Infrarouge et Raman : de la spectroscopie à l'imagerie

Maggy Colas[1], Patrick Simon[2],
Michel Mermoux[3] et Ganesh D. Sockalingum[4]

[1] IRCER-UMR CNRS 7315, Université de Limoges, F-87068 Limoges, France
[2] CEMHTI-CNRS UPR3079, Université d'Orléans, F-45071 Orléans, France
[3] Univ. Grenoble Alpes, Univ. Savoie Mont Blanc, CNRS, Grenoble INP, LEPMI, F-38000, Grenoble, France
[4] Université de Reims Champagne-Ardenne, BioSpecT EA7506, F-51097 Reims, France

1 Introduction

Les spectroscopies infrarouge et Raman décrites en détails dans les chapitres précédents permettent donc de caractériser finement les objets sondés. Si ces objets sont hétérogènes, cette caractérisation sera différente en fonction de l'endroit sondé. Plusieurs mesures ponctuelles permettront d'affiner la réponse, mais souvent, cette description restera incomplète. L'hétérogénéité peut être de différentes origines : échantillons constitués de différentes phases, différentes compositions moléculaires, gradients de concentration, variations locales de propriétés (contraintes mécaniques, indices optiques, température, etc.). Les spectroscopistes ont alors développé des techniques d'imagerie, qui trouveront naturellement leur intérêt dès lors que les hétérogénéités de compositions ou de propriétés ont des dimensions comparables aux résolutions spatiales de ces méthodes. À titre de premier exemple, la Fig. 1 montre une image Raman d'une vitrocéramique (cristaux d'oxyde de tellure, inclus dans une matrice de verres d'oxydes de tellure et tungstène). Cette image contient 23 409 points (200*200 µm, écart entre 2 points adjacents=1,3 µm). Chaque point correspond à un spectre acquis. Il s'agit ici d'une carte à deux dimensions (2 dimensions spatiales et une dimension spectrale). Le tracé d'un tel jeu de données se fait le plus souvent en visualisant un paramètre extrait de la cartographie, comme ici l'intensité intégrée de la raie principale de la phase cristalline (γ TeO_2), qui est tracée en échelle de gris. Une multitude de paramètres peut ainsi être imagée à partir d'une seule acquisition d'image spectrale : intensité de chaque bande (maximale ou intégrée), largeur, forme gaussienne ou

lorentzienne, rapport d'intensité entre deux raies, et bien d'autres encore, qui seront détaillés par la suite.

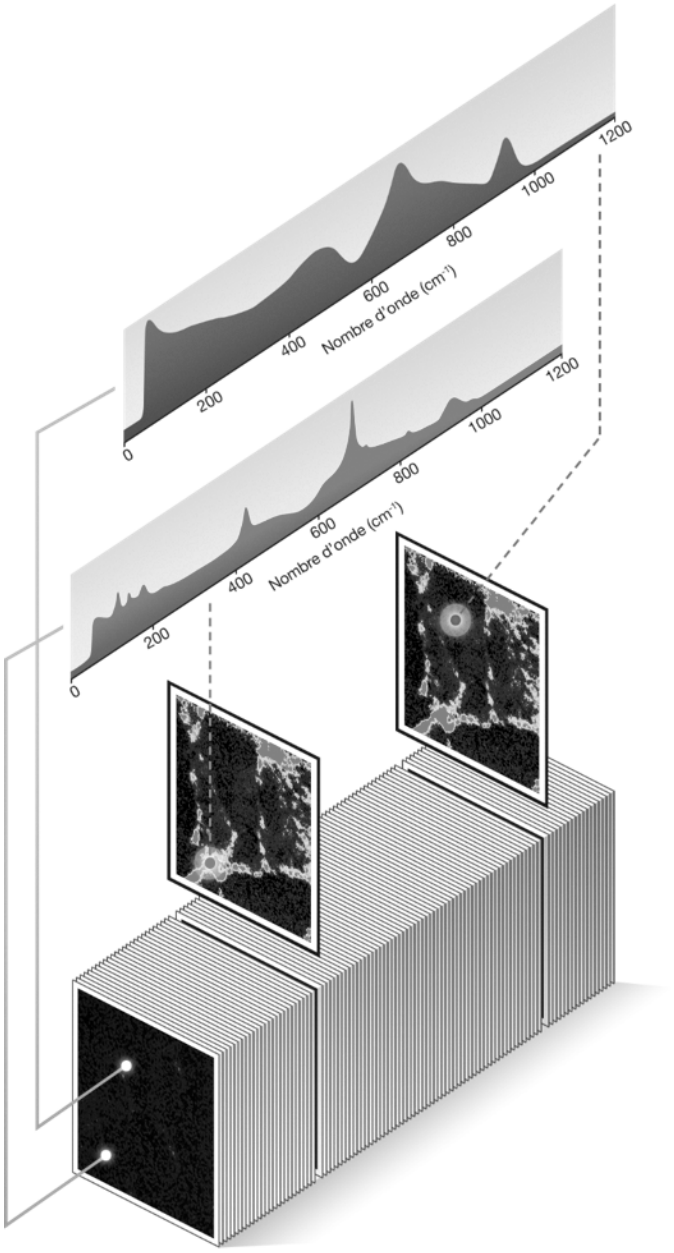


Figure 1 – Schéma de principe illustrant la spécificité des **« spectromètres imageurs »** qui est de permettre en tous points de l'objet l'acquisition d'un spectre continu dans une gamme donnée de nombres d'ondes

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

Il apparaît d'ores et déjà qu'un traitement numérique approprié sera indispensable pour extraire ces cartes de paramètres, faute de quoi l'image tracée sera limitée à des paramètres simplistes (tels que l'intensité mesurée à un nombre d'ondes donné) et n'exploitera que bien peu la puissance de l'imagerie spectroscopique. Autre caractéristique de cette image exemple de la Fig. 1, il s'agit d'une image à deux dimensions spatiales. Il est possible de manière analogue de réaliser des images à une dimension spatiale (cartographie 'ligne') ou à trois dimensions spatiales (cartographies de volume). Une série de spectres prise sur un même point de l'échantillon, mais en fonction d'un paramètre extérieur (temps, température, contrainte mécanique, optique ou électrique, etc.) formera aussi l'équivalent d'une image 1D. Dans tous ces cas, le jeu de données obtenu sera un hypercube à n dimensions : 1 dimension spectrale, n-1 dimensions spatiales ou liées à un paramètre extérieur. Les méthodes de traitement de données seront quasiment similaires. Enfin, il convient de souligner que dans certains cas, l'intérêt sera uniquement l'obtention d'images de l'échantillon, sans que le spectre lui-même soit recherché. La spectroscopie proprement dite n'est plus ici qu'un simple outil pour l'obtention des images désirées. L'exemple de tels cas pourrait être, dans un autre domaine d'imagerie spectroscopique, le cas du médecin réalisant des images par résonance magnétique (IRM) : seule l'image l'intéresse, révélatrice de pathologies – la physique du spectre RMN n'est qu'un outil d'acquisition d'images.

Nous décrivons dans ce chapitre ces techniques d'imagerie, qui existent aujourd'hui commercialement pour le Raman comme pour l'infrarouge, avec toutefois un développement plus récent et moins généralisé pour ces dernières.

2 Court historique. Principaux concepts

À l'heure actuelle, la majeure partie des spectromètres Raman présents sur le marché intègrent dès leur conception un microscope. L'utilisation de lasers dans la gamme du visible (ainsi que proche IR et UV) permet de sonder facilement des échelles spatiales de l'ordre du micromètre. Ce microscope est optiquement couplé au spectromètre, de manière à collecter le maximum de lumière. Nous ne décrirons pas ici les différentes solutions retenues pour ce couplage, les constructeurs ont chacun leurs propres designs, leurs propres caractéristiques. Dès lors, les applications en termes d'imagerie deviennent évidentes. Les lois de la diffraction limitent plus fortement l'accès à des objets de taille micrométrique en infrarouge, néanmoins les constructeurs proposent également des solutions à base de microscopes, mais avec des caractéristiques spécifiques liées aux longueurs d'onde utilisées. Nous allons par la suite développer tout d'abord l'aspect Raman. Un certain nombre des sujets développés s'appliquera également à l'infrarouge. Les spécificités de l'imagerie IR seront abordées ensuite.

Les origines de la microanalyse Raman, ainsi que les différents concepts d'imagerie présentés ci-dessous, ont été proposés très tôt, dans les années 70. Le premier microscope Raman, ou première microsonde Raman connue sous le nom de microsonde MOLE, a été mis au point au Laboratoire de spectrochimie infrarouge et Raman (LASIR, Lille) suite en particulier aux travaux de M. Delhaye et P. Dhamelincourt [1,2]. Les auteurs ont alors montré que l'efficacité de l'analyse sous microscope par rapport au montage conventionnel de macroanalyse est liée d'une part à l'éclairement

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

local beaucoup plus intense de l'échantillon, et d'autre part au très grand angle solide de l'optique de collection. La méthode était toutefois pénalisée par les fortes durées d'acquisition des spectres individuels.

Depuis, l'apparition des caméras CCD (*Charge Coupled Devices*), des filtres de réjection de type Notch ou diélectriques, et de microordinateurs puissants, a permis la conception d'instruments autorisant l'acquisition de spectres individuels en quelques secondes, voire quelques millisecondes avec des caméras intensifiées et/ou des lectures optimisées du registre CCD. Cela autorise l'acquisition d'un très grand nombre de spectres avec des durées d'acquisition raisonnables, c'est-à-dire que l'on pourra construire des images ou des cartes en deux ou trois dimensions, caractéristiques des inhomogénéités présentes dans l'échantillon avec un pouvoir séparateur de l'ordre du micromètre. Grâce à ces progrès technologiques, l'imagerie Raman de par l'information moléculaire apportée est maintenant un véritable outil analytique, au même titre que d'autres méthodes de microanalyse. Il existe même sur le marché des dispositifs couplant l'imagerie Raman à d'autres types de microscopie à l'échelle micrométrique : microscopie électronique à balayage, microscopies à force atomique notamment.

La discussion sera ici limitée à la microscopie Raman conventionnelle. Nous renvoyons le lecteur vers d'autres chapitres de cet ouvrage pour les techniques en champ proche, en cours de développement.

3 Imagerie multispectrale – Imagerie hyperspectrale

De manière générale, *on parlera d'imagerie hyperspectrale* dans le cas où, à chaque point de l'image, l'on enregistre un spectre constitué de nombreux nombres d'ondes consécutifs (ou variables) [Fig. 1]. Cette notion est un élargissement de l'imagerie multispectrale, où seuls sont recueillis quelques nombres d'ondes, ou quelques bandes non contiguës de nombres d'ondes. Ce cas d'imagerie multispectrale, voire monospectrale, concerne plutôt les systèmes d'acquisition sans spectromètre à proprement parler mais où la sélection en nombre d'ondes est faite par des filtres passe-bande. Dans ce cas, l'image en deux dimensions de l'objet étudiée peut être focalisée sur le détecteur CCD, on parlera d'imagerie globale. Dans le cas hyperspectral le pixel image (point de mesure sur l'échantillon) sera défini par les choix de l'expérimentateur, c'est-à-dire le maillage sur l'échantillon. La notion d'imagerie multispectrale voire monospectrale sera plutôt réservée au cas où la taille du pixel sera définie par le grandissement de l'optique utilisée. Dans les deux cas, un pixel peut ne pas être composé d'un seul matériau et la réponse spectrale enregistrée par le capteur est alors le résultat d'un mélange des différents constituants.

Ce chapitre sera focalisé sur l'imagerie hyperspectrale. La spécificité des « *spectromètres imageurs* » est donc de permettre en tous points de l'objet l'acquisition d'un spectre continu dans une gamme donnée de nombres d'ondes, correspondant ici aux domaines du proche UV, du visible, du proche-infrarouge et de l'infrarouge moyen, (200 nm à 25 μm), avec un pas d'échantillonnage généralement voisin du cm^{-1}. Une image « hyperspectrale » sera donc un « cube de données », à une dimension spectrale et deux dimensions spatiales, dans le cas le plus fréquent. La notion de spectre continu est dans la plupart des cas essentielle puisqu'elle permet d'exploiter au mieux la ou les

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

informations présentes dans chaque spectre individuel. Ce seront le rapport signal sur bruit de chaque mesure individuelle et les résolutions spatiale et spectrale du spectromètre qui détermineront la qualité de la mesure. L'imagerie « hyperspectrale » permet généralement en premier lieu de reconnaître dans chaque spectre individuel la « signature » des composants qui forment l'objet, c'est-à-dire de les identifier. On pourra de plus non seulement identifier les différents constituants (minéraux, organiques, entités chimiques...), mais également dans certains cas en déterminer les concentrations, en ajoutant ainsi une dimension quantitative à la cartographie (mais avec la nécessité d'utiliser des étalons avec un dosage externe). Il est enfin également possible de mesurer certaines des propriétés physico-chimiques par l'analyse de leurs caractéristiques spectrales fines (faibles décalages en nombre d'ondes, variation de largeur à mi-hauteur, profils de bandes spécifiques...).

Comparativement à l'imagerie hyperspectrale où une mesure spectrale est prise en bougeant l'échantillon point par point ou ligne par ligne comme nous le verrons plus loin, *l'imagerie « globale »* consiste à former l'image de l'échantillon sur un détecteur bidimensionnel en mesurant l'intensité lumineuse émise ou absorbée par l'objet dans toute la gamme spectrale (image d'absorption totale), une fréquence ou une bande de fréquences donnée (image chimique). Dans la plupart des cas, ceci est réalisé au moyen d'un filtre adapté aux propriétés de l'objet et du type de mesure. Ce type d'imagerie est aujourd'hui beaucoup plus rare et concerne essentiellement des caractérisations industrielles spécifiques et répétitives.

Le point crucial en imagerie est l'analyse des données mais le prétraitement de l'image spectrale est également très important car souvent le spectre peut contenir non seulement l'information chimique mais aussi d'autres informations qui proviennent de l'interaction lumière-matière. Ainsi, certaines caractéristiques de l'échantillon (épaisseur, forme, diffusion et réflexion de la lumière...) peuvent avoir une influence sur le profil spectral de chaque point. Il est donc nécessaire d'analyser les mesures acquises au travers de différentes méthodes afin d'accéder aux informations pertinentes et ensuite aux paramètres chimiques ou physiques de l'objet. *L'image sera alors reconstruite sur le ou les paramètres pertinents choisis par l'expérimentateur.* Ces traitements de reconstruction jouent donc un rôle essentiel pour la visualisation et l'interprétation des données. En fonction des informations recherchées, et de la connaissance des constituants de l'objet analysé, différents algorithmes seront utilisés. Certains algorithmes développés récemment permettent de trouver automatiquement les nombres d'ondes discriminants ainsi que le nombre de « clusters » (ou classes) nécessaires pour la reconstruction de l'image spectrale.

4 Aspects expérimentaux

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les techniques d'imagerie Raman peuvent être classées en deux catégories : les techniques de reconstruction d'image qui impliquent une exploration de l'échantillon par le faisceau laser, point par point ou ligne par ligne, et d'autre part l'imagerie directe globale, correspondant à un éclairement global de l'échantillon et à l'enregistrement d'une image « monochromatique » de l'échantillon.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

L'imagerie « point par point » permet de reconstruire une image de l'échantillon point par point en déplaçant la platine porte-échantillon par incréments réguliers. C'est la méthode la plus intuitive : optiquement, il n'y a ici aucune différence avec l'acquisition d'un spectre simple. Le laser est focalisé en un point, et la partie utile de la caméra CCD est réduite à quelques lignes, centrées sur le signal, de manière à réduire le bruit de la mesure. C'est une technique qui ne présente que peu d'artefacts dans la mesure où c'est toujours la même zone de la caméra qui est concernée. L'exploration point par point de l'échantillon présente également l'avantage de pouvoir être parfaitement confocale, nous y reviendrons. Par contre, elle peut être très couteuse en temps : si l'on veut imager une zone de 100*100 points, soit 10 000 spectres, avec un temps d'acquisition de 1 seconde par spectre, il faut 2h50. Si cette zone est de 1000*1000 points, il faudra presque 12 jours...

Les figures 2, 3 et 4 illustrent l'impact du choix de l'objectif et de la confocalité sur la reconstruction de l'image. Ici l'échantillon est une vitrocéramique de matrice vitreuse TeO_2-WO_3, dont le spectre Raman vous est présenté Fig. 5, au sein duquel il existe des cristallites de la phase γ-TeO_2 (figure 6). L'ensemble des images est reconstruit sur la variation de l'intensité intégrée de la bande centrée entre 391 et 452 cm^{-1} caractéristique de la phase γ-TeO_2 [12].

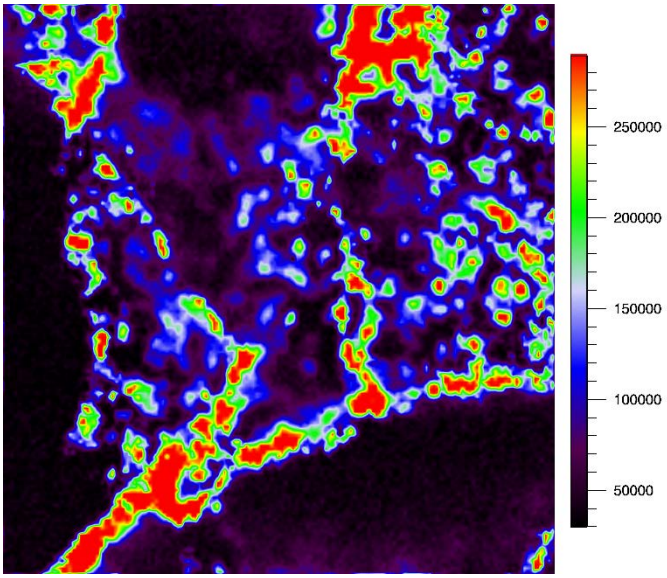


Figure 2 – Image enregistrée en mode ponctuel, pas de 1.3 µm, et objectif x50

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

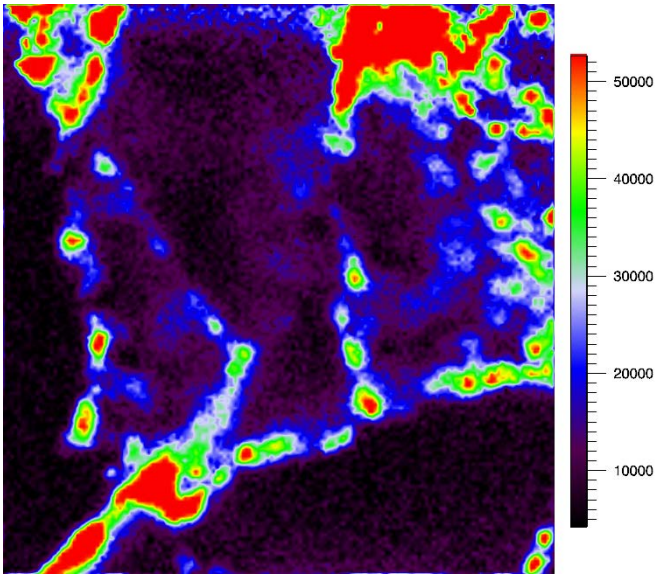


Figure 3 – Image enregistrée en mode ponctuel, pas de 1.3 µm, et objectif x100

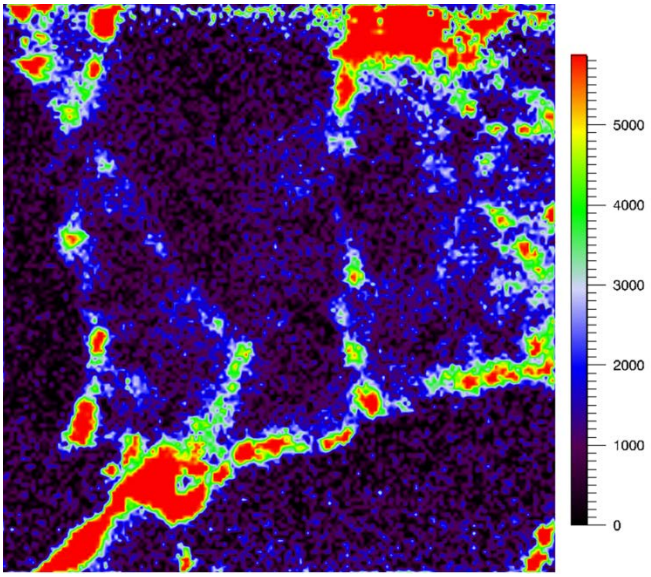


Figure 4 – Image enregistrée en mode ponctuel en haute confocalité, pas de 1.3 µm, et objectif x100

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

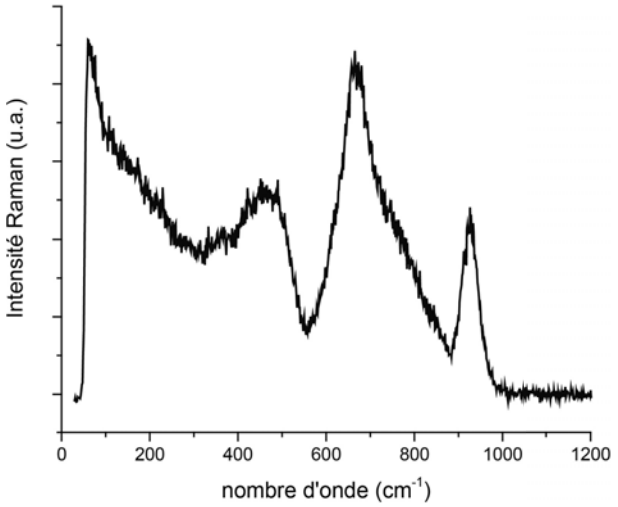


Figure 5 – Spectre Raman caractéristique du verre TeO_2-WO_3, extrait de la cartographie

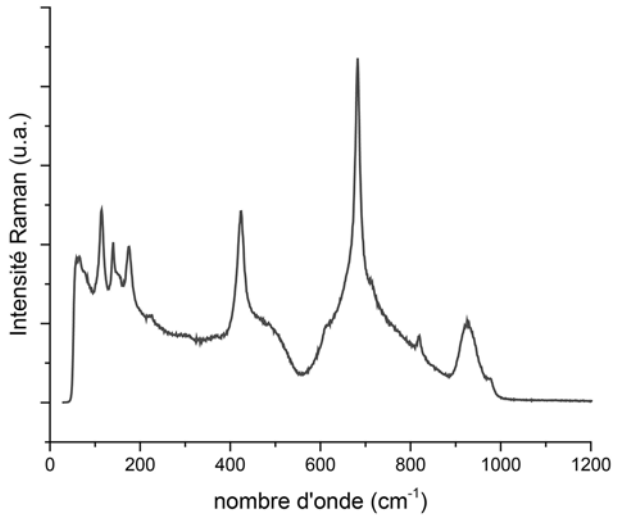


Figure 6 – Spectre Raman caractéristique de la phase cristallisée γ-TeO_2, extrait de la cartographie

L'imagerie « ligne » est une technique permettant d'optimiser le temps de mesure *via* une utilisation optimisée de la caméra CCD : le principe est de focaliser la lumière sur une ligne plutôt que sur un point. Pour cela, le faisceau laser est soit rapidement défléchi le long d'une ligne au moyen d'un miroir oscillant, soit focalisé au moyen d'une lentille cylindrique pour obtenir une ligne sur l'échantillon. Dans les deux cas, la lumière collectée est focalisée sur la fente d'entrée du spectromètre, puis est ensuite dispersée sur le CCD. Lors de chaque lecture du CCD, on utilise ainsi les deux dimensions de la caméra : la première, perpendiculaire à la fente d'entrée du spectromètre,

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

pour l'acquisition des spectres individuels, la seconde, parallèlement à la fente, pour le stockage des différents spectres obtenus le long de la ligne. L'image bidimensionnelle est généralement obtenue en déplaçant la platine porte-échantillon selon l'axe perpendiculaire à la ligne de lumière. D'autres techniques sont basées sur un système de double balayage optique sur l'échantillon. Par sa nature, l'imagerie ligne présente certaines aberrations, en particulier une sous- ou une surbrillance aux bords de la ligne, ce que l'on sait toutefois maintenant corriger partiellement ou complètement. Le principal apport de cette méthode est que l'irradiance (la densité de puissance sur l'échantillon) est bien plus faible, ce qui autorise l'analyse de matériaux fragiles thermiquement. Selon le matériau analysé, cette méthode peut enfin être bien plus rapide. On notera que la résolution spatiale de l'image, ou plus exactement l'échantillonnage au point de mesure, est en partie conditionné par le grandissement du spectromètre.

D'autres systèmes d'optimisation du temps de mesure existent. Certains exploitent un processus de lecture accéléré du CCD. La lecture est normalement faite à la fin de l'acquisition, en descendant 'ligne par ligne' les électrons piégés depuis la zone illuminée jusqu'au registre de lecture en bas de capteur CCD. Ces optimisations font une lecture en descendant pas à pas la zone d'intérêt, en même temps qu'un déplacement de la platine microscope, tout en continuant à illuminer la zone utile sur le pixel suivant. Ceci peut également se faire de manière couplée à un éclairage ligne. Il est enfin possible, dans les cas où l'on ne désire pas de résolution spatiale très élevée, de dégrader cette résolution, en jumelant des pixels sur le capteur CCD (« *binning* » ou utilisation de superpixels).

Les figures 7 et 8 sont enregistrées sur le même échantillon que les figures précédentes mais cette fois-ci le mode ligne est choisi avec deux pas de mesure différents. Les images sont reconstruites exactement de la même manière que précédemment.

Le choix de la longueur d'onde du laser d'excitation a déjà été détaillé dans le chapitre Raman, il faut juste signaler ici que l'on peut faire des images avec différentes excitations laser, sans déplacer l'échantillon, et qu'il peut être très judicieux de comparer deux images du même objet faites avec plusieurs raies laser ; les effets de luminescence ou de Raman résonnant apparaîtront immédiatement sur les images ; en fonction de la profondeur de pénétration du laser utilisé on pourra également sonder ainsi l'objet analysé sur des épaisseurs différentes.

Tous ces systèmes d'acquisition ont des avantages et des inconvénients. Il n'existe pas de système idéal qui réponde à tous les cas de mesure. Chaque cas doit être considéré, en fonction du type d'échantillon (résistance au flux laser, sensibilité Raman), des caractéristiques du spectromètre utilisé, du but visé (identification rapide du nombre de composants d'un échantillon inconnu, ou étude de faibles effets de contrainte, par exemple), et enfin du temps disponible pour la mesure. Il faut enfin souligner que les détails techniques des différents systèmes d'acquisition sont différents suivant les systèmes utilisés, que les paramétrages par défaut prévus par les constructeurs sont en général un bon compromis, mais que leur optimisation reste du ressort du seul utilisateur, aux commandes du spectromètre.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

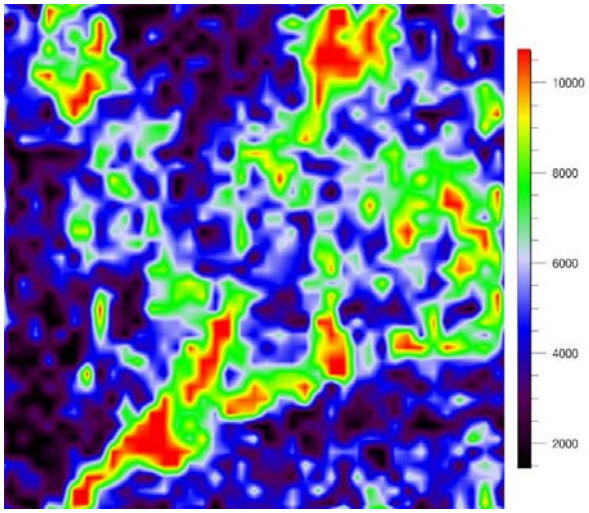


Figure 7 – Image enregistrée en mode ligne, pas de 5.2 µm, et objectif x50

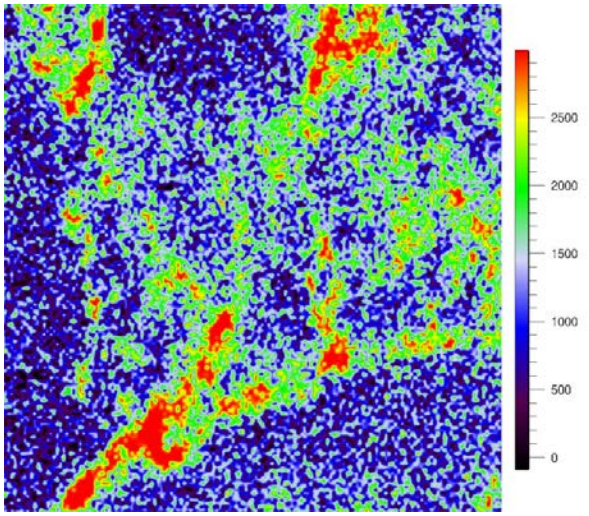


Figure 8 – Image enregistrée en mode ligne, pas de 1.3 µm, et objectif x50

En ce qui concerne la microspectroscopie infrarouge, le premier couplage d'un spectromètre IR avec un microscope date des années 1950. Les grandes étapes de développement sont dans les années 1980 avec l'arrivée de la transformée de Fourier qui rend les analyses beaucoup plus rapides et dans les années 1990 avec l'accès aux détecteurs type imageurs IR développés par l'armée américaine. Comme pour l'imagerie Raman expliquée ci-dessus, les approches sont aussi de deux sortes avec l'imagerie spectrale infrarouge : mode image point par point (cartographie) ou par une illumination globale. Les détecteurs sont des photodétecteurs de type semi-conducteur MCT (Mercury Cadmium Telluride, HgCdTe, tellurure de mercure-cadmium). Ce sont des

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

photoconducteurs refroidis à l'azote liquide et qui couvrent le domaine 12500-400 cm^{-1} (0,8-25 µm). Pour le mode point, le détecteur est un MCT mono-élément ; un spectre est mesuré à la fois pour chaque point. La qualité spectrale (rapport signal/bruit) dépendra du temps de mesure mais aussi de l'objectif utilisé, qui détermine la taille du faisceau IR éclairant l'échantillon. Les objectifs sont de type Cassegrain avec des grossissements X15, X20 et X36. Il est à noter qu'avec une source thermique (type Globar®) et tenant compte des caractéristiques de la source IR polychromatique (2,5 – 25 µm), il est assez difficile d'obtenir un spectre de bonne qualité pour des ouvertures plus faibles que 15x15 $µm^2$ (résolution spatiale). Pour pallier ce problème, il est possible d'utiliser une source non conventionnelle très brillante comme la source IR synchrotron pour améliorer la résolution spatiale et en gardant un rapport signal/bruit correct. Dans ce cas il a été démontré qu'il était possible d'enregistrer des cartographies avec une résolution spatiale de 3x3 $µm^2$ [3]. Néanmoins, le mode point reste chronophage comme en microspectroscopie Raman, avec ici les avantages des spectromètres IRTF. L'imagerie IR connaît un grand essor avec l'introduction des détecteurs matriciels avec plusieurs éléments soit arrangés en ligne (8x2 pixels) ou en matrices (FPA : Focal Plane Array, Matrice à Plan Focal) avec 64x64 ou 128x128 pixels [4]. C'est une illumination globale qui couvre toute la surface du détecteur. Dans le cas du mode ligne, 16 spectres sont mesurés simultanément avec une résolution de 6,25 µm/pixel ou 25 µm/pixel. On note que pour l'illumination globale, la résolution spatiale est donnée en µm/pixel. Les détecteurs matriciels peuvent enregistrer 4096 (64x64) ou 16384 (128x128) spectres en une fois. Suivant les objectifs utilisés, la résolution peut atteindre des valeurs inférieures à 2 µm/pixel. Les mesures peuvent être faites en mode transmission ou réflexion et l'échantillon est balayé par le mouvement précis de la platine motorisée XY. La technologie devient alors très intéressante dans les domaines de la biologie et du biomédical où des résolutions comparables à la microspectroscopie Raman sont obtenues. Il y a eu par la suite beaucoup d'applications et sont apparus les concepts de « cytologie spectrale » et « histologie spectrale » qui permettent de proposer de nouvelles approches d'analyse au niveau cellulaire et tissulaire.

En exemple d'application, la Figure 9 montre l'utilisation du détecteur matriciel FPA (ici 64x64 pixels) pour l'imagerie au niveau de la cellule unique. Avec un champ de vision de 128x128 $µm^2$, la taille du pixel est de 2 µm et l'imagerie spectrale est constituée de 4096 spectres enregistrés en quelques minutes. L'image spectrale reconstituée sur l'information des protéines est illustrée dans ce cas. La même taille d'image en mode point prendrait plus d'une heure à réaliser.

Une modalité intéressante en réflexion est l'imagerie ATR (réflexion totale atténuée). Dans ce cas un cristal ATR de fort indice de réfraction (ex : diamant, germanium, séléniure de zinc…) est utilisé. L'échantillon, le cristal et la platine motorisée deviennent solidaires et l'image est obtenue par la surface du cristal en contact avec l'échantillon et par le mouvement de la platine XY. La Fig. 10 montre l'ensemble spectromètre couplé à l'imageur IR avec l'accessoire ATR installé sur la platine XY.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

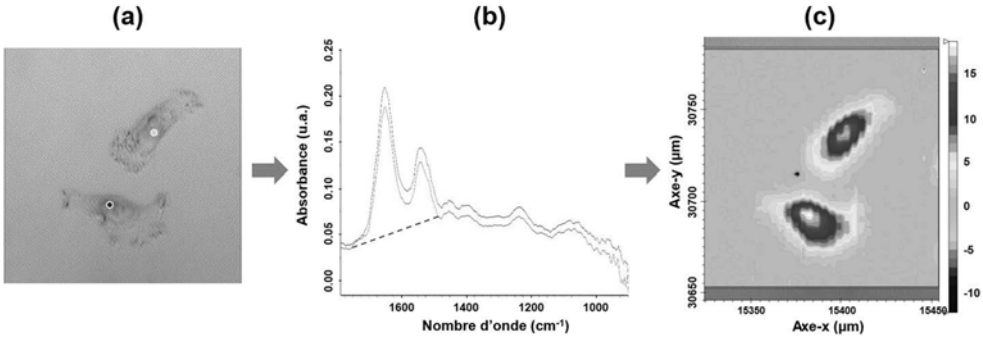


FIGURE 9 – Cytologie spectrale. Imagerie IR de la cellule unique avec détecteur MCT matriciel. (a) Photo montrant l'image visible de deux cellules dans le champ de vision (128x128 µm^2) d'un plan du détecteur FPA matriciel 64x64 pixels (Obj. x20) ; (b) extraction de deux spectres des deux cellules aux pixels indiqués en (a) ; (c) image spectrale des deux cellules reconstituée à partir de l'aire des bandes, indiquées en (b), correspondant à l'absorbance des protéines (bandes amide I et amide II). Conditions : 256 accumulations, résolution spectrale de 4 cm^{-1}, 2 µm/pixel et les 4096 spectres sont enregistrés en quelques minutes.

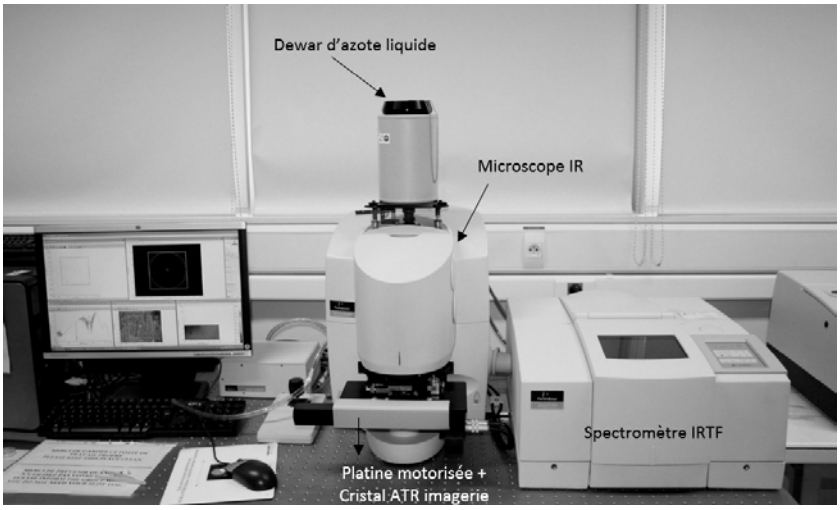


FIGURE 10 – Photo montrant un spectromètre IRTF couplé à un microscope équipé d'un détecteur MCT mode point et d'une barrette linéaire de 2x8 pixels. Les détecteurs MCT sont refroidis à l'azote liquide. Dans cette configuration, le condenseur est enlevé et le mode d'acquisition est en imagerie ATR. L'échantillon, le cristal ATR et la platine XY sont solidaires et se déplacent ensemble sur la zone à analyser

L'avantage est qu'on peut réduire la taille initiale du pixel avec l'indice de réfraction élevé du cristal. Par exemple, un déplacement de 6,25 µm de la platine en mode transmission se traduit par un déplacement du faisceau de 1,56 µm sur l'échantillon en utilisant l'imagerie ATR avec un cristal de germanium, dont l'indice de réfraction est égal à 4. Ainsi, l'image IR résultante sera de meilleur contraste car la résolution sera

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

d'environ 1,56 µm/pixel [5]. Le cristal ATR utilisé ici est un cristal de germanium dont le diamètre est de 600 µm. La surface maximale analysable est de 500x500 μm^2. La Fig. 11 montre une photographie du cristal, et son support optique. Les désavantages sont les mêmes qu'en spectroscopie ATR conventionnelle. C'est une technique de contact, ce qui implique le nettoyage du cristal avant chaque analyse car il y a un risque de contamination. Dans certains cas, la pression exercée lors du contact peut impacter sur l'échantillon (matière molle) et l'endommager. Il a été démontré que la pression exercée peut aussi influencer l'intensité relative des bandes IR, ce qui peut impacter l'analyse quantitative ou semi-quantitative.

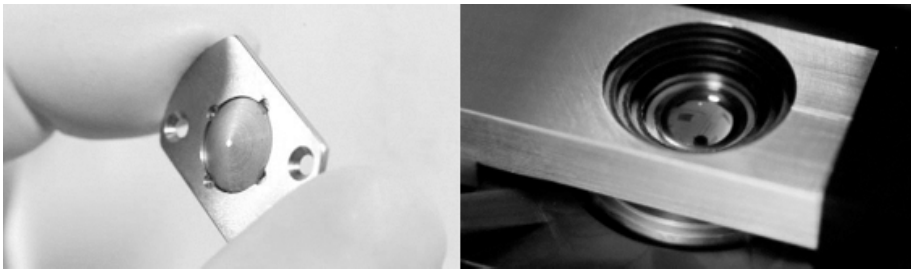


FIGURE 11 – Photo montrant (a- gauche) le cristal de germanium pour l'imagerie ATR, (b - droite) son support optique (avec l'aimable autorisation de la société Perkin-Elmer France).

À titre d'exemple de l'histologie spectrale (voir Fig. 12), l'imagerie IR a été appliquée à l'analyse de biopsies du foie pour détecter des zones de fibrose (dépôt de collagène). Ces coupes tissulaires sont de grande taille et ont été analysées avec un détecteur linéaire de 16 pixels et une résolution de 25 µm/pixel. Les deux exemples de biopsies du foie montrent bien que l'image spectrale, générée à partir d'un « clustering » par méthode K-means à 3 classes, peut distinguer les zones de fibrose (en bleu) des zones nodulaires (en violet). Ainsi on peut évaluer le pourcentage de fibrose dans le tissu à partir des résultats du K-means [6]. Ces coupes ont été obtenues à partir de blocs inclus dans la paraffine. Comme nous l'indiquons plus loin, les images spectrales IR peuvent être traitées mathématiquement et on effectue ainsi un « déparaffinage numérique » ; ce qui n'altère pas l'échantillon en comparaison à un déparaffinage chimique. Les pixels blancs des images spectrales représentent donc les endroits où le signal de la paraffine a été neutralisé. Ainsi, seuls les pixels contenant de l'information biochimique tissulaire sont pris en compte dans la classification par K-means.

Cette forme d'imagerie spectrale est donc non-invasive, sans marquage (car on utilise les informations moléculaires intrinsèques) et peut aider l'anatomopathologiste et les cliniciens à mieux évaluer l'état physiopathologique d'un tissu ou d'une cellule.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

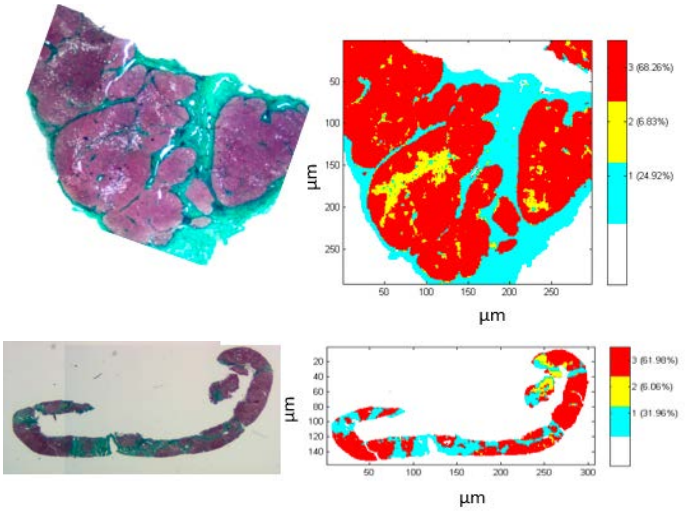


Figure 12 – Histologie spectrale. Exemples d'imagerie spectrale IR avec un détecteur linéaire et résolution de 25 µm/pixel sur des biopsies du foie de grande taille : (a et c) Histologie conventionnelle avec coloration au trichrome de Masson. Les nodules sont colorés en violet et le collagène en bleu représentant les zones où la fibrose hépatique s'est développée ; (b et d) histologie spectrale des coupes adjacentes en utilisant un clustering par méthode K-means à 3 classes où les nodules sont représentés en rouge, une hétérogénéité dans les nodules en jaune et la fibrose en bleu.

5 Acquisition et gestion d'un grand nombre de données – Extraction des grandeurs recherchées

En utilisant les instruments de dernière génération, les données acquises lors d'une expérimentation d'imagerie peuvent très vite compter plusieurs centaines de milliers de spectres, voire quelques millions. Chacun de ces spectres étant constitué de quelques centaines à un millier de points sur l'échelle des nombres d'ondes, les fichiers expérimentaux générés seront très volumineux (quelques centaines de mégaoctets, voire au-delà du gigaoctet). Des formats permettant d'optimiser cette taille et de compacter les données sont développés par les constructeurs, mais les volumes des fichiers restent néanmoins très importants. La plupart du temps, ces données peuvent être néanmoins gérées par un simple microordinateur de puissance raisonnable. Tout d'abord, les spectres peuvent être prétraités pour éliminer les artefacts de mesure (par exemple les signaux aléatoires générés par les rayons cosmiques), pour soustraire si besoin une ligne de base (fond de diffusion, de photoluminescence, ...), voir lisser les données pour améliorer le rapport signal sur bruit et ainsi faciliter la décomposition des bandes vibrationnelles. Ces prétraitements doivent être conduits avec précaution de manière à ne pas altérer les signaux.

Il reste ensuite à extraire l'information recherchée comme par exemple *les cartes de distribution de différents composés* dans l'objet analysé. Plusieurs approches sont possibles en fonction de la complexité de l'objet et du recouvrement des signaux de ses différents composants. Le cas le plus simple est sans doute celui pour lequel l'objet est *a priori* connu (on connait ses composants) et pour lequel les spectres caracté-

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

ristiques de chaque phase ne se recouvrent pas complètement. L'approche est alors très intuitive puisque l'on pourra *isoler une bande caractéristique* de chaque composant. L'amplitude ou l'intensité intégrée de ces bandes permettra alors de reconstruire immédiatement les cartes de présence de ces phases dans l'objet analysé.

Dans le cas où le recouvrement des spectres des composants individuels de l'objet est plus important, on pourra faire l'hypothèse que chaque spectre individuel *est une combinaison linéaire de spectres « de phase pure »* ou spectres « modèles ». Lorsque ces spectres de références sont connus (composés de référence, banques de données, spectres extraits du jeu de données...), une régression des moindres carrés classique (« *Classical Least Squares* ») donnera également les cartes de distributions des différents composés. Il est important de mentionner ici qu'il faut connaitre *a priori* toutes les composantes de l'objet.

Cependant, la superposition des bandes caractéristiques peut être telle qu'il est parfois difficile, voire impossible, de trouver un nombre d'ondes caractéristique pour chaque composé. Ce sera souvent le cas lors de l'analyse de cellules, de tissus, ... De plus, l'expérimentateur ne peut avoir qu'une connaissance partielle de l'objet à analyser. Il est alors possible, voire nécessaire, de traiter les données à l'aide de *méthodes chimiométriques*. De manière générale, ces méthodes d'analyses dites « *multivariées* » (en opposition aux techniques « *univariées* » basées sur l'exploitation d'un seul paramètre comme l'intensité à une fréquence particulière, une aire, une fréquence ou une largeur de raie, ...) des jeux de données prennent en compte toute l'information spectrale. Elles offrent l'avantage de pouvoir être appliquées *sans connaissance a priori* de l'objet à analyser, de manière non supervisée.

Les méthodes exploratoires comme l'analyse en composantes principales (ACP), la classification hiérarchique ascendante (HCA) ainsi que les méthodes multivariées de résolution de courbes (MCR, *Multivariate Curve Resolution*) sont sans doute les plus couramment utilisées. Elles sont décrites par ailleurs en détail dans cet ouvrage. De manière très synthétique, le jeu de données est alors représenté selon une matrice de données **D**, de dimensions (m,n), contenant **m** nombres d'ondes (informations spectrales) et **n** spectres (information spatiale). L'objectif de ces méthodes est alors de décomposer cette matrice de données D, contenant toute l'information sur la mesure, en deux matrices, C de dimension (m, k) et S^T de dimension (k, n) selon :

$$D=CS^t+E$$

La matrice E, de dimension (m, n), regroupe alors les résidus de cette modélisation. On reconnaîtra également une matrice de « pseudo concentrations » C et une matrice de « spectres élémentaires » ou « *loadings* » S.

Les objectifs de l'analyse en composantes principales et des méthodes multivariées de résolution de courbes sont différents. Sans reprendre le détail de ces méthodes, développé dans le chapitre précédent, les grandes lignes en seront ici rappelées.

L'analyse en composantes principales consiste à transformer les variables, ici les spectres, liées entre elles (dites « corrélées » en statistique) en nouvelles variables

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

décorrélées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées « composantes principales », ou axes principaux, ou enfin « *loadings* ». L'analyse en composantes principales permet de réduire le nombre de variables et de rendre l'information moins redondante. On peut concevoir l'analyse en composantes principales comme une approche à la fois géométrique (les n spectres étant représentés comme n « points » ou vecteurs dans un nouvel espace de dimension de **m** nombres d'ondes) et statistique : on recherchera de nouveaux axes indépendants, par construction orthogonaux entre eux, expliquant au mieux la variabilité des données, c'est-à-dire leur variance. On pourra ainsi compresser un ensemble de n variables, c'est à dire les n spectres constituant l'image, selon les k premiers axes de l'analyse en composantes principales qui permettront de reconstruire au mieux le jeu de données. En ce sens, l'analyse en composantes principales permettra de décrire et visualiser les données, de les décorréler, de les débruiter, c'est à dire que les (n-k) axes que l'on décide d'oublier sont des axes bruités qui ne portent pas d'information pertinente. Chaque spectre ponctuel sera alors vu comme la combinaison linéaire de ces k premiers axes ou « *loadings* », les coefficients de cette combinaison linéaire étant généralement nommés « scores ». Il est important ici de mentionner que ces « *loadings* » et « scores » ne portent directement pas de signification physico-chimique. Ils permettent par contre de reconstruire et de compresser l'ensemble du fichier image sans perte d'information. Néanmoins, comme les « *loadings* » sont exprimés en fonction des nombres d'ondes, comme pour les spectres originaux, des informations chimiques différenciant les classes de spectres pourraient être extraites. Les images ou cartes des « scores » peuvent alors permettre de visualiser la variabilité des données et mieux comprendre la distribution des espèces chimiques.

La Fig. 13 est basée sur le jeu de données acquis pour la Fig. 4, cette fois-ci c'est le traitement de données utilisé pour reconstruire l'image qui diffère, puisque l'image a été reconstruite en analyse par composantes principales (PCA). Nous attirons l'attention du lecteur sur l'importance des prétraitements dans ce type d'analyse. En effet dans ce cas précis, il est important de ne pas normaliser les données au risque « d'écraser » la réponse du verre par rapport à celle du cristal et par conséquent de ne plus pouvoir extraire cette composante qui est pourtant majoritaire.

L'objectif des méthodes multivariées de résolution de courbes (techniques de « démélange » spectral) est de remonter directement aux cartes de répartition et aux k spectres ou composantes individuelles permettant de décrire complétement le jeu de données, idéalement, k espèces chimiques dites pures. D'un point de vue numérique, les algorithmes utilisés sont généralement des variantes de la méthode des moindres carrés tel que l'algorithme ALS (*Alternating Least Squares*), mais d'autres algorithmes continuent à être envisagés. Les méthodes déjà citées d'ajustement à l'aide de spectres de réference (« *classical least square fit* », parfois appelées « *direct classical least square fit* », ou DCLS) peuvent au premier abord sembler proches de l'approche ACP (reconstruction via une équation matricielle $\mathbf{D}=\mathbf{CS^t}+\mathbf{E}$), mais la différence fondamentale est que en DCLS la matrice S est composée de spectres de référence fournis par l'utilisateur, alors qu'en ACP elle est déterminée par le calcul, de manière totalement indépendante de l'utilisateur.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

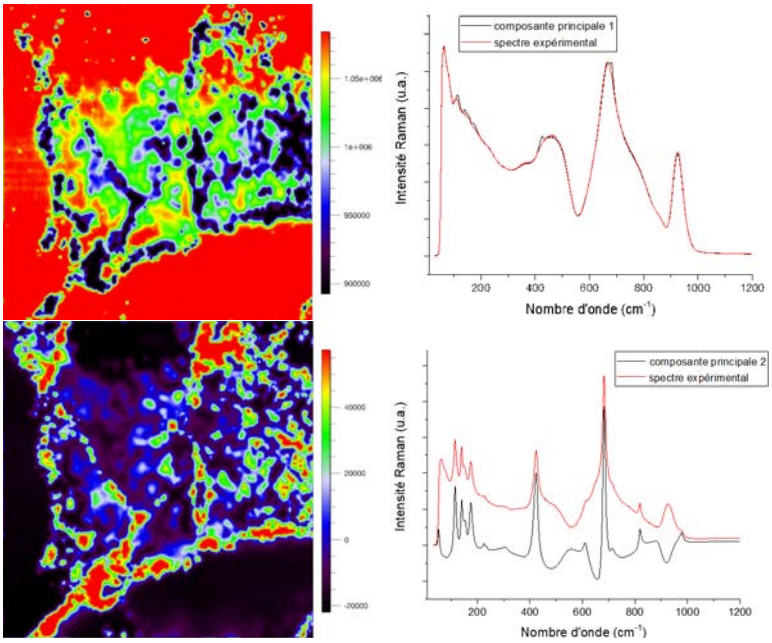


Figure 13 – Analyse par ACP du jeu de données de la figure 4

La figure 14 illustre la reconstruction d'image par analyse de type DCLS, obtenue à partir des spectres des phases pures cristal et verre.

Dans ces deux derniers cas, d'un point de vue mathématique, ces méthodes reposent donc uniquement sur la décomposition bilinéaire de la matrice de données : l'analyse des données devient alors du calcul matriciel.

Ces méthodes s'appliquent particulièrement bien au cas d'identification de phases. Elles peuvent également permettre de remonter à des grandeurs physicochimiques, par exemple des déformations structurales, la température, la densité de porteurs et leur mobilité dans le cas de matériaux semiconducteurs, des coefficients de diffusion, des nombres de transport... Ces informations sont en général contenues dans le profil d'une ou d'un groupe de raies particulier sous la forme de petits décalages en fréquences, d'élargissements de raies, de profils spécifiques. L'analyse consistera alors à ajuster chaque raie individuelle avec un profil spécifique de manière à extraire l'information recherchée. Dans ce cas, l'information sur la grandeur recherchée peut être quantitative. L'intérêt est ici bien évidement pour pouvoir effectuer ces mesures locales sans contact, de manière non destructive. La Fig. 15 montre l'exemple d'une céramique d'oxyde d'uranium (UO_2), dont l'image Raman est acquise avec un laser 633nm ; l'image couvre 87x95 µm, et contient 6 794 spectres [7,8]. Le traitement est effectué par analyse en composantes principales ; ici il ne révèle pas d'inhomogénéité de composition – le procédé d'élaboration de ces céramiques conduit à des matériaux chimiquement très homogènes – mais par contre illustre la structure de la céramique. La 1ère composante (spectre moyen) ainsi que la seconde sont caractéristiques des

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

cœurs de grains, avec des variations d'intensité liées à l'orientation cristallographique des grains. La troisième est liée aux joints de grains, avec une raie Raman spécifique déterminée par le calcul du « *loading* ». Enfin la quatrième composante, dont le *loading* est en forme de dérivée de raie, traduit par sa carte de score une légère inhomogénéité de position de la raie, liée à des contraintes mécaniques et/ou à des variations locales de stoechiométrie en oxygène.

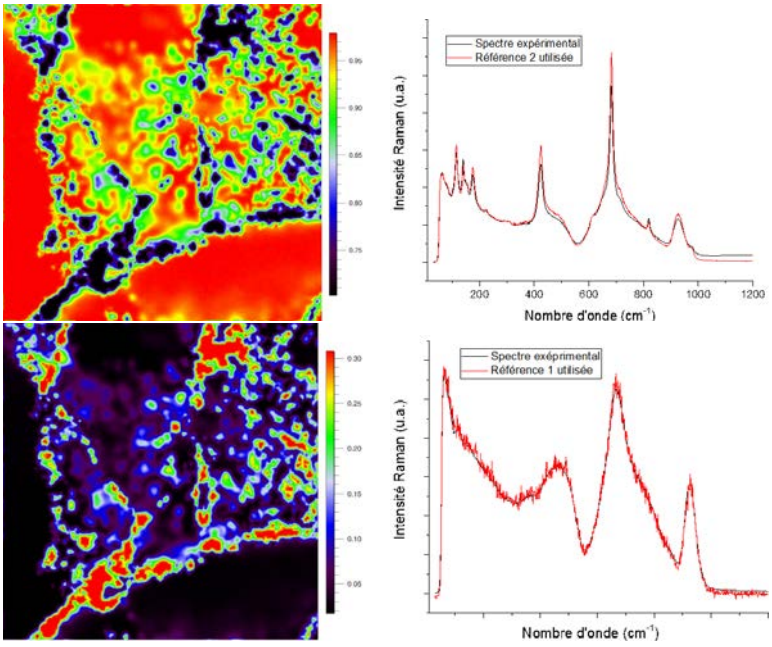


Figure 14 – Analyse par DCLS du jeu de données de la Fig. 4

Toutes les méthodes décrites ci-dessus s'appliquent particulièrement bien lorsque l'on cherche à analyser un matériau hétérogène, lorsque l'on cherche à localiser les différentes phases qui le constituent.

On pourra également chercher à extraire des jeux de données des grandeurs physico-chimiques, par exemple des déformations structurales, la température, la densité de porteurs et leur mobilité dans le cas de matériaux semiconducteurs, des coefficients de diffusion, des nombres de transport… Ici, l'échantillon peut être homogène ou hétérogène d'un point de vue chimique. Ces informations sont en général contenues dans le profil d'une ou d'un groupe de raies particulier sous la forme de petits décalages en fréquences, d'élargissements de raies, de profils spécifiques. L'analyse consistera alors à ajuster chaque raie individuelle avec un profil spécifique de manière à extraire l'information recherchée. Dans ce cas, l'information sur la grandeur recherchée peut être quantitative. L'intérêt est ici bien évidement de pouvoir effectuer ces mesures locales sans contact, de manière non destructive. Les exemples décrits dans la Fig. 16 concernent l'analyse de monocristaux de diamant et de silicium [9,10]. L'information recherchée est ici mécanique : déformations résiduelles et/ou contraintes résiduelles.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

En première approximation, cette information est contenue dans la fréquence de la (des) raie(s) caractéristique(s) du matériau. Dans le cas de faibles déformations (typiquement en deçà de 10^{-3}), on considère généralement que ce décalage de raie est proportionnel à la déformation ou à la contrainte résiduelle. Dans la majeure partie des cas, un décalage vers les hauts (bas) nombres d'ondes traduira un état de compression (tension). Ici chaque raie sur chaque spectre individuel est ajustée par une fonction lorentzienne de manière à extraire aussi précisément que possible sa fréquence. Sur ces cartes de fréquence, le « zéro » correspond à l'état du matériau non déformé.

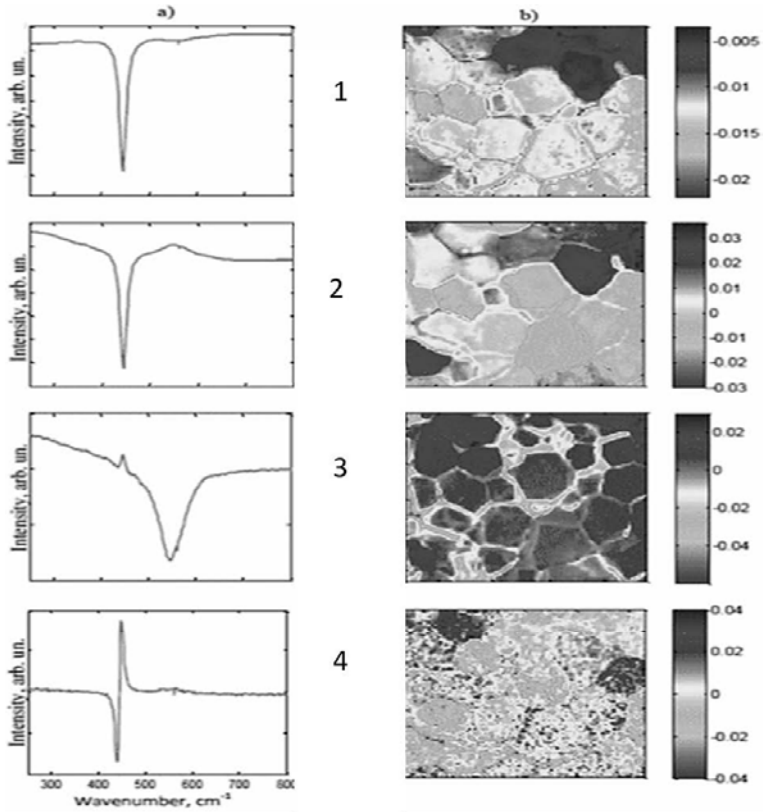


Figure 15 – Image Raman 2D d'une céramique UO_2. De haut en bas : micrographie MEB de la zone imagée. De 1 à 4 : Composantes principales des 4 premières composantes : *loadings* (gauche) et cartes de score (droite).

Le premier exemple représente le champ de déformation induit par un faisceau de dislocations dans un cristal de diamant. Ce champ de déformation se traduit par un motif spécifique dans l'image optique, obtenue en transmission, entre deux polariseurs croisés. L'image en fréquence traduit directement les zones de tension/compression présentes au voisinage de ce faisceau de dislocations. Le second exemple concerne un monocristal de silicium, après gravure de tranchées d'isolation et remplissage par de la silice, avant fabrication du transistor. On retrouvera les zones de compression

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

induites par le processus de fabrication de ces tranchées, ici un dépôt chimique à haute température. Ce type d'analyse a été longtemps pratiqué dans la microélectronique. En technologie silicium, du fait de la dimension actuelle des transistors (quelques dizaines de nm), l'imagerie Raman conventionnelle perd progressivement son intérêt, du fait de sa taille de sonde bien supérieure à la taille de la zone à analyser.

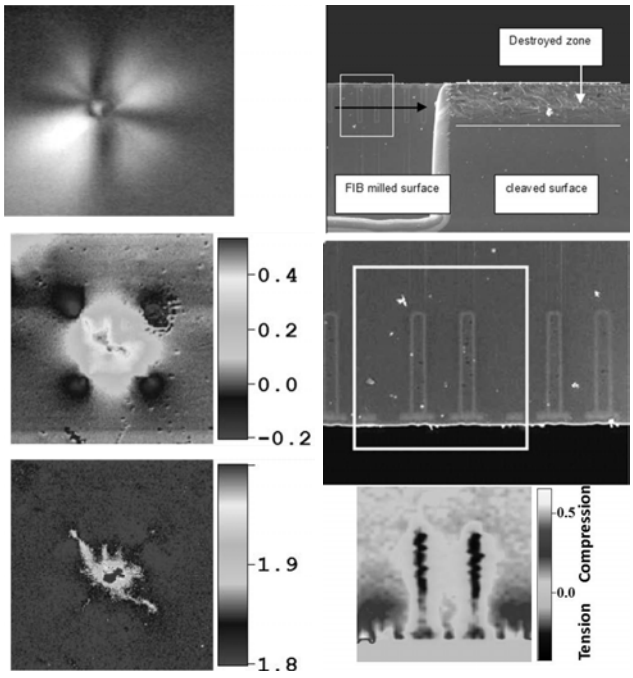


Figure 16 – Utilisation des fréquences et des largeurs de raie pour visualiser les déformations et/ou contraintes résiduelles dans des cristaux ou des dispositifs. Les trois images de gauche concernent l'étude d'un faisceau de dislocations dans un monocristal de diamant. L'image optique en lumière polarisée permet de repérer le défaut cristallin. Le décalage en fréquence (milieu) et l'élargissement (bas) du mode T_{2g} du diamant permettent de visualiser la zone déformée. Les trois images de la colonne de droite décrivent la préparation d'une coupe préparée par usinage FIB ou simple clivage au voisinage de tranchées d'isolation. Ces tranchées sont créées par gravure dans un monocristal de silicium, et remplissage par une couche de silice et de silicium polycristallin. De même, la fréquence du mode T_{2g} du silicium permet de visualiser les zones déformées ou contraintes. Dans les deux cas, le contraste de fréquence est inférieur à 1 cm^{-1} [9,10].

Une dernière étape de traitement peut consister à extraire à partir de ces cartes, quelques caractéristiques de l'objet analysé, comme par exemple la taille des particules qui le constituent, ou encore l'analyse statistique des histogrammes représentant la distribution des intensités des pixels.

À l'heure actuelle, la plupart des constructeurs proposent en standard de tels algorithmes dans le logiciel de contrôle de leurs spectromètres imageurs. Dans certaines situations, quand l'échantillon analysé est complexe par nature ou est préparé d'une façon particulière, des algorithmes spécifiques adaptés aux besoins sont développés par les laboratoires. Par exemple, dans le domaine biomédical, les cellules ou tissus sont souvent fixés pour conserver leurs morphologie et structure. La fixation des tissus

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

est généralement faite par la paraffine qui est un hydrocarbure qui va interférer avec l'information biochimique. Souvent un déparaffinage chimique est nécessaire mais il a été démontré qu'il modifie la composition de l'échantillon. Ainsi, un algorithme de déparaffinage numérique a été développé, ce qui évite une attaque chimique de l'échantillon. De même, toute la chaîne de prétraitement de l'image spectrale peut être prise en compte par des algorithmes développés suite aux besoins des laboratoires, comme l'algorithme EMSC (*Extended Multiplicative Signal Correction*). Suite au prétraitement, les images spectrales peuvent être analysées par des algorithmes plus complexes de recherche de nombre de classes comme le K-means ou le Fuzzy-c-means. Le nombre de classes n'est pas choisi arbitrairement ou par « essais et erreurs » par l'expérimentateur, mais de façon non subjective par l'algorithme.

6 Échantillonnage

L'une des questions que se pose l'utilisateur est le choix de l'échantillonnage, c'est-à-dire l'écart entre deux points consécutifs. L'effet de l'échantillonnage a déjà été évoqué figures 4-6. En imagerie point par point, *l'échantillonnage idéal* consistera donc à imposer des pas de déplacement de la table motorisée d'un pas voisin de la tache d'Airy dans les deux dimensions. Dans le cas d'un sous-échantillonnage important, l'image pourra ne pas représenter toutes les inhomogénéités de la surface, si une phase différente est présente mais de taille inférieure à l'écart entre points. Si les dimensions caractéristiques de l'échantillon sont petites devant la tache d'Airy, il pourra être avantageux de sur-échantillonner, c'est-à-dire imposer des pas de déplacement petits devant la dimension de la tache d'Airy. Le sur-échantillonnage permet également (pour certains constructeurs) d'améliorer les traitements de réduction du bruit : deux points voisins, séparés par une distance inférieure à la limite de diffraction, doivent nécessairement présenter les mêmes composantes. Dans tous les cas, l'échantillonnage, c'est-à-dire le pas mécanique, est un paramètre qui détermine en partie le rendu final des détails de l'image. Dans le cas de l'imagerie IR en illumination globale, il n'est pas nécessaire de choisir le pas car la résolution est donnée par le type de détecteur et l'objectif utilisé.

7 Tomographie Raman

L'exploration d'un échantillon par un balayage optique qui conserve en tout point les conditions de confocalité permet évidement de reconstruire des images de plans successifs, c'est-à-dire que l'on pourra *reconstruire des volumes*. Comme nous l'avons déjà mentionné, la profondeur sondée dans l'échantillon dépend de l'ouverture numérique de l'optique utilisée, mais également de l'indice de réfraction et de l'absorbance du matériau. Pour une optique donnée, les effets de réfraction auront naturellement pour premier effet de modifier la distance apparente du point de focalisation. Les effets de réfraction auront également pour effet d'augmenter la profondeur éclairée au fur et à mesure que l'on plonge dans l'échantillon. Différents modèles ont été proposés pour estimer la résolution en profondeur atteinte dans les conditions de confocalité [cf. chapitre 4]. L'équation donnée ci-dessous donne une estimation (surestimée) de la profondeur de matériau sondée Δ, qui tient compte de l'indice de réfraction du cristal étudié et de la profondeur apparente de focalisation z [11] :

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

$$\Delta = z\left[\sqrt{\frac{NA^2\left(n^2-1\right)}{\left(1-NA^2\right)}+n^2}-n\right]$$

où z est la profondeur à laquelle le faisceau laser est focalisé. Cette équation, la plus simple et intuitive car obtenue à partir des lois de l'optique géométrique, montre que la profondeur de champ Δ augmente linéairement avec la profondeur z à laquelle l'expérimentateur focalise le laser (c'est-à-dire le point de focalisation correspondant à un milieu d'indice 1). Cet effet sera d'autant plus important que l'on étudiera des solides transparents à la longueur d'onde d'analyse, et sera fortement dépendant de l'indice de réfraction de l'échantillon.

Dans le cas de matériaux « opaques », une autre méthode sera de moduler la profondeur de pénétration Δ dans l'échantillon en faisant varier la longueur d'onde de l'onde incidente. Dans la pratique, pour chaque longueur d'onde incidente, on obtiendra alors une information moyenne dans la zone sondée.

On voit clairement ici un des intérêts de disposer de plusieurs longueurs d'onde en fonction de l'échantillon et du problème à analyser. Un autre intérêt sera bien entendu la recherche de *conditions de résonances*, ce qui autorisera l'analyse de couches très fines ou de très faibles quantités de matière. L'exemple typique est sans doute ici le graphène, puisque l'on détecte sans problème cette monocouche atomique de carbone.

La Fig. 17 illustre l'imagerie Raman 3D reconstruite en DCLS et non corrigée de l'indice optique très élevé du matériau. Si la distribution des cristallites est réelle, leur taille en revanche est modifiée de par la pénétration du faisceau laser sur une profondeur de 30 microns dans un matériau de matrice vitreuse TeO_2-WO_3 donc d'indice moyen aux environs de 2.1.

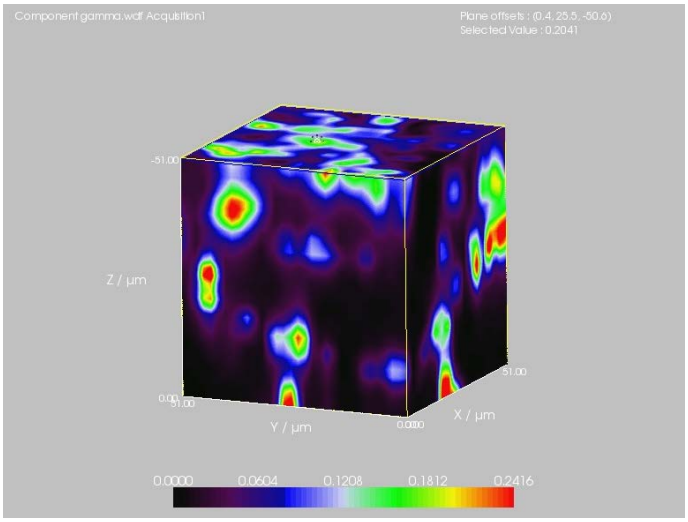


FIGURE 17 – Image Raman 3D d'une vitrocéramique de matrice vitreuse TeO_2-WO_3 avec des cristallites de la variété gamma de TeO_2 reconstruite par DCLS

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

8 Conclusions

Les méthodes d'imagerie ont pris aujourd'hui une grande importance en spectrométries vibrationnelles ; en témoigne le fait que les constructeurs de spectromètres proposent tous cette option à leur catalogue. L'apport de ces méthodes, en infrarouge comme en Raman, est indéniable, de la science des matériaux à celles du vivant, comme illustré dans ce chapitre, mais aussi dans bien d'autres domaines : génie des procédés, microfluidique, sciences de la Terre, objets du Patrimoine, etc... Leur potentiel vient de celui de la spectrométrie elle-même mais aussi de la statistique apportée par un très grand nombre de spectres. Il faut cependant souligner que l'imagerie a un double volet : l'acquisition des spectres, puis le traitement des données. Les deux volets sont essentiels, et réaliser puis exploiter au mieux une image vibrationnelle demande un certain investissement de son auteur dans les deux aspects. On ne peut parler réellement de méthode de 'routine', surtout pour le traitement de données, très dépendant de chaque objet d'étude, et du type d'information recherché. Mais l'imagerie vibrationnelle n'est aujourd'hui plus réservée à quelques spécialistes.

Les spectrométries vibrationnnelles ne sont pas l'apanage de l'imagerie. Beaucoup de méthodes de caractérisation s'y ouvrent aujourd'hui, à des échelles spatiales compatibles : luminescence, RMN, MEB, AFM, et bien d'autres encore. On trouve d'ailleurs déjà sur le marché des appareils couplant différentes méthodes : Raman/MEB ou Raman/AFM, par exemple. L'exploitation groupée des données de plusieurs méthodes d'imagerie, ou imagerie multimodale, offre de séduisantes perspectives pour un avenir proche, et permettra de d'exploiter au mieux les informations complémentaires fournies par chacune des méthodes.

Remerciements

Nous tenons à remercier celles et ceux qui ont contribué à ce texte : Julie Cornette, Olga A. Maslova, Valérie Untereiner, Mohamed-Ramzi Ammar, Aurélien Canizarès, Alexandre Crisci, Eddy Latu-Romain et Mohammed Reda Zaki.

Références

[1] M. Delhaye and P. Dhamelincourt, Raman microprobe and microscope with laser excitation, Journal of Raman Spectroscopy 3 (1975) 33-43.

[2] G. Turrell and J. Corset, Raman Microscopy : Developments and Applications, Academic Press, 1996.

[3] P. Dumas, G.D Sockalingum, J. Sulé-Suso, Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy : what's new in biomedical applications ? Trends Biotechnol. 25(2007) 40-4.

[4] E.N. Lewis, P.J. Treado, R.C. Reeder, G.M. Story, A.E. Dowrey, C. Marcott, and I.W. Levin, Fourier Transform Spectroscopic Imaging Using an Infrared Focal-Plane Array Detector Anal. Chem. 67 (1995) 3377–3381.

[5] J. Nallala, O. Piot, M.D Diebold, C. Gobinet, O. Bouché, M. Manfait, G.D Sockalingum, Infrared and Raman imaging for characterizing complex biological materials : a comparative morpho-spectroscopic study of colon tissue, Appl Spectrosc.68 (2014) 57-68.

[6] J. Moreau, P. Bouzy, J. Guillard, V. Untereiner, R. Garnotel, A. Marchal, C. Gobinet, C. Terryn, G.D Sockalingum, G. Thiéfin, Analysis of Hepatic Fibrosis Characteristics in Cirrhotic Patients with and without Hepatocellular Carcinoma by FTIR Spectral Imaging, Molecules 25 (2020) 4092.

[7] O.A. Maslova, G. Guimbretière, M.R. Ammar, L. Desgranges, C. Jégou, A. Canizarès, P. Simon, Raman imaging and Principal Component Analysis-Based Data Processing on Uranium Oxide Ceramics, Mater. Charact. 129 (2017) 260-269.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556

[8] O.A. Maslova, X. Iltis, L. Desgranges, M.R. Ammar, C. Genevois, E. de Bilbao, A. Canizarès, S.A. Barannikova, I.N. Leontyev, P. Simon, Characterization of an UO_2 Ceramic via Raman Imaging and Electron Back-Scattering Diffraction, Mater. Charact. 147 (2019) 280-285.

[9] E. Romain-Latu, M. Mermoux, A. Crisci, D. Delille, L. Kwakmann, Local strain measurements in shallow trench insulator structures using near-ultraviolet Raman spectroscopy : Simulation and experiment, J. Appl. Phys. 102 (2007) 103506.

[10] A. Crisci, F. Baillet, M. Mermoux, G. Bogdan, M. Nesladek, K. Haenen, Residual strain around grown-in defects in CVD diamond single crystals. A 2D and 3D Raman imaging study, Phys. Stat. Sol. 208 (2011) 2038-2044.

[11] N. Everall, Confocal Raman Microscopy : Why the Depth Resolution and Spatial Accuracy Can Be Much Worse than You Think, Applied Spectroscopy, 54 (2000) 1515-1520.

[12] M. Mirgorodsky, M. Colas, M. Smirnov, T. Merle-Méjean, R. El-Mallawany, P. Thomas, Structural peculiarities and Raman spectra of TeO_2/WO_3-based glasses : A fresh look at the problem, J. Solid State Chem. 190 (2012) 45.

Published in : SIMON G. (dir.) (2020), *Spectroscopies vibrationnelles. Théorie, aspects pratiques et applications*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813002556, doi : https ://doi.org/10.17184/eac.9782813002556