

La spectroscopie Raman exaltée pour l'imagerie chimique nanométrique

Résumé La spectroscopie Raman est une technique particulièrement adaptée pour la caractérisation des molécules et des matériaux. Elle est néanmoins confrontée à un « problème de taille » pour l'étude de nano-objets individuels du fait de la faible intensité de diffusion Raman et de sa résolution spatiale optique limitée par diffraction à quelques centaines de nanomètres. Pour pallier ces défauts, la spectroscopie Raman exaltée de pointe (TERS) s'est progressivement répandue à partir des années 2000. Afin d'améliorer la sensibilité de détection et la mise en œuvre de cette technique spectroscopique, et ainsi faciliter l'acquisition des données, un système de TERS utilisant un éclairage laser en réflexion totale interne a été développé en y intégrant un microscope à force atomique (AFM). Couplé également à de la microscopie de diffusion en champ sombre (MDCS), il constitue un outil idéal pour localiser rapidement des nano-objets, puis réaliser leur caractérisation morphologique, chimique et structurale colocalisée avec une résolution spatiale optique nanométrique.

Mots-clés Spectroscopie Raman, microscopie de diffusion en champ sombre, microscopie à force atomique, spectroscopie Raman exaltée de pointe (TERS), nano-objets individuels, biomolécules, nanoparticules métalliques.

Abstract Enhanced Raman spectroscopy for nanoscale chemical imaging
Raman spectroscopy is a technique particularly suitable for the characterization of molecules and materials. It is however confronted with a significant problem for the study of individual nano-objects due to the low Raman scattering intensity and to its spatial optical resolution limited by diffraction to a few hundred nanometers. To overcome these shortcomings, tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) has gradually spread since the years 2000. In order to improve the detection sensitivity and the implementation of this spectroscopic technique, and thus facilitate data acquisition, a total internal reflection tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) system including an atomic force microscope (AFM) has been developed. Coupled with dark-field scattering microscopy (DFSM), it constitutes an ideal tool to quickly locate nano-objects, and realize their colocalized morphological, chemical and structural characterization with nanoscale spatial optical resolution.

Keywords Raman spectroscopy, dark-field scattering microscopy, atomic force microscopy, tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS), individual nano-objects, biomolecules, metal nanoparticles.

Automobile, aéronautique, aérospatial, pharmacologie, médecine, cosmétique, agro-alimentaire..., les nano-objets (dimension inférieure à 0,1 μm) sont omniprésents dans notre société moderne. Certains sont formés de nanomatériaux permettant d'accéder à des propriétés mécaniques, optiques et électriques remarquables qui surpassent celles des matériaux traditionnels. À l'état individuel (nanoparticule) ou en association en nombre limité, ils peuvent présenter des applications en nano-électronique, opto-électronique et photonique. Leurs propriétés peuvent alors différer de celles qu'ils affichent lorsqu'ils sont dispersés en nombre dans une matrice ou organisés sur une surface. Solides ou liquides, les nano-objets comportent donc de nombreux avantages, mais certains, telles les particules d'aérosols et les poussières, sont aussi capables d'occasionner des effets néfastes sur la santé humaine et le climat. La mise au point de techniques permettant la caractérisation physico-chimique de nano-objets individuels est donc cruciale pour mieux comprendre leurs comportements, les exploiter au mieux à des fins applicatives ou s'en protéger. Dans ce contexte, le développement de techniques assurant la caractérisation chimique et morphologique colocalisée de nano-objets uniques apparaît particulièrement pertinente.

La spectroscopie Raman

De l'imagerie chimique microscopique...

La spectroscopie de diffusion Raman (ou plus simplement spectroscopie Raman) est une technique particulièrement

pertinente pour la caractérisation chimique de molécules et de matériaux [1]. Elle fournit en effet une riche signature spectrale associée à de nombreux modes de vibrations spécifiques de groupements chimiques. Outre les mesures point par point, elle permet la réalisation de cartes chimiques et structurales. La distribution spatiale des différents marqueurs de l'échantillon (leurs fonctions chimiques) peut alors être aisément déduite par intégration des intensités des bandes Raman correspondantes.

La spectroscopie Raman présente néanmoins deux inconvénients majeurs, à savoir une faible sensibilité liée à la faible section efficace de diffusion Raman (10^{-30} cm^2) et une résolution spatiale optique limitée par diffraction à une demi-longueur d'onde d'excitation typiquement, soit quelques centaines de nanomètres. Ces contraintes peuvent entraver la caractérisation de nano-objets pour deux raisons essentielles. La quantité de matière réduite les constituant induit souvent un signal Raman de faible intensité, à moins que la nanostructure puisse être excitée de manière résonante dans le visible (nanotubes de carbone ou graphène par exemple) ou contienne des groupements chimiques bons diffuseurs Raman (espèces aromatiques). Par ailleurs, l'hétérogénéité en composition des nano-objets ne peut pas être déterminée précisément, du fait de l'insuffisante résolution spatiale optique. Le signal Raman détecté, potentiellement faible, est donc une moyenne des contributions de tous les groupements chimiques irradiés sur quelques centaines de nanomètres.

... à l'imagerie chimique nanométrique

Pour s'affranchir des défauts de la spectroscopie Raman traditionnelle, la spectroscopie Raman exaltée de pointe (« tip-enhanced Raman spectroscopy », TERS) a été progressivement développée (*encadré 1*) [2-3]. Elle consiste à combiner la microscopie Raman à la microscopie à sonde locale (MSL), dite aussi microscopie en champ proche. La microscopie Raman fournit la caractérisation « moléculaire » de l'échantillon avec une bonne résolution spectrale (pouvant être inférieure à 1 cm^{-1}) et la MSL, à savoir la microscopie à force atomique (AFM) ou à effet tunnel (STM) essentiellement, permet notamment de générer des images topographiques avec une résolution spatiale latérale (et axiale) nanométrique. La sonde MSL métallique (aussi appelée pointe TERS) est généralement en or ou en argent, les deux métaux les plus pertinents de par leurs propriétés diélectriques et leur stabilité chimique plus grande que celle du cuivre et de l'aluminium. Le choix du métal est en effet intrinsèquement lié à la possibilité d'exciter la résonance plasmon de surface localisée à l'interface entre le métal du bout de la pointe TERS et son milieu diélectrique environnant. Cette excitation résonante par un faisceau laser produit une forte exaltation du champ électromagnétique au niveau du sommet de la pointe TERS à l'origine de l'amplification du signal Raman. Les mécanismes d'exaltation impliqués en TERS sont très similaires à ceux agissant en spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS), technique pour laquelle l'absorption plasmonique de nanoparticules ou nanostructures amplificatrices de champ électromagnétique dépend de leur composition, de leur taille, de leur forme et de leur environnement diélectrique [4]. Associé à l'effet paratonnerre non résonant induisant une accumulation de la densité de charge en bout de pointe TERS et à l'effet de nano-antenne résonant permettant une conversion du signal exalté en champ proche optique en un signal de champ lointain détectable, l'effet plasmonique est à l'origine du signal TERS capable de caractériser des nano-objets avec une résolution spatiale optique latérale de l'ordre de 5-10 nm, voire subnanométrique en présence de protubérances métalliques de taille nanométrique en bout de pointe TERS [5].

Du fait de ses capacités remarquables, la spectroscopie TERS s'est progressivement répandue pour la caractérisation chimique nanométrique des nanomatériaux et des biomolécules [2-3, 6]. Toutefois, les études par TERS sont confrontées à deux problèmes. Certains échantillons sensibles à l'irradiation laser peuvent être endommagés par le champ électromagnétique exalté localement pendant la courte durée d'acquisition du spectre TERS (1-15 s typiquement) et/ou par le spot laser lui-même devant stagner pendant des dizaines de minutes voire des heures sur une zone de l'échantillon, pour l'acquisition d'images TERS. Par ailleurs, la localisation par MSL de nano-objets dispersés sur une lamelle de verre ou de mica peut s'avérer assez laborieuse. Enfin, l'obtention d'un outil permettant de caractériser la résonance plasmon de surface localisée des pointes TERS constituerait une plus-value certaine pour déterminer la longueur d'onde idéale d'excitation préalablement à la réalisation d'expériences par TERS. Une optimisation technique des systèmes TERS traditionnels est donc nécessaire. C'est dans cette optique qu'un système TERS en réflexion totale interne a été développé au sein de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux pour pouvoir caractériser notamment des biomolécules et biomatériaux hétérogènes à l'échelle nanométrique le plus précisément

Encadré 1

Aux origines de la spectroscopie Raman exaltée de pointe

La microscopie optique en champ proche (« scanning near-field optical microscopy », SNOM) est née dès 1984 de la nécessité de caractériser des matériaux et des molécules avec une résolution spatiale en dessous de la limite de diffraction [13]. Elle consiste à coupler un microscope à sonde locale (MSL) à un système optique. Deux types de microscopes SNOM ont été proposés en fonction de la sonde utilisée, à savoir les instruments « a-SNOM » (aperture-SNOM) utilisant une pointe trouée avec une ouverture de diamètre supérieur à 50 nm et les « al-SNOM » (apertureless SNOM) avec une pointe sans ouverture. Avant l'an 2000, des techniques couplant SNOM (principalement a-SNOM) et spectroscopie de fluorescence ont été largement développées du fait de la section efficace d'émission de fluorescence élevée rendant même possible la détection de molécules uniques [14-15]. L'a-SNOM a également été utilisée pour détecter, sous excitation laser à 514,5 nm, la signature de diffusion Raman de résonance exaltée de surface (SERRS) de molécules aromatiques de rhodamine 6G déposées sur des colloïdes d'argent [16]. Elle s'est néanmoins avérée inefficace pour sonder des systèmes moléculaires au signal Raman non exalté, du fait de la faible puissance laser en sortie de pointe trouée (de l'ordre du nanowatt).

En 2000, plusieurs groupes ont alors proposé l'utilisation de l'al-SNOM pour la caractérisation Raman à l'échelle nanométrique, donnant ainsi naissance à la spectroscopie Raman exaltée de pointe (TERS) [17-19]. Jusqu'en 2010, les travaux en TERS se sont essentiellement limités à l'étude de molécules de colorants (tels la rhodamine 6G ou le bleu de crésyl brillant [17, 19]) et de nano-objets carbonés (tels les nanotubes de carbone [20]) présentant une forte section efficace de diffusion Raman, même si la caractérisation de quelques biosystèmes a débuté. À partir de 2010, des avancées techniques progressives améliorant la stabilité des systèmes MSL utilisés en TERS, le couplage optique avec le spectromètre Raman et les performances des pointes TERS ont permis d'élargir les domaines d'application de la technique en permettant notamment l'étude chimique et structurale nanométrique de nombreuses biomolécules (protéines, acides nucléiques et membranes lipidiques en particulier), de matériaux bidimensionnels (feuillet de graphène et MoS₂ par exemple) et de divers polymères.

possible, tout en minimisant les risques de dégradations photo-induites [7-8].

Quels sont les avantages de la réflexion totale interne pour des mesures TERS ?

Une des configurations expérimentales populaires pour la réalisation de mesures TERS sur nanostructures individuelles est la géométrie en éclairage par dessous (*figure 1*). Combinée à l'AFM, elle est la technique la plus fréquemment employée pour la caractérisation chimique nanométrique de systèmes biologiques [2-3]. Dans cette géométrie, la lumière laser incidente excite à la fois les nanostructures (l'échantillon) déposées sur un substrat optiquement transparent et la pointe TERS. Cette excitation lumineuse directe conduit à un signal Raman de champ lointain de l'échantillon qui peut être assez intense pour une longueur d'onde laser résonante, c'est-à-dire excitant l'échantillon à une de ses longueurs d'onde d'absorption UV-visible spécifique. Ce signal se superpose au signal TERS en champ proche optique et peut le masquer en partie. L'irradiation continue des nanostructures peut aussi causer leur décomposition progressive par

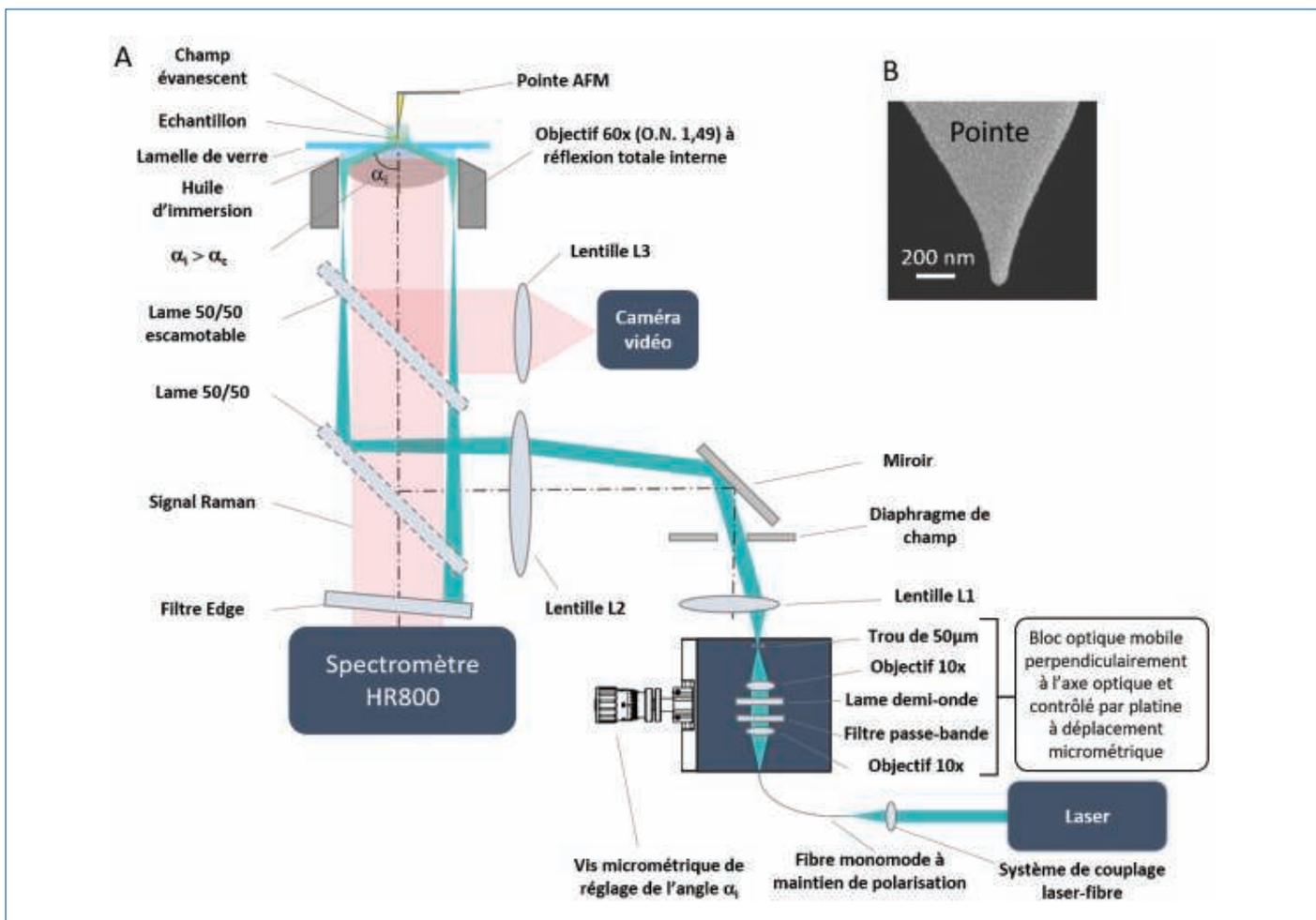


Figure 1 - (A) Système TERS en réflexion totale interne ; (B) image MEB d'une pointe TERS métallisée avec 60 nm d'or par pulvérisation cathodique.

chauffage photo-induit ou conduire à leur évolution par effet photochimique. Enfin, une large portion du spot laser, dont la taille est limitée par diffraction, irradie la pointe TERS sur un à plusieurs microns, le long de son axe. Si un contaminant approche la zone de champ électromagnétique exalté pendant la mesure, sa signature spectrale est susceptible de contribuer au signal détecté. Cela est particulièrement problématique lorsque le MSL est un système de type AFM car les sondes TERS sont alors classiquement produites par métallisation de pointes AFM commerciales. Les couches métalliques sont alors rugueuses, de sorte que chaque nanoparticule métallique de la zone de pointe irradiée peut exalter le champ électromagnétique incident et induire un signal exalté de contaminants éventuels à proximité immédiate par diffusion Raman exaltée de surface (SERS).

La configuration en éclairage par dessous en réflexion totale interne permet de limiter significativement ces inconvénients de la géométrie en éclairage direct [7-9] (figure 1 et encadré 2). La large zone d'échantillon excitée (jusqu'à 80 µm de diamètre) réduit la densité de puissance au niveau de l'échantillon, abaissant ainsi le signal Raman de champ lointain et les risques de dégradation. Par ailleurs, elle facilite l'alignement pointe-laser indispensable à toute expérience par TERS. Cette densité de puissance laser réduite n'obère pas l'obtention de signaux TERS intenses, en raison du fort couplage entre le plasmon de surface localisé de la pointe TERS et le champ évanescent produit [7-8] (encadré 2). Le signal TERS collecté est en effet typiquement trente fois plus intense en réflexion totale interne que sous éclairage laser

direct polarisé linéairement et huit fois plus intense que sous éclairage laser direct polarisé radialement [8]. Enfin, du fait de la faible portion de pointe TERS irradiée (~ 200-300 nm dans des conditions optimales pour des mesures TERS avec un angle d'incidence proche de l'angle critique du régime de réflexion totale interne), les contributions non désirées de contaminants éventuels sont minimisées.

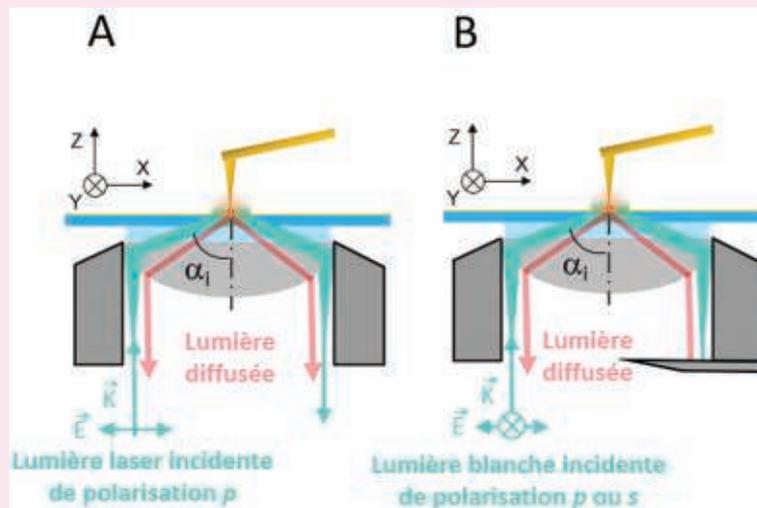
Outre ces atouts, cette configuration expérimentale permet, moyennant quelques adaptations minimales intégrables au sein d'un dispositif unique, de réaliser également de la microscopie de diffusion en champ sombre (MDCS) [9] (figures 2A, B et C et encadré 2). En MDCS, le contraste optique est amélioré par rapport à de la microscopie optique classique en champ clair, ce qui favorise la localisation aisée de nano-objets dispersés sur un substrat (nanosphères [10], nanobâtonnets [10], fibrilles [8] et nanofils [9] par exemple) et la mesure du spectre de diffusion élastique de nano-objets individuels. Le spectre de nanoparticules métalliques et de pointes TERS fournit leur bande de résonance plasmon de surface localisé, et par extension la longueur d'onde idéale d'excitation pour des expériences en SERS et/ou TERS, cette longueur d'onde et la résonance plasmon se devant d'être proches. Par exemple, une pointe métallisée avec 60 nm d'argent conduit à un fort signal diffusé dans le visible avec un maximum d'absorption à 540 nm (figure 2C). Par ailleurs, le signal en polarisation p est clairement plus intense que celui en polarisation s , ce qui est conforme aux attentes dans la mesure où la polarisation p produit une forte composante du champ électrique incident le long de l'axe de la pointe

Encadré 2

Deux instruments en un : TERS en réflexion totale interne et microscopie de diffusion en champ sombre

Un système TERS en réflexion totale interne est une variante de la configuration expérimentale en éclairage direct par dessous [2-3]. Dans cette dernière configuration, la lumière laser polarisée linéairement (ou radialement) est injectée via un objectif à forte ouverture numérique ($1,4 < \text{O.N.} < 1,5$ typiquement) et traverse le substrat optiquement transparent sur lequel l'échantillon est déposé. Le système d'éclairage en réflexion totale interne apporte plusieurs innovations techniques importantes. Outre l'utilisation d'un objectif à réflexion totale interne, un bloc optique pouvant translater perpendiculairement à l'axe optique avec une précision micrométrique permet d'ajuster finement l'angle d'incidence α_i du faisceau laser au niveau du plan de l'échantillon (figure 1). À l'intérieur de ce bloc, un filtre passe-bande permet d'éliminer des signaux lumineux à une énergie différente de la raie laser et une lame demi-onde permet de changer l'état de polarisation (p ou s en particulier) de la lumière incidente.

En réflexion totale interne, une onde évanescente est générée à l'interface entre le substrat et les nanostructures étudiées. L'intensité du champ électrique associé à cette onde décroît exponentiellement avec la distance au substrat. Une zone limitée de la pointe TERS, d'extension spatiale susceptible d'être inférieure à 100 nm pour des angles d'incidence α_i au-delà de l'angle critique α_c caractéristique du régime de réflexion totale interne, est donc irradiée [7]. En polarisation p (figure A), une exaltation notable du champ électromagnétique en sommet de pointe est produite car une forte composante E_z du champ électrique orthogonale au plan du substrat, donc parallèle à la pointe TERS, est générée. Une telle orientation du champ électrique favorise l'accumulation d'électrons, donc le confinement d'un champ électromagnétique intense, en sommet de pointe TERS. La polarisation s conduit en revanche à un champ électrique E_y orienté parallèlement au plan du substrat, incapable d'induire une exaltation électromagnétique suffisante pour de l'imagerie chimique nanométrique [7]. Par ailleurs, la surface d'échantillon excitée est beaucoup plus large que sous excitation directe en lumière polarisée linéairement ou radialement (jusqu'à 80 μm), ce qui facilite l'alignement pointe-laser crucial pour le succès d'expériences par TERS. Dans un montage en éclairage direct par dessous, cet alignement est réalisé en déplaçant finement le spot laser autour de la pointe à l'aide de miroirs galvanométriques ou de systèmes piézoélectriques. Dans une configuration en réflexion totale interne, du fait du large champ évanescent dans lequel baigne la pointe, son positionnement est beaucoup moins critique, et par conséquent beaucoup plus rapide. Enfin, la lumière diffusée par la matière irradiée est collectée de manière similaire à celle utilisée en microscopie Raman confocale traditionnelle.



Représentation des montages TERS (A) et MDCS (B) en réflexion totale interne.

Ce système TERS en réflexion totale interne peut être aisément converti en dispositif de microscopie de diffusion en champ sombre (MDCS). Traditionnellement, la MDCS consiste à éclairer l'échantillon en lumière blanche sous un fort angle d'incidence et à collecter les photons diffusés avec une optique à faible ouverture numérique. Une alternative ingénieuse peut tirer profit d'un système TERS en réflexion totale interne moyennant quelques adaptations techniques, à savoir l'utilisation d'une source blanche intense au lieu du laser, l'élimination de filtres, l'ajout d'un polariseur à l'injection et en analyse, l'ajout d'un masque pour couper le faisceau incident réfléchi et la modification du système couplage source-fibre optique d'injection (figure B) [7-9]. Une lumière polarisée p permet alors de déterminer le spectre de diffusion en champ sombre de pointes TERS, et d'en déduire le maximum de la bande de résonance plasmon indiquant la longueur d'onde idéale pour des expériences en TERS (figures 2A, B et C). La géométrie de MDCS standard est incapable de fournir ce type d'information.

(encadré 2). Excepté la (ou les) résonance(s) plasmon, les larges spectres observés en figure 2C doivent aussi inclure une contribution liée à la résonance d'antenne de la pointe TERS [3]. Les deux résonances (plasmon et d'antenne) doivent être excitées simultanément pour assurer une exaltation optimale. Ainsi, malgré la largeur du signal collecté, les longueurs d'onde à 532, 561 et 633 nm par exemple ne conduiront par nécessairement aux mêmes exaltations électromagnétiques. L'intensité du signal en MDCS, sa dépendance en polarisation et sa largeur spectrale permettent donc de confirmer ou

d'infirmier l'activité TERS de la pointe et indiquent la gamme spectrale d'intérêt pour les mesures.

Quelles informations extraire de la caractérisation de biomolécules ?

La technique de TERS en réflexion totale interne peut être utilisée pour sonder des biomolécules photosensibles. C'est notamment le cas des molécules de cytochrome c intervenant dans la respiration cellulaire [7]. Cette hémoprotéine est

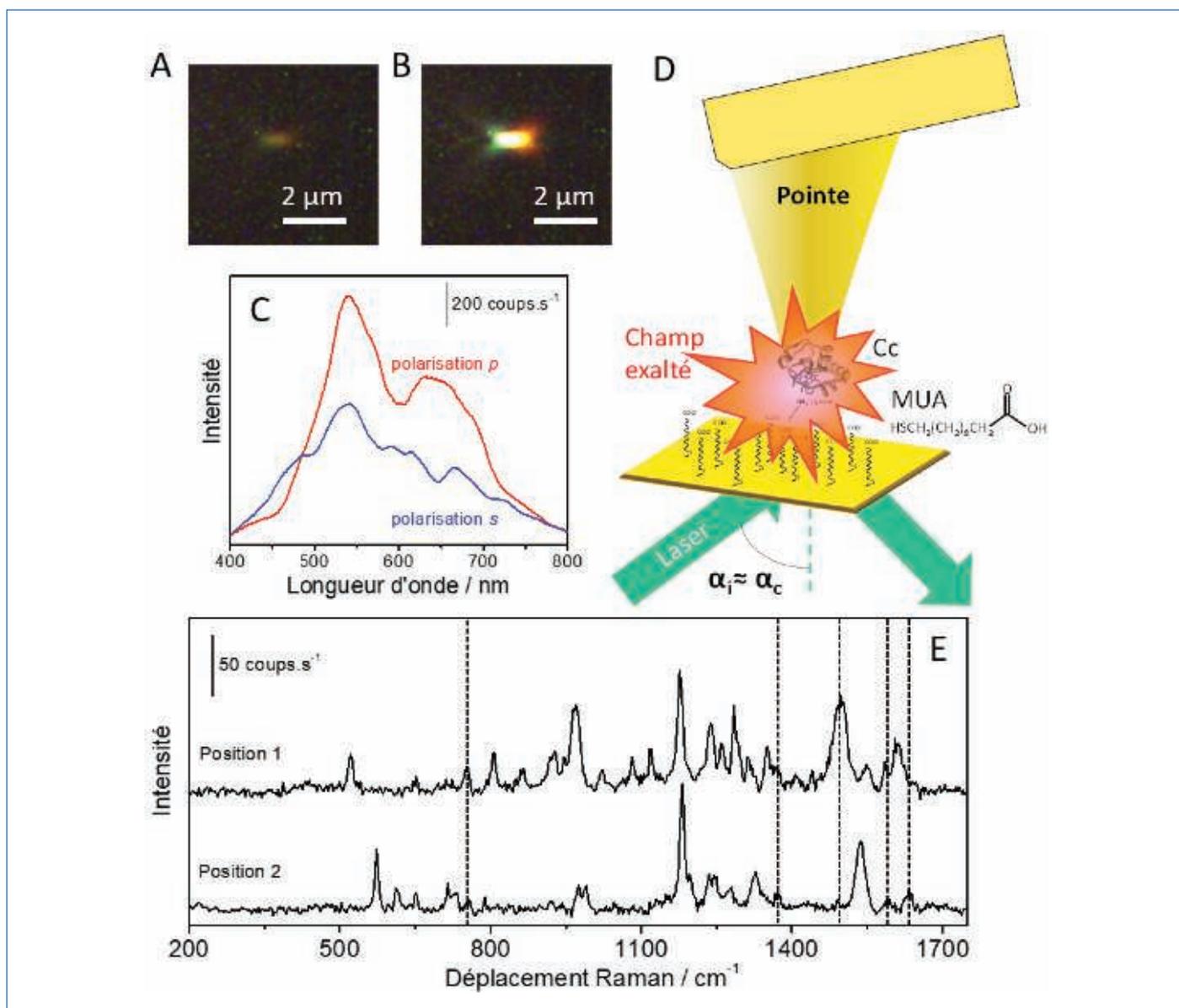


Figure 2 - (A) Image MDCT d'une pointe TERS métallisée avec 60 nm d'argent placée à 200 nm au-dessus de la surface d'un substrat. (B) Image MDCT d'une pointe TERS métallisée avec 60 nm d'argent placée à la surface d'un substrat. (C) Spectres MDCT correspondant pour une polarisation *p* et *s* de la lumière blanche incidente. (D) Schéma de la configuration de TERS en réflexion totale interne dans le cadre de l'étude du cytochrome *c* (Cc) sur couche d'acide 11-mercaptoundécanoïque (MUA). (E) Spectres TERS en réflexion totale interne d'une monocouche de Cc sur substrat fonctionnalisé au MUA lorsque la pointe TERS est engagée à la surface de l'échantillon. La densité de puissance laser à l'échantillon est $P_{\text{laser}} \approx 0,6 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$. Les lignes en pointillés indiquent les bandes Raman correspondant à l'état ferrique 6cBS du Cc.

constituée d'un hème, c'est-à-dire d'un ion ferrique ou ferreux entouré d'un ligand de type porphyrine en position équatoriale, et d'un polypeptide d'une centaine d'acides aminés reliés à l'ion métallique en position axiale. L'état d'oxydation, de coordination et de spin de cet ion est extrêmement sensible aux conditions environnementales et détermine son activité biologique. En particulier, l'état bas spin pour lequel l'ion est relié au cycle porphyrine par six liaisons (noté 6cBS) est l'état natif attendu à pH neutre et impliqué dans les mécanismes d'apoptose cellulaire (mort cellulaire programmée) intervenant notamment dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. La *figure 2D* schématise l'expérience TERS réalisée en réflexion totale interne sous éclairage laser à 561 nm avec un angle d'incidence proche de l'angle critique ($\alpha_i \approx \alpha_c \approx 42^\circ$) [7]. À cette longueur d'onde, la résonance plasmon de surface localisée de la pointe TERS et une résonance moléculaire de la molécule de cytochrome *c* (dite bande Q) sont excitées. La solution aqueuse de cytochrome *c* a été déposée sur une couche hydrophile

d'acide 11-mercaptoundécanoïque (MUA) pour faciliter sa dispersion et assurer une orientation préférentielle des molécules de cytochrome *c* par interaction des groupements NH_3^+ des résidus de lysine avec les groupements COO^- terminaux des molécules de MUA. En fonction des positions sur l'échantillon et des pointes TERS utilisées, les spectres collectés peuvent différer (*figure 2E*). Cependant, la plupart des marqueurs de l'état ferrique 6cBS sont identifiables sur les spectres, à savoir les modes de vibration de l'hème autour de 751, 1375, 1497, 1588 et 1632 cm^{-1} (lignes en pointillés sur la *figure 2E*). Des bandes attribuables à des acides aminés aromatiques sont aussi discernables en dessous de 700 cm^{-1} (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et vers 860 cm^{-1} (tyrosine). La présence de la monocouche de MUA est repérable grâce à quelques bandes associées notamment au groupements terminaux COOH/COO^- , telle celle correspondant aux elongations antisymétriques COO^- vers 1607 cm^{-1} [7]. Les mesures TERS en réflexion totale interne permettent donc d'identifier les différents constituants de l'échantillon,

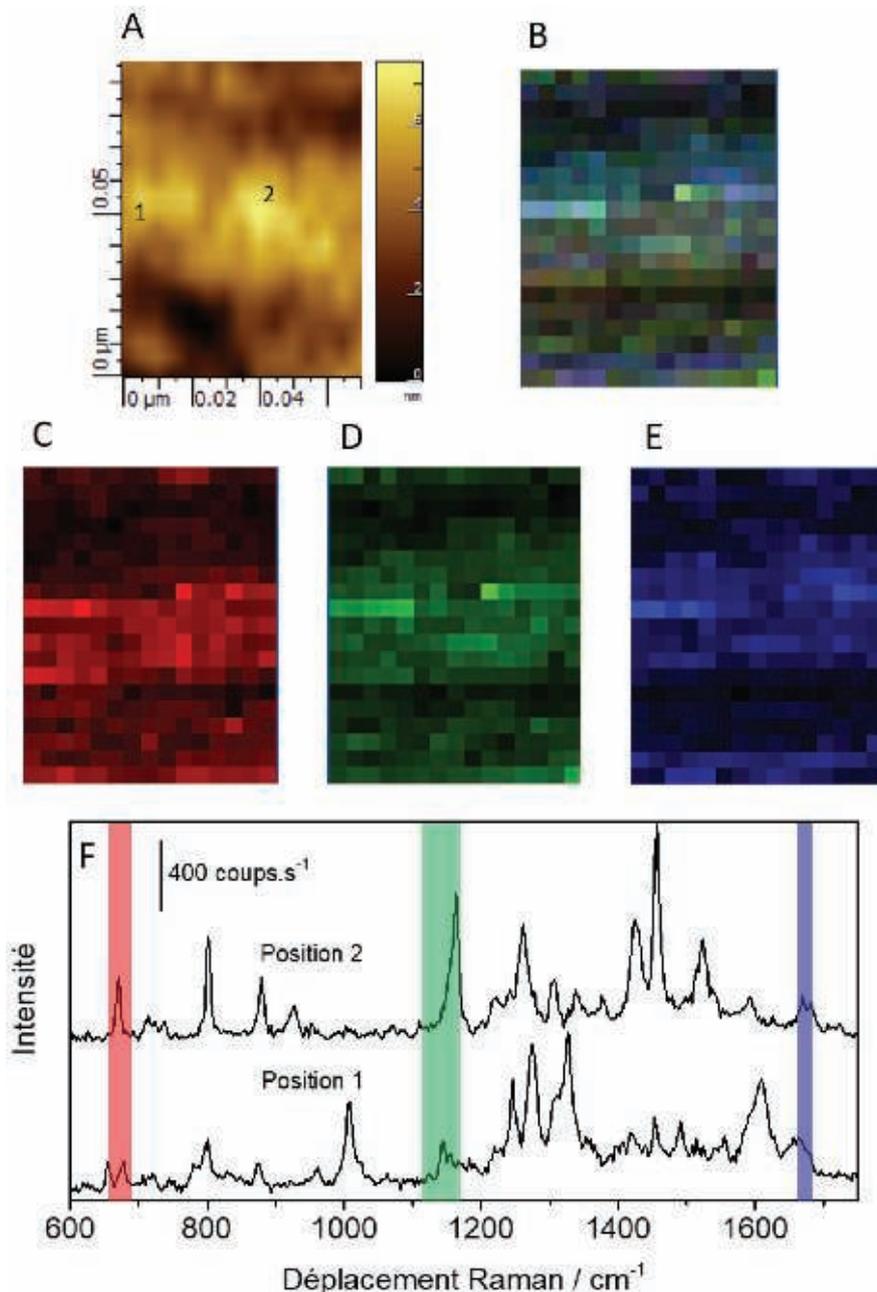


Figure 3 - (A) Image AFM d'une portion de fibrille Tau produite avec un cofacteur d'héparine de sodium. (B) Carte TERS obtenue par superposition des cartes TERS C, D et E. (C-E) Cartes TERS déduites de l'intégration des régions spectrales attribuées aux vibrations d'élongation C-S de la cystéine ($655\text{-}689\text{ cm}^{-1}$, rouge), aux vibrations de déformation NH_3^+ et $=\text{NH}_2^+$ de l'asparagine, la glutamine, la lysine et l'arginine ($1\ 115\text{-}1\ 171\text{ cm}^{-1}$, vert) et aux bandes amide I associées à des feuillets β antiparallèles ou de cœur de fibrille ($1\ 660\text{-}1\ 682\text{ cm}^{-1}$, bleu). Les conditions expérimentales sont les suivantes : dimensions des cartes TERS $75 \times 100\text{ nm}$, pas de balayage de 5 nm , temps d'acquisition de 1 s par spectre, densité de puissance laser de $2\ \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$. (F) Spectres TERS aux positions 1 et 2 indiquées en figure 3A. Les bandes colorées signalent les zones spectrales dont l'intensité est intégrée pour obtenir les cartes TERS B, C (rouge), D (vert) et E (bleu).

à savoir l'hème, le polypeptide et la couche moléculaire de MUA, en minimisant les risques de dégradation du cytochrome c excité de manière résonante. L'utilisation du montage en réflexion totale interne est aussi particulièrement efficace pour caractériser des biomolécules ou des biomatériaux qui ne peuvent pas être excités de manière résonante. C'est le cas des fibrilles amyloïdes formant des plaques délétères dans le cadre des maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. Du fait de leur composition, ces structures sont hétérogènes à l'échelle nanométrique, ce qui rend leur étude particulièrement pertinente par TERS. La figure 3A présente une portion de fibrille produite par agrégation de protéines Tau (« tubulin-associated unit »), constituées exclu-

sivement d'acides aminés, en présence d'héparine de sodium comme cofacteur d'agrégation [8]. Sur cette zone de fibrille, des spectres TERS espacés de 5 nm ont été mesurés. Ils contiennent notamment des bandes caractéristiques d'acides aminés non aromatiques, comme celles attribuées aux vibrations d'élongation C-S de la cystéine entre $655\text{ et }689\text{ cm}^{-1}$ (figure 3C), aux vibrations de déformation NH_3^+ et $=\text{NH}_2^+$ de l'asparagine, la glutamine, la lysine et l'arginine entre $1\ 115\text{ et }1\ 171\text{ cm}^{-1}$ (figure 3D) et aux bandes amide I associées à une structure secondaire protéique en feuillets β antiparallèles ou au cœur de la fibrille entre $1\ 660\text{ et }1\ 682\text{ cm}^{-1}$ (figure 3E). L'intégration de ces bandes fournit la distribution spatiale des acides aminés et des structures secondaires correspondants

avec une résolution spatiale latérale de 5-10 nm [8]. Les trois marqueurs étudiés apparaissent au centre de l'image dans une zone large de 40 nm, comme le révèle la *figure 3B* sommant les cartes TERS des *figures 3C, 3D et 3E*. Au-dessus et en dessous de cette région, deux zones plus sombres de 10 nm de large indiquent une quantité moindre en cystéine, asparagine, glutamine, lysine, arginine et feuillettes β antiparallèles ou de cœur de fibrille. Ceci suggère une corrélation entre ces différents constituants. Notons que ces acides aminés ne sont pas colocalisés avec les régions riches en structure secondaire de type « pelote statistique » (non montrées en *figure 3*) [8]. Il est donc possible de corréler composition et structure de fibrilles amyloïdes à l'échelle nanométrique. De plus amples travaux sont en cours pour décrire des fibrilles de différentes compositions en fonction des maladies neurodégénératives considérées et mieux comprendre les processus moléculaires en jeu lorsqu'elles interagissent avec des membranes biologiques [3].

Même si la configuration en réflexion totale interne a été uniquement utilisée pour caractériser des composés protéiques jusqu'à présent, elle est tout à fait adaptée à l'étude de tout système (biologique ou non) suffisamment transparent optiquement pour permettre une excitation laser efficace de la pointe TERS. Cela comprend les membranes biologiques, les monocouches (voire des multicouches) moléculaires et la grande majorité des nano-objets individuels.

Vers des études en environnement contrôlé

En biologie, la microscopie Raman confocale est reconnue comme une technique performante pour la description moléculaire fine d'espèces et de réactions *in vitro*, voire *in vivo* [11]. En TERS, la plupart des travaux sont réalisés à sec et à l'air, dans les conditions ambiantes de température et de pression, mais des efforts importants ont été et sont encore déployés pour mettre au point des dispositifs permettant des mesures en milieu liquide, une étape cruciale pour des applications plus proches des conditions physiologiques en biologie. La première caractérisation par TERS de fibrilles amyloïdes en milieu liquide a seulement été réussie très récemment [12]. Toutefois, aucun système TERS ne se démarque réellement à l'heure actuelle pour les applications en milieu liquide. De même, la réalisation de mesures TERS sous atmosphère contrôlée ouvrirait de nombreuses perspectives en catalyse hétérogène et en sciences de l'environnement, et pourrait aider de surcroît à limiter les contaminations éventuelles en cours d'expérience. Le développement de nouvelles cellules adaptées aux environnements liquides et gazeux contrôlés constitue le prochain défi à relever pour rendre la technique de TERS plus polyvalente.

Les auteurs remercient l'Université de Bordeaux, le CNRS, ainsi que celles et ceux qui ont participé à rendre ces travaux possibles.

[1] P. Larkin, *Infrared and Raman Spectroscopy*, Elsevier, 2017 ; P. Bourson, G. Simon, D. Chapron, N. Kokanyan, P. Colomban, *Spectroscopie et spectrométrie Raman, Spectroscopie vibrationnelles - Théorie, aspects pratiques et applications*, G. Simon (eds/coord.), Editions des archives contemporaines, 2020, p. 109-154.

- [2] S. Bonhommeau, S. Lecomte, Tip-enhanced Raman spectroscopy: a tool for nanoscale chemical and structural characterization of biomolecules, *ChemPhysChem*, 2018, 19, p. 8-18.
- [3] S. Bonhommeau, G.S. Cooney, Y. Huang, Nanoscale chemical characterization of biomolecules using tip-enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Soc. Rev.*, 2022, 51, p. 2416-30.
- [4] S. Schlücker, Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, p. 4756-95.
- [5] S. Trautmann *et al.*, A classical description of subnanometer resolution by atomic features in metallic structures, *Nanoscale*, 2017, 9, p. 391-401.
- [6] Z. Zhang, S. Sheng, R. Wang, M. Sun, Tip-enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2016, 88, p. 9328-46.
- [7] D. Talaga *et al.*, Total internal reflection tip-enhanced Raman spectroscopy of cytochrome c, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2020, 11, p. 3835-40.
- [8] D. Talaga *et al.*, Total internal reflection tip-enhanced Raman spectroscopy of Tau fibrils, *J. Phys. Chem. B*, 2022, 126(27), p. 5024-32.
- [9] M. Plissonneau *et al.*, Efficient passivation of Ag nanowires with 11-mercaptoundecanoic acid probed using in situ total-internal-reflection surface-enhanced Raman scattering spectroscopy, *ChemNanoMat*, 2019, 5, p. 1044-49.
- [10] D. Talaga, M. Comesaña-Hermo, S. Ravaine, R.A.L. Vallée, S. Bonhommeau, Colocalized dark-field scattering, atomic force and surface-enhanced Raman scattering microscopic imaging of single gold nanoparticles, *J. Opt.*, 2015, 17, 114006.
- [11] G. Pezzotti, Raman spectroscopy in cell biology and microbiology, *J. Raman Spectrosc.*, 2021, 52, p. 2348-2443.
- [12] E. Lipiec *et al.*, Nanoscale hyperspectral imaging of amyloid secondary structures in liquid, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2021, 60, p. 4545-50.
- [13] D.W. Pohl, U.C. Fischer, U.T. Dürig, Scanning near-field optical microscopy (SNOM), *J. Microsc. Oxf.*, 1988, 152, p. 853-861.
- [14] R.C. Dunn, Near-field scanning optical microscopy, *Chem. Rev.*, 1999, 99, p. 2891-927.
- [15] R.X. Bian, R.C. Dunn, X.S. Xie, P.T. Leung, Single molecule emission characteristics in near-field microscopy, *Phys. Rev. Lett.*, 1995, 75, p. 4772-75.
- [16] S.R. Emory, S.M. Nie, Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy on single nanoparticles, *Anal. Chem.*, 1997, 69, p. 2631-35.
- [17] R.M. Stöckel, Y.D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi, Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, 2000, 318, p. 131-136.
- [18] M.S. Anderson, Locally enhanced Raman spectroscopy with an atomic force microscope, *Appl. Phys. Lett.*, 2000, 76, p. 3130-32.
- [19] N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, S. Kawata, Metallized tip amplification of near-field Raman scattering, *Opt. Commun.*, 2000, 183, p. 333-336.
- [20] N. Anderson, A. Hartschuh, S. Cronin, L. Novotny, Nanoscale vibrational analysis of single-walled carbon nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, p. 2533-37.

David TALAGA, ingénieur de recherche CNRS, et **Sébastien BONHOMMEAU***, maître de conférences, Université de Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires, CNRS UMR 5255, Bordeaux.

David TALAGA et Sébastien BONHOMMEAU ont reçu le prix d'Instrumentation 2020 de la division Chimie physique (DCP).

* sebastien.bonhommeau@u-bordeaux.fr



D. Talaga



S. Bonhommeau