une expérience a été réalisée en 1959 afin de confirmer la prédiction de Ritchie par Powell (Powell et Swan, 1959). Désormais, le phénomène est reconnu sous le nom de polaritons-plasmon de surface « Surface plasmon -polaritons » (SPP). Il existe deux types importants de SPP, l'un qui se propage à la surface du métal « propagating surface plasmon-polaritons » (PSPP) et l'autre qui est localisé à la surface du métal « localized surface plasmon-polaritons » (LSPP ou LSP) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). Les PSPP sont associés à l'oscillation des électrons se propageant à l'interface entre le métal et un milieu diélectrique à la suite de l'interaction avec un rayonnement électromagnétique incident. C'est le phénomène primordial à la base de plusieurs applications de la plasmonique avec une interface planaire 2D. Cependant, lorsqu'on considère des nanoparticules dont la taille est inférieure à la longueur d'onde du rayonnement électromagnétique incident, l'oscillation respective des électrons devient limitée aux alentours des nanoparticules (LSPP). Une attention particulière sera ainsi attribuée au LSP (contrairement au PSPP) dans le cadre de ce mémoire étant donné l'emploi de nanoparticules plutôt que d'une surface plane.

Les métaux peuvent absorber et diffuser la lumière plus ou moins efficacement en fonction de leur nature et de la fréquence de la radiation incidente. Selon la théorie classique, la réponse d'un milieu lors de l'interaction avec un champ électromagnétique externe est définie par la constante diélectrique $\varepsilon(\omega)$. Celle-ci se divise en deux composantes : l'une <u>réelle</u> Re $[\varepsilon(\omega)]$ et l'autre <u>imaginaire</u> Im $[\varepsilon(\omega)]$ (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008):

$$\varepsilon(\omega) = Re[\varepsilon(\omega)] + Im[\varepsilon(\omega)]$$

$$Re[\varepsilon(\omega)] = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + G^{\,2}}$$

$$\mathrm{Im}[\varepsilon(\omega)] = 1 - \frac{\omega_p^2 G}{\omega(\omega^2 + G^{\,2})}$$

G [rad·s^{-1}] correspond au taux de collisions des électrons libres en mouvement et représente les pertes d'énergie totales du système. Le terme ω_p [rad·s^{-1}] correspond à la fréquence de plasma (aussi appelée fréquence de Langmuir) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). La diffusion de la lumière est associée à la composante réelle Re $[\varepsilon(\omega)]$ alors que l'absorption est associée à la composante imaginaire Im $[\varepsilon(\omega)]$ et représente les pertes engendrées par le processus. Lorsque $\omega < \omega_p$ ($\lambda > \lambda_p$), la composante réelle sera négative (Re $[\varepsilon(\omega)] < 0$). Par ailleurs, si ω n'est pas trop petite dans la région considérée, la composante imaginaire Im $[\varepsilon(\omega)]$ sera, elle, faible. Si ces deux conditions sont respectées : Re $[\varepsilon(\omega)] < 0$ et faible Im $[\varepsilon(\omega)]$ dans la région étudiée, il sera possible d'exploiter les propriétés optiques des métaux telles que la résonance plasmonique de surface (SPR) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). Plusieurs métaux possèdent une fréquence de plasma ω_p dans le domaine de l'ultraviolet (UV) tel que présenté dans le tableau suivant :

Tableau 2.1 Fréquence de plasma (ω_p) et début de la fréquence de transition interbande (ω_{inter}) de principaux métaux utilisés en SERS (West *et al.*, 2010).

Métal	**ω_p (λ_p)**	**ω_{inter} (λ_{inter})**
Au	8.9 eV (139 nm)	2.3 eV (539 nm)
Ag	9.2 eV (134 nm)	3.9 eV (318 nm)
Cu	8.7 eV (142 nm)	2.1 eV (590 nm)
Al	12.7 eV (98 nm)	1.4 eV (886 nm)

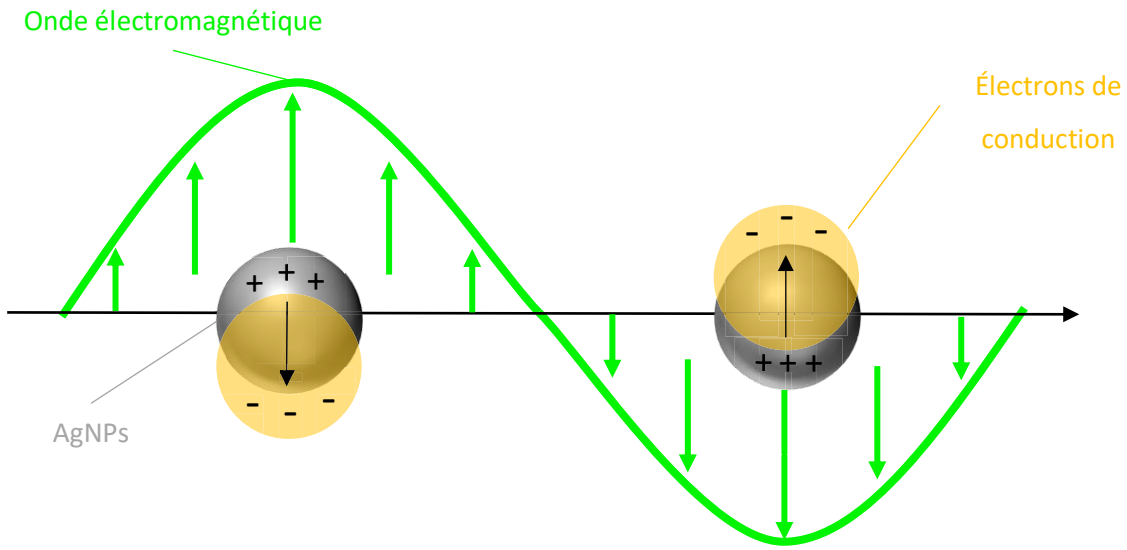
Par conséquent, la région d'intérêt se situe dans le domaine du visible et du proche-IR ($\omega < \omega_p$ | $\lambda > \lambda_p$, ce qui est particulièrement intéressant pour les techniques de spectroscopie vibrationnelle comme la spectroscopie Raman. Le tableau 2.1 présente également la fréquence de transition interbande (ω_{inter}) des principaux métaux. Des pertes associées à la transition des électrons de la bande de conduction vers la bande de valence sont particulièrement importantes lorsque la fréquence est au-dessus de la fréquence de transition interbande ($\omega > \omega_{inter}$).

Le champ électromagnétique (E_{in}) généré par une simple sphère métallique, dont le diamètre est inférieur à la longueur d'onde incidente, excitée par une source externe (E_0) (c.-à-d. faisceau laser) peut être exprimé par l'équation suivante (Jackson, 1999):

$$E_{in} = \frac{3\varepsilon_M}{\varepsilon(\omega)+2\varepsilon_M} E_0$$

Où $\varepsilon(\omega)$ correspond à la constante diélectrique du matériau constituant la sphère [F/m], définie elle-même par une composante réelle Re [$\varepsilon(\omega)$] et imaginaire Im [$\varepsilon(\omega)$], alors que ε_M correspond à la constante diélectrique du milieu d'immersion. Dans la situation où $\varepsilon(\omega) \approx -2\ \varepsilon_M$, le dénominateur s'approchera de 0 permettant d'obtenir une fraction considérablement élevée pour E_{in}. En respectant la condition où (1) la composante imaginaire Im [$\varepsilon(\omega)$] ≈ 0 lorsque (2) la composante réelle Re [$\varepsilon(\omega)$] $\approx -2\ \varepsilon_M$ pour une longueur d'onde donnée, les phénomènes d'absorption et de diffusion sont particulièrement élevés, ce qui est représentatif du phénomène de <u>résonance</u> (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).

Figure 2.5 Représentation de la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR) à la surface des nanoparticules d'argent (AgNPs). Inspiré de figure 7 (Pilot, R. *et al.*, 2019).



La résonance plasmonique de surface localisée (LSPR) est introduite afin de distinguer le phénomène de résonance des plasmons à l'interface d'une nanoparticule de celui à l'interface d'une surface plane : résonance plasmonique de surface (SPR). Lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec des nanoparticules d'argent (AgNPs), une oscillation collective des électrons de conduction en cohérence avec l'onde électromagnétique est observée causant une polarisation du système. L'attraction de Coulomb entre les charges négatives des électrons de conduction et les charges positives du noyau métallique agit en tant que force de restauration (Pilot, R. *et al.*, 2019). Une analogie importante peut être établie avec un oscillateur harmonique où les électrons de conduction (masse) oscillent en cohérence sous l'effet périodique de l'onde électromagnétique et de la force de restauration générée par l'attraction de Coulomb entre les charges négatives et positives (Schlücker, 2014).

2.3 Substrats SERS

Les substrats SERS font généralement référence à tous types de matériaux pouvant soutenir une résonance plasmonique et, par conséquent, une amplification SERS. Les métaux sont un choix évident étant donné les propriétés optiques introduites précédemment. Il est important de mentionner que d'autres matériaux ont également été étudiés pour leur potentiel intéressant en tant que substrats SERS, notamment les semiconducteurs, les diélectriques et le graphène. Cependant, ces matériaux ne seront pas davantage étudiés dans le cadre de ce mémoire. Les lecteurs intéressés sont invités à consulter la

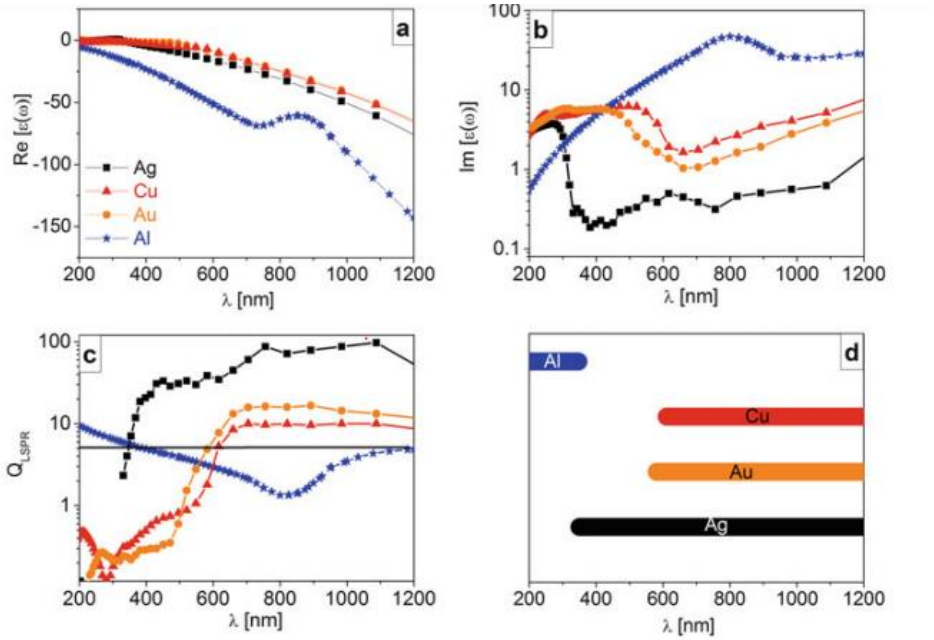
littérature pertinente à ce sujet : (Alessandri et Lombardi, 2016; Barros et Dresselhaus, 2014; Ji *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2010; Lombardi et Birke, 2014)

Le facteur de qualité (Q_{LSPR}) permet de définir l'amplitude de la résonance plasmonique et de comparer les performances de différents substrats métalliques dans une région spectrale (West *et al.*, 2010) :

$$Q_{LSPR} = \frac{-\mathrm{Re}\,[\varepsilon(\omega)]}{\mathrm{Im}\,[\varepsilon(\omega)]}$$

Une valeur de Q_{LSPR} d'au moins 5 est désirée pour un substrat métallique à une longueur d'onde donnée. Le facteur de qualité Q_{LSPR} est maximisé avec des valeurs négatives élevées de la composante réelle Re [ε(ω)], associée au phénomène de diffusion, et des faibles valeurs pour la composante imaginaire Im [ε(ω)], représentant les pertes du système. La prochaine figure permet de présenter les différentes valeurs associées à la composante réelle et imaginaire des principaux métaux exploités en SERS en fonction de la longueur d'onde de même que leur région d'intérêt où une performance considérable est attendue (Q_{LSPR} > 5).

Figure 2.6 Propriétés des métaux communément utilisés en SERS : Ag **(noir)**, Cu **(rouge)**, Au **(jaune)** et Al **(bleu)**. Composante réelle Re [ε(ω)] **(a)** et composante imaginaire Im [ε(ω)] de la constante diélectrique **(b)** en fonction de la longueur d'onde. Le facteur de qualité (Q_{LSPR}), dépendamment de la longueur d'onde **(c)**, permet de discriminer les zones d'intérêt de chacun des métaux, Q_{LSPR} > 5 **(d)**. Reproduit avec permission de (Pilot, Roberto *et al.*, 2018).



Les points suivants peuvent être soulignés à partir de la figure 2.6 :

- Les valeurs de la composante réelle Re [$\varepsilon(\omega)$] sont négatives dans le domaine du visible et du proche-infrarouge pour tous les métaux, respectant l'un des critères pour observer le phénomène de résonance. (Fig. 2.6 a), p.29)
- L'argent est le métal avec la plus faible composante imaginaire Im [$\varepsilon(\omega)$] dans le domaine du visible et, par conséquent, possède les pertes les plus faibles et les valeurs attendues d'amplification les plus élevées. Cependant, au-dessus de 600 nm, lorsque l'on dépasse les valeurs de fréquence de transition interbande [ω_{inter} (λ_{inter})] de l'or et du cuivre (Tab. 2.1, p.27), la différence entre les valeurs de Im [$\varepsilon(\omega)$] devient négligeable. L'or et le cuivre sont alors considérés comme étant des métaux pertinents dans le proche-infrarouge. Le cas de l'aluminium est intéressant puisque Im [$\varepsilon(\omega)$] est faible dans le domaine de l'ultraviolet. Par conséquent, l'aluminium est considéré comme un choix primordial pour l'UV-SERS. (Fig. 2.6 b), p.29) (Pilot, Roberto *et al.*, 2018).
- À partir du facteur de qualité Q_{LSPR}, il est possible de soutenir les affirmations effectuées précédemment (Fig. 2.6 c) et d), p.29):
    - L'aluminium est pertinent uniquement dans l'ultraviolet (<300 nm).
    - L'argent fournit les meilleures performances dans le visible.
    - Les performances de l'or et du cuivre rencontrent celles de l'argent au-dessus de 600 nm.

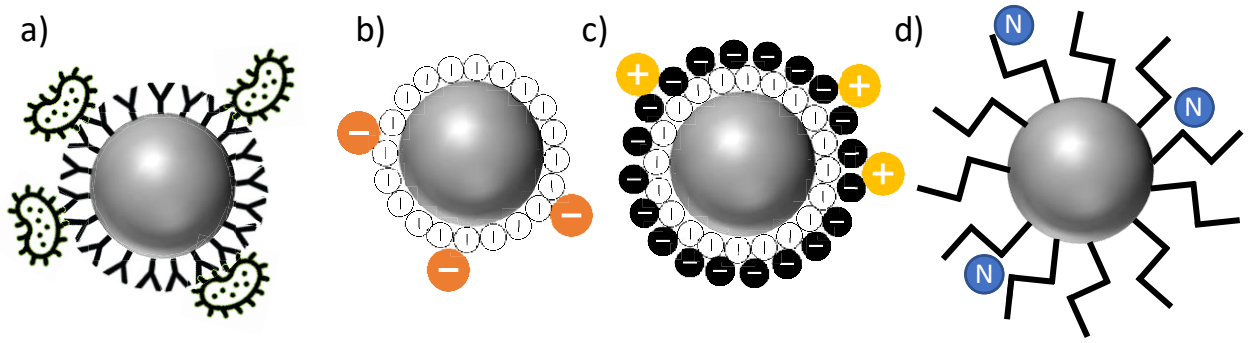
Davantage de considérations doivent être prises en compte outre la performance. Notamment, le coût, la stabilité et la facilité de fabrication. L'argent et l'or sont les candidats les plus populaires pour leur stabilité supérieure comparée à celle du cuivre et de l'aluminium (Sharma *et al.*, 2012). L'argent demeure le choix le plus populaire étant donné sa versatilité, sa simplicité de fabrication et ses performances. L'or est particulièrement pertinent au domaine biomédical considérant sa faible cytotoxicité et sa stabilité chimique particulièrement élevée (Kunzmann *et al.*, 2011). Des études sur l'effet de l'oxydation des substrats SERS telles que l'argent (Han, Y. *et al.*, 2011), le cuivre (Chan *et al.*, 2007) et l'aluminium (Gérard et Gray, 2014) ont d'ailleurs démontré une diminution des facteurs d'amplification. Il est, par conséquent, primordial d'évaluer tous ces paramètres et le contexte d'application lors de la sélection du substrat SERS.

2.3.1 Fabrication des substrats SERS

Plusieurs types de substrats SERS sont disponibles et classifiés en trois catégories principales : suspension colloïdale, surfaces nanostructurées et les substrats flexibles (Kahraman *et al.*, 2017). Les plus populaires

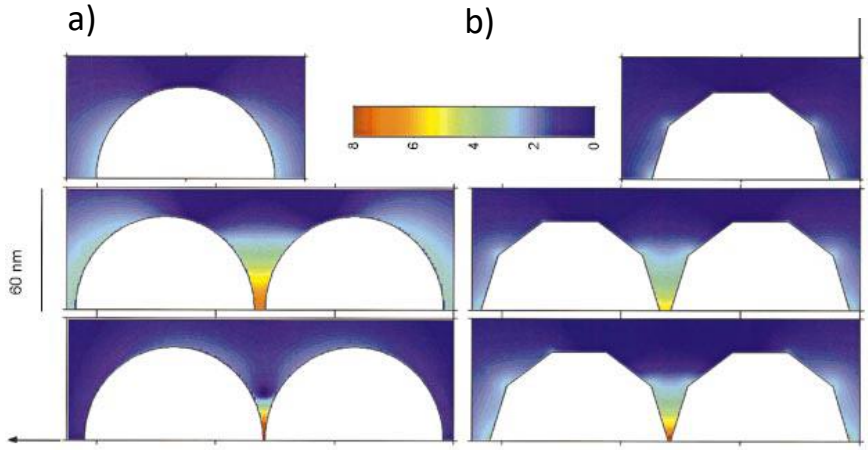
sont indéniablement les substrats SERS à base de suspension colloïdale étant donné leur simplicité de fabrication, leur accessibilité, la facilité à moduler leur résonance plasmonique et à fonctionnaliser leur surface. Dans le cas des nanoparticules, elles sont particulièrement adaptées pour analyser les substances liquides et il est possible de modifier la charge de leur surface pour favoriser l'attraction électrostatique entre l'analyte et le substrat métallique. Les nanoparticules d'argent (AgNPs), de charge cationique (+), possèdent une excellente affinité pour les molécules de charge anionique (-). Il est d'ailleurs possible de greffer des ligands spécifiques à certaines molécules afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité des analyses SERS.

Figure 2.7 Schéma de différents types de fonctionnalisation des nanoparticules d'argent (AgNPs) : a) AgNPs + ligand anticorps pour la détection d'antigène spécifique, b) AgNPs cationique (+) d'affinité électrostatique pour les **molécules anioniques**, c) AgNPs stabilisés avec des anions citrate **(-)** d'affinité électrostatique pour les **molécules cationiques**, d) AgNps + ligand apolaire C_xH_y d'affinité pour les **molécules hydrophobes**.



La résonance plasmonique peut être adaptée en modifiant la taille, la morphologie et la composition des nanoparticules (Lee, K.-S. et El-Sayed, 2006). Un agent agrégant (p. ex. KNO_3, NaCl, etc.) peut également être utilisé pour favoriser l'agglomération des nanoparticules préalablement à la prise de mesures. Ceci permet de favoriser la formation de points chauds (« hot-spots »), région située dans l'interstice entre deux nanoparticules, afin d'offrir des facteurs d'amplification significativement plus élevés que sur le reste de la surface du substrat (potentiellement de l'ordre de 10^{11}) (Xu *et al.*, 2000). La figure suivante présente d'ailleurs les facteurs d'amplification observés pour différentes configurations d'AgNPs :

Figure 2.8 Facteur d'amplification électromagnétique (EM) pour six configurations d'AgNPs différentes : a) AgNPs de forme sphérique et b) AgNPs de forme polygonale. La longueur d'onde incidente est de 514,5 nm avec une polarisation verticale et les AgNPs ont toutes un diamètre maximal de 90 nm. Noter l'échelle logarithmique de couleur chaude (EM élevé) vers une couleur froide (EM faible) couvrant l'intervalle : [10^0-10^8]. La première rangée représente une nanoparticule isolée. Le dimère de la troisième rangée est séparé d'une distance de 1 nm alors que celle du milieu est de 5,5 nm. Reproduite avec permission de (Xu *et al.*, 2000).



L'illustration permet de constater que EM est significativement plus élevé dans l'interstice du dimère (deux dernières rangées) en contraste de la nanoparticule isolée. EM est distribué vaguement aux extrémités de la nanoparticule isolée dans le sens de la polarisation (horizontal). D'ailleurs, il est possible de remarquer que, malgré la forme polygonale des AgNPs (Fig. 2.8 b), p.32), il n'y a pas de changement drastique sur EM. Cependant, il est important de noter qu'une augmentation de la distance de l'interstice à 5,5 nm entre le dimère (Fig. 2.8, p.32) impacte considérablement les valeurs d'EM obtenues. Selon l'échelle de couleur, des valeurs de 10^8 ont pu être obtenues pour l'interstice de 1 nm alors qu'elles sont de 10^6 pour une distance supérieure de 5,5 nm. L'effet de la distance sur EM est communément reporté dans la littérature (Aroca, 2006; Le Ru, E. et Etchegoin, 2008; Pilot, R. *et al.*, 2019; Pilot, Roberto *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2000). La formule ci-contre permet de réaliser l'impact de la distance d sur le facteur d'amplification électromagnétique d'une molécule à la position a (Pilot, R. *et al.*, 2019):

$$EF_{EM} = \left[\frac{a}{a+d}\right]^{12}$$

Elle suggère qu'il suffit que d'une faible augmentation de la distance (d) pour diminuer drastiquement le facteur d'amplification électromagnétique EF_{EM}. C'est pour cette raison qu'il est conseillé de réduire la

distance entre l'analyte et le substrat SERS en dessous de 10 nm en favorisant leur affinité. Les « hot-spots » sont cruciales pour avoir permis la détection d'une seule molécule avec la technique SERS (Kneipp *et al.*, 1997; Nie et Emory, 1997). Ils sont également reconnus comme étant la source majeure du signal observé en SERS. Ainsi, il suffit qu'une infime portion du substrat SERS soit illuminée, exactement à l'endroit où les molécules se retrouvent dans un « hot-spot », pour fournir un signal SERS adéquat. Selon Ru et ses collaborateurs, environ 0,64% des molécules, assumant une couverture uniforme du substrat SERS, sont responsables pour la majorité du signal obtenu (2006). Cependant, cette variation spatiale affecte la reproductibilité des mesures en pratique puisque le signal moyen des mesures SERS est nécessairement plus faible que celui lorsqu'un « hot-spot » est rencontré. En fonction de sa nature, de sa structure, de sa taille et de sa forme, la variabilité des signaux obtenus à partir d'un substrat SERS spécifique sera considérable. Le problème de reproductibilité en SERS est d'ailleurs l'une des raisons pour laquelle la technique, malgré son énorme potentiel, n'est pas communément reconnue. Le « SERS uncertainty principle » permet de simplifier la relation entre la reproductibilité et l'amplification. En général, plus un substrat permet d'obtenir des signaux SERS reproductibles, moins les facteurs d'amplification seront élevés (Brown et Milton, 2008) :

$$Reproductibilité\ du\ substrat\ \times Facteur\ d'amplification \approx Constante$$

Les suspensions colloïdales sont, par conséquent, reconnues comme étant des substrats SERS fournissant des facteurs d'amplification considérables au détriment de leur reproductibilité due à leur hétérogénéité de surface élevée. La synthèse d'AgNPs la plus reconnue est celle de Lee et Meisel (1982). Elle utilise le nitrate d'argent comme source d'argent et le citrate de sodium à la fois comme agent réducteur et comme agent stabilisant. Les colloïdes synthétisés demeurent en solution par répulsion électrostatique les uns des autres à l'aide à l'agent stabilisant qui inhibe l'agrégation. La réaction chimique de formation des colloïdes n'est pas tout à fait comprise et continue d'être étudiée. Les lecteurs sont tout de même référés à des articles qui approfondissent le sujet (Munro *et al.*, 1995; Pillai et Kamat, 2004).

L'alternative des surfaces nanostructurées améliore la reproductibilité des analyses, mais ne fournit pas de facteurs d'amplification aussi élevés et n'est pas reconnue comme étant autant accessible. L'une des techniques est tout simplement d'attacher des nanoparticules via des liaisons covalentes sur une surface prétraitée avec des groupements thiols (méthode dénommée « self-assembly »). Également, des

techniques nanolithographiques, par exemple à faisceau d'électrons, sont régulièrement utilisées pour créer des substrats ordonnés et homogènes (Fan *et al.*, 2011).

La troisième catégorie des substrats flexibles est particulièrement intéressante pour un contexte forensique. Il est possible de citer les papiers et les filtres fonctionnalisés qui permettent de récolter les traces chimiques sur tout type de surfaces et d'effectuer directement les prises de mesure SERS étant donné la présence de matériel plasmonique intégré au substrat (Betz *et al.*, 2014). Prenons l'exemple d'une trace de poudre blanche sur le coin d'une table suspectée d'être une substance illicite. À l'aide d'un substrat SERS flexible comme un tissu ou un écouvillon, la stratégie serait de permettre aux intervenants de prélever directement une partie de la trace et de mesurer sur place le spectre SERS permettant l'identification du stupéfiant sur la scène de crime. Ceci permettrait d'améliorer la stratégie actuelle qui demeure de réaliser un test d'orientation, puis d'envoyer un échantillon aux laboratoires pour effectuer une identification formelle à l'aide d'un test confirmatoire.

Natan a proposé des caractéristiques importantes à considérer lors de la fabrication d'un substrat métallique pour l'emploi SERS, entre autres (2006):

- « Spot-to-spot reproducibility » < 20% sur au moins 10 mm^2. Cette reproductibilité est évaluée en observant la variabilité des mesures issue de la modification de la surface échantillonnée.
- Reproductibilité substrat-substrat < 20% entre au moins 10 substrats. Cette reproductibilité est évaluée en observant la variabilité des mesures issue de la modification du substrat.
- Substrat de grande surface. Particulièrement important lors de l'emploi d'un spectromètre portable ne possédant pas de microscope intégré.
- Stabilité sur plusieurs semaines voire quelques mois et inaltérée par l'emploi de solvants communs.
- Accessibilité et abordable
- Facteur d'amplification > 10^5 sur l'ensemble de la surface de travail. Il est préférable dans le contexte d'application d'obtenir des facteurs d'amplification plus faibles et uniformes que des facteurs d'amplification élevés, mais non reproductibles.

L'un des enjeux actuels concernant l'emploi de la technique SERS pour un contexte d'application donné, comme la science forensique, est l'énorme quantité de substrats SERS disponibles et le manque d'uniformité dans le choix du substrat. Chaque praticien est libre de choisir un substrat plutôt qu'un autre et de répertorier les résultats obtenus avec ses conditions particulières. Il devient alors compliqué de

comparer les résultats entre différents laboratoires et de bâtir une librairie des spectres de référence. Chaque substrat possède une résonance plasmonique et une spécificité qui lui est propre en fonction de la nature des AgNPs, de leur géométrie et de leur arrangement. Sans mentionner que parmi les centaines de substrats SERS actuellement disponibles, seulement quelques-uns ont subi une validation concrète (reproductibilité, robustesse, etc.). D'ailleurs, celle-ci est généralement réalisée dans des laboratoires avec des instruments de haute gamme. L'emploi d'un spectromètre portable implique de faire des compromis au niveau des performances telles que la résolution. Le prochain chapitre présente la méthodologie et les considérations pratiques entreprises pour chacun des objectifs de ce projet : 1) l'optimisation de la synthèse des AgNPs et 2) la validation de la méthode SERS.

CHAPITRE 3
Méthodologie

3.1 Optimisation de la synthèse d'AgNPs

3.1.1 Réactifs

Le sulfate d'argent, le D-glucose, le citrate de sodium et l'acide nitrique ont tous été procurés chez Fisher Chemical. Les solutions ont été préparées par dissolution ou dilution dans l'eau distillée aux concentrations désirées.

3.1.2 Synthèse des nanoparticules d'argent

La synthèse des nanoparticules d'argent a été réalisée à partir d'une réduction au four à micro-ondes proposée par Leona (2009). Brièvement, 12,5 mL d'une solution de 0,5 mM de sulfate d'argent est ajouté à un récipient de Teflon, préalablement nettoyé à l'acide nitrique 30 % (v/v), composé à 100% de PTFE, résistant aux variations de pression et excellent isolant thermique de la marque JVLAB. Un volume de 1 mL d'une solution de D-glucose 1 % (p/v) et 0,5 mL d'une solution de citrate de sodium 1 % (p/v) sont également rajoutés au récipient avant que celui-ci soit refermé, bien mélangé et positionné au centre du four à micro-ondes. Une attention particulière a été apportée à ne pas trop fermer la valve sur le couvercle du récipient afin de ne pas causer un excès de pression à l'intérieur. Cette étape est particulièrement importante pour éviter les blessures dues à la libération importante de vapeurs lors de l'ouverture du contenant.

Étant donné l'emploi d'un four à micro-ondes conventionnel (Panasonic Inverter 1200 W – modèle NN-SD671S) plutôt qu'un système de digestion à micro-ondes typiquement retrouvé dans les laboratoires, un design expérimental a été élaboré afin d'optimiser les facteurs de chauffage : Niveau de puissance (W) et Temps de chauffage (s) à cinq niveaux pour un total de 25 expériences (2^5). La gamme de niveaux de puissance étudiés est de 720 W à 1200 W alors que celle du temps de chauffage est de 30 s à 150 s. Toutes les solutions devraient fournir une couleur jaune-ambre signifiant la synthèse d'AgNPs selon les observations de Leona (2009). Après avoir effectué la réaction au four à micro-ondes aux paramètres sélectionnés, la solution est rapidement transvidée dans un tube Falcon de 15 mL préalablement enrobé de papier d'aluminium, puis transférée dans un bain de glace. La solution est subséquemment déplacée dans un réfrigérateur à l'abri de la lumière et est considérée comme étant stable pendant plusieurs mois

sous ces conditions (Leona, 2009). Le récipient de Teflon est ensuite rincé à l'eau et remplit d'acide nitrique 30 % (v/v) pendant 60 s avant d'être réutilisé ultérieurement.

3.1.3 Caractérisation par spectrophotométrie UV-VIS

Les solutions d'AgNPs synthétisées dans le cadre du design expérimental ont été caractérisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS Cary 60 d'Agilent dans la gamme de 300 à 600 nm en utilisant une cuvette de quartz de 10 mm de largeur. Les solutions d'AgNPs ont été diluées d'un facteur de 25 préalablement à la mesure afin de respecter les limites de la loi de Beer-Lambert (Abs < 1).

3.1.4 Caractérisation par microscopie électronique à transmission (TEM)

Des images des solutions d'AgNPs ont été prises au microscope électronique à transmission Phillips 208S à 110 kV. Une goutte de solution d'AgNPs, préalablement diluée dans du méthanol par un facteur de 10, a été déposée sur une grille Ted Pella. La dilution dans le méthanol permet d'écarter la perturbation potentielle sur la prise d'image que pourrait causer l'évaporation de l'eau sous le faisceau d'électrons en plus de réduire la concentration d'AgNPs.

3.1.5 Traitement de données UV-vis et TEM

Les spectres UV-vis des solutions d'AgNPs synthétisées ont été traités à l'aide du logiciel d'analyse graphique OriginPro™ 2019 d'OriginLab pour en extraire les caractéristiques pertinentes à l'optimisation : l'absorbance, la position du maxima (nm) et la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la bande (nm). Les graphiques présentés dans le cadre de l'optimisation de la synthèse d'AgNPs (Fig.4.2, p.45) ont été réalisés à l'aide du logiciel Design Expert 11 de Stat-Ease.

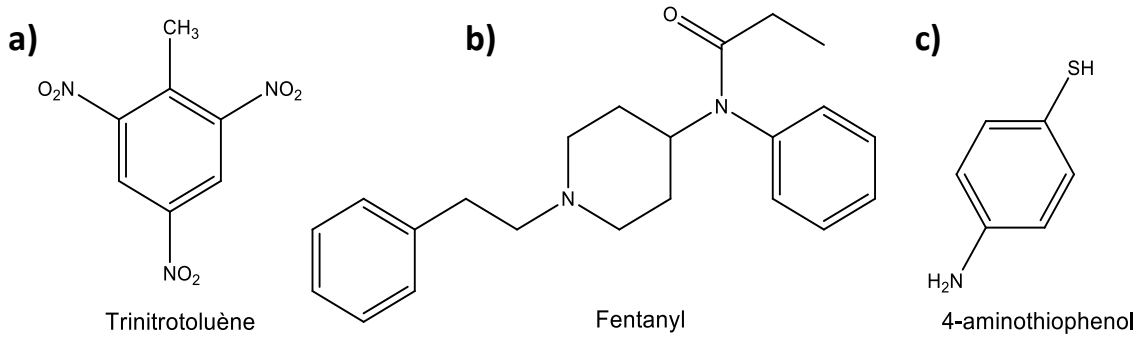
L'application ImageJ développée par les Instituts américains de la santé (NIH), libre d'accès, a été utilisée pour le traitement d'images obtenues au TEM. Un échantillonnage de 80 colloïdes a été réalisé systématiquement sur l'image présentée (Fig. 4.4, p.49) pour obtenir un diamètre moyen représentatif. Les données récoltées ont ensuite été analysées au logiciel OriginPro™ 2019.

3.2 Validation de la méthode SERS

3.2.1 Réactifs

Le nitrate de potassium (KNO_3) a été acquis chez Fisher Chemical. Une solution de KNO_3 0,5 M a été réalisée dans de l'eau distillée. Le 4-ATP a servi de spécimen contrôle dans le cadre de ce projet alors que le fentanyl et le TNT agissent à titre d'analyte d'intérêt forensique. Le 4-aminothiophénol (4-ATP) a été acheté chez TCI America et une solution de 100 ppm a été réalisée dans du méthanol. Le fentanyl a été acheté chez Cayman Chemical comme solution standard de 100 ppm dans le méthanol sous sa forme hydrochlorate. La trinitrotoluène (TNT) a été acheté chez SPEX CertiPrep comme solution standard de 1000 ppm dans le méthanol : Acétonitrile (9:1). Le TNT et le fentanyl ne sont pas des molécules reconnues comme étant de bons diffuseurs Raman. Ils ont justement été sélectionnés comme candidat pour représenter leur catégorie respective (explosif / stupéfiant) dans cette étude. Il est attendu que les spectres SERS pour les molécules d'intérêt forensique soient de moindre qualité comparée à celle des spectres du 4-ATP.

Figure 3.1 Structure chimique des analytes utilisés dans le cadre ce projet : **a)** le trinitrotoluène (TNT), **b)** le fentanyl et **c)** le 4-aminothiophénol (4-ATP).



3.2.2 Activation des AgNPs

À partir de la solution d'AgNPs préparée précédemment dans le cadre de l'optimisation de la synthèse des AgNPs, un volume de 1 mL a été prélevé puis transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Une centrifugation à 12000 RPM pendant 10 min (Mini-centrifuge™ - Fisherbrand) a été réalisée afin de séparer le culot d'AgNPs du surnageant, principalement composé de citrate de sodium, et de le remplacer par de l'eau distillée. L'objectif étant de minimiser considérablement l'interférence des ions citrate dans l'acquisition des spectres Raman. La solution d'AgNPs activés est entreposée dans un réfrigérateur à l'abri de la lumière et est considérée stable pendant plusieurs semaines.

3.2.3 Prise de mesures Raman et SERS

Deux spectromètres Raman ont été employés dans le cadre de ce projet : un spectromètre Raman portable CORA 5500™ d'Anton Paar et un microspectromètre Raman de laboratoire DXR³ ™ de Thermosfisher afin de comparer leur performance dans le cadre d'une identification de spécimens d'intérêt forensique (TNT et fentanyl).

Les spectres SERS ont été collectés en déposant 1 μL d'AgNPs sur une lame de verre recouverte de papier d'aluminium, suivi de 0,5 μL du spécimen et 0,5 μL de KNO_3. Dans le but d'effectuer une comparaison intègre et représentative entre le spectre Raman et SERS du même analyte, les spectres Raman ont été mesurés dans les mêmes conditions que ceux en SERS, hormis la présence d'AgNPs et de KNO_3. Par conséquent, 0,5 μL de l'analyte a été déposé sur la lame de verre recouverte d'aluminium suivi de 1,5 uL d'eau distillée pour obtenir une concentration similaire lors des mesures effectuées en spectroscopie Raman.

3.2.3.1 Spectromètre CORA 5500™

Le spectromètre Raman CORA 5500™ possède une batterie lithium-ion lui permettant d'être transporté à l'extérieur du laboratoire. Il est composé d'un laser à double bande permettant de permuter rapidement entre un laser de 532 nm et un laser de 785 nm. Le laser de 532 nm est exclusivement utilisé dans le cadre de ce projet avec un détecteur CCD de 2048 px pour l'acquisition des spectres. Le réseau à diffraction à phase volumique f/2 permet d'obtenir une résolution FWHM entre 9 et 12 cm^{-1} et une tache focale de 120 μm pour le laser de 532 nm. Tous les spectres ont été mesurés avec une puissance du laser de 532 nm à 50 mW, un temps d'intégration de 500 ms, sauf le fentanyl qui a nécessité 1000 ms, et trois accumulations. Étant donné l'absence de microscope sur le spectromètre portable CORA 5500™, aucun focus visuel n'a pu être réalisé. Le focus a plutôt été effectué en accumulant successivement des spectres Raman du spécimen tout en modifiant manuellement la profondeur (Z) du faisceau et en observant la dynamique de l'intensité de la bande la plus intense. Ainsi, le focus a été fixé lorsque la valeur de l'intensité de la bande était la plus élevée pour ce spécimen et recommencé pour chacun des spécimens suivants.

3.2.3.2 Spectromètre DXR³ ™

Le microspectromètre Raman DXR³ ™ de Thermofisher est équipé d'un microscope avec une caméra intégrée au système optique et une platine motorisée. Le laser à 532 nm, dépolarisé et sans polarisation à l'analyseur, a été sélectionné avec un réseau de diffraction de densité de rainures équivalente à 900

gr/mm permettant une résolution estimée entre 2,7 et 4,2 cm^{-1}. Les spectres ont été enregistrés avec une fente d'ouverture de 25 μm et un objectif de 20X/0.50 NA de longue distance de travail fournissant une tache focale de 1,30 μm sur l'intervalle de 500 à 3500 cm^{-1}. Le focus a été réalisé visuellement, à l'aide de la caméra Atlus intégrée au microscope, au centre de la goutte. Tous les spectres ont été mesurés avec le laser à 532 nm de puissance de 1 mW. Le fentanyl et le TNT ont nécessité 3 acquisitions de 3 s pour un total de 9 s alors que le 4-ATP a été mesuré avec 3 acquisitions de temps d'intégration de 0,5 s pour un total de 1,5 s. Aucune correction du bruit de fond, de la ligne de base ou de la fluorescence n'a été effectuée lors de l'acquisition.

Une vérification quotidienne a été réalisée avec un échantillon de polystyrène pour les deux spectromètres. Le spectromètre CORA 5500™ a été calibré mensuellement avec un standard de benzonitrile alors que la calibration du spectromètre DXR³ ™ est réalisée hebdomadairement avec un dispositif de calibration et d'alignement intégré.

3.2.4 Évaluation de la précision au niveau de la répétabilité

L'évaluation de la précision au niveau de la répétabilité a été le premier critère évalué dans le cadre de la validation de la méthode SERS. Elle permet d'étudier la variabilité de l'aspect dynamique des mesures SERS. Ainsi, la *répétabilité* a été estimée par la déviation standard relative (%RSD) sur des mesures successives de la molécule contrôle, le 4-ATP, dans des conditions en tout point identiques à l'aide du spectromètre CORA 5500™. En tout, 50 spectres consécutifs ont été enregistrés. Trois réplicas ont été effectués afin de vérifier la reproductibilité de cette procédure. Il est attendu que l'évaluation de la répétabilité avec différents analytes serait intéressante. Nécessairement, les résultats obtenus avec le 4-ATP ne reflètent pas la réalité avec des molécules peu sensibles en Raman et de moins bonne affinité pour les AgNPs comme le TNT et le fentanyl. Cependant, il a été jugé davantage pertinent de limiter l'étude de la répétabilité avec le 4-ATP et de concentrer l'étude des spécimens d'intérêt forensique au niveau de la reproductibilité. Par le fait même, l'étude de la répétabilité est limitée au spectromètre portable CORA 5500™. Le spectromètre de laboratoire DXR³ ™ est employé uniquement dans le but de comparer les performances entre les deux spectromètres lors de l'étude de la reproductibilité du TNT et du fentanyl.

3.2.5 Évaluation de la précision au niveau de la reproductibilité

L'évaluation de la précision au niveau de la reproductibilité a ensuite été effectuée avec le 4-ATP et les molécules d'intérêt forensique (TNT et fentanyl). Par définition, la *reproductibilité* correspond à la

précision estimée en faisant varier les conditions de prise de mesures (matériel, réactifs, opérateur) tout en conservant les mêmes réglages instrumentaux. Plus particulièrement, c'est la *reproductibilité « spot-to-spot »* qui a été étudiée dans le cadre de ce projet afin de vérifier l'impact de l'hétérogénéité du substrat métallique (AgNPs) sur la précision des mesures de l'analyte. Ainsi, la reproductibilité « spot-to-spot » est définie comme étant la précision estimée à la suite de la modification de la région du substrat métallique irradiée par le laser participant dans l'acquisition des spectres. L'étude de la reproductibilité a été réalisée à l'aide du spectromètre portable CORA 5500™ ainsi que du microspectromètre de laboratoire DXR^3 ™ de Thermofisher en mesurant 15 spectres sur l'ensemble de la goutte. L'objectif est de comparer la précision obtenue avec un spectromètre portable (CORA 5500™) avec celle d'un spectromètre fixe de laboratoire (DXR^3 ™). Nécessairement, des ajustements ont dû être réalisés. Par exemple, étant donné l'absence d'un plateau motorisé sur le spectromètre CORA 5500

™, les spectres ont été enregistrés en déplaçant manuellement la lame de verre de sorte à modifier la surface de la goutte exposée au faisceau du laser. Dans le cas du spectromètre DXR^3 ™, la modification de la surface exposée a été réalisée à l'aide d'un plateau motorisé pour enregistrer les spectres sur l'ensemble de la goutte.

3.2.6 Estimation de la limite de détection du fentanyl et du TNT

L'estimation de la *limite de détection* pour le fentanyl et le TNT a été réalisée par l'acquisition des spectres de dilutions subséquentes des solutions standards reçues (fentanyl 100 ppm et TNT 1000 ppm) dans du méthanol de sorte à produire les solutions suivantes : 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm pour le fentanyl et 100 ppm, 10 ppm et 1 ppm pour le TNT. Par conséquent, les dilutions sérielles effectuées sont d'un facteur de 10 pour le TNT et de facteur 2 pour le fentanyl (outre la solution de 10 ppm). La précision des résultats a été considérée par l'acquisition de 10 spectres sur l'ensemble de la goutte pour chacune des solutions.

3.2.7 Estimation du facteur d'amplification (EF)

Les facteurs d'amplification ont été estimés à partir des spectres SERS et Raman de la solution de 4-ATP (100 ppm), fentanyl (100 ppm) et TNT (1000 ppm). Les spectres SERS et Raman ont été mesurés dans les conditions présentées précédemment (Section 3.2.3.1, p.39). La formule du calcul du EF est présentée ci-contre :

$$EF = \frac{I_{SERS}/c_{SERS}}{I_{Raman}/c_{Raman}}$$

Où I_{SERS} et I_{Raman} correspond respectivement à l'intensité de la bande sélectionnée sur le spectre SERS et sur le spectre Raman alors que c_{SERS} et c_{Raman} représente la concentration de l'analyte pour chaque technique.

3.2.8 Traitement de données des spectres Raman et SERS

Tous les spectres enregistrés sur le logiciel d'Anton Paar pour le spectromètre CORA 5500™ et celui d'Omnic™ de Thermofisher pour le spectromètre DXR³ ™ n'ont subi aucun prétraitement lors de l'acquisition. Une zone d'intérêt a été sélectionnée entre 600 et 2000 cm^{-1} pour l'analyse et l'interprétation des résultats. Le logiciel OriginPro™ 2019 a été utilisé pour compiler les données et produire les graphiques. Les spectres bruts sélectionnés ont été transférés au logiciel Unscrambler™ pour effectuer un prétraitement des données sous la forme d'une normalisation « Standard normal variate » (SNV) dans le cas de l'évaluation de la reproductibilité et de l'estimation de la limite de détection. Cette méthode de prétraitement est issue de la différence entre chaque variable par la moyenne du spectre. La différence est ensuite divisée par l'écart type du spectre permettant de corriger indépendamment chaque spectre.

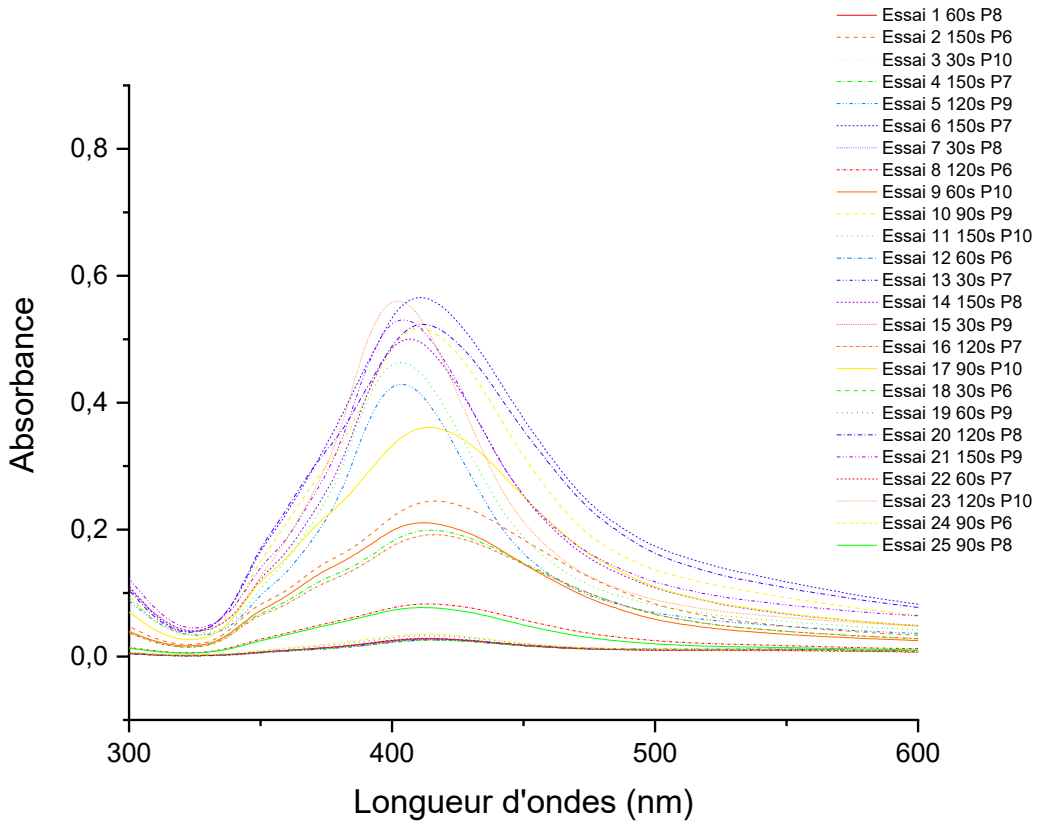
CHAPITRE 4

Résultats et discussion

4.1 Optimisation de la synthèse d'AgNPs

L'optimisation de la synthèse des AgNPs a été effectuée à l'aide d'un design expérimental. Après avoir synthétisé les solutions d'AgNPs en faisant varier leurs paramètres de synthèse (niveau de puissance (W) et temps de chauffage (s)), il a été possible de les comparer à l'aide d'une caractérisation par spectrophotométrie UV-vis. Les facteurs de réponse obtenus par spectrophotométrie UV-vis sont extraits des spectres et permettent ensuite de déterminer quels sont les paramètres qui ont permis la synthèse de la solution qualifiée d'optimale. Une fois sélectionnée, la solution optimale est caractérisée par microscopie électronique à transmission pour qualifier la distribution des AgNPs.

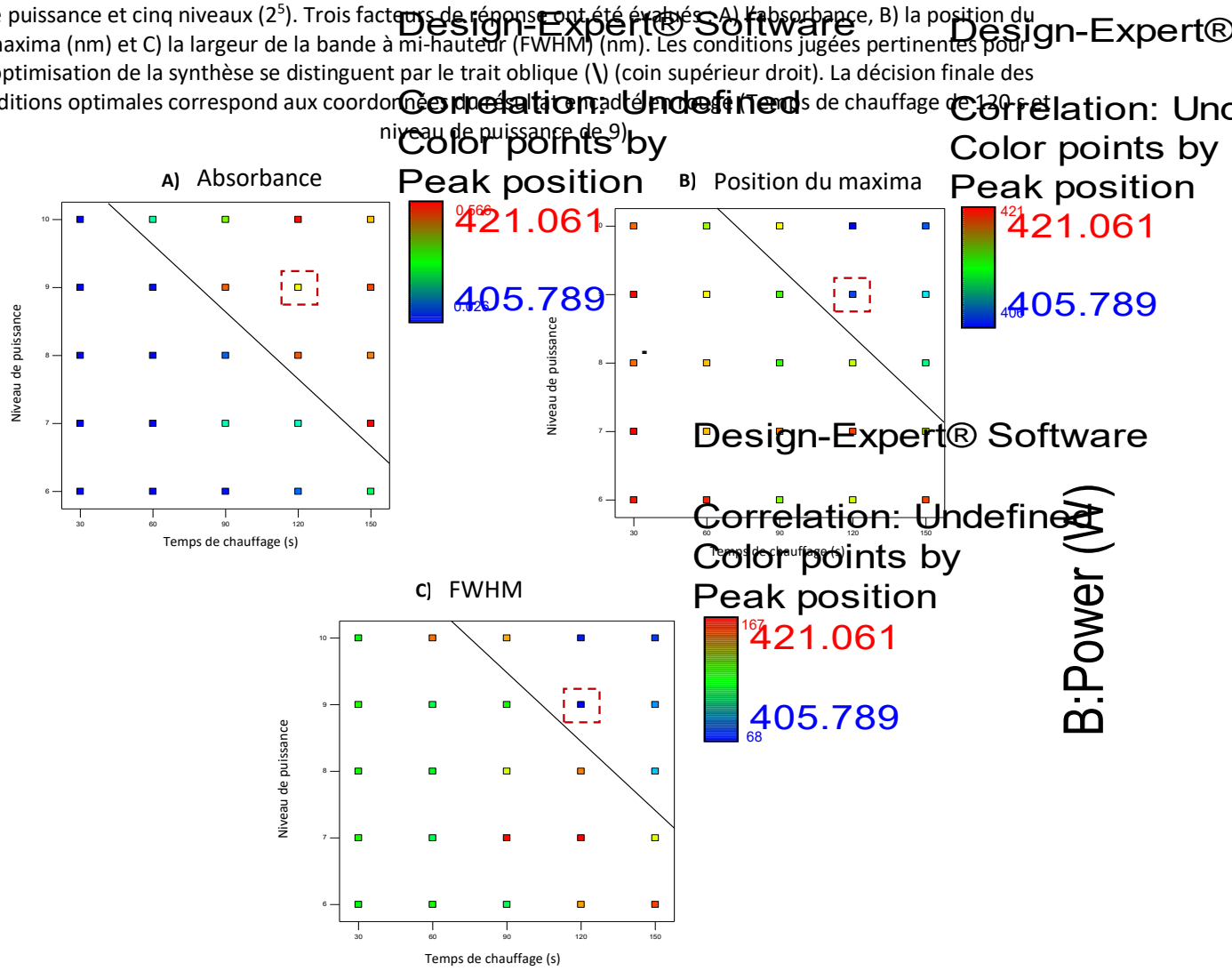
Figure 4.1 Spectres UV-visible des solutions d'AgNPs synthétisées. Les spectres sont tous sur une échelle commune et n'ont pas été normalisés.



Un design expérimental composé de 2 facteurs, niveau de puissance (W) et temps de chauffage (s), à 5 niveaux a été effectué pour déterminer les paramètres de synthèse optimaux et leurs effets sur la concentration et la distribution des colloïdes (Fig. 4.2, p.45). Le facteur de puissance est représenté en cinq niveaux : 6, 7, 8, 9 et 10 correspondants respectivement à une puissance de 720 W, 816 W, 912 W, 1008 W et 1200 W alors que le temps de chauffage est divisé en intervalle de 30 s (30 s, 60 s, 90 s, 120 s et 150 s). 3 facteurs de réponse ont été évalués à l'aide de la méthode de caractérisation par spectrophotométrie UV-Vis soient l'absorbance (Fig. 4.2 a), p.45), la position du maxima (nm) (Fig. 4.2 b), p.45) et la largeur de la bande à mi-hauteur (FWHM) (nm) (Fig. 4.2 c), p.45).

Chaque solution préparée a fourni une coloration jaune ambrée telle que décrite selon les observations de Leona (2009). Une bande, dont le maxima est centré autour de 400 nm, est présente pour chacune des solutions indiquant que tous les couples du design expérimental ont permis la synthèse d'AgNPs (Fig. 4.1, p.43). De plus, il n'y a pas de décalage significatif au niveau de la position du maxima entre les différentes solutions signifiant que, malgré la modification des conditions expérimentales, le diamètre des AgNPs demeure similaire. Les spectres de certaines solutions (Essai 1, 3, 7, 12, 13, 15, 18, 19, 22 et 24) possèdent tout de même une intensité très faible. Il est, par conséquent, attendu que leur valeur d'absorbance soit relativement faible, justifiant également une concentration en AgNPs négligeable.

Figure 4.2 Représentation graphique du design expérimental avec deux facteurs : temps de chauffage (s) et niveau de puissance et cinq niveaux (2^5). Trois facteurs de réponse ont été évalués : A) l'absorbance, B) la position du maxima (nm) et C) la largeur de la bande à mi-hauteur (FWHM) (nm). Les conditions jugées pertinentes pour l'optimisation de la synthèse se distinguent par le trait oblique (\) (coin supérieur droit). La décision finale des conditions optimales correspond aux coordonnées représentant un haut temps de chauffage (120 s et niveau de puissance de 9).



Une tendance est observée pour chacun des facteurs de réponse. Une augmentation des deux facteurs (niveau de puissance et temps de chauffage) est directement proportionnelle à la valeur d'absorbance (Fig. 4.2 A) et indirectement proportionnelle à celle de la position du maxima (Fig. 4.2 B) ainsi que de la largeur de la bande (FWHM) (Fig. 4.2 C). Ces résultats supportent l'hypothèse que, d'après la loi de Beer-Lambert qui stipule que la concentration d'analyte est directement proportionnelle à l'absorbance (Swinehart, 1962), l'augmentation des deux facteurs favorise la synthèse des colloïdes d'argent. Un niveau de puissance élevé au four à micro-ondes pendant un haut temps de chauffage favorise l'apport d'une quantité significative d'énergie permettant la réaction chimique de nucléation des colloïdes à se réaliser rapidement. Dans le même ordre d'idée, les couples en bas à gauche du graphique (Fig. 4.2 A) n'ont pas

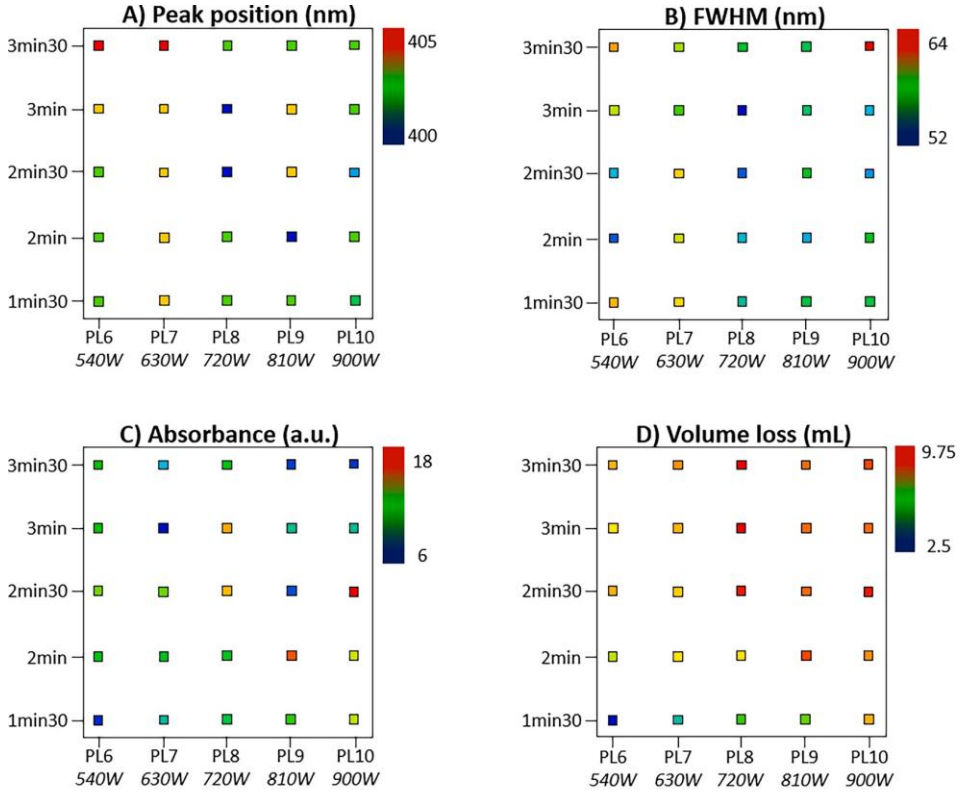
été chauffés assez longtemps pour obtenir une concentration d'AgNPs considérable d'après l'échelle de couleur annexée au graphique (absorbance ≈ 0,026).

L'optimisation de la synthèse d'AgNPs a également considéré le volume final de la solution une fois le chauffage complété. Il était attendu que les solutions, où le temps et le niveau de puissance étaient élevés, auraient eu un volume significativement plus faible que le reste des solutions. Les concentrations élevées en AgNPs dans ces solutions et, par conséquent, leur absorbance, pourraient être associées au fait que leur volume était plus faible, dû à l'évaporation de l'eau, et non à une réaction de synthèse davantage optimale. Cependant, il a été observé que les volumes entre les différentes solutions étaient similaires (entre 12 et 11 mL) pour tous les couples de solutions synthétisés. Ainsi, les concentrations élevées en AgNPs dans les solutions du coin supérieur droit du graphique (Fig. 4.2, p.45) sont dues à un apport optimal d'énergie permettant une meilleure efficacité de la synthèse des AgNPs (et non parce que leur concentration a augmenté proportionnellement à la perte de volume).

De faibles valeurs de FWHM (Fig. 4.2 C), p.45) signifient que les AgNPs synthétisés sont monodispersés (distribution étroite) et dont le diamètre moyen est uniforme. Tout comme l'absorbance, il s'agit des couples de puissance et de temps de chauffage élevé qui permettent d'obtenir des valeurs faibles pour la position du maxima et de la largeur de la bande à mi-hauteur (λ_{max} = 406 nm et FWHM = 68 nm). Un niveau de puissance et un temps de chauffage faible fourni des valeurs élevées (λ_{max} = 421 nm et FWHM = 167 nm) similaires à celles obtenues via la synthèse de Lee-Meisel ($\lambda_{max} \approx$ 425 nm et FWHM > 165 nm) (Lee, P. C. et Meisel, 1982). La synthèse d'AgNPs de Lee-Meisel est reconnue comme étant simple et efficace, mais est également réputée pour fournir des AgNPs instables (moins de quelques semaines) et de reproductibilité limitée. La synthèse d'AgNPs réalisée dans le cadre de ce projet repose sur celle proposée par Leona (2009) qui a l'avantage de fournir des AgNPs monodispersés en quelques minutes et stables pendant des mois à l'aide d'un four à micro-ondes. L'objectif de ce projet est de proposer une synthèse d'AgNPs simple, accessible et abordable à tous types de laboratoires de recherche ou judiciaires qui souhaitent entreprendre des mesures SERS. À cet effet, la synthèse d'AgNPs a été réalisée à l'aide d'un four à micro-ondes conventionnel (Panasonic Inverter 1200 W – modèle NN-SD671S), dont le prix est de quelques centaines de dollars, plutôt qu'un système de digestion à micro-ondes qui peut coûter plusieurs milliers de dollars. De plus, l'agent réducteur choisi est le D-glucose qui favorise la direction d'une chimie verte plutôt que de l'emploi d'un agent réducteur typique tel que le Tétrahydruroborate de sodium ($NaBH_4$).

Les résultats de ce design expérimental réalisés dans le cadre de ce mémoire font suite à ceux obtenus dans une publication antérieure (Lux *et al.*, 2019) :

Figure 4.3 Résultats du design expérimental pour **A)** la position du maxima, **B)** la largeur de la bande à mi-hauteur (FWHM), **C)** l'absorbance et **D)** la perte de volume. Reproduit avec permission à partir de (Lux *et al.*, 2019)



Lux et al. (2019) ont noté l'absence d'une tendance pour les facteurs de réponse (Position du maxima, FWHM, Absorbance) en faisant varier les deux facteurs, niveau de puissance (PL) et temps de chauffage (Fig. 4.3, p.47). Le four à micro-ondes utilisé fut le Danby™ 900W – Model DMW099BLDB. Contrairement à celui-ci, le four à micro-ondes Panasonic Inverter™ – 1200W utilisé dans le cadre de ce projet possède la technologie Inverter™ qui permet de fournir un flux constant d'énergie en fonction du niveau de puissance sélectionné. Par conséquent, à un niveau de puissance 8, le four à micro-ondes Panasonic Inverter™ fournit constamment une puissance de 912W (80% de 1200W) pendant la durée de chauffage. Pour le même temps de chauffage et une puissance maximale de 1200W, un autre four à micro-ondes conventionnel qui ne possède pas la technologie Inverter™, va alterner à répétition la puissance maximale du four pour simuler un niveau de puissance plus faible (c.-à-d. PL8). Comme noté par Lux et ses collaborateurs, la conséquence est qu'il a un manque de tendance dans les graphiques pour chacun des facteurs de réponse ((A) Position du maxima, (B) FWHM et (C) Absorbance) (Fig. 4.3, p.47). En comparaison,

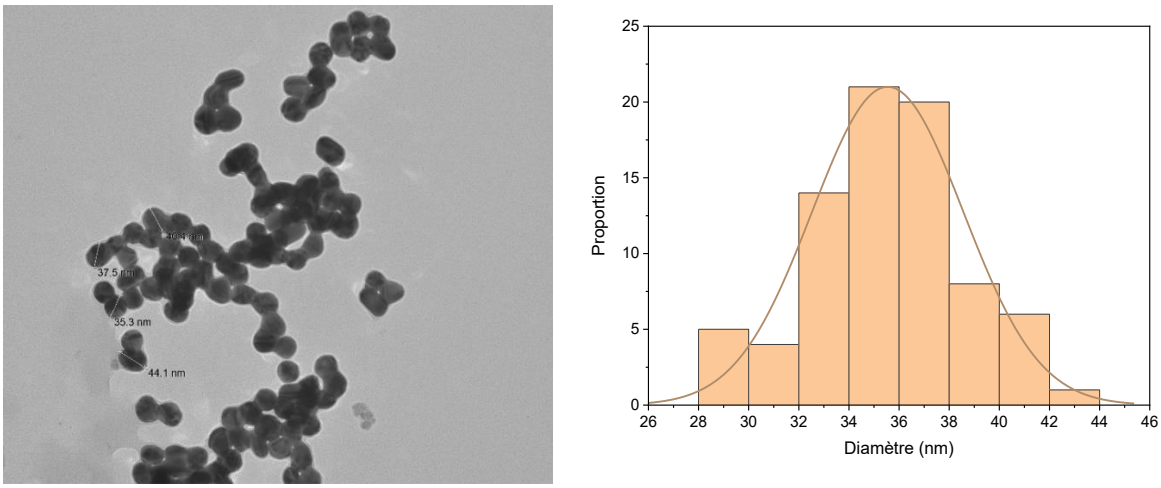
les graphiques obtenus dans le cadre de ce projet (Fig. 4.2, p.45) présentent clairement une tendance : l'augmentation de l'apport d'énergie est proportionnelle à l'absorbance et inversement proportionnelle à la position du maxima et à la largeur de la bande.

Davantage de solutions ont été réalisées dans des conditions supérieures de temps de chauffage et de puissance pour déterminer si un plateau est obtenu. Les résultats obtenus supportent qu'en chauffant davantage les solutions au-dessus des conditions supérieures établies (150 s à P10), il n'y a pas d'augmentation significative des concentrations d'AgNPs.

Le choix des conditions optimales s'est concentré sur les couples situés dans le coin supérieur droit des graphiques (temps de chauffage et niveau de puissance élevé) (Fig. 4.2, p.45) où les valeurs d'absorbance sont élevées (signifiant une concentration d'AgNPs proportionnellement élevée) alors que celles du FWHM sont faibles (distribution étroite d'AgNPs). Puisque l'optimisation de la synthèse tient également compte de la sécurité des manipulations (réduction d'exposition aux vapeurs), le choix final s'est terminé sur les conditions suivantes : temps de chauffage de 120 s et une puissance de 9 (1080 W). Ce choix implique une absorbance un peu plus faible (Abs=0,429) comparée à celle des autres solutions du coin supérieur droit (Fig. 4.2, p.45), certes, mais prévient un risque significatif d'accumulation de vapeurs et de perte de volume. La valeur de la largeur de la bande à mi-hauteur (FWHM=68 nm) est également parmi les plus faibles indiquant une excellente synthèse d'AgNPs monodispersés et de diamètre uniforme.

À partir des conditions optimales sélectionnées (120 s à P9), davantage de solutions ont été synthétisées dans le cadre du projet afin de s'assurer de la reproductibilité de la synthèse. Des échantillons ont été récupérés pour effectuer la caractérisation par TEM et plusieurs images ont été prises (Fig. 4.4, p.49). Les colloïdes observés présentaient tous une forme sphérique de distribution étroite dont le diamètre moyen est de 35 ±3 (n=80).

Figure 4.4 Illustration des AgNPs synthétisés aux conditions optimales sélectionnées (120 s et P9) par TEM (Grossissement de 217000x à un voltage de 110 kV) accompagnée de l'histogramme de la distribution du diamètre



La concentration d'AgNPs synthétisées a été estimée à $5x10^{23}$ colloïdes/cm^3 à partir de la loi de Beer-Lambert (c=A /εb) avec une longueur du trajet optique (b) de 1 cm et l'absorbance (A) mesurée de 0,429 par spectrophotométrie à la position du maxima (407 nm) tout en considérant le facteur de dilution de 25 (Section 3.1.3, p.37). Le coefficient d'extinction molaire (ε=145 x 10^8 $M^{-1}cm^{-1}$) a été sélectionné à partir d'une table de référence répertoriée dans (Paramelle *et al.*, 2014) en fonction du diamètre moyen déterminé par TEM (35 nm) :

Tableau 4.1 Sommaire des données simulées pour la position du maxima (λ_{max}) et le coefficient d'extinction molaire (ε) des AgNPs de différentes tailles. Reproduit avec permission à partir de (Paramelle *et al.*, 2014)

Table 1 Summary of the simulated data for λ_{max} and molar extinction coefficient of various sizes of citrate-capped silver nanoparticles

d/nm	λ_{max}/nm	$\varepsilon/M^{-1}\ cm^{-1} \times 10^8$
10	392.1	5.56
20	400.8	41.8
30	405.6	145
40	412.3	336
50	420.9	537
60	431.5	739
70	443.8	941
80	458.3	1142
90	474.6	1344
100	492.8	1546

Paramelle et ses collaborateurs ont simulé des données pour le coefficient d'extinction molaire et la position du maxima pour différentes tailles d'AgNPs synthétisées via une réduction avec le citrate de sodium. La concentration obtenue est relativement élevée comparée aux valeurs typiques retrouvées dans la littérature (10^{11}) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). Elle est considérée comme une surestimation de la concentration réelle des nanoparticules étant donné que certaines nanoparticules peuvent tout de même avoir tendance à s'agglomérer.

La réaction chimique qui permet la synthèse de nanoparticules n'est pas tout à fait évidente au niveau moléculaire et atomique. Il est connu que la réaction débute par un processus de nucléation qui permet la croissance d'une nanoparticule. Celle-ci va rencontrer éventuellement d'autres nanoparticules pour s'associer et s'encapsuler. La réaction continue ainsi jusqu'à ce que l'agent réducteur soit épuisé. Elle peut être affectée par différents facteurs physiques (comme la température et la pression) et par des conditions chimiques particulières (choix de l'agent réducteur, agent stabilisant, pH, etc.) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008; Munro *et al.*, 1995; Pillai et Kamat, 2004). Une avenue potentielle et pertinente pour la SERS, dans le but de concrétiser son application pratique dans divers domaines, est d'étudier davantage la réaction de synthèse des nanoparticules et l'influence de divers facteurs sur la taille, la forme et la dispersion des nanoparticules.

4.2 Validation de la méthode SERS

La validation de la méthode SERS est une étape cruciale pour son déploiement éventuel sur les scènes de crime. Non seulement, elle permet de s'assurer de la fiabilité de la méthode et d'identifier ses lacunes, mais elle est d'autant plus une étape nécessaire dans un contexte judiciaire pour permettre son admissibilité à la cour. En 1993, le critère de Daubert a été adopté par la Cour Suprême des États-Unis pour assister les juges dans leur tâche d'évaluer la fiabilité et, par conséquent, la recevabilité d'une preuve scientifique (Groscup *et al.*, 2002). La liste non exhaustive des facteurs considérés est présentée ci-dessous :

- La méthode peut être ou a été testée
- La méthode a été publiée dans des revues à comité de lecture
- Il existe un taux d'erreur potentiel connu
- La méthode est généralement acceptée dans la communauté scientifique pertinente

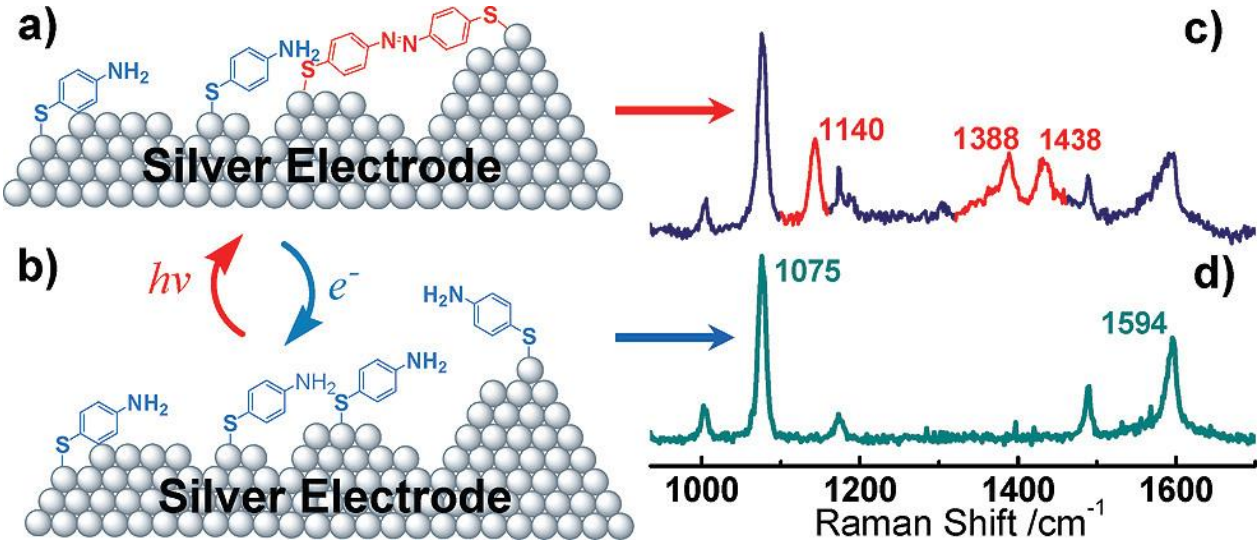
Dans le cadre de ce projet, une validation qualitative partielle de la méthode SERS a été effectuée selon l'article de Trullols et al. (2004). La *précision* permet d'estimer les erreurs aléatoires et systématiques liées à la *répétabilité* et à la *reproductibilité* des mesures effectuées. La répétabilité a été évaluée par des mesures consécutives dans des conditions en tout point identiques alors que la reproductibilité étudie l'impact de la modification d'un facteur en particulier. Dans le cas de ce projet, c'est la modification de la surface exposée du substrat métallique qui a été étudiée d'où l'attribution du nom de reproductibilité « spot-to-spot ». La validation comporte une section semi-quantitative, soit l'estimation de la limite de détection pour des molécules d'intérêt forensique : un stupéfiant (fentanyl) et un explosif (TNT). Nécessairement, davantage de critères de validation doivent être étudiés avant de considérer la validation comme étant complète : reproductibilité à différents niveaux (différents appareils, laboratoires, manipulateurs, etc.), robustesse (effet des conditions environnementales sur les mesures), etc.

4.2.1 Évaluation de la précision au niveau de la répétabilité

La molécule contrôle 4-ATP a été choisie pour évaluer la précision au niveau de la répétabilité et de la reproductibilité. C'est une molécule importante dans le domaine de la SERS puisqu'elle fournit un signal intense et qu'elle a été utilisée pour supporter l'existence du mécanisme de transfert de charge (Huang *et al.*, 2012). La présence d'un groupement fonctionnel thiol (R-SH) dans sa structure moléculaire lui permet d'effectuer des liaisons covalentes avec les AgNPs favorisant ainsi sa proximité et son couplage pour bénéficier du phénomène LSPR et du transfert de charge (Fig. 3.1, p.38).

Étant donné sa popularité comme sonde SERS, des études se sont intéressées au 4-ATP pour l'assignation des bandes observées en spectroscopie Raman et SERS. En étudiant davantage le spectre SERS du 4-ATP, il a été proposé que l'illumination au laser dans une mesure conventionnelle en SERS peut transformer chimiquement la molécule 4-ATP via un couplage oxydatif en 4,4'-dimercaptoazobenzene (DMAB) (Huang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2010).

Figure 4.5 Transformation du DMAB (**a)** et **c)**) à partir du 4-ATP (**b)** et **d)**), adsorbé sur une électrode d'argent, lors d'une mesure SERS. Reproduit avec permission à partir de (Huang *et al.*, 2010).



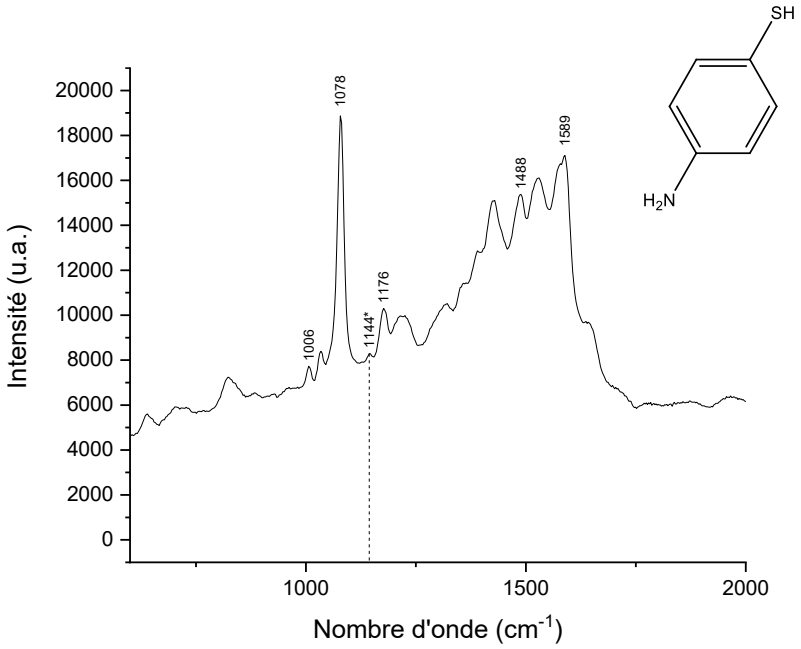
Cette transformation implique que le spectre SERS du 4-ATP est dépendant de l'intensité du laser et au fur et à mesure de l'acquisition des spectres, de plus en plus de molécules de 4-ATP se dimérisent en DMAB permettant l'observation des bandes vers 1140, 1390 et 1440 cm^{-1}. Ce phénomène est attribué à l'amplification chimique (CE), plus spécifiquement au transfert de charge, de certaines bandes spécifiques du 4-ATP (Huang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2010; Pilot, R. *et al.*, 2019).

La technique SERS, tout comme la spectroscopie Raman, est considérée comme étant non-invasive pour obtenir l'identification d'une molécule sur la base de ses vibrations qui lui sont propres. Évidemment, si la molécule se transforme en cours de mesure, il doit être envisagé dans l'interprétation des résultats de justifier adéquatement l'utilisation de cette technique plutôt qu'une technique alternative qui est réellement non-destructive (c.-à-d. Raman). Ces constatations ne font qu'amplifier l'importance de la recherche sur les méthodes innovantes telles que la SERS afin de détecter ces phénomènes et proposer des solutions. Il demeure qu'il n'est pas impossible d'observer la détérioration d'un échantillon sous l'imposante énergie issue de la LSPR en SERS. Il ne faut pas oublier également que dans un contexte forensique, l'intégrité de la trace chimique est nécessairement affectée au moment où celle-ci entre en contact avec le substrat métallique pouvant causer des phénomènes inattendus.

Les deux prochaines figures présentent respectivement le spectre Raman du 4-ATP et celui assigné à la SERS. Bien que le spectre de la figure 4.7 soit nommé « Spectre SERS du 4-ATP », il est reconnu que le spectre observé provient des vibrations issues de la structure moléculaire du DMAB. Il a tout de même été

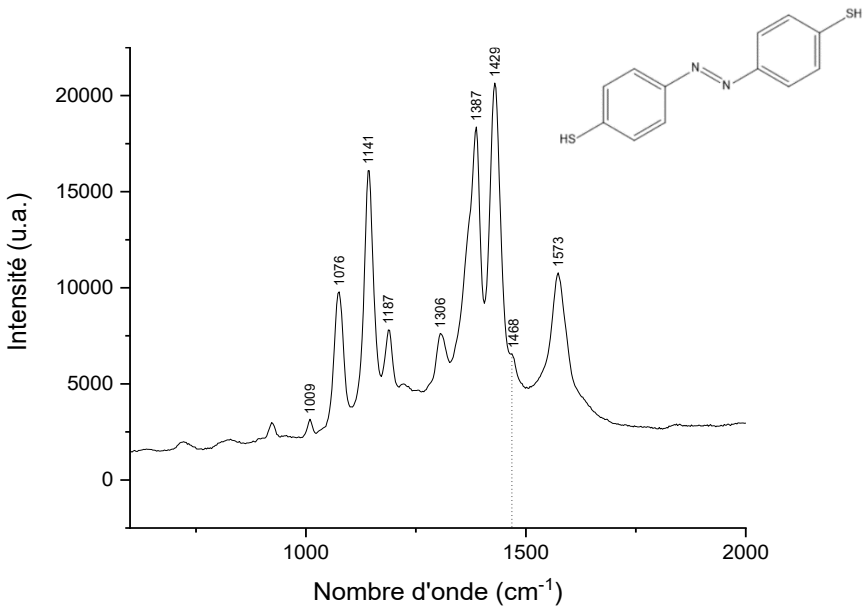
choisi, par souci de simplicité, de nommer les spectres Raman et SERS du 4-ATP malgré le manque de rigueur.

Figure 4.6 Spectre Raman brut du 4-ATP. La structure moléculaire du 4-ATP accompagne également le spectre à titre informatif. La bande identifiée * n'est pas assignée au spectre du 4-ATP, mais plutôt à la contribution du DMAB.



Le spectre Raman du 4-ATP présente une bande intense vers 1078 cm^{-1} assignée à la vibration de la liaison du groupement thiol. La plupart des bandes observées ne peuvent cependant pas être assignées. Le spectre Raman du 4-ATP demeure susceptible à la fluorescence qui peut potentiellement interférer avec la détection des bandes. La faible bande vers 1144 cm^{-1} semble provenir de la transformation de quelques molécules de 4-ATP en DMAB, et ce, malgré l'absence de substrat métallique. L'hypothèse proposée est que la puissance du laser fixée à 50 mW favorise légèrement la transformation de quelques molécules en DMAB.

Figure 4.7 Spectre SERS brut du 4-ATP. Les bandes observées sont expliquées par la transformation chimique du 4-ATP via un couplage oxydatif en DMAB. La structure moléculaire du DMAB accompagne également le spectre à titre informatif.



En comparant le spectre Raman brut du 4-ATP avec celui de la SERS, il est possible d'observer l'amplification significative de certaines bandes sur le spectre SERS: 1141 cm^{-1}, 1387 cm^{-1} et 1429 cm^{-1}. Deux plus petites bandes sont également présentes vers 1187 cm^{-1} et 1306 cm^{-1}. Le spectre SERS réduit la fluorescence et amplifie les signaux caractéristiques de la molécule. La bande vers 1078 cm^{-1} possède une intensité davantage réduite comparée au spectre Raman. Il est suggéré qu'au fur et à mesure que les molécules de 4-ATP se lient au substrat métallique, la vibration assignée au groupement thiol diminue en intensité puisqu'il s'agit du site de liaison avec leur substrat métallique. Une légère bande vers 1468 cm^{-1} semble se distinguer de celle à 1429 cm^{-1}. Un spectromètre avec une meilleure résolution favoriserait la démarcation de la bande. Ainsi, les bandes observées dans le spectre SERS respectent l'assignation effectuée par Huang et ses collaborateurs (2012).

L'assignation des bandes pour le 4-ATP en Raman et en SERS est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4.2 Assignation des bandes principales observées dans le spectre Raman et SERS du 4-ATP. Les bandes sélectionnées du spectre Raman et SERS pour l'étude de la répétabilité sont représentées en **gras.** L'assignation des bandes a été effectuée par comparaison avec celle effectuée par Huang et ses collaborateurs (2012)

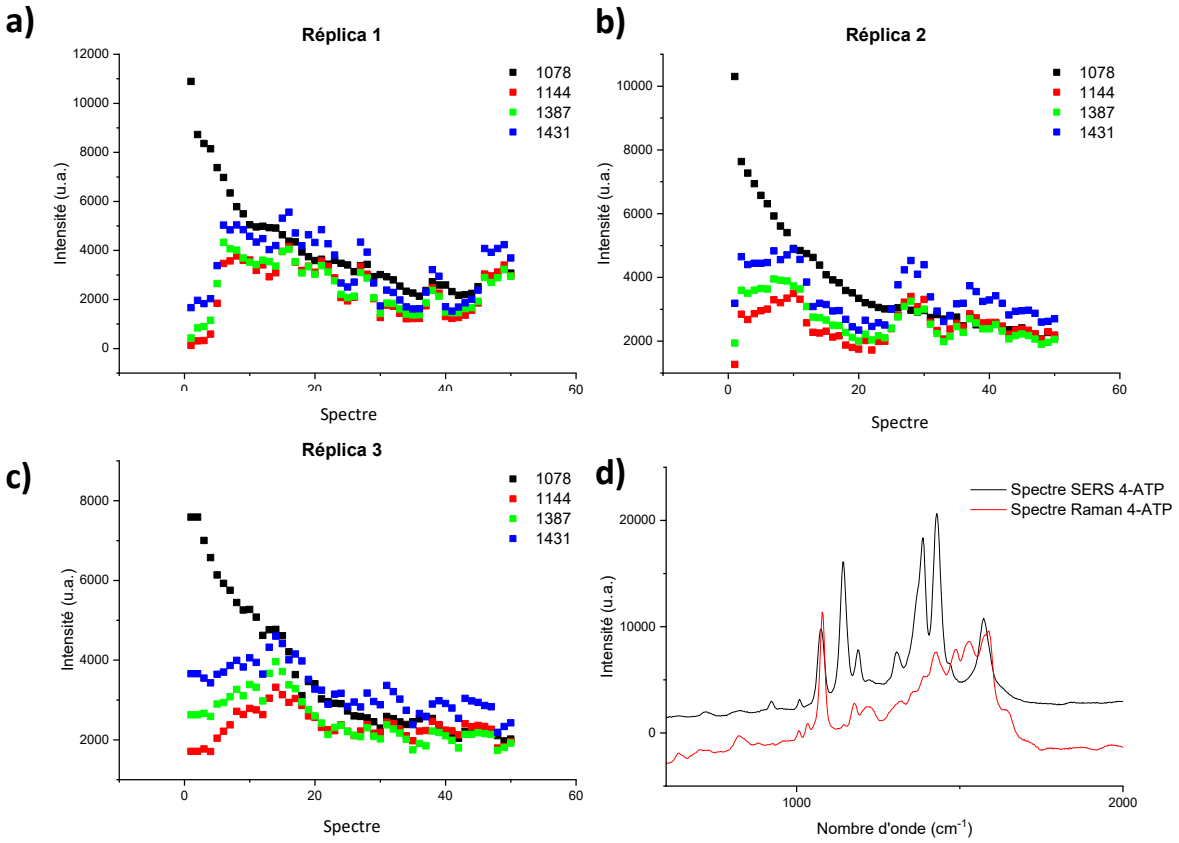
Spectre Raman 4-ATP			**Spectre SERS 4-ATP**		
Spectre Raman mesuré (cm^{-1})	**Spectre Raman Huang et al. (cm^{-1})**	**Assignation**	**Spectre SERS mesuré (cm^{-1})**	**Spectre SERS Huang et al. (cm^{-1})**	**Assignation**
1006	1004	$\delta_{benzène}$	1009	1004	$\delta_{benzène}$
1078	**1078**	$\boldsymbol{\nu_{C-C} + \nu_{C-S}}$	**1076**	**1074**	$\boldsymbol{\nu_{C-C} + \nu_{C-S}}$
-	-	-	**1141**	**1140**	$\boldsymbol{\nu_{C-N} + \delta_{C-H}}$
1176	1176	δ_{C-H}	**-**	**-**	**-**
-	**-**	**-**	1187	1188	$\nu_{C-N} + \delta_{C-H}$
-	**-**	**-**	1306	1302	ν_{C-C}
-	**-**	**-**	**1387**	**1386**	$\boldsymbol{\nu_{N-N} + \nu_{C-N}}$
-	**-**	**-**	**1429**	**1432**	$\boldsymbol{\nu_{N-N} + \delta_{C-H}}$
-	-	-	1468	1471	$\nu_{N-N} + \delta_{C-H}$
1488	1488	$\delta_{C-H} + \nu_{C-C}$	-	-	-
1589	1595	$\nu_{C-C} + \delta_{NH2}$	1573	1577	ν_{C-C}

ν : Élongation δ : Déformation

La bande vers 1580 cm^{-1} est assignée à l'élongation d'une liaison carbone-carbone (ν_{C-C}) et la déformation d'un groupement amine (δ_{NH2}) dans le cas du spectre Raman. Dans le cas du spectre SERS, cette bande est uniquement assignée à l'élongation d'une liaison carbone-carbone (ν_{C-C}). Il est reconnu que le phénomène SERS peut causer un décalage de certaines bandes entre le spectre Raman et celui SERS, particulièrement lorsqu'il y a une liaison chimique avec le substrat métallique et une amplification chimique impliquée. L'absence de la contribution associée à la déformation (δ_{NH2}) est due au fait que la dimérisation du 4-ATP en DMAB s'effectue via l'amine.

Les trois graphiques dans la figure 4.8 représentent trois réplicas effectués afin d'étudier la dynamique de l'évolution des bandes sélectionnées du spectre SERS et Raman du 4-ATP entre chaque mesure consécutive pour un total de 50 spectres en 25 s. L'expérience a été répliquée à trois reprises (3 réplicas) afin de s'assurer que les tendances observées sont reproductibles.

Figure 4.8 Dynamique de l'évolution de l'intensité des bandes du spectre du 4-ATP pour chacun des réplicas (a), b), c)) avec comparaison du spectre Raman et SERS du 4-ATP (d))

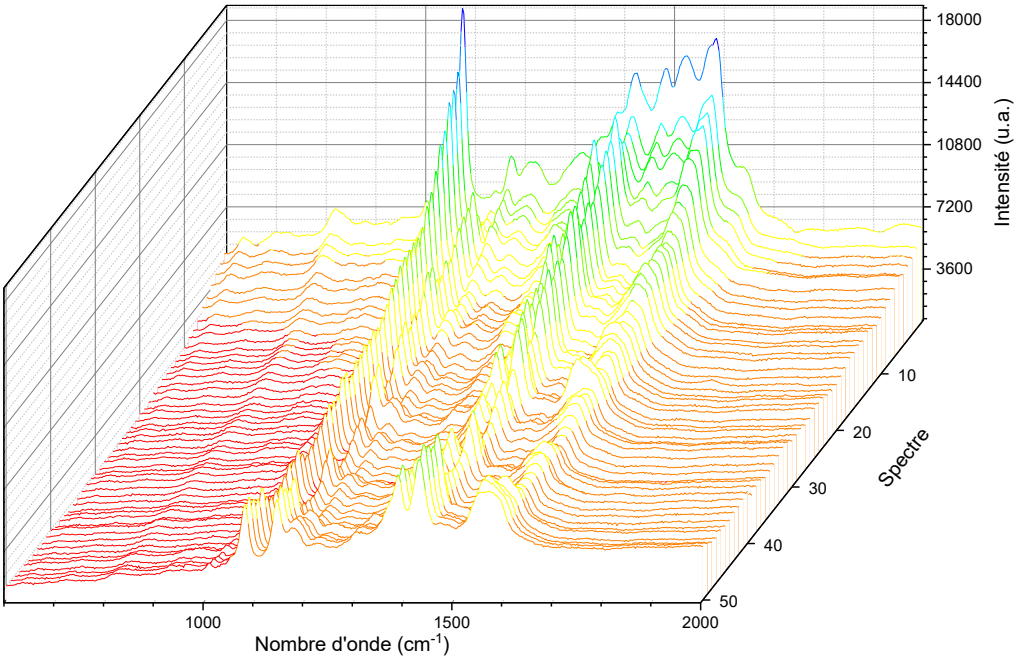


Les spectres initiaux correspondent au spectre Raman du 4-ATP avec une bande intense à 1078cm^{-1} étant donné que les molécules n'ont pas encore effectué d'interaction avec les AgNPs et qu'elles sont libres de diffuser la lumière indépendamment. Après quelques mesures, une quantité significative de molécules de 4-ATP ont eu l'opportunité d'interagir avec les AgNPs pour former des liaisons covalentes via leur groupement fonctionnel thiol ce qui favorise l'agrégation. Sous l'illumination du laser, les molécules de 4-ATP liées aux AgNPs se transforment en DMAB et fournissent le spectre SERS. Ainsi, l'intensité de la bande à 1078 cm^{-1} est diminuée alors que celle des bandes spécifiques au spectre SERS (1144, 1387 et 1431 cm^{-1}) augmente proportionnellement. Éventuellement, l'intensité des bandes attribuées au spectre SERS

cesse d'augmenter. Une variabilité importante est ensuite observée dans l'intensité des bandes attribuées au spectre SERS. Plusieurs facteurs peuvent en être la cause, notamment l'évaporation continuelle de la goutte. Au fur et à mesure de l'acquisition des spectres, l'évaporation concentre les AgNPs favorisant la formation de « hot-spots » et augmentant la vraisemblance d'y retrouver des molécules participant à l'amplification SERS. Les spectres SERS présentent cette forte variabilité attribuée à la formation des « hot-spots » alors que le spectre Raman est davantage stable. Un autre facteur important est le mouvement brownien des AgNPs qui, inévitablement, va causer des fluctuations dans l'intensité des bandes en SERS avec un substrat SERS colloïdal. Par conséquent, le nombre d'AgNPs qui participe au phénomène SERS enregistré par l'appareil varie substantiellement en cours de lecture. Une photo-dégradation ou une oxydation du substrat peut également justifier la diminution de l'intensité des bandes en cours de lecture (Muehlethaler *et al.*, 2016b). Comme illustré en figure 4.5 (Fig. 4.5, p.52) c'est la dimérisation du 4-ATP en DMAB par couplage oxydatif sous illumination du laser qui permet l'observation des bandes du spectre SERS. Une variabilité considérable associée à cette transformation chimique peut également permettre d'expliquer la fluctuation de l'intensité des bandes SERS. De plus, la réaction inverse de réduction est également possible pouvant expliquer la perte et la fluctuation de l'intensité des signaux par la transformation des molécules de DMAB en 4-ATP.

Il est important de mentionner que ces spectres n'ont subi aucun prétraitement. Par conséquent, une ligne de base importante au début des mesures peut expliquer pourquoi les intensités initiales des bandes sélectionnées sont semblables à celles finales. Dans l'exemple des spectres de la figure suivante, qui ont été mesurés selon la même procédure que ceux précédents, il est possible d'observer une ligne de base importante dans les premiers spectres (ceux plus au fond). Celle-ci est progressivement réduite au fur et à mesure que le phénomène SERS prend de l'ampleur et vient minimiser son influence.

Figure 4.9 Dynamique de l'évolution du spectre Raman vers le spectre SERS du 4-ATP dans le cadre de l'évaluation de la répétabilité



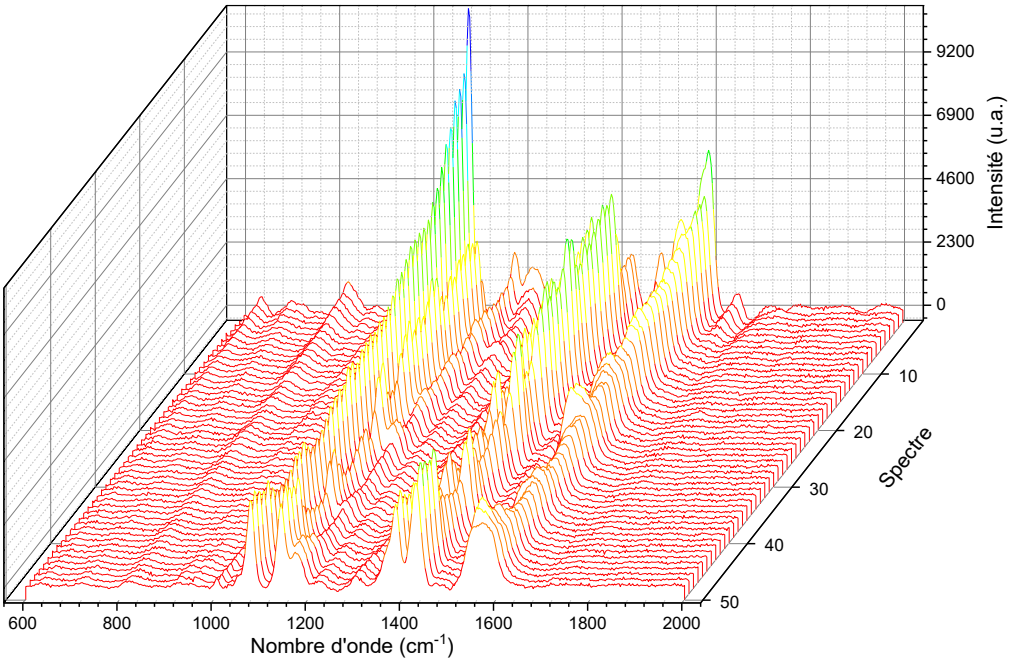
L'interprétation de la dynamique des bandes est ensuite la même que celle décrite précédemment pour la figure 4.8 (Fig. 4.8, p.56)

- Après quelques mesures, l'intensité des bandes associées au SERS (1144, 1387 et 1431 cm^{-1}) s'accentue proportionnellement alors que celle associée au spectre Raman du 4-ATP se voit être réduite considérablement.
- La ligne de base est également minimisée grâce au phénomène SERS qui prend de l'ampleur au fur et à mesure de la liaison entre des molécules de 4-ATP et des AgNPs.
- L'intensité du spectre Raman diminue de façon monotone alors que celle des bandes SERS stagne et varie considérablement en fonction des facteurs mentionnés précédemment (évaporation, mouvement brownien, photodégradation, transformation réversible 4-ATP en DMAB et vice-versa)

La figure suivante permet d'illustrer l'impact d'une méthode de prétraitement des données assez intrusive puisqu'elle affecte considérablement l'intégrité des données, soit la correction de la ligne de base via un

lissage asymétrique des moindres carrés (Newey et Powell, 1987). Elle permet toutefois de minimiser la contribution de la ligne de base, particulièrement importante dans les premiers spectres enregistrés, et d'observer plus facilement la dynamique de l'évolution des signaux importants.

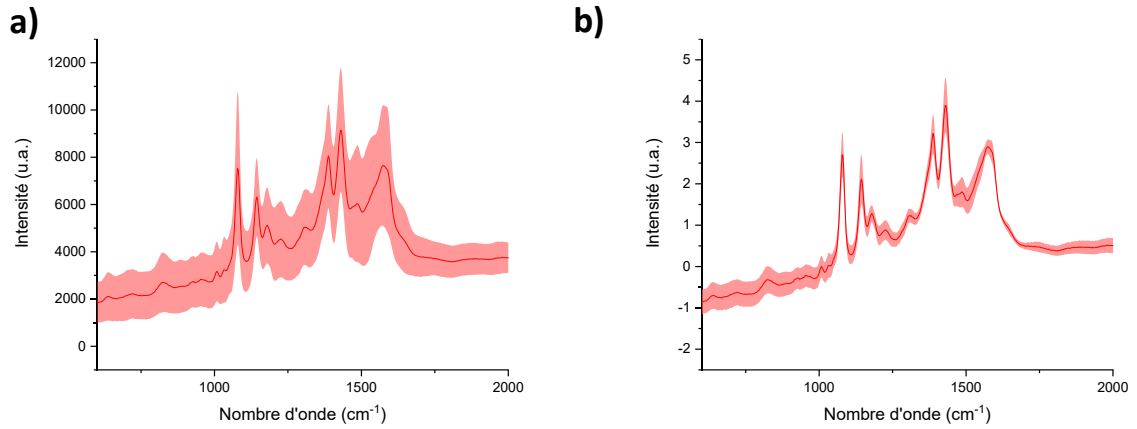
Figure 4.10 Dynamique de l'évolution du spectre Raman traité par un lissage asymétrique des moindres carrés vers le spectre SERS du 4-ATP dans le cadre de l'évaluation de la répétabilité



Les facteurs mentionnés affecteront significativement la variabilité des mesures effectuées et la précision au niveau de la répétabilité dans le cadre d'une méthode qualitative SERS. L'expérience a été effectuée avec trois réplicas afin de s'assurer de sa reproductibilité entre différents substrats. Il était nécessairement attendu, considérant la nature aléatoire de la formation des « hot-spots » avec un substrat SERS de nature colloïdale, que ces résultats peuvent non seulement varier d'une région à l'autre au sein du même substrat, mais également entre trois réplicas distincts. L'étude de la répétabilité a tout de même permis d'estimer à quel point la modification de ces paramètres contribue significativement à la variation du signal obtenu. C'est plutôt la prochaine section portant sur la reproductibilité qui va s'intéresser à l'étude de la variabilité issue de la modification de la région mesurée au sein du substrat métallique.

La figure 4.11 présente l'intensité moyenne des bandes SERS du 4-ATP avec leur déviation standard sous forme de région ombragée alentour du spectre. Le prétraitement des données par la méthode SNV permet d'observer une nette amélioration par la normalisation des signaux et la correction de la majorité des erreurs aléatoires rencontrées. Elle permet de corriger les sources de variation (erreurs) entre les différents spectres SERS provenant de la différence de taille des particules du matériau et des irrégularités de surface. Par conséquent, à la suite du prétraitement SNV, la source de variation qui demeure entre les différents spectres provient exclusivement de leur diffusion respective SERS pertinente.

Figure 4.11 Illustration de l'amélioration de la précision du spectre SERS brut du 4-ATP (a) avec le prétraitement SNV (b). La moyenne des spectres est représentée par le trait plein alors que la région ombragée alentour du spectre correspond à la déviation standard.



Le tableau suivant présente l'amélioration des valeurs de %RSD pour les bandes principales du 4-ATP :

Tableau 4.3 Comparaison des valeurs de %RSD des bandes principales sélectionnées du 4-ATP entre le spectre SERS brut et SNV du 4-ATP

Bande (cm^{-1})	**Déviation standard relative (%RSD)**	
	Spectre SERS brut 4-ATP	**Spectre SERS SNV 4-ATP**
1078	43	8
1144	26	15
1387	27	12
1429	29	15
1573	33	2
Limite acceptable	20	

Les valeurs pour le spectre brut sont considérablement élevées pour le spectre SERS brut [26-43]% comparées à la limite acceptable présentée par Natan de 20% (Natan, 2006) alors que celles corrigées par SNV respectent le barème établi [2-15]%. Le prétraitement des données par SNV est considéré comme étant essentiel pour l'étude de la précision de la méthode analytique SERS notamment dans la prochaine section au niveau de la reproductibilité.

4.2.2 Évaluation de la précision au niveau de la reproductibilité

4.2.2.1 4-ATP

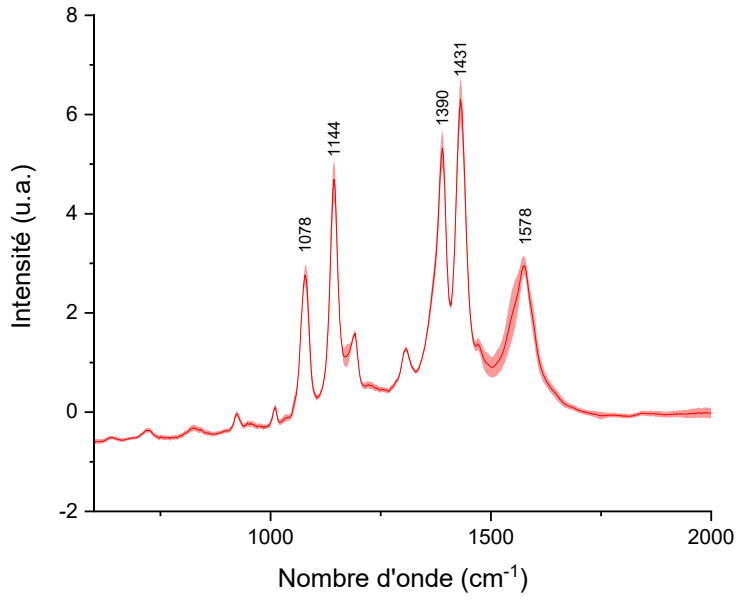
L'emphase a été mise sur la reproductibilité « spot-to-spot » dans le cadre de ce projet. Comme spécifié précédemment, la reproductibilité peut être étudiée à différents niveaux : expérimentateur, appareil, substrats, etc. La reproductibilité « spot-to-spot » permet d'étudier l'impact de la modification de la région exposée au laser sur la variabilité des spectres mesurés. La théorie d'échantillonnage introduit par Pierre M. Gy informe que toute erreur d'échantillonnage est une conséquence directe de l'existence d'une forme d'hétérogénéité (1995). Deux types d'hétérogénéité existent : l'une est de constitution et l'autre de distribution. L'hétérogénéité de constitution est due aux différences physicochimiques entre les plus petites unités d'un spécimen. L'hétérogénéité de distribution, tel que son nom l'indique, est due à la distribution de ces petites unités à l'intérieur du spécimen et aux différences observées en fonction de l'endroit de l'échantillonnage. Sur la base de ces définitions, tout matériau existant est plus ou moins hétérogène au niveau de la distribution et de la constitution à un certain niveau (grains, fragments, particules, molécules) (Gy, 1995). Il est alors crucial pour l'opérateur de considérer l'existence de ces notions lorsqu'un échantillonnage représentatif est envisagé. Il est d'ailleurs possible de minimiser l'hétérogénéité de constitution en augmentant la taille de la tache focale du spécimen analysé. Plus le spécimen est grand et plus les différences physicochimiques vont devenir négligeables. De même, l'augmentation du nombre et de la distribution spatiale des spécimens analysés (réplicas) va diminuer la contribution de l'hétérogénéité de distribution d'où l'importance d'effectuer plusieurs réplicas aléatoirement sur l'entièreté de l'espace géométrique disponible pour obtenir un échantillonnage représentatif. Ainsi, l'étude de la reproductibilité « spot-to-spot » permet de mettre l'accent sur l'un des problèmes majeurs en SERS ayant nui au déploiement à grande échelle de cette méthode, soit le manque de reproductibilité. Il était nécessairement attendu, comme proposé par le « SERS uncertainty principle » introduit dans la section 2.3.1 (Section 2.3.1, p.30), que le choix d'un substrat colloïdal défavorise la reproductibilité « spot-to-spot » étant donné leur hétérogénéité, autant de distribution que de constitution, importante associée à la distribution aléatoire des AgNPs et la formation des « hot-spots ».

Néanmoins, ces « hot-spots » conduisent à des facteurs d'amplification significativement plus élevés que ceux attendus pour une surface plane davantage homogène.

Le 4-ATP est une excellente molécule particulièrement sensible en spectroscopie Raman. Elle a permis tout au long de ce projet de s'assurer de la présence de SERS avec le substrat métallique en agissant comme molécule contrôle. Elle n'a pas d'intérêt en particulier dans le domaine de la science forensique comparativement au TNT et au fentanyl. Cependant, il était attendu avant d'entreprendre la prise de mesures SERS que ces molécules, typiquement retrouvées à l'état de traces dans un contexte forensique, ne fournissent pas ou très peu de signaux en SERS et encore moins en Raman.

La figure 4.12 présente le spectre SERS obtenu dans le cadre de l'étude de la reproductibilité à l'aide du 4-ATP. Les bandes caractéristiques intenses identifiées dans le spectre permettent de justifier sa sélection. Les autres bandes de plus faibles intensités ne sont pas pour autant impertinentes et peuvent tout de même fournir des informations cruciales à certaines études.

Figure 4.12 Spectre SERS moyen des 15 spectres mesurés du 4-ATP dans le cadre de l'étude de la reproductibilité



Les valeurs de %RSD pour chacune des bandes caractéristiques associées au spectre SERS du 4-ATP sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4.4 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du 4-ATP. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison.

Bande (cm^{-1})	Déviation standard relative (%RSD)
1078	7
1144	9
1387	7
1429	7
1573	6
Limite acceptable	20

Elles respectent toutes la limite acceptable, qui est celle présentée par Natan pour la reproductibilité « spot-to-spot » soit moins de 20% (2006). Il est important de préciser que Natan propose d'estimer la reproductibilité « spot-to-spot » sur une surface d'au moins 10 mm^2. Néanmoins, la superficie de la goutte issue de l'ajout de 1 μL d'AgNPs, 0,5 μL de KNO_3 et 0,5 μL de l'analyte n'a pas été mesurée. Elle est estimée d'être au moins de 3 mm sur 3 mm, soit le minimum de la taille recommandée par Natan (2006). Nécessairement, étant une goutte de volume total équivalent à 2 μL, la dimension de la profondeur du substrat n'est pas mentionnée par Natan. Comme proposé dans la section 3.2.3 (Section 3.2.3, p.39), la profondeur optimale a été estimée manuellement avec le spectromètre CORA 5500™ alors qu'il était aisé avec le microspectromètre DXR³ ™ de fixer la profondeur au centre de la goutte avec un système mécanique typique d'un microscope et une caméra intégrée au système optique. L'étude de la précision des mesures en SERS effectuée, autant au niveau de la reproductibilité que de la répétabilité, est limitée par les compromis associés à la fixation de la profondeur de la tache focale du laser, particulièrement avec le spectromètre CORA 5500™, qui peut avoir un impact considérable sur la variabilité des signaux mesurés. Il en reste que les valeurs de %RSD supportent une excellente précision au niveau de la reproductibilité « spot-to-spot » pour le 4-ATP. Ces résultats étaient tout de même attendus étant donné l'excellente sensibilité de cette molécule en Raman et sa capacité à effectuer des liaisons covalentes avec les AgNPs favorisants la SERS, d'où son choix comme molécule contrôle. Les valeurs de %RSD sont inférieures à celles présentées précédemment pour la répétabilité (Tab 4.3, p.60) comme attendu. La variabilité associée aux différents facteurs affectant la répétabilité (mouvement brownien, évaporation, photodégradation, transformation DMAB/4-ATP) est effectivement supérieure à celle associée à l'hétérogénéité de la surface

de la solution d'AgNPs. Malgré tout, les valeurs observées sont tout de même témoins d'une excellente précision tant au niveau de la répétabilité et de la reproductibilité pour le 4-ATP.

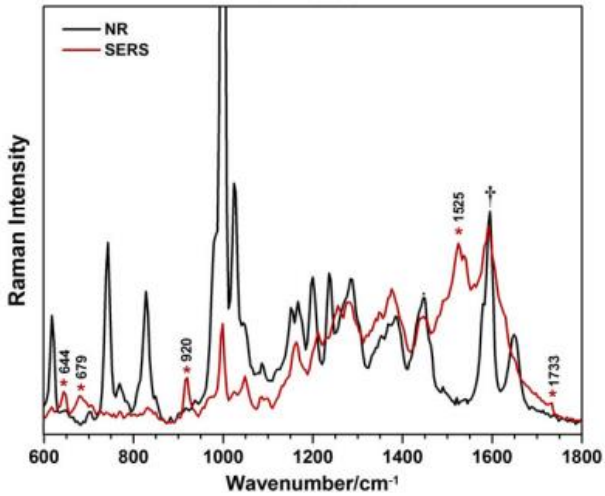
Aucun prétraitement n'a été effectué sur le substrat ou l'analyte pour favoriser une affinité mutuelle, réduisant ainsi la distance entre eux et augmentant la vraisemblance d'obtenir des facteurs d'amplification significativement élevés. L'objectif de ce projet demeure cependant d'évaluer les performances d'un substrat SERS brut polyvalent pour le domaine de la forensique, soit les AgNPs, sans considérer un quelconque prétraitement de leur surface ou de leurs paramètres de mesure. Comme présenté dans la figure 2.7 (Fig.2.7, p.31), différentes stratégies peuvent être considérées pour favoriser l'affinité à des analytes spécifiques via un prétraitement des nanoparticules. Une stratégie viable demeure de modifier le pH de la solution et le sel d'agrégation, améliorant ainsi l'affinité des analytes pour les nanoparticules. Par exemple, Mabbott et ses collaborateurs ont effectué un design expérimental avec différents paramètres, dont le pH et la nature du sel agrégant, pour optimiser la détection de la méphédrone, stimulant synthétique appartenant à la famille des phényléthylamines, à l'aide d'une méthode SERS (2013). Par l'utilisation d'un substrat SERS typique, les nanoparticules d'argent ou d'or, l'optimisation du pH et des solutions de sel ont permis de favoriser l'affinité de la méphédrone pour les nanoparticules et ont pu obtenir des faibles valeurs de %RSD (<20%) et de limite de détection (9.06×10^{-6} M).

4.2.2.2 Fentanyl

La crise des opioïdes demeure importante au Canada. En 2021, il y a eu 7560 décès liés à une intoxication apparente aux opioïdes. Santé Canada (2022) informe qu'il s'agit d'environ 21 décès quotidiennement, comparés à 12 décès par jour en 2018, et que la toxicité des produits demeure l'un des facteurs importants. Le fentanyl, un opioïde synthétique, est impliqué dans 86% des décès accidentels survenus dans l'année 2021 (Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdoses d'opioïdes, 2022). Le fentanyl est régulièrement utilisé comme adultérant dans les drogues illicites et il suffit que de quelques milligrammes pour causer une overdose et, potentiellement, la mort (Prekupec *et al.*, 2017). Haddad et ses collaborateurs ont proposé l'utilisation d'un substrat à base de papier imprégné de nanoparticules d'argent pour la détection de traces de fentanyl dans des spécimens d'héroïne (2018). L'affinité entre le fentanyl et les AgNPs est reconnue être due aux interactions de Van Der Waals entre le groupement fonctionnel amide tertiaire et l'un des groupements phényl du fentanyl (Fig.3.1, p.38) avec les atomes d'argent (Wang *et al.*, 2021). Cette interaction est considérée comme étant faible et demeure susceptible à la compétition. Toutefois, une bande intense vers 1000 cm^{-1} dans le spectre SERS du fentanyl demeure

observable et est assignée à la déformation trigonale C-C-C des groupements phényls (Leonard *et al.*, 2017) (Fig. 4.13, p.65). Cette bande est particulièrement intense et caractéristique du spectre du fentanyl étant donné la présence de deux groupements phényls dans sa structure et parce que la polarisabilité de ces groupements fonctionnels est reconnue comme étant élevée.

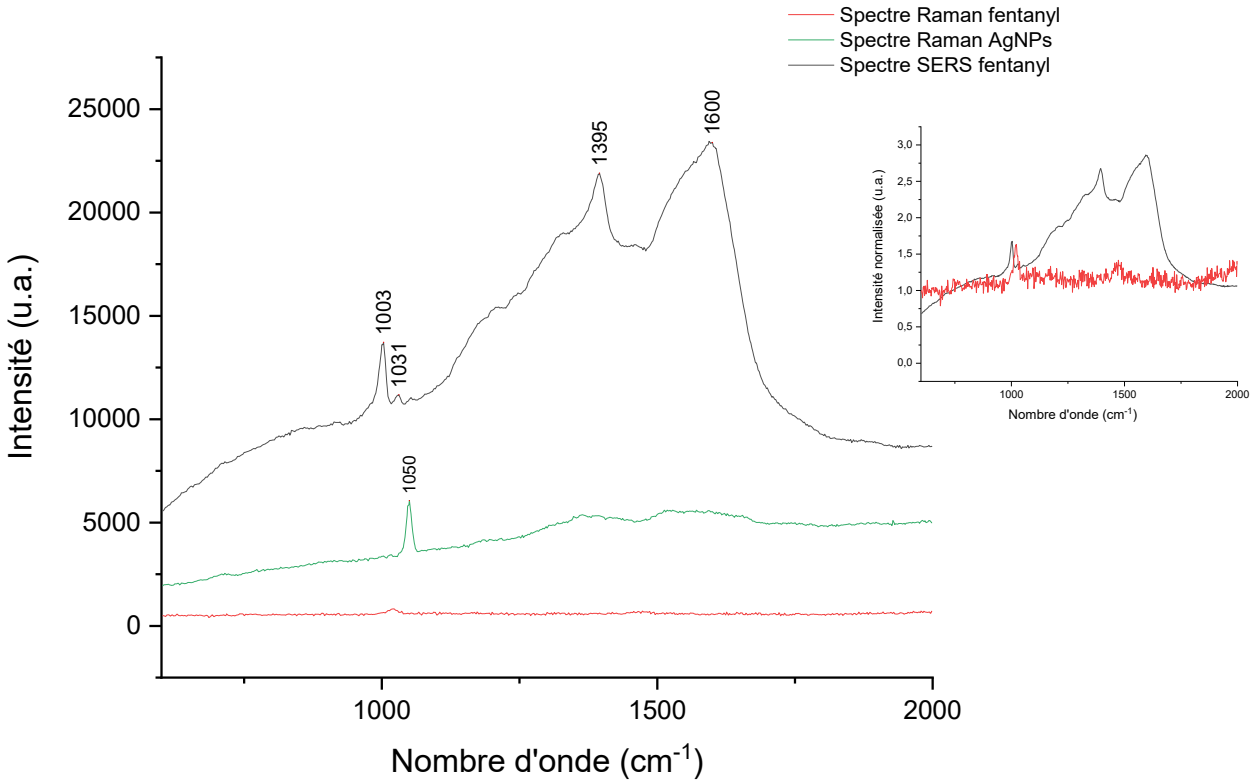
Figure 4.13 Comparaison du spectre SERS (**rouge**) avec le spectre Raman (**noir**) du fentanyl. Les nouvelles bandes issues de la SERS sont marquées avec *. La mise à l'échelle des spectres a été réalisée en normalisant l'intensité de la bande marquée (t). Reproduit avec permission de (Leonard *et al.*, 2017).



Le spectre de référence (Fig. 4.13, p.65) présente un spectre Raman d'intensité particulièrement élevée, non seulement comparé à celui obtenu dans le cadre de ce projet (Fig. 4.14, p.66), mais également en relation avec leur propre spectre SERS présenté dans la même figure. Les paramètres d'acquisition du spectre Raman de référence indiquent des temps d'acquisition élevés, typiques d'une analyse en spectroscopie Raman : cinq accumulations de 50 s pour un total de 250 s à 29,5 mW avec un spectromètre de laboratoire performant (WiTec Alpha300r modèle 300i) (Leonard *et al.*, 2017). Les paramètres d'acquisition établis dans ce projet pour le spectre Raman (Fig. 4.14, p.66) du fentanyl sont considérablement plus faibles avec trois acquisitions de 1 s à 50 mW, qui sont les mêmes paramètres que ceux du spectre SERS pouvant expliquer la différence notable d'intensité entre les deux spectres Raman. Ces paramètres demeurent dans l'intérêt d'une analyse de terrain qui doit être rapide avec un spectromètre portable CORA 5500™. De plus, le spectre SERS en référence (Fig. 4.13, p.65) n'a pas été mesuré dans les mêmes conditions que leur spectre Raman. Une puissance de 1,5 mW a été employée pour l'acquisition du spectre SERS (comparativement à 29,5 mW pour le spectre Raman) expliquant pourquoi l'intensité des bandes du spectre Raman semble significativement supérieure à celle du spectre

SERS (Leonard *et al.*, 2017). Par conséquent, la figure 4.13 ne peut servir uniquement qu'à comparer les bandes caractéristiques entre le spectre Raman et SERS du fentanyl et ne doit pas être considérée pour comparer l'intensité relative des bandes entre les deux spectres. Il est également attendu que la résolution du spectre de laboratoire employé par Leonard et ses collaborateurs soit plus performante que celle du CORA 5500™ (9-12 cm^{-1}) justifiant la raison pour laquelle les bandes sont mieux définies. Davantage de facteurs peuvent expliquer les différences entre les deux spectres, dont la nature du substrat métallique, le prétraitement des données effectuées, etc.

Figure 4.14 Comparaison du spectre SERS (**noir**) et Raman (**rouge**) mesuré dans les mêmes conditions (hormis la présence d'AgNPs et de KNO_3) du fentanyl. Le spectre Raman des AgNPs (**vert**) est également illustré pour présenter la contribution potentielle du substrat métallique au spectre SERS. Une comparaison des spectres normalisés est jointe pour faciliter l'illustration du spectre Raman.



La figure 4.14 présente la comparaison du spectre Raman et SERS du fentanyl mesuré à partir d'une solution de 100 ppm et du substrat métallique (AgNPs). Tout comme le 4-ATP, dans le but d'effectuer une comparaison juste et représentative entre le spectre Raman et SERS, la seule différence entre les deux spectres est l'ajout d'AgNPs et de KNO_3 dans le cas du spectre SERS. La différence est assez évidente,

aucune bande d'intensité apparente n'est visible dans le spectre Raman du fentanyl alors que le spectre SERS présente une amplification notable de certaines bandes caractéristiques, notamment celle vers 1000 cm^{-1} assignée à la déformation trigonale C-C-C ($\delta_{(C-C-C)}$). Les trois autres bandes observées : 1031 cm^{-1}, 1395 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} sont respectivement attribuées à l'élongation symétrique C-C d'un benzène ($\nu_{s\,(C-C)}$), à la déformation d'une liaison C-H ($\delta_{(C-H)}$) et à l'élongation symétrique C-C d'un second benzène ($\nu_{s\,(C-C)}$) (Leonard *et al.*, 2017). Cependant, il est également possible que les larges bandes à 1395 cm-1 et à 1600 cm-1 proviennent du carbone amorphe résultant de la destruction des molécules de fentanyl dans le « hot-spot ». D'ailleurs, l'utilisation du spectromètre portable CORA 5500™ implique une puissance élevée fixe à 50 mW supportant l'hypothèse d'une dégradation potentielle des molécules de fentanyl dans le « hot-spot ».

Les spectres normalisés par la moyenne permettent de mieux représenter le bruit de fond intense observé en Raman en comparaison avec celui du SERS. Une légère bande se distingue tout de même vers 1000 cm^{-1}, mais demeure de trop faible intensité pour justifier l'identification du fentanyl par rapport au bruit de fond.

Le spectre Raman des AgNPs correspond à la contribution de la matrice qui peut potentiellement affecter le spectre SERS de l'analyte. Notamment, il possède une bande importante associée à l'élongation symétrique de l'ion NO_3^- (Gares *et al.*, 2016) provenant du sel agrégant (KNO_3) et deux larges bandes de faible intensité vers [1300-1500] cm^{-1} assignées aux ions citrate qui demeurent en solution. La bande du KNO_3 est de plus en plus intense lors de la prise de mesure alors que la goutte s'évapore et que le KNO_3 se concentre et cristallise. Le spectre des AgNPs est particulièrement important à considérer lors de l'étude des spectres des analytes d'intérêts forensique qui sont peu sensibles en Raman. Le spectre du 4-ATP (Fig. 4.12, p.62), précédemment présenté, n'est pas affecté par la contribution des AgNPs puisque son intensité globale est significativement supérieure.

La comparaison du patron du spectre SERS ainsi que de chacune des bandes associées (Tab. 4.5, p.68), à celui du spectre de référence permet de supporter davantage l'existence du phénomène SERS dans le cas du fentanyl, malgré l'absence de certaines bandes, dont celle à 920 cm^{-1} (Fig. 4.14, p.66).

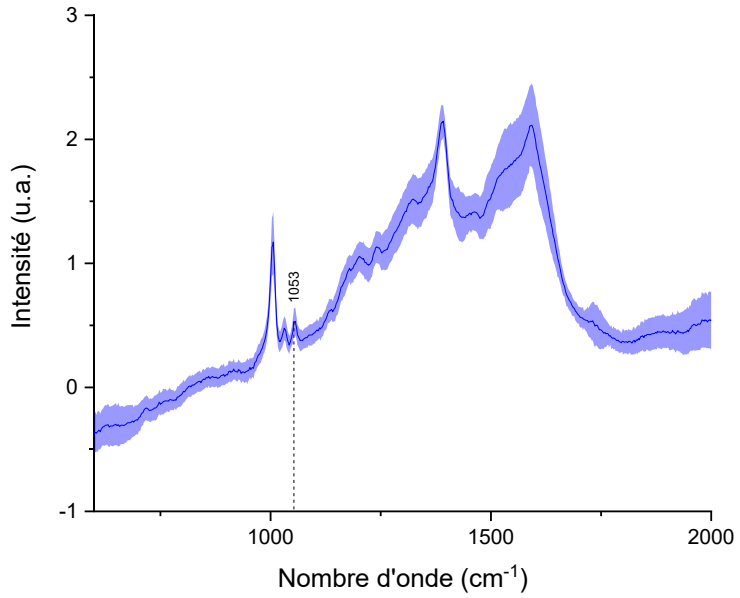
Tableau 4.5 Assignation et comparaison des bandes principales du fentanyl sélectionnées du spectre SERS mesuré avec celles du spectre de référence de Leonard (2017). La bande caractéristique du fentanyl considérée comme davantage pertinente à son identification est accentuée en **gras**.

Fentanyl	Spectre SERS mesuré (cm^{-1})	Spectre SERS Leonard et al. (cm^{-1})
$\delta_{(C–C–C)}$	**1003**	**999**
$\nu_{s\ (C-C)}$	1031	1024
$\delta_{(C-H)}$	1395	1376
$\nu_{s\ (C-C)}$	1600	1595

ν_s : Élongation symétrique δ : Déformation

Le spectre SERS moyen du fentanyl permet de représenter qualitativement la reproductibilité des mesures du fentanyl avec le spectromètre portable CORA 5500™ (Fig. 4.15, p.68). Le patron spectral est semblable aux spectres présentés précédemment. Il est tout de même possible d'observer la bande associée au KNO_3 vers 1050 cm^{-1}. L'intensité globale du spectre demeure notablement faible et est davantage sujette à être perturbée par la contribution des signaux des AgNPs pouvant affecter la précision des résultats.

Figure 4.15 Spectre SERS moyen des 15 spectres mesurés du fentanyl dans le cadre de l'étude de la reproductibilité au spectromètre CORA 5500™. La bande associée à la contribution du KNO_3 est marquée pour éviter une mauvaise interprétation lors de l'assignation.



Une analyse quantitative de la reproductibilité du spectre SERS moyen du fentanyl est présentée dans le tableau (Tab 4.6, p.69).

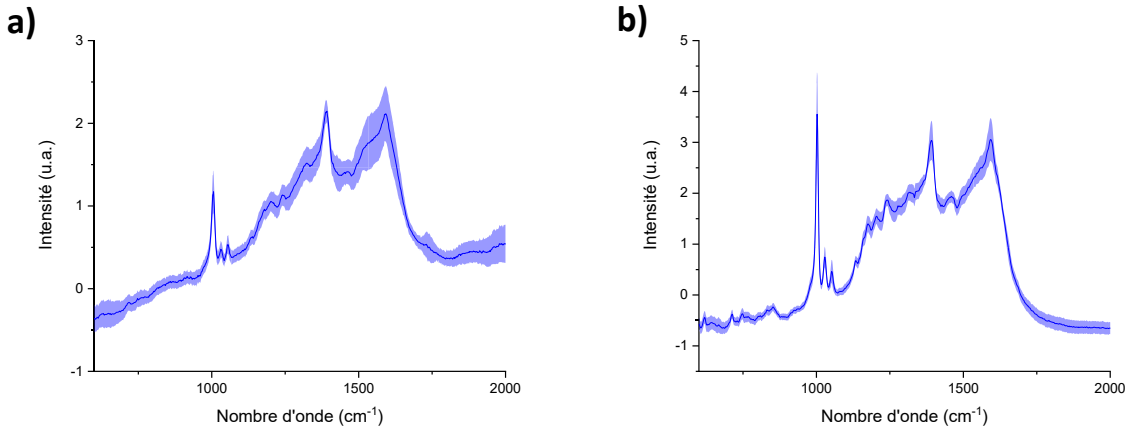
Tableau 4.6 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du spectre SERS du fentanyl mesuré au spectromètre CORA 5500™. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. La bande caractéristique du fentanyl considérée comme davantage pertinente à son identification est accentuée en **gras**.

Bande (cm^{-1})	**Déviation standard relative (%RSD)**
1003	**21**
1031	20
1395	6
1600	17
Limite acceptable	20

Les valeurs des %RSD pour les bandes caractéristiques du fentanyl, hormis celle à 1395 cm^{-1}, sont à l'extrémité de la limite acceptable de 20%. Ces résultats sont attendus puisque le phénomène de diffusion Raman pour le fentanyl est très faible et que son affinité pour les AgNPs est précaire et susceptible à la compétition, notamment avec les ions citrate. La variabilité homoscédastique, dispersion homogène des erreurs dans l'ensemble des mesures, demeure inévitable en spectrométrie Raman et SERS. Par conséquent, il n'y a pas de corrélation entre l'erreur associée aux valeurs élevées et celles faibles. La tendance demeure que, si l'affinité entre l'analyte et le substrat est faible, la variabilité observée entre plusieurs mesures soit élevée. Si l'expérience était reproduite dans des conditions en tout point identiques, les valeurs de %RSD respectives de chaque bande ne seraient pas exactement identiques dues à la nature aléatoire de l'orientation des molécules, la formation des « hot-spots », l'hétérogénéité de la surface, etc. Le spectre SERS permet toutefois l'identification du fentanyl avec une précision dans l'ensemble tout de même acceptable.

Par souci de comparaison, l'étude de la reproductibilité « spot-to-spot » a également été réalisée avec un microspectromètre de laboratoire DXR^3 ™ pour chaque analyte d'intérêt forensique. Le but étant de comparer les résultats obtenus avec un spectromètre portable (CORA 5500™), conséquemment conçu avec certains compromis, à ceux d'un spectromètre fixe de laboratoire (DXR^3 ™) nécessairement plus puissant.

Figure 4.16 Comparaison des spectres moyens SERS mesurés **a)** au spectromètre CORA 5500™ et **b)** au spectromètre DXR³ ™ du fentanyl.



L'intensité des signaux est plus importante avec le spectromètre DXR³ ™ comparé à celle obtenue avec le spectromètre CORA 5500™, notamment pour la bande caractéristique vers 1000 cm^{-1}. Le patron spectral demeure semblable entre les deux appareils permettant l'identification du fentanyl. Toutefois, la résolution spectrale, elle, est significativement inférieure avec le spectromètre CORA 5500™ comme attendu ([9-12] cm^{-1} > [3-4] cm^{-1}). Convertir un spectromètre Raman pour qu'il soit portable implique des compromis notamment au niveau de la résolution spectrale et de la modalité des analyses (microscope). Il en reste qu'il n'est pas nécessaire dans le cadre de l'application de ce projet de posséder une résolution particulièrement performante. Un spectromètre portable demeure adéquat tant que les bandes caractéristiques de l'analyte d'intérêt sont suffisamment amplifiées permettant son identification et que la méthode employée soit reconnue comme étant fiable. Le spectromètre DXR³ ™ possède un microscope intégré qui permet de visualiser la formation des agglomérats d'AgNPs et les sélectionner avec un grossissement approprié permettant de favoriser l'obtention de « hot-spots » et des signaux vraisemblablement plus intenses.

Tableau 4.7 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du spectre SERS du fentanyl mesuré au spectromètre DXR^{3} ™. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. La bande caractéristique du fentanyl considérée comme davantage pertinente à son identification est accentuée en **gras**.

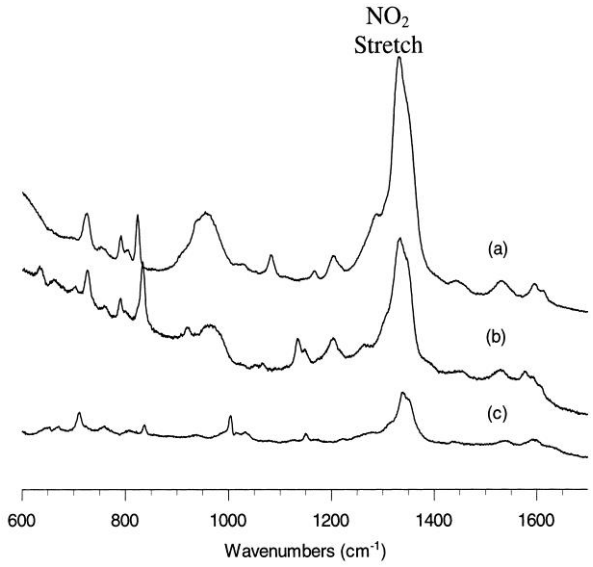
Bande (cm^{-1})	Déviation standard relative (%RSD)
1002	**23**
1028	27
1392	13
1594	14
Limite acceptable	20

Les valeurs de %RSD obtenues pour le DXR^{3} ™ sont dans l'ensemble légèrement supérieures à celles présentées pour le CORA 5500™ (Tab 4.6, p.69). Les conditions d'exposition entre les deux spectromètres ne sont pas en tout point identiques. La puissance du laser de 532 nm du spectromètre CORA 5500™ est fixée à 50 mW par le fabricant alors qu'il est possible de modifier la puissance de celui du DXR^{3} ™ (établi à 1mW). La tache focale du laser du spectromètre CORA 5500™ est nécessairement plus grande que celle du DXR^{3} ™ (120 μm comparativement à 1,30 μm) pour compenser la puissance élevée du laser et éviter d'endommager l'intégrité du spécimen (brûlure). Puisque la tache focale du spectromètre CORA 5500™ est significativement supérieure, la quantité de molécules pouvant participer dans l'enregistrement des signaux varie peu entre chaque mesure malgré le déplacement manuel dans la goutte de 2 μL. C'est tout le contraire dans le cas du DXR^{3} ™ où un microscope est utilisé pour sélectionner exactement la région échantillonnée. Le déplacement de la lame à l'aide de la platine motorisée assure que la même région de la goutte ne soit pas échantillonnée entre chaque mesure. Cette distinction permet d'expliquer les valeurs de %RSD plus élevées dans le cas du DXR^{3} ™ par rapport à celles présentées dans le cas du CORA 5500™ (Tab 4.5, p.69). La différence demeure relativement faible et il est conclu que la précision au niveau de la reproductibilité n'est pas significativement affectée par la modification du spectromètre utilisé (CORA 5500™ ou DXR^{3} ™). Les différences observées au niveau des variations d'intensité relative sont davantage expliquées par le manque de reproductibilité associé à la nature du substrat (AgNPs) et l'origine de l'affinité du fentanyl pour celui-ci.

4.2.2.3 TNT

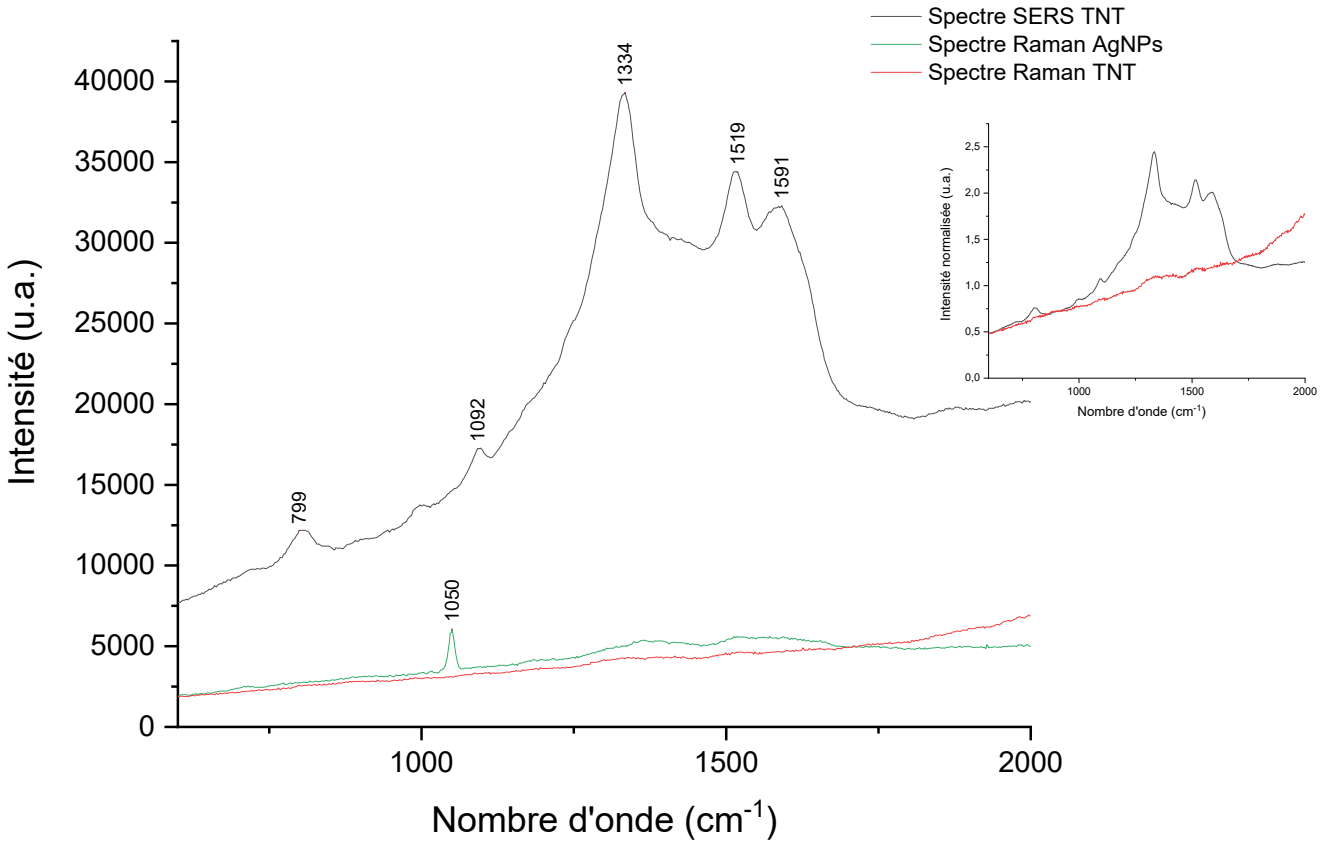
Pour les explosifs, il a été démontré à plusieurs reprises que les nanoparticules d'or (AuNPs) sont le choix optimal en termes de spécificité et sensibilité (Chou *et al.*, 2012; Demeritte *et al.*, 2012). Les explosifs nitroaromatiques, tels que le TNT, peuvent former un chélate avec la surface des AuNPs via leurs atomes d'oxygène (Muehlethaler *et al.*, 2016a). La détection d'explosif dans les aéroports, par exemple, ou sur une scène d'incident impliquant une explosion, est cruciale pour assurer la sécurité des passagers ou des intervenants. Le TNT est un explosif communément utilisé dans les mines terrestres pour les applications militaire et terroristes (Holthoff, E. L. *et al.*, 2011). Certains articles ont d'ailleurs démontré l'intérêt d'une méthode SERS pour la détection des traces de TNT (Sylvia *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2014). Zhang et ses collaborateurs ont d'ailleurs employé des AgNPs synthétisées au four à micro-ondes pour détecter le TNT, méthode de synthèse similaire à celle utilisée dans le cadre de ce projet, et une limite de détection jusqu'à 10^{-10} M a été estimée (2014). Cependant, des modifications au niveau du pH et de la concentration en NaCl des solutions ont été effectuées pour favoriser l'affinité de le TNT et un spectromètre de haute performance a été utilisé. Les trois groupements fonctionnels nitro ($R\text{-}NO_2$) de la structure moléculaire du TNT (Fig. 3.1, p.38) peuvent potentiellement se lier aux AgNPs. Le cycle aromatique peut également contribuer à l'adsorption via des interactions de Van der Waals (Muehlethaler *et al.*, 2016b). Le spectre Raman et SERS du TNT est, par conséquent, dominé par les bandes vers 830 cm^{-1} et 1350 cm^{-1}. Ces bandes correspondent respectivement à la déformation angulaire ($\delta_{s\ (2,4,6\text{-}NO_2)}$) et à l'élongation symétrique ($\nu_{s\ (2,6\text{-}NO_2)}$) associées aux groupements nitro ($R\text{-}NO_2$) permettant la détection des composés nitroaromatiques (Holthoff, Ellen L. *et al.*, 2011). Sylvia et ses collaborateurs ont démontré l'efficacité de la technique SERS pour la détection des vapeurs du TNT et ses impuretés, 1,3-dinitrobenzene (1,3-DNB) et 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), dans le cas des mines terrestres (2000). Le spectre de référence SERS utilisé pour la comparaison avec le spectre SERS obtenu dans le cadre de ce projet est présenté dans la figure suivante :

Figure 4.17 Spectre SERS du a) TNT, b) 2,4-DNT et c) 1,3-DNB. La bande associée à l'élongation symétrique du groupement nitro (R-NO2), caractéristique des composés nitroaromatique, est identifiée. Reproduit avec permission de (Sylvia *et al.*, 2000)



Un spectre de comparaison présente le spectre SERS ainsi que le spectre Raman d'une solution de 1000 ppm de TNT. (Fig. 4.18, p.74). Le spectre des AgNPs a également été rajouté afin de présenter la contribution du substrat métallique sur les signaux mesurés. Tout comme dans le cas du fentanyl, il n'a pas été possible d'obtenir de spectre Raman du TNT. La normalisation des signaux par la moyenne présente d'ailleurs un bruit de fond important dans le cas du spectre Raman et aucune bande n'est observable alors que les signaux en SERS demeurent intenses. La bande du KNO_3 demeure présente vers 1050 cm^{-1}. L'amplification SERS permet non seulement de faire apparaitre les bandes caractéristiques permettant d'identifier le TNT, mais son spectre n'est pas affecté significativement par la contribution des AgNPs (aucune bande vers 1050 cm^{-1}).

Figure 4.18 Comparaison du spectre SERS (**noir**) et Raman (**rouge**) mesuré dans les mêmes conditions (hormis la présence d'AgNPs et de KNO_3) du TNT. Le spectre Raman des AgNPs (**vert**) est également illustré pour présenter la contribution potentielle du substrat métallique au spectre SERS. Une comparaison des spectres normalisés est jointe pour faciliter l'illustration du spectre Raman.



La comparaison des bandes du spectre SERS avec celles présentées par Sylvia permet de supporter l'identification du TNT, malgré l'absence de certaines bandes. Notamment, les auteurs ont obtenu deux bandes vers 800 cm^{-1}, l'une associée à la déformation angulaire du NO_2 ($\delta_{s\ (2,4,6\text{-}NO2)}$) vers 820-850 cm^{-1} et l'autre à la déformation d'une liaison C-H ($\delta_{\ (C\text{–}H)}$) vers 800 cm^{-1} (Fig. 4.17, p.73). Étant donné l'absence d'une des bandes dans le spectre SERS obtenu (Fig. 4.18, p.74), la large bande à 799 cm^{-1} a été assignée à la déformation angulaire ($\delta_{s\ (2,4,6\text{-}NO2)}$) en cohérence avec la présence de la vibration symétrique ($\nu_{s\ (2,6\text{-}NO2)}$) intense et caractéristique du TNT (Tab. 4.8, p.75). Tout comme le fentanyl, il est également possible que certains signaux, tels que celui à 1591 cm^{-1}, proviennent du carbone amorphe résultant de la destruction des molécules DE TNT dans le « hot-spot ».

Par l'observation d'une amplification SERS considérable de la solution de TNT en présence d'AgNPs, d'un patron spectral semblable entre les spectres SERS et d'une assignation acceptable des bandes caractéristiques du TNT, il est possible de supporter que les AgNPs synthétisées ont permis l'obtention de signaux nécessaires à l'identification du TNT.

Tableau 4.8 Assignation et comparaison des bandes principales du TNT sélectionnées dans le spectre SERS mesuré avec celles du spectre de référence de Sylvia (2000). Les deux bandes caractéristiques du TNT considérées comme davantage pertinentes à son identification sont accentuées en **gras**.

TNT	Spectre SERS mesuré (cm^{-1})	Spectre SERS Sylvia et al. (cm^{-1})
$\delta_{(C-H)}$	-	800
$\delta_{s\ (2,4,6\text{-}NO2)}$	**799**	**[820-850]**
$\delta_{(C-H)}$ benzène	1092	[1080-1100]
$\nu_{s\ (2,6\text{-}NO2)}$	**1334**	**1356**
$\nu_{as\ (2,4,6\text{-}NO2)}$	1519	[1500-1550]
$\nu_{(C=C)}$ benzène	1591	[1580-1600]

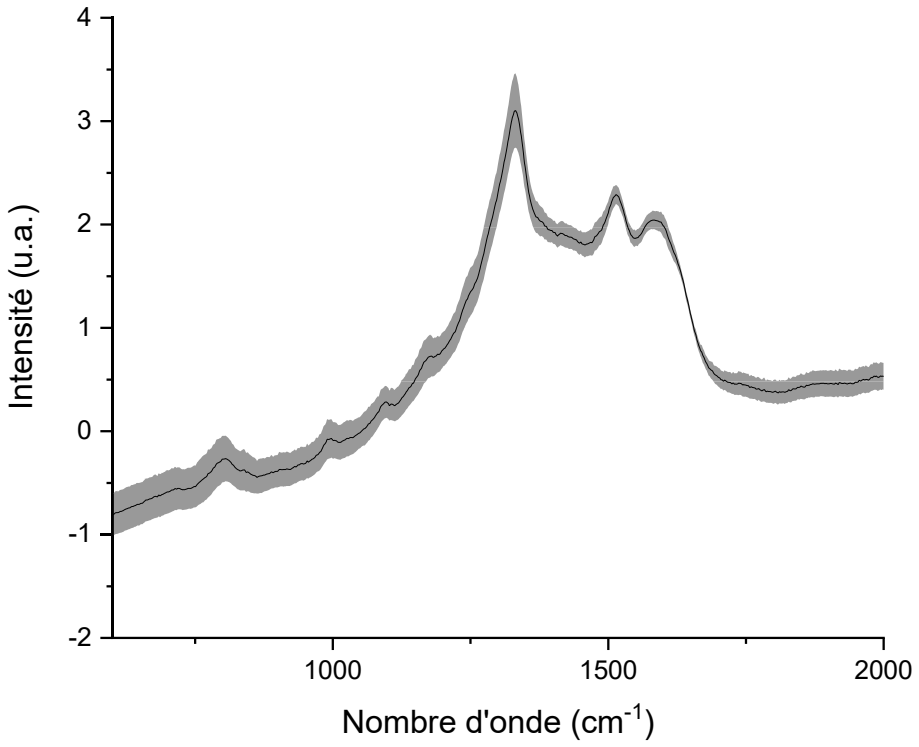
[XX-XX] valeurs estimées étant donné l'absence de mention dans l'article

δ_s : déformation angulaire (cisaillement) ν_s : Élongation symétrique ν_{as} : Élongation asymétrique

La même procédure que celle dans le cas du 4-ATP et du fentanyl a été effectuée avec le TNT pour évaluer la reproductibilité au niveau de ces mesures. La figure 4.19 présente ainsi le spectre moyen du TNT mesuré avec le spectromètre CORA 5500™. En comparaison au spectre moyen du fentanyl (Fig. 4.15, p.68), celui du TNT possède une intensité globale relativement plus élevée notamment dans le cas de la bande caractéristique du groupement nitro ($\nu_{s\ (2,6\text{-}NO2)}$). L'affinité pour le substrat métallique (AgNPs) est attendue à être meilleure avec les groupements nitro du TNT qui peuvent effectivement se lier aux AgNPs, contrairement au fentanyl. Une adsorption efficace du TNT avec le substrat métallique permettrait de bénéficier d'une amplification considérable. La technique SERS demeure une technique de surface. Les

analytes doivent être très près du substrat métallique pour pouvoir bénéficier du phénomène LSPR et l'amplification des signaux rattachée.

Figure 4.19 Spectre SERS moyen des 15 spectres mesurés du TNT dans le cadre de l'étude de la reproductibilité au spectromètre CORA 5500™.



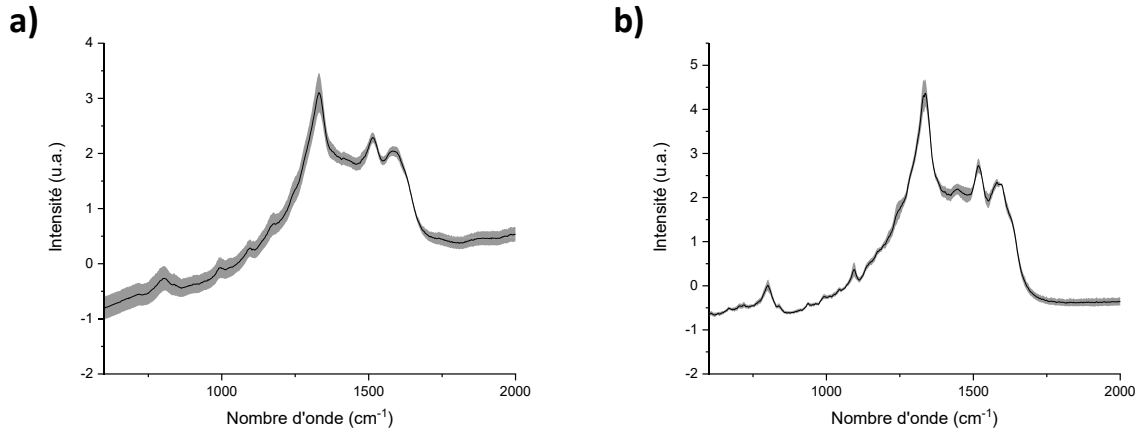
Le tableau 4.9 présente les valeurs de %RSD relatives à chaque bande assignée au spectre SERS du TNT. L'étendue des valeurs obtenues [4-83] % est plus élevée que celle des bandes retenues pour le fentanyl [6-21] % (Tab.4.7, p.71). Les deux bandes, 799 et 1092 cm^{-1}, possèdent des intensités relativement faibles, ce qui peut justifier partiellement les hautes valeurs de %RSD. Néanmoins, la valeur de la bande caractéristique du TNT à 1334 cm^{-1} demeure en dessous de la limite acceptable de 20% avec une valeur de 11%. Étant donné l'affinité intermédiaire du TNT pour les AgNPs, l'hétérogénéité de surface des « hot-spots » peut affecter particulièrement la précision des résultats sans mentionner l'impact de la modification des règles de sélection en fonction de l'orientation et de la symétrie de la molécule dans le cas d'un mécanisme de transfert de charge.

Tableau 4.9 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du spectre SERS mesuré au spectromètre CORA 5500™ du TNT. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. Les deux bandes caractéristiques du TNT considérées comme davantage pertinentes à son identification sont accentuées en **gras**.

Bande (cm^{-1})	Déviation standard relative (%RSD)
799	**83**
1092	58
1334	**11**
1519	4
1591	5
Limite acceptable	20

Tout comme le fentanyl, un spectre SERS a été mesuré avec le microspectromètre DXR^3 ™ par souci de comparaison de la reproductibilité des mesures entre un spectromètre portable (CORA 5500™) et un de laboratoire (DXR^3).

Figure 4.20 Comparaison des spectres moyens SERS mesurés a) au spectromètre CORA 5500™ et b) au spectromètre DXR^3 ™ du TNT.



Une comparaison qualitative entre les deux spectres relève une différence notable entre l'intensité relative des bandes sélectionnées lors de l'assignation. Notamment, l'intensité des deux bandes caractéristiques des groupements nitro (≈820 et 1330cm^{-1}) est davantage importante avec le spectre DXR^3 ™, ce qui était attendu étant donné la résolution supérieure du DXR^3 ™ comparativement à celle du CORA 5500™.

Tableau 4.10 Présentation des valeurs de déviation standard relative (%RSD) en fonction des bandes principales sélectionnées du spectre SERS mesuré au spectromètre DXR^{3} ™ du TNT. La limite acceptable mentionnée dans Natan (2006) est présentée pour comparaison. Les deux bandes caractéristiques du TNT considérées comme davantage pertinentes à son identification sont accentuées en **gras**.

Bande (cm^{-1})	Déviation standard relative (%RSD)
799	**29**
1092	47
1334	**8**
1519	6
1591	1
Limite acceptable	20

Les valeurs de %RSD pour le DXR^{3} ™ sont inférieures à celles présentées pour le CORA 5500™ dans le cas du TNT (Tab 4.9, p.77). Toutefois, telle que le fentanyl, la précision des deux spectromètres demeure, dans l'ensemble, relativement similaire au niveau de la reproductibilité, hormis celle de la bande à 799 cm^{-1} qui a subi une nette amélioration (83% pour le CORA 5500™). Comme mentionné précédemment, l'amplification par l'interaction avec un « hot-spot » peut expliquer la variabilité intense d'une bande en particulier dans le cas du CORA 5500™ Il suffit ensuite qu'une liaison en particulier soit impliquée avec un mécanisme de transfert de charge, tel qu'un groupement nitro, pour que la bande en question varie substantiellement en intensité.

Les mêmes constatations que celles présentées dans le cadre de la comparaison des résultats du fentanyl demeurent pertinentes avec le TNT. Nécessairement, l'adaptation d'un spectromètre Raman en appareil portatif impacte certains paramètres expérimentaux, dont la résolution spectrale et les modalités d'analyse (puissance, microscope, etc.). Toutefois, ces compromis demeurent négligeables dans le cadre d'une application forensique pour la détection et l'identification de substance illicite sur le terrain et les avantages de pouvoir obtenir des résultats fiables sur le terrain une fois la validation de la méthode SERS complétée. Tant que les objectifs de la validation qualitative de la méthode SERS sont rapportés afin de s'assurer de l'exactitude et de la précision des spectres mesurés, les avantages de la portabilité d'un spectromètre pourraient être considérés comme surpassant ces limitations opérationnelles.

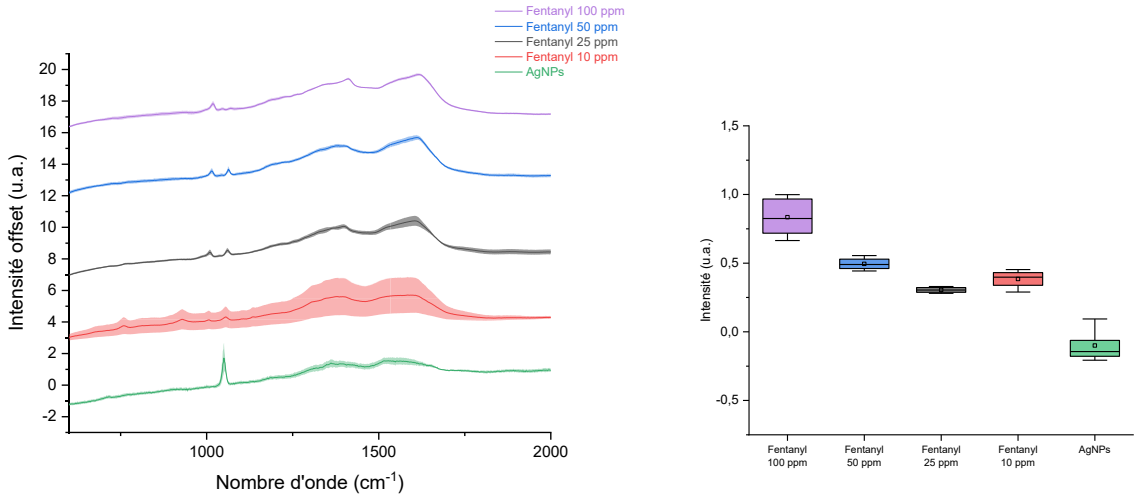
4.2.3 Estimation de la limite de détection

La validation de la méthode analytique SERS est considérée comme étant qualitative, plutôt que quantitative, étant donné que l'intérêt de la SERS pour le domaine de la science forensique est davantage orienté sur l'identification. Ainsi, l'estimation de la limite de détection n'est, a priori, pas nécessaire pour compléter la validation qualitative de la méthode SERS. Cependant, il a été considéré qu'il est tout de même pertinent, afin de démontrer l'efficacité du substrat métallique dans son amplification d'une trace chimique potentiellement retrouvée sur une scène d'incident, d'estimer la concentration à laquelle il est possible d'identifier avec précision le TNT et le fentanyl. Bien que l'estimation de la limite de détection demeure intéressante pour un colorant, tel que le 4-ATP, celle-ci n'a pas été effectuée et l'emphase a été mise plutôt sur les composés d'intérêt forensique (TNT et fentanyl).

L'estimation de la limite de détection correspond au paramètre semi-quantitatif de la validation de la méthode SERS de ce projet. Les prochains spectres et graphiques présentent l'évolution de l'intensité relative des signaux en fonction de la concentration de l'analyte. Le spectre des AgNPs est également rapporté pour représenter la contribution associée au substrat métallique avec l'absence d'analyte. Dans chacun des cas respectifs (fentanyl ou TNT), le spectre SNV moyen de chaque solution est présenté accompagné d'un diagramme en boite de la bande intense caractéristique de l'analyte en question. Les diagrammes à boite ont été créés à la suite d'une correction de la ligne de base via un lissage asymétrique des moindres carrés. Cette correction, relativement forte, permet de rapporter l'intensité des signaux de chaque solution en éliminant la contribution de la ligne de base. Dans le but de présenter les données intègres et d'apprécier le patron spectral, la même procédure a été réalisée avec le spectre brut de chaque analyte. Le ratio S/N proposé dans la littérature de 3 :1 est employé pour justifier l'identification de l'analyte (Trullols *et al.*, 2004).

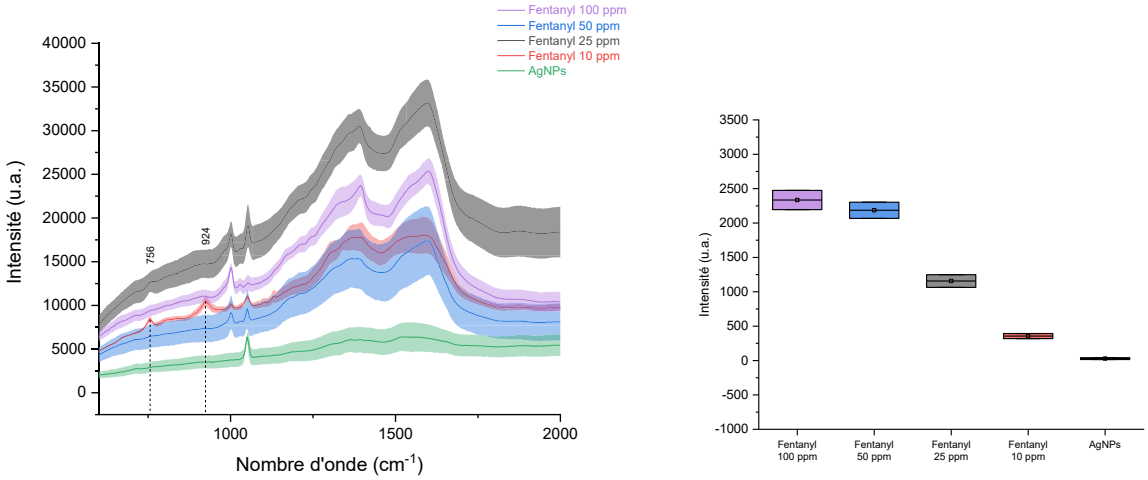
4.2.3.1 Fentanyl

Figure 4.21 Spectre SERS prétraité par SNV des solutions du fentanyl à différentes concentrations (100, 50, 25 et 10) ppm avec un diagramme à boite de l'intensité de la bande à 1000 cm^{-1} corrigé par lissage asymétrique des moindres carrés. Le spectre des AgNPs est également ajouté permettant de distinguer les spectres SERS de celui du substrat métallique.



Le diagramme en boite permet d'apprécier davantage l'évolution de l'intensité de la bande caractéristique du fentanyl (1000 cm^{-1}) comparé au spectre SNV avec intensité offset. Cette bande a été sélectionnée pour son intensité prédominante et pour sa signification particulière dans l'identification du fentanyl tel que mentionné précédemment (Haddad *et al.*, 2018; Leonard *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). L'intensité de la bande demeure généralement faible pour toutes les solutions de fentanyl. L'évolution de l'intensité de la bande est décroissante jusqu'à 25 ppm où celle-ci commence à plafonner. Tout de même, le spectre du fentanyl à 10 ppm continue à se distinguer de celui des AgNPs et respecte toujours le critère d'identification S/N de 3 :1. Cependant, la variabilité du spectre de la solution de 10 ppm est significativement plus élevée que celle des autres solutions malgré qu'aucune donnée aberrante n'ait été détectée lors de l'analyse. Cette variabilité peut être due au faible nombre de molécules participant à l'amplification SERS et ayant été échantillonnés lors de l'acquisition du spectre. Par conséquent, la prise de plusieurs spectres sur l'ensemble de la goutte peut effectivement causer davantage d'erreurs que dans le cas d'une solution de concentration plus élevée. La variabilité, dans le cas des spectres bruts présentés dans la figure suivante, demeure relativement semblable entre chaque solution.

Figure 4.22 Spectre SERS brut des solutions du fentanyl à différentes concentrations (100, 50, 25 et 10) ppm avec un diagramme à boite de l'intensité de la bande à 1000 cm^{-1} corrigé par lissage asymétrique des moindres carrés. Le spectre des AgNPs est également ajouté permettant de distinguer les spectres SERS de celui du substrat métallique.



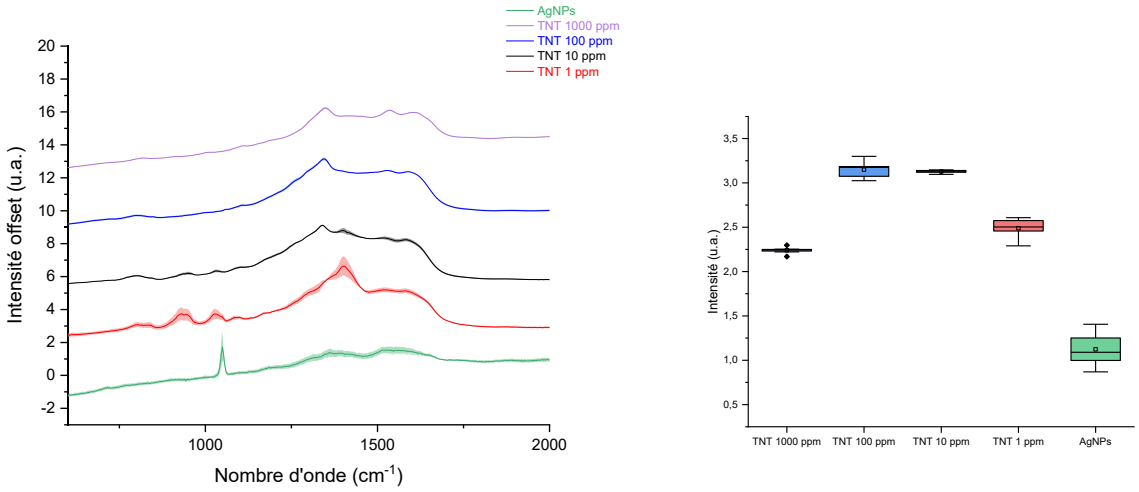
Il est intéressant de constater que l'évolution de la bande à 1000 cm^{-1} dans le diagramme à boite associé aux spectres bruts est relativement similaire à celle des spectres SNV. Il est toutefois important de considérer que, dans le cas des données brutes, l'intensité de la bande à 1000 cm^{-1} peut comprendre également la contribution de la ligne de base, qui n'a pas été corrigée par SNV.

L'une des différences est que l'intensité de la solution de 10 ppm en fentanyl est, dans ce cas-ci, inférieure à celle de la solution de 25 ppm comme attendu étant donné la quantité inférieure de molécules disponibles à interagir. Les spectres bruts permettent d'apprécier le patron spectral de chaque solution. Il est possible d'observer la présence de certaines bandes pour le spectre de la solution de 10 ppm (920 et 750 cm^{-1}) qui sont absentes de ceux des autres solutions (25, 50 et 100) ppm. La présence de « nouvelles » bandes dans le spectre de la solution de 10 ppm peut être attribuée à la quantité optimale de molécules avec une solution de faible concentration. Dans le cas des solutions de plus haute concentration, la quantité élevée de molécules peut empêcher l'interaction et l'orientation optimale de la structure du fentanyl de sorte que certaines vibrations peuvent être amplifiées considérablement par le substrat métallique. Cette observation implique des règles de sélection de surface pour la SERS du fentanyl et un phénomène d'amplification chimique de ces bandes spécifiques. La bande vers 900 cm^{-1} est attribuée à la déformation trigonale asymétrique C-H d'un groupement benzène alors que la bande vers 700 cm^{-1} est assignée à la déformation d'une liaison C-H selon (Leonard *et al.*, 2017).

4.2.3.2 TNT

Les différentes solutions de TNT (100, 10 et 1) ppm ont été préparées par dilution successive d'un facteur de 10 à partir de la solution de 1000 ppm. Chaque solution a fourni un spectre SERS pouvant être corrélé à l'identification du TNT sur la base du patron spectral présenté précédemment (Fig. 4.18, p.74). Tout comme le fentanyl, le spectre de chaque solution est présenté et accompagné d'un diagramme à boite de la bande principale sélectionnée (Fig. 4.23, p.82). Dans le cas du TNT, la bande sélectionnée est celle vers 800 cm^{-1} qui correspond à la déformation angulaire du NO_2 ($\delta_{s\ (2,4,6\text{-}NO2)}$). Elle a été choisie bien que l'intensité de la bande à 1330 cm^{-1}, correspondant à l'élongation symétrique ($\nu_{s\ (2,6\text{-}NO2)}$) tout autant caractéristique du TNT, soit plus élevée. La justification derrière cette décision est basée sur l'accentuation de la ligne de base qui est beaucoup plus significative vers 1330 cm^{-1} alors qu'elle est relativement négligeable vers 800 cm^{-1}.

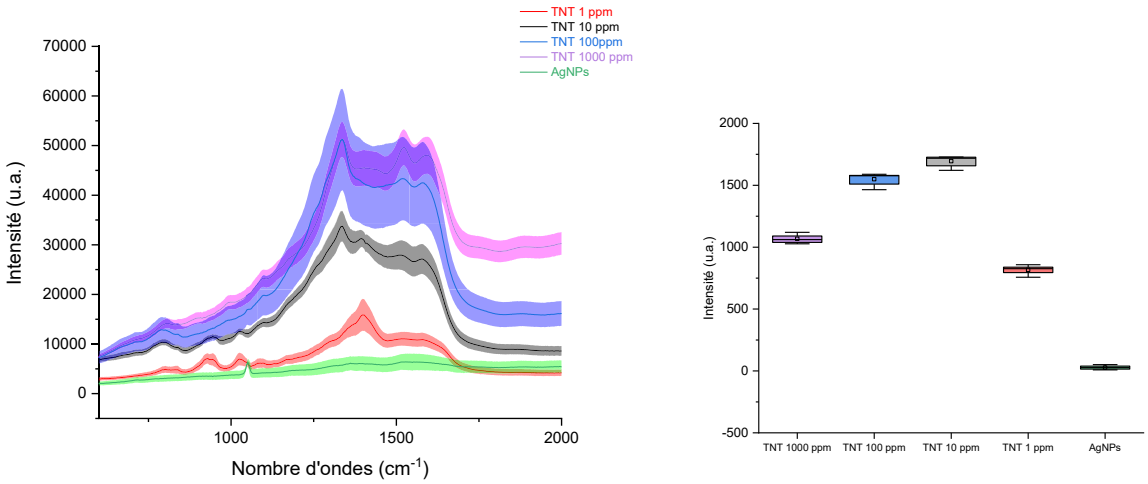
Figure 4.23 Spectre SERS prétraité par SNV des solutions du TNT à différentes concentrations (1000, 100, 10 et 1) ppm avec un diagramme à boite de l'intensité de la bande à 800 cm^{-1} corrigé par lissage asymétrique des moindres carrés. Le spectre des AgNPs est également ajouté permettant de distinguer les signaux des spectres SERS de ceux du substrat métallique.



Il est possible d'observer que l'intensité de la solution de 1000 ppm est inférieure à celle des autres solutions, même celle dont la concentration est de 1 ppm. L'explication derrière ces résultats provient du phénomène de « self-absorption » qui est observé lorsque la concentration en analyte est fortement élevée. À haute concentration, la surface du substrat métallique peut devenir saturée de sorte que les molécules toujours en solution vont venir agir en tant que filtre. Elles vont absorber les photons du laser et ceux de la diffusion SERS atténuant l'intensité des bandes caractéristiques et perturbant la précision

des résultats (Muehlethaler *et al.*, 2017). Ce phénomène peut expliquer la raison pour laquelle il y a également 2 valeurs considérées comme étant aberrantes dans le diagramme à boite de la solution de 1000 ppm. De plus, il y a une saturation au niveau de l'intensité entre la solution de 100 et 10 ppm avant de diminuer pour la solution de 1 ppm. Cette observation peut être également attribuée au phénomène de « self-absorption » où la différence de concentration entre 100 et 10 ppm ne diminue pas l'intensité de la bande. La concentration en TNT optimale semble alors être près de 10 ppm puisqu'une concentration plus élevée ne contribue pas à des signaux plus élevés et qu'une diminution de concentration réduit leurs intensités. Le spectre de la solution de 1000 ppm, tout comme la solution de 1 ppm, est tout de même au-dessus du ratio S/N 3 :1 et permet l'identification du TNT, tout comme les autres solutions. Le phénomène de « self-absorption » n'est pas observé dans le cas du fentanyl étant donné que la plus haute concentration des solutions de fentanyl est de 100 ppm, qui n'est pas suffisamment élevée pour perturber les signaux des molécules participant au SERS.

Figure 4.24 Spectre SERS brut des solutions du TNT à différentes concentrations (1000, 100, 10 et 1) ppm avec un diagramme à boite de l'intensité de la bande à 800 cm^{-1} corrigé par lissage asymétrique des moindres carrés. Le spectre des AgNPs est également ajouté permettant de distinguer les spectres SERS de celui du substrat métallique



La variabilité des spectres bruts est similaire entre chaque solution et demeure relativement élevée. Le prétraitement SNV permet de corriger la majorité des erreurs observées (Fig. 4.23, p.82). La dynamique du diagramme à boite des spectres bruts est similaire à celui des spectres SNV bien que l'intensité du spectre de la solution de 1000 ppm soit légèrement au-dessus de celui de la solution de 1 ppm. Toutefois, la dynamique observée n'est pas celle attendue, telle que celle obtenue avec le fentanyl, soit une diminution proportionnelle de l'intensité de la bande en fonction de la concentration. Le phénomène de

« self-absorption » permet toujours d'expliquer l'intensité réduite dans le cas de la solution de 1000 ppm et de 100 ppm du TNT. Le patron du spectre de la solution de 1 ppm présente également une différence notable au niveau de la bande vers 1330 cm^{-1}, assignée à l'élongation symétrique du groupement nitro, dont l'intensité est significativement faible. De plus, la bande vers 1430 cm^{-1}, absente dans le spectre SERS moyen du TNT, est apparente dans le spectre de la solution de 1 ppm. Cette bande se distingue légèrement dans le spectre de la solution de 10 ppm ainsi que dans le spectre SERS mesuré au spectromètre DXR^{3} ™ (Fig. 4.20, p. 77). Cependant, cette bande ne peut pas être assignée à aucune vibration caractéristique du TNT à la suite d'une revue de la littérature entourant la SERS du TNT (Clarkson *et al.*, 2003; Demeritte *et al.*, 2012; Holthoff, Ellen L. *et al.*, 2011; Muehlethaler *et al.*, 2016b; Zhang *et al.*, 2014). Tout comme le fentanyl, les différences observées dans les spectres SERS en fonction de la concentration sont attribuées à l'amplification chimique spécifique de certaines bandes qui sont dues à l'interaction et à l'orientation des molécules. À concentration élevée, les molécules vont avoir moins d'espace pour effectuer leur liaison sur les AgNPs, surtout si l'interaction s'effectue via une chimisorption (liaison forte) plutôt qu'une physisorption (liaison faible). À concentration faible, les molécules vont avoir plus d'espace pour effectuer leur interaction optimale avec le substrat métallique, mais vont être moins nombreuses pour contribuer au signal SERS.

4.2.4 Estimation du facteur d'amplification (EF)

Jusqu'à présent, aucune mention n'a été faite sur les facteurs d'amplification obtenus dans le cadre des résultats de ce projet. Typiquement, la littérature SERS porte une attention particulière aux facteurs d'amplification depuis la proposition de la détection d'une molécule unique (Kneipp *et al.*, 1997; Nie et Emory, 1997) avec des facteurs d'amplification significativement élevés de 10^{10}-10^{12}. C'est d'ailleurs ce qui a propulsé exponentiellement l'intérêt pour l'étude et la mise en application de la SERS au début des années 2000 (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008). Toutefois, l'objectif de ce projet n'est pas de présenter une méthode SERS offrant une amplification exceptionnelle, mais plutôt qu'elle soit simple, accessible, abordable et fiable. Le facteur d'amplification (EF) calculé dans le cadre de ce projet correspond au ratio des intensités (I_{SERS} et I_{Raman}) normalisées par la concentration respective en analyte (c_{SERS} et c_{Raman}) (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008) :

$$EF = \frac{I_{SERS}/c_{SERS}}{I_{Raman}/c_{Raman}}$$

Tableau 4.11 Estimation du facteur d'amplification pour chacun des analytes employés dans le cadre de ce projet. Les valeurs d'I_{SERS} et I_{Raman} correspondent à celles de la bande principale respective à chaque analyte. Les valeurs de c_{SERS} et c_{Raman} correspondent à la concentration de chacun des analytes lors de l'acquisition des spectres.

Analyte	**I_{SERS}**	**I_{Raman}**	**c_{SERS} (ppm)**	**c_{Raman} (ppm)**	**EF**
4-ATP	11466	44	25	1E+02	$1x10^3$
Fentanyl	2869	32	25	1E+02	$4x10^2$
TNT	7356	10	250	1E+03	$3x10^3$

Nécessairement, les spectres SERS et Raman ont été mesurés sous des conditions identiques, hormis la présence d'AgNPs et de KNO_3 spécifique au SERS. Cette estimation du facteur d'amplification permet d'offrir une solution simple et pertinente dans le cas d'une solution d'AgNPs, plutôt que d'un substrat planaire, pour le calcul de l'EF. Néanmoins, il est important de mettre l'accent sur le fait que cette estimation ne considère pas l'un des points significatifs de la SERS : le fait qu'il s'agit essentiellement d'une technique de surface. Ainsi, la normalisation en fonction de c_{SERS} suppose qu'I_{SERS} provient de la totalité des molécules en solution alors qu'uniquement les molécules en contact avec les AgNPs contribuent réellement aux signaux obtenus (I_{SERS}). De plus, le signal I_{Raman} provient uniquement des molécules présentes dans le volume d'échantillonnage du laser et non de la totalité des molécules en solution. Par conséquent, le ratio I_{SERS}/c_{SERS} et I_{Raman}/c_{Raman} est, tout comme le EF, sous-estimé et ne caractérise pas fidèlement l'amplification SERS observés avec les AgNPs. Une meilleure caractérisation du EF, et celle considérée comme étant la meilleure estimation de EF dans la littérature SERS (Cai *et al.*, 1998), est de normaliser les signaux I_{SERS} et I_{Raman} en fonction du nombre de molécules à la surface du substrat métallique N_{SERS} et dans le volume d'échantillonnage en Raman N_{Raman} :

$$EF = \frac{I_{SERS}/N_{SERS}}{I_{Raman}/N_{Raman}}$$

Toutefois, ce calcul doit considérer une monocouche des analytes et n'est pas apte à des solutions de forte concentration, ce qui n'est pas généralement un problème dans le cadre d'une application SERS où les analytes sont au niveau de la trace (Le Ru, E. et Etchegoin, 2008).

La valeur de c_{Raman} correspond à la concentration de chacun des analytes, soit 1000 ppm pour le TNT et 100 ppm pour le fentanyl et le 4-ATP. Étant donné que 0,5 μL a été ajouté à 1 μL et 0,5 μL de KNO_3 dans le cadre des mesures SERS, la valeur de c_{SERS} est diluée d'un facteur 4, soit 250 ppm pour le TNT et 25 ppm pour le 4-ATP et le fentanyl. Les valeurs sélectionnées d'intensité I_{SERS} et I_{Raman} proviennent respectivement des valeurs assignées à la bande principale de chacun des analytes (4-ATP : 1430 cm^{-1}, fentanyl : 1000 cm^{-1}, TNT : 1334 cm^{-1}) après correction de la ligne de base. Cette étape permet d'éviter que l'augmentation de la ligne de base due à la fluorescence, dans le cas du 4-ATP, ou aux AgNPs, dans le cas du TNT et du fentanyl, ne perturbe pas l'intensité réelle de la bande sur le spectre Raman et SERS. Comme attendu, la valeur du EF pour le TNT est supérieure à celle du fentanyl ($3x10^3$ comparée à $4x10^2$) puisqu'elle possède des groupements nitro pouvant se lier aux AgNPs alors que l'interaction du fentanyl est entièrement basée sur des forces de Van Der Waals. Toutefois, il est surprenant de constater que la molécule contrôle, le 4-ATP possède un EF relativement faible avec une valeur de $1x10^3$. L'une des raisons peut être que la différence dans l'intensité entre le spectre Raman et SERS du 4-ATP, étant à la base très sensible en Raman, ne soit pas considérable. De même, le phénomène de « self-absorption » peut toujours nuire lorsque les molécules en solution peuvent absorber l'émission des molécules participant à la SERS. Il est attendu que ce phénomène affecte notamment le 4-ATP. De même, tel que mentionné précédemment, le fait de rapporter I_{SERS} en fonction de c_{SERS} crée nécessairement une sous-estimation de la valeur réelle de EF et une molécule très sensible en Raman, telle que le 4-ATP, peut être significativement affectée par cette pratique. Il ne suffit concrètement que de quelques molécules qui puissent contribuer au signal observé en étant au bon endroit tel qu'un « hot-spot » et le ratio I_{SERS}/c_{SERS} devient non caractéristique de l'amplification réelle observée.

4.3 Discussion générale

Le cas du 4-ATP est particulier considérant la formation d'un nouveau composé (DMAB) sous l'illumination du laser. Ainsi, un facteur supplémentaire est modifié entre le SERS et le Raman : la molécule fournissant le signal I_{SERS} ou I_{Raman} n'est pas identique et ne possède pas, entre autres, la même section efficace ni la même polarisabilité. C'est un des problèmes qui ont nui à la fiabilité attribuée aux valeurs extrêmes d'EF dans le passé. Certains auteurs ont calculé l'EF attribué à leur résultat en rapportant l'intensité SERS d'un colorant (extrêmement sensible en Raman) par rapport à une molécule de faible sensibilité en Raman (Kneipp *et al.*, 1997; Nie et Emory, 1997). Tel que mentionné précédemment, dans le cadre d'un calcul représentatif et fiable du EF, il est primordial que le spectre SERS et Raman soit mesuré dans des conditions

identiques. Nécessairement, si l'analyte est modifié entre les deux techniques, la valeur attribuée à l'EF sera conséquemment affectée.

Les AgNPs n'ont pas été prétraités dans le but d'optimiser les mesures d'un analyte en particulier. Autant le fentanyl que le TNT ont été mesurés avec le même substrat métallique sans modifier sa surface. De plus, ces analytes sont reconnus comme n'ayant pas une bonne affinité pour les AgNPs, mais demeurent des molécules d'intérêt forensique. Par conséquent, les valeurs de facteur d'amplification (EF) obtenues sont relativement faibles en comparaison avec les valeurs typiques attendues en SERS (10^6-10^8). Tout comme le 4-ATP, le TNT peut également être affectée par le phénomène de « self-absorption » puisque sa concentration est relativement élevée comparée à celle des autres analytes (1000 ppm comparativement à 100 ppm).

Malgré qu'il soit reconnu que les facteurs d'amplification présentés sont modestes comparés à ceux attendus et qu'ils demeurent susceptibles de varier considérablement par l'emploi d'AgNPs, étant donné l'hétérogénéité de surface inhérente de ce type de substrat et la présence de « hot-spots » aléatoires, le substrat SERS demeure recommandé dans l'exploitation de la SERS pour la science forensique. Il est important de mentionner que l'intérêt du domaine de la science forensique est davantage tourné vers une reproductibilité des signaux obtenus en SERS plutôt que des facteurs d'amplification significatifs. Il est bien plus important dans un contexte judiciaire de détecter précisément les bandes caractéristiques permettant l'identification, certes à une intensité convenable par rapport au bruit de fond (S/N > 3), bien que le facteur d'amplification soit modeste, voire faible. Les avantages de la polyvalence, de la simplicité et des faibles coûts de synthèse des AgNPs surpassent largement ses inconvénients qui, après avoir subi une validation complète, demeurent tolérables dans un contexte forensique.

La validation de la méthode SERS est considérée comme étant qualitative plutôt que quantitative. Une étude quantitative nécessite l'étude de davantage de paramètres, dont l'approfondissement de la limite de détection, la limite de quantification et le domaine de linéarité (Trullols *et al.*, 2004). Étant donné que l'intérêt de la SERS pour le domaine de la science forensique est orienté sur l'identification, une méthode de validation qualitative semblait plus pertinente. Toutefois, les paramètres évalués dans le cadre de ce projet (précision au niveau de la répétabilité, reproductibilité « spot-to-spot » et estimation de la limite de détection) ne couvrent pas la totalité d'une méthode de validation qualitative. Davantage de paramètres doivent être étudiés pour s'assurer de la fiabilité de la méthode SERS notamment la sensibilité, la

spécificité et la robustesse. La robustesse correspond à la capacité de la méthode à fournir des résultats fiables sous diverses conditions opérationnelles ou environnementales. Il est possible, par exemple, d'étudier l'impact d'une modification des conditions environnementales, telles que la température et le taux d'humidité, sur les signaux mesurés. D'ailleurs, ce paramètre est particulièrement important dans un pays, tel que le Canada, où les conditions météorologiques sur le terrain varient considérablement au cours de l'année. La validation de la sensibilité et de la spécificité est également cruciale pour le domaine de la science forensique. Elles permettent de s'assurer que les taux de faux positif et de faux négatif soient négligeables ou raisonnables pour une méthode analytique. La sensibilité, définie comme l'habileté d'une méthode à détecter un test connu positif comme étant effectivement positif (Trullols *et al.*, 2004):

$$Sensibilité = \frac{Test\ réellement\ positif}{Total\ positif\ obtenu} = \frac{Vrai\ positif}{Vrai\ positif\ +\ Faux\ négatif}$$

Conjointement, la spécificité est définie comme étant la capacité d'une méthode à détecter un test connu négatif comme étant effectivement négatif :

$$Spécficité = \frac{Test\ réellement\ négatif}{Total\ négatif\ obtenu} = \frac{Vrai\ négatif}{Vrai\ négatif\ +\ Faux\ positif}$$

Ces deux paramètres nécessitent néanmoins l'accès à des substances contrôlées et des échantillons de cas réels pour effectuer les mesures sous diverses conditions en modifiant la matrice avec des adultérants et des agents de coupage.

La validation partielle effectuée dans le cadre de ce projet permet tout de même de constater que la méthode SERS permet d'identifier précisément les molécules d'intérêt forensique (fentanyl et TNT). Ces molécules, telles que spécifiées précédemment, ne sont pas reconnues comme étant des molécules sensibles en spectroscopie Raman. En introduisant le substrat métallique, soit les AgNPs, en contact avec ses molécules, sans modifier de quelque façon la surface ni l'intégrité de la trace chimique, il est possible d'obtenir une amplification convenable à l'identification de ces molécules. Les AgNPs sont simples à fabriquer, abordables et accessibles autant aux laboratoires de recherche qu'à ceux judiciaires. Le spectromètre utilisé, CORA 5500™, demeure également portable et peut être effectivement employé comme instrument de détection et d'identification des substances illicites directement sur la scène d'incident. La comparaison de la précision des spectres obtenue entre le CORA 5500™ et un spectromètre

de laboratoire (DXR^{3} ™) démontre qu'il n'y a pas de différence significative au niveau de la variabilité et du patron spectral qui puisse nuire à l'identification de l'analyte. C'est l'un des objectifs d'actualité dans la mise en place de méthodes fiables pour la détection de traces chimiques sur le terrain : transporter le laboratoire sur le terrain tout en s'assurant de préserver la fiabilité des résultats malgré les compromis qui accompagnent cette démarche. Elle permettrait peut-être de réduire la surcharge de travail des laboratoires judiciaires et la latence des résultats. Il demeure opportun de préserver les tests d'orientation, tels que ceux colorimétriques, dans le cadre de l'identification de stupéfiants sur la scène de crime. Étant donné que l'admissibilité de la méthode SERS ne soit pas affirmée, le complément de la méthode SERS avec un test colorimétrique permettrait de préserver une identification fiable par deux méthodes aux principes différents tout en demeurant une séquence analytique intéressante pour soulager les latences et coûts associés aux analyses de laboratoire.

CHAPITRE 5
CONCLUSION

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet permettent de proposer une solution pertinente, sous la forme du développement d'une méthode analytique SERS-portable, à la situation actuelle concernant la détection et l'identification de traces chimiques sur une scène d'incident. Les analyses présentement effectuées sur une scène d'incident demeurent considérées comme des tests d'orientation puisqu'elles sont susceptibles à des taux élevés de faux positifs ou de faux négatifs. Par conséquent, elles doivent être accompagnées d'un test confirmatoire, généralement réalisé en laboratoire, dans le but d'identifier avec fiabilité la substance retrouvée, ce qui demande plus de temps et d'argent dû, entre autres, à la surcharge des laboratoires judiciaires. Le développement d'une méthode analytique SERS qui est rapide, sensible, hautement spécifique, semi-destructive et portative permettra de fournir une solution innovante à la problématique actuelle et à la gestion des facteurs de stress : temps, argent, continuité et préservation de l'intégrité de la preuve. Ces critères sont d'autant plus cruciaux lorsque le spécimen d'intérêt est à l'état de traces, nécessairement contaminé par son environnement physique et par les circonstances de sa déposition sur scène, mais également par les activités des premiers intervenants. La SERS a démontré un très fort potentiel dans la littérature pour le domaine de la science forensique (Muehlethaler *et al.*, 2016a). Cependant, la majorité nécessite des conditions de laboratoire particulières au niveau de l'instrumentation et de la préparation des échantillons. Le déploiement d'une méthode analytique SERS-portable implique inévitablement des compromis et une adaptation des paramètres instrumentaux.

Les objectifs de ce projet ont été séparés en deux volets. Premièrement, la synthèse d'un substrat SERS à base de nanoparticules d'argent (AgNPs) a été optimisée au four à micro-ondes conventionnel, basée sur l'étude antérieure de Leona (2009), à l'aide d'un design expérimental à deux facteurs (niveau de puissance et temps de chauffage) et cinq niveaux pour un total de 25 expériences 2^5. Trois facteurs de réponse ont été évalués par spectrophotométrie UV-vis : l'absorbance, la position du maxima et la largeur de la bande à mi-hauteur (FWHM) afin de sélectionner les conditions optimales de synthèse. Celles-ci ont été déterminées comme étant d'une puissance de 9 sur le réglage du four à micro-ondes (1080W) avec un temps de chauffage de 120s. La solution d'AgNPs synthétisée fournie une absorbance élevée qui, d'après la loi de Beer-Lambert, supporte une concentration proportionnellement élevée en AgNPs ($5x10^{23}$ colloïdes/cm^3) et une faible valeur de FWHM signifiant que les nanoparticules sont monodispersées (distribution étroite) et de diamètre uniforme. Le diamètre moyen des AgNPs a été déterminé

subséquemment par microscopie électronique à transmission (TEM) comme étant de (35 ±3) nm. L'optimisation de la synthèse des nanoparticules permet de proposer un substrat SERS qui est simple, accessible et abordable (réactifs disponibles, micro-onde conventionnelle, chimie verte) autant à des laboratoires de recherche qu'à ceux judiciaires afin de promouvoir l'utilisation de cette technique aux néophytes. L'optimisation de la synthèse des colloïdes demeure limitée aux facteurs sélectionnés. Un design expérimental complet avec davantage de facteurs, tels que la concentration des réactifs, permettrait d'approfondir la réaction chimique au cœur de cette synthèse qui n'est pas tout à fait évidente au niveau moléculaire et atomique dans la littérature.

Le deuxième objectif de ce projet est de valider la fiabilité de la méthode analytique SERS-portable qualitative dans la perspective qu'elle soit exploitée dans un contexte judiciaire et qu'elle soit inévitablement questionnée lors de son admissibilité à la cour. Établie sur l'étude de Trullols (2004), la validation de la précision au niveau de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode SERS a été effectuée avec un spectromètre portatif CORA 5500™. La répétabilité a été étudiée à l'aide d'une molécule contrôle, le 4-ATP, reconnue comme étant particulièrement sensible en spectroscopie Raman. Des valeurs de déviation standard relative (%RSD) de [2-15] % sont associées à la variabilité issue du substrat métallique à base d'AgNPs en solution et des différents facteurs inhérents (mouvement brownien, évaporation, photodégradation). Cette variabilité est reconnue comme étant supérieure à celle de la reproductibilité pour le 4-ATP [6-9] % qui, elle, est issue de l'hétérogénéité de surface des AgNPs.

La reproductibilité de deux molécules d'intérêt forensique a été étudiée dans le cadre de ce projet, le fentanyl, un opioïde synthétique, significativement plus puissant que l'héroïne, et un explosif couramment employé, le TNT. La valeur du %RSD pour la bande principale du fentanyl correspond à 21% alors que celle pour le TNT est de 11%. Comparée à la limite acceptable de 20% présentée par Natan (2006), les valeurs obtenues supportent tout de même une précision acceptable pour les mesures effectuées avec la méthode analytique SERS et l'hypothèse comme quoi le TNT possède une affinité intermédiaire pour les AgNPs alors qu'elle est faible pour le fentanyl. L'étude a été répliquée avec un spectromètre de laboratoire DXR^{3} ™ et des valeurs similaires de %RSD ont été obtenues pour le fentanyl et le TNT signifiant que, malgré les compromis impliqués lors de la conversion d'un spectromètre en appareil portatif, la reproductibilité des mesures demeure néanmoins acceptable.

Une étape semi-quantitative a également été effectuée dans le cadre de la validation de la méthode analytique SERS, soit l'estimation de la limite de détection des molécules d'intérêt forensique. Il a été estimé qu'il est possible d'identifier jusqu'à 10 ppm de fentanyl et 1 ppm de TNT tout en respectant le critère d'identification proposé dans la littérature de ratio signal sur bruit de fond (S/N) supérieur à 3. Une estimation du facteur d'amplification accompagne celle de la limite de détection. Des valeurs modestes de $1x10^3$, $4x10^2$ et $3x10^3$ ont été respectivement obtenues pour le 4-ATP, le fentanyl et le TNT.

La validation de la méthode analytique qualitative demeure partielle et davantage de paramètres doivent être évalués dont la robustesse, la sensibilité et la spécificité. Ces paramètres sont particulièrement importants à étudier étant donné que les traces chimiques retrouvées sur une scène d'incident, telle qu'une scène d'explosion ou d'un démantèlement d'un laboratoire clandestin, sont par définition un spécimen non contrôlé, partiel, dégradé et mélangé. Néanmoins, la validation effectuée permet de renseigner les praticiens sur le potentiel et les limites de la méthode SERS dans le cadre de la détection et l'identification de composés chimiques. Il demeure recommandé, via la collaboration avec un laboratoire judiciaire et l'accès à des substances contrôlées ainsi que des échantillons de cas réels, d'effectuer une étude des paramètres de validation omis dans le cadre de ce projet.

Une perspective intéressante pour l'application de la SERS en science forensique serait le potentiel de substrat-SERS innovant à base de papier permettant le prélèvement, la concentration et la mesure in situ. Les colloïdes d'argent (AgNPs) demeurent un substrat SERS polyvalent, mais nécessitent que la trace chimique soit en solution aqueuse. Par conséquent, une étape intermédiaire avant la prise de mesure avec le substrat SERS à base d'AgNPs sur le terrain est de solubiliser le spécimen dans un solvant adéquat altérant nécessairement l'intégrité même de la trace. La proposition d'un substrat SERS à base de papier, sur lequel une couche d'argent est présente, permettrait de prélever directement la trace chimique par tamponnage, de concentrer les analytes et d'effectuer une mesure immédiatement sur la scène d'incident avec un spectromètre portable. Également, une séquence analytique polyvalente demeure une avenue intéressante pour le domaine de la science forensique. Plusieurs solutions de colloïdes préalablement fonctionnalisés pourraient être employées successivement dans le but de favoriser l'affinité et l'amplification spécifique d'une famille de composés.

BIBLIOGRAPHIE

Albrecht, M. G. et Creighton, J. A. (1977, 1977/06/01). Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, *99*(15), 5215-5217. https://doi.org/10.1021/ja00457a071

Alessandri, I. et Lombardi, J. R. (2016, 2016/12/28). Enhanced Raman Scattering with Dielectrics. *Chemical Reviews*, *116*(24), 14921-14981. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00365

Aroca, R. (2006). *Surface-enhanced vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons.

Barros, E. B. et Dresselhaus, M. S. (2014, 07/25/). Theory of Raman enhancement by two-dimensional materials: Applications for graphene-enhanced Raman spectroscopy. *Physical Review B*, *90*(3), 035443. https://doi.org/10.1103/PhysRevB.90.035443

Betz, J. F., Yu, W. W., Cheng, Y., White, I. M. et Rubloff, G. W. (2014). Simple SERS substrates: powerful, portable, and full of potential [10.1039/C3CP53560F]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *16*(6), 2224-2239. https://doi.org/10.1039/C3CP53560F

Brown, R. J. C. et Milton, M. J. T. (2008). Nanostructures and nanostructured substrates for surface—enhanced Raman scattering (SERS). *Journal of Raman Spectroscopy*, *39*(10), 1313-1326. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.2030

Cai, W. B., Ren, B., Li, X. Q., She, C. X., Liu, F. M., Cai, X. W. et Tian, Z. Q. (1998, 1998/05/31/). Investigation of surface-enhanced Raman scattering from platinum electrodes using a confocal Raman microscope: dependence of surface roughening pretreatment. *Surface Science*, *406*(1), 9-22. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0039-6028(97)01030-3

Cañamares, M. V., Chenal, C., Birke, R. et Lombardi, J. (2008, 12/03). DFT, SERS, and single-molecule SERS of crystal violet. *Journal of Physical Chemistry C - J PHYS CHEM C*, *112*. https://doi.org/10.1021/jp807807j

Chan, G. H., Zhao, J., Hicks, E. M., Schatz, G. C. et Van Duyne, R. P. (2007, 2007/07/01). Plasmonic Properties of Copper Nanoparticles Fabricated by Nanosphere Lithography. *Nano Letters*, *7*(7), 1947-1952. https://doi.org/10.1021/nl070648a

Chen, L., Gao, Y., Cheng, Y., Li, H., Wang, Z., Li, Z. et Zhang, R.-Q. (2016). Nonresonant chemical mechanism in surface-enhanced Raman scattering of pyridine on M@Au12 clusters [10.1039/C5NR07246H]. *Nanoscale*, *8*(7), 4086-4093. https://doi.org/10.1039/C5NR07246H

Chou, A., Jaatinen, E., Buividas, R., Seniutinas, G., Juodkazis, S., Izake, E. L. et Fredericks, P. M. (2012). SERS substrate for detection of explosives [10.1039/C2NR32409A]. *Nanoscale*, *4*(23), 7419-7424. https://doi.org/10.1039/C2NR32409A

Chu, H. O., Song, S., Li, C. et Gibson, D. (2017). Surface Enhanced Raman Scattering Substrates Made by Oblique Angle Deposition: Methods and Applications. *Coatings*, *7*(2), 26. https://www.mdpi.com/2079-6412/7/2/26

Clarkson, J., Smith, W. E., Batchelder, D. N., Smith, D. A. et Coats, A. M. (2003, 2003/03/26/). A theoretical study of the structure and vibrations of 2,4,6-trinitrotolune. *Journal of Molecular Structure*, *648*(3), 203-214. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2860(03)00024-3

Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdoses d'opioïdes. (2022). *Méfaits associés aux opioïdes et aux stimulants au Canada*. Agence de la santé publique du Canada. https://sante-infobase.canada.ca/mefaits-associes-aux-substances/opioides-stimulants

Cuypers, E., Bonneure, A.-J. et Tytgat, J. (2016). The use of presumptive color tests for new psychoactive substances. *Drug Testing and Analysis*, *8*(1), 136-140. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.1847

De Gelder, J., Vandenabeele, P., Govaert, F. et Moens, L. (2005). Forensic analysis of automotive paints by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, *36*(11), 1059-1067. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.1408

Demeritte, T., Kanchanapally, R., Fan, Z., Singh, A. K., Senapati, D., Dubey, M., Zakar, E. et Ray, P. C. (2012). Highly efficient SERS substrate for direct detection of explosive TNT using popcorn-shaped gold nanoparticle-functionalized SWCNT hybrid [10.1039/C2AN35984G]. *Analyst*, *137*(21), 5041-5045. https://doi.org/10.1039/C2AN35984G

Drude, P. (1900). Zur Elektronentheorie der Metalle. *Annalen der Physik*, *306*(3), 566-613. https://doi.org/10.1002/andp.19003060312

Fan, M., Andrade, G. F. S. et Brolo, A. G. (2011, 2011/05/05/). A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, *693*(1), 7-25. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.002

Fleischmann, M., Hendra, P. J. et McQuillan, A. J. (1974, 1974/05/15/). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, *26*(2), 163-166. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1

Freestone, I., Meeks, N., Sax, M. et Higgitt, C. (2007, 2007/12/01). The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, *40*(4), 270-277. https://doi.org/10.1007/BF03215599

Gao, X., Davies, J. P. et Weaver, M. J. (1990, 1990/08/01). Test of surface selection rules for surface-enhanced Raman scattering: the orientation of adsorbed benzene and monosubstituted benzenes on gold. *The Journal of Physical Chemistry*, *94*(17), 6858-6864. https://doi.org/10.1021/j100380a059

Gares, K. L., Hufziger, K. T., Bykov, S. V. et Asher, S. A. (2016). Review of explosive detection methodologies and the emergence of standoff deep UV resonance Raman. *Journal of Raman Spectroscopy*, *47*(1), 124-141. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.4868

Gérard, D. et Gray, S. K. (2014, 2014/12/15). Aluminium plasmonics. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *48*(18), 184001. https://doi.org/10.1088/0022-3727/48/18/184001

Groscup, J. L., Penrod, S. D., Studebaker, C. A., Huss, M. T. et O'Neil, K. M. (2002). The effects of Daubert on the admissibility of expert testimony in state and federal criminal cases. *Psychology, Public Policy, and Law*, *8*(4), 339-372. https://doi.org/10.1037/1076-8971.8.4.339

Gy, P. M. (1995, 1995/02/01/). Introduction to the theory of sampling I. Heterogeneity of a population of uncorrelated units. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *14*(2), 67-76. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-9936(95)91474-7

Haddad, A., Comanescu, M. A., Green, O., Kubic, T. A. et Lombardi, J. R. (2018, 2018/11/06). Detection and Quantitation of Trace Fentanyl in Heroin by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, *90*(21), 12678-12685. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02909

Han, X. X., Zhao, B. et Ozaki, Y. (2009, 2009/08/01). Surface-enhanced Raman scattering for protein detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *394*(7), 1719-1727. https://doi.org/10.1007/s00216-009-2702-3

Han, Y., Lupitskyy, R., Chou, T.-M., Stafford, C. M., Du, H. et Sukhishvili, S. (2011, 2011/08/01). Effect of Oxidation on Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Silver Nanoparticles: A Quantitative Correlation. *Analytical Chemistry*, *83*(15), 5873-5880. https://doi.org/10.1021/ac2005839

Hargreaves, M. D., Page, K., Munshi, T., Tomsett, R., Lynch, G. et Edwards, H. G. M. (2008). Analysis of seized drugs using portable Raman spectroscopy in an airport environment—a proof of principle study. *Journal of Raman Spectroscopy*, *39*(7), 873-880. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.1926

Holthoff, E. L., Stratis-Cullum, D. N. et Hankus, M. E. (2011). A Nanosensor for TNT Detection Based on Molecularly Imprinted Polymers and Surface Enhanced Raman Scattering. *Sensors*, *11*(3), 2700-2714. https://www.mdpi.com/1424-8220/11/3/2700

Holthoff, E. L., Stratis-Cullum, D. N. et Hankus, M. E. (2011). A nanosensor for TNT detection based on molecularly imprinted polymers and surface enhanced Raman scattering. *Sensors (Basel)*, *11*(3), 2700-2714. https://doi.org/10.3390/s110302700

Huang, Y.-F., Wu, D.-Y., Zhu, H.-P., Zhao, L.-B., Liu, G.-K., Ren, B. et Tian, Z.-Q. (2012). Surface-enhanced Raman spectroscopic study of p-aminothiophenol [10.1039/C2CP40558J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *14*(24), 8485-8497. https://doi.org/10.1039/C2CP40558J

Huang, Y.-F., Zhu, H.-P., Liu, G.-K., Wu, D.-Y., Ren, B. et Tian, Z.-Q. (2010, 2010/07/14). When the Signal Is Not from the Original Molecule To Be Detected: Chemical Transformation of para-Aminothiophenol on Ag during the SERS Measurement. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(27), 9244-9246. https://doi.org/10.1021/ja101107z

Izake, E. L. (2010, 2010/10/10/). Forensic and homeland security applications of modern portable Raman spectroscopy. *Forensic Sci Int*, *202*(1), 1-8. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.020

Jackson, J. D. (1999). *Classical electrodynamics* : American Association of Physics Teachers.

Jeanmaire, D. L. et Van Duyne, R. P. (1977, 1977/11/10/). Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, *84*(1), 1-20. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6

Ji, W., Zhao, B. et Ozaki, Y. (2016). Semiconductor materials in analytical applications of surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, *47*(1), 51-58. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.4854

Kahraman, M., Mullen, E. R., Korkmaz, A. et Wachsmann-Hogiu, S. (2017). Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing. *Nanophotonics*, *6*(5), 831-852. https://doi.org/doi:10.1515/nanoph-2016-0174

Kirk, P. L. (1953). Crime investigation; physical evidence and the police laboratory.

Kneipp, K., Kneipp, H., Kartha, V. B., Manoharan, R., Deinum, G., Itzkan, I., Dasari, R. R. et Feld, M. S. (1998, 06/01/). Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Physical Review E*, *57*(6), R6281-R6284. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.57.R6281

Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R. R. et Feld, M. S. (1997, 03/03/). Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Physical Review Letters*, *78*(9), 1667-1670. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667

Kuhar, N., Sil, S., Verma, T. et Umapathy, S. (2018). Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials [10.1039/C8RA04491K]. *RSC advances*, *8*(46), 25888-25908. https://doi.org/10.1039/C8RA04491K

Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A. et Fadeel, B. (2011, 2011/03/01/). Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1810*(3), 361-373. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.04.007

Le Ru, E. et Etchegoin, P. (2008). *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*. Elsevier.

Le Ru, E. C., Blackie, E., Meyer, M. et Etchegoin, P. G. (2007, 2007/09/01). Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, *111*(37), 13794-13803. https://doi.org/10.1021/jp0687908

Lee, K.-S. et El-Sayed, M. A. (2006, 2006/10/01). Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition. *The Journal of Physical Chemistry B*, *110*(39), 19220-19225. https://doi.org/10.1021/jp062536y

Lee, P. C. et Meisel, D. (1982, 1982/08/01). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, *86*(17), 3391-3395. https://doi.org/10.1021/j100214a025

Leona, M. (2009). Microanalysis of organic pigments and glazes in polychrome works of art by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(35), 14757-14762. https://doi.org/10.1073/pnas.0906995106

Leonard, J., Haddad, A., Green, O., Birke, R. L., Kubic, T., Kocak, A. et Lombardi, J. R. (2017). SERS, Raman, and DFT analyses of fentanyl and carfentanil: Toward detection of trace samples. *Journal of Raman Spectroscopy*, *48*(10), 1323-1329. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.5220

Lepot, L., De Wael, K., Gason, F. et Gilbert, B. (2008, 2008/09/01/). Application of Raman spectroscopy to forensic fibre cases. *Science & Justice*, *48*(3), 109-117. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scijus.2007.09.013

Li, Y.-S. et Church, J. S. (2014, 2014/03/01/). Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal of Food and Drug Analysis*, *22*(1), 29-48. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.003

Ling, X., Xie, L., Fang, Y., Xu, H., Zhang, H., Kong, J., Dresselhaus, M. S., Zhang, J. et Liu, Z. (2010, 2010/02/10). Can Graphene be used as a Substrate for Raman Enhancement? *Nano Letters*, *10*(2), 553-561. https://doi.org/10.1021/nl903414x

Locard, E. (1920). *L'enquête criminelle et les méthodes scientifiques*. E. Flammarion.

Lombardi, J. R. et Birke, R. L. (2009, 2009/06/16). A Unified View of Surface-Enhanced Raman Scattering. *Accounts of Chemical Research*, *42*(6), 734-742. https://doi.org/10.1021/ar800249y

Lombardi, J. R. et Birke, R. L. (2014, 2014/05/22). Theory of Surface-Enhanced Raman Scattering in Semiconductors. *The Journal of Physical Chemistry C*, *118*(20), 11120-11130. https://doi.org/10.1021/jp5020675

Loos, M. (2015). Chapter 1 - Nanoscience and Nanotechnology. Dans M. Loos (dir.), *Carbon Nanotube Reinforced Composites* (p. 1-36). William Andrew Publishing. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3195-4.00001-1.

Lux, C., Lubio, A., Ruediger, A., Robert, S. et Muehlethaler, C. (2019, 09/01). Optimizing the analysis of dyes by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) using a conventional-microwave silver nanoparticles synthesis. *Forensic Chemistry*, *16*, 100186. https://doi.org/10.1016/j.forc.2019.100186

Mabbott, S., Correa, E., Cowcher, D. P., Allwood, J. W. et Goodacre, R. (2013, 2013/01/15). Optimization of Parameters for the Quantitative Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of Mephedrone Using a Fractional Factorial Design and a Portable Raman Spectrometer. *Analytical Chemistry*, *85*(2), 923-931. https://doi.org/10.1021/ac302542r

McNay, G., Eustace, D., Smith, W. E., Faulds, K. et Graham, D. (2011). Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. *Applied Spectroscopy*, *65*(8), 825-837. https://doi.org/10.1366/11-06365

Moore, D. S. et Scharff, R. J. (2009, 2009/03/01). Portable Raman explosives detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *393*(6), 1571-1578. https://doi.org/10.1007/s00216-008-2499-5

Moskovits, M. (1978). Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *The Journal of Chemical Physics*, *69*(9), 4159-4161. https://doi.org/10.1063/1.437095

Moskovits, M. (2013). Persistent misconceptions regarding SERS [10.1039/C2CP44030J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *15*(15), 5301-5311. https://doi.org/10.1039/C2CP44030J

Moskovits, M. et Suh, J. S. (1984, 1984/11/01). Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of

phthalazine on silver. *The Journal of Physical Chemistry*, *88*(23), 5526-5530. https://doi.org/10.1021/j150667a013

Muehlethaler, C., Leona, M. et Lombardi, J. R. (2016a, 2016/01/05). Review of Surface Enhanced Raman Scattering Applications in Forensic Science. *Analytical Chemistry*, *88*(1), 152-169. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04131

Muehlethaler, C., Leona, M. et Lombardi, J. R. (2016b, 2016/11/01/). Towards a validation of surface-enhanced Raman scattering (SERS) for use in forensic science: repeatability and reproducibility experiments. *Forensic Sci Int*, *268*, 1-13. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.09.005

Muehlethaler, C., Lombardi, J. R. et Leona, M. (2017). Sample self-absorption in surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): influence of the resonance, dilution and depth of the measurements. *Journal of Raman Spectroscopy*, *48*(5), 647-652. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.5097

Munro, C. H., Smith, W. E., Garner, M., Clarkson, J. et White, P. C. (1995, 1995/10/01). Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering. *Langmuir*, *11*(10), 3712-3720. https://doi.org/10.1021/la00010a021

Natan, M. J. (2006). Concluding Remarks Surface enhanced Raman scattering [10.1039/B601494C]. *Faraday Discussions*, *132*(0), 321-328. https://doi.org/10.1039/B601494C

Newey, W. K. et Powell, J. L. (1987). Asymmetric Least Squares Estimation and Testing. *Econometrica*, *55*(4), 819-847. https://doi.org/10.2307/1911031

Nie, S. et Emory, S. R. (1997, Feb 21). Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science*, *275*(5303), 1102-1106. https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1102

Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J. et Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra [10.1039/C4AN00978A]. *Analyst*, *139*(19), 4855-4861. https://doi.org/10.1039/C4AN00978A

Philp, M. et Fu, S. (2018). A review of chemical 'spot' tests: A presumptive illicit drug identification technique. *Drug Testing and Analysis*, *10*(1), 95-108. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.2300

Pillai, Z. S. et Kamat, P. V. (2004, 2004/01/01). What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? *The Journal of Physical Chemistry B*, *108*(3), 945-951. https://doi.org/10.1021/jp037018r

Pilot, R., Signorini, R., Durante, C., Orian, L., Bhamidipati, M. et Fabris, L. (2019, Apr 17). A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Biosensors (Basel)*, *9*(2). https://doi.org/10.3390/bios9020057

Pilot, R., Signorini, R. et Fabris, L. (2018). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Principles, Substrates, and Applications. Dans F. L. Deepak (dir.), *Metal Nanoparticles and Clusters: Advances in Synthesis, Properties and Applications* (p. 89-164). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68053-8_4.

Pines, D. (1956). Collective Energy Losses in Solid. *Reviews of Modern Physics*, *28*(3), 16.

Powell, C. J. et Swan, J. B. (1959, 08/15/). Origin of the Characteristic Electron Energy Losses in Aluminum. *Physical Review*, *115*(4), 869-875. https://doi.org/10.1103/PhysRev.115.869

Prekupec, M. P., Mansky, P. A. et Baumann, M. H. (2017, Jul/Aug). Misuse of Novel Synthetic Opioids: A Deadly New Trend. *J Addict Med*, *11*(4), 256-265. https://doi.org/10.1097/adm.0000000000000324

Raman, C. V. et Krishnan, K. S. (1928). A new type of secondary radiation. *Nature*, *121*(3048), 501-502.

Ritchie, R. H. (1957, 06/01/). Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Physical Review*, *106*(5), 874-881. https://doi.org/10.1103/PhysRev.106.874

Ropret, P. et Madariaga, J. M. (2014). Applications of Raman spectroscopy in art and archaeology. *Journal of Raman Spectroscopy*, *45*(11-12), 985-992. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.4631

Ru, E. C. L., Etchegoin, P. G. et Meyer, M. (2006). Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection. *The Journal of Chemical Physics*, *125*(20), 204701. https://doi.org/10.1063/1.2390694

Schlücker, S. (2014). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, *53*(19), 4756-4795. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201205748

Shafer-Peltier, K. E., Haynes, C. L., Glucksberg, M. R. et Van Duyne, R. P. (2003, 2003/01/01). Toward a Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(2), 588-593. https://doi.org/10.1021/ja028255v

Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A.-I., Ringe, E. et Van Duyne, R. P. (2012, 2012/01/01/). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, *15*(1), 16-25. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70017-2

Smith, E. et Dent, G. (2019). *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons.

Swinehart, D. F. (1962, 1962/07/01). The Beer-Lambert Law. *Journal of Chemical Education*, *39*(7), 333. https://doi.org/10.1021/ed039p333

Sylvia, J. M., Janni, J. A., Klein, J. D. et Spencer, K. M. (2000, 2000/12/01). Surface-Enhanced Raman Detection of 2,4-Dinitrotoluene Impurity Vapor as a Marker To Locate Landmines. *Analytical Chemistry*, *72*(23), 5834-5840. https://doi.org/10.1021/ac0006573

Trullols, E., Ruisánchez, I. et Rius, F. X. (2004, 2004/02/01/). Validation of qualitative analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *23*(2), 137-145. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00201-8

Vandenabeele, P., Edwards, H. G. M. et Jehlička, J. (2014). The role of mobile instrumentation in novel applications of Raman spectroscopy: archaeometry, geosciences, and forensics [10.1039/C3CS60263J]. *Chemical Society Reviews*, *43*(8), 2628-2649. https://doi.org/10.1039/C3CS60263J

Vandenabeele, P., Edwards, H. G. M. et Moens, L. (2007, 2007/03/01). A Decade of Raman Spectroscopy in Art and Archaeology. *Chemical Reviews*, *107*(3), 675-686. https://doi.org/10.1021/cr068036i

Vankeirsbilck, T., Vercauteren, A., Baeyens, W., Van der Weken, G., Verpoort, F., Vergote, G. et Remon, J. P. (2002, 2002/12/01/). Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *21*(12), 869-877. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)01208-6

Wang, H., Xue, Z., Wu, Y., Gilmore, J., Wang, L. et Fabris, L. (2021, 2021/07/13). Rapid SERS Quantification of Trace Fentanyl Laced in Recreational Drugs with a Portable Raman Module. *Analytical Chemistry*, *93*(27), 9373-9382. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00792

West, P. R., Ishii, S., Naik, G. V., Emani, N. K., Shalaev, V. M. et Boltasseva, A. (2010). Searching for better plasmonic materials. *Laser & Photonics Reviews*, *4*(6), 795-808. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/lpor.200900055

Xu, H., Aizpurua, J., Käll, M. et Apell, P. (2000, 09/01/). Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. *Physical Review E*, *62*(3), 4318-4324. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.62.4318

Zhang, C., Wang, K., Han, D. et Pang, Q. (2014, 2014/03/25/). Surface enhanced Raman scattering (SERS) spectra of trinitrotoluene in silver colloids prepared by microwave heating method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *122*, 387-391. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.11.066