



Université de Montréal

**Fabrication des films microstructurés et leurs  
caractéristiques en spectroscopie de résonance des  
plasmons de surface**

par

Ludovic Saiveng Live

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des arts et des sciences  
en vue de l'obtention du grade du doctorat  
en chimie

Août 2011

© Ludovic Saiveng Live, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Fabrication des films microstructurés et leurs caractéristiques en spectroscopie de  
résonance des plasmons de surface

Présenté par :  
Ludovic Saiveng Live

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Professeure Antonella Badia, présidente-rapporteuse et  
représentante du Doyen de la Faculté  
Professeur Jean-François Masson, directeur de recherche  
Professeur Richard Martel, membre du jury  
Professeure Maryam Tabrizian, examinatrice externe

## Résumé

Cette thèse caractérise les propriétés optiques des matériaux plasmoniques microstructurés et procède à l'évaluation des paramètres analytiques afin de les employer comme plateforme de biodétection en spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR). Aux dimensions micrométriques, les matériaux plasmoniques présentent des caractéristiques optiques propres aux nano- et macromatériaux. La cartographie physico-optiques en SPR de matériaux méso- et microscopiques s'est effectuée à l'aide de films structurés de motifs périodiques triangulaires et circulaires fabriqués par une technique modifiée de lithographie par nanosphères (*nanosphere lithography*, NSL). À partir de cette vue d'ensemble, quelques films structurés ont été sélectionnés en fonction d'aspects analytiques tels que la sensibilité et la résolution face aux variations d'indice de réfraction (RI) pour déterminer le potentiel de ces matériaux comme plateforme de biodétection. Les propriétés optiques distinctes des films microstructurés proviennent d'interactions résonantes entre les modes de plasmons de surface (SP) localisé et délocalisé identifiés par la relation de dispersion en SPR ainsi que l'imagerie Raman. Les conditions de résonance des modes SP dépendent de paramètres expérimentaux ( $\lambda$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ) tel qu'observés numériquement par *rigorous coupled wave analysis* (RCWA) et empiriquement. Ces travaux démontrent la nature plasmonique distincte des micro-matériaux et leur potentiel d'intégration aux techniques analytiques SPR existantes.

Les matériaux plasmoniques micrométriques furent également étudiés pour l'implémentation de la SPR à une pointe de microscopie à force atomique (*atomic force microscopy*, AFM) combinant ainsi la spectroscopie à l'imagerie topographique. Des travaux préliminaires se sont concentrés sur la signature spectroscopique de leviers en silicium (Si) et en nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), l'impact d'un revêtement d'or sur les pointes et l'influence de milieu environnant. Une image d'origine plasmonique a été obtenue avec des leviers en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  revêtus d'or en transmission dans un environnement aqueux, indiquant

ainsi le potentiel de ces pointes comme micro-biocapteur SPR. Ces résultats préliminaires servent de fondement pour orienter les prochaines investigations dans ce projet.

**Mots-clés** : Résonance des plasmons de surface, plasmonique, film microstructuré, microtrous, amplification, localisation des plasmons de surface, SPR, LSPR, biocapteurs.

## Abstract

This thesis characterizes the optical properties of microstructured plasmonic materials and evaluates analytical parameters to use them as biosensing platforms in surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. At microscopic dimensions, plasmonic materials present optical characteristics unique to nano- and macromaterials. A SPR physico-optic mapping of meso- and microscopic materials was performed using structured films with triangular and circular periodic patterns fabricated by modified nanosphere lithography (NSL) technique. From this overview, a few structured films were selected based on analytical aspects such as sensitivity and resolution with respect to the refractive index (RI) to determine the potential of these materials as biosensing platforms. The distinct plasmonic properties of microstructured films emerge from resonant interactions between localized and propagating surface plasmons (SP) modes identified by the SPR dispersion relation and by Raman imaging. The conditions of SP modes resonant interactions depend on experimental parameters ( $\lambda$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ) as observed numerically in rigorous coupled wave analysis (RCWA) and empirically. These works show the distinct plasmonic nature of micromaterials and their potential integration to existing SPR techniques.

Plasmonic micromaterials were also studied for the implementation of SPR to an atomic force microscopy (AFM) cantilever, hence combining spectroscopy to topographic imaging. Preliminary works were focused on the spectroscopic response of silicon (Si) and silicon nitride ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) cantilever, the impact of gold coating on the cantilever is tip, and the influence of the adjacent environment. An image of plasmonic nature was obtained in transmission spectroscopy with gold coated  $\text{Si}_3\text{N}_4$  cantilever in water environment, thus indicating the potential of these cantilevers as micro-SPR sensing probes. These preliminary results provide a basis to guide future investigations in this project.

**Keywords** : Microhole arrays, microstructured film, plasmonic, microplasmonic, surface plasmon resonance, SPR, localized surface plasmon resonance, LSPR, enhanced sensitivity, biosensors.

# Table des matières

Résumé.....	iv
Abstract.....	vi
Liste des symboles et abréviations.....	xi
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xiv
Remerciements.....	xxiii
Chapitre 1 Introduction.....	24
1.1 Résonance des plasmons de surface.....	28
1.1.1 Physique du phénomène du SPR.....	28
1.1.2 Modes SPR et LSPR.....	32
1.2 Considérations pour le design de biocapteurs SPR.....	38
1.2.1 Instrumentation SPR.....	39
1.2.2 Sensibilité à l'indice de réfraction.....	42
1.3 Imagerie Raman.....	44
1.4 Implémentation du SPR à la microscopie à force atomique.....	47
1.4.1 Principes de base de la microscopie à force atomique.....	48
1.4.2 Intégration de capteurs plasmoniques aux leviers AFM.....	50
1.4.3 Modification chimique des leviers AFM.....	51
1.5 Directions et perspectives de la thèse.....	52
Chapitre 2 High sensitivity of plasmonic structures near the transition from short range to propagating surface plasmon.....	55
2.1 Introduction.....	56
2.2 Experimental.....	60
2.2.1 Preparation of the triangles and microhole arrays.....	60
2.2.2 Characterization of the triangles and microhole arrays.....	62
2.2.3 Optical properties of the micro-structures.....	63
2.2.4 Monolayer formation.....	64

2.3	Results and discussion .....	64
2.3.1	Spectroscopy of the Au triangles in transmission.....	64
2.3.2	Effect of the metal on the plasmonic properties of 1.8 $\mu\text{m}$ triangles – SPR measured in TIR.....	65
2.3.3	Edge length and aspect ratio influence on the plasmonic properties of Au triangle arrays measured in SPR .....	67
2.3.4	Wavelength and sensitivity of the maximum transmittance of Au triangles in SPR .....	68
2.3.5	Penetration depth and RI resolution for the transmission maxima .....	71
2.3.6	Transition from triangles to microhole arrays measured in SPR .....	73
2.3.7	Sensitivity with microhole arrays .....	75
2.4	Conclusions.....	76
2.5	Acknowledgments.....	77
Chapitre 3	Propagating Surface Plasmon Resonance on microhole arrays .....	78
3.1	Introduction.....	79
3.2	Experimental Section .....	82
3.2.1	Preparation of the micro plasmonic materials and continuous films .....	82
3.2.2	Physical and optical characterization of microstructured films .....	84
3.2.3	Monolayer formation .....	85
3.2.4	SPR biosensors.....	85
3.3	Results and Discussion.....	86
3.3.1	Sensitivity to refractive index .....	87
3.3.2	Width of the SPR band in microstructures.....	90
3.3.3	Penetration depth ( $l_d$ ) .....	92
3.3.4	Sensing performances with microhole arrays .....	94
3.3.5	IgG biosensors with different plasmonic materials.....	95
3.4	Conclusions.....	96
3.5	Acknowledgments.....	97



Chapitre 4	Enhanced biosensing using excitation of localized and propagating surface plasmons in microhole arrays.....	98
4.1	Introduction.....	99
4.2	Materials and methods .....	102
4.2.1	Surface plasmon resonance and Raman microscopy measurements on microhole arrays.....	102
4.2.2	RCWA simulations .....	103
4.3	Results and discussion .....	103
4.3.1	Propagating surface plasmon waves in microhole arrays .....	103
4.3.2	Concentration of SP waves into holes.....	108
4.3.3	RCWA simulation of the SPR response .....	110
4.3.4	Performance of SPR sensors based on microhole arrays – Bulk sensitivity..	111
4.3.5	Angulo-spectral SPR sensing - biodetection of IgG .....	114
4.4	Conclusions.....	116
4.5	Acknowledgments.....	117
Chapitre 5	Vers l'intégration du SPR à la microscopie à force atomique (AFM).....	118
5.1	Introduction.....	118
5.2	Partie expérimentale.....	118
5.2.1	Montage instrumental optique.....	118
5.2.2	Levier AFM.....	122
5.2.3	Imagerie et acquisition des spectres.....	123
5.2.4	Fabrication de microtriangles.....	124
5.3	Spectroscopie sur des leviers AFM.....	124
5.4	Imagerie AFM –SPR.....	126
5.4.1	Configuration instrumentale dans l'air.....	127
5.4.2	Milieu de propagation .....	130
5.4.3	Effet du substrat .....	134
5.4.4	Effet du levier.....	137
5.4.5	Mode contact.....	137

5.4.6	Vers l'intégration biocapteur SPR au pointe AFM.....	138
Chapitre 6	Conclusions et perspectives .....	140
	Références.....	143
	Annexes.....	161
	Annexe 1 – Supporting Information: High sensitivity of plasmonic structures near the transition from short range to propagating surface plasmon.....	162
	Annexe 2 – Supporting Information: Propagating Surface Plasmon Resonance on microhole arrays.....	165
	Annexe 3 – Supporting Information: Enhanced biosensing using excitation of localized and propagating surface plasmons in microhole arrays .....	168
	Detailed materials and methods .....	168
	Preparation and characterization of microhole arrays.....	168
	RCWA simulations .....	168
	Raman microscopy.....	169
	Angulo-spectral SPR instrument.....	170
	Anti-IgG / IgG kinetics .....	170
	Text 1: Influence of the bulk RI of biofluids on the optimal excitation angle.....	171
	Supporting information tables and figures.....	172
	Annexe 4 – Information supplémentaire: Vers l'intégration du SPR à la microscopie à force atomique (AFM) .....	176

## Liste des symboles et abréviations

16-MHA	Acide 16-mercaptohexadécanoïque / <i>16 - mercaptohexadecanoic acid</i>
4-NBT	4 – nitrobenzene thiol / <i>4 – nitrobenzene thiol</i>
AFM	Microscopie à force atomique / <i>Atomic force microscopy</i>
Ag	Argent
Ag <sub>2</sub> O	Oxide d'argent
Au	Or
Da	Dalton
EM	Électromagnétique
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier / <i>Fourier transform infrared</i>
FWHM	<i>Full width half maximum</i>
HeNe	Hélium néon
IR	Infrarouge
IgG	Immunoglobuline G / <i>Immunoglobulin G</i>
$l_d$	Distance de pénétration
LSPR	Résonance des plasmons de surface localisée / <i>Localized surface plasmon resonance</i>
NSL	<i>Nanosphere lithography</i>
PBS	Tampon phosphate salin / <i>Phosphate buffer saline</i>
RI	Indice de réfraction / <i>Refractive index</i>
RIU	Unité d'indice de réfraction / <i>Refractive index units</i>
RTI	Réflexion totale interne
RCWA	<i>Rigorous coupled-wave analysis</i>
SERS	Exaltation de surface du signal Raman diffusé / <i>Surface enhanced Raman scattering</i>
Si	Silicium
Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Nitride de silicium

SNOM	Microscopie en champs proche / <i>Scanning near-field optical microscopy</i>
SP	Plasmons de surface / <i>Surface plasmons</i>
SPR	Résonance des plasmons de surface / <i>Surface plasmon resonance</i>
SPP	Polariton de plasmons de surface / <i>Surface plasmon polariton</i>
TIR	<i>Total internal reflection</i>
Vis-NIR	Visible-proche infrarouge / <i>Visible-near infrared</i>
V	Volt
W	Watt
$\mu\text{L}$	Microlitre
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
$\mu\text{m}$	Micromètre
$\mu\text{M}$	Micromolaire
$\varepsilon$	Diélectrique
$\eta$	Indice de réfraction
$\lambda$	Longueur d'onde
$\omega$	Fréquence angulaire
$\theta_{\text{exc}}$	Angle d'excitation

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 – Propriétés plasmoniques de nanoparticules de diverses formes et des films continus.

Table 2.1. LSPR signal from triangles measured using transmission spectroscopy.

Table 3.1. Mixture of latex spheres, ethanol and water used to prepare sphere masks by drop coating. Volumes between 35-40  $\mu\text{L}$  of mixture solution are used to prepare a mask.

Table 3.2. The sensitivity to refractive index between 1.33 to 1.39 RIU of the transmission maximum band with Au triangles.

Table 3.3. The sensitivity to refractive index in nm/RIU for Au microhole arrays with different diam/period (D/P).

Table 3.4. Analytical parameters of triangles, microhole arrays and continuous film in kinetic measurement.

Tableau 5.1 – Principales composantes optiques du montage AFM-SPR en transmission.

Tableau 5.2 – Les propriétés physiques, mécaniques et l'indice de réfraction des leviers.

## Liste des figures

Figure 1.1 – Évolution depuis l’an 2000 du nombre de publications portant sur la SPR. Les données pour la première moitié de 2011 sont en bleu, et la projection pour la seconde moitié est en gris. (Source Internet : Web of Knowledge, mot clé : Surface Plasmon Resonance, juillet 2011).

Figure 1.2 – Résonance des plasmons de surface (SPR) : schématisation de la polarisation des charges en surface d’un métal.

Figure 1.3 – Conditions d’excitation du SPP par la lumière se propageant dans un prisme de BK7. Les vecteurs d’onde pour les photons se propageant dans l’air (ligne noire), dans le BK7 (ligne hachurée verte) et le SPP (ligne rouge pointillée) sont présentés. (Insertion) Schéma des conditions expérimentales pour exciter le SPP.

Figure 1.4 – (Gauche) Caractéristiques plasmoniques du mode SPR propagatif et (droite) spectre de réflectance d’un film continu par interrogation spectrale ou angulaire.

Figure 1.5 – Configuration d’excitation (A) de Kretschmann et (B) par un réseau.

Figure 1.6 – (Gauche) Caractéristiques plasmoniques du mode SPR localisé et (droite) spectre d’absorbance en transmission de nanoparticules en solution.

Figure 1.7 – Échelle de taille des matériaux plasmoniques.

Figure 1.8 – Sensorgramme typique d’une cinétique SPR d’un couple récepteur/cible.

Figure 1.9 – Caractéristiques spectrales du SPP sur lesquelles est basée la spectroscopie SPR. Dispersion du SPP d’un film d’or de 50 nm d’épaisseur (supérieur gauche) en contact

avec l'eau ( $\eta = 1.33$ ) et (supérieur gauche) diverses solutions d'indice de réfraction croissantes. Signal optique mesuré afin d'établir une courbe d'étalonnage (inférieur gauche) par interrogations angulaire ou (inférieur droite) spectrale.

Figure 1.10 – Explications générales de la spectroscopie Raman. (Gauche) Diagramme des niveaux d'énergie accessibles lors de la diffusion de la lumière par une molécule. (Droite) Spectre Raman typique d'un rapporteur Raman (R) sur un matériel plasmonique ici représenté par une nanoparticule d'or (np).

Figure 1.11 – Intégration et application de la SPR avec l'AFM.

Figure 1.12 – Image en microscopie électronique d'un levier du côté de la pointe. (<http://www.nanoworld.com/uploads/gallery/Pyrex-Nitride-oxide-sharpened-pyramidal-tip-20101202021221.jpg>, consulté en août 2011)

Figure 1.13 – Principe de base de la microscopie à force atomique.

Figure 1.14 – SNOM par amplification locale du signal.

Figure 2.1. The extinction spectra were measured in transmission spectroscopy for Au triangle arrays in air with various edge lengths.

Figure 2.2. (Left) SPR spectra for 1.8  $\mu\text{m}$  triangles of different metal, Ag, Au, and  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  with an aspect ratio of 36, 33, and 29 respectively. Ag and Au exhibit a SPR signal, while  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  does not in the wavelength range measured. (Right) SPR spectra for 1.8  $\mu\text{m}$  Ag triangles (aspect ratio of 36) without oxidation (0 min), after 30 min and 75 min oxidation in an oxygen plasma.

Figure 2.3. (Left) SPR spectrum for triangles of 1.8  $\mu\text{m}$  with an aspect ratio of 33 measured with air (gray), RI = 1.33359, RI = 1.34722, RI = 1.36320, RI = 1.37335, and RI = 1.39073 (black traces). (Right) Excitation wavelength for triangles with varying aspect ratio and edge lengths measured in TIR with an air sample.

Figure 2.4. (Left) Spectral position of the transmission maxima in water with various triangle edge length and aspect ratio. (Right) Sensitivity to refractive index of the transmission maxima measured with aqueous sucrose solution.

Figure 2.5. SPR spectra in water of triangles with an edge length of 700 nm (top left), 950 nm (top right), and 1.8  $\mu\text{m}$  (bottom left) respectively, with various aspect ratio as indicated with the numbers next to each spectrum. The spectra for the 700 nm triangles were offset for ease of representation. For the 950 nm and the 1.8  $\mu\text{m}$  triangles, the intensity generally increases with aspect ratio. (Bottom right) Total internal reflection spectra for air (gray) and aqueous solutions of varying refractive index with a blank glass slide.

Figure 2.6. AFM images of microhole arrays etched for 30 minutes at different position in the plasma cleaner. A gradient exist in the chamber resulting in different etch rates. The microhole arrays were prepared using a mask composed of 3  $\mu\text{m}$  spheres. The hole diameter is 2.5 (triangles, top left), 2.2 (top right), 2.0 (bottom left), and 1.6  $\mu\text{m}$  (bottom right). The depth of the holes is between 60 and 70 nm. Each AFM images corresponds to a 20 x 20  $\mu\text{m}$  scan.

Figure 2.7. (Left) Overlay of the SPR spectrum with microhole arrays acquired in water with increasing etching. The hole diameter for each samples is 1 (2.5  $\mu\text{m}$  – gray), 2 (2.2  $\mu\text{m}$  - red), 3 (2.0  $\mu\text{m}$  - blue), and 4 (1.6  $\mu\text{m}$  - black). (Right) The sensitivity to refractive index is measured with sucrose solutions on a continuous Au film of 50 nm thin.



Figure 2.8. The SPR spectra of microhole arrays with hole diameter of 2.5  $\mu\text{m}$  (top left), 2.2  $\mu\text{m}$  (top right), 2.0  $\mu\text{m}$  (bottom left) and 1.6  $\mu\text{m}$  (bottom right) were measured with air (dark blue) and sucrose solutions of RI = 1.3333 (green), RI = 1.3480 (black), RI = 1.3554 (pink), RI = 1.3647 (red), RI = 1.3755 (gray), and RI = 1.3888 (light blue).

Figure 3.1. AFM images of micro-patterned thin films with micro-triangle (left) and microhole arrays (right) prepared with 3.2  $\mu\text{m}$  spheres.

Figure 3.2. (Left) SPR calibration spectra of microhole arrays measured in air (RI = 1.0, dark blue) and sucrose solution of RI = 1.3337 (green), 1.3484 (black), 1.3588 (violet), 1.3715 (red), 1.3817 (yellow), 1.3942 (light blue). (Right) Calibration curves of SPR sensors with sucrose solutions. The calibration curve represents the average response from three independent samples.

Figure 3.3. (Top left) Methodology to calculate the FWHM ratio for triangles (blue curve) and for microhole arrays (red curve). (Top right) The SPR spectra for water were measured with microhole arrays of 3.2  $\mu\text{m}$  periodicity with diam/period between 0 and 1. (Bottom left) SPR response in water for microhole arrays near 0.3 diam/period with various periodicities. (Bottom right) The FWHM ratio decreases for smaller diam/period. This value must be minimized for optical analytical performance.

Figure 3.4. (Left) Wavelength shift of the SPR absorption band measured in water solution from the formation of a 16-MHA monolayer and (Right) the calculated penetration depth from this shift.

Figure 3.5. Sensorgrams for SPR sensors with different plasmonic materials. A short exposition of the sensor to water (1.33400 RIU) is followed by a phosphate buffer solution (PBS, 1.33566 RIU). The SPR response of triangles (dark lines) is offset for ease of representation.

Figure 3.6. Sensogram for the detection of 10 nM IgG with different plasmonic materials; triangles (x), microhole arrays ( $\square$ ), and continuous film (o). The error bars represent two standard deviations on the data points.

Figure 4.1 – Angulo-spectral images of SPR dispersion in water ( $\eta_{\text{water}} = 1.333$ ) for a continuous film 50 nm thick (Left) and microhole arrays (p: 3.2  $\mu\text{m}$ , d: 1.8  $\mu\text{m}$ ) of 50 nm (center) and 70 nm (Right) depth.

Figure 4.2 – Spectral characteristics of microhole arrays (Left) The wavelength position of the plasmonic bands for microhole arrays of 50 nm (blue circles) and 70 nm (red squares) and for a 50 nm-thick continuous film (dark triangles). (Right) Spectra of the plasmonic band measured in total internal reflectance for microhole arrays of 70 nm depth excited at three different  $\theta_{\text{exc}}$ .

Figure 4.3 –SERS and reflectance images of 4-nitrobenzene thiol (4-NBT) monolayer on microhole arrays of 120 nm depth. (Left) False color image of the 1573  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-C}$ ) vibration (SERS) located at the center of the hole (Reflectance image), with an overlay of the two images (S+R). (Right) Overlay of the SERS spectra for microhole arrays of 120 nm depth (red) and 70 nm depth (green), and for a continuous film of 120 nm thickness (blue).

Figure 4.4 – RCWA simulation of the response for Au microhole arrays (p: 3.2  $\mu\text{m}$ , d: 1.8  $\mu\text{m}$ , t: 50 nm). (Left) Reflectance spectra of the dispersive plasmonic band in water ( $\eta = 1.333$ ) and (Right) angular SPR response of microhole arrays to variations of 10 mRIU.

Figure 4.5 – Enhancement of bulk sensitivity for microhole arrays in relation to the RI window and the excitation angle ( $\theta_{\text{exc}}$ ). (Left) Reflectance image of microhole arrays excited at  $\theta_{\text{exc}} = 72.6^\circ$  with increasing RI. (Center) Calibration curves for microhole arrays

(red) and continuous films (blue) at 3 different  $\theta_{exc}$ , (Right) Amplification factor for bulk sensitivity with microhole arrays for specific RI windows (experimental data).

Figure 4.6 –SPR response of microhole arrays for molecules adsorbing to the surface. (Left) RCWA simulations demonstrate enhanced SPR sensing at a specific angle. (Centre) Experimental SPR data for anti-IgG immobilization on microhole arrays (blue circle) and for the detection of IgG (red circle). (Right) SPR sensorgram for the detection of 100 nM IgG at  $\theta_{exc} = 72.6^\circ$  with microhole arrays (red) and continuous film (blue).

Figure 5.1 – Montage optique AFM-SPR.

Figure 5.2 – (Haut) Spectres de réflectance des divers leviers avec (rouge) et sans (bleu) revêtement de  $\sim 40$  nm d'or. (Bas) Spectre de transmission des leviers avec (rouge) et sans (bleu) revêtement d'or.

Figure 5.3 – Image AFM en mode contact de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  du substrat de microtriangles d'or.

Figure 5.4 – (Gauche) Spectre de réflectance d'un cantilevier en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  revêtu d'or durant le balayage du substrat. Image AFM-SPR des variations d'intensité dans le spectre de réflectance pour une longueur d'onde entre (milieu)  $\lambda = 640$  à  $660$  nm et (droite)  $\lambda = 660$  à  $680$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.1, p. XX).

Figure 5.5 – Image spectrale en réflexion total interne avec un cantilevier en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  non métallisé. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.1, p. XX)

Figure 5.6 - Image optique des variations d'intensité en transmission pour des longueurs d'onde (gauche) de  $\lambda = 480$  à  $580$  nm et (droite) de  $\lambda = 580$  à  $680$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.2, p. XXI).

Figure 5.7 - (Gauche) Spectre en RTI d'un levier en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  revêtu d'or durant le balayage du substrat. Image des variations d'intensité dans le spectre de RTI pour une longueur d'onde entre (milieu)  $\lambda = 640$  à  $660$  nm et (droite)  $\lambda = 660$  à  $680$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.3, p. XXI).

Figure 5.8 – (Gauche) Spectre de transmission d'un levier en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  recouvert d'or durant le balayage du substrat. Image des variations d'intensité dans le spectre de transmission pour une longueur d'onde entre (milieu)  $\lambda = 500$  à  $600$  nm et (droite)  $\lambda = 600$  à  $700$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.4, p. XXII).

Figure 5.9 – Image AFM-SPR des microtriangles (gauche) de Ag et (droite) de  $\text{Ag}_2\text{O}$ . Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.5, p. XXII).

Figure 5.10 – (Gauche) Image AFM et (droite) AFM-SPR en transmission de film microstructuré d'or avec des motifs (haut) triangulaires et (bas) de trous. Les variations d'intensité des images AFM-SPR sont mesurées entre  $\lambda = 640$  et  $720$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.6 et A4.7, p. XXIII - XXIV).

*À ma famille, mon frère Luc et mes  
merveilleux parents Albertine et Jacques*



## Remerciements

D'abord et avant tout j'aimerais remercier le support constant de mes parents qui ont tout fait pour mettre en place un environnement favorisant la réussite de leurs enfants. C'est grâce à des années d'efforts et de sacrifices de leur part qu'aujourd'hui je puisse jouir d'une éducation avancée ainsi que d'une position stratégique pour ma carrière et ma vie. Bien que je ne puisse jamais assez les remercier, je leur dédie ce travail et tous les efforts de ces nombreuses années d'étude.

Au plan académique, j'aimerais remercier Jean-François Masson avec qui j'ai eu l'honneur, et surtout beaucoup de plaisir, à travailler et apprendre. C'est à travers sa grande disponibilité, son enthousiasme et sa méthodologie que j'ai pu m'épanouir scientifiquement. Son support et sa confiance envers ses étudiants en font un professeur unique inspirant la créativité et le travail. J'aimerais aussi remercier spécialement Sandy S. Zhao ma copine et collègue pour son support, sa joie et son énergie. Je souhaiterais de plus souligner le plaisir que j'ai eu de travailler avec Olivier B., Marie-Pierre M. M., Julien B.-T., Maxime C., Mathieu R., Kim-Ly N., Audrey P. G., Debby C. L. et Rita F. ainsi que les nombreux autres personnes avec qui je me suis amusé et parfois j'ai travaillé! Aussi, des remerciements spéciaux aux étudiants étrangers qui ont été de passage au laboratoire, entre autres Mathieu B., Kirsty G. et Andreas H.. Encore une fois, j'aimerais remercier mon ancien superviseur Denis Boudreau pour m'avoir offert l'opportunité de faire de la recherche en chimie analytique/instrumental ainsi que pour son constant support chaque fois que j'en ai besoin. Mille mercis à vous tous et tous ceux que j'oublie.

Je tiens également à remercier mes amis et mon entourage dont le bon Benoit « bon Bény » Voisin pour les conseils en physique optique et implémentation microfluidique, les bonnes discussions et... ses meubles. Un dernier remerciement à l'université de Montréal pour le support financier (bourses FESP et Charron-Lam) et tous les autres organismes subventionnaires (parents).

# Chapitre 1 Introduction

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse portent sur la caractérisation des matériaux plasmoniques microstructurés et leur potentiel d'application en tant que biocapteur optique.

Le domaine de la plasmonique, correspond à l'étude des effets électro-optiques liés au phénomène de la résonance des plasmon de surface (SPR) dans les matériaux tel que proposé au début des années 2000 par Maier *et al.*<sup>1,2</sup> Principalement présent dans les métaux, les plasmons de surface (SP) sont l'oscillation collective des électrons libres à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique.<sup>3,4</sup> L'oscillation devient résonante lorsque l'onde électromagnétique (EM) se couple avec les électrons libres à la surface d'un métal. Les applications découlant de la SPR se basent principalement sur l'énergie du champ électrique générée par le mouvement de ces électrons. Ce dernier possède une composante pénétrant le milieu diélectrique au-dessus de la surface métallique permettant ainsi de sonder son environnement local.<sup>3-6</sup> Par exemple, l'influence de ce champ est notable sur des chromophores en spectroscopie Raman où l'intensité de diffusion des molécules à l'intérieur de ce champ électrique est considérablement amplifiée.<sup>7-11</sup> L'architecture physique des matériaux plasmoniques permet de manipuler le SPR et ses effets optiques, et ce, pour des applications ciblées.<sup>10,12,13</sup> Ces applications touchent des domaines scientifiques variés comme la chimie analytique, la physique et l'optique pour en nommer que quelques-uns. Par conséquent, l'émergence de la plasmonique revêt une importance en recherche, motivant les travaux de nombreux groupes tant dans le milieu académique que dans l'industrie.

Alors que les applications contemporaines du SPR sont nées d'observations scientifiques au cours du dernier siècle, les propriétés optiques des plasmons de surface étaient déjà utilisées au Moyen-Âge, tel qu'en témoignent les couleurs rougeâtre et violette des nanoparticules d'or dans les vitraux de la Cathédrale Notre Dame de Paris.<sup>14</sup> Bien que peu connue scientifiquement avant le 20<sup>e</sup> siècle, les premières observations physiques



rigoureuses du SPR ont été faits par Wood en 1902, lorsqu'il nota un patron « anormal » composé de zones sombres et claires de la lumière polarisée réfléchi sur un miroir avec réseau métallique en surface.<sup>15,16</sup> Des ébauches de théorie entourant le phénomène furent établies par Lord Rayleigh,<sup>17</sup> raffinées par Fano,<sup>18</sup> et complétées par Otto<sup>19</sup> en 1968, au même moment où Kretschmann et Raether<sup>20</sup> rapportèrent les mécanismes d'excitation des plasmons de surface. Ce phénomène demeura essentiellement une curiosité scientifique pour plus d'une décennie, malgré quelques applications pour mesurer les constantes diélectriques de matériaux. Les premières applications du SPR furent rapportées dans la littérature au cours des années 1980, pour mesurer quantitativement l'assemblage de monocouches organiques,<sup>21</sup> ainsi que pour détecter des gaz et des biomolécules<sup>22</sup> à la surface d'un film métallique. Ces expériences, pionnières des applications SPR contemporaines, ont exposé le potentiel de cette technique, dont les applications touchent actuellement un large éventail de domaines.

De toutes les publications portant sur le SPR, près de 90% d'entre elles ont été relatés dans la littérature depuis l'an 2000. L'apparition de nombreux instrument SPR commerciaux au cours la même période n'est surement pas étrangère à cette augmentation de popularité. La contribution annuelle a constamment augmenté pour atteindre une projection annuelle de plus de 2500 publications, prévue pour l'année 2011 (figure 1.1).

Principalement, le SPR est utilisé dans le domaine pharmaceutique pour la détermination de l'activité des médicaments, l'étude de cinétiques biologiques et la détermination de paramètres de bioaffinité.<sup>23,24</sup> L'engouement pour cette technique a facilité la commercialisation d'instruments SPR alliant haute sensibilité, bonne résolution et stabilité.<sup>25</sup> D'autres domaines tels que la sécurité nationale (analyse de molécules pouvant être utilisées à des fins terroristes), l'analyse alimentaire et environnementale, profitent des propriétés analytiques de la SPR.<sup>26,27</sup> Des applications plus fondamentales en recherche et développement utilisent le SPR comme matériel de transduction, tel est le cas en chimie physique pour l'étude de l'organisation de films organiques sur une surface.<sup>28-30</sup> En

physique, des applications plus complexes se basent sur les propriétés électriques et leur manipulation dans les matériaux plasmoniques à l'échelle nanométrique.<sup>31-33</sup> Le SPR touche un large éventail de domaines, ce qui en fait une technologie avec un important potentiel d'applications.

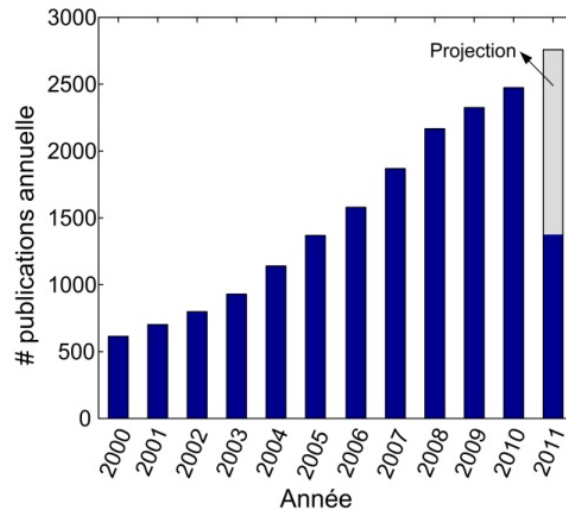


Figure 1.1 – Évolution depuis l’an 2000 du nombre de publications portant sur la SPR. Les données pour la première moitié de 2011 sont en bleu, et la projection pour la seconde moitié est en gris. (Source Internet : Web of Knowledge, mot clé : Surface Plasmon Resonance, juillet 2011).

Sur le plan économique, le domaine de la plasmonique se classe parmi l'ensemble des nanotechnologies. Les nanotechnologies regroupent tous les processus de l'ordre de 1 à 100 nanomètres, et ce, peu importe leur nature (<http://www.nano.gov/>). De ce fait, l'économie des nanotechnologies est subdivisée en plusieurs fractions, dont une partie est attribuée à la plasmonique. Un regard rapide sur l'économie des nanotechnologies démontrent l'intérêt qu'ont les divers pays à développer la science pour en exploiter le potentiel commercialement. Les agences gouvernementales des divers pays industrialisés reconnaissent l'importance des nanotechnologies et, depuis la mise en place du *US National Nanotechnology Initiative* en 2000, l'investissement cumulatif projeté pour 2011 devrait atteindre 65 milliards \$US et augmenter à 100 milliards \$US pour 2014.<sup>34</sup> En plus

de l'investissement économique brut, en tenant compte de facteurs tels que la qualité scientifique des institutions, la capacité d'innovation et la compétitivité globale d'un pays, les États-Unis, la Chine et la Russie sont respectivement les pays avec les plus hauts facteurs d'impact nanotechnologique.<sup>34</sup> Bien que le Canada ne figure pas parmi les principaux pôles des nanotechnologies en terme absolu, il tire quand même avantage des développements de ses centres de recherche et de ceux présents chez le pays voisin. L'importance économique croissante des nanotechnologies, incluant la plasmonique, stimule la recherche et le développement, particulièrement dans le milieu académique.

En somme, la plasmonique est un domaine de recherche en plein essor où les opportunités d'applications sont florissantes. La compréhension des grandes lignes des phénomènes encadrant la plasmonique est dorénavant établie mais, des connaissances plus approfondies sont nécessaires pour accroître le marché des applications SPR. Particulièrement, les travaux de la très grande majorité des centres de recherche ce sont concentrés sur le développement de nanoparticules ou d'application pour les instruments SPR commerciaux.

En contraste avec ces travaux antérieurs, cette thèse étudie la possibilité d'utiliser des matériaux mésoscopiques en plasmonique. Les matériaux mésoscopiques possèdent une taille de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres. Ce domaine de taille intermédiaire entre les nanoparticules et les matériaux plasmoniques des instruments commerciaux demeure très peu étudié. Les bases théoriques de la plasmonique contemporaine sont nécessaires à la compréhension de cette thèse et seront exposées dans ce chapitre. De plus, certains éléments théoriques additionnels sont utiles pour la compréhension des travaux exposés dans cette thèse sur la plasmonique des matériaux à l'échelle microscopique.

## 1.1 Résonance des plasmons de surface

Un survol de la physique entourant le SPR sera initialement présenté, mettant l'accent sur les conditions du couplage de la lumière avec les électrons libres des métaux et la relation de dispersion du SPR. D'autres ouvrages discutent en détails de la physique du SPR à partir des solutions des équations de Maxwell.<sup>25,35-38</sup>

### 1.1.1 Physique du phénomène du SPR

Le SPR est un phénomène complexe souvent décrit de manière simplifiée comme une oscillation des électrons libres à l'interface métal/diélectrique (figure 1.2).<sup>3,4</sup> Le comportement de ces électrons est comparable à ceux à l'intérieur d'un gaz où une polarisation locale est possible, tout en conservant la neutralité de l'ensemble.<sup>39,40</sup> Le mouvement de ces électrons génère un champ électromagnétique (EM) auquel est attribuée une certaine énergie. La composante électrique du champ EM est la principale, car le champ magnétique est négligeable aux fréquences optiques. L'énergie du champ électrique caractérise le polariton des plasmons de surface (*surface plasmon polariton, SPP*) excité, et du même coup, l'aspect physique des matériaux plasmoniques. Le couplage lumière/matière et les propriétés qui en découlent proviennent majoritairement des interactions entre la composante électrique de l'onde EM et les électrons libres du métal. Dans cette section, seule la lumière dont la composante électrique est perpendiculaire au substrat plasmonique, polarisation-P, sera considérée.

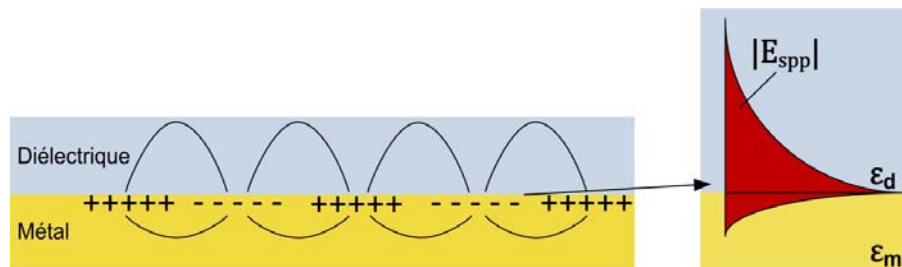


Figure 1.2 – Résonance des plasmons de surface (SPR) : schématisation de la polarisation des charges en surface d'un métal

Les propriétés optiques d'un métal changent selon la fréquence de la radiation incidente à laquelle il est exposé. La constante diélectrique ou permittivité relative ( $\epsilon_m$ ) permet de caractériser ces interactions. Pour les métaux, celle-ci suit le modèle de Drude stipulant que les électrons d'un métal agissent comme ceux d'un gaz.<sup>40</sup>

Équation 1.1 
$$\epsilon_m(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma)}$$

La fréquence angulaire ( $\omega$ ) est convertie en longueur d'onde ( $\lambda$ ) par  $\lambda = \frac{2\pi c}{\omega}$  où  $c$  est la vitesse de la lumière. L'absorption ( $\gamma$ ) provient de la composante imaginaire de la constante diélectrique des métaux, tandis que la fréquence de plasma ( $\omega_p$ ) caractérise les électrons dans le métal suivant l'équation 2 :

Équation 1.2 
$$\omega_p = \sqrt{\frac{e^2 n_e}{\epsilon_0 m_e}}$$

où la masse effective  $m_e$ , la densité  $n_e$  et la charge  $e^2$  des électrons ainsi que la constante de la permittivité dans le vide  $\epsilon_0$  sont prises en compte. Ces paramètres sont propres aux métaux<sup>41</sup> ainsi qu'à leur aspect physique.<sup>42</sup> L'équation 1 peut être simplifiée en considérant  $\omega \gg \gamma$  où l'absorption est négligée et seuls les électrons libres contribuent à la constante diélectrique (équation 1.3).

Équation 1.3 
$$\epsilon_m(\omega) = 1 - \left(\frac{\omega_p}{\omega}\right)^2$$

Ce modèle correspond aux conditions SPR dans la région du visible et du proche infrarouge pour la plupart des métaux nobles.<sup>4</sup> Le couplage entre les électrons libres d'un métal et des photons se produit à des conditions précises anticipées par les équations de Maxwell.<sup>37</sup>

Selon les solutions des équations de Maxwell, lorsqu'un SPP est généré à l'interface métal ( $\epsilon_m$ )/diélectrique ( $\epsilon_d$ ), un champ EM est produit pénétrant à l'intérieur de chaque milieu avec une intensité exponentiellement décroissante (figure 1.2). Pour chaque environnement, le champ EM est quantifié par un vecteur d'onde ( $k$ ), réel et positif, dont la valeur est intimement liée à la constante diélectrique du milieu. Les vecteurs de propagation dans chaque milieu sont égaux, ce qui nécessite que  $\epsilon_m$  soit réel et  $< 0$ .<sup>37</sup> Le lien entre les vecteurs d'onde du champ EM et la constante diélectrique des milieux permet d'établir la relation de dispersion du SPP ( $k_{spp}$ ) :

Équation 1.4 
$$K_{spp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

une relation valide même si  $\epsilon_m$  est complexe.<sup>37</sup> Cette équation démontre que l'excitation du SPP dépend des milieux formant l'interface ( $\epsilon_m$  et  $\epsilon_d$ ) ainsi que de la fréquence angulaire des photons incidents. La fréquence angulaire est liée à la longueur d'onde ( $\lambda$ ) par  $\omega = \frac{2\pi c}{\lambda}$ . Pour un métal dont  $\epsilon_m$  suit l'équation 1.3, la relation de dispersion du SPP est une courbe tendant vers une limite asymptotique correspondant à la fréquence de plasmon ( $\omega_{sp}$ ), soit la limite à laquelle le phénomène est possible pour un  $\epsilon_d$  donné (figure 1.3, ligne pointillée rouge).

Contrairement aux photons dont la dispersion est linéaire ( $K_{ph}$ , équation 1.5b) dans un milieu quelconque (figure 1.3, ligne noire), la courbe de dispersion de  $K_{spp}$  est reliée à sa décroissance exponentielle du champ EM vers l'intérieur du milieu adjacent à la surface de métal. Par conséquent, l'illumination directe de la lumière par le milieu adjacent ( $\epsilon_d$ ) ne peut correspondre au *momentum* de  $K_{spp}$ , donc se coupler avec le métal.

Équation 1.5 a) 
$$K_{ph} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\epsilon}$$

$$b) K_{ph,x} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\epsilon} \cdot \sin\theta_i$$

Le couplage entre les photons et le SP n'est possible que lorsque les *momentums* de chaque vecteur d'onde dans l'axe du film sont égaux. L'équation 1.5b est la projection de  $K_{ph}$  sur l'axe x correspondant au plan du film. Pour augmenter le *momentum* des photons, le couplage s'effectue avec une illumination à un certain angle d'incidence ( $\theta_i$ ) et à l'aide d'un prisme (figure 1.3, insertion) ou par diffraction (discussion détaillée section 1.1.2). Pour  $\lambda$  et  $\theta_i$  fixe, l'augmentation de  $\epsilon$ , par exemple de l'air ( $\epsilon_{air} = 1$ ) vers le BK7 ( $\epsilon_{BK7} = 2.25$ ), augmente le *momentum* de la lumière permettant une correspondance entre  $K_{ph,x-BK7}$  et  $K_{SPP}$  (figure 1.3, croisement entre les lignes verte et rouge). De plus, l'équation 1.5b démontre que pour un  $\epsilon$  fixe où le couplage est possible (i.e. BK7),  $K_{ph,x}$  peut être modulé selon  $\lambda$  ou  $\theta_i$ . En spectroscopie, la relation de dispersion du SPP se caractérise par une forte absorption de la lumière aux conditions de couplage. Ce signal optique est mesuré pour étudier les variations de  $\epsilon_d$ .

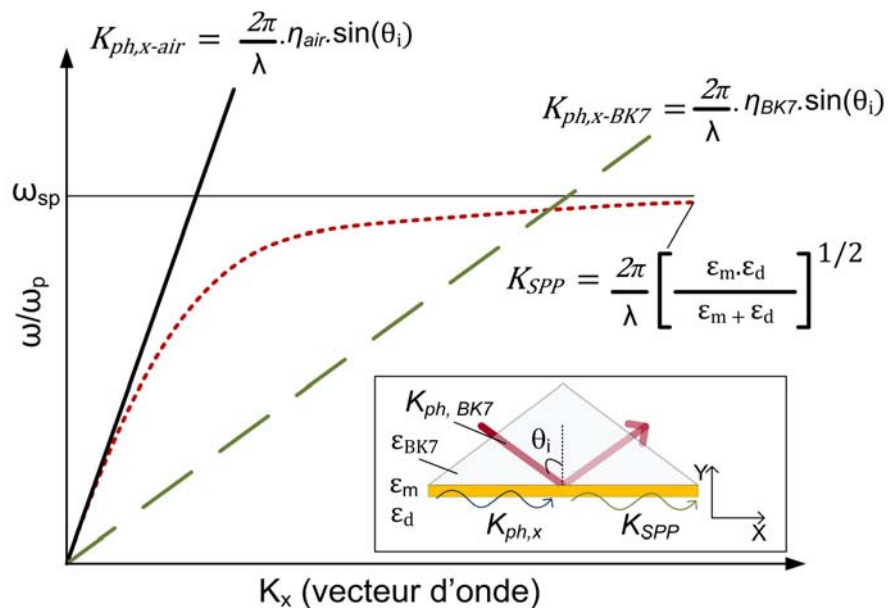


Figure 1.3 – Conditions d'excitation du SPP par la lumière se propageant dans un prisme de BK7. Les vecteurs d'onde pour les photons se propageant dans l'air (ligne noire), dans le BK7 (ligne

hachurée verte) et le SPP (ligne rouge pointillée) sont présentés. (Insertion) Schéma des conditions expérimentales pour exciter le SPP.

Bien que la relation de dispersion soit présentée en considérant majoritairement la pénétration du champ EM généré par le SPP dans le milieu adjacent à la surface métallique, il faut tenir compte aussi sa propagation dans l'axe de l'interface. L'intensité de propagation du SPP décroît en raison de la résistance du métal définie par la partie imaginaire de  $\epsilon_m$ . La distance parcourue par le SPP jusqu'il atteigne une intensité de  $1/e$  correspond à la distance de propagation. L'excitation du SPP est optimale pour les métaux dont la résistance ( $\epsilon_m$  imaginaire) est basse.

En chimie analytique, le SPR est avantageux puisqu'il permet la détection de biomolécules dans leur état natif. Leur seule présence physique à l'intérieur du volume sondé par les effets plasmoniques en surface des matériaux provoque une variation de constante diélectrique (aussi exprimé en indice de réfraction (RI) par  $\eta = \sqrt{\epsilon}$ ) changeant les conditions de résonance. L'étude de ces interactions est possible par le suivi en temps réel des variations optiques causées par les changements de RI. Ces changements perçus en SPR ne se limitent pas à quelques nm de la surface, mais peuvent s'étendre plusieurs centaines de nm dans le milieu adjacent selon le type de matériel plasmonique utilisé. Pour mieux comprendre les liens entre les matériaux plasmoniques et les applications bioanalytiques, il est nécessaire d'approfondir la discussion sur les propriétés plasmoniques de divers types de matériaux.

### 1.1.2 Modes SPR et LSPR

L'exploitation des propriétés plasmoniques pour des applications de détection optique utilise une large gamme de matériaux dont les propriétés optiques sont définies par les caractéristiques physiques (ex. taille, forme, épaisseur, rugosité, composition métallique). La principale considération au niveau de l'aspect physique est la taille du



matériel (ex. nanométrique, micrométrique, macrométrique), car ce paramètre dicte essentiellement le mécanisme d'excitation ainsi que les propriétés optiques des effets plasmoniques. Deux théories englobent les effets plasmoniques : le SPR dit classique ou propagatif (*Propagation Surface Plasmon Resonance, p-SPR*) et le SPR localisé (*Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR*).

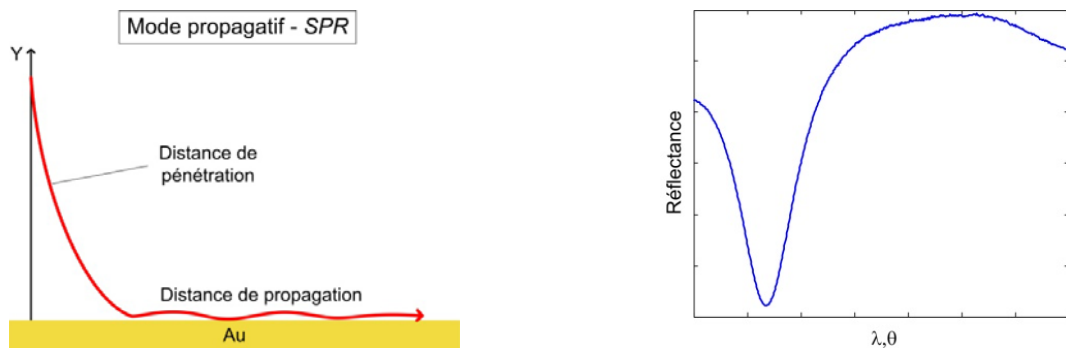


Figure 1.4 – (Gauche) Caractéristiques plasmoniques du mode SPR propagatif et (droite) spectre de réflectance d'un film continu par interrogation spectrale ou angulaire.

Le SPR classique décrit la dispersion du SPP à la surface d'un mince film métallique s'étalant sur une superficie d'au moins quelques dizaines de  $\mu\text{m}^2$ .<sup>43</sup> Le SPP excité génère un champ électrique se propageant à la surface du métal ainsi qu'hors axe vers le milieu diélectrique adjacent (figure 1.4 – gauche). Bien que le SPR soit supporté par plusieurs métaux, Au et Ag sont les plus utilisés, car leurs conditions de résonances se situent dans la région du visible et du proche infrarouge. Pour ces métaux, les distances de pénétration et de propagation sont respectivement 162 nm et 3  $\mu\text{m}$  pour Au excité à  $\lambda = 630$  nm comparativement à 219 nm et 19  $\mu\text{m}$  pour Ag dans les mêmes conditions (tableau 1.1).<sup>4</sup> Ces valeurs augmentent en fonction de la longueur d'onde d'excitation du SPP. La distribution du champ électrique en surface et dans l'environnement adjacent du film délimite le volume sondé. L'Ag possède de meilleures propriétés plasmoniques que Au, car la bande d'absorption est plus fine améliorant ainsi la résolution analytique en spectroscopie SPR; cependant il est moins stable chimiquement puisqu'il s'oxyde en  $\text{Ag}_2\text{O}$

inactif en SPR. Les conditions d'excitations du SPP sont caractérisées par une bande d'absorption dans le spectre de réflectance obtenue par un ratio de la lumière polarisée P sur S (figure 1.4 - droite). Plusieurs mécanismes d'excitation du SPR conventionnel sont possibles, mais seulement deux seront considérés.<sup>4</sup>

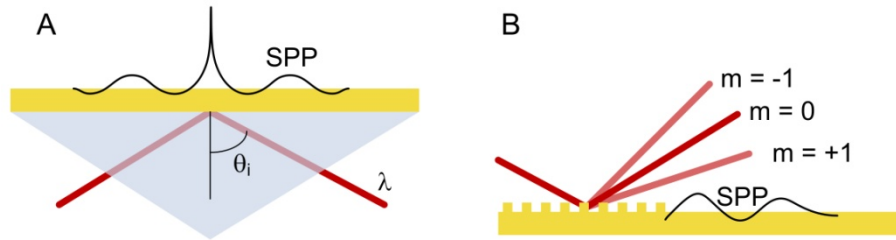


Figure 1.5 – Configuration d'excitation (A) de Kretschmann et (B) par un réseau.

L'excitation du SPP sur un film continu ne peut se faire par une illumination directe, ce qui nécessite l'assistance d'un prisme de verre pour augmenter le *momentum* de la lumière incidente (figure 1.5 - A). L'angle d'incidence du faisceau lumineux doit être plus grand que l'angle critique afin de répondre aux conditions de réflexion totale interne. La configuration la plus répandue fut proposée par Kretschmann, par laquelle l'excitation d'un matériel plasmonique positionné directement sur le prisme s'effectue en réflexion totale interne. L'interrogation de  $K_{spp}$  (équation 1.4) se fait en balayant le spectre de  $K_{ph,x}$  (équation 1.5b) pour un angle d'excitation fixe ( $\theta_i$ ) ou par interrogation angulaire pour une longueur d'onde donnée.

L'excitation directe du SPP est possible seulement à l'aide d'un réseau de diffraction où le *momentum* de lumière diffractée concorde à celui du SPP dans le plan du film (figure 1.5 - B).<sup>44</sup> Généralement, la sensibilité et la résolution du SPR sont meilleures lorsque le couplage se fait à l'aide d'un prisme par interrogation angulaire.<sup>4</sup> Par contre, les comparaisons des sensibilités entre les matériaux plasmoniques se font essentiellement en fonction des longueurs d'onde, car dans certains cas, l'excitation est indépendante à l'angle

incident. Donc, une sensibilité autour de 3000 nm/RIU est notée pour l'interrogation spectrale d'un film de Au avec une résolution entre  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  RIU (*refractive index unit*, *RIU*), soit 1 ordre de grandeur au-dessus de l'interrogation angulaire.<sup>4,45,46</sup> Les propriétés plasmoniques changent considérablement avec une réduction de la taille des métaux vers le nanométrique.

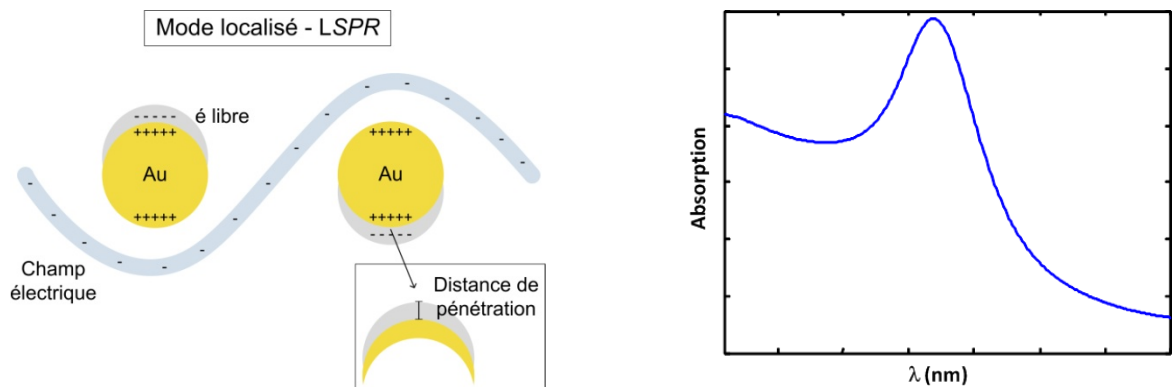


Figure 1.6 – (Gauche) Caractéristiques plasmoniques du mode SPR localisé et (droite) spectre d'absorbance en transmission de nanoparticules en solution.

Contrairement au SPR classique, le SPR localisé (LSPR) caractérise les nanoparticules et tous les échantillons où l'excitation du SPP est confinée à l'intérieur d'un espace nanométrique. L'excitation du LSPR des nanoparticules symétriques est possible à n'importe quel angle d'incidence du faisceau lumineux, car les électrons peuvent osciller suivant son champ électrique (figure 1.6 - gauche). Par contre, il faut noter que dans certaines nanoparticules, la polarisation de la lumière face à l'orientation des nanoparticules permet d'exciter préférentiellement des modes plasmoniques tel est le cas avec les nanobâtonnet.<sup>47,48</sup> Les propriétés optiques du LSPR se démarquent par une bande d'absorption plasmonique dans le spectre de transmission (figure 1.6- droite). En LSPR, l'aspect physique du matériel influence grandement les propriétés plasmoniques ouvrant ainsi une dimension inexistante en SPR classique (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 – Propriétés plasmoniques de nanoparticules de diverses formes et des films continus.

Aspect physique	Distance de pénétration (nm)	Sensibilité (nm/RIU)	Domaine spectral
Disque <sup>49,50</sup>	30	130-180	NIR
Triangle <sup>51, 52</sup>	5-15	191	Vis-NIR
Croissant <sup>53-55</sup>	17-26 (NIR) 217-370 (IR)	242-879	NIR IR
Anneau <sup>56,57</sup>	12	880	NIR
Coquille <sup>58</sup>	---	~500	Vis-NIR
Double-trou <sup>59</sup>	~20	600	Vis-NIR
Trou <sup>60,61</sup>	10-20	400	Vis
Riz <sup>62</sup>	---	801	NIR
Sphere <sup>63</sup>	---	90	Vis
Étoile <sup>64</sup>	---	665	NIR
Bâtonnet <sup>65</sup>	---	~500	NIR
Film continu <sup>4*</sup>	200 nm	3000	Vis-NIR

\* distance de propagation : ~ 10  $\mu$ m

La propagation du SPP dans le matériel n'étant pas un facteur en LSPR, les nanostructures se caractérisent seulement par leur distance de pénétration et leur sensibilité au milieu environnant. Dans le domaine du vis-NIR, la distance de pénétration est de quelques dizaines de nm et la sensibilité maximale est ~ 900 nm/RIU. Le champ électrique généré en LSPR se concentre aux frontières physiques des nanoparticules. En particulier, dans les nanoparticules en formes de riz, triangle et étoile pour lesquelles le champ électrique s'intensifie aux pointes, la sensibilité est meilleure que dans les nanoparticules avec des formes plus régulières comme les sphères et les disques. D'autres nanoparticules en formes d'anneau et de coquille vont avoir plusieurs modes LSPR possibles dont certains très sensibles à l'environnement adjacent. La sensibilité reste proportionnelle au domaine spectral dans lequel le LSPR est excité tel est le cas pour les nanoparticules en forme de

croissant dont les propriétés plasmoniques augmentent significativement dans l'infrarouge (IR). La recherche en chimie colloïdale et en nanofabrication a permis de synthétiser diverses structures plus ou moins exotiques. Le potentiel d'utilisation de ces structures dans les applications analytiques fut démontré, malgré qu'il ne soit pas encore exploité à son plein potentiel. L'architecture des nanoparticules permet d'optimiser les propriétés optiques selon les besoins.

Une autre forme de LSPR est possible à l'intérieur de films métalliques troués dont le diamètre des trous est plus petit que la longueur d'onde d'excitation. Ce phénomène, appelé transmission exaltée (*enhanced optical transmission, EOT*), concentre le champ électrique à l'intérieur des trous et permet la transmission de longueurs d'ondes spécifiques qui dépasse parfois 100% de la lumière transmise prédite par la théorie de Bethe.<sup>66-68</sup> Bien que ce phénomène combine les propriétés SPR et LSPR,<sup>69</sup> la distance de pénétration et la sensibilité concordent avec d'autres nanostructures LSPR.

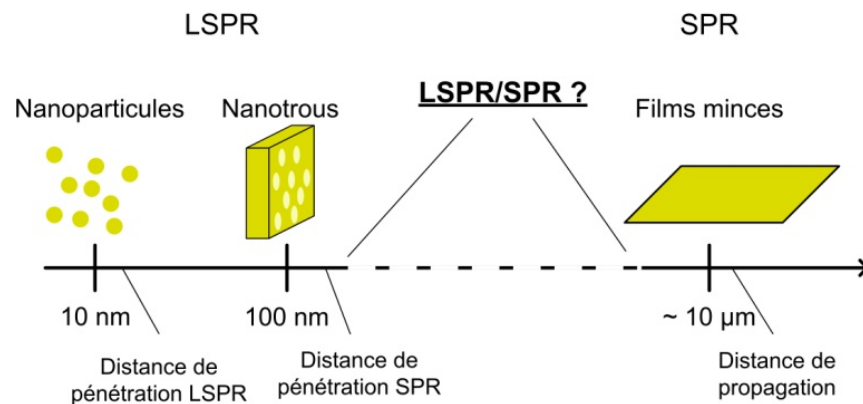


Figure 1.7 – Échelle de taille des matériaux plasmoniques.

Lorsque les phénomènes plasmoniques connus sont placés selon la dimension des matériaux sur lesquels ils se produisent, un domaine peu caractérisé ressort couvrant l'échelle mésoscopique (100 – 1000 nm) jusqu'aux microns (figure 1.7). À ces dimensions intermédiaires entre les matériaux catalogués SPR et LSPR, les méso- et micro-matériaux

sont plus courts que la distance de propagation et du même ordre que la distance de pénétration caractéristique du SPR sur des films macroscopiques. Bien que les théories du SPR et du LSPR soient bien établies et amplement caractérisées, leurs frontières ainsi que la transition d'un mécanisme à l'autre demeure inexplicée. Les films plasmoniques microstructurés possèdent l'aspect physique se trouvant dans cette région intermédiaire et la présence de structures crée des frontières physiques pouvant confiner le champ électrique comme en LSPR. Une plus grande compréhension de la transition entre ces phénomènes ainsi que leurs propriétés plasmoniques dans cette transition peuvent mener vers le développement de nouveaux matériaux. Cette thèse explore en grande partie les propriétés plasmoniques des structures possédant une taille de l'ordre du micromètre.

## 1.2 Considérations pour le design de biocapteurs SPR

Les propriétés optiques des matériaux plasmoniques peuvent être adaptées à des besoins spécifiques selon l'application visée, et ce, en changeant l'aspect physique de ces derniers. Cette section porte sur les propriétés plasmoniques à considérer avec l'intention d'employer ces matériaux pour la biodétection.

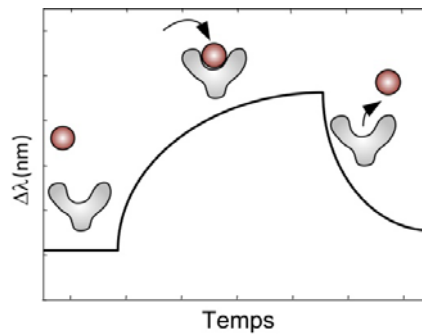


Figure 1.8 – Sensorgramme typique d'une cinétique SPR d'un couple récepteur/cible.

La haute sensibilité de la technique SPR classique est exploitée sous la forme de biocapteur optique permettant la détection d'analytes biologiques. Les propriétés optiques des films métalliques servent à la transduction d'interactions biologiques et chimiques à la

surface du film. Ces interactions font varier l'indice de réfraction (*refractive index, RI*) à l'intérieur du volume sondé par le champ électrique SPR déplaçant ainsi les conditions de résonance. Un suivi en temps réel de ce déplacement permet de dresser une courbe cinétique de la dynamique des interactions entre un récepteur et sa cible à l'interface métal/diélectrique (figure 1.8). De plus, il est possible de quantifier l'analyte étudié puisque le déplacement du signal SPR est proportionnel à la quantité de matériel à la surface du biocapteur.

### 1.2.1 Instrumentation SPR

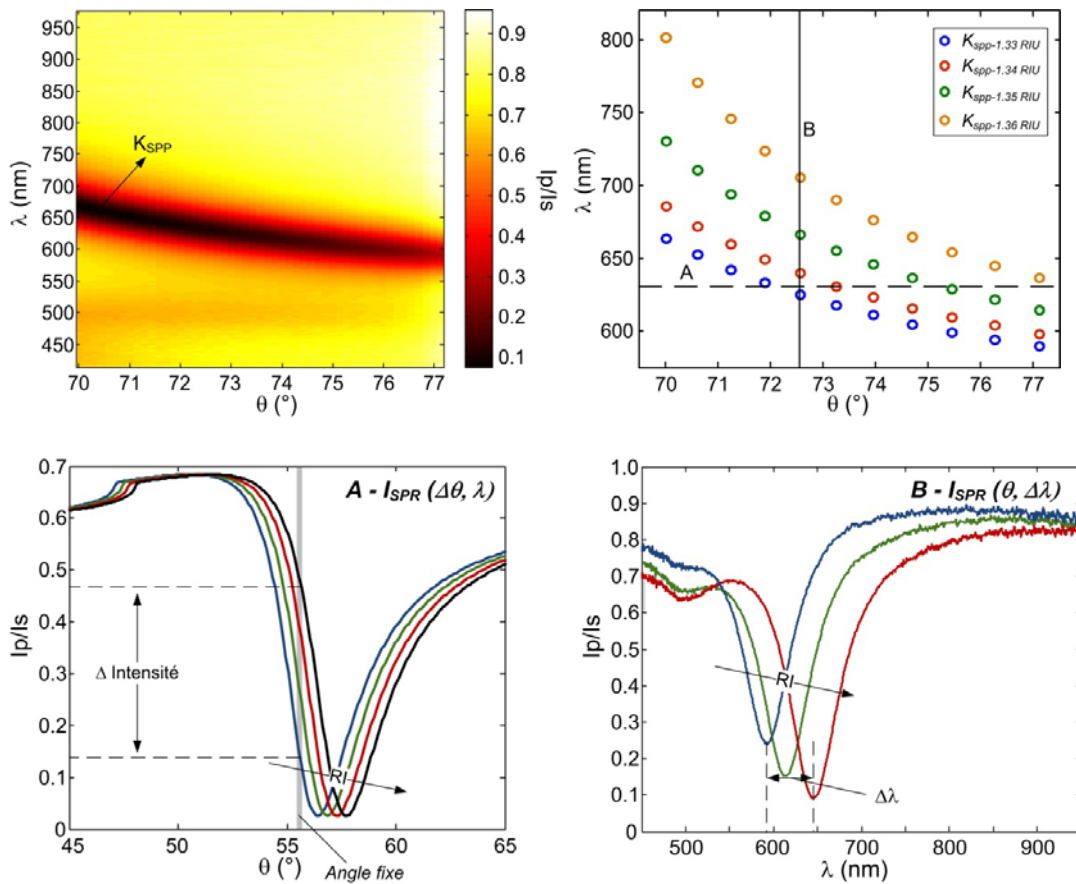


Figure 1.9 – Caractéristiques spectrales du SPP sur lesquelles est basée la spectroscopie SPR. Dispersion du SPP d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur (supérieur gauche) en contact avec l'eau ( $n = 1.33$ ) et (supérieur gauche) diverses solutions d'indice de réfraction croissantes. Signal optique

mesuré afin d'établir une courbe d'étalonnage (inférieur gauche) par interrogations angulaire ou (inférieur droite) spectrale.

L'instrumentation SPR est basée sur la dispersion du SPP (équation 1.4) et les diverses façons de moduler le *momentum* de la lumière (équation 1.5b) afin d'exciter le SPP. Pour un film d'or d'une épaisseur de 50 nm exposé à l'eau ( $\eta = 1.33$ ), la correspondance des *momentums* du SP et des photons varie selon l'angle d'incidence ( $\theta$ ) de la lumière (figure 1.9, supérieur gauche). Une augmentation de l'indice de réfraction (RI) du milieu adjacent déplace la dispersion du SPP vers le proche infrarouge (figure 1.9, supérieur droite). Dans ce cas-ci, l'excitation du SPP s'effectue à l'aide d'un prisme de verre (ex. BK7,  $\eta = 1.5$ ) et  $k_{ph,x}$  est modulé en variant  $\theta$  pour  $\lambda$  fixe (figure 1.9, supérieur droite ligne A) ou l'inverse (figure 1.9, supérieur droite ligne B). Dans la majorité des instruments SPR commerciaux, le SPP est excité par interrogation angulaire ( $\Delta\theta, \lambda$ ) où un faisceau monochromatique est fixé à un angle précis ce qui permet de suivre les variations de RI du milieu par des changements proportionnels d'intensité lumineuse réfléchie (figure 1.9, inférieur gauche).<sup>25</sup> L'alignement optique de ces instruments demeure critique, car pour établir la position de l'angle d'excitation avant une mesure cinétique, il faut préalablement construire le spectre SPR en balayant divers angles. Les caractéristiques SPR changent significativement avec  $\theta$ , or le désalignement à pour conséquence de fausser les conditions de concordance entre les *momentums* en plus d'affecter la précision de mesures cinétiques. La seconde possibilité d'excitation du SPP est par interrogation spectrale à un  $\theta$  fixe, ce qui comprend l'utilisation d'une lumière polychromatique (figure 1.9, inférieur droite). Contrairement aux instruments par interrogation angulaire, les instruments basés sur l'interrogation spectrale présentent une plus grande robustesse puisque les composantes optiques sont immobiles. De plus, la position spectrale de l'excitation du SPP augmente avec RI permettant ainsi des mesures cinétiques lorsque le déplacement en longueur d'onde ( $\lambda$ ) est suivi temporellement. Bien que ce type d'instrumentation soit plus simple et robuste, il offre une moins bonne résolution que pour l'interrogation angulaire. L'utilisation d'une source lumineuse polychromatique élargit le spectre de la bande SPR en raison de



dispersion spectrale dans le prisme diminuant la résolution à  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  RIU, ce qui est environ 1-2 ordre de grandeur supérieur à celle obtenue pour une interrogation angulaire, mais comparable à l'interrogation de l'intensité.<sup>4</sup>

L'implémentation instrumentale des films minces dans un montage de biocapteur SPR est relativement simple et avantageuse. La fabrication des films minces continus est simple, rapide et peu coûteuse, ce qui en fait un produit consommable intéressant du point de vue commerciale. De plus, l'excitation du SPP en réflexion totale interne (RTI) permet l'utilisation du SPR en milieu turbide ou opaque, ce qui n'est pas le cas avec les nanomatériaux en transmission. La spectroscopie SPR se démarque des autres techniques spectroscopiques comme la fluorescence ou l'UV-vis, car l'intensité du signal analytique dépend du phénomène physique et non du volume sondé par la lumière. Le volume sondé en SPR est estimé par la distance de propagation d'une dizaine de  $\mu\text{m}$  et la pénétration d'une centaine de nm de l'onde évanescente dans le milieu adjacent. Lorsqu'un film mince rencontre ces contraintes physiques du SPR, il est utilisable comme surface de détection, et ce, avec les mêmes performances optiques qu'un film nettement plus grand. Cette particularité permet la miniaturisation de l'instrumentation SPR comme par exemple la métallisation d'une pointe de quelques dizaines de microns au bout d'une fibre optique.<sup>70</sup> Au niveau instrumental, le SPR offre une variété de possibilités de configuration permettant ainsi une adaptation pour les applications visées.

Au niveau des paramètres de détection du SPR, la taille de l'analyte et la température du milieu adjacent sont des facteurs altérant ou limitant la technique. La détection d'évènements physico-chimiques à la surface d'un capteur SPR est causée par un changement de RI à l'intérieur du volume sondé. Afin de générer une perturbation détectable en SPR, l'analyte ciblé doit avoir une certaine taille. Par exemple, la biodétection de molécules sous 1 kDa se complexifie, car les variations locales de RI perturbent peu le volume sondé.<sup>25</sup> La limite de détection des films minces est établie à  $1 \text{ pg/mm}^2$  démontrant entre autres l'importance de la taille de l'analyte.<sup>25</sup> De plus, la distance pénétration d'une

centaine de nm sonde l'intérieur du milieu adjacent où l'indice de réfraction varie selon sa température. Tel est le cas de l'eau qui varie de  $\sim 8 \times 10^{-5}$  RIU par Kelvin autour de la température ambiante.<sup>71</sup> Pour corriger ces variations, certains instruments ont des régulateurs de température ou un canal de référence.<sup>25</sup>

Pour un même matériel plasmonique, les performances analytiques peuvent être optimisées par la configuration et le choix des composantes instrumentales du système de détection. Dans une configuration instrumentale optimale pour la biodétection, il est possible de repousser les performances analytiques vers de plus faibles limites en modifiant les propriétés plasmoniques des matériaux, en particulier la sensibilité face à l'indice de réfraction.

### 1.2.2 Sensibilité à l'indice de réfraction

Avec le développement de l'instrumentation SPR, l'utilisation du SPR conventionnel sur film mince a rapidement atteint ses limites. Il y a un besoin de développer de nouveaux matériaux plasmoniques pour améliorer les performances analytiques des biocapteurs SPR. Une avenue plausible afin d'augmenter la sensibilité des matériaux plasmoniques est d'étudier leurs caractéristiques selon divers aspects physiques. Le phénomène LSPR présente une plus grande sensibilité que le SPR aux variations de RI localisées à quelques dizaines de nm de la surface métallique. Cet avantage du LSPR combiné aux propriétés des films planaires excités en réflexion totale interne est rapporté dans la littérature pour des matériaux présentant des dimensions macro- et nanoscopiques.

Selon Piliarik *et al.*, la résolution limite du SPR est presque atteinte et l'amélioration de celle-ci passe par le développement de détecteurs et l'optimisation des propriétés plasmoniques des matériaux.<sup>72</sup> Une des plus importante augmentation de sensibilité face au RI rapporté, soit environ 5 fois celle du SPR conventionnel, est par le SPR longue distance (*long-range SPR, LR-SPR*) où une fine couche isolante (ex. du Teflon) se trouve entre le

prisme de verre et le film métallique.<sup>73</sup> Bien que la résolution soit de l'ordre de  $10^{-8}$  RIU, elle s'accompagne d'une très longue distance de pénétration, beaucoup plus grande qu'en SPR conventionnel, adaptée pour la détection de systèmes biologiques comme des bactéries.<sup>74</sup> Or, pour améliorer le SPR conventionnel, d'autres avenues doivent être étudiées afin de réduire la distance de pénétration et augmenter la sensibilité en surface tout en conservant le même ordre de résolution.

L'architecture de matériaux plasmoniques est employée comme stratégie pour améliorer la sensibilité des films métalliques minces par l'insertion de nanostructures. La périodicité, la forme et l'épaisseur du film sont quelques aspects physiques permettant de moduler les propriétés plasmoniques. Les propriétés optiques des films nanostructurés sont toujours comparées au SPR conventionnel. Des nanobâtonnets métalliques condensés verticalement sur un film continu métallique formant un tapis, démontrent des propriétés LSPR et SPR avec une sensibilité du milieu adjacent d'environ 30 000 nm/RIU.<sup>75</sup> De plus, ce matériel présente une capacité de détection de petites molécules (244 Da) lorsqu'il est employé comme biocapteur.<sup>75</sup> Bien que ce type de matériel plasmonique démontre une augmentation significative de la sensibilité par la présence du SPR et du LSPR ainsi que le potentiel d'exploitation en biodétection d'un tel matériel, il reste difficile de contrôler l'arrangement des nanostructures sur le film pour en faire un substrat reproductible. Un arrangement similaire, mais avec des nanopoteaux (*nanoposts*) ordonnés périodiquement, démontrent une augmentation de la sensibilité jusqu'à 5 fois supérieur par rapport au SPR conventionnel.<sup>76</sup> Cette amplification, démontrée par la détection de l'ADN, est attribuée à une plus grande surface d'attachement et au couplage entre les plasmons de surface propagatifs et localisés sur le matériel.<sup>76</sup> L'intégration d'un réseau métallique unidimensionnel sur un film continu crée une transition interdite (*bandgap*), où numériquement, la sensibilité du milieu adjacent est amplifiée jusqu'à 6 fois près de cette transition.<sup>77</sup> Ces matériaux démontrent expérimentalement une amplification plus modeste autour de 2,5 fois la sensibilité en surface du SPR conventionnel.<sup>78</sup> Cependant, cet écart entre la théorie et la pratique pourrait être réduit si un réseau avec un pas plus court serait

employé.<sup>78</sup> Tout comme l'ordre de diffraction 0, les ordres de diffraction des réseaux plasmoniques sont sensibles à RI et ils peuvent être utilisés en SPR.<sup>79,80</sup> Le développement de matériaux hybrides SPR-LSPR améliorant les biocapteurs est possible par l'adaptation de l'aspect physique des matériaux. Les structures périodiques présentent un grand potentiel tant pour la reproductibilité des matériaux que les effets optiques.

Les approches proposées dans la littérature pour obtenir un matériel combinant le SPR et le LSPR se basent essentiellement sur la combinaison architecturale de paramètres physiques nanoscopiques et macroscopiques. Cependant, la présence de propriétés plasmoniques mixtes est envisageable avec les matériaux méso et microscopiques qui sont de dimensions intermédiaires. Les travaux présentés dans la littérature fournissent une preuve du potentiel d'amélioration des plateformes de détection SPR par des matériaux plasmoniques SPR et LSPR. L'exploration des méso- et micro-matériaux SPR représente un parcours de recherche différent jusqu'ici peu caractérisé pour développer de nouvelles plateformes de détection.

### **1.3 Imagerie Raman**

La haute sensibilité et la bande d'absorption similaire au SPR conventionnel avec les films plats font des matériaux mésoscopiques, en particulier les microtrous, des candidats potentiels pour substituer les films plats et améliorer le SPR dans les systèmes instrumentaux déjà en place. Afin d'en faire une utilisation optimale, une compréhension plus fondamentale des effets plasmoniques est nécessaire. Bien que les matériaux mésoscopiques présentent un comportement hybride en spectroscopie SPR, cette technique de caractérisation ne fournit pas d'information spatiale. L'imagerie Raman est employée comme caractérisation complémentaire pour imager le champ électrique dans les matériaux mésoscopiques et mieux comprendre le mécanisme d'amplification de la sensibilité.

La diffusion Raman exaltée (*Surface-enhanced Raman Scattering, SERS*) est un outil analytique puissant, exploitant les propriétés optiques des molécules immobilisées sur un substrat plasmonique. Le signal Raman de ces molécules est amplifié par l'excitation du LSPR.<sup>81,82</sup> Par rapport au signal Raman non exalté, des facteurs d'amplification allant jusqu'à  $10^{12}$  sont rapportés dans la littérature, expliqué en majeure partie par la contribution de l'amplification du champ électrique par l'excitation du LSPR.<sup>83,84</sup> Les variations d'intensité du champ électrique dans les matériaux plasmoniques créent un contraste d'intensité lumineuse des molécules en surface permettant de caractériser les endroits où le champ est concentré.<sup>85,86</sup>

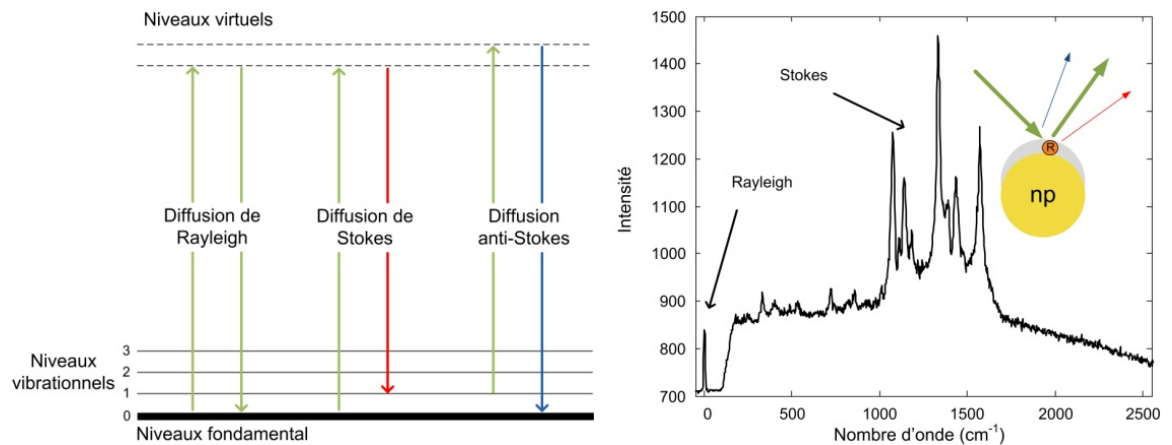


Figure 1.10 – Explications générales de la spectroscopie Raman. (Gauche) Diagramme des niveaux d'énergie accessibles lors de la diffusion de la lumière par une molécule. (Droite) Spectre Raman typique d'un rapporteur Raman (R) sur un matériel plasmonique ici représenté par une nanoparticule d'or (np).

Le SERS provient de la diffusion inélastique de la lumière (figure 1.10 - gauche), à la base de l'effet Raman. Habituellement, la diffusion de la lumière se fait élastiquement (diffusion de Rayleigh), lors duquel la lumière diffusée possède la même énergie que la lumière incidente. À l'occasion, la lumière diffusée est moins énergétique (Stokes) ou plus énergétique (anti-Stokes) que la lumière incidente. Cette variation d'énergie correspond à l'énergie des niveaux vibrationnels. La diffusion anti-Stokes est la moins favorisée

puisqu'elle repose sur l'excitation de niveaux vibrationnels d'une molécule se trouvant déjà à un niveau d'énergie plus élevé, proportionnellement moins favorable selon la distribution de Boltzmann. Le déplacement Raman est référencé par rapport à l'énergie d'excitation, ce qui permet de mesurer l'énergie vibrationnelle pour chaque bande spectrale. Certaines transitions virtuelles sont favorisées générant un spectre avec de fines bandes caractéristiques aux propriétés vibrationnelles de molécules. En SERS, l'intensité de ces bandes sont significativement plus intense que le bruit, permettant ainsi l'identification chimique du composé à l'intérieur du champ LSPR d'une nanoparticule (np) (figure 1.10 - droite).

Comparativement à la spectroscopie infrarouge, l'aspect des bandes se ressemble puisqu'elles sont toutes deux associées aux niveaux d'énergie vibrationnels. Par contre, en spectroscopie Raman, il n'y a qu'une diffusion de la lumière. L'excitation en Raman et de la fluorescence sont en compétition et sont mesurées identiquement, ce qui crée de l'interférence spectrale entre ces deux techniques. Cependant, la fluorescence est grandement inhibée par les surfaces métalliques, minimisant les phénomènes d'interférence. En effet, à proximité d'un métal (distance < 5 nm), la relaxation non-radiative des photons absorbés en fluorescence est favorisée par un transfert d'énergie au métal<sup>87</sup> tandis que la diffusion Raman, un processus radiatif, est exaltée s'il y a résonance avec le métal ce qui accentue le contraste des régions de fortes amplifications. Ainsi, la réponse du signal Raman en SERS dépend grandement des propriétés optiques du matériel, ce qui en fait une excellente technique pour les caractériser.

En LSPR, l'intensité du champ électrique croît lorsqu'il est confiné physiquement (ex. aux frontières physique, aux pointes) ou par couplage plasmonique, recouvrement des champs électriques de matériaux LSPR distincts,<sup>88</sup> ce qui crée des régions hautement énergétiques. Les points chauds (*hot spots*), ou régions de haute intensité, sont des régions de fort champ électrique où le signal SERS des molécules est considérablement amplifié. L'exaltation du signal Raman est optimale lorsque la bande plasmonique de la surface

amplificatrice est près de la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, le faisceau incident excite le LSPR et sonde simultanément les molécules à la surface.

La microscopie Raman permet d'imager les points chauds et d'en mesurer l'intensité pour comparer les divers matériaux plasmoniques.<sup>85,89,90</sup> Ce sont entre autres ces capacités de la technique SERS qui sont exploités dans les travaux de cette thèse pour étudier les matériaux plasmoniques mésoscopiques.

## 1.4 Implémentation du SPR à la microscopie à force atomique

Jusqu'à présent, l'étude des matériaux mésoscopiques fabriqués sur des substrats solides a démontré qu'ils possèdent une nature plasmonique. Les dimensions de ces matériaux offrent la possibilité de miniaturiser d'avantage l'instrumentation autour de la taille du micron. Cette échelle correspond aux leviers AFM où la pointe est de forme pyramidale. En métallisant la pointe AFM, l'aspect physique du matériel est comparable à celui des patrons triangulaires des films structurés. Ces leviers sont déjà employés pour jumeler les mesures physiques et optiques de divers matériaux en microscopie à champ proche (*Scanning Near field Optical Microscopy, SNOM*). Par contre, le couplage de la spectroscopie SPR en simultanée avec des mesures physique en microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy, AFM*) ne figure pas dans la littérature scientifique. Tout comme en SPR conventionnel avec un prisme, la pointe AFM pourrait jouer le rôle de prisme microscopique dans l'excitation du SPR sur le revêtement métallique en contact avec un milieu diélectrique adjacent. Ainsi, la pointe AFM devient un micro-biocapteur pouvant sonder l'environnement chimique d'un milieu quelconque avec une résolution spatiale.

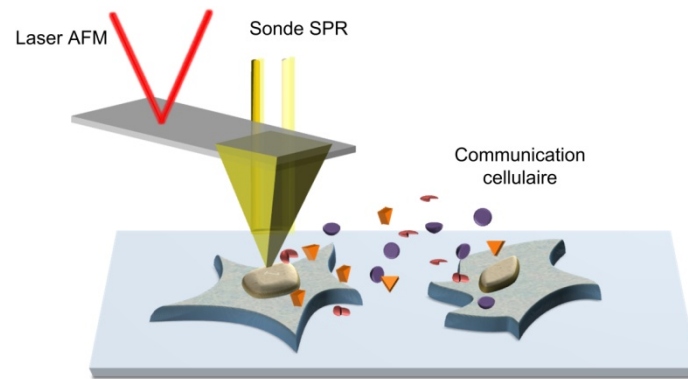


Figure 1.11 – Intégration et application de la SPR avec l’AFM.

Les biocapteurs SPR macroscopiques sont généralement employés pour la détection protéomique. La miniaturisation du SPR sur les pointes permettrait de créer un micro-détecteur protéomique adapté pour étudier la communication cellulaire (figure 1.11). La communication cellulaire joue un rôle important dans la croissance, la migration, la différenciation et l’organisation des cellules.<sup>91</sup> Les protéines font partie des éléments clés à la compréhension de ce phénomène. Pour étudier la communication cellulaire, la transposition du SPR sur les leviers permettrait la détection des protéines, et ce, avec une résolution spatiale rendant possible la cartographie chimique de l’environnement. De plus, puisque les canaux d’interrogation spectrale du SPR et de l’AFM sont à deux endroits distincts sur le levier (figure 1.11), la cartographie physique peut être enregistrée en simultanée. Pour comprendre comment le SPR peut être intégré à l’AFM, un survol du principe de base de l’AFM sera fait.

#### 1.4.1 Principes de base de la microscopie à force atomique

Les cantilevers (ou levier) font le pont entre le monde nanoscopique et les observations macroscopiques tant à l’aide de leurs caractéristiques physiques que de leur adaptabilité aux applications biologiques. Ils sont composés d’un pont sous lequel se trouve une fine pointe d’une hauteur de quelques microns et dont le rayon peut être inférieur à une dizaine de nanomètres (figure 1.12).<sup>92</sup> En général, les pointes sont de formes triangulaires



ou pyramidales et elles sont en silicium (Si) ou nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), des matériaux qui transmettent une certaine partie de la lumière dans le visible-NIR. Pour être manipulés en AFM, les cantilevers doivent être revêtus d'une couche métallique, habituellement composée d'or.

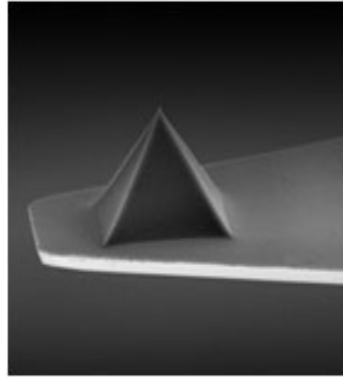


Figure 1.12 – Image en microscopie électronique d'un levier du côté de la pointe. (<http://www.nanoworld.com/uploads/gallery/Pyrex-Nitride-oxide-sharpened-pyramidal-tip-20101202021221.jpg>, consulté en août 2011).

En AFM, la surface étudiée est balayée par la pointe nanoscopique du levier et les fins mouvements du levier sont suivis par un laser dont l'angle de réflexion change selon l'orientation de ce dernier (figure 1.13). Les différences de réflexion sont perçues par une photodiode à quadrants, dont le mouvement du faisceau laser crée des variations d'intensité sur chaque quadrant. Une calibration préalable de ces variations d'intensité permet la conversion du signal électrique en coordonnées spatiales. Ainsi, la géométrie tridimensionnelle de la surface est cartographiée. Le couplage entre la caractérisation spatiale et optique est possible, car le laser sonde de l'AFM est réfléchi sur le levier laissant la pointe libre pour effectuer des mesures spectroscopiques.

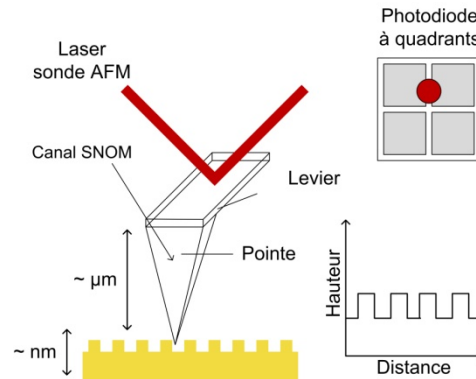


Figure 1.13 – Principe de base de la microscopie à force atomique.

### 1.4.2 Intégration de capteurs plasmoniques aux leviers AFM

Tel que les chapitres 3 et 4 le démontreront, les matériaux actifs en SPR peuvent être miniaturisés à l'échelle du micromètre, soit la distance nécessaire pour supporter la propagation du SPP.<sup>4</sup> Dans la littérature, plusieurs exemples existent sur l'intégration du SPR planaire à des fibres optiques pour créer des sondes SPR.<sup>93</sup> Afin de pouvoir intégrer ce phénomène aux cantilevers, il faut plutôt s'orienter vers un capteur SPR d'une forme conique ou pyramidale. Un capteur SPR conique avec une résolution spatiale de l'ordre du mm et une précision sur le déplacement de l'indice de réfraction de  $2 \times 10^{-4}$  RIU a été démontré avec comme application l'étude de micro-organismes marins.<sup>94</sup> Des travaux, expérimentaux et théoriques, supportent également la possibilité d'observer le phénomène SPR sur une pointe excitée en réflexion totale interne et de mesurer des variations de RI du milieu environnant.<sup>70,95</sup> Les propriétés physiques de la pointe en cône dictent les propriétés SPR de cette dernière.<sup>96,97</sup> Bien que ceci prouve le potentiel d'intégration du SPR sur une pointe, celle-ci doit avoir une dimension près du micromètre afin d'avoir une résolution spatiale comparable aux systèmes biologiques, tout en étant capable d'interroger des phénomènes nanoscopiques.<sup>98</sup>

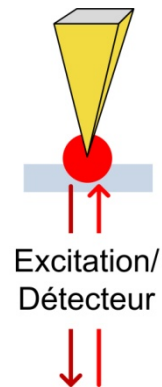


Figure 1.14 – SNOM par amplification locale du signal.

Les pointes métallisées sont présentement employées en microscopie en champ proche (*Scanning Near-field Optical Microscopy, SNOM*) pour étudier des effets spectroscopiques localisés en surface.<sup>99-102</sup> La résolution optique d'au moins 15 nm de cette méthode optique est basée sur la concentration du champ électrique à la pointe du cantilever.<sup>103</sup> L'excitation et la collection se font sous la pointe, où un intense champ électrique évanescent est généré à la pointe sonde, diffusant vers son environnement local, et exaltant les effets optiques des molécules à l'intérieur du champ (figure 1.14).<sup>104</sup> Cette méthode d'exaltation du signal est exploitée entre autres en imagerie Raman et en fluorescence.<sup>104-108</sup> L'interrogation d'effets plasmoniques plus directe est aussi possible en SNOM sans ouverture, et ce, en utilisant une nanoparticule isolée sur une pointe comme sonde.<sup>109</sup> Comme le démontre ces exemples, les cantilevers supportent les effets plasmoniques. Un tel champ électrique généré en SPR pourrait servir à sonder l'environnement local, et ce, avec une résolution nettement sous la limite de diffraction.

### 1.4.3 Modification chimique des leviers AFM

La fonctionnalisation des cantilevers avec une chimie de surface adéquate permettrait de développer un nanobiocapteur. La chimie de surface basée sur l'or<sup>30</sup> est déjà bien établie et les cantilevers servent déjà de sonde chimique non-invasive en spectroscopie de force pour étudier des systèmes biologiques.<sup>110</sup> Par exemple, les interactions entre des

molécules immobilisées sur la pointe et en surface d'un substrat solide peuvent être suivies en spectroscopie de force pour générer une image cartographiant l'arrangement chimique en surface.<sup>111,112</sup> Cette méthode est applicable aux cellules biologiques.<sup>113</sup> Le potentiel de construction d'un biocapteur sur les pointes des cantilevers est déjà établi, mais le SPR ajoute une dimension dynamique et quantitative aux méthodes actuelles.

En comparaison avec la spectroscopie de force, un micro-biocapteur SPR permettrait de mesurer des événements cinétiques localisés. En spectroscopie de force, les éléments détectés sont immobilisés à la surface, ce qui limite la technique à une caractérisation statique. Dans le cas de la communication cellulaire, plusieurs problèmes s'imposent, dont la bio-reconnaissance en milieu aqueux et un suivi de la dynamique de ces éléments dans un certain environnement. L'idée de l'implémentation du SPR à l'AFM s'adresse à ces problèmes encore peu caractérisés.

Les travaux présentés dans cette thèse sur le projet AFM-SPR sont préliminaires. L'objectif est essentiellement de déterminer la faisabilité d'imager optiquement des matériaux plasmoniques à l'aide d'un levier AFM métallisé. De plus, les expériences sont effectuées pour établir si les leviers AFM modifiés présentent un signal optique de nature plasmonique. L'application de l'AFM-SPR à la communication cellulaire reste l'objectif à long terme.

## **1.5 Directions et perspectives de la thèse**

Cette thèse étoffe la compréhension des propriétés plasmoniques de méso- et micro-matériaux et prouve leur potentiel d'application comme plateforme de détection optique. L'approche proposée repose sur l'étude des propriétés plasmoniques des matériaux mésoscopiques à l'aide de films structurés de motifs triangulaires et circulaires. Des matériaux similaires à l'échelle nanoscopique ( $\ll \lambda$ ) ont été caractérisés dans la littérature,<sup>114,60</sup> cependant leurs propriétés optiques changent significativement à l'échelle

méso- et microscopique ( $\geq \lambda$ ). Une fois les propriétés physico-optiques SPR cartographiées, l'emphase de la thèse est orientée vers la caractérisation des paramètres analytiques de ces matériaux pour en faire des plateformes de détection. Plus particulièrement, la sensibilité aux variations locales de RI, la résolution et la signature spectrale sont considérés. Ces critères permettent de concentrer la recherche sur un nombre restreint de matériaux plasmoniques. Ensuite, la possibilité d'employer ces matériaux optimisés pour la biodétection est démontrée à l'aide des interactions biologiques de l'immunoglobuline G (IgG). La cartographie des propriétés physico-optique des méso- et micro-matériaux est présentée aux chapitres 2 et 3. Ces sections introduisent des observations expérimentales prouvant la nature plasmonique distincte de ces matériaux. De plus, le chapitre 3 oriente la caractérisation vers l'application comme biocapteur et prouve que les micro-matériaux peuvent servir de plateforme de détection alternative aux films continus. Ces deux chapitres fournissent plusieurs preuves empiriques du caractère distinct des méso-et micro-matériaux sans toutefois fournir d'information sur les mécanismes plasmoniques.

Une compréhension plus théorique des interactions plasmoniques dans les matériaux microscopiques ainsi qu'une caractérisation optique plus exhaustive est présentée au chapitre 4. D'autres techniques analytiques complètent les études SPR telles que l'imagerie Raman de surface exaltée (*surface-enhanced Raman scattering, SERS*) et les simulations en *rigorous coupled wave analysis (RCWA)* pour identifier clairement la présence de plasmons de surface localisés et propagatifs sur les micro-matériaux. Le chapitre 4 rassemble les observations empiriques des chapitres précédents et présente de façon plus globale les propriétés micro-plasmonique à l'aide des microtrous comme model.

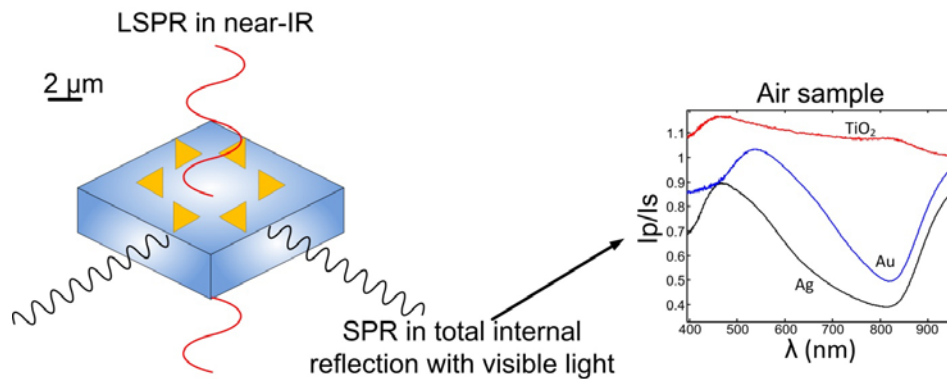
Dans un ordre d'idée un peu différent, la caractérisation de méso- et micro-matériaux plasmoniques expose la possibilité de développer de nouveaux instruments à ces dimensions. Le chapitre 5 propose l'intégration de la spectroscopie SPR à la microscopie à force atomique (*atomic force microscopy, AFM*) par le biais des pointes AFM microscopique. Les films minces avec des patrons microtriangulaires (chapitre 2) ont des

dimensions comparables aux pointes AFM et ils présentent une nature plasmonique. Le chapitre 5 démontre quelques étapes de caractérisation optique d'un système AFM commercial modifié pour y intégrer le SPR. Le but de ce chapitre est d'obtenir de l'information préliminaire pour orienter la recherche dans ce projet à moyen et long terme.

Veillez noter que chaque chapitre contient sa propre partie expérimentale.

## Chapitre 2 High sensitivity of plasmonic structures near the transition from short range to propagating surface plasmon

Ce chapitre présente les premières observations empiriques concernant des matériaux plasmoniques méso et microscopiques étudiés en réflexion totale interne (configuration de Kretschmann). Dans ces travaux, sont introduits la méthode de fabrication des films microstructurés, les caractéristiques spectrales du SPR des films avec des motifs discontinus (triangles) et continus (trous) et la sensibilité face aux variations de RI pour chaque matériel, Une étude plus approfondie de ces matériaux est présentée au chapitre 3.



Live, L. S.; Masson, J. F. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 10052.

### Abstract

The optical properties of Au triangles with 700, 950 nm and  $1.8\ \mu\text{m}$  edge length and of microhole arrays with a  $3\ \mu\text{m}$ -periodicity show a strong absorption peak highly sensitive to refractive index with excitation in the Kretschmann configuration of surface plasmon resonance (SPR). This absorption peak is due to a SPR phenomenon only present with

microstructures of micrometer length, as demonstrated with SPR active materials, Au and Ag; but absent in SPR inactive materials,  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  and Ag triangles covered with a thin film of silver oxide. The Au triangle arrays were exhibiting: 1) two transmission minima at  $\lambda = 525$  and  $800$  nm with low refractive index sensitivity and 2) a transmission maximum near  $\lambda = 600$  nm exhibiting a high sensitivity to bulk refractive index for the triangles with an edge length of  $950$  nm ( $1993$  nm/RI) and  $1.8$   $\mu\text{m}$  ( $1038$  nm/RI). This is a significant improvement of the sensitivity compared to nanoparticles and is near the sensitivity of SPR on a continuous film. The transmission minima at  $\lambda = 800$  nm was also present in microhole arrays in a Au film, but of reduced intensity as the size of the hole decreases. Moreover, the microhole arrays with smaller holes also presented a strong transmission minimum around  $\lambda = 600$  nm, with a similar wavelength, bandwidth and sensitivity as SPR on a continuous gold film. Lastly, the response measured for the formation of a monolayer on the triangle arrays results in a large shift of the SPR response of  $13 \pm 3$  nm, which correlates to a short penetration depth of  $24$  nm. Triangle arrays investigated in the present configuration could significantly improve SPR biosensing by increasing the measured response from a binding event and could decrease the temperature drift due to lower bulk refractive index sensitivity.

## 2.1 Introduction

Research on biosensors is currently focusing on the development of micron size monitoring tools with spatial resolution on the order of the micron and sub-micron for measurements of biological processes at single-cell level,<sup>111,115</sup> electrochemical imaging of biological membranes,<sup>116</sup> and for the development of simple and small detectors in microanalysis.<sup>117</sup> In most cases, the sensors at these length scales are based on optical techniques, such as fluorescence spectroscopy,<sup>118</sup> on electrochemical techniques using ultramicroelectrodes (UMEs)<sup>119</sup> or using mass sensors such as microcantilevers.<sup>120,121</sup> Although these techniques are extremely powerful, there is still the need to develop



microbiosensors especially for proteins analysis involved in extracellular communication. Label-free analysis of proteins with microbiosensors could improve the scope of microfluidic based detection and the analysis of proteins located in the near-cell environment among others.

A powerful technique for the label-free detection of proteins reside on the use of surface plasmon resonance (SPR) biosensors.<sup>4</sup> Proteins binding to an immobilized receptor on the SPR sensor results in small, albeit detectable change of refractive index due to the high sensitivity and resolution of SPR to refractive index. Proteins have a relatively large refractive index and are large molecules such that low detection limit in the nM or pM range can be achieved, without labeling the protein.<sup>122</sup> However, SPR microbiosensors have yet to be developed and the optical properties of SPR-active metals, such as gold or silver, are not well characterized at the micrometer scale. Thus, it is necessary to study the optical properties of metallic films with a length scale on the order of the micron, to evaluate their potential as SPR microbiosensors or for other plasmonic applications.

At both ends of the size spectrum, SPR biosensors based on nanoparticles<sup>5</sup> and on continuous thin metallic film of macroscopic sizes<sup>4</sup> have been extensively studied. Firstly, the optical properties of nanoparticles are especially interesting for localized surface plasmon resonance (LSPR), measured with transmission or extinction spectroscopy, and for the scattering properties resulting in surface enhanced Raman spectroscopy (SERS).<sup>123</sup> The collective oscillation of the free electrons in nanoparticles can be directly excited using visible light for small metallic nanoparticles, such as gold or silver. This absorption of light by the metallic nanoparticles gives rise to their strong characteristic coloration. The wavelength of the absorbed light by the nanoparticles shifts to higher energies with larger nanoparticles of a given geometry. Thus, LSPR in larger nanoparticles of near micron size may be excited using infrared light with triangles,<sup>124,125</sup> rings,<sup>57</sup> in nanocrescents<sup>54</sup> or in nanoshells.<sup>126</sup> The resonant wavelength of LSPR for nanoparticles is sensitive to refractive

index of the solution near the nanoparticle, which has been exploited as a biosensing transducer.<sup>52</sup> The penetration depth of the field is relatively short for LSPR, on the order of 20 nm.<sup>127</sup> This short penetration depth results in large changes of the resonant wavelength for binding events occurring at the nanoparticle surface,<sup>127</sup> even if the refractive index sensitivity of LSPR is lower than for the Kretschmann configuration SPR. This sensitivity to refractive index of LSPR is typically on the order of 150 nm/RI for triangles,<sup>127</sup> up to 350 nm/RI in gold nanoshells<sup>128</sup> and up to 600 nm/RI for nanohole arrays.<sup>59</sup> These optical properties are characteristic of LSPR.

On the other end of the size regime of SPR, continuous metallic films of 40 – 60 nm thickness exhibit a strong absorption of light undergoing total internal reflection. This SPR effect has been well characterized for gold films and is now the commonly used for the study biomolecular interactions,<sup>129,130</sup> protein quantification<sup>131,132</sup> and DNA interactions.<sup>133</sup> The wavelength or angle at which light is absorbed also depends strongly on the refractive index within approx. 100 – 500 nm of the surface.<sup>3</sup> Although the penetration depth is much larger than for LSPR, the sensitivity of SPR is much greater at nearly 2000 nm/RI (RI range of 1.33 – 1.36), using broadband light at an angle of incidence of 72.8°. <sup>134</sup> The SPR band is relatively sharp such that the resolution achieved with wavelength interrogation systems can be as low as 10<sup>-7</sup> RIU range.<sup>4</sup> The spatial resolution of the SPR effect is mainly limited by the propagation length of the SP, which is typically on the order of a few tens of microns.<sup>44</sup> Thus, SPR imaging usually provide spatial resolution on the order of 200 μm with a prism based SPR instrument and could be decreased to a few micrometers using a microscope objective based SPR instrument.<sup>135</sup> The excellent optical properties of SPR have been greatly exploited with a wide availability of commercial SPR instruments and the number of publications in the field highlights the importance of this technique in the modern analytical tools.

However, exploitation of thin film SPR has nearly reached theoretical limits. The sensitivity of SPR instruments is identical to theoretical simulations, while the resolution is within the  $10^{-7}$  RIU range. Improvement to the resolution of current SPR instruments can be achieved with engineering, but it is unlikely that resolution will decrease by another order of magnitude. Among the possibilities, further improvements could be achieved with novel plasmonic materials improving the optical properties of SPR. In particular, the optical properties of metallic particles with a size domain intermediate to the nanoparticles regime and continuous thin film have not been studied in great details. Thus, it is unknown if the optical properties of plasmonic materials of near micron size are characteristic of LSPR, SPR, a combination of both, or other optical properties uncharacteristic of the preceding. The investigation of SP properties in micron size plasmonic structures is not only important for biosensing,<sup>5</sup> but also for photonics and plasmonics to develop photonic bandgaps<sup>136</sup> or understanding the properties of thin metal stripes used as optical waveguides.<sup>137</sup>

A few studies are starting to provide information on the optical properties of micron-size metallic films. It was previously reported that the excitation of the surface plasmon on a metallic film located at the tip apex of a scanning near-field optical microscope could enable the measurement of the surface plasmon of underlying structures.<sup>138</sup> Also, the micron size plasmonic films could be used as a refractive index sensor, albeit the somewhat low resolution on the RI measurement.<sup>95,70</sup> Recently, a SPR absorption peak was observed with triangle arrays with near micron edge length, when optically interrogated in total internal reflection with a SPR instrument.<sup>124</sup> This SPR phenomenon was only present with triangles of greater than 500 nm edge lengths and also showed low sensitivity to refractive index. However, the influence of the physical characteristics of the triangles on the sensitivity is still unknown and could be improved with tuning of the aspect ratio of the triangles.

Another interesting novel plasmonic material is gaining attention as a potential biosensing template. Light impinging on nanohole arrays exhibit an anomalous transmission.<sup>68</sup> This phenomenon is sensitive to the refractive index near the surface of the nanohole arrays, which was exploited to detect biomolecule adsorption.<sup>139</sup> Nanohole arrays consisting of holes smaller than the diffraction limit of light were previously manufactured using focus ion beam milling<sup>59,139,140</sup> or electron beam lithography.<sup>56,141,142</sup> Alternatively, nanohole arrays can be prepared using a modified nanosphere lithography.<sup>143</sup> Etching a latex nanosphere mask in plasma, followed by the metallization of the substrate results in a nanohole arrays. The SPR peak observed by Live *et al.* with the triangle arrays of micrometer edge length was also present in nanohole arrays, with a second absorption peak active at the same wavelength and sensitivity as SPR on a continuous film measured using a multi-wavelength Kretschmann configuration. The absorption peak at  $\lambda = 800$  nm was attributed to a short range SPR mode active in structures of near micron size. Although it is known that the micro metallic structure exhibit a SPR peak, the influence of the aspect ratio on the sensitivity is still unexplored, the sensitivity to monolayer formation and there is no data on the optical properties measured in total internal reflection for the transition from triangle arrays to microhole arrays. Thus, further studies are required to fully characterize this SPR mode and to evaluate the biosensing potential of these structures.

## 2.2 Experimental

### 2.2.1 Preparation of the triangles and microhole arrays

The procedure to deposit a well-ordered sphere monolayer uses drop coating of a polymer microsphere suspension onto cleaned glass slides and was slightly modified from Live *et al.*<sup>124</sup> In all cases, the sphere solution was purchased from Duke Scientific, with a coefficient of variation of < 3 - 5% (depending on the size) and a concentration of 10% by weight. For microspheres of 1.0 and 1.5  $\mu\text{m}$ , 22  $\mu\text{L}$  of the sphere solution was mixed with

22  $\mu\text{L}$  of 100% ethanol and 100  $\mu\text{L}$  of ultrapure water. Finally, the suspension with microspheres of 3  $\mu\text{m}$  was prepared from 30  $\mu\text{L}$  of the sphere solution, 30  $\mu\text{L}$  of 100% ethanol and 100  $\mu\text{L}$  of ultrapure water. Once the mixture equilibrated at room temperature (approx. 10 min), 40  $\mu\text{L}$  of the solution was drop-coated on a previously cleaned and dried glass slide of 22 x 22 mm. In order to obtain a monolayer well-ordered on the length scale of several hundreds of microns to mm, the evaporation of the solution must be accomplished over a period of an hour to two hours. To reduce the rate of evaporation of water and ethanol, the drop-coated sphere solution is evaporated under an upside down Petri dish, with the end of a 200  $\mu\text{L}$  pipet tip lifting one end of the Petri dish to slowly evaporate the solvent. Thereby, large surface areas of approx. a few  $\text{mm}^2$  of sphere monolayer with relatively few defects were obtained with this technique.

Thereafter, a 0.5 to 1 nm thick Ti adsorption layer and a Au film was deposited onto the sphere monolayer using a Cressington 308R sputter coater to yield triangles or Au films from 10 to 85 nm in thickness depending on the deposition time. For the Ag and Ti deposition, 50 nm were deposited on the 3  $\mu\text{m}$  microsphere mask using the sputter coater. The microsphere samples were mounted on two Petri dishes staked in the sputter coater chamber in order to increase the deposition rate onto the samples. For every sample, the base pressure in the chamber was  $< 1 \times 10^{-4}$  Pa, the sputtering pressure was 1 Pa of Ar leak gas, and the power of the DC magnetron was 80 W. Depositing Ti in these conditions results in titanium oxynitride ( $\text{TiO}_x\text{N}_y$ ) films on the surface,<sup>144</sup> observed from a dark gray metallic coloration.

In the case of the microhole arrays, a 30 min treatment in a plasma cleaner (Harrick PG-32) etched the sphere mask prepared with the 3  $\mu\text{m}$  beads and subsequent metallization of the mask led to microhole arrays.<sup>143</sup> Four microhole arrays were placed in the plasma cleaner at different locations such that the different etch rate for each position results in microhole arrays of the same periodicity, but varying microhole sizes. Au was deposited to

have 70 nm-deep microholes. The sphere mask was immersed in chloroform and removed using ultrasounds. A final wash with methanol was performed to ensure no residual polymer from the spheres remained on the surface.

### 2.2.2 Characterization of the triangles and microhole arrays

Physical characterization of the metallic structures was performed by atomic force microscopy (AFM) in contact mode. AFM measurements were performed using a WITec Alpha SNOM with force modulation cantilevers with a spring constant of 3 N/m, resonant frequency of 60 kHz, a length of 225  $\mu\text{m}$ , a width of 45  $\mu\text{m}$ , a tip height of 14  $\mu\text{m}$  and a curvature radius of  $< 10$  nm. Scanning areas were adjusted for the triangle sizes to 20 x 20  $\mu\text{m}$  for the smallest structures or 40 x 40  $\mu\text{m}$  for the largest micro-structures. The triangles produced with the sphere mask of 1.0  $\mu\text{m}$  have a 700 nm edge length, while the 1.5  $\mu\text{m}$  spheres yielded triangles of 950 nm, and triangles of 1.8  $\mu\text{m}$  are obtained with the mask prepared with a monolayer of 3  $\mu\text{m}$  spheres. The height and the edge length were measured from multiple spots on a single sample and multiple samples were averaged ( $n=3$ ) for each preparation conditions. The ratio of the edge length to the height of the triangle is defined as the aspect ratio thereafter (Table 2.1).

Table 2.1. LSPR signal from triangles measured using transmission spectroscopy

700 nm		950 nm		1.8 $\mu\text{m}$	
Aspect Ratio	$\lambda_{\text{SPR}}$ (nm)	Aspect Ratio	$\lambda_{\text{SPR}}$ (nm)	Aspect Ratio	$\lambda_{\text{SPR}}$ (nm)
21	$885 \pm 7$	17	$1364 \pm 11$	21	$2452 \pm 3$
23	$902.2 \pm 2.8$	18	$1319 \pm 6$	33	$2477 \pm 14$
33	$906.1 \pm 3.4$	34	$1359 \pm 4$	41	$2507 \pm 7$
41	$908.9 \pm 1.6$	35	$1355 \pm 5$	49	$2546 \pm 38$
47	$909.4 \pm 2.2$	53	$1388 \pm 8$	95	$2648 \pm 17$

### 2.2.3 Optical properties of the micro-structures

The optical properties of the triangles were measured by transmission spectroscopy for LSPR and by TIR for propagation SPR with specific setups. Transmission for the 700 nm triangles was measured with a single channel fiber-optic Vis-NIR spectrophotometer built in-house where samples were excited with a 50 W halogen lamp and transmitted light was coupled to a Vis-NIR spectrophotometer (range 550 – 1200 nm). The 950 nm triangle samples were measured in transmission using a NIR spectrophotometer (800 – 1800 nm). Lastly, the LSPR response of the 1.8  $\mu\text{m}$  triangles was measured in transmission using a FTIR, working spectroscopic range of 7 500  $\text{cm}^{-1}$  (1 333 nm) to 400  $\text{cm}^{-1}$  (25  $\mu\text{m}$ ).

For the SPR experiments in TIR with the triangles, microhole arrays and the macroscopic Au films, a sheet polarizer and a BK-7 dove prism reflecting light at 72.8° (versus normal) were mounted in a single axis optical path.<sup>134</sup> At this fixed angle, wavelength interrogation of the metallic surface was performed with the reflectance ratio between the P and S polarization of excitation light. A PI-Acton spectrophotometer with a triple grating turret and an Andor CCD camera was utilized to monitor the SPR signal from 400 nm to 900 nm. A 150 gr/mm grating blazed at 500 nm was centered at 675 nm to accomplish this spectral window. Averaging an acquisition of 100 spectra with an integration time of 100 ms/acquisition resulted in a single measurement for each sample. Control experiments were performed using a blank glass slide and numerous Au ultra-thin films ranging from 10 nm to 50 nm thick with a 1 nm-thick Ti adhesion layer underneath the Au film. The ratio of P and S-polarization of light was calculated using the Matlab software, and the SPR wavelength is calculated using a minimum finding algorithm. This algorithm models the peak using a second-order polynomial, where the zero of the derivative from the second-order polynomial is resulting in the SPR wavelength.

## 2.2.4 Monolayer formation

A monolayer of 16-mercaptohexadecanoic acid (MHA) was formed on the 1.8  $\mu\text{m}$  triangle and aspect ratio of 39. A 3.8 mM solution of MHA was prepared in ethanol and dissolved using ultrasounds. The monolayer formation was monitored using a fluidic cell to minimize evaporation of the solvent. The volume of the flow cell is approx. 200  $\mu\text{L}$ . The triangle array was placed into contact with ethanol for at least 15 minutes to equilibrate the SPR response. Thereafter, the SPR signal was monitored for 5 minutes in ethanol, followed by an exposition to the ethanolic MHA solution for 50 minutes and a final wash with ethanol for 5 minutes. A 1 mL volume was injected in the flow cell to replace the prior solution and with the solution to be monitored. Hence, the measurements were performed in a static solution. Continuous monitoring of the SPR signal during the monolayer formation allows the measurement of the kinetic curve. The data were acquired at 1 Hz over the 1 hour-long experiment. The SPR response is converted to a kinetic curve (sensorgram) to measure the change in SPR response, from the beginning of the MHA monolayer formation to the final seconds of the MHA solutions being in contact with the sample. The change in SPR wavelength was compared with a set of measurements with a continuous gold film of 50 nm, with a Ti adhesion layer of 2 nm. The measurements for the triangle arrays were repeated four times and three measurements were acquired with the continuous gold film SPR.

## 2.3 Results and discussion

### 2.3.1 Spectroscopy of the Au triangles in transmission

The LSPR signal from each Au triangle arrays was measured in transmission spectroscopy. The 700, 950 nm, and 1.8  $\mu\text{m}$  Au triangle arrays are active in the NIR region, with significant differences in the excitation wavelength for each series of triangles (Figure 2.1). All samples were measured in air for comparison. Air does not absorb in the spectral



region covered by the measurements, while most solvents would exhibit absorption in the NIR region. The 700 nm Au triangles have a strong absorption band near  $\lambda = 900$  nm, while the 950 nm Au triangles are showing an absorption peak near  $\lambda = 1.35$   $\mu\text{m}$  and the 1.8  $\mu\text{m}$  Au triangles have an absorption peak near  $\lambda = 2.5$   $\mu\text{m}$  (Table 2.1). As previously observed, these absorption peaks are also generally excited at longer wavelength for larger aspect ratio,<sup>127,145</sup> within the error on the measurement ( $n = 3$ , one standard deviation reported as the error). Hence, it shown here that LSPR is active in every Au triangle sample prepared herein.

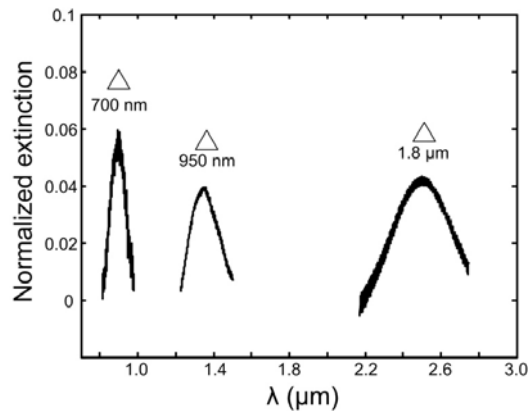


Figure 2.1. The extinction spectra were measured in transmission spectroscopy for Au triangle arrays in air with various edge lengths.

### 2.3.2 Effect of the metal on the plasmonic properties of 1.8 $\mu\text{m}$ triangles – SPR measured in TIR

Excitation of the triangle arrays in total internal reflection with a SPR instrument in the Kretschmann configuration results in two peaks for the Au triangle arrays of 1.8  $\mu\text{m}$  edge length and an aspect ratio of 33 (Figure 2.2). Although many different Au structures of similar sizes have been reported as plasmon active,<sup>70,95</sup> it is essential to investigate the properties of these triangle arrays to confirm the plasmonic nature of the response observed.

Sets of 1.8  $\mu\text{m}$  triangles were prepared with an approximate height of 50 nm, resulting in Au, Ag, and  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  triangles of aspect ratio of 33, 36, and 29 respectively. Au and Ag are plasmon active materials (negative real part of the dielectric constant)<sup>44</sup> while  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  is SPR inactive due to a positive real part of the dielectric constant.<sup>146</sup> As observed in Figure 2.2, a similar SPR spectrum is obtained for 1.8  $\mu\text{m}$  Au and Ag triangles, while  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  triangles are SPR inactive. This result suggests that the optical response for Au and Ag triangles results from the surface plasmon. To further confirm the plasmonic nature of the measured SPR response, the Ag triangles were oxidized in a plasma cleaner filled with  $\text{O}_2$ . After 30 min  $\text{O}_2$  treatment, the surface of Ag triangles has partially oxidized, observed with a tarnished surface and the SPR spectrum is greatly decreased (Figure 2.2). After 75 min oxidation, the SPR response is null due to a full oxidation of the Ag triangle surface to  $\text{Ag}_2\text{O}$  and observed from the black coloration of the film (typical for  $\text{Ag}_2\text{O}$ ) compared to the characteristic metallic gray of Ag. Oxidation of the Ag triangles maintains the main physical characteristics of the triangle arrays (geometry, height, and periodicity) and forms a SPR inactive  $\text{Ag}_2\text{O}$  thin film on the surface of the triangle. Hence, this experimentally confirms the plasmonic nature of the measured SPR response from 1.8  $\mu\text{m}$  Au and Ag triangles.

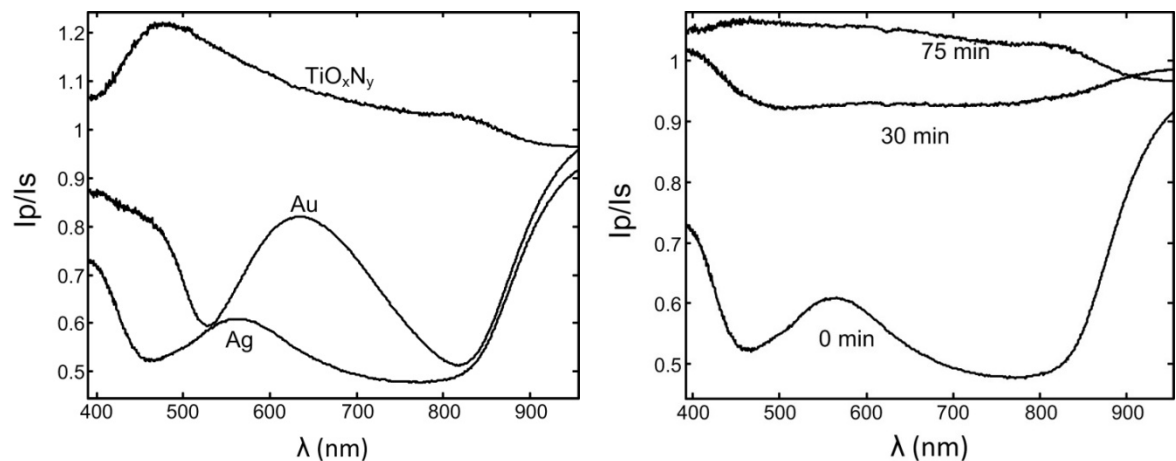


Figure 2.2. (Left) SPR spectra for 1.8  $\mu\text{m}$  triangles of different metal, Ag, Au, and  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  with an aspect ratio of 36, 33, and 29 respectively. Ag and Au exhibit a SPR signal, while  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  does not

in the wavelength range measured. (Right) SPR spectra for 1.8  $\mu\text{m}$  Ag triangles (aspect ratio of 36) without oxidation (0 min), after 30 min and 75 min oxidation in an oxygen plasma.

### **2.3.3 Edge length and aspect ratio influence on the plasmonic properties of Au triangle arrays measured in SPR**

All of the following results in this article were obtained with Au triangles. The SPR response of the Au triangles exhibited two distinct absorption peaks, observed at a wavelength of approx.  $\lambda = 525$  and 800 nm (Figure 2.3). The position of the peak at  $\lambda = 525$  nm is relatively invariable with geometrical aspects of the triangles, while the peak at  $\lambda = 800$  nm depends on the aspect ratio and the size of the triangle. The 700 nm triangles have an excitation wavelength of less than  $\lambda = 800$  nm, while the 950 nm triangles have an excitation wavelength of approx.  $\lambda = 805$  nm. The excitation wavelength is invariable relative to the aspect ratio of the 700 and 950 nm triangles within each series. For the triangles with 1.8  $\mu\text{m}$  edge length, the excitation wavelength increases significantly from  $\lambda = 800$  nm to  $\lambda = 840$  nm for triangle arrays with the largest aspect ratio. Bulk refractive index sensitivity was also measured using sucrose solutions between RI = 1.33 and RI = 1.39. It was also observed with the multiple spectra acquired with different refractive index solutions that the peak at  $\lambda = 800$  nm is not very sensitive to refractive index (Figure 2.3). The series of spectra for the calibration of each triangle sizes with varying aspect ratio is available as supporting information. Nonetheless, there is a relatively large decrease in the intensity of the absorption peak at  $\lambda = 800$  nm for every triangle sizes and aspect ratio with increasing refractive index. Although it may be useful to exploit the absorbance-dependant property of refractive index calibration, it is not unusual when monitoring real-time processes in SPR with broadband light, as in the current setup, to observe a drift of the absorbance intensity due to the light source fluctuations. Thus, the use of the absorbance may be linked to a greater error in the measurement and poorer resolution of the measured response in the SPR sensorgram. This problem is also encountered in the measurement of

the reflectivity in SPR imagers and results in lower resolution than for wavelength or angle scanning instruments.<sup>4</sup>

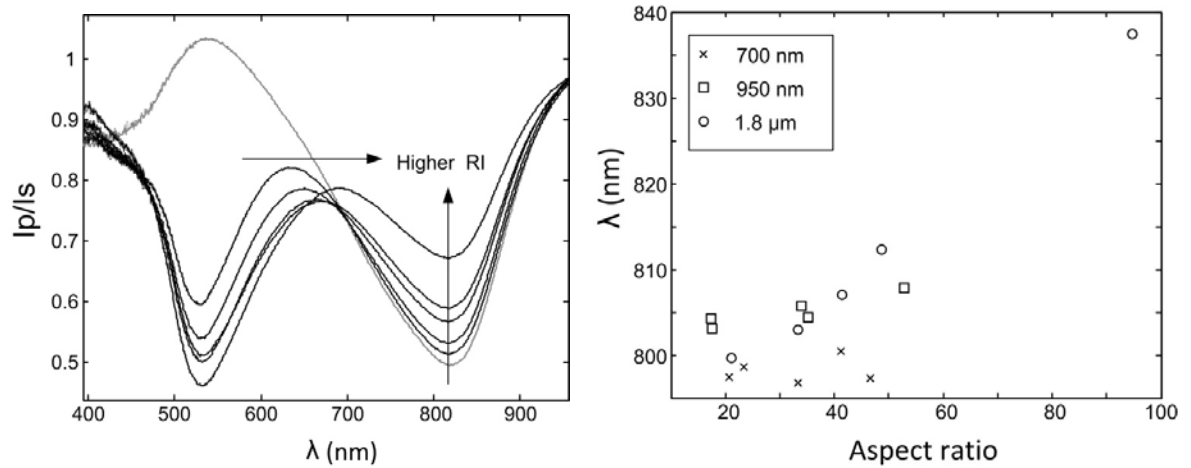


Figure 2.3. (Left) SPR spectrum for triangles of 1.8  $\mu\text{m}$  with an aspect ratio of 33 measured with air (gray), RI = 1.33359, RI = 1.34722, RI = 1.36320, RI = 1.37335, and RI = 1.39073 (black traces). (Right) Excitation wavelength for triangles with varying aspect ratio and edge lengths measured in TIR with an air sample.

### 2.3.4 Wavelength and sensitivity of the maximum transmittance of Au triangles in SPR

The SPR response of Au triangles shows a maximum transmission near  $\lambda = 600$  nm, between the absorption peaks at  $\lambda = 525$  and 800 nm, which significantly shifts in wavelength with increasing refractive index (Figure 2.3 and supplementary information). Increasing the aspect ratio of the 700 nm triangles initially blue-shifts the wavelength of the maximum in the SPR spectrum followed by a red-shift, resulting in a U-shape curve for increasing aspect ratio between  $\lambda = 560$  and 580 nm. Triangles of 950 nm have a relatively invariable wavelength around  $\lambda = 600$  nm, while the peak position of the 1.8  $\mu\text{m}$  triangles is increasing from  $\lambda = 620$  to 680 nm with increasing aspect ratio (Figure 2.4). It is noteworthy to mention that the sensitivity of this peak is now much greater than the

absorption peak at  $\lambda = 800$  nm ( $\partial\lambda/\partial\eta < 100$  nm/RIU). Triangles of 950 nm are the most sensitive with an average sensitivity of  $1993 \pm 374$  nm/RIU. The error on the sensitivity represents two standard deviations on the mean sensitivity for each triangle arrays of 950 nm, as the sensitivity is constant with aspect ratio. The triangles of 1.8  $\mu\text{m}$  are less sensitive with  $1038 \pm 96$  nm/RIU. For the 700 nm triangle, the sensitivity varies greatly from nearly 0 nm/RIU to approximately 1000 nm/RIU with smaller aspect ratio (Figure 2.4). Thus, a significantly improved sensitivity is obtained by tracking the transmission maxima compared to the absorption peaks at  $\lambda = 525$  and 800 nm. The sensitivity is also greater than for nanoparticles (typically  $\partial\lambda/\partial\eta < 500$  nm/RIU) and is close to the sensitivity of conventional SPR in the same instrumental configuration ( $\partial\lambda/\partial\eta = 2971$  nm/RIU).<sup>124</sup>

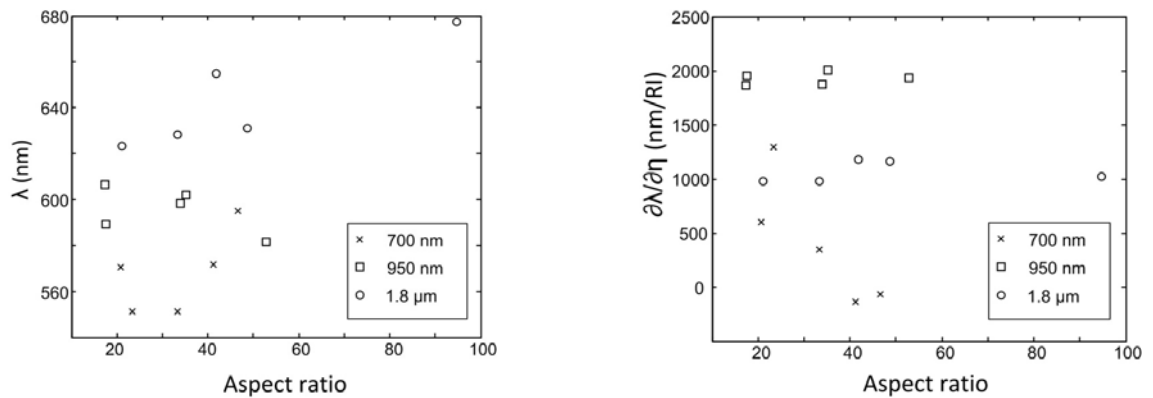


Figure 2.4. (Left) Spectral position of the transmission maxima in water with various triangle edge length and aspect ratio. (Right) Sensitivity to refractive index of the transmission maxima measured with aqueous sucrose solution.

The SPR spectra for each triangle sizes and aspect ratio vary greatly in shape. Figure 2.5 shows a representative spectra acquired in water for each triangle size and aspect ratio. With 700 nm triangles, there is no absorption peak at  $\lambda = 525$  nm. However, a markedly increase in transmission is observed around  $\lambda = 560$  nm for aspect ratio 33 and 41, while the other spectra show a minor peak around  $\lambda = 580$  nm. The intensity variation for the peak at  $\lambda = 560 - 580$  nm follows the same U-shape in intensity as for the

wavelength observed in Figure 2.4. The absorption peak attributed to the short range SPR mode is observed in all cases at  $\lambda = 800$  nm for each samples, but the peak is very broad and of low intensity. For the 950 nm triangles, an absorption peak at  $\lambda = 525$  nm is observed, while the absorption peak at  $\lambda = 800$  nm is narrower especially for larger aspect ratio and of greater intensity comparatively to 700 nm triangles. Lastly, the triangles at 1.8  $\mu\text{m}$  exhibited an absorption peak at  $\lambda = 525$  nm of greater intensity, while the peak at  $\lambda = 800$  nm is narrower and of the highest intensity among tested samples. One exception was observed with the triangle with an aspect ratio of 95, which the absorption peak is unseen at  $\lambda = 800$  nm, but an anomalously increased transmission is observed. This was seen for every sample prepared with an aspect ratio of 95 with 1.8  $\mu\text{m}$  triangles.

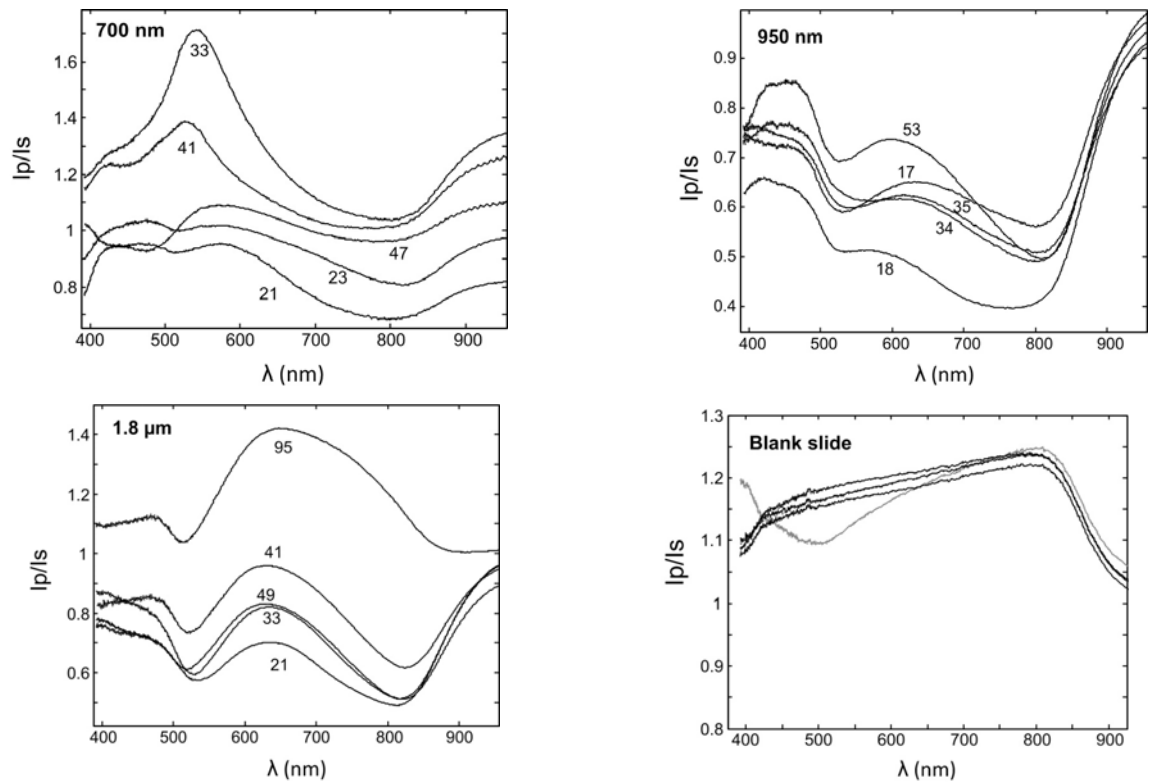


Figure 2.5. SPR spectra in water of triangles with an edge length of 700 nm (top left), 950 nm (top right), and 1.8  $\mu\text{m}$  (bottom left) respectively, with various aspect ratio as indicated with the numbers next to each spectrum. The spectra for the 700 nm triangles were offset for ease of

representation. For the 950 nm and the 1.8  $\mu\text{m}$  triangles, the intensity generally increases with aspect ratio. (Bottom right) Total internal reflection spectra for air (gray) and aqueous solutions of varying refractive index with a blank glass slide.

### 2.3.5 Penetration depth and RI resolution for the transmission maxima

Although the refractive index sensitivity is a useful measurement of the bulk refractive index changes, it does not indicate the penetration depth of the SPR sensing field. A film or nanostructure with a short sensing depth would exhibit a greater response to binding events occurring at the surface of the sensor than with another sensor of equal sensitivity with a greater penetration depth. This is usually the case when nanoparticle based LSPR is compared to conventional SPR. LSPR has a shorter penetration depth and is resulting in larger signal for the formation of a monolayer than with conventional continuous film SPR.<sup>127</sup>

To measure the penetration depth of the triangle arrays, the formation of a MHA monolayer on the 1.8  $\mu\text{m}$  triangles with an aspect ratio of 39 resulted in a change of SPR wavelength ( $\Delta\lambda_{\text{SPR}}$ ) of  $13 \pm 3$  nm ( $n = 4$ ) from the formation of MHA monolayer during a period of 50 minutes. Comparatively, the formation of a MHA monolayer a continuous gold film resulted in  $\Delta\lambda_{\text{SPR}} = 2.4 \pm 0.8$  nm ( $n = 3$ ). The error on the measurement reflects two standard deviations on the mean SPR response. Using the equations from Jung *et al* for the thickness of as adsorbed layer, it is possible to calculate the penetration depth of the SPR mode in the triangle arrays.<sup>71</sup> Using the parameters for the refractive index of thiols ( $RI_{\text{SAM}} = 1.45$ ),<sup>147</sup> the refractive index of ethanol ( $RI_{\text{solution}} = 1.36$ ), the sensitivity for a continuous gold film ( $m_{\text{Au}} = 1765$  nm/RI for the wavelength range of the experiment) and for the triangles ( $m_{\text{triangle}} = 1038$  nm/RI), and the penetration depth of SPR on a continuous film ( $l_{d-\text{Au}} = 230$  nm at  $\lambda = 630$  nm), one can obtain the penetration depth of the triangles ( $l_{d-\text{triangle}}$ ) using equations 2.1-2.3.

Equation 2.1

$$d = -\frac{l_d}{2} \ln\left(1 - \frac{\Delta\lambda_{SPR}}{m(RI_{SAM} - RI_{solution})}\right)$$

Equation 2.2

$$d_{Au} = d_{triangle} \quad \text{for MHA monolayer on both substrates}$$

Equation 2.3

$$l_{d-triangle} = l_{d-Au} \frac{\ln\left(1 - \frac{\Delta\lambda_{SPR-Au}}{m_{Au}(RI_{SAM} - RI_{solution})}\right)}{\ln\left(1 - \frac{\Delta\lambda_{SPR-triangle}}{m_{triangle}(RI_{SAM} - RI_{solution})}\right)}$$

Where  $d$  is the optical thickness of the monolayer for Au and the triangle arrays respectively. Thus, using  $\Delta\lambda_{SPR}$  for Au and the triangle arrays respectively, a value of 24 nm is obtained for the penetration depth of the triangles. This result is actually surprising for SPR excitation using total internal reflection, due to the relatively large penetration depth typically observed on Au films. However, this result is comparable to the 20 nm penetration depth observed in LSPR.<sup>127</sup> Hence, the field of the short range SP mode observed here seems to extend in the solution similarly to LSPR. This result is important for SPR biosensing due to a lesser sensitivity to bulk refractive index of the sensor with triangle arrays, causing a decreased influence of the temperature on the measurement. Since the temperature sensitivity to refractive index is constant, a sensor with smaller bulk refractive index sensitivity will have a smaller drift due to temperature compared to SPR sensors based on continuous films. Moreover, the signal from a binding event will be increased due to the short penetration depth. Lastly, the bandwidth at half height of the peak is approx. 150 nm, resulting in a relatively narrow peak and a refractive index resolution of  $6 \times 10^{-5}$  RIU. However, this resolution was measured with low spectral



resolution spectrophotometer (0.5 nm/pixel) to observe the full spectrum and could be significantly improved using better resolution spectrophotometer focused on the maximum transmission peak.

### 2.3.6 Transition from triangles to microhole arrays measured in SPR

In order to further understand the properties of the SPR mode present in plasmonic structures with a micrometer length scale, a series of samples were prepared to observe the optical properties in total internal reflection for the transition from triangle to microhole arrays. Figure 2.6 shows AFM images of the microstructures ranging from triangle to microhole arrays. Three of the samples show a distinct microhole array aspect, while for the last sample, a triangle array was obtained with a slight overlap between adjacent triangles. For the triangle arrays, the spheres were etched to a diameter of 2.5  $\mu\text{m}$ , while the microhole arrays have a hole diameter 2.2, 2.0, and 1.6  $\mu\text{m}$  for increasingly etched spheres.

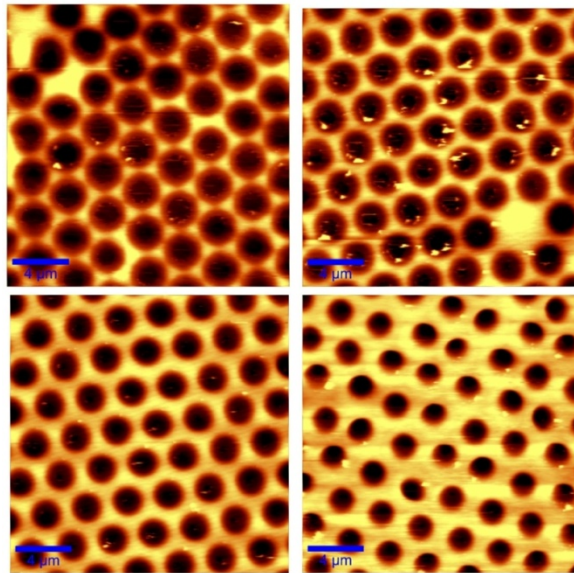


Figure 2.6. AFM images of microhole arrays etched for 30 minutes at different position in the plasma cleaner. A gradient exist in the chamber resulting in different etch rates. The microhole arrays were prepared using a mask composed of 3  $\mu\text{m}$  spheres. The hole diameter is 2.5 (triangles,

top left), 2.2 (top right), 2.0 (bottom left), and 1.6  $\mu\text{m}$  (bottom right). The depth of the holes is between 60 and 70 nm. Each AFM images corresponds to a 20 x 20  $\mu\text{m}$  scan.

For the etched structure resulting in a triangle array (sphere diameter of 2.5  $\mu\text{m}$  after etching), the SPR response is similar to the other 1.8  $\mu\text{m}$  triangle arrays (Figure 2.7 and Supporting information, Figure C) except for the presence of another strong absorption peak at around  $\lambda = 425$  nm. When the hole diameter reaches approximately 2.2  $\mu\text{m}$ , the width of the gold patch between holes is 0.8  $\mu\text{m}$  wide by several tens of  $\mu\text{m}$  in length and is starting to optically respond as a propagating SPR response. A relatively broad SPR peak is appearing at  $\lambda = 541$  nm, which shifts to longer wavelength for an increased etch of the spheres to  $\lambda = 608$  nm for holes of 2.0  $\mu\text{m}$  in diameter to reach  $\lambda = 618$  nm for the sample with the smallest holes of 1.6  $\mu\text{m}$  in diameter (Figure 2.7). Furthermore, the width of the SPR peak and the excitation wavelength for the microhole array with the smallest holes is very similar to the SPR signal from a 50 nm-thick Au film (Figure 2.7). Lastly, the intensity of the short range SPR peak at  $\lambda = 800$  nm is decreasing with smaller hole diameter. Thus, the increasing propagating SPR contribution in microholes of decreasing diameter is matched with a reduction in the short range SPR intensity. This confirms that the transition from the short range SPR mode to the propagating SPR occur with a coexistence of both SPR properties. This is similar to the conclusion reached previously for the transition from LSPR to short range SPR, where both the short range SPR and propagating SPR modes were active in sample of micro-structures.<sup>124</sup>

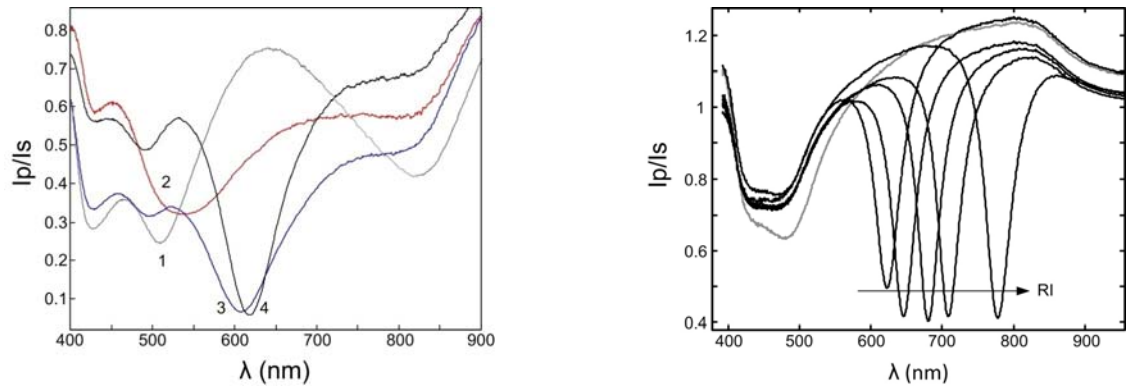


Figure 2.7. (Left) Overlay of the SPR spectrum with microhole arrays acquired in water with increasing etching. The hole diameter for each samples is 1 ( $2.5 \mu\text{m}$  – gray), 2 ( $2.2 \mu\text{m}$  - red), 3 ( $2.0 \mu\text{m}$  - blue), and 4 ( $1.6 \mu\text{m}$  - black). (Right) The sensitivity to refractive index is measured with sucrose solutions on a continuous Au film of 50 nm thin.

### 2.3.7 Sensitivity with microhole arrays

Spectra for the calibration of the microhole arrays are shown in Figure 2.8. The triangle arrays (sphere of  $2.5 \mu\text{m}$ ) exhibited a maximum transmission peak with a sensitivity of  $315 \pm 30 \text{ nm/RIU}$  which is about 3 times less sensitive than with the other  $1.8 \mu\text{m}$  triangles (unetched samples). Increasing the etching of the spheres (hole diameter of  $2.2 \mu\text{m}$ ) results in overlaid response of the propagating and short range SPR (Figure 2.8). Thus, the sensitivity cannot be extrapolated with this microhole array. Further decreasing the hole size improves significantly the sensitivity, at  $3700 \pm 400 \text{ nm/RIU}$  and  $3300 \pm 350 \text{ nm/RIU}$  for the microhole arrays with a diameter of  $2.0$  and  $1.6 \mu\text{m}$  respectively, within the RI range of  $1.33 - 1.39$ . This sensitivity is greater than for SPR on a thin gold film, which exhibits a sensitivity of  $2971 \pm 286 \text{ nm/RI}$  within the same RI range (Figure 2.7). The propagating SPR peak is shaper and more intense with respectively a continuous Au film, microholes with a diameter of  $2.0$  and  $1.6 \mu\text{m}$ .

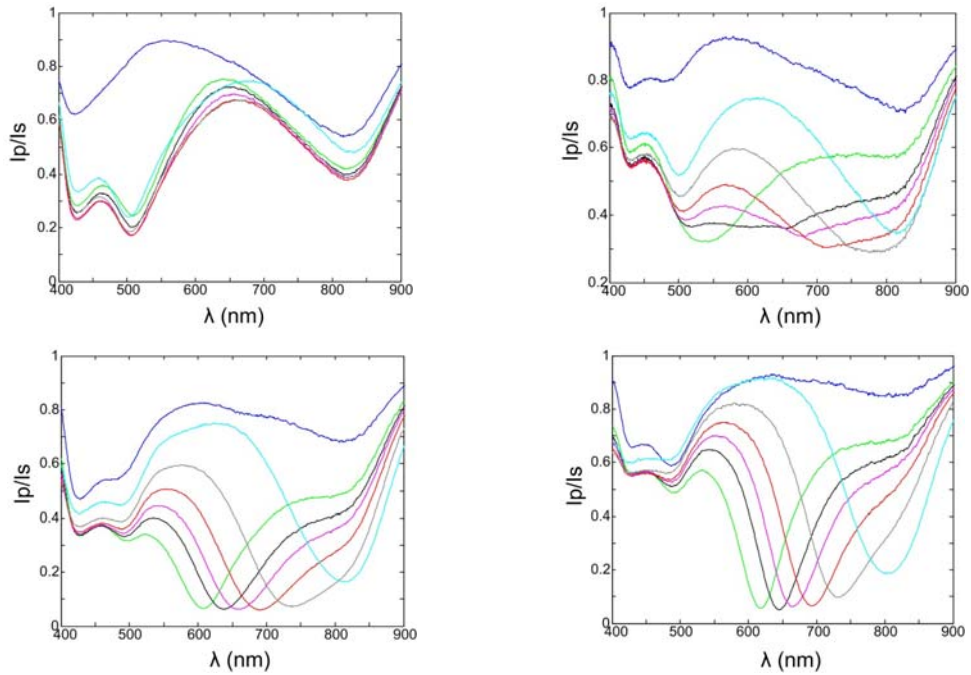


Figure 2.8. The SPR spectra of microhole arrays with hole diameter of 2.5  $\mu\text{m}$  (top left), 2.2  $\mu\text{m}$  (top right), 2.0  $\mu\text{m}$  (bottom left) and 1.6  $\mu\text{m}$  (bottom right) were measured with air (dark blue) and sucrose solutions of RI = 1.3333 (green), RI = 1.3480 (black), RI = 1.3554 (pink), RI = 1.3647 (red), RI = 1.3755 (gray), and RI = 1.3888 (light blue).

## 2.4 Conclusions

This article is demonstrating the presence of a short range SPR mode (as measured in the Kretschmann configuration SPR) in triangles of 700, 950 nm and 1.8 mm edge length and in microhole arrays which transitions to propagating SPR with microhole arrays of decreasing size. The plasmonic nature of the triangle arrays was measured from the presence of a similar response with Au and Ag triangles, while  $\text{TiO}_x\text{N}_y$  and oxidized Ag triangle arrays did not exhibit a SPR response. The triangles arrays of different sizes and aspect ratio are generally exhibiting two absorption bands and a transmission maximum in the SPR spectrum. The maximum in transmission at approximately  $\lambda = 600$  nm exhibit the best analytical characteristics for triangle arrays. This maximum shifts significantly with

increasing RI for the triangles of 950 nm and 1.8  $\mu\text{m}$ , with a sensitivity of 1993 and 1038 nm/RI respectively. This high sensitivity is close to regular SPR spectroscopy with the same instrumental setup measured at 2971 nm/RI and much greater than with nanoparticles. Moreover, it was measured using the formation of a MHA monolayer that the penetration depth of this peak is much lower at  $l_d = 24$  nm for the triangle arrays compared to  $l_d = 230$  nm for SPR on a continuous film. This short penetration depth makes this sensor template ideal for highly sensitive biosensing, as the peak bandwidth is relatively narrow, is less sensitive to bulk refractive than conventional SPR potentially reducing the effect of temperature drift, while improving the sensitivity to the detection of binding events. Microhole arrays are transitioning from a short range SPR behavior to a propagating SPR signal, similar to continuous Au thin films, but of higher RI sensitivity with the microhole arrays. These results show that micron scale plasmonic structures exhibits interesting optical properties, which could be exploited in a biosensor format.

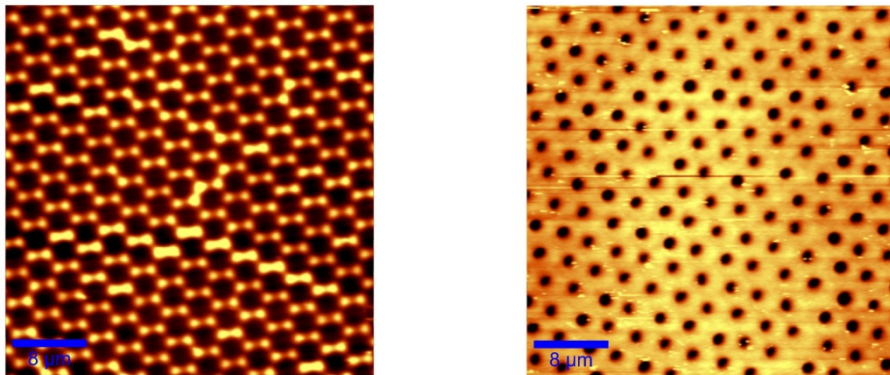
## 2.5 Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support from the Canadian Foundation for Innovation (CFI – Leaders fund grant 12910), the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC – Discovery Grant RGPIN 3419472-2008) and the Université de Montréal.

**Supporting Information Available in Annexe 1 from pages II to IV.** Spectra for the calibration of each triangle size and aspect ratio are included in supporting information. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## Chapitre 3 Propagating Surface Plasmon Resonance on microhole arrays

Le chapitre précédent introduisait quelques caractéristiques optiques des films microstructurés, tandis que ce chapitre vient approfondir les observations initiales par une étude systématique des propriétés physico-optiques de ces matériaux. Il sera question particulièrement de l'impact de la forme (triangles vs trous), de la périodicité et de la taille des motifs pour des épaisseurs de films autour de 50 nm. Les caractéristiques des matériaux structurés sont comparées avec les films continus. Des considérations analytiques concernant l'application des films structurés comme surface de biodétection précisent les travaux de recherches sur un nombre restreint d'échantillons. Cette section demeure, comme la précédente, surtout basée sur des observations empiriques. Des explications plus théoriques sur la plasmonique des films microstructurés seront élaborées dans le chapitre suivant.



Live, L. S.; Bolduc, O. R.; Masson, J. F. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3780.

### *Abstract*

Metallic thin films patterned with micron size triangles or hole arrays present plasmonic properties when excited in the Kretschmann configuration, that are improved in comparison to conventional thin film Surface Plasmon Resonance (SPR). These optical

properties can be tuned by varying the physical aspects of the micro plasmonic structures. Triangles and microhole arrays were prepared with modified nanosphere lithography (NSL) using latex spheres of 0.65, 0.82, 1.0, 1.5 or 3.2  $\mu\text{m}$  in diameter. This allowed the preparation of triangles with edge lengths between 275 to 2000 nm and microhole arrays of various periodicities, diameters and hole depth. These microstructures were studied to understand the relationship between the physical aspect and the optical properties, such as: the sensitivity, working refractive index range, spectral width of the plasmonic peaks, spectral noise and refractive index resolution. Microhole arrays with a hole diameter equal to half the periodicity were found to combine the advantages of both localized surface plasmon resonance (LSPR) on nanoparticles and SPR on a thin film. These microhole arrays exhibited high sensitivity to refractive index ( $> 3000 \text{ nm/RIU}$ ), sensitivity to monolayer formation (2-fold improvement compared to thin films) and excellent refractive index resolution ( $10^{-6} \text{ RIU}$ ). Finally, a biosensor for the detection of 10 nM of immunoglobulin G (IgG) exhibited a greater response with micro plasmonic materials compared to conventional thin Au films. Hence, these novel plasmonic materials exhibit a strong potential as SPR sensing platform. They can be implemented on existing instrumentation and use detection protocols developed for current SPR sensors.

### 3.1 Introduction

Surface Plasmon Resonance is a powerful analytical technique for label-free detection with high sensitivity of biomolecules based on the optical properties of plasmonic materials.<sup>3,4</sup> SPR instruments typically use thin continuous metallic films, usually with Au or Ag as the plasmonic materials. These metals present a sharp and intense plasmonic band in their total internal reflectance spectrum when excited in Kretschmann configuration of SPR.<sup>3,4</sup> While the position of the plasmonic peak corresponds to a specific refractive index at the metal/dielectric interface, real-time monitoring of its position gives kinetic information of binding processes occurring to the SPR sensors surface. In sensing experiments, molecular interactions occur in close proximity of the metal surface creating a

small, albeit measurable change of refractive index (RI). As a result, SPR is very sensitive to binding of biomolecules to the Au or Ag surface. Although this configuration of SPR has been very useful to monitor binding interactions of biomolecules in the nM to pM range, sensitivity improvement remains important to detect biomolecules in the fM to pM range. SPR sensor performances could be improved by developing novel plasmonic materials with greater sensitivity and shorter penetration depth.

Among possibilities to improve the sensing performance of SPR based sensors, the optical properties can be tuned by changing the size, shape and composition of the metal particle or film.<sup>148</sup> By tuning the optical properties of plasmonic materials, other parameters such as the spectral aspect of the SPR band and the RI linearity range have to be considered as they also affect the quality of a SPR sensor. Also of consideration, novel plasmonic materials should be based on simple fabrication methodologies and require little or no changes to existing instrumentation. One approach that was developed with success consists of tuning the sensing volume of SPR. Of particular interest, Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) has a short penetration depth of the electric field, which increases the SPR response measured upon binding events.<sup>127</sup> Hence, LSPR is widely employed with nanoparticles,<sup>128,149,150</sup> nanohole arrays,<sup>67,68</sup> nanorings,<sup>57</sup> nanorods,<sup>151</sup> nanocrescents<sup>54</sup> and nanoshells.<sup>126</sup> Although LSPR is advantageous due to the short penetration depth and large response to binding events, it is currently limited by low bulk RI sensitivity and RI resolution.

Alternatively, most investigations to improve SPR on a Kretschmann configuration have been aimed at increasing the sensitivity to refractive index of thin continuous film by using Ag/Au bilayers,<sup>152</sup> indium tin oxide thin overlayer<sup>153</sup> and nanoparticles over metallic film.<sup>154</sup> Significant improvement of the optical properties were observed with long range surface plasmon resonance (LR SPR) with a Teflon layer comprised between the prism and the metallic film on a Kretschmann configuration SPR.<sup>155</sup> A sensitivity 8 times greater than conventional SPR and refractive index resolution as low as  $10^{-8}$  RIU were observed with



this novel plasmonic propagation mode.<sup>74</sup> However, the long penetration depth of LRSPR makes it more suitable for large molecules sensing such as virus and bacteria.<sup>74</sup> Another approach of interest uses nanorods orientated normally to a metallic film. These nanorod films were active in LSPR and SPR with high sensitivity of  $3 \times 10^4$  nm/RIU and a probing depth of 500 nm.<sup>75</sup> Otherwise, improved sensitivity was achieved with nanopatterned film with periodic nanowires,<sup>156</sup> nanogrooves,<sup>157</sup> and isolated nanoparticles film.<sup>80</sup> These approaches are especially interesting as multiple techniques have been designed to pattern surfaces in the recent years. However, the novel plasmonic materials mainly involve continuous or nanostructured thin films.

To date, very few studies report the plasmonic properties of micron size plasmonic structures. This is contrasting with the large amount of research undertaken on LSPR with nanoparticles and SPR with macroscopic thin films. However, it is known that micron size Au films support a surface plasmon. It was previously reported that SPR was excited on a metalized tip apex of a scanning near-field optical microscopy.<sup>138</sup> Based on this principle, refractive index sensors were built with a microscopic thin metallic film at the tip of an etched fiber.<sup>70,95</sup> The sensing region of these etched fibers was on the order of a few microns. Although the etched fibers exhibited sensitivity to refractive index, the noise level was high resulting in poor RI resolution. The complexity associated with these measurements makes it difficult to fully investigate the properties of micro structures using this technique. Hence, a method based on nanosphere lithography (NSL) was recently developed to investigate the optical properties of micron size Au triangles, with a SPR instrument in the Kretschmann configuration.<sup>124,145</sup> Fabricating triangle arrays with nanospheres of different sizes tunes the area of the micron size Au films. These micron size triangles arrays proved to be active in both LSPR (measured in transmission spectroscopy) and SPR (measured on a Kretschmann configuration SPR). The refractive index sensitivity of these triangle arrays was measured to be up to 2000 nm/RIU from the SPR-active peak. Also, a penetration depth of 24 nm was calculated for microtriangles,<sup>145</sup> which is comparable to the probing distance observed in LSPR.<sup>127</sup>

Applying NSL to fabricate micro plasmonic structures provides a simple tool to tailor the physical aspect of the Au micro structures and study the optical properties on a Kretschmann configuration SPR. Recently, NSL was modified to fabricate nanohole arrays.<sup>69,143,158-162</sup> This modified technique involves etching the NSL mask with oxygen plasma. The nanospheres are etched to smaller diameter, while maintaining the position of the sphere in the crystalline lattice. Depositing a metal film on this NSL mask and removing it creates a nanohole array. Depending on the orientation of the lattice, nanohole arrays have long continuous Au film between rows of holes, while other orientations have short island-like films of Au.<sup>124</sup> This technique is also suitable to fabricate microhole arrays. It is important to map the plasmonic properties of microstructured films to assess the potential of these materials as sensing platform. Hence, micro-patterned thin films with triangles and microhole arrays must be investigated with different periodicities, hole diameter and depth (film thickness). The structure-dependant sensitivity to RI, penetration depth, spectral noise and RI resolution using Kretschmann configuration SPR will establish the potential of micro plasmonic structures for SPR biosensors.

## **3.2 Experimental Section**

### **3.2.1 Preparation of the micro plasmonic materials and continuous films**

Au triangles and microhole arrays were fabricated according to a modified NSL method published elsewhere.<sup>124,143,145</sup> Herein, the latex sphere masks were drop coated on clean glass coverslip. A 10% solution of the latex spheres with diameters of 0.65, 0.82, 1.0, 1.5 and 3.2  $\mu\text{m}$  was mixed with ethanol and water (Table 3.1). Volumes between 35-40  $\mu\text{L}$  of the mixture solution were drop coated on each clean 22 x 22 mm glass slides and dried slowly over few hours using a Petri dish cover to decrease the evaporation rate. This preparation method results in a well-ordered monolayer with large areas over 10  $\text{mm}^2$  for 1.0, 1.5 and 3.2  $\mu\text{m}$  spheres. Latex spheres of 0.82 and 0.65  $\mu\text{m}$  produced well-ordered

monolayer over slightly smaller areas. For the metallization step, a 2 nm thick adhesive layer of Ti was deposit on the sample prior the Au deposition. At this stage, if Au was deposited over this NSL mask, a pattern of metal triangles arrays remained on the glass slide following removal of the mask. The sphere masks were slightly etched prior to metallization, which allows the preparation of 50 nm thick triangles with 3.2, 1.5 and 1.0  $\mu\text{m}$  sphere masks corresponding to triangles edge lengths of 2.0, 1.0, and 0.75  $\mu\text{m}$  respectively. This process was also applied to fabricate nanotriangles with 0.82 and 0.65  $\mu\text{m}$  spheres, which result in triangles edge length of 475 and 275 nm with thicknesses of 40 and 25 nm respectively.

Table 3.1. Mixture of latex spheres, ethanol and water used to prepare sphere masks by drop coating. Volumes between 35-40  $\mu\text{L}$  of mixture solution are used to prepare a mask.

<b>Diameter (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Spheres (v%)</b>	<b>Ethanol (v%)</b>	<b>Water (v%)</b>
3.2	20	20	60
1.5	15	15	70
1.0	13	27	60
0.82	20	30	50
0.65	12	16	72

Otherwise, microhole arrays were prepared by etching the sphere mask with reactive ion etching (RIE) in an oxygen plasma chamber (Harrick PG-32). The oxygen flow was set at 15-20 mL/min in the plasma chamber, which was operated at 16 W. Four samples were etched simultaneously in the chamber with an average etch rate around 60 nm/min using these settings. Therefore, the etch time (between 2 to 75 min) controls the size of the spheres, while the periodicity of the microhole array is the initial diameter of the sphere mask. The microhole arrays prepared with this method had a small standard deviation of 70 nm on the diameter of the holes. Once Au is deposited, the spheres were removed with ultrasounds using a mixed water/ethanol solution and the microhole arrays remained on the glass slide. A series of microhole arrays with 0.65, 0.82, 1.0, 1.5, and 3.2  $\mu\text{m}$  periodicities

and a broad range of diameter were prepared with RIE using oxygen plasma. The continuous thin films were prepared by coating directly a clean glass coverslip with 2 nm of the adhesive layer of Ti and 50 nm of Au.

### **3.2.2 Physical and optical characterization of microstructured films**

The physical properties of triangles and microhole arrays were systematically measured by atomic force microscopy (AFM) in contact mode (Figure 3.1). Areas of  $5 \times 5$  to  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  (depending on the initial sphere diameter) were scanned to obtain the topographic image of the samples. The structures edge length and height for triangles or diameter and depth for microhole arrays were obtained with the cross-section analysis of the AFM image. For triangles and microhole arrays of 1.0, 1.5 and 3.2  $\mu\text{m}$  periodicity, the thickness of the metal film deposited was set at 50 nm, unless otherwise indicated. For triangles of 0.82 and 0.65  $\mu\text{m}$  periodicities, the thickness of Au was limited to  $\sim 40$  nm. The SPR measurements were performed with a home built SPR instrument in the Kretschmann configuration based on a dove prism.<sup>134</sup> The SPR response was probed from a sample area under  $10 \text{ mm}^2$ . The SPR signal was monitored in the wavelength range comprised between 400 and 900 nm with a spectrophotometer based on a 150 g/mm grating blazed at 500 nm. Each spectrum was an average of 200 acquisitions with an integration time of 20 ms/acquisition. The processed SPR spectrum was obtained in Matlab software as a ratio of the P and S polarization of light. The wavelength position of the SPR active band was calculated using a minimum finding algorithm.

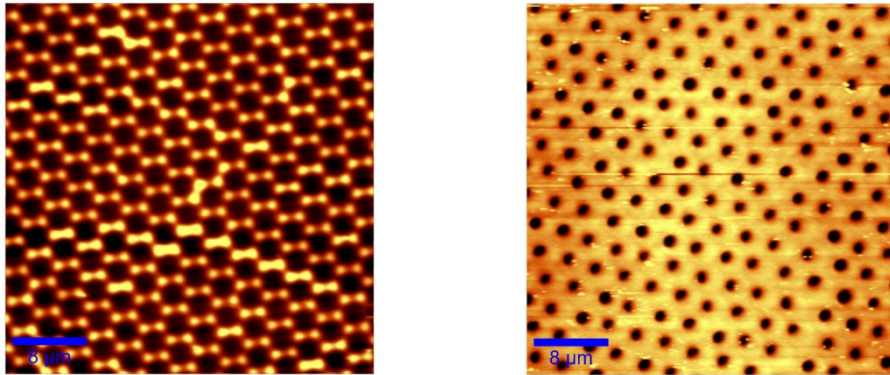


Figure 3.1. AFM images of micro-patterned thin films with micro-triangle (left) and microhole arrays (right) prepared with 3.2  $\mu\text{m}$  spheres.

### 3.2.3 Monolayer formation

A monolayer of 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHA) was formed on the Au microstructures with a 5 mM solution of 16-MHA in dimethylformamide (DMF). Samples were immersed in this solution overnight and then washed thoroughly with ethanol. The SPR response was measured in water before and after the formation of a monolayer. The difference in SPR wavelength was used to calculate the SPR response due to monolayer formation.

### 3.2.4 SPR biosensors

The glass slide with the microhole arrays, the triangle arrays or the continuous film was immersed in a 1 mM of 3-MPA-(Histidine)<sub>3</sub>-(Aspartic acid)<sub>2</sub>-OH synthesized on hydroxymethyl polystyrene resin (EMD biochemicals, Ville Mont-Royal, QC) where 3-MPA stands for 3-mercaptopropionic acid (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI). After 16 hours in the 3-MPA-(Histidine)<sub>3</sub>-(Aspartic acid)<sub>2</sub>-OH solution, the samples were washed with ethanol and dried. Then, the modified Au surfaces were placed on a wavelength interrogation SPR instrument equipped with a 100- $\mu\text{L}$  fluidic cell for kinetic measurements.<sup>134</sup> Prior to the acquisition of the S polarized spectrum, the fluidic chamber

was filled with 18 M $\Omega$  water for a stabilization period of 5 min. Thereafter, the P polarized light was used for real-time monitoring of each reaction performed on the SPR sensor. After 2 min in water, an aqueous solution composed of 100 mM N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC, Fluka) and 20 mM of N-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich) was injected for 2 min followed by a rinsing step with phosphate buffer saline (PBS, pH 4.5) for 2 minutes.<sup>163,164</sup> Immobilization of the antibody was accomplished from the reaction of 25  $\mu$ g/mL anti-human IgG (Cedarlane laboratories ltd, Burlington, ON) with the EDC/NHS activated surface for 15 minutes. The anti-IgG solution was prepared in PBS at pH= 7.4. PBS was injected for 2 minutes to rinse unbound antibody. The next step required the injection of 1 M ethanolamine solution adjusted to pH 8.5 for 5 min. This step deactivated the unreacted NHS sites on the monolayer. PBS was injected on the SPR sensor once again to result in the IgG-specific biosensor. The SPR detection of 10 nM immunoglobulin G (IgG) solution in PBS was performed for 5 minutes. Reversibility of IgG binding was monitored with PBS for 5 minutes. IgG detection was measured at least three times with each plasmonic material.

### 3.3 Results and Discussion

The potential of microstructured Au film in Kretschmann based SPR was assessed by a thorough investigation of the optical and analytical properties of these plasmonic materials. In order to be useful, these structures should improve on current analytical properties of continuous Au thin film. Moreover, the micro-patterned Au films should exhibit optical properties within the same wavelength/angle range. This would allow their use on existing SPR instruments. Therefore, the plasmonic properties were investigated with Au microhole arrays for various periodicities (spacing between holes), diameters and depths of the microhole. Each of the different physical parameters was varied independently of the others. In a first experiment, micro-patterned Au thin films of  $50 \pm 10$  nm thick were prepared with modified NSL technique using latex spheres of 0.65, 0.82, 1.0, 1.5 and 3.2  $\mu$ m in diameter. The initial diameter of the spheres is equal to the periodicity.

Secondly, triangles and microhole arrays were fabricated with different hole diameters for every period. In order to compare microhole arrays of different periodicities on the same basis, a diam/period scale was established. From this scale, three regimes were observed: triangles (diam/period  $> 0.7$ ), microhole arrays ( $0 < \text{diam/period} < 0.7$ ) and continuous film (diam/period = 0). Moreover, Au microstructures of fixed periodicity and diam/period were investigated for thicknesses varying from 20 to 200 nm (see supporting information). In this work, each of the investigated parameters is an average of at least three ( $n = 3$ ) samples. Thereby, a complete map of the structure dependant plasmonic properties was established.

### 3.3.1 Sensitivity to refractive index

The sensitivity to refractive index of the SPR active band is often used as a comparative point for different plasmonic structures. Here, the sensitivity to bulk refractive index was measured in Kretschmann configuration SPR for continuous films, triangles and microhole arrays with aqueous sucrose solutions between 1.33 to 1.39 RIU. The sensitivity of continuous film is well characterized and will serve as reference point. Due to the non-linearity of SPR in the 1.33 to 1.39 RIU range, the sensitivity for the whole range is taken into account in this work. For the continuous Au film, a linear calibration model within the 1.33 to 1.39 RIU range results in sensitivity of 2742 nm/RIU. However, the sensitivity calculated from the tangent of a polynomial fit for Au films is 1765 nm/RIU at 1.33 RIU, which increases to 2248 nm/RIU at 1.36 RIU and 3870 nm/RIU at 1.38 RIU. The sensitivity of micro-structures will therefore be compared to these values.

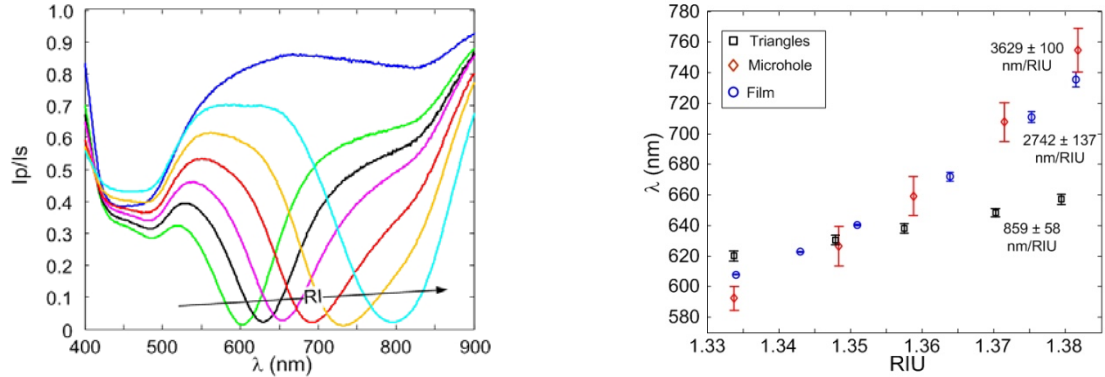


Figure 3.2. (Left) SPR calibration spectra of microhole arrays measured in air (RI = 1.0, dark blue) and sucrose solution of RI = 1.3337 (green), 1.3484 (black), 1.3588 (violet), 1.3715 (red), 1.3817 (yellow), 1.3942 (light blue). (Right) Calibration curves of SPR sensors with sucrose solutions. The calibration curve represents the average response from three independent samples.

Table 3.2. The sensitivity to refractive index between 1.33 to 1.39 RIU of the transmission maximum band with Au triangles

Periodicity ( $\mu\text{m}$ )	Edge length (nm)	Height (nm)	$\delta\lambda/\delta\eta$ (nm/RIU)
3.2	2000	49	1065
1.5	1000	46	849
1.0	750	47	796
0.82	475	37	770
0.65	275	25	869

The SPR spectrum for triangles is characterized with two transmission minima of low sensitivity and one transmission maximum of higher sensitivity.<sup>124,145</sup> The transmission maximum is the only peak considered herein, as it is the only one with a measurable sensitivity. Triangle arrays 50 nm-thick presented a SPR active transmission maximum band with sensitivity ranging from 1065 nm/RIU in 2000 nm triangles to 770 nm/RIU in 475 nm triangles (Table 3.2). It was noted that the sensitivity slightly decreases with smaller periodicity. In every case, the sensitivity of micro-triangles is lower than for continuous films. However, this is not the case for microhole arrays. Firstly, the SPR



spectrum of microhole arrays is very similar to SPR on a continuous film. A strong absorption peak is observed near  $\lambda = 600$  nm with microhole arrays, also characteristic of propagating SPR on continuous films. This plasmonic band exhibits sensitivity to refractive index, as observed from the redshift of the SPR active band with increasing refractive index (Figure 3.2, left panel). The sensitivity for every microhole arrays is equal or greater than for a continuous film (Table 3.3). The sensitivity is comprised between 4200 and 2800 nm/RIU with each microhole arrays investigated here. A significant increase in sensitivity was observed for microhole arrays with 0.65  $\mu\text{m}$  periodicity and for the 1.5 and 3.2  $\mu\text{m}$  microhole arrays near a diam/period of 0.6. Another important point to consider in the sensitivity of micro plasmonic structures is the linearity of the sensitivity with refractive index. As noted in figure 3.2 (right panel) and from the relatively small error on the sensitivity, triangle and microhole arrays exhibit a strongly linear correlation between  $\lambda_{\text{SPR}}$  and refractive index. This observation is different than for continuous thin film where sensitivity increases with larger refractive index. Therefore, microhole arrays present the advantages of increased sensitivity and linearity of the SPR response compared to continuous film.

Table 3.3. The sensitivity to refractive index in nm/RIU for Au microhole arrays with different diam/period (D/P)

<b>3.2 <math>\mu\text{m}</math></b>		<b>1.5 <math>\mu\text{m}</math></b>		<b>1.0 <math>\mu\text{m}</math></b>		<b>0.82 <math>\mu\text{m}</math></b>		<b>0.65 <math>\mu\text{m}</math></b>	
<b>D/P</b>	<b><math>\delta\lambda/\delta\eta</math></b>	<b>D/P</b>	<b><math>\delta\lambda/\delta\eta</math></b>	<b>D/P</b>	<b><math>\delta\lambda/\delta\eta</math></b>	<b>D/P</b>	<b><math>\delta\lambda/\delta\eta</math></b>	<b>D/P</b>	<b><math>\delta\lambda/\delta\eta</math></b>
<b>0.58</b>	4238	0.57	4244	0.60	3681	0.43	2929	0.39	4217
<b>0.48</b>	3325	0.43	3046	0.47	3357	0.35	3398	0.26	4145
<b>0.28</b>	3253	0.36	2924	0.29	2826	0.22	3091		
<b>0.14</b>	3281	0.30	2744	0.25	3050				

\*The sensitivity for continuous film is 2742 nm/RIU

### 3.3.2 Width of the SPR band in microstructures

The quality of the sensing performance with plasmonic materials is not only a function of sensitivity, but also on the precision at which the SPR wavelength can be measured. Generally, the precision of the SPR wavelength is closely related to the spectral aspect of the SPR active band. Specifically, the full-width at half-maximum (FWHM) and the intensity of the SPR band gives a good estimate of the precision for SPR bands. A sharp and intense band is required to improve resolution of spectroscopic techniques. In the case of microstructures, the SPR active band is either a transmission maximum for triangle or an absorption peak for microhole arrays and continuous thin films. The methodology to calculate the intensity and FWHM is demonstrated in figure 3.3 (top left). Since SPR is an asymmetrical spectroscopic peak, the intensity was measured from the baseline with the lowest intensity drop. Thus, the FWHM was measured at the halfway intensity point from this way of measuring the intensity. This provides a good estimate of both parameters.

The intensity and the FWHM of the SPR band are dependent on the physical aspect of the structures. The transition from the SPR signal obtained in triangle to the SPR signal in continuous Au films is clearly observed for microstructures with a periodicity of 3.2  $\mu\text{m}$  (Figure 3.3, top right). The SPR response of intermediate diam/period exhibits spectral features characteristic of triangle and continuous films. Initially, the SPR active band in water for triangle is a broad transmission maximum around  $\lambda = 625 \text{ nm}$ . This SPR band transitions to an absorption minimum in microhole arrays (diam/period  $< 0.7$ ). The SPR band in microhole arrays sharpens and is more intense with decreasing diam/period (as the microhole arrays increasingly resemble a continuous film). The periodicity also affects the SPR response in microhole arrays. The SPR response, with a diam/period of approximately 0.3, is sharper and more intense for 3.2  $\mu\text{m}$  periodicity, which broadens and weakens as the periodicity decreases (Figure 3.3, bottom left). Also, microhole arrays of 3.2  $\mu\text{m}$  periodicity exhibit a SPR response spectroscopically similar to continuous films.

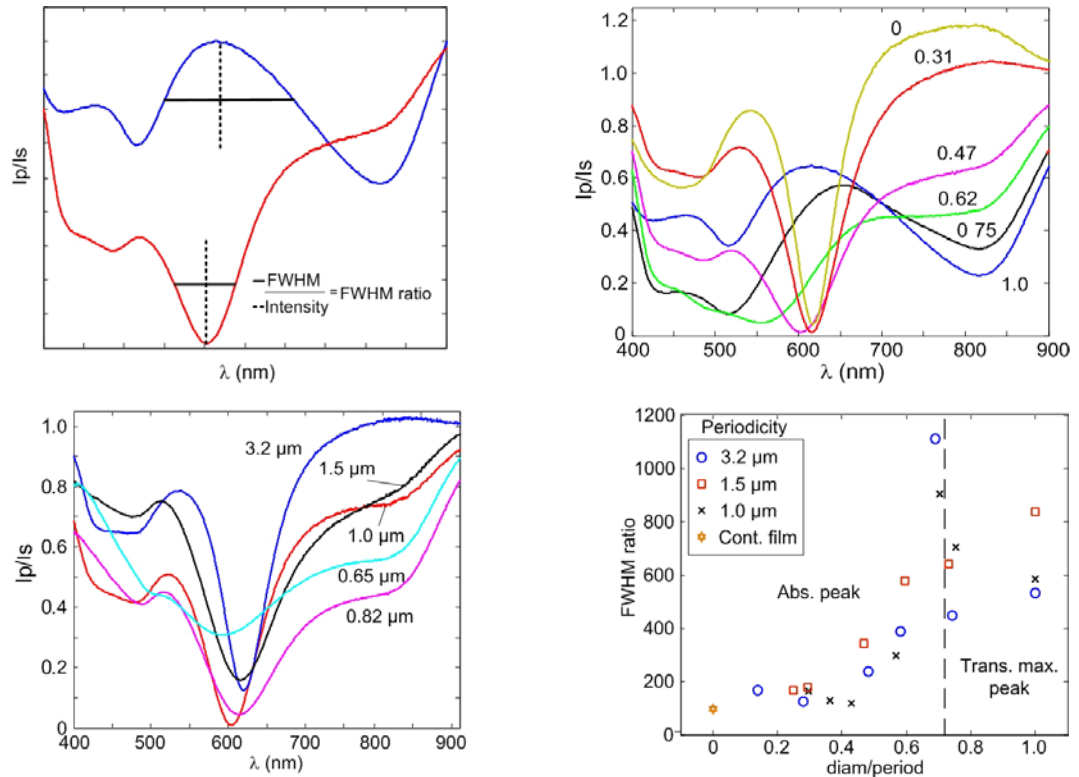


Figure 3.3. (Top left) Methodology to calculate the FWHM ratio for triangles (blue curve) and for microhole arrays (red curve). (Top right) The SPR spectra for water were measured with microhole arrays of 3.2  $\mu\text{m}$  periodicity with diam/period between 0 and 1. (Bottom left) SPR response in water for microhole arrays near 0.3 diam/period with various periodicities. (Bottom right) The FWHM ratio decreases for smaller diam/period. This value must be minimized for optical analytical performance.

In order to compare with a single parameter the variations of intensity and FWHM, the characterization of the SPR active band will be performed based on the FWHM ratio, which is the FWHM divided by intensity of the SPR band. This intensity is measured as the intensity reflected divided by the initial intensity, ranging from 0 for a complete absorption of light to 1 for 100% transmission. A small FWHM ratio indicates a sharp and/or intense SPR response while higher FWHM ratio characterizes a weak and/or broad SPR response (Figure 3.3, bottom right). Continuous film presented the lowest FWHM ratio at approximately 100. For microhole arrays of diam/period  $< 0.5$ , the FWHM ratio is

relatively constant between 100 and 200, similar to continuous film. This indicates that the periodicity slightly impacts the FWHM ratio for smaller diam/period, which exhibit the lowest FWHM ratio. However, for microhole arrays of diam/period  $> 0.5$ , the FWHM ratio increases rapidly to nearly 1000 for diam/period of 0.7. Triangles also exhibit a FWHM ratio greater than 500. The optimal sensing platform should combine both high refractive index sensitivity and resolution. Therefore, the structures with optimal sensitivity and FWHM ratio are microhole arrays with diam/period between 0.5 and 0.1.

### 3.3.3 Penetration depth ( $l_d$ )

In biosensing, a shorter  $l_d$  increases the SPR response of the sensing platform for binding events occurring close to the Au surface. Therefore, a short  $l_d$  is highly advantageous in a biosensor format where the measurement principle is based on surface binding events. The penetration depth is a measure of the distance that the SPR electric field probes into the surrounding medium. For continuous film,  $l_d$  is usually between 200 to 500 nm,<sup>4</sup> but in our experimental conditions, the  $l_d$  is roughly 230 nm. However, the penetration depth is much smaller at around 20 nm with nanoparticles LSPR.<sup>127</sup> The penetration depth for triangle and microhole arrays was experimentally measured with the SPR response to the formation of a monolayer of 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHA). The excitation wavelength of the SPR band was measured in water before and after the formation of a monolayer. The difference in the SPR response gives the SPR shift ( $\Delta\lambda$ ) due to the formation of a monolayer.

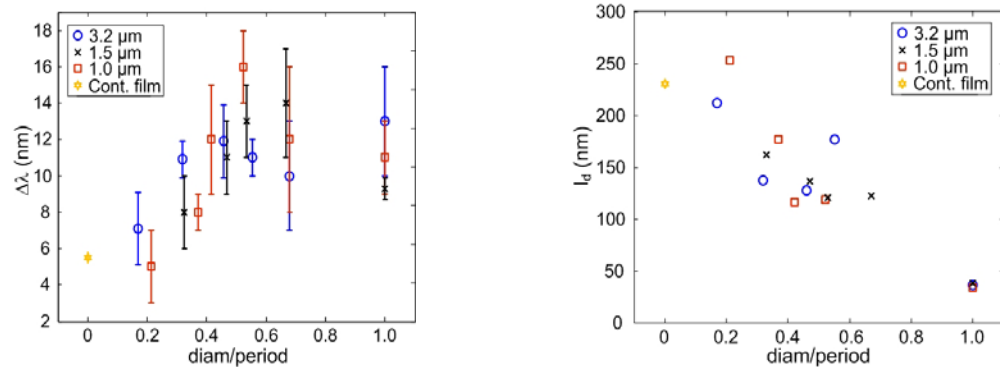


Figure 3.4. (Left) Wavelength shift of the SPR absorption band measured in water solution from the formation of a 16-MHA monolayer and (Right) the calculated penetration depth from this shift.

The lowest response to formation of a monolayer was obtained with the continuous Au film. The SPR shift initially increases with larger diam/period and plateaus for microstructures of larger diam/period (Figure 3.4, left). Triangles and hole arrays with a diam/period  $> 0.5$  present the highest SPR response  $\Delta\lambda = 12$  nm, which is over 2 times greater than the SPR response with continuous film ( $\Delta\lambda = 5.5$  nm). The penetration depth can be obtained experimentally from the SPR response of the monolayer formation. The calculations were performed based on the equations introduced by Jung *et al.*<sup>71</sup> The calculated  $l_d$  showed a linear decrease of the penetration depth with increasing diam/period. Thus, a continuous film exhibits a  $l_d$  of 230 nm and micro plasmonic structures have a tunable  $l_d$  between 250 to 30 nm (Figure 3.4, right). Triangle and microhole arrays present a penetration depth shorter than for continuous film. This shorter penetration depth is advantageous as it results in a larger SPR response from binding events. Therefore, microhole arrays have a great potential as sensing platform because of its high refractive index sensitivity, excellent FWHM ratio and improved response to binding events. Hence, the following sensing experiments were performed with 3.2  $\mu\text{m}$  microhole arrays with diam/period = 0.5.

### 3.3.4 Sensing performances with microhole arrays

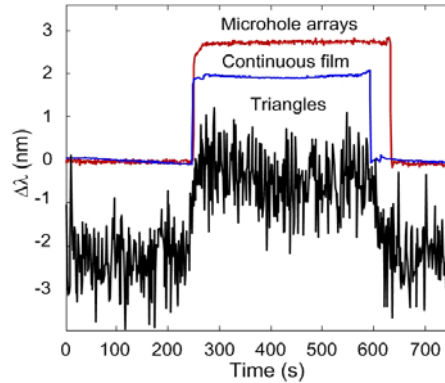


Figure 3.5. Sensorgrams for SPR sensors with different plasmonic materials. A short exposition of the sensor to water (1.33400 RIU) is followed by a phosphate buffer solution (PBS, 1.33566 RIU). The SPR response of triangles (dark lines) is offset for ease of representation.

In this section, the sensing performances of 3.2  $\mu\text{m}$  microhole arrays with diam/period of 0.5 are compared with triangle of 1.8  $\mu\text{m}$  edge length and continuous thin films which are currently used as a SPR sensing platform. Analytical parameters such as the spectral noise and the refractive index resolution were investigated in kinetic experiments. The SPR signal was measured as a function of time in water and phosphate buffer solution (PBS) ( $\Delta\text{RI} < 0.002$ ). Water and PBS was successively injected on the SPR sensors made with the different plasmonic materials (Figure 3.5). The sensorgram measured with triangles and continuous film present a similar SPR response of  $\Delta\lambda = 1.8$  nm while microhole arrays exhibit a greater shift at  $\Delta\lambda = 2.7$  nm (Table 3.4). The spectral noise was calculated as the standard deviation of 100 data points for the SPR measurement in PBS. The spectral noise for the sensorgram with triangle arrays (0.096 nm) is greater than 1 order of magnitude worse than for continuous film and microhole arrays (0.0027 and 0.0055 nm respectively). The slightly larger noise with microhole arrays compared to continuous film can be explained by the somewhat larger FWHM ratio observed with microhole arrays. The RI resolution was determined from the spectral noise divided by the sensitivity to refractive index. The resolution with microhole arrays and continuous thin

film is  $1.5 \times 10^{-6}$  RIU, while the resolution with triangle arrays is limited to  $10^{-4}$  RIU. The significantly worse RI resolution of triangle arrays is caused by the lower sensitivity and the larger FWHM ratio. It is important to note that the resolution was obtained without data pre-processing, which could improve the RI resolution by nearly 1 order of magnitude.<sup>134</sup> Thus, microhole arrays and continuous films are comparable platforms in terms of resolution and spectral noise. However, microhole arrays showed improved SPR response in other experimental conditions, as described in the sections above.

Table 3.4. Analytical parameters of triangles, microhole arrays and continuous film in kinetic measurement

	$\Delta\lambda$ (nm)	Spectral noise (nm)	Resolution (RIU)
<b>Continuous film</b>	$1.8 \pm 0.3$	0.0027	$1.5 \times 10^{-6}$
<b>Microhole arrays</b>	$2.7 \pm 0.4$	0.0055	$1.5 \times 10^{-6}$
<b>Triangles</b>	$1.8 \pm 0.4$	0.096	$1.1 \times 10^{-4}$

### 3.3.5 IgG biosensors with different plasmonic materials

The potential of using plasmonic microstructures as a biosensing platform was investigated with the detection of 10 nM IgG. In this experiment, the SPR response to IgG was measured with microhole arrays, triangle arrays of 1.8  $\mu\text{m}$  edge length and continuous film. The surface of each plasmonic material was functionalized with anti-IgG, resulting in a specific response to IgG. The SPR response with triangles within the first 300 seconds is much greater than for the microhole arrays and for the Au thin film (Figure 3.6). The SPR response to 10 nM IgG was the largest for the triangle arrays at  $(2.1 \pm 0.6)$  nm, significantly larger than for microhole arrays ( $0.91 \pm 0.18$  nm) and for continuous film ( $0.69 \pm 0.11$  nm). The increase in the SPR response to IgG with microstructures compared to thin Au film is likely to be due to the shorter penetration depth for these materials. Continuous films have the longest penetration depth of these plasmonic materials and results in the smallest response to the IgG binding event. Microhole arrays have a shorter penetration depth than

the continuous film, thus a larger SPR response. Lastly, IgG binding to the triangle arrays exhibited the shortest penetration depth among the plasmonic materials tested and has the largest response to IgG binding. A shorter penetration depth generally results in a greater SPR response to binding events occurring close to the sensing surface. This demonstrates that micro plasmonic materials are advantageous for biosensing.

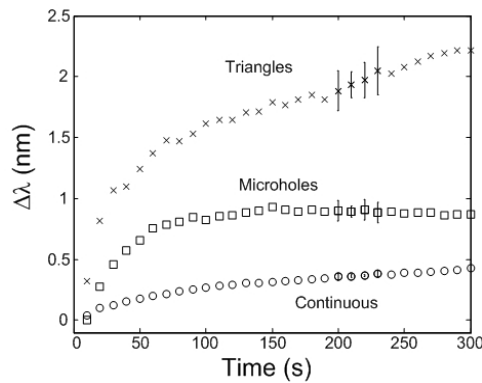


Figure 3.6. Sensogram for the detection of 10 nM IgG with different plasmonic materials; triangles (x), microhole arrays (□), and continuous film (o). The error bars represent two standard deviations on the data points.

### 3.4 Conclusions

Metallic thin films with triangle or microhole arrays are active in SPR when excited in Kretschmann configuration SPR. These micro plasmonic materials exhibited structure-dependant plasmonic properties which improve the sensing performance of SPR compared to continuous Au film. The sensitivity to refractive index and the sensitivity to monolayer formation or binding events were improved with microhole arrays. Otherwise, the refractive index resolution, the FWHM ratio, and the spectral noise were all equivalent or similar to continuous Au film. The optimal microstructure was found to be microhole arrays of diam/period = 0.5. Other advantages of these micro plasmonic materials include the ease of fabrication and the use of current SPR instrument without modifications. To demonstrate the biosensing potential of these materials, an IgG biosensor was constructed



on triangle and microhole arrays using standard chemical derivations of the surface. The SPR response for a 10 nM IgG solution was improved significantly with triangle and microhole arrays compared to the response obtained with continuous thin films. Therefore, these structures could replace currently used continuous Au film, with minimal modifications to protocols.

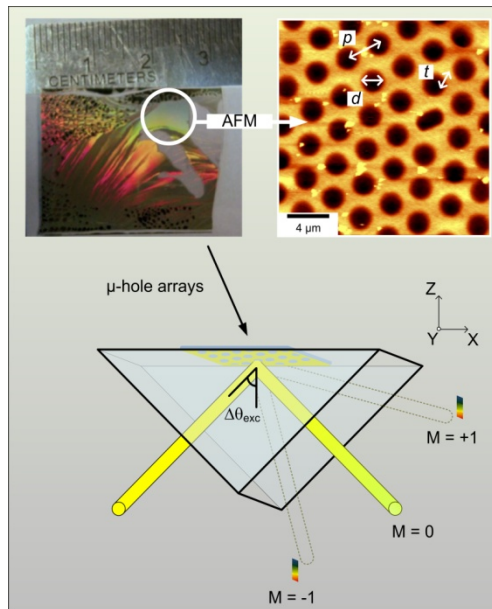
### **3.5 Acknowledgments**

Financial support was provided by NanoQuébec, the Canadian Space Agency, the Canada Foundation for Innovation (CFI), the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

**Supporting Information Available in Annexe 2 from pages V to VII.** The effect of the Au film thickness on the SPR response is included in supporting information. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## Chapitre 4 Enhanced biosensing using excitation of localized and propagating surface plasmons in microhole arrays

Les chapitres 2 et 3 démontrent expérimentalement le caractère plasmonique distinct des films microstructurés, mais ne fournissent pas d'explications concernant les mécanismes plasmoniques derrière ces observations. Ce chapitre englobe les observations des chapitres précédents et propose un mécanisme expliquant l'augmentation de sensibilité notée pour les films microstructurés en comparaison avec les films continus. Dans son ensemble, le mécanisme théorique et les observations empiriques prouvent la singularité de la nature plasmonique des films microstructurés ainsi que leur potentiel comme surface de détection.



Live, L. S.; Dhawan, A.; Gibson, K.F.; Graham, D.; Canva, M.; Vo-Dinh, T.; Masson, J. F. *Proc. Natl Acad Sci*, submitted August 23<sup>rd</sup> 2011.

### *Abstract*

Current state-of-the-art surface plasmon resonance (SPR) sensing based on continuous films can be improved beyond instrumental limitations by introducing microhole array patterns into the film, which enhanced the sensing response from the bulk and surface refractive index (RI) by at least 3 times. The nature of this sensing enhancement in a prism-based configuration (Kretschmann configuration) originates from the distinct plasmonic properties of microhole arrays. Variations in the excitation angle ( $\theta_{\text{exc}}$ ) reveal a transition of the SPR properties at which the plasmonic bands characteristic of localized and propagating surface plasmons (SP) decouple, leading to an anomalous dispersion and to enhanced bulk sensitivity. In addition, microhole arrays exhibit higher electromagnetic field (EM) distribution locally at the inner edge of holes, which is characteristic of hole arrays excited in LSPR and Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) microscopy. Numerical simulations of microhole arrays by rigorous coupled-wave analysis (RCWA) accurately predict the enhancement with microhole arrays. Experimentally, this enhancement occurs at an optimal  $\theta_{\text{exc}}$ , RI window and for a given geometry of the microhole arrays substrate (periodicity, hole diameter and depth). Importantly, the SPR response to molecular adsorption processes is also amplified, illustrated by immobilization of anti-IgG and the detection of IgG. These results provide evidences of the plasmonic properties of metamaterials, which helps bridging the gap between localized and propagating SPR. It also demonstrates the advantages of using microhole arrays instead of classical thin films for SPR sensing, and the potential for their use in SP-coupled experiments, such as SPR-SERS.

## **4.1 Introduction**

The properties of plasmonic materials emerge from the electromagnetic (EM) field generated by the SP waves (or polaritons), which are the collective oscillation of free electrons at the metal/dielectric interface.<sup>3,4</sup> Arising from this enhanced EM field, the plasmonic materials exhibit high sensitivity to refractive index and the presence of

molecules at the vicinity of their surface, which makes them particularly well suited for label-free optical sensing of bioanalytes.<sup>3,4,165,166</sup> In addition, other applications exploit the excitation of the SP on the metallic surface to greatly increase the EM field generated for various applications in surface-enhanced spectroscopies [Raman, *SERS*,<sup>10,13,81</sup> fluorescence, *MEF*,<sup>167,168</sup> infrared, *SEIRAS*<sup>85,169</sup>], sub-diffraction limit microscopy (*apertureless near-field scanning optical microscopy* (NSOM)),<sup>100</sup> photothermal treatments<sup>170</sup> and drug delivery<sup>171</sup> in biomedicine. The increasing interest in plasmonic materials underlines the importance of further understanding and controlling plasmon effects.

The optical properties of plasmonic substrates are closely related to the physical aspect (*i.e.* metal composition, size and shape) of the material. More specifically, the size of the plasmonic material is a crucial physical feature that influences the behavior of the SP waves.<sup>3,4</sup> For example, the energy of the EM field is much greater in nanometric materials (*i.e.* nanoparticles, nanorods) as the SP is confined to a small area in comparison to a propagating SP on a continuous film, in which the EM field is delocalized over an area of few tens of  $\mu\text{m}^2$ . Each mode gives rise to distinct plasmonic regimes: localized surface plasmon for nanomaterials, and classical surface plasmon resonance for thin Au films. Although for most plasmonic materials the nature of the SP dictates if excitation is produced by direct illumination or by prism-coupling, both localized and propagating SP can be excited simultaneously as demonstrated in extraordinary transmission of sub wavelength holes directly excited by light<sup>68</sup> and with nanoporous membrane excited in total internal reflection.<sup>172</sup> Studies of materials exhibiting plasmonic properties characteristic of both LSPR and SPR has attracted recent interest and attention has been mainly focused on integrating nanometric features to macroscopic films.<sup>173,69</sup> Materials exhibiting length scales at the micrometer size are intermediates between the classical boundaries of LSPR and SPR. Recently, it was demonstrated that these metamaterials are suited for excitation of a propagating surface plasmon in microhole arrays with high sensitivity to refractive index,<sup>124,145</sup> providing solid evidence to further investigate plasmonic metamaterials.

Contemporary commercial SPR instrumentation employing the classical thin Au film is mainly limited by the instrumentation (*i.e.* light source, glass prism, camera, and spectrometer), engineering new methods for analysis and data treatment.<sup>72</sup> The investigation and development of novel plasmonic materials has been targeted as a strategy to improve classical SPR sensing. By tailoring the physical aspect the plasmonic properties of metal - such as the enhancement factor in SERS<sup>85</sup> and the sensitivity to molecular adsorbate in SPR<sup>5</sup> - improve with the intensity of the EM field generated by SP waves at physical boundaries. Recent examples exploit the SP excited at normal incidence in nanostructured films, such as for nanohole arrays,<sup>68</sup> nanotriangle arrays<sup>149</sup> and nanogratings.<sup>77</sup> These structures focus the SP locally at the edges of the structure, increasing the EM field and consequently the plasmonic field optical effect. Excitation of localized SP is also possible in total internal reflection (TIR) excitation with micro- and nanogratings<sup>174</sup> and nanoposts<sup>76</sup> improving the sensing properties. Other designs of LSPR and SPR coupling were developed using nanoparticles to enhance the SPR sensing related to the diffraction of gratings.<sup>80</sup> Moreover, the diffracted light in structured films has enough momentum to excite SP without a prism, thus adding complexity to these materials.<sup>25</sup> While these nanostructures exhibit good sensing properties at close vicinity to the surface, their sensitivity remains lower than classical continuous SPR films. In addition, to benefit from the existing state-of-the-art instrumentation, the development of plasmonic materials with sensing performance surpassing classical thin films and providing local EM field enhancement would create a new generation of plasmonic materials suited for the novel SP-coupled techniques and for implementation in contemporary SPR instrumentation.

Recent advances in optical characterization of plasmonic metamaterials showed that microhole arrays were improving thin films sensitivity to bulk refractive index and to the detection of molecular adsorbates.<sup>46,145</sup> In particular, the propagating SP excited in Kretschmann configuration on microhole arrays has the potential to exhibit high sensitivity for biosensing applications. These materials are also adapted for use with classical SPR instruments or with LSPR configuration and hole arrays are known substrates for Raman

enhancement. While the plasmonic properties are still poorly understood for microhole arrays, this paper describes that an anomalous dispersion relation is observed derogating from the Fresnel equation of thin Au film and dispersion relations of nanostructures substrates. Numerical simulation indicates that the distinct SPR properties of microhole arrays are in part related to a grating effect. Integration of the microhole arrays to existing SPR technology could significantly improve sensing limits in relation to existing plasmonic materials.

## **4.2 Materials and methods**

### **4.2.1 Surface plasmon resonance and Raman microscopy measurements on microhole arrays**

The method for the fabrication and characterization of the microhole arrays was adapted from previous reports,<sup>46,175</sup> and is explained in details in supporting information. Briefly, microhole arrays were prepared using a modified nanosphere lithography (NSL) method, where the periodicity is controlled by the initial diameter of the microsphere and the diameter of the hole depends on the duration of the etching process. A gold film of 50 to 150 nm thickness was sputtered on the NSL mask, which was then removed by sonification to create the microhole array. SPR measurements were performed on an angulo-spectral instrument from 400 to 900 nm and with angles ranging from 70 – 77 degrees (details in supporting information). Raman microscopy measurements were performed at 633 nm laser excitation with a 100x dry objective, which provides near-diffraction limited spatial resolution (details in supporting information). A monolayer of 4-nitrobenzenethiol was formed on the microhole arrays to image the distribution of the electric field on the microhole arrays. Enhanced biosensing with microhole arrays was demonstrated with the detection of IgG with a substrate functionalized with anti-IgG (details in supporting information), in comparison to the response from a thin Au film of 50 nm thickness. Angulo-spectral SPR response of the immobilization of anti-IgG and the

detection of IgG at various excitation angles optimized the response of microhole arrays. Thus, real-time kinetic measurements of the IgG detection were performed at  $72.6^\circ$  for microhole arrays of 70 nm depth, with at least four identically prepared substrates.

## 4.2.2 RCWA simulations

3-D Rigorous Coupled Wave Analysis (RCWA) calculations<sup>173,176</sup> of reflectance from the microhole array structures were carried out using DiffractMOD 3.1 software. In the RCWA calculations carried out for the microhole array structures, TM polarized plane waves (at different wavelengths and angles of incidence) were incident on the hexagonal array of microholes in a thin gold film and the reflectance calculated as a function of the incident angle or wavelength. In the simulations, the thickness of the gold films was modeled at 50 nm - the gold films being deposited on a 1 nm thick chromium adhesion layer which is deposited on BK7 glass substrates having refractive index (RI) of  $\sim 1.517$ . Other experimental details are provided in supporting information.

## 4.3 Results and discussion

### 4.3.1 Propagating surface plasmon waves in microhole arrays

Plasmonic materials with features on a shorter length scale than the wavelength of light are explained by the localized surface plasmon resonance (LSPR) theory.<sup>5</sup> Metamaterials with features of a length scale greater than the wavelength of light and shorter than the propagation distance of the SPP in a thin Au film are not well understood. Characterizations of such materials were performed with thin Au films patterned with hexagonal array of circular holes with a periodic interval of  $3.2 \mu\text{m}$  over an area of few  $\text{mm}^2$  on a BK7 substrate. Depending on the orientation of the microhole arrays with respect to the incident photons, strips of Au with a length scale greater than the propagation distance or short island-like films of Au are presented to the incident light beam. While this

effect of orientation of the sample is expected to influence the SPR response, the area on the microhole arrays substrate is sufficiently large enough to interrogate a distribution of orientations due to the imperfect nature of the NSL method employed to fabricate the samples. Indeed, crystalline regions with different orientations relative to each other are characteristic of hole arrays prepared by NSL and will result in the investigation of a distribution of orientations.

The SPR dispersion relation characterizes plasmonic materials with an SPR excitation dependant to the incident wavelength, thus providing valuable information about the optical properties related to the physical aspect of materials. The dispersion relation of the SP excited in microhole arrays was characterized and compared to continuous films to investigate the spectral effects of the presence of patterned holes into the film as well as the influence of the hole depth. The optical properties such as the RI sensitivity and bandwidth of the plasmonic response for thin continuous films (commercial SPR chips) are the reference in SPR sensing. In the Kretschmann configuration of SPR, these optical properties emerge from a SP wave propagating over tens of microns along the film axis, which interrogate the dielectric medium adjacent to the metallic film for the length of the penetration depth.<sup>3,4</sup> The excitation of SP waves occurs when the SP wavevector momentum (eq 4.1) matches the excitation light momentum (eq 4.2) along the surface axis resulting in a strong absorption band in the reflectance spectrum. In this case, the photon is converted into a surface plasmon polariton (SPP), which results in an intensity decrease through loss in the metallic film. Patterning the metal film modifies the propagation of the SP wave, such that it should be reflected in the dispersion relation.

Equation 4.1 
$$K_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

Equation 4.2 
$$K_x = K_0 \sin \theta_{exc} = \frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin \theta_{exc}$$



The SPR dispersion relation ( $\omega$ - $Kx$ ) for a continuous and thin metallic film of dielectric constant  $\epsilon_m$  surrounded by another dielectric medium ( $\epsilon_d$ ) shows decreasing surface plasmon momentum ( $K_{sp}$ ) with decreasing excitation momentum ( $Kx$ ). P-polarized light in the visible-NIR spectral window incident at a given excitation angle ( $\theta_{exc}$ ) fulfills the set of resonant conditions for propagating SPR with noble metals (*i.e.* Au and Ag). The propagation of SP waves at the metal surface is affected by the nature of the metal film, its thickness and roughness. Thus, the measurement of the dispersion relation provides a tool to investigate the plasmonic nature of novel materials, such as microhole arrays.

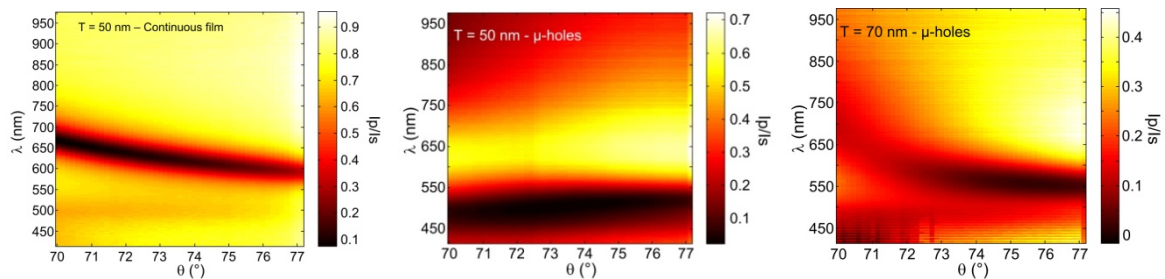


Figure 4.1 – Angulo-spectral images of SPR dispersion in water ( $\eta_{\text{water}} = 1.333$ ) for a continuous film 50 nm thick (Left) and microhole arrays (p: 3.2  $\mu\text{m}$ , d: 1.8  $\mu\text{m}$ ) of 50 nm (center) and 70 nm (Right) depth.

A propagating SP features a strong dependence on the excitation wavelength for different excitation angle. Angulo-spectral images of a 50 nm thick Au film and microhole arrays in water ( $\eta = 1.333$ ) demonstrates that the continuous film and microhole arrays of 70 nm support a propagating SP waves, which is absent for the microhole arrays with shallower holes (Figure 4.1). For microhole arrays with holes of 50 nm depth, corresponding to the optimal SPR thickness for continuous films, the dispersion relation shows two plasmonic bands at  $\lambda \sim 550$  nm and in the near-infrared region (NIR) region at  $\lambda > 700$  nm; invariable to  $\theta_{exc}$ . The wavelength spectra of these microhole arrays are similar to the ones previously observed in microtriangle arrays that did not support a propagating SP.<sup>145</sup> Increasing the film thickness changes  $\epsilon_m$  properties allowing the excitation of a propagating SP. Thus, the dispersion relation for microhole arrays features dual properties

that are characteristic of the non-propagating and propagating SP. A plasmonic band, comparable to the SPR dispersion in thin film, exhibits an exponential increase in wavelength for decreasing  $\theta_{\text{exc}}$ . In addition, this plasmonic band is degenerate in two plasmon bands at a transition angle of nearly 74-75° (Figure 4.1 – Left). The second band is relatively invariable to angle, characteristic of the non-propagating plasmonic band in microhole arrays with shallower holes or microtriangle arrays. The film thickness between 50 to 70 nm constitutes the limitation for microhole arrays with a 3.2  $\mu\text{m}$  periodicity and 1.8  $\mu\text{m}$  hole diameter to support a propagating SP. The effect of thickness noted here for microhole arrays is in agreement with previous observations on microhole arrays at excited at a fixed angle, which demonstrated characteristics of propagating SP with thick triangles holes.<sup>46</sup>

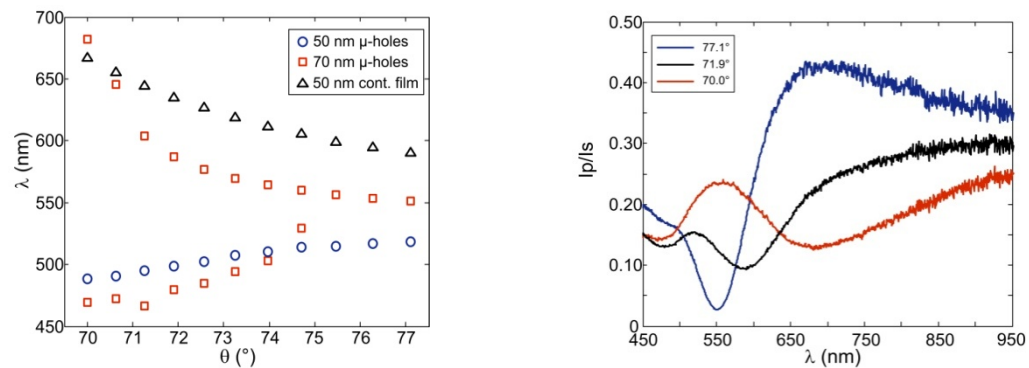


Figure 4.2 – Spectral characteristics of microhole arrays (Left) The wavelength position of the plasmonic bands for microhole arrays of 50 nm (blue circles) and 70 nm (red squares) and for a 50 nm-thick continuous film (dark triangles). (Right) Spectra of the plasmonic band measured in total internal reflectance for microhole arrays of 70 nm depth excited at three different  $\theta_{\text{exc}}$ .

The analysis of the plasmonic wavelength in microhole arrays highlights a unique dispersion relation as the position of the momentum-matching conditions increase at a faster rate at  $\theta_{\text{exc}}$  lower than the degenerescence of the plasmonic band (Figure 4.2 - Left). Whilst the plasmonic wavelength of a continuous film monotonically increases through the  $\theta_{\text{exc}}$  range due to the increasing  $\epsilon_m$  of Au, the microhole arrays (70 nm depth) features a

more complex behavior. For  $\theta_{\text{exc}} > 73^\circ$ , microhole arrays exhibit a plasmonic band at lower wavelength than a continuous film, which slowly increases similarly to the continuous film. For  $\theta_{\text{exc}} < 73^\circ$ , the plasmon wavelength of microhole arrays increases by more than 100 nm for  $\Delta\theta_{\text{exc}} \sim 3^\circ$ , a rate significantly greater than for the continuous film. This anomalous behavior cannot be explained solely by the increasing dielectric constant for Au. In addition, at the transition angle of  $\theta_{\text{exc}} \sim 73^\circ$ , the plasmonic band decouples into a highly dispersive band and weak blueshifting band at  $\lambda < 500$  nm. This is particularly evident in the constant angle reflectance curves, where the sharp and intense plasmonic band for high  $\theta_{\text{exc}}$  transition to a broad and weak band with decreasing  $\theta_{\text{exc}}$  (Figure 4.2 - Right).

Absorption in microhole arrays involves the contribution of deeper-lying electrons absorbing higher energy photons at sharp  $\theta_{\text{exc}}$ , while surface electrons of weaker energy photons are absorbed at smaller  $\theta_{\text{exc}}$ . High energy absorption in microhole arrays is comparable to LSPR absorption in nanoparticles.<sup>5</sup> Moreover, excitation of deeper-lying electrons close to Au interband transition dampens the oscillation of surface plasmons.<sup>177,178</sup> Thus, the strong absorption at short wavelength suggests the presence of localized SP in microholes. The propagating SP, excited close to the NIR region, is highly scattered at the microhole surface, which broaden the plasmonic band in reflectance spectra. The degradation of the plasmonic band increases with the excitation wavelength as the SP waves propagate over a greater distance. The absorption band around  $\lambda = 580$  nm for  $\theta_{\text{exc}} \sim 73^\circ$  present an intermediate aspect as both deeper-lying and surface electrons contributes to the signal. These features are observed solely with deeper microhole arrays as continuous film only exhibit propagating SP and shallower microhole arrays support a localized SP in the interband transitions region.

### 4.3.2 Concentration of SP waves into holes

Localization of the excited SP in microhole arrays can be confined into the holes. The presence of high energy LSP is well known and characterized in sub-wavelength nanohole arrays as the enhanced EM field is concentrated into holes and increases the local sensitivity to RI changes.<sup>67</sup> It is anticipated that the zero order excitation of microhole arrays would occur in the near-IR to mid-IR region<sup>68</sup> due to the periodicity of microhole arrays. While the lower mode of excitation (such as (1,0), (0,1), (1,1) of hole arrays) cannot be excited in the visible spectral range for microhole arrays, higher modes of LSP or grating modes of the microhole arrays are accessible by direct illumination. Although the presence of holes increases the possibility to observe a localized EM field, no evidence has been previously reported.

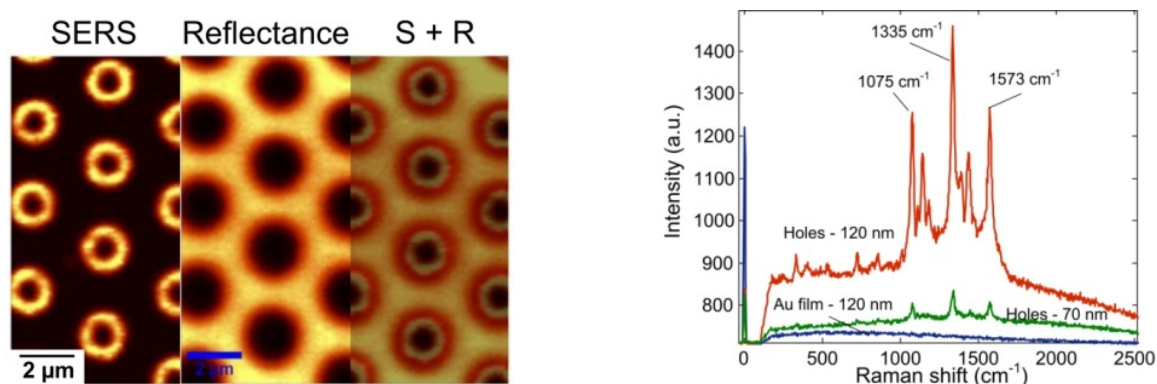


Figure 4.3 –SERS and reflectance images of 4-nitrobenzene thiol (4-NBT) monolayer on microhole arrays of 120 nm depth. (Left) False color image of the  $1573\text{ cm}^{-1}$  (vC-C) vibration (SERS) located at the center of the hole (Reflectance image), with an overlay of the two images (S+R). (Right) Overlay of the SERS spectra for microhole arrays of 120 nm depth (red) and 70 nm depth (green), and for a continuous film of 120 nm thickness (blue).

Raman microscopy provides a powerful tool to image the localization of surface plasmons on a surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate. Regions of high Raman intensity are correlated to the highest EM field generated by the plasmonic material. Thus, a set of microhole arrays (p:  $3.2\text{ }\mu\text{m}$ , d:  $1.8\text{ }\mu\text{m}$ ) with thicknesses of 50, 70, 120 and

150 nm were prepared to investigate the localization of SP using SERS microscopy. The SERS response was measured with an excitation laser of 632.8 nm for a 4-nitrobenzenethiol (4-NBT,  $1573\text{ cm}^{-1}$  (vC-C) vibration of 4 - NBT) monolayer on the surface of microhole arrays. The Raman images show evidence of a localized surface plasmon, with donut-shaped regions of high field intensity (Figure 4.3 - Left), similar to the previously reported prediction by numerical simulations for nanohole arrays.<sup>162</sup> The reflectance image of the laser produces a high-resolution image of the microhole substrate (Figure 4.3 - Left). The superposition of the SERS and reflectance image (S + R) from the same region clearly indicates the presence of a localized EM field at the rim of the microholes. SERS images for microhole arrays of different depths show a similar amplified response around the rim of the microholes (see supporting information, Figure S1).

While the localization of the region of high Raman response remains identical regardless of the depth of the microholes, the intensity of the SERS response for 4-NBT varies with the depth. A ratio of the SERS signal of 4-NBT in the region of high intensity amplification *versus* the signal from the metal between the holes indicates that the SERS response is amplified by about a factor of 2 with 120 nm-deep microhole arrays (see supporting information, Table S1). The amplification is relatively small in comparison to that observed from other classes of SERS substrate. The low amplification can be attributed to LSP being a relatively weak phenomenon in microhole arrays. Evidence of strong localized SP excited in the vis-NIR region is observed by SERS with nanometric structures such as triangular nanoparticles or sub-wavelength grating where the Raman signal is amplified in the order of 100-1000 times<sup>179,180</sup> compared to rough metallic surfaces. Although weak, SERS amplification in microhole arrays probed in the visible-NIR region is not negligible. The 2-fold amplification agrees with results obtained from previous FDTD calculations and Raman mapping of nanohole arrays with a smaller periodicity in which the same donut-shaped high intensity region was observed (manuscript in preparation). The enhanced electric field around the rim of the nanohole was on the order of

1.3 to 1.5 for nanoholes that do not exhibit a strong SP at the Raman wavelength, which agrees with the factor of 2 improvement of the Raman response ( $I_{\text{Raman}} \propto E^2$ ).

Although excitation of strong SP should be in the infrared region for microhole arrays, a weaker SP mode can be excited with a wavelength smaller than the holes. This SP mode observed in the Raman images arises from the excitation of the propagating SP by the 632.8 nm laser. The SPP propagates radially around a hole in a metallic structure.<sup>181</sup> The high scattering of the SPP in an array of hole results in a fringe pattern where the electron density is higher at the boundary of the rim of the hole. The localization of a higher EM field around the rim of the microhole is of utmost importance, as it indicates that microhole arrays would preferentially sense molecules adsorbed to the rim of the microhole, instead of on the terrace of the continuous part of the film.

### 4.3.3 RCWA simulation of the SPR response

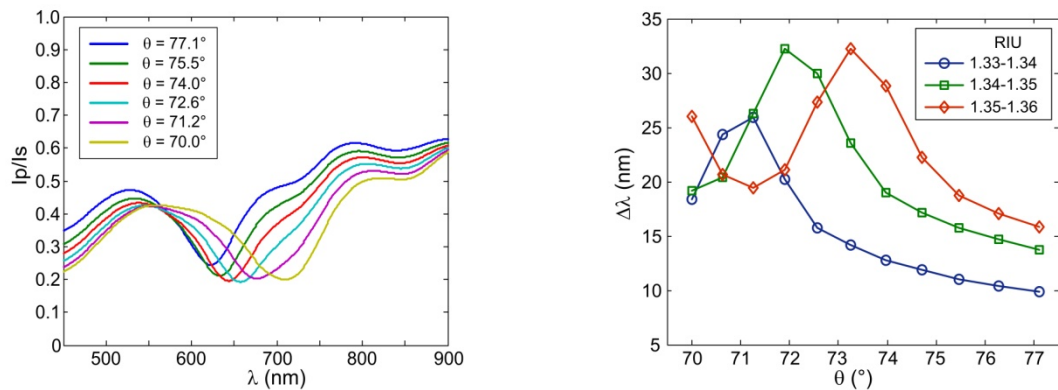


Figure 4.4 – RCWA simulation of the response for Au microhole arrays (p: 3.2  $\mu\text{m}$ , d: 1.8  $\mu\text{m}$ , t: 50 nm). (Left) Reflectance spectra of the dispersive plasmonic band in water ( $\eta = 1.333$ ) and (Right) angular SPR response of microhole arrays to variations of 10 mRIU.

Rigorous coupled-wave analysis (RCWA) of the diffraction of the electric field by the microhole arrays provides an adequate model for SPR sensors. Simulations were

performed to cover the angular range of 40-85°, the wavelength range of 450-900 nm and RI from 1.33 to 1.36 RIU (see supporting information, Figure S2). The rotation of the sample versus the incident electric field was set at 0°, as this parameter cannot be controlled with the actual microhole arrays. The wavelength spectra of the different RI solutions and angle of excitation are in good agreement with the experimental spectra. As expected, the simulations accurately predict that a plasmonic band near 600 nm redshifts for higher RI to near 700 nm (Figure 4.4 - Left). The angle range of 70 to 77° where the plasmonic bands are active is also in agreement with the experimental data. The simulation of the shift in the SPR wavelength for RI jumps of 10 mRIU at different incident angles exhibit an unexpected behavior. For SPR on a thin Au film, a monotonous increase of wavelength jump is expected by decreasing the incident angle. However, for simulated microhole arrays, the wavelength shift reaches a maximum value at a specific excitation angle (Figure 4.4 - Right). Further decreasing the excitation angle leads to smaller wavelength shifts. In addition, the maximum sensitivity occurs at a different excitation angle for different RI ranges. These unexpected results must be verified experimentally (see the following section), but they may form the underlying basis for the enhanced sensitivity previously observed for microhole arrays.<sup>46</sup>

#### **4.3.4 Performance of SPR sensors based on microhole arrays – Bulk sensitivity**

Bulk sensitivity to refractive index is often employed as comparison point between different plasmonic materials, in addition to being an indicator of the potential use of the material as sensing template. In previous work, mapping of the sensitivity of microhole arrays with various periodicity and hole arrays showed an improvement as high as ~50% in bulk sensitivity with microhole arrays of 3.2  $\mu\text{m}$  periodicity and hole diameter greater than half the periodicity.<sup>46</sup> These observations were made at a single  $\theta_{\text{exc}}$  of 72.8°. Commercial SPR instruments do not necessarily work at this  $\theta_{\text{exc}}$ , such that a complete mapping of the

sensitivity in relation to  $\theta_{exc}$  must be undertaken. Here, RCWA simulations suggest that the SPR response should be enhanced for microhole arrays at different angles depending on the RI range (Figure 4.4 - Right). Experimental validation of this effect predicted numerically is thus important to understand the influence of SPs excited in microhole arrays. It also underlines the excellent agreement between the experimental data and RCWA simulations. Therefore, the investigation of the bulk sensitivity for various excitation angles was performed with microhole arrays of 3.2  $\mu\text{m}$  periodicity,  $1.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$  diameter and  $65 \pm 10 \text{ nm}$  depth ( $n = 6$  samples), as the optimal SPR dispersion was noticed around these physical parameters.

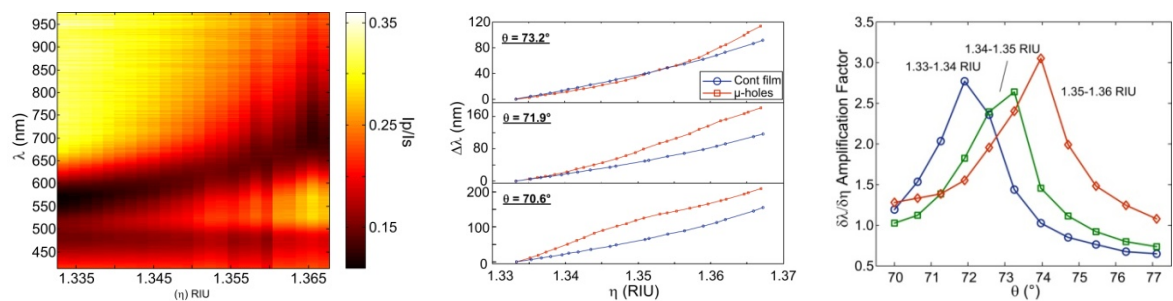


Figure 4.5 – Enhancement of bulk sensitivity for microhole arrays in relation to the RI window and the excitation angle ( $\theta_{exc}$ ). (Left) Reflectance image of microhole arrays excited at  $\theta_{exc} = 72.6^\circ$  with increasing RI. (Center) Calibration curves for microhole arrays (red) and continuous films (blue) at 3 different  $\theta_{exc}$ , (Right) Amplification factor for bulk sensitivity with microhole arrays for specific RI windows (experimental data).

An increased wavelength shift is observed in calibration curves using bulk refractive index changes from 1.33 to 1.36 RIU. The RI range of this steeper RI sensitivity slope shifts with  $\theta_{exc}$  (Figure 4.5). This feature is observed only with microhole arrays as the sensitivity of continuous films is relatively constant over the complete RI range measured. This steep RI sensitivity corresponds to the region of steeper dispersion for a specific  $\theta_{exc}$  range with microhole arrays. To further highlight the location of the enhanced sensitivity RI



range at fixed  $\theta_{\text{exc}}$ , the SPR response of microhole arrays and continuous films was normalized to the position of the plasmonic band in water (Figure 4.5 - center). If only the high sensitivity part of the calibration curve is considered and compared to the sensitivity of continuous film in the same RI range, the RI of the enhanced sensitivity range is  $\sim 1.36$  RIU at  $\theta_{\text{exc}} = 73.2^\circ$  and it shifts to  $\sim 1.33$  RIU for an excitation angle lower by  $2.6^\circ$  ( $\theta_{\text{exc}} = 70.6^\circ$ ). This result exposes the significant influence of the excitation angle on the region of enhanced sensitivity. In order to quantify the improvement provided by microhole arrays, the amplification factor (AF) is introduced as the ratio of the SPR response microhole arrays in relation to the one of a thin Au film.

For bulk RI amplification factor, the SPR response of both plasmonic materials was measured for steps of 0.010 RIU (10 mRIU) at various  $\theta_{\text{exc}}$ . The AF ratio clearly indicates the  $\theta_{\text{exc}}$  position for the greatest enhancement is dependent on the RI range of the solution (Figure 4.5 - Right). By properly selecting the RI range, the SPR response was improved by up to 3 times with microhole arrays. The optimal enhanced sensitivity for specific pair of RI and  $\theta_{\text{exc}}$  is in strong agreement with the RCWA simulations (Figure 4.4 - Right), signifying that the enhanced sensitivity is in part due to a grating effect observed with the microhole arrays. It is important to note that this amplification was obtained for a fixed geometry of the microhole arrays. We anticipate that the results would be different for microhole arrays with different periodicity, hole diameter and depth, as it would change the diffraction of the electric field and the propagation of the SP in the plasmonic substrate. These results provide insight on the sensitivity enhancement in microhole arrays. Although sensitivity to RI is a key characteristic in the evaluation of novel plasmonic materials for sensing applications, other considerations of the spectral properties are required such as the width of the plasmonic band.

The enhanced sensitivity for microhole arrays near the degenerescence of the plasmonic bands comes at a cost of a slightly worse full width at half maximum (FWHM), due to a weaker and broader plasmonic band for microhole arrays in comparison to continuous film. SPR spectroscopy in wavelength interrogation is impacted by the width of the plasmonic band as it plays a role in the resolution for measuring small SPR shift caused by weak RI changes. As expected, the FWHM for microhole arrays is larger for higher RI, due to excitation of the plasmonic band at higher wavelength. This effect, inherent to wavelength interrogation SPR, is more important in microhole because of surface roughness. In continuous films, the absorption band remains with a relatively constant FWHM around 60 nm, while in microhole arrays, a comparable band was obtained at low RI (FWHM of  $\sim 75$  nm for RI  $\sim 1.334$ ), but close to 1.340 the FWHM is  $\sim 150$  nm, and almost double at 1.344 (FWHM of  $\sim 250$  nm). Although the FWHM of SPR band with microhole arrays increases by about a factor of 2 in comparison to the band with continuous film in the probed RI range, the RI resolution calculated for both substrates is marginally worse for the microhole arrays (see supporting information, Table S2). In addition, both calibration curves have an excellent linearity (see supporting information, Figure S3). Thus, the broadening of the plasmonic band for microhole arrays does not affect the precision of the calibration curve as both curves have a similar correlation coefficient ( $R^2$ ). The lower sensing linearity range and band broadening effect observed for microhole arrays do not automatically affect the application potential of these structures in sensing applications. This is particularly true for the application of microhole arrays structures as biosensors, because small RI changes are monitored and the  $\theta_{\text{exc}}$  can be optimized to have a band at  $\lambda \sim 610$  nm where the FWHM is comparable to the FWHM for continuous films.

#### **4.3.5 Angulo-spectral SPR sensing - biodetection of IgG**

While bulk sensitivity is commonly employed to compare plasmonic substrates, the sensitivity to molecular adsorbate provides a comparison more relevant to SPR biosensing. Thus, the sensitivity to local RI changes caused by the immobilization of anti-IgG and to

biosensing of a 100 nM IgG concentration was investigated using microhole arrays. RCWA simulations predicted that the formation of a thin molecular adsorbate would yield enhanced SPR sensing at a specific angle, as also noted for the bulk sensitivity (Figure 4.6 – Left). The simulations were performed for a 1 nm-thick layer of a molecule with 1.53 RIU, such that the simulated enhancement was observed at  $70.5^\circ$ . Experimentally, the SPR response for the immobilization of anti-IgG to the SPR sensor and the biodetection of IgG was enhanced with microhole arrays in comparison to thin Au films (see supporting information for SPR response, Figure S4). The enhancement was observed at higher angle than for the simulations (near  $72.5^\circ$ , due to the thicker biological layer formed by anti-IgG and IgG (approximately 5-10 nm)).<sup>182</sup> Nonetheless, microhole arrays resulted in amplification by a factor of approximately 3, which is similar to enhancement observed for bulk sensitivity (Figure 4.6 – Center). The amplification observed with microhole arrays is comparable to the ones reported for other nanostructured films.<sup>183</sup> It is noteworthy to mention that this optimal excitation angle is very close to the one obtained with SPR using a dove prism ( $72.8^\circ$ ).<sup>134</sup> Thus, the combination of microhole arrays and this SPR configuration can significantly improve SPR sensing.

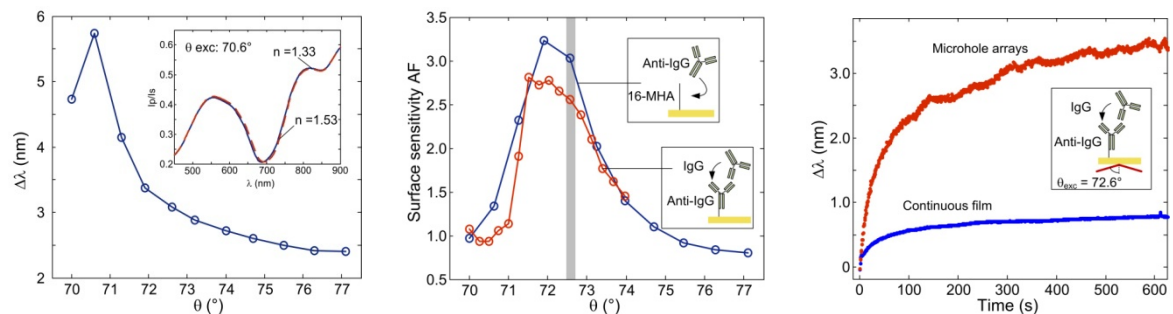


Figure 4.6 –SPR response of microhole arrays for molecules adsorbing to the surface. (Left) RCWA simulations demonstrate enhanced SPR sensing at a specific angle. (Centre) Experimental SPR data for anti-IgG immobilization on microhole arrays (blue circle) and for the detection of IgG (red circle). (Right) SPR sensorgram for the detection of 100 nM IgG at  $\theta_{exc} = 72.6^\circ$  with microhole arrays (red) and continuous film (blue).

The sensorgram for the detection of IgG clearly shows the enhanced response for microhole arrays at a fixed excitation of  $72.6^\circ$ . This excitation angle is valid for the RI of PBS, but will change to greater angles for solutions of higher refractive index such as cell lysate or serum (see supporting information Text1 and Figure S5). While anti-IgG resulted in a shift of 6 nm for microhole arrays, the shift on the thin Au film was only 2 nm (see supporting information, Table S2). Detection of 100 nM IgG solution shifted the signal by 3 nm for microhole arrays in comparison to 0.8 nm for thin Au film. The enhanced SPR sensing is achieved despite interrogating fewer molecules for the microhole arrays. Indeed, the surface covered by the metallic surface can be approximated to the terrace, while the 70 nm wall of the inside of the hole is negligible in comparison to the area of Au on the terrace. For the  $1.8\ \mu\text{m}$  microhole arrays with  $3.2\ \mu\text{m}$  periodicity, the surface covered by Au on the microhole arrays equals approximately 70% of the surface covered by a thin Au film. Assuming that the chemical reactions proceed to the same efficiency on both substrates, fewer antibodies and IgG molecules are detected producing a greater SPR response. With the enhanced Raman response observed for microhole arrays at the rim of the hole and prior reports demonstrating that SPR sensing is more efficient for biomolecules located in the high EM field near the apex of nanotriangles,<sup>184</sup> we hypothesize that antibodies located at the rim of the microhole and the enhanced sensitivity contribute to the higher response observed for microhole arrays.

## 4.4 Conclusions

The potential use of microhole arrays as an enhanced sensing platform compared to continuous films in Kretschmann SPR was demonstrated as microhole arrays have distinct plasmonic properties adapted for current SPR instrumentation. These unconventional materials show dual SPR and LSPR optical properties, although their physical features are greater than the incident wavelength but smaller than SPR plasmonic effects. A more comprehensive investigation of the plasmonic properties of microhole arrays revealed the presence of propagation and localized SP waves in the dispersion relation and SERS

imaging confirmed the location of a strong EM field lying into the inner-edges of the holes. The enhanced sensitivity predicted in RCWA simulation was experimentally observed and at the optimal  $\theta_{\text{exc}}$ , the amplification by a factor of at least 3. The numerical simulation also suggests the contribution of a grating effect to the plasmonic behavior of microhole arrays. The enhanced optical properties noted for bulk RI changes were translated to local RI changes as microhole arrays were used as biosensing templates. In addition, by exploiting these materials at their optimal sensitivity it is possible to analyze a wide range of biological matrices by simple instrumental adaptation. Finally, in comparison to other plasmonic materials with enhanced sensitivity, the sample design is rather simple and requires a fabrication method with physical precision in the order of hundreds of nanometers instead of low nanometers. Better optical properties are anticipated for material prepared with a fabrication technique of greater precision than NSL.

## 4.5 Acknowledgments

Financial support was provided by the Canadian Foundation for Innovation (CFI), the Centre for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS), the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the National Institutes of Health (NIH, project R01 EB006201) of the United States of America. L.S. L. is supported by a scholarship from Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) at Université de Montréal. The authors acknowledge the support of K.F.G. by the EPSRC through a doctoral training award and the Royal Society for a Wolfson Research Merit award to D.G.. Authors would also want to acknowledge Professor Antonella Badia for her scientific and instrument support.

**Supporting Information Available in Annexe 3 from pages VIII to XV.**

# **Chapitre 5 Vers l'intégration du SPR à la microscopie à force atomique (AFM)**

## **5.1 Introduction**

Dans les chapitres 2 et 3, l'étude des microtriangles a prouvé qu'ils sont actifs en SPR et que leur sensibilité peut être du même ordre de grandeur que celle des films continus. À partir de ces dimensions, l'idée de développer un instrument SPR miniaturisé aux pointes des cantilevier de microscopie à force atomique (AFM) a été explorée. Ainsi, la sensibilité chimique de la spectroscopie SPR pourrait être exploitée de manière localisée dans un environnement biologique. L'AFM est déjà une méthode d'analyse bien développée pour imager l'aspect physique de matériel biologique. Particulièrement, la spectroscopie de force a démontré le potentiel d'utiliser des réactions biologiques intégrées à la surface des leviers AFM. Afin de pouvoir montrer l'intégrabilité du SPR aux pointes AFM, il est nécessaire de caractériser les propriétés optiques des pointes revêtues d'or pour déterminer la présence d'un plasmon de surface. Cette section vise donc à présenter le potentiel d'imagerie plasmonique des pointes de levier AFM couvertes d'or. Les résultats exposés servent à supporter les diverses orientations que pourrait prendre le projet pour l'intégration d'un capteur SPR à des pointes AFM pour en faire des nano/micro biocapteurs.

## **5.2 Partie expérimentale**

### **5.2.1 Montage instrumental optique**

Un montage commercial destiné à la microscopie à balayage en champ proche (SNOM - *Alpha 300 s WITec*) permet d'effectuer des mesures en imagerie AFM et SNOM. Cet instrument est également adéquat pour effectuer des mesures en spectroscopie de réflectance et de transmission. Tous les détails sur l'instrument, ses composantes mécaniques et optiques et le programme d'acquisition et de traitement de données se

trouvent sur le site Internet de la compagnie (<http://www.witec.de/en/products/snom/alpha300s>). Une brève description de l'instrumentation, orientée vers la compréhension des expériences préliminaires, permettra d'établir les bases expérimentales visant à déterminer le potentiel d'intégration de la spectroscopie SPR sur la pointe d'un levier AFM.

Certaines modifications ont été faites sur l'instrument *Alpha 300 s*, pour adapter la spectroscopie à champ proche au SPR sur les pointes AFM. La figure 5.1 présente l'alignement général des parcours optiques dans le microscope.

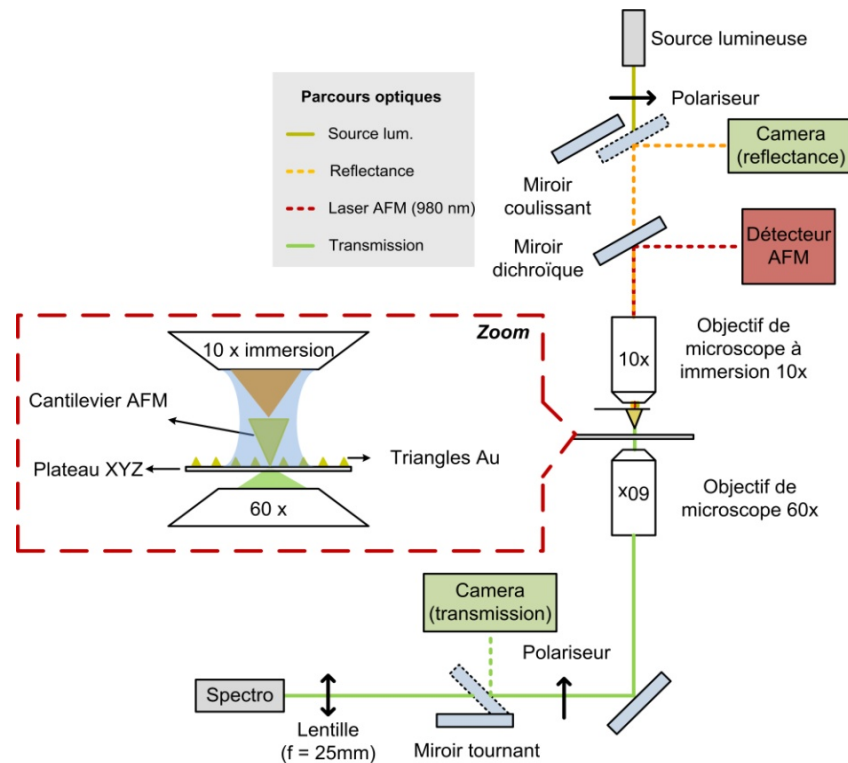


Figure 5.1 – Montage optique AFM-SPR.

La spectroscopie de transmission sur un levier AFM se fait à l'aide d'un montage de spectroscopie confocale, dans lequel le levier se situe entre les deux objectifs de microscope (voir agrandissement dans l'encadré rouge de la figure 5.1). Dans un milieu

aqueux, la lumière est focalisée derrière la pointe du levier AFM dont les façades de la pointe sont revêtues d'un film d'or. La lumière transmise par la pointe est collectée en spectroscopie de transmission par un objectif 60x monté sur la partie microscope inversé du montage. La lumière collectée est filtrée par un polariseur à 90 degrés de celui de l'excitation pour diminuer la lumière provenant directement de la source. Par la suite, la lumière est focalisée par une lentille concave sur une fibre optique multimodale d'un diamètre de 200  $\mu\text{m}$  menant vers le spectrophotomètre. Un miroir dans le parcours permet de dévier la lumière vers une caméra d'imagerie pour des fins d'alignement ou de positionnement sur le substrat étudié.

Dans une autre configuration du montage, il est aussi possible de mesurer la lumière en réflexion totale interne (RTI) par l'objectif du haut. Derrière l'objectif 10x se situent les parcours optiques d'excitation et de collection en RTI. Dans ce chemin optique, la lumière d'excitation, une source halogène polychromatique, est guidée par une fibre optique multimodale de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre au-dessus du microscope et elle traverse un filtre polarisant avant d'être focalisée sur la pointe du levier par l'objectif de microscope. La lumière réfléchie peut être dirigée vers une caméra d'observation ou vers le spectrophotomètre (parcours similaire à celui vers la caméra). Dans ce même parcours se trouve le laser de positionnement de l'AFM qui est réfléchi sur le pont du levier AFM vers le détecteur à quadrants. L'objectif de microscope 10x peut être changé par un objectif 20x opérant uniquement dans l'air. Les diverses pièces du montage ainsi que leurs caractéristiques sont décrites dans le tableau 5.1.



Tableau 5.1 – Principales composantes optiques du montage AFM-SPR en transmission.

Pièces	Spécificité	Compagnie
<b>Lampes halogènes</b>	21V; 150W; $\Delta\lambda = 500 - 750$ nm	Ushio (Projector Lamp)
	12V; 50W : $\Delta\lambda = 450 - 900$ nm	Bulbe halogène
<b>Fibre optique excitation</b>	Ouverture 50 $\mu\text{m}$ .	---
<b>Objectif 10x immersion</b>	Achroplan, NA 0.3, $\infty/0$ , Ph 1; $\theta_{\text{exc}} : 13^\circ$ .	Carl Zeiss
<b>Objectif 20x</b>	WD 3.8 mm; $\infty/0.17$ ; NA 0.4; $\theta_{\text{exc}} : 23^\circ$ .	Nikon
<b>Objectif 60x</b>	WD 0.3 mm; $\infty/0.17$ ; NA 0.8; $\theta_{\text{exc}} : 53^\circ$ .	Nikon
<b>Cantileviers</b>	Pyramidal AFM tips; uncoated	NanoWorld
	$\text{Si}_3\text{N}_4$ Force Modulation ; uncoated; Si	Vista probes
<b>Filtre polarisant</b>	Unmounted linear glass polarizer.	Edmund Optics
<b>Lentille concave</b>	D = 25 mm; F = 25 mm; vis-NIR antireflection coating.	Thorlabs
<b>Fibre optique collection</b>	Ouverture 200 $\mu\text{m}$ .	Fait maison

Les objectifs, le plateau ainsi que le levier sont tous mobiles et les contrôles se trouvent dans le programme d'exploitation du microscope *WITec control*.

À priori, un alignement des diverses pièces optiques est primordial pour contrôler les effets optiques dans le parcours de la lumière et obtenir une intensité adéquate pour les mesures spectroscopiques. Idéalement, l'alignement doit se faire avec un laser et en suivant en partie les instructions fournies par le fabricant pour la microscopie en champ proche. Si possible, l'alignement doit être fait à partir du signal optique et non à partir des images, car le plan image diverge souvent du plan spectral. Un premier l'alignement entre l'entrée de la source en haut du microscope, l'arrière de l'objectif et l'entrée de la source laser au

connecteur FC qui se trouve perpendiculaire au tube du microscope devrait être fait, ce qui permet de travailler en réflectance si nécessaire, mais surtout d'avoir un point focal plan. La seconde partie à aligner, la collection, est de loin la plus difficile. La section du bas du microscope n'est pas conçue pour ajouter ou modifier des composants. L'espace restreint sous le microscope ainsi que la grande différence de plan entre l'image et la spectroscopie complique les choses. Une façon d'aligner les parcours optiques du bas serait d'utiliser deux lasers de couleurs différentes pour placer le point focal colinéaire avec l'objectif du haut. Cet alignement n'est pas optimal, car il est difficile d'avoir un parcours optiques bien aligné à l'arrière de l'entrée de l'objectif inversé. Par contre, il est possible d'effectuer des mesures spectrales avec cette procédure d'alignement.

### 5.2.2 Levier AFM

Les leviers (ou levier) employés sont sans ouverture et servent essentiellement à la spectroscopie AFM classique. Deux type de leviers fait de matériaux différents ont été comparés (Tableau 5.2).

Tableau 5.2 – Les propriétés physiques, mécaniques et l'indice de réfraction des leviers.

	<b>Si (<i>Vista probes</i>)</b>	<b>Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (<i>NanoWorld</i>)</b>
<b>Longueur du pont</b>	225 µm	100 µm
<b>Largeur du pont</b>	45 µm	40 µm
<b>Hauteur de la pointe</b>	14 µm	3,5 µm
<b>Rayon de la pointe</b>	< 10 nm	< 10 nm
<b>Force de rappelle</b>	0,2 N/m	0,48 N/m
<b>Fréquence de résonance</b>	12 kHz	67 kHz
<b>Indice de réfraction</b>	3,5	2

Les leviers en silicium (Si) sont géométriquement plus grands que ceux en nitrure de silicium (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>). En particulier, ces leviers en Si sont au niveau de la hauteur de la

pointe, 4 fois plus hauts que ceux en  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Les deux types de leviers AFM ont un rayon de la pointe et une largeur comparable, mais la longueur des leviers en Si est 2 fois plus grande que celle des leviers en  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . La différence entre les matériaux est aussi visible dans les propriétés mécaniques où le plus petit levier à une force de rappel et une fréquence de résonance plus élevée que le long levier. Ces leviers diffèrent aussi au niveau de l'indice de réfraction. Le Si, un matériau généralement utilisé en SPR dans l'infrarouge,<sup>185</sup> a un indice de réfraction significativement plus élevé que le  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (voir tableau 5.2).

Pour supporter un plasmon de surface, la pointe des leviers AFM doit être recouverte d'un mince film d'or. Le revêtement métallique des pointes s'est fait par pulvérisation d'or directement sur les pointes des leviers AFM, d'une épaisseur approximative de 40 nm sur les parois externes des pointes. Seul le côté où se trouve la pointe est recouvert d'or. Aucune couche d'adhésion n'a été employée.

### 5.2.3 Imagerie et acquisition des spectres

Pour obtenir une image AFM de la topographie de la surface, la force du *feedback* sur le levier est de 1 *setback*, 2 *p-gain* et 4 *i-gain*. En général, ces paramètres doivent être optimisés selon la surface balayée. Le *setback* est la force appliquée par le levier sur l'échantillon et les gains sont associés au mouvement du cantilevier.

Les images AFM-SPR sont construites à partir de la lumière collectée en RTI et en transmission. Un spectrophotomètre (*Princeton Instrument*) avec un réseau de 150 traits par mm est couplé avec une caméra CCD de 1024 pixels (*Andor*). Une plage spectrale d'un peu plus de 500 nm est mesurée, et ce, avec une résolution spectrale d'environ 0,5 nm. Le temps d'acquisition est d'environ 30 ms par pixel, et ce, pour environ 150 x 150 pixels. Des temps d'acquisitions plus lents sont possibles, mais ils augmentent considérablement le temps de balayage et les artéfacts de variations vibrationnelles causés par l'environnement.

L'aire balayée se situe entre  $10 \times 10 \mu\text{m}$  et  $20 \times 20 \mu\text{m}$ . Durant le balayage, le spectre acquis pour chaque pixel est accessible sur le programme de *WITec*.

#### **5.2.4 Fabrication de microtriangles**

Le substrat balayé est une surface d'or active en SPR avec des patrons triangulaires. Des microtriangles d'au avec une périodicité de  $3,2 \mu\text{m}$ , une hauteur d'environ  $50 \text{ nm}$  et une longueur de  $1,8 \mu\text{m}$  sont employés comme substrat. La fabrication et la caractérisation de ces échantillons est rapportée dans le chapitre 2.

### **5.3 Spectroscopie sur des leviers AFM**

Généralement, les mesures spectroscopiques sur des cantileviers AFM sont effectuées par l'irradiation avec un laser. Ceci est le cas pour la spectroscopie à balayage en champ proche et pour les spectroscopies exaltées sur la pointe métallisée. Donc, il est nécessaire de mieux comprendre l'influence de l'excitation avec une lumière blanche sur la spectroscopie sur les pointes de leviers AFM. Les résultats préliminaires ont été obtenus avec deux types de leviers, un en Si et l'autre en  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . L'interrogation spectrale des pointes dans l'air s'est fait dans le domaine spectral couvrant les régions du visible et du proche infrarouge (NIR).

Le positionnement du levier aux points focaux des objectifs inférieur et supérieur (figure 5.1), droit et inversé, s'effectue à l'aide des diverses caméras dans les parcours optiques. La lumière incidente provient du haut du microscope et elle est focalisée à l'arrière de la pointe par un objectif 20x. La lumière réfléchiée en réflexion totale interne (RTI) sur la pointe du levier est collectée par ce même objectif et dirigée vers le détecteur. En transmission, un objectif inversé 60x est approché sous la pointe pour collecter la lumière, qui est ensuite dirigée vers le détecteur. Des moteurs indépendants permettent le déplacement de chaque objectif de microscope ainsi que la pointe AFM pour aligner les

pièces dans un axe optique favorisant la collection maximale de la lumière. Les spectres en transmission et en RTI sont acquis pour des leviers avec et sans revêtements d'or (figure 5.2).

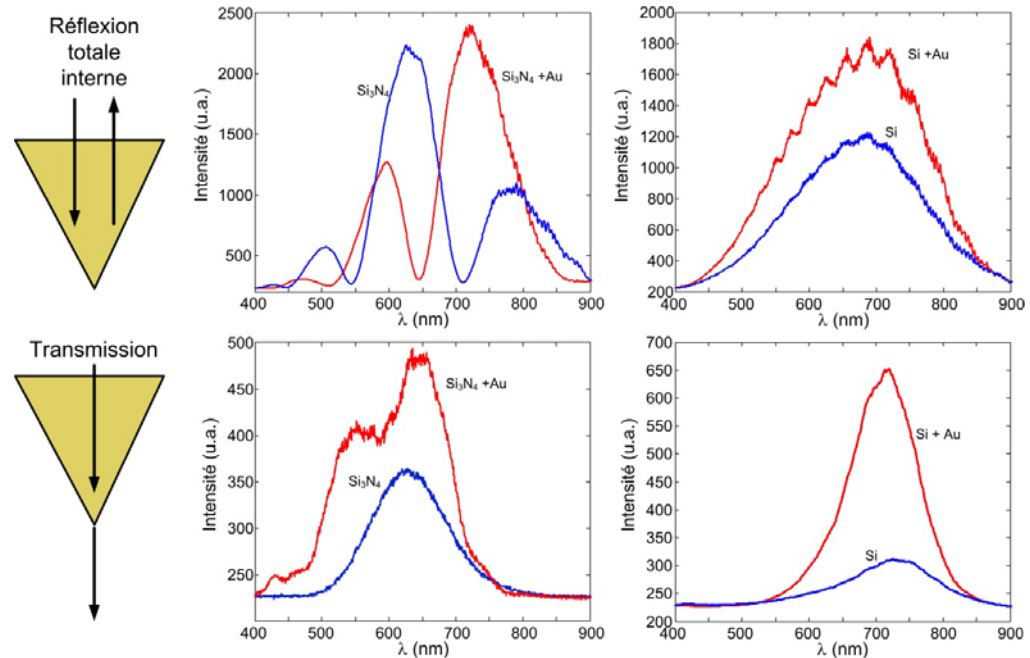


Figure 5.2 – (Haut) Spectres de réflectance des divers leviers avec (rouge) et sans (bleu) revêtement de  $\sim 40$  nm d'or. (Bas) Spectre de transmission des leviers avec (rouge) et sans (bleu) revêtement d'or.

Le spectre de réflectance des leviers en Si est similaire avec et sans Au mis à part l'augmentation d'intensité lorsqu'il y a un revêtement métallique. De plus, des interférences optiques sur les spectres sont visibles avec ce matériel. Dans le cas du  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , le spectre change lorsqu'il y a de l'or. Deux bandes d'absorption à  $\sim 550$  nm et  $\lambda \sim 710$  nm sont visibles lorsqu'il n'y a pas de revêtement métallique et ces bandes se déplacent vers le bleu d'environ 50 nm avec le revêtement. Pour l'instant, il est difficile d'expliquer cette observation. Bien que les spectres en transmission permettent d'observer l'aspect spectral de la lumière qui traverse les pointes, l'intensité varie selon l'alignement de l'objectif inversé. Ceci explique, entre autres, que les spectres sans revêtement d'or pour les deux

types de leviers sont moins intenses qu'avec le revêtement (figure 5.2). L'aspect spectral de la transmission des leviers en Si ne change pas significativement avec le revêtement métallique, la transmission reste autour de 700 nm. La pointe en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  métallisée montre une bande d'absorption autour de  $\lambda = 550$  nm absente sans métal. Il faut noter que le spectre de chaque pointe en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  métallisé est pris avec une source d'excitation à plus large spectre. Dans les deux cas, une partie de la lumière traverse la pointe même lorsqu'elle est revêtue d'un métal. Cet effet semble plus important dans le cas du  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , en plus de laisser passer la lumière dans le domaine du visible, comparativement à la transmission optimale dans le NIR pour le Si. La transmission de ces matériaux suggère que la lumière peut se propager à l'intérieur de ceux-ci pour exciter le SPR des films métalliques sur les parois.

## 5.4 Imagerie AFM –SPR

Des images AFM-SPR d'un substrat de microtriangles d'or ont été réalisées en RTI ainsi qu'en transmission, et ce, avec différents milieux diélectriques recouvrant le substrat. Le substrat étudié est placé sous la pointe AFM, au-dessus de l'objectif inversé 60x. Le substrat de microtriangle est actif en plasmonique, tel que décrit dans les chapitres précédents. Les triangles ont une épaisseur approximative de 50 nm avec une périodicité de  $3.2 \mu\text{m}$  (figure 5.3). Les leviers de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  furent utilisés pour ces mesures avec un revêtement d'or d'environ 40 nm. Un spectre dans le visible-NIR est enregistré pour chaque localisation sur l'échantillon (pixel). Les images AFM-SPR sont construites à partir des variations d'intensité pour un domaine spectral défini. Les effets de la configuration instrumentale et du milieu dans lequel se propage la lumière sont étudiés dans cette section.

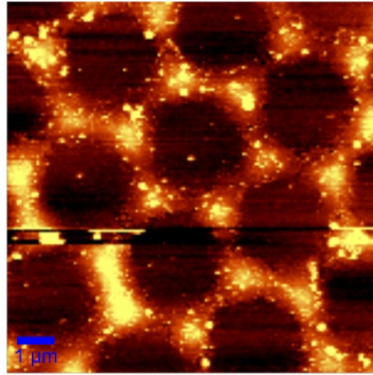


Figure 5.3 – Image AFM en mode contact de 10 x 10  $\mu\text{m}$  du substrat de microtriangles d'or.

## 5.4.1 Configuration instrumentale dans l'air

### 5.4.1.1 Réflexion totale interne

La configuration optique étudiée en premier est celle en réflexion totale interne avec un objectif 20x dans l'air. La base de la pointe du levier est placée au point focal de l'objectif. Puisque le comportement spectral de ces leviers n'est pas connu, une source polychromatique est employée et diverses bandes spectrales sont utilisées pour reconstruire des images AFM-SPR (figure 5.4).

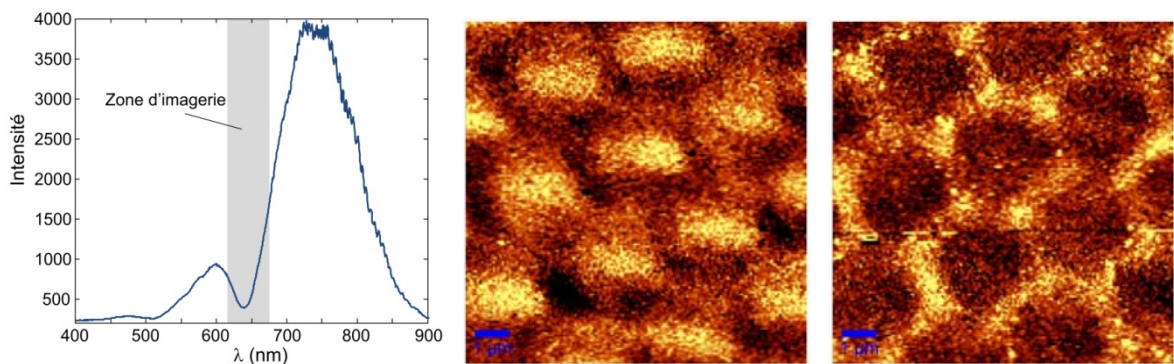


Figure 5.4 – (Gauche) Spectre de réflectance d'un cantilevier en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  revêtu d'or durant le balayage du substrat. Image AFM-SPR des variations d'intensité dans le spectre de réflectance pour une longueur d'onde entre (milieu)  $\lambda = 640$  à  $660$  nm et (droite)  $\lambda = 660$  à  $680$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.1, p. XX).

Le spectre de la source d'excitation dans ce cas-ci s'étend essentiellement de  $\lambda = 500$  à  $900$  nm. Tel qu'observé à la figure 5.2, une bande d'absorption près de  $\lambda = 650$  nm est visible dans le spectre de réflectance du levier (figure 5.4, gauche). Autour de cette bande spectrale, les variations d'intensité correspondant au patron du substrat balayé sont les plus intenses. De plus, la résolution spatiale de l'image spectrale est relativement comparable à celle de l'AFM (figure 5.3). D'autres plages spectrales à l'extérieur de la zone grise (figure 5.4 - gauche) montrent un contraste d'intensité, mais ce dernier est beaucoup plus faible. La région comprise entre  $\lambda = 640$  et  $680$  nm a été divisée en deux bandes couvrant  $20$  nm chacune afin d'obtenir des images optiques à partir des variations d'intensité à l'intérieur de ces bornes (figure 5.4 – milieu et droite). La comparaison entre les plages spectrales étudiées montre un contraste correspondant au substrat balayé. Ce contraste pour la première plage, étant de  $\lambda = 640$  à  $660$  nm, présente une intensité plus faible (région plus sombre) lorsque la pointe passe sur des microtriangles d'or (figure 5.4 - milieu). À l'inverse, la seconde plage spectrale,  $\lambda = 660$  à  $680$  nm, démontre une augmentation d'intensité lorsque la pointe se situe sur les microtriangles (figure 5.4 - droite). Pour l'instant, il est impossible de déterminer les causes du changement de contraste entre les deux plages spectrales étudiées lorsque la pointe balaye les microtriangles. Ce relativement faible contraste des images optiques en comparaison avec l'image AFM n'est visible que lorsque la pointe est métallisée (figure 5.5).

La nature du contraste reste encore difficile à déterminer. Une possibilité de l'origine du contraste pourrait être due au mouvement du levier sur l'échantillon, ce qui expliquerait en parti qu'un contraste de faible intensité soit visible sur tout le spectre (comme en AFM contact conventionnel). Par contre, ceci n'explique pas la présence d'un contraste positif ou négatif selon la plage de longueur d'onde observée (figure 5.4, centre et droite). Donc, d'autres pistes d'explication doivent être explorées.



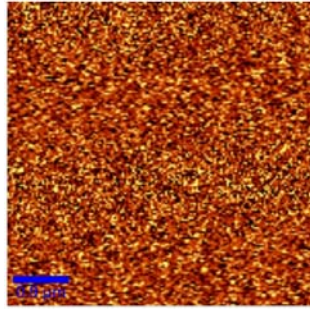


Figure 5.5 – Image spectrale en réflexion total interne avec un cantilevier en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  non métallisé. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.1, p. XX)

Des interactions plasmoniques entre la pointe et le substrat pourrait être à l'origine d'un tel contraste à des longueurs d'onde spécifique. En spectroscopie, le signal plasmonique n'est visible qu'à certaines plages spectrales. Il a été précédemment déterminé que les microtriangles sont actifs autour de  $\lambda = 650 \text{ nm}$  en SPR classique sur un prisme et en excitation directe, de type LSPR, ces triangles sont actifs dans l'infrarouge (chapitre 2). La région plasmonique active des microtriangles correspond à celle où les contrastes sont optimaux, ce qui peut être supporté par l'idée de couplage plasmonique. Dans tous les cas, ceci reste une hypothèse à ce stade. Pour vérifier cette hypothèse, un substrat non plasmonique pourrait être employé pour une image optique dans la configuration en RTI.

#### 5.4.1.2 Spectroscopie en mode transmission

En conservant la même configuration du faisceau incident, la lumière transmise à travers la pointe et le substrat étudié est collectée par l'objectif inversé 60x. Le spectre de transmission est celui présenté à la figure 5.6 pour le levier  $\text{Si}_3\text{N}_4$  métallisé. L'intensité en transmission est environ 4 fois plus faible qu'en RTI. Cette faible intensité nécessite de mesurer les variations d'intensité sur une plus grande plage spectrale soit 5 fois plus grande qu'en RTI afin d'obtenir des images optiques (figure 5.6). En comparaison avec les images en RTI précédentes, le contraste ainsi que la résolution du patron des microtriangles sont

beaucoup plus faibles. Il est difficile de localiser spatialement les structures du substrat balayé.

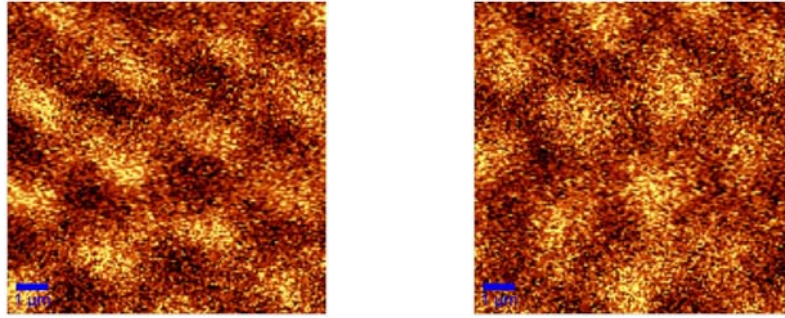


Figure 5.6 - Image optique des variations d'intensité en transmission pour des longueurs d'onde (gauche) de  $\lambda = 480$  à  $580$  nm et (droite) de  $\lambda = 580$  à  $680$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.2, p. XXI).

Donc, il fut possible d'obtenir une image optique avec un contraste spectral acceptable tant en RTI qu'en transmission, malgré que le contraste soit meilleur pour la première configuration. En RTI, il est aisément possible d'identifier le substrat balayé en mode AFM. Les effets impliqués dans le contraste des images AFM-SPR demeurent inconnus. La pointe du levier et le substrat peuvent tous deux être actifs en plasmonique. Pour voir si un couplage plasmonique est possible entre les matériaux, une étude dans un milieu aqueux sera effectuée. Dans cet environnement, les conditions pour observer des plasmoniques devraient être rencontrées dans la plage spectrale interrogée.

#### 5.4.2 Milieu de propagation

Pour travailler en milieu aqueux ( $\eta = 1.33$ ), l'objectif de microscope 20x est remplacé par un objectif de microscope 10x à immersion aqueuse. Un environnement aqueux est créé entre l'objectif et le substrat par capillarité et le levier est placé à l'intérieur de cette environnement au point focal de l'objectif 10x (voir figure 5.1 – partie instrumentale pour le concept). Le substrat étudié est toujours un film d'or avec un patron

périodique de microtriangles. Dans l'eau, l'imagerie AFM n'a pu être collectée en simultanée pour chaque échantillon.

#### 5.4.2.1 Réflexion totale interne dans l'eau

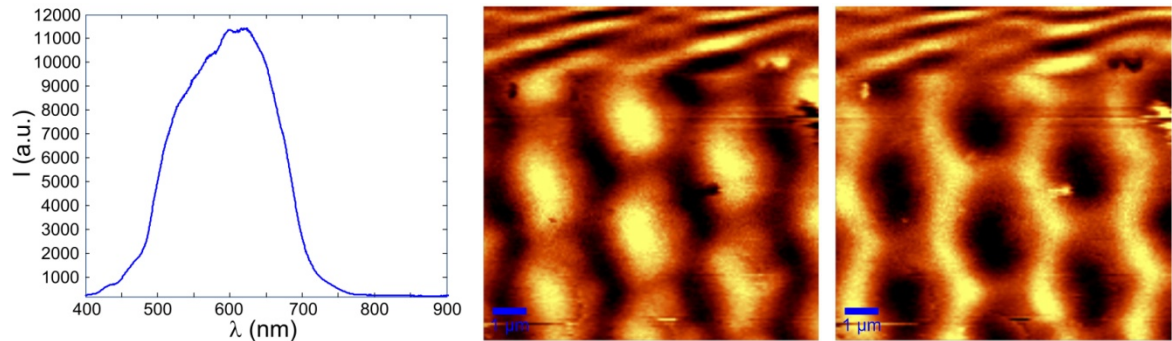


Figure 5.7 - (Gauche) Spectre en RTI d'un levier en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  revêtu d'or durant le balayage du substrat. Image des variations d'intensité dans le spectre de RTI pour une longueur d'onde entre (milieu)  $\lambda = 640$  à  $660$  nm et (droite)  $\lambda = 660$  à  $680$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.3, p. XXI).

En spectroscopie de RTI et dans un milieu aqueux, le contraste est nettement augmenté en comparaison avec les images AFM-SPR acquises dans l'air (figure 5.4). Pour cet échantillon, le spectre de réflectance ne présente pas de bande d'absorption à  $\lambda \sim 650$  nm comme dans l'air, mais il démontre plutôt une forme gaussienne entre  $\lambda = 400$  et  $700$  nm (figure 5.7 - gauche). Il faut noter ici qu'une autre source halogène a été employé pour cet échantillon, et ce, toujours en comparaison avec les images précédentes dans l'air. De plus, le substrat balayé n'est pas des microtriangles, mais plutôt de larges trous. Le comportement spectral de l'intensité de réflectivité est comparable avec celui dans l'air, mais avec une amplification des contrastes. La région de fort contraste est encore autour de  $\lambda = 660$  nm et l'effet d'inversion de l'intensité des microtriangles selon le domaine spectral est plus apparent (5.7 – milieu et droite).

### 5.4.2.2 Transmission dans l'eau

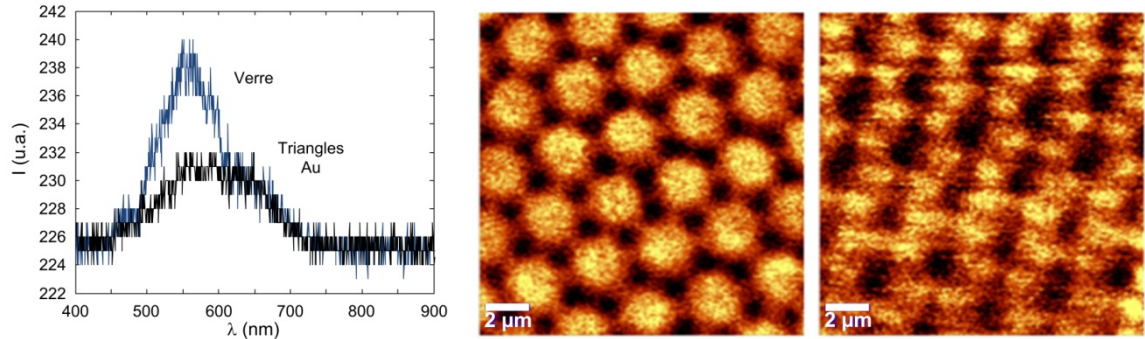


Figure 5.8 – (Gauche) Spectre de transmission d'un levier en  $\text{Si}_3\text{N}_4$  recouvert d'or durant le balayage du substrat. Image des variations d'intensité dans le spectre de transmission pour une longueur d'onde entre (milieu)  $\lambda = 500$  à  $600$  nm et (droite)  $\lambda = 600$  à  $700$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.4, p. XXII).

Tel qu'observé en RTI, un net contraste d'intensité est perceptible, relatant le patron de l'échantillon balayé (figure 5.8). Bien que l'intensité collectée soit très faible, soit moins de 20 u.a. au maximum, le contraste d'intensité entre  $\lambda = 500$  à  $600$  nm montre clairement les microtriangles (figure 5.8 - milieu). Le patron hexagonal d'une périodicité de  $3,2 \mu\text{m}$  des microtriangles est aisément identifiable ainsi que la position de chaque structure triangulaire d'une longueur d'environ  $2 \mu\text{m}$ . Ce qui apparait comme des microtriangles dans le plan du substrat (voir l'image AFM, figure 5.3) sont en fait des pyramides où le sommet atteint une hauteur d'environ  $40$  nm dans l'axe orthogonal au plan du substrat (chapitre 2). Sur l'image optique des microtriangles (figure 5.8 - milieu), l'intensité est quasi-nulle lorsque la pointe se trouve autour du sommet de la pyramide, tandis qu'une faible intensité est visible quelques centaines de nanomètres vers la base de la pyramide. L'intensité est plus élevée pour les régions où il n'y a pas d'or. Ce gradient d'intensité en transmission confère une résolution spatiale sous le micron dans le plan du substrat ainsi qu'une résolution de quelques dizaines de nanomètres dans l'axe hors du plan du substrat. Les propriétés d'imagerie optique de ces pointes n'est visible que pour le domaine spectrale

autour en-dessous de  $\lambda = 600$  nm puisque la résolution spatiale disparaît aux plus grandes longueurs d'onde (figure 5.8 - droite).

Le contraste spécifiquement observé autour de  $\lambda = 550$  nm peut être le produit d'interaction plasmonique entre la pointe métallisée et le substrat d'or. Cette région spectrale correspond à l'absorption des nanoparticules excitées en LSPR en milieu aqueux ainsi qu'à l'absorption de l'or par les transitions interbandes. Tout d'abord, le substrat peut être actif dans le domaine spectral étudié. La caractérisation des effets plasmoniques des microtriangles a démontré que ces matériaux ont un caractère hybride entre le LSPR et le SPR (chapitre 2). Les observations empiriques montrent une absorption de ces structures dans l'infrarouge, mais il n'est pas exclu que des modes d'excitation LSPR plus faible existent dans le domaine du visible. De plus, l'excitation des effets plasmoniques dans cette configuration est différente, car contrairement aux configurations LSPR classique, l'excitation est spatialement définie par les dimensions de la pointe. L'absorption de la lumière autour de  $\lambda = 550$  nm peut aussi être causée par les transitions interbandes qui sont des effets propres au métal. Dans ce cas-ci, l'absorption provient de l'excitation des électrons dans la couche d'énergie de Fermi vers la bande de conduction. Ce dernier effet peut se produire peu importe l'environnement adjacent tandis que l'absorption plasmonique varie selon cet environnement. Ceci pourrait expliquer en partie le faible contraste d'intensité mesuré dans l'air (figure 5.6) et l'augmentation de contraste d'intensité marquée lorsque le milieu change pour l'eau.

Une autre possibilité est envisageable concernant l'image optique avec un gradient de contraste et une relativement bonne résolution spatiale. Il est possible que, comme en *SNOM sans ouverture*, le champ évanescent créé par l'excitation localisée du plasmon de surface soit diffusé par la pointe en photons vers le champ éloignée, ce qui rend possible la détection par l'objectif inversé.<sup>101</sup>

Outre que par des effets plasmoniques, il est peu probable que l'image spectrale soit produite par une illumination directe du substrat puisque le point focal couvre une région de quelques  $\mu\text{m}^2$ , donc plusieurs triangles à la fois.

Il est important de mentionner que, en comparaison avec les images prises dans l'air, ces images sont prises non seulement dans un autre milieu diélectrique, mais aussi avec un objectif différent. La plus faible magnification de l'objectif à immersion change la taille du point focal ainsi que l'angle d'incidence de la lumière à l'intérieur de la pointe (tableau 5.1). Intrinsèquement, l'utilisation de la lumière polychromatique dans le montage instrumental génère un point focal grand que si une source spectrale avec une bande d'excitation plus restreinte a été utilisée. Au-delà de la limitation géométrique du point focal, la limite de diffraction est estimée à environ 450 nm, soit la moitié de la plus haute longueur d'onde d'excitation. En réalité, la résolution spatiale du montage sans cantilevier est bien au-dessus du micron. Bien que ces facteurs soient négligés dans cette étude, leurs impacts devraient être considérés dans une étude ultérieure.

### **5.4.3 Effet du substrat**

L'effet de la forme et la nature plasmonique du substrat a été étudié en transmission avec les leviers  $\text{Si}_3\text{N}_4$  revêtus d'or, et ce, dans l'air. Tel que démontré précédemment, le contraste des images dans l'air est plus faible que ceux dans l'eau, mais il est quand même possible d'imager le patron du substrat.

### 5.4.3.1 Plasmonique et non plasmonique

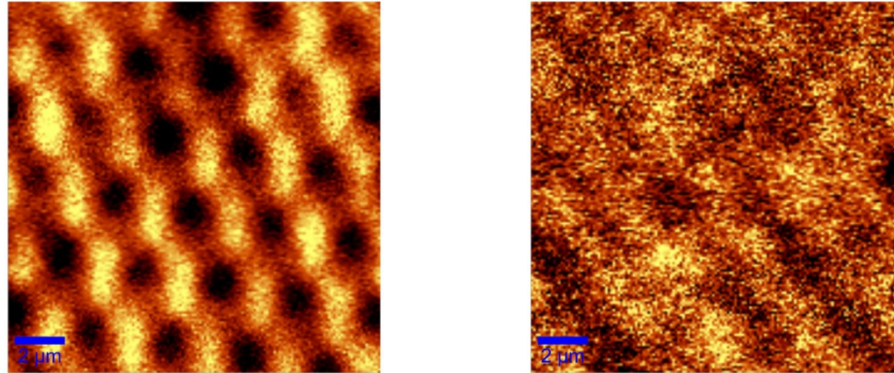


Figure 5.9 – Image AFM-SPR des microtriangles (gauche) de Ag et (droite) de  $\text{Ag}_2\text{O}$ . Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.5, p. XXII).

À titre de comparaison, un échantillon actif en plasmonique, ensuite passivé, fût employé pour connaître l'influence de la nature du matériel étudié. Des microtriangles d'argent (Ag), actif en SPR, ont été fabriqués et étudiés dans un premier temps. Par la suite, les propriétés plasmoniques des microtriangles d'Ag sont désactivées par l'oxyde ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) de la surface du substrat. Les images des microtriangles d'argent avant et après la désactivation de la surface par l'oxydation de l'argent démontrent que la spectroscopie en transmission change grandement dépendamment de l'activité plasmonique de l'échantillon. Le contraste entre les régions métalliques et le verre est visible lorsque le substrat est actif en plasmonique, malgré qu'il soit faible. Suite à la passivation de l'argent, l'intensité lumineuse devient homogène pour les régions métalliques et le verre (figure 5.9). À l'œil nu et en microscopie optique avec un objectif 60x, il était possible de voir le patron des structures sur le substrat après l'oxydation, bien que le reflet métallique caractéristique de Ag n'était plus visible. Ce résultat suggère la nature plasmonique de l'imagerie puisque les effets non plasmonique, comme la diffusion de l'échantillon, restent les mêmes après l'oxydation de la surface. Or, aucun contraste n'est visible dans l'image optique avec un substrat recouvert de  $\text{Ag}_2\text{O}$  inactif en plasmonique.

#### 5.4.3.2 Effet de la forme (triangles- trou)

Au cours de ces travaux, les matériaux mésoscopiques métalliques ont été étudiés et, en particulier, deux formes de patrons des films structurés ont été analysés : les triangles et les trous (chapitres 2, 3 et 4). Une caractérisation en SPR classique a démontré la différence de propriétés plasmoniques entre ces formes. Ces matériaux ont été employés pour des expériences AFM-SPR afin de voir s'il est possible de percevoir des variations plasmoniques dans cette configuration.

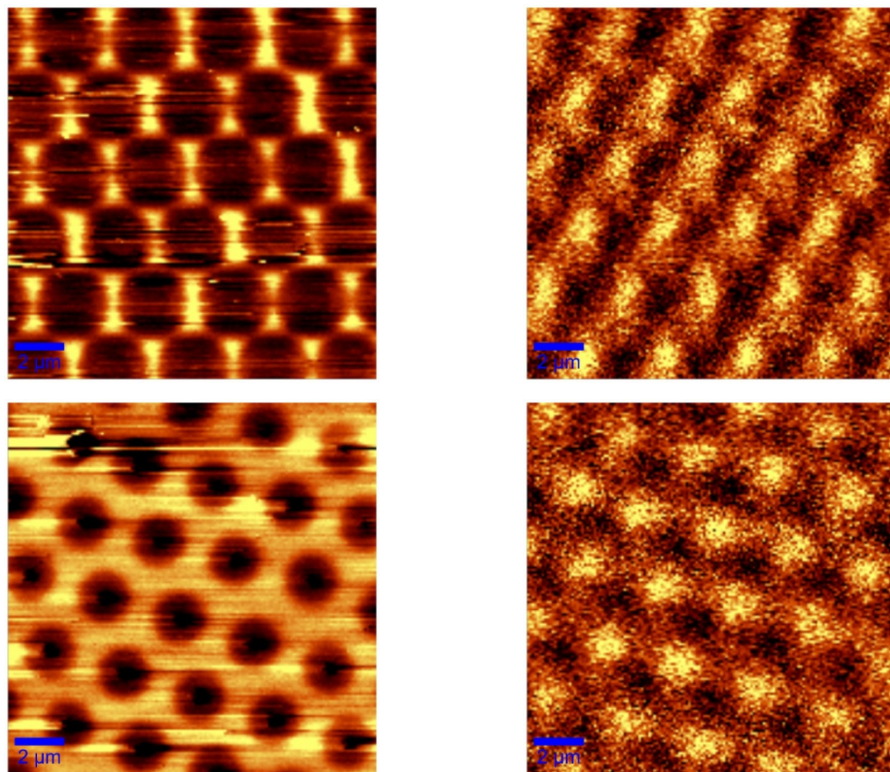


Figure 5.10 – (Gauche) Image AFM et (droite) AFM-SPR en transmission de film microstructuré d'or avec des motifs (haut) triangulaires et (bas) de trous. Les variations d'intensité des images AFM-SPR sont mesurées entre  $\lambda = 640$  et  $720$  nm. Voir les paramètres de balayage en annexe (A4.6 et A4.7, p. XXIII - XXIV).



Deux formes de substrats ont été étudiées en transmission avec les leviers  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , soit les microtriangles et les microtrous avec un diamètre de trou d'environ  $1,6 \mu\text{m}$  (figure 5.10). Les substrats ont la même composition métallique et environ la même épaisseur. Les mesures sont prises dans l'air avec l'objectif de microscope 20x pour l'excitation et l'objectif inversé 60x pour la collection. Une transmission plus faible est attendue pour les microtrous puisque l'or couvre une superficie beaucoup plus grande que les triangles. Pour les deux substrats étudiés, les images optiques sont construites à partir des variations d'intensité entre  $\lambda = 640$  et  $720 \text{ nm}$ . Ce domaine spectral diffère des images optiques prises dans l'eau avec la même configuration (figure 5.8). Un faible contraste d'intensité est produit pour les deux types de substrats. Pour les triangles, le patron du substrat est plus difficilement identifiable, tandis que la forme de microtrous ressort plus facilement. Bien que le contraste d'intensité soit faible, il est possible d'en conclure que la taille de ces deux substrats plasmoniques n'affecte pas significativement le signal.

Pour obtenir une information plus complète sur les effets de la forme en AFM-SPR, l'expérience devrait être refaite dans l'eau en RTI et en transmission.

#### **5.4.4 Effet du levier**

Quelques essais en imagerie ont été effectués avec les cantileviers en Si recouverts d'or, mais le contraste obtenu, en RTI ou transmission, est beaucoup plus faible qu'avec les leviers en  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . De plus, les leviers en Si présente des patrons de diffraction dans la lumière réfléchi, ce qui n'est pas le cas avec l'autre matériau. Des meilleurs résultats et beaucoup plus constant ont été observés avec les leviers en  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .

#### **5.4.5 Mode contact**

Jusqu'à présent, les essais préliminaires sont tous effectués en mode contact où la pointe applique une certaine pression sur l'échantillon lors du balayage. Ceci implique

certaines considérations à tenir compte, en particulier au niveau de l'usure de la pointe ainsi que l'impact du mouvement sur le signal en réflectance. Pour l'instant, les substrats étudiés sont des surfaces métalliques. Suite à un balayage d'une de ces surfaces plutôt dure et rugueuse, la friction avec le substrat peut délaminer la couche métallique. Ces effets sur les pointes peuvent être étudiés, entre autres, par imagerie en microscopie électronique à balayage. Par contre, il faut tenir compte que dans le cas de matériel biologique, le mode contact est invasif et peut détruire l'échantillon. Or, il faudra plutôt travailler en mode *tapping*, ce qui permet déjà l'imagerie de matériel biologique.

L'angle réflectance à l'intérieur de la pointe du levier est modulé selon la force appliquée sur l'échantillon ainsi que les variations topographiques de l'échantillon. Certains essais préliminaires montrent des variations spectrales suivant la pression de la pointe sur la surface. L'impact de ces observations sur l'imagerie n'a pas été caractérisé d'avantage.

#### **5.4.6 Vers l'intégration biocapteur SPR au pointe AFM**

Les études préliminaires sur les propriétés plasmoniques en SPR de microtriangles ayant la taille d'une pointe AFM ont démontré un signal plasmonique distinct du SPR conventionnel. Le signal observé montre des variations d'intensité face aux changements de RI, et ce, à des longueurs d'ondes précises. Contrairement au SPR conventionnel, la bande qui se déplace s'étend sur une large plage spectrale, il est donc plus facile de suivre les variations d'intensité de ce signal. De plus, l'épaisseur d'or joue un facteur sur l'intensité ainsi que la sensibilité du signal SPR aux changements de RI. Pour ces travaux, le signal mesuré provient d'une multitude de triangles tandis que dans le cas de l'image optique sur la pointe du levier AFM, un seul triangle est interrogé à chaque mesure. Ces travaux montrent que le SPR est possible avec des matériaux microscopiques, mais le même type d'étude doit être fait avec les pointes AFM d'or. En particulier, l'épaisseur du revêtement métallique et son impact sur le signal doit être étudié, et ce, pour les deux types de matériaux de cantilevers AFM.

Bien qu'une partie des travaux préliminaires démontrent un certain potentiel de la technique en transmission, le mode en RTI demeure celui visé puisqu'il est avantageux de sonder optiquement le milieu biologique à partir d'un milieu adjacent isolé. Les études en transmission suggèrent la présence d'effets plasmoniques et le potentiel de la technique, mais dans un milieu biologique (ex. cellules biologiques), cette configuration n'est pas appropriée.

Éventuellement, si le développement de la méthode permet l'usage de la lumière monochromatique, le montage pourrait être grandement simplifié en remplaçant le spectrographe par un PMT. Ceci faciliterait aussi l'alignement optique et augmenterait la sensibilité spectrale de la méthode, ce qui est présentement un problème puisque le faible signal semble noyé dans le spectre de réflectance.

## Chapitre 6 Conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse démontrent la possibilité d'exploiter les caractéristiques optiques des méso et micro-matériaux comme biocapteur optique en résonance des plasmons de surface (SPR). En particulier, l'intérêt d'employer les films structurés comme plateforme de détection provient de leur réponse SPR plus importante face aux variations d'indice de réfraction (RI) comparativement aux films continus conventionnels. De plus, les matériaux caractérisés dans ces travaux prouvent la nature plasmonique distincte des films microstructurés. Co-excité dans la configuration de Kretschmann, les modes localisé et propagatif de plasmons de surface interagissent ensemble de manière résonante pour améliorer la sensibilité des matériaux microstructurés. Il est noté qu'avec les microtrous que l'amplification du signal peut atteindre jusqu'à 5 fois celle d'un film continu. Cette approche pour augmenter la sensibilité en SPR contraste avec les autres proposés dans la littérature où des aspects physiques nanométriques sont intégrés à des films continus pour augmenter la sensibilité de ces derniers. L'ensemble de ces travaux démontre le potentiel des microstructures comme nouveaux substrats plasmoniques pour des applications de biodétection, et ce, sans l'intégration de physiques de l'ordre du nanomètre.

Dans l'ensemble des travaux de recherches menés au sein du groupe de recherche du professeur Masson, les micro-matériaux répondent aux besoins d'une plateforme de détection meilleure que les films continus pour le développement d'un instrument de biodétection miniature et portable. Combiné avec une chimie de surface adéquate, la meilleure réponse SPR des microtrous permet d'employer une instrumentation plus simple et robuste que les instruments commerciaux destinés à la recherche en laboratoire. Plus particulièrement, la résolution de  $10^{-6}$  RIU<sup>25</sup> d'appareils commerciaux comme *Biacore* valant quelques dizaines de milliers de dollars est atteinte avec notre système SPR d'au plus quelques milliers de dollars basé sur les microtrous. La plus importante réponse SPR des microtrous rend possible le développement d'instruments SPR portable peu coûteux.

En perspective, une caractérisation optique plus poussée des microtrous est nécessaire afin d'en établir le plein potentiel comme plateforme de détection. Tout d'abord, les microtrous présentent une importante diffraction de la lumière diminuant ainsi l'intensité lumineuse réfléchi à l'ordre  $m = 0$ . D'une part, ceci limite la résolution spectrale sur la bande plasmonique. D'autre part, une partie importante du signal analytique se trouve dans les 1<sup>er</sup> ordres de diffraction tel que démontré par le groupe de *Robert Corn*.<sup>80,133,186</sup> Il serait donc intéressant d'étudier les caractéristiques spectrales (ex. le déphasage et l'intensité) de ces ordres de diffraction. Ceci pourrait entre autres permettre de ne plus employer de couplage SPR assisté par prisme simplifiant ainsi significativement l'instrumentation.

Une autre caractérisation est nécessaire afin d'établir la contribution des propriétés plasmoniques des films microstructurés à l'augmentation de réponse SPR lors de mesures dynamiques par rapport aux films continus. Par exemple, au chapitre 3 (figure 4.6), l'augmentation du signal et l'amplification calculée ne tient pas compte l'arrangement et la densité de récepteurs à la surface. Il est possible qu'en majeure partie, l'augmentation du signal SPR provient du plus grand nombre de récepteurs en surface des films microstructurés et moins d'effets plasmoniques. Afin de tenir compte d'un tel facteur, une normalisation de la réponse SPR par rapport à la concentration de récepteurs en surface permettrait de cerner un peu plus la contribution réelle des effets plasmoniques à l'augmentation de la vitesse de réponse.

Dans un avenir rapproché, les travaux présentés dans cette thèse mènent vers le développement de projet connexe sur les microstructures tel que la compréhension des phénomènes plasmoniques et dynamiques générant une diminution du temps de réponse SPR avec les matériaux triangulaires isolés. D'autres projets visent plutôt à appliquer les caractéristiques optiques des microtrous comme biocapteur SPR pour des cibles biologiques d'intérêt comme la *prostate specific antigens (PSA)* et combiner les propriétés plasmoniques de ces mêmes substrats avec des spectroscopies basées sur des surfaces

exaltantes comme le *surface-enhanced Raman Scattering (SERS)* ou le *metal enhanced fluorescence (MEF)*. En somme, ces travaux servent de fondement pour plusieurs projets reliés aux propriétés plasmoniques des films microstructurés.

En conclusion, les matériaux plasmoniques actifs à l'échelle méso et microscopique présentent une nouvelle alternative dans le développement de plateformes de détection optique. Ces dimensions intermédiaires sur l'échelle plasmonique ouvrent une possibilité de miniaturisation des systèmes SPR en réflexion totale interne existant. De plus, d'autres avenues doivent être exploitées pour intégrer la spectroscopie SPR à d'autres systèmes analytiques comme la microscopie à force atomique.

## Références

- (1) Maier, S. A.; Atwater, H. A. Plasmonics: *Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures*; J. Appl. Phys. **2005**, 98.
- (2) Maier, S. A.; Brongersma, M. L.; Kik, P. G.; Meltzer, S.; Requicha, A. A. G.; Atwater, H. A. *Plasmonics—A Route to Nanoscale Optical Devices*; Adv. Mater. (Weinheim, Ger.) **2001**, 13, 1501.
- (3) Homola, J. *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*; Anal. Bioanal. Chem. **2003**, 377, 528.
- (4) Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. *Surface plasmon resonance sensors: review*; Sens. Actuators, B **1999**, 54, 3.
- (5) Willets, K. A.; Van Duyne, R. P. *Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing*; Annu. Rev. Phys. Chem. **2007**, 58, 267.
- (6) Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. *Universal scaling of plasmon coupling in metal nanostructures: Extension from particle pairs to nanoshells*; Nano Lett. **2007**, 7, 2854.
- (7) Bantz, K. C.; Meyer, A. F.; Wittenberg, N. J.; Im, H.; Kurtulus, O.; Lee, S. H.; Lindquist, N. C.; Oh, S. H.; Haynes, C. L. *Recent progress in SERS biosensing*; Phys. Chem. Chem. Phys. **2011**, 13, 11551.
- (8) Han, X. X.; Zhao, B.; Ozaki, Y. *Surface-enhanced Raman scattering for protein detection*; Anal. Bioanal. Chem. **2009**, 394, 1719.
- (9) Nabiev, I.; Chourpa, I.; Manfait, M. *Applications of Raman and Surface-Enhanced Raman-Scattering Spectroscopy in Medicine*; J. Raman Spectrosc. **1994**, 25, 13.
- (10) Tripp, R. A.; Dluhy, R. A.; Zhao, Y. P. *Novel nanostructures for SERS biosensing*; Nano Today **2008**, 3, 31.
- (11) Aslan, K.; Geddes, C. D. *A review of an ultrafast and sensitive bioassay platform technology: Microwave-accelerated metal-enhanced fluorescence*; Plasmonics **2008**, 3, 89.

- (12) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G. *Nanostructured plasmonic sensors*; Chem. Rev. **2008**, 108, 494.
- (13) Fan, M. K.; Andrade, G. F. S.; Brolo, A. G. *A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry*; Anal. Chim. Acta **2011**, 693, 7.
- (14) Link, S.; El-Sayed, M. A. *Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals*; Annu. Rev. Phys. Chem. **2003**, 54, 331.
- (15) Wood, R. W. *On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum*; Proceedings of the Physical Society of London **1902**, 18, 269.
- (16) Wood, R. W. *Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity*; Philosophical Magazine **1912**, 23, 310.
- (17) Rayleigh, L. *On the Dynamical Theory of Gratings*; Proc. R. Soc. Lond. A **1907**, 79, 399.
- (18) Fano, U. *The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves)*; J. Opt. Soc. Am. **1941**, 31, 213.
- (19) Otto, A. *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection.*; Z Phys **1968**, 216, 398.
- (20) Kretschmann, E.; Reather, H. *Radiative decay of nonradiative surface plasmon excited by light.*; Z.Naturf. **1968**, 23A, 2135.
- (21) Pockrand, I.; Swalen, J. D.; Gordon, J. G.; Philpott, M. R. *Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies*; Surf. Sci. **1978**, 74, 237.
- (22) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I. *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*; Sens. Actuators, B **1983**, 4, 299.
- (23) Rich, R. L.; Myszka, D. G. *Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis*; Curr. Opin. Biotechnol. **2000**, 11, 54.
- (24) Kerns, E. H.; Di, L. *Pharmaceutical profiling in drug discovery*; Drug Discovery Today **2003**, 8, 316.



- (25) Schasfoort, R. B. M.; Tudos, A. J. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **2008**.
- (26) Homola, J. *In Frontiers in Planar Lightwave Circuit Technology*; Janz, S., Ctyroky, J., Tanev, S., Eds.; Springer Netherlands: **2006**; Vol. 216, p 101.
- (27) Dostálek, J.; Homola, J. *In Surface Plasmon Resonance Based Sensors*; Homola, J., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: **2006**; Vol. 4, p 191.
- (28) Kujawa, P.; Moraille, P.; Sanchez, J.; Badia, A.; Winnik, F. M. *Effect of molecular weight on the exponential growth and morphology of hyaluronan/chitosan multilayers: A surface plasmon resonance spectroscopy and atomic force microscopy investigation*; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9224.
- (29) Knoll, W.; Zizlsperger, M.; Liebermann, T.; Arnold, S.; Badia, A.; Liley, M.; Piscevic, D.; Schmitt, F. J.; Spinke, J. *Streptavidin arrays as supramolecular architectures in surface-plasmon optical sensor formats*; *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, 161, 115.
- (30) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*; *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2005**, 105, 1103.
- (31) Gramotnev, D. K.; Bozhevolnyi, S. I. *Plasmonics beyond the diffraction limit*; *Nat Photon* **2010**, 4, 83.
- (32) Lalanne, P.; Hugonin, J. P.; Liu, H. T.; Wang, B. *A microscopic view of the electromagnetic properties of sub-lambda metallic surfaces*; *Surf. Sci. Rep.* **2009**, 64, 453.
- (33) Vasa, P.; Ropers, C.; Pomraenke, R.; Lienau, C. *Ultra-fast nano-optics*; *Laser & Photonics Reviews* **2009**, 3, 483.
- (34) Harper, T. *Global funding of nanotechnologies and its impact* [Online Early Access]. Published Online: 2011. <http://cientifica.eu/blog/wp-content/uploads/downloads/2011/07/Global-Nanotechnology-Funding-Report-2011.pdf>.

- (35) Homola, J. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*; Homola, J., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: **2006**; Vol. 4, p 3.
- (36) Pitarke, J. M.; et al. *Theory of surface plasmons and surface-plasmon polaritons*; Reports on Progress in Physics **2007**, 70, 1.
- (37) Zayats, A. V.; Smolyaninov, II; Maradudin, A. A. *Nano-optics of surface plasmon polaritons*; Phys. Rep. **2005**, 408, 131.
- (38) Knoll, W. *Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves*; Annu. Rev. Phys. Chem. **1998**, 49, 569.
- (39) Hecht, E. *Optics*; Addison-Wesley, **2002**.
- (40) Dionne, J. A.; Sweatlock, L. A.; Atwater, H. A.; Polman, *A Planar metal plasmon waveguides: frequency-dependent dispersion, propagation, localization, and loss beyond the free electron model*; Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys. **2005**, 72.
- (41) Forstmann, F.; Gerhardt, R. *In Festkörperprobleme 22*; Grosse Aachen, P., Ed.; Springer Berlin / Heidelberg: **1982**; Vol. 22, p 291.
- (42) Anatoliy, P.; et al. *Influence of interband electronic transitions on the optical absorption in metallic nanoparticles*; J. Phys. D: Appl. Phys. **2004**, 37, 3133.
- (43) Barnes, W. L. *Surface plasmon–polariton length scales: a route to sub-wavelength optics*; Journal of Optics A: Pure and Applied Optics **2006**, 8, S87.
- (44) Raether, H. *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on grating*; Springer-Verlag: New York, **1988**.
- (45) Ince, R.; Narayanaswamy, R. *Analysis of the performance of interferometry, surface plasmon resonance and luminescence as biosensors and chemosensors*; Anal. Chim. Acta **2006**, 569, 1.
- (46) Live, L. S.; Bolduc, O. R.; Masson, J. F. *Propagating Surface Plasmon Resonance on Microhole Arrays*; Anal. Chem. **2010**, 82, 3780.
- (47) Jain, P. K.; Huang, W. Y.; El-Sayed, M. A. *On the universal scaling behavior of the distance decay of plasmon coupling in metal nanoparticle pairs: A plasmon ruler equation*; Nano Lett. **2007**, 7, 2080.

- (48) Haynes, C. L.; McFarland, A. D.; Zhao, L. L.; Van Duyne, R. P.; Schatz, G. C.; Gunnarsson, L.; Prikulis, J.; Kasemo, B.; Kall, M. Nanoparticle optics: *The importance of radiative dipole coupling in two-dimensional nanoparticle arrays*; J. Phys. Chem. B **2003**, 107, 7337.
- (49) Zheng, Y. B.; Juluri, B. K.; Mao, X. L.; Walker, T. R.; Huang, T. J. *Systematic investigation of localized surface plasmon resonance of long-range ordered Au nanodisk arrays*; J. Appl. Phys. **2008**, 103.
- (50) Svedendahl, M.; Chen, S.; Dmitriev, A.; Kaäll, M. *Refractometric Sensing Using Propagating versus Localized Surface Plasmons: A Direct Comparison*; Nano Lett. **2009**, 9, 4428.
- (51) Haes, A. J.; Zou, S.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Nanoscale Optical Biosensor: Short Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles*; J. Phys. Chem. B **2004**, 108, 6961.
- (52) McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P. *Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity*; Nano Lett. **2003**, 3, 1057.
- (53) Bukasov, R.; Ali, T. A.; Nordlander, P.; Shumaker-Parry, J. S. *Probing the Plasmonic Near-Field of Gold Nanocrescent Antennas*; ACS Nano **2010**, 4, 6639.
- (54) Bukasov, R.; Shumaker-Parry, J. S. *Highly tunable infrared extinction properties of gold nanocrescents*; Nano Lett. **2007**, 7, 1113.
- (55) Bukasov, R.; Shumaker-Parry, J. S. *Silver Nanocrescents with Infrared Plasmonic Properties As Tunable Substrates for Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy*; Anal. Chem. **2009**, 81, 4531.
- (56) Ji, J.; O'Connell, J. G.; Carter, D. J. D.; Larson, D. N. *High-throughput nanohole array based system to monitor multiple binding events in real time*; Anal. Chem. **2008**, 80, 2491.
- (57) Kim, S.; Jung, J. M.; Choi, D. G.; Jung, H. T.; Yang, S. M. *Patterned Arrays of Au rings for localized surface plasmon resonance*; Langmuir **2006**, 22, 7109.

- (58) Tam, F.; Moran, C.; Halas, N. *Geometrical Parameters Controlling Sensitivity of Nanoshell Plasmon Resonances to Changes in Dielectric Environment*; J. Phys. Chem. B **2004**, 108, 17290.
- (59) Lesuffleur, A.; Im, H.; Lindquist, N. C.; Oh, S. H. *Periodic nanohole arrays with shape-enhanced plasmon resonance as real-time biosensors*; Appl. Phys. Lett. **2007**, 90.
- (60) Brolo, A. G.; Gordon, R.; Leathem, B.; Kavanagh, K. L. *Surface plasmon sensor based on the enhanced light transmission through arrays of nanoholes in gold films*; Langmuir **2004**, 20, 4813.
- (61) Rindzevicius, T.; Alaverdyan, Y.; Dahlin, A.; Hook, F.; Sutherland, D. S.; Kall, M. *Plasmonic sensing characteristics of single nanometric holes*; Nano Lett. **2005**, 5, 2335.
- (62) Wang, H.; Brandl, D. W.; Le, F.; Nordlander, P.; Halas, N. J. *Nanorice: A Hybrid Plasmonic Nanostructure*; Nano Lett. **2006**, 6, 827.
- (63) Underwood, S.; Mulvaney, P. *Effect of the Solution Refractive Index on the Color of Gold Colloids*; Langmuir **1994**, 10, 3427.
- (64) Nehl, C. L.; Liao, H.; Hafner, J. H. *Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles*; Nano Lett. **2006**, 6, 683.
- (65) Lee, K.-S.; El-Sayed, M. A. *Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition*; J. Phys. Chem. B **2006**, 110, 19220.
- (66) Ebbesen, T. W.; Lezec, H. J.; Ghaemi, H. F.; Thio, T.; Wolff, P. A. *Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays*; Nature **1998**, 391, 667.
- (67) Gordon, R.; Sinton, D.; Kavanagh, K. L.; Brolo, A. G. *A New Generation of Sensors Based on Extraordinary Optical Transmission*; Acc. Chem. Res. **2008**, 41, 1049.
- (68) Coe, J. V.; Heer, J. M.; Teeters-Kennedy, S.; Tian, H.; Rodriguez, K. R. *Extraordinary Transmission of Metal Films with Arrays of Subwavelength Holes*; Annu. Rev. Phys. Chem. **2008**, 59, 179.

- (69) Murray, W. A.; Astilean, S.; Barnes, W. L. *Transition from localized surface plasmon resonance to extended surface plasmon-polariton as metallic nanoparticles merge to form a periodic hole array*; Phys. Rev. B **2004**, 69, Art. No. 165407.
- (70) Abrahamyan, I.; Nerkararyan, K. *Surface plasmon resonance on vicinity of gold-coated fiber tip*; Phys. Lett. A **2007**, 364, 494.
- (71) Jung, L. S.; Campbell, C. T.; Chinowsky, T. M.; Mar, M. N.; Yee, S. S. *Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films*; Langmuir **1998**, 14, 5636.
- (72) Piliarik, M.; Homola, J. *Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits?*; Opt. Express **2009**, 17, 16505.
- (73) Slavík, R.; Homola, J. *Ultra-high resolution long range surface plasmon-based sensor*; Sens. Actuators, B **2007**, 123, 10.
- (74) Vala, M.; Etheridge, S.; Roach, J. A.; Homola, J. *Long-range surface plasmons for sensitive detection of bacterial analytes*; Sens. Actuators, B **2009**, 139, 59.
- (75) Kabashin, A. V.; Evans, P.; Pastkovsky, S.; Hendren, W.; Wurtz, G. A.; Atkinson, R.; Pollard, R.; Podolskiy, V. A.; Zayats, A. V. *Plasmonic nanorod metamaterials for biosensing*; Nat. Mater. **2009**, 8, 867.
- (76) Malic, L.; Cui, B.; Veres, T.; Tabrizian, M. *Enhanced surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization on periodic gold nanoposts*; Opt. Lett. **2007**, 32, 3092.
- (77) Alleyne, C. J.; Kirk, A. G.; McPhedran, R. C.; Nicorovici, N. A. P.; Maystre, D. *Enhanced SPR sensitivity using periodic metallic structures*; Optics Express **2007**, 15, 8163.
- (78) Kim, K.; Kim, D. J.; Moon, S.; Kim, D.; Byun, K. M. *Localized surface plasmon resonance detection of layered biointeractions on metallic subwavelength nanogratings*; Nanotechnology **2009**, 20.
- (79) Yu, F.; Tian, S.; Yao, D.; Knoll, W. *Surface Plasmon Enhanced Diffraction for Label-Free Biosensing*; Anal. Chem. **2004**, 76, 3530.

- (80) Wark, A. W.; Lee, H. J.; Qavi, A. J.; Corn, R. M. *Nanoparticle-enhanced diffraction gratings for ultrasensitive surface plasmon biosensing*; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6697.
- (81) Vo-Dinh, T.; Wang, H. N.; Scaffidi, J. *Plasmonic nanoprobe for SERS biosensing and bioimaging*; *Journal of Biophotonics* **2010**, *3*, 89.
- (82) Sabur, A.; Havel, M.; Gogotsi, Y. *SERS intensity optimization by controlling the size and shape of faceted gold nanoparticles*; *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39*, 61.
- (83) Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. *Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study*; *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13794.
- (84) Dieringer, J. A.; McFarland, A. D.; Shah, N. C.; Stuart, D. A.; Whitney, A. V.; Yonzon, C. R.; Young, M. A.; Zhang, X.; Van Duyne, R. P. *Introductory Lecture Surface enhanced Raman spectroscopy: new materials, concepts, characterization tools, and applications*; *Faraday Discuss.* **2006**, 132, 9.
- (85) Lal, S.; Grady, N. K.; Kundu, J.; Levin, C. S.; Lassiter, J. B.; Halas, N. J. *Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies*; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 898.
- (86) Ko, H.; Singamaneni, S.; Tsukruk, V. V. *Nanostructured Surfaces and Assemblies as SERS Media*; *Small* **2008**, *4*, 1576.
- (87) Lakowicz, J. R. *In Principles of Fluorescence Spectroscopy*; . Ed.; Springer US: **2006**, p 277.
- (88) Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayad, M. A. *Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems*; *Plasmonics* **2007**, *2*, 107.
- (89) Jiang, G. Q.; Baba, A.; Ikarashi, H.; Xu, R. S.; Locklin, J.; Kashif, K. R.; Shinbo, K.; Kato, K.; Kaneko, F.; Advincula, R. *Signal enhancement and tuning of surface plasmon resonance in Au nanoparticle/polyelectrolyte ultrathin films*; *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 18687.

- (90) Gibson, K. F.; Correia-Ledo, D.; Couture, M.; Graham, D.; Masson, J. F. *Correlated AFM and SERS imaging of the transition from nanotriangle to nanohole arrays*; Chem. Commun. (Cambridge, U. K.) **2011**, 47, 3404.
- (91) Pawson, T. *Protein modules and signalling networks*; Nature **1995**, 373, 573.
- (92) Butt, H.-J.; Cappella, B.; Kappl, M. *Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications*; Surf. Sci. Rep. **2005**, 59, 1.
- (93) Sharma, A. K.; Jha, R.; Gupta, B. D. *Fiber-optic sensors based on surface plasmon resonance: A comprehensive review*; IEEE Sensors Journal **2007**, 7, 1118.
- (94) Grunwald, B.; Holst, G. *Fibre optic refractive index microsensors based on white-light SPR excitation*; Sens. Actuators, A **2004**, 113, 174.
- (95) Kurihara, K.; Ohkawa, H.; Iwasaki, Y.; Niwa, O.; Tobita, T.; Suzuki, K. *Fiber-optic conical microsensors for surface plasmon resonance using chemically etched single-mode fiber*; Anal. Chim. Acta **2004**, 523, 165.
- (96) Quong, M. C.; Elezzabi, A. Y. *Offset-apertured near-field scanning optical microscope probes*; Optics Express **2007**, 15, 10163.
- (97) Yu, Y.; Blake, P.; Roper, D. K. *Tapered Optical Fibers Designed for Surface Plasmon Resonance Phase Matching*; Langmuir **2009**, 25, 59.
- (98) Nohynek, G. J.; Lademann, J.; Ribaud, C.; Roberts, M. S. *Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety*; Critical Reviews in Toxicology **2007**, 37, 251.
- (99) Hecht, B.; Sick, B.; Wild, U. P.; Deckert, V.; Zenobi, R.; Martin, O. J. F.; Pohl, D. W. *Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications*; AIP, **2000**; Vol. 112.
- (100) Kim, J.; Song, K.-B. *Recent progress of nano-technology with NSOM*; Micron **2007**, 38, 409.
- (101) Rasmussen, A.; Deckert, V. *New dimension in nano-imaging: breaking through the diffraction limit with scanning near-field optical microscopy*; Anal. Bioanal. Chem. **2005**, 381, 165.

- (102) Novotny, L.; Stranick, S. J. *Near-field optical microscopy and spectroscopy with pointed probes*; *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2006**, *57*, 303.
- (103) Frey, H. G.; Bolwien, C.; Brandenburg, A.; Ros, R.; Anselmetti, D. *Optimized apertureless optical near-field probes with 15 nm optical resolution*; *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3105.
- (104) Bouhelier, A. *Field-enhanced scanning near-field optical microscopy*; *Microscopy Research and Technique* **2006**, *69*, 563.
- (105) Hartschuh, A.; Beversluis, M. R.; Bouhelier, A.; Novotny, L. *Tip-enhanced optical spectroscopy*; *Philos. Trans. R. Soc. London, A* **2004**, *362*, 807.
- (106) Patane, S.; Gucciardi, P. G.; Labardi, M.; Allegrini, M. *Apertureless near-field optical microscopy*; *Rivista Del Nuovo Cimento* **2004**, *27*, 1.
- (107) Bailo, E.; Deckert, V. *Tip-enhanced Raman scattering*; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 921.
- (108) Kawata, S.; Inouye, Y.; Verma, P. *Plasmonics for near-field nano-imaging and superlensing*; *Nat. Photonics* **2009**, *3*, 388.
- (109) Kalkbrenner, T.; Ramstein, M.; Mlynek, J.; Sandoghdar, V. *A single gold particle as a probe for apertureless scanning near-field optical microscopy*; *Journal of Microscopy* **2001**, *202*, 72.
- (110) Muller, D. J.; Dufrene, Y. F. *Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology*; *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 261.
- (111) Boland, T.; Ratner, B. D. *Direct measurement of hydrogen bonding in DNA nucleotide bases by atomic force microscopy*; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5297.
- (112) Florin, E.; Moy, V.; Gaub, H. *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*; *Science* **1994**, *264*, 415.
- (113) Dague, E.; Alsteens, D.; Latgé, J.-P.; Verbelen, C.; Raze, D.; Baulard, A. R.; Dufrene, Y. F. *Chemical Force Microscopy of Single Live Cells*; *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3026.



- (114) Galarreta, B. C.; Norton, P. R.; Lagugne-Labarthet, F. *Hexagonal Array of Gold Nanotriangles: Modeling the Electric Field Distribution*; *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 19952.
- (115) Cohen, D.; Dickerson, J. A.; Whitmore, C. D.; Turner, E. H.; Palcic, M. M.; Hindsgaul, O.; Dovichi, N. J. *Chemical Cytometry: Fluorescence-Based Single-Cell Analysis*; *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1, 165.
- (116) Frederix, P.; Bosshart, P. D.; Akiyama, T.; Chami, M.; Gullo, M. R.; Blackstock, J. J.; Dooleweerd, K.; de Rooij, N. F.; Staufer, U.; Engel, A. *Conductive supports for combined AFM-SECM on biological membranes*; *Nanotechnology* **2008**, 19, 10.
- (117) Crevillen, A. G.; Pumera, M.; Gonzalez, M. C.; Escarpa, A. *Towards lab-on-a-chip approaches in real analytical domains based on microfluidic chips/electrochemical multi-walled carbon nanotube platforms*; *Lab Chip* **2009**, 9, 346.
- (118) Borland, L. M.; Kottegoda, S.; Phillips, K. S.; Allbritton, N. L. *Chemical Analysis of Single Cells*; *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1, 191.
- (119) Amemiya, S.; Bard, A. J.; Fan, F.-R. F.; Mirkin, M. V.; Unwin, P. R. *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2008**; Vol. 1, p 95.
- (120) Cheng, M. M. C.; Cuda, G.; Bunimovich, Y. L.; Gaspari, M.; Heath, J. R.; Hill, H. D.; Mirkin, C. A.; Nijdam, A. J.; Terracciano, R.; Thundat, T.; Ferrari, M. *Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics*; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 11.
- (121) Waggoner, P. S.; Craighead, H. G. *Micro- and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection*; *Lab Chip* **2007**, 7, 1238.
- (122) Yang, C. Y.; Brooks, E.; Li, Y.; Denny, P.; Ho, C. M.; Qi, F. X.; Shi, W. Y.; Wolinsky, L.; Wu, B.; Wong, D. T. W.; Montemagno, C. D. *Detection of picomolar levels of interleukin-8 in human saliva by SPR*; *Lab Chip* **2005**, 5, 1017.
- (123) Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C.; Van Duyne, R. P. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*; *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1, 601.

- (124) Live, L. S.; Murray-Methot, M. P.; Masson, J. F. *Localized and Propagating Surface Plasmons in Gold Particles of Near-Micron Size*; J. Phys. Chem. C **2009**, 113, 40.
- (125) Yonzon, C. R.; Jeung, E.; Zou, S.; Schatz, G. C.; Mrksich, M.; Van Duyne, R. P. A *Comparative Analysis of Localized and Propagating Surface Plasmon Resonance Sensors: The Binding of Concanavalin A to a Monosaccharide Functionalized Self-Assembled Monolayer*; J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 12669.
- (126) Wu, D.; Xu, X.; Liu, X. *Tunable near-infrared optical properties of three-layered metal nanoshells*; J. Chem. Phys. **2008**, 129, 074711.
- (127) Malinsky, M. D.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Chain length dependence and sensing capabilities of the localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles chemically modified with alkanethiol self-assembled monolayers*; J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 1471.
- (128) Jain, P. K.; Huang, X. H.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine*; Acc. Chem. Res. **2008**, 41, 1578.
- (129) Campbell, C. T.; Kim, G. *SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics*; Biomaterials **2007**, 28, 2380.
- (130) Green, R. J.; Frazier, R. A.; Shakesheff, K. M.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B. *Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials*; Biomaterials **2000**, 21, 1823.
- (131) Mullett, W. M.; Lai, E. P. C.; Yeung, J. M. *Surface plasmon resonance-based immunoassays*; Methods (Oxford, U. K.) **2000**, 22, 77.
- (132) Yuk, J. S.; Ha, K. S. *Proteomic applications of surface plasmon resonance biosensors: analysis of protein arrays*; Exp. Mol. Med. **2005**, 37, 1.
- (133) Brockman, J. M.; Nelson, B. P.; Corn, R. M. *Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films*; Annu. Rev. Phys. Chem. **2000**, 51, 41.

- (134) Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J. F. *High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism*; *Talanta* **2009**, 77, 1680.
- (135) Huang, B.; Yu, F.; Zare, R. N. *Surface plasmon resonance imaging using a high numerical aperture microscope objective*; *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2979.
- (136) Gauvreau, B.; Hassani, A.; Fehri, M. F.; Kabashin, A.; Skorobogatiy, M. *Photonic bandgap fiber-based surface plasmon resonance sensors*; *Opt. Express* **2007**, 15, 11413.
- (137) Weeber, J. C.; Krenn, J. R.; Dereux, A.; Lamprecht, B.; Lacroute, Y.; Goudonnet, J. P. *Near-field observation of surface plasmon polariton propagation on thin metal stripes*; *Phys. Rev. B* **2001**, 6404, Art no. 045411.
- (138) Devaux, E.; Dereux, A.; Bourillot, E.; Weeber, J. C.; Lacroute, Y.; Goudonnet, J. P.; Girard, C. *Local detection of the optical magnetic field in the near zone of dielectric samples*; *Phys. Rev. B* **2000**, 62, 10504.
- (139) Sinton, D.; Gordon, R.; Brolo, A. G. *Nanohole arrays in metal films as optofluidic elements: progress and potential*; *Microfluidics and Nanofluidics* **2008**, 4, 107.
- (140) De Leebeeck, A.; Kumar, L. K. S.; de Lange, V.; Sinton, D.; Gordon, R.; Brolo, A. G. *On-chip surface-based detection with nanohole arrays*; *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4094.
- (141) Kim, J. H.; Moyer, P. J. *Laser-induced fluorescence within subwavelength metallic arrays of nanoholes indicating minimal dependence on hole periodicity*; *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 90, 131111.
- (142) Sharpe, J. C.; Mitchell, J. S.; Lin, L.; Sedoglavich, H.; Blaikie, R. J. *Gold nanohole array substrates as immunobiosensors*; *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2244.
- (143) Murray-Methot, M. P.; Menegazzo, N.; Masson, J. F. *Analytical and physical optimization of nanohole-array sensors prepared by modified nanosphere lithography*; *Analyst* **2008**, 133, 1714.
- (144) Jeyachandran, Y. L.; Karunagaran, B.; Narayandass, S. K.; Mangalaraj, D.; Jenkins, T. E.; Martin, P. J. *Properties of titanium thin films deposited by dc magnetron sputtering*; *Mater. Sci. Eng., A* **2006**, 431, 277.

- (145) Live, L. S.; Masson, J. F. *High Sensitivity of Plasmonic Microstructures near the Transition from Short-Range to Propagating Surface Plasmon*; J. Phys. Chem. C **2009**, 113, 10052.
- (146) He, G.; Zhang, L. D.; Li, G. H.; Liu, M.; Wang, X. J. *Structure, composition and evolution of dispersive optical constants of sputtered TiO<sub>2</sub> thin films: effects of nitrogen doping*; Journal of Physics D-Applied Physics **2008**, 41.
- (147) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold*; J. Am. Chem. Soc. **1989**, 111, 321.
- (148) El-Sayed, M. A. *Small is different: Shape-, size-, and composition-dependent properties of some colloidal semiconductor nanocrystals*; Acc. Chem. Res. **2004**, 37, 326.
- (149) Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P. *Nanosphere lithography: Tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles*; J. Phys. Chem. B **2000**, 104, 10549.
- (150) Link, S.; El-Sayed, M. A. *Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals*; Int. Rev. Phys. Chem. **2000**, 19, 409.
- (151) Huang, X. H.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. *Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods*; J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 2115.
- (152) Zynio, S. A.; Samoylov, A. V.; Surovtseva, E. R.; Mirsky, V. M.; Shirshov, Y. M. *Bimetallic layers increase sensitivity of affinity sensors based on surface plasmon resonance*; Sensors **2002**, 2, 62.
- (153) Szunerits, S.; Castel, X.; Boukherroub, R. *Surface Plasmon Resonance Investigation of Silver and Gold Films Coated with Thin Indium Tin Oxide Layers: Influence on Stability and Sensitivity*; J. Phys. Chem. C **2008**, 112, 15813.

- (154) Hutter, E.; Fendler, J. H.; Roy, D. *Surface Plasmon Resonance Studies of Gold and Silver Nanoparticles Linked to Gold and Silver Substrates by 2-Aminoethanethiol and 1,6-Hexanedithiol*; J. Phys. Chem. B **2001**, 105, 11159.
- (155) Nenninger, G. G.; Tobiska, P.; Homola, J.; Yee, S. S. *Long-range surface plasmons for high-resolution surface plasmon resonance sensors*; Sens. Actuators, B **2001**, 74, 145.
- (156) Byun, K. M.; Yoon, S. J.; Kim, D.; Kim, S. J. *Experimental study of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance biosensors by use of periodic metallic nanowires*; Opt. Lett. **2007**, 32, 1902.
- (157) Malic, L.; Cui, B.; Tabrizian, M.; Veres, T. *Nanoimprinted plastic substrates for enhanced surface plasmon resonance imaging detection*; Optics Express **2009**, 17, 20386.
- (158) Canpean, V.; Astilean, S. *Extending nanosphere lithography for the fabrication of periodic arrays of subwavelength metallic nanoholes*; Mater. Lett. **2009**, 63, 2520.
- (159) Canpean, V.; Astilean, S. *Interaction of light with metallic nanohole arrays*; Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B **2009**, 267, 397.
- (160) Cong, C. X.; Junus, W. C.; Shen, Z. X.; Yu, T. *New Colloidal Lithographic Nanopatterns Fabricated by Combining Pre-Heating and Reactive Ion Etching*; Nanoscale Research Letters **2009**, 4, 1324.
- (161) Huang, W. H.; Sun, C. H.; Min, W. L.; Jiang, P.; Jiang, B. *Templated Fabrication of Periodic Binary Nanostructures*; J. Phys. Chem. C **2008**, 112, 17586.
- (162) Lee, S. H.; Bantz, K. C.; Lindquist, N. C.; Oh, S.-H.; Haynes, C. L. *Self-Assembled Plasmonic Nanohole Arrays*; Langmuir **2009**, 25, 13685.
- (163) Löfås, S.; Johnsson, B.; Tegendal, K.; Rönnberg, I. *Dextran modified gold surfaces for surface plasmon resonance sensors: immunoreactivity of immobilized antibodies and antibody-surface interaction studies*; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **1993**, 1, 83.
- (164) Johnsson, B.; Löfås, S.; Lindquist, G.; Edström, Å.; Hillgren, R.-M. M.; Hansson, A. *Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor*

- surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies*; J. Mol. Recognit. **1995**, 8, 125.
- (165) Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles*; J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124, 10596.
- (166) Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *Au nanoparticles target cancer*; Nano Today **2007**, 2, 18.
- (167) Aslan, K.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Matveeva, E.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. *Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology*; Curr. Opin. Biotechnol. **2005**, 16, 55.
- (168) Lakowicz, J. R. *Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications*; Anal. Biochem. **2001**, 298, 1.
- (169) Osawa, M. *Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons*, **2001**; Vol. 81, p 163.
- (170) Cobley, C. M.; Chen, J.; Cho, E. C.; Wang, L. V.; Xia, Y. *Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications*; Chem. Soc. Rev. **2011**, 40, 44.
- (171) Yavuz, M. S.; Cheng, Y.; Chen, J.; Cobley, C. M.; Zhang, Q.; Rycenga, M.; Xie, J.; Kim, C.; Song, K. H.; Schwartz, A. G.; Wang, L. V.; Xia, Y. *Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light*; Nat. Mater. **2009**, 8, 935.
- (172) Yu, F.; Ahl, S.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Knoll, W.; Erlebacher, J. *Simultaneous Excitation of Propagating and Localized Surface Plasmon Resonance in Nanoporous Gold Membranes*; Anal. Chem. **2006**, 78, 7346.
- (173) Dhawan, A.; Canva, M.; Vo-Dinh, T. *Narrow groove plasmonic nano-gratings for surface plasmon resonance sensing*; Optics Express **2011**, 19, 787.

- (174) Dhawan, A.; Duval, A.; Nakkach, M.; Barbillon, G.; Moreau, J.; Canva, M.; VoDinh, T. *Deep UV nano-microstructuring of substrates for surface plasmon resonance imaging*; Nanotechnology **2011**, 22.
- (175) Live, L. S.; Masson, J. F. In *Plasmonics in Biology and Medicine VII*; VoDinh, T., Lakowicz, J. R., Eds. **2010**; Vol. 7577.
- (176) Moharam, M. G.; Gaylord, T. K. *Three-dimensional vector coupled-wave analysis of planar-grating diffraction*; J. Opt. Soc. Am. **1983**, 73, 1105.
- (177) Wang, H.; Tam, F.; Grady, N. K.; Halas, N. J. *Cu Nanoshells: Effects of Interband Transitions on the Nanoparticle Plasmon Resonance*; J. Phys. Chem. B **2005**, 109, 18218.
- (178) Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C.; Meyer, M. *An analytic model for the optical properties of gold*; J. Chem. Phys. **2006**, 125, 164705.
- (179) Hou, Y.; Xu, J.; Li, W.; Wang, X. *Coupled subwavelength gratings for surface-enhanced Raman spectroscopy*; Phys. Chem. Chem. Phys. **2011**, 13, 10946.
- (180) McFarland, A. D.; Young, M. A.; Dieringer, J. A.; Van Duyne, R. P. *Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy*; J. Phys. Chem. B **2005**, 109, 11279.
- (181) Nikitin, A. et al., L. *Surface Electromagnetic Field Radiated by a Subwavelength Hole in a Metal Film*; Phys. Rev. Lett. **2010**, 105, 073902.
- (182) Zhang, J.; Lakowicz, J. R. *Metal-enhanced fluorescence of an organic fluorophore using gold particles*; Optics Express **2007**, 15, 2598.
- (183) Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M. *Enhanced SPR response from patterned immobilization of surface bioreceptors on nano-gratings*; Biosens. Bioelectron. **2009**, 24, 3043.
- (184) Beeram, S. R.; Zamborini, F. P. *Effect of Protein Binding Coverage, Location, and Distance on the Localized Surface Plasmon Resonance Response of Purified Au Nanoplates Grown Directly on Surfaces*; J. Phys. Chem. C **2011**, 115, 7364.

- (185) Patskovsky, S.; Kabashin, A. V.; Meunier, M.; Luong, J. H. T. *Silicon-Based Surface Plasmon Resonance Sensing with Two Surface Plasmon Polariton Modes*; *Appl. Opt.* **2003**, 42, 6905.
- (186) Lee, H. J.; Wark, A. W.; Corn, R. M. *Enhanced bioaffinity sensing using surface plasmons, surface enzyme reactions, nanoparticles and diffraction gratings*; *Analyst* **2008**, 133, 596.



## **Annexes**

## Annexe 1 – Supporting Information: High sensitivity of plasmonic structures near the transition from short range to propagating surface plasmon

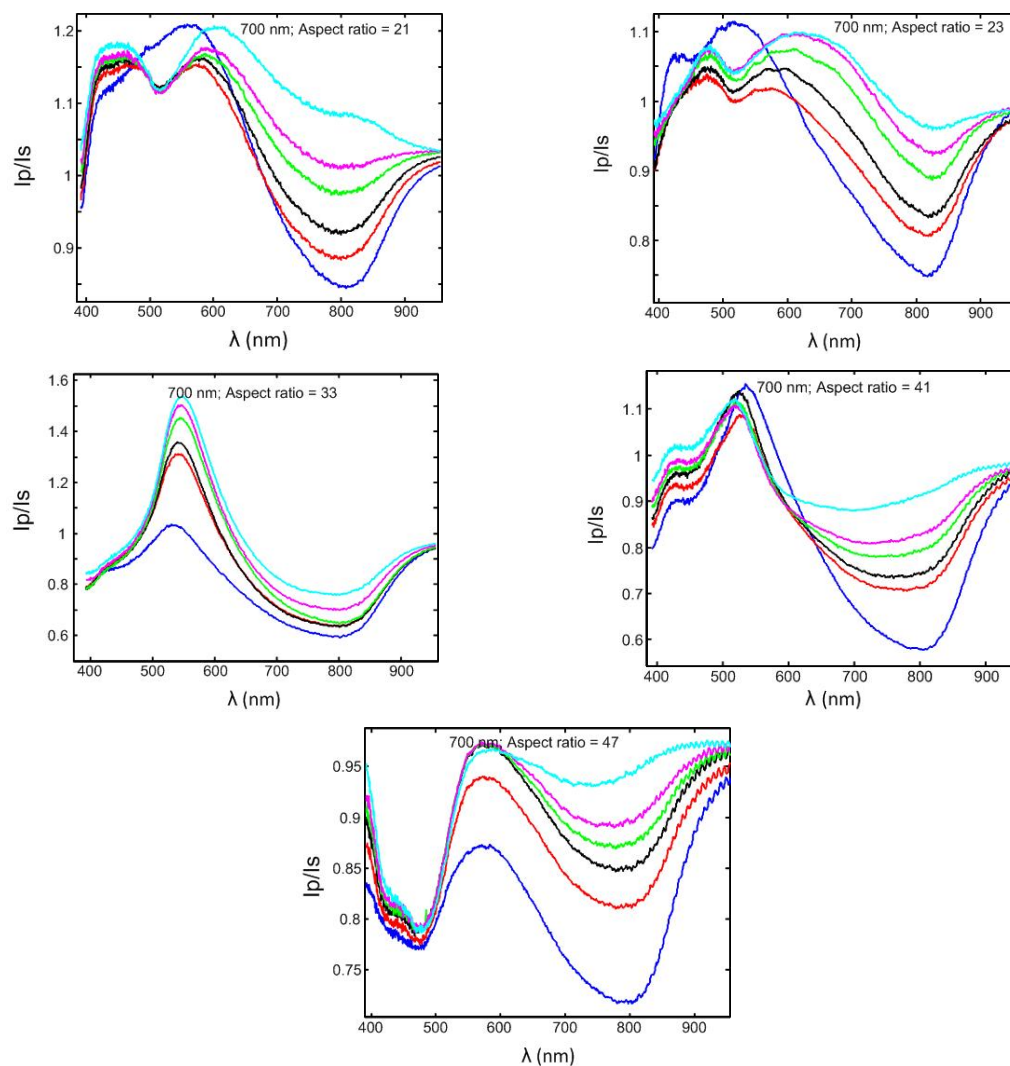


Figure A. Spectra of 700 nm nanotriangles with different aspect ratio, acquired in total internal reflection at  $72.8^\circ$ ; blue: air, red: RI = 1.33359, black : RI = 1.34722, green : RI = 1.36320, purple : RI = 1.37335, and light blue : RI = 1.39073

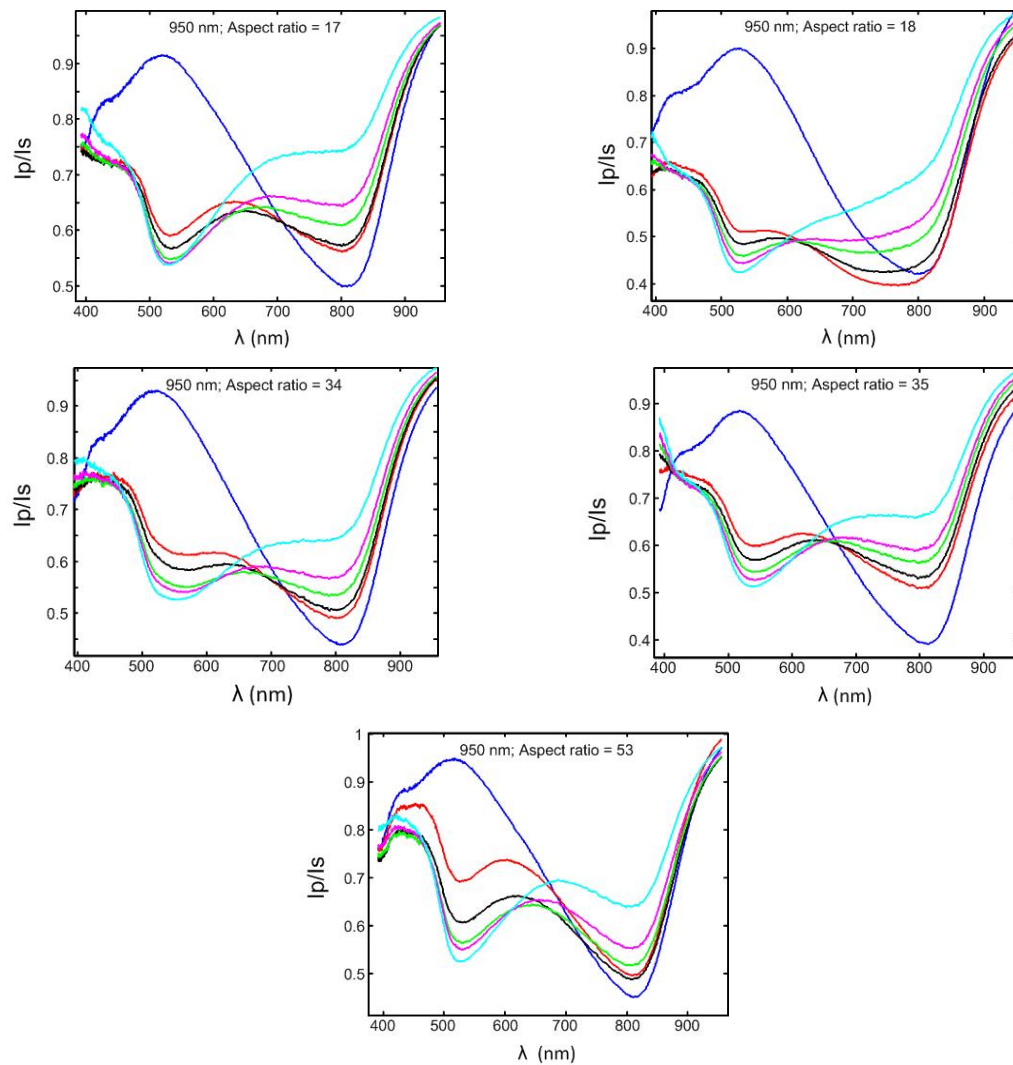


Figure B. Spectra of 950 nm nanotriangles with different aspect ratio, acquired in total internal reflection at  $72.8^\circ$ ; blue: air, red: RI = 1.33359, black : RI = 1.34722, green : RI = 1.36320, purple : RI = 1.37335, and light blue : RI = 1.39073

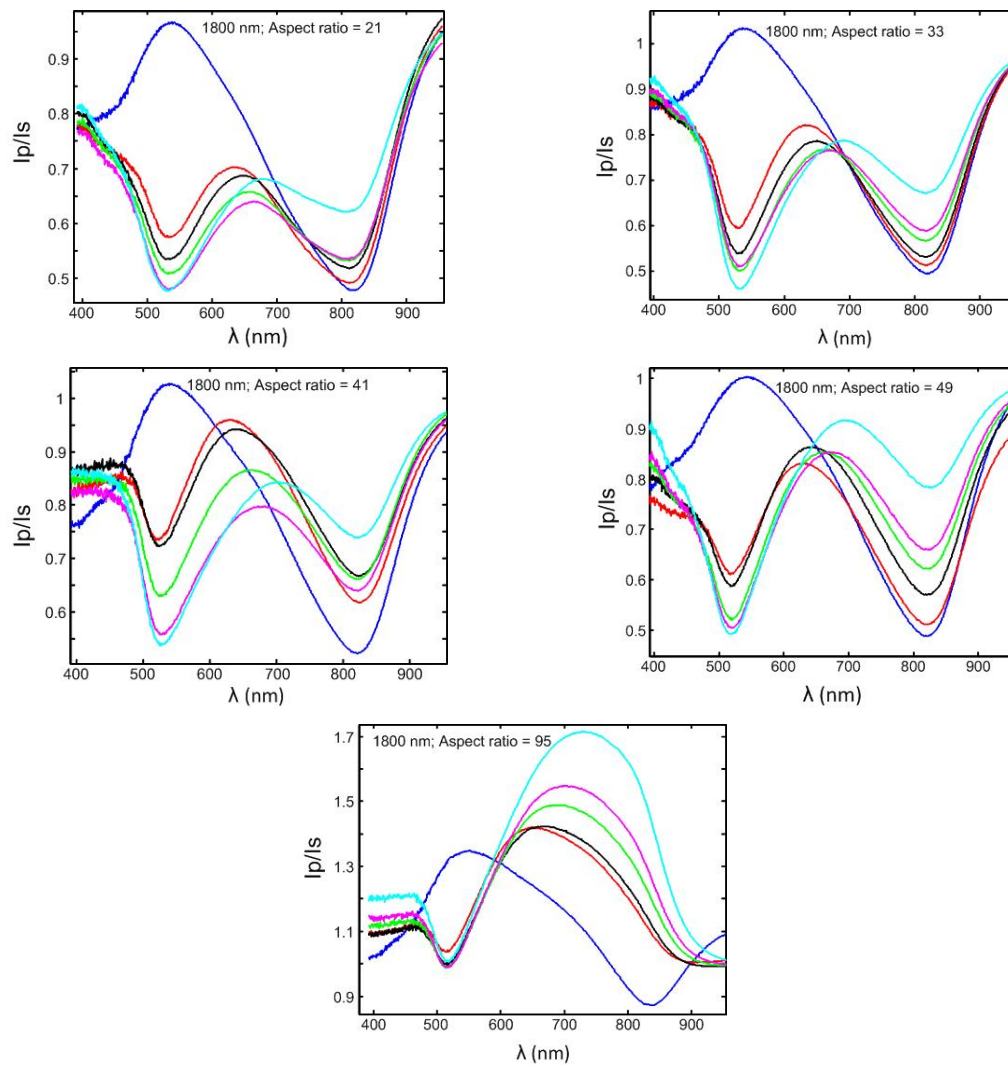


Figure C. Spectra of 1800 nm nanotriangles with different aspect ratio, acquired in total internal reflection at  $72.8^\circ$ ; blue: air, red: RI = 1.33359, black : RI = 1.34722, green : RI = 1.36320, purple : RI = 1.37335, and light blue : RI = 1.39073.

## **Annexe 2 – Supporting Information: Propagating Surface Plasmon Resonance on microhole arrays**

### *Effect of the metal thickness near the transition point between triangle and microhole arrays*

The effect of the film thickness on the SPR signal was measured with 3.2  $\mu\text{m}$  sphere mask that was slightly etched to result in large triangles ( $1 > \text{diam/period} > 0.7$ ). At this diam/period, a 50 nm thick micro plasmonic structure exhibits the SPR response characteristic of triangles. The triangles were fabricated with Au thicknesses between 20 to 200 nm by changing the Au deposition time. Two size regimes were observed for an increasing thickness of the plasmonic structures. Firstly, the SPR spectra in water present a transmission maximum band for structures with a thickness  $< 100$  nm (Figure A, left panel). For structures of 100 nm and greater, an absorption band similar to SPR on continuous film is observed (Figure A, right panel). At thicknesses reaching 200 nm, the SPR response is very weak and hard to discern from baseline. However, SPR in microstructures is still active at large film thicknesses, while SPR on continuous films is relatively inexistent for thicknesses greater than 60-70 nm.

The transmission maximum band characteristic of triangle arrays becomes narrower with increasing thicknesses from 20 to 75 nm. This is noted by a generally smaller FWHM ratio for structures of increased thickness. In that range of thicknesses, the highest sensitivity to refractive index was higher for 20 nm thick structures (1030 nm/RIU) than for 30 to 60 nm thick structures (Table A). Around 100 nm, a transition in the SPR active band occurs from a transmission maximum characteristic of triangle to an absorption band similar to continuous film SPR. The sensitivity around the transition cannot be measured because the absorption band is not visible for RI above 1.34 (Figure B). After the transition, the FWHM ration remains constant around 600 – 900, while the sensitivity decreases from 4500 nm/RIU with 110 nm thick structures to 2160 nm/RIU at 200 nm thickness (Table A). This result is similar to the sensitivity for micro plasmonic structures of decreasing diam/period, where the sensitivity to refractive index is higher near the transition point from triangle to microhole arrays. Thus, it is observed that the

sensitivity is correlating with the SPR spectra. For structures with smaller Au thickness, the SPR spectra and the sensitivity correspond to the one observed for triangle arrays, while thicker structures correlate with SPR on a thin film. Moreover, the position of the absorption band is around  $\lambda = 500$  nm for thinner structures, similar to triangle. This band redshifts gradually as the thickness increases to around  $\lambda = 600$  nm, close to the excitation wavelength observed in thin films SPR. Hence, a transition in the plasmonic properties is observed with micro plasmonic structures of increasing thickness.

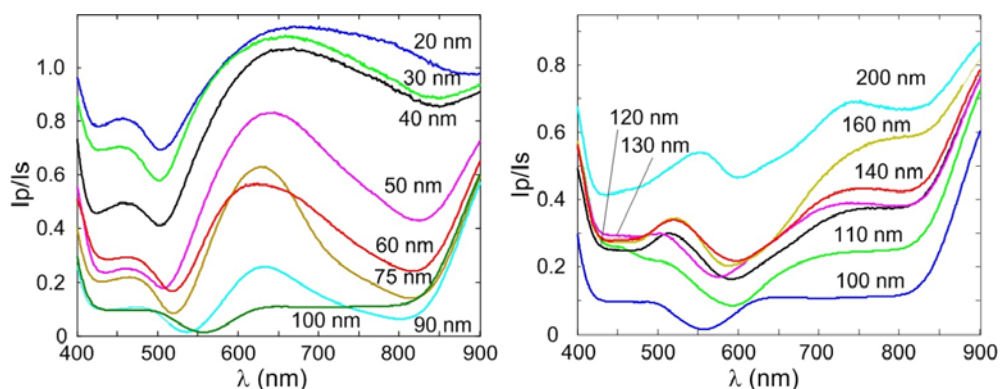


Figure A. (Left) SPR spectra of  $3.2 \mu\text{m}$  microhole arrays with  $1 > \text{diam/period} > 0.7$  measured in water. The depth of the microholes is varied from 20 to 100 nm. The SPR response is similar to triangles. (Right) The depth of the microholes is varied from 100 to 200 nm. The SPR response changes significantly and is comparable to the one obtained with continuous thin films.

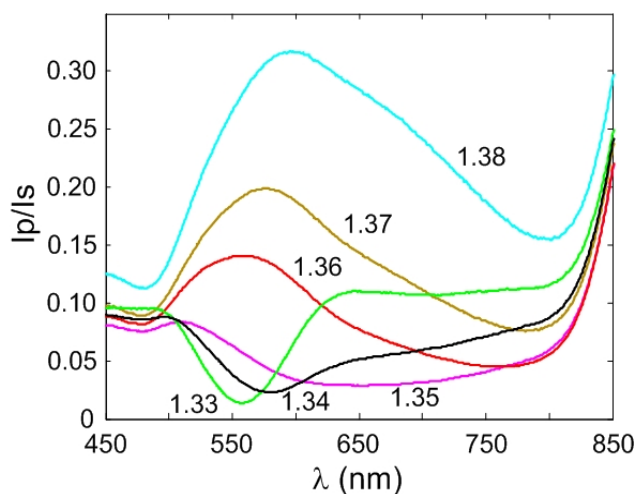


Figure B. SPR calibration spectra of 100 nm thick  $3.2 \mu\text{m}$  microhole arrays. The absorption band vanishes for RI over 1.35 RIU.

Table A. The sensitivity and spectra aspect characterization of the SPR active band with 3.2  $\mu\text{m}$  microhole arrays (diam./period. = 0.78) as the thickness changes.

<b>Thickness (nm)</b>	$\delta\lambda/\delta\eta$ (nm/RIU)	FWHM ratio	<b>Thickness (nm)</b>	$\delta\lambda/\delta\eta$ (nm/RIU)	FWHM ratio
<b>20</b>	1030 $\pm$ 40	1200	100	---	864
<b>30</b>	665 $\pm$ 6	880	110	4500 $\pm$ 365	650
<b>40</b>	780 $\pm$ 70	795	120	2950 $\pm$ 183	661
<b>50</b>	410 $\pm$ 18	380	130	2760 $\pm$ 95	623
<b>60</b>	600 $\pm$ 6	475	140	2880 $\pm$ 200	750
<b>75</b>	---	610	160	2325 $\pm$ 90	628
<b>90</b>	---	324	200	2160 $\pm$ 70	842

## **Annexe 3 – Supporting Information: Enhanced biosensing using excitation of localized and propagating surface plasmons in microhole arrays**

### **Detailed materials and methods**

#### **Preparation and characterization of microhole arrays**

The method for the fabrication and characterization of the microhole arrays was adapted from previous reports.<sup>85,86</sup> Briefly, microhole arrays were prepared using polystyrene beads of 3.2  $\mu\text{m}$  in diameter (Thermo Scientific particle technology, 10% w/w) mixed with water and ethanol in a ratio of 65% pure water (18.2 M $\Omega$ )/25% sphere solution/10% ethanol. A 120  $\mu\text{L}$  drop of the mixture was drop coated on a clean 20 x 60 mm BK7 coverslip glass (cleaned with piranha solution followed by an ammonium/peroxide mixture). Slow evaporation of the solvent created large regions (few  $\text{mm}^2$  areas) of closely-packed spheres monolayers. The periodicity of the mask was kept constant at 3.2  $\mu\text{m}$ , while reactive ion etching (RIE) with oxygen plasma for about 25 min decreased the sphere diameter to 1.8  $\mu\text{m}$ . A 1 nm thick Cr adhesion layer was sputtered on the etched sphere mask followed by the deposition of Au layer, varying for the different samples, from 50 to 150 nm. Shadowing effects of the mask decreases the deposition rate compared to areas with defects (i.e. unmasked, missing sphere or junction of lattices with different orientation). The sphere mask was removed by immersion in an ultrasound bath with a water/ethanol solution exposing the microhole arrays on the surface of the BK7 substrate. The hole diameter and depth of the microhole arrays were characterized by atomic force microscopy (AFM).

#### **RCWA simulations**

This software allows a full vectorial solution of the Maxwell's equations in the Fourier domain, wherein periodic permittivity functions are represented using Fourier harmonics and the electromagnetic fields are represented as summations over coupled



waves. RCWA analysis significantly decreases computational time and required memory size as compared to the FDTD method and was therefore employed to calculate the wavelength and angular dependence of the reflectance from microhole arrays in gold films. This software enables RCWA analysis of the metallic media to include dispersion relations of the dielectric constants of the metals such as gold.<sup>208</sup>

Simulations were performed to cover the angular range of 40-85°, the wavelength range of 450-900 nm. The RCWA calculations were carried out to determine the effect of varying the refractive index of bulk media (varying the bulk RI from 1.33 to 1.36 RIU) around the microhole arrays as well as localized changes of refractive index (varying the localized RI from 1.33 to 1.53 RIU) such as those caused by binding of a 1 nm thick layer of a biomolecule target to a functionalized surface of the microhole arrays structured metallic film.

### **Raman microscopy**

Microhole arrays were modified with a monolayer of 4-nitrobenzene thiol (4-NBT) by incubating the substrates in a 500  $\mu$ M aqueous solution of 4-NBT overnight. The substrates were thoroughly washed with water and then ethanol to remove any unbound 4-NBT. Microhole arrays were imaged in laser reflectance mode and Raman images were acquired with an alpha300 instrument (WITec). Regions of 10 x 10  $\mu$ m were imaged with a HeNe laser (3.85 mW, 18% power intensity) at 632.8 nm focused on the surface with a 100x microscope objective (Olympus, MPlan-FL, 0.90 NA). Spatially-resolved spectrum acquired for 100 ms were collected by lateral steps of 100 nm and analyzed with spectrophotometer to image the Raman intensity of the substrate. A reference and SERS image was respectively obtained using signal contrast from the laser line reflectance (to capture the geometry of the microhole arrays) and the 4-NBT 1573  $\text{cm}^{-1}$  Raman band (map of the SERS intensity).

## Angulo-spectral SPR instrument

SPR measurements were performed with angulo-spectral SPR instrument based on a right-angle LaSFn9 glass prism. While this instrument was designed for single wavelength excitation, we modified it to house a broadband light source covering the 400-900 nm range and replace the PMT detector with a spectrophotometer. Samples were centered at the rotation axis of a goniometer (Huber) controlled using a stepper-motor driven  $\theta/2\theta$  and motor control unit allowed angle variation step  $\geq 0.01^\circ$ . The excitation angle at the BK7 substrate/microhole arrays interface was calculated with  $n_{\text{LaSFn9}} = 1.85$  and  $n_{\text{BK7}} = 1.52$  for a range of angles from  $\theta = 70$  to  $77^\circ$  (see supporting information, S8). In that angle range, the wavelength position of the SPR band for every sample analyzed was within  $\lambda = 450$  to  $950$  nm for RI indexes from 1.33 to 1.36 RIU. Generally, the SPR response was measured at  $0.5^\circ$  increment at the goniometer, which corresponds to 11 angles in the targeted range. The angle was scanned by increments of  $0.2^\circ$  at the goniometer from  $\theta = 70^\circ$  to  $74^\circ$  for the IgG biodetection experiment. The optical properties were interrogated using a white light halogen source polarized prior the excitation and the reflected light was analyzed with a PI Acton spectrophotometer equipped with a 150 g/mm grating covering wavelength range from  $\lambda = 450$  to  $950$  nm. The wavelength resolution using a 1024 pixels Andor camera was  $\sim 0.5$  nm/pixel. Each spectrum for a specific excitation angle is an average of 50 acquisitions at 20 ms/acquisition. The SPR spectra were calculated as the ratio of the p-polarized light divided by the s-polarized light. The spectral position of the SPR band was calculated using a minimum-finding algorithm on Matlab software.

## Anti-IgG / IgG kinetics

The freshly sputtered Au films were immersed overnight in  $\sim 5$  mM solution of 16-mercaptodecanoic acid (16-MHA, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) dissolved in dimethylformaldehyde (DMF) to form a densely packed monolayer. The substrates were then cleaned with ethanol, dried and placed on the SPR instrument to monitor the subsequent steps. The anti-IgG (Affinite Pure Goat anti-human IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) linkage to the surface was performed by activating

the surface with N-ethyl-N<sup>3</sup>-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC, Fluka) and N-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich) chemistry. The 16-MHA layer was first reacted with a solution composed of 100 mM EDC and 20 mM NHS dissolved in 18.2 M $\Omega$  water for 2 minutes. The activated sensor was then rinsed with PBS at pH 4.5 to optimize the receptor linkage. A solution of 153 nM of anti-IgG dissolved in PBS was reacted for 10 minutes with the surface, followed by a rinse step with PBS. Unreacted NHS activated sites were passivated for 5 min with a 1 M ethanolamine solution at pH 8.5 and washed away with PBS. The biodetection of 100 nM of human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) dissolved in PBS was run for 10 min, and the surface was then washed with PBS. SPR response profile at various excitation angles were calculated with the wavelength shift of the SPR signal in PBS before and after the kinetics, while quantitative kinetic measures were performed at  $\theta = 72.6^\circ$ . Every result represents an average of at least 4 different measurements on identically prepared microhole arrays.

### **Text 1: Influence of the bulk RI of biofluids on the optimal excitation angle**

The enhanced sensitivity measured in bulk RI changes is preserved for local RI changes at the vicinity of surface, but instrumental consideration are needed if the RI of the matrix is greater than water or PBS. Monitoring of local RI changes at the optimal SPR excitation conditions in various biological matrices can be achieved as the enhanced sensitivity excitation can be predicted. The dispersion relations for microhole arrays in different bulk RI show a similar dispersion shifting toward greater  $\theta_{\text{exc}}$  with the increasing RI (Figure S5 - Right). The wavelength location of the greatest SPR shift between RI changes of 10 mRIU is always near  $\lambda = 610$  nm (See Figure S5 - left panel). The optimal excitation conditions for a specific RI can be calculated by tracking the  $\theta_{\text{exc}}$  at which the plasmonic band is close to  $\lambda = 610$  nm for different RI. Thus, enhanced SPR sensing can be performed at  $73^\circ$  for simple matrices such as phosphate buffer solution

(PBS) or urine (RI of 1.34 RIU)<sup>209</sup> or at 74° or 75° for more complex matrices such as bovine serum (RI of 1.35) or cell lysate (RI at 1.36 RIU)<sup>210</sup>.

## Supporting information tables and figures

Table S1 – Calculation of the SERS amplification with three spectral lines of 4-NBT for microhole arrays of various thicknesses.

Thickness	Raman	1075 cm <sup>-1</sup>	1335 cm <sup>-1</sup>	1573 cm <sup>-1</sup>
	shift	$\nu(\text{CS})$	$\nu(\text{NO}_2)$	$\nu(\text{CC})$
50 nm		1.06	1.08	1.07
70 nm		1.10	1.15	1.11
120 nm		1.72	2.01	1.75
150 nm		1.55	1.71	1.57

Table S2 – SPR response at  $\theta_{\text{exc}} = 72.6^\circ$  for microhole arrays.

	Anti-IgG*	IgG*	Bulk sensitivity.**	Resolution
	$\Delta\lambda$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	nm/RIU	$\mu\text{RI}$
Continuous film (n=4)	2.0 ± 0.5	0.8 ± 0.2	1670 ± 220	28
Microhole arrays (n=4)	6 ± 1	3 ± 1	4000 ± 800	40

\* 153 nM anti-IgG and 100 nM IgG were measured respectively.

\*\* The bulk sensitivity was measured from 1.333 to 1.340 RIU.

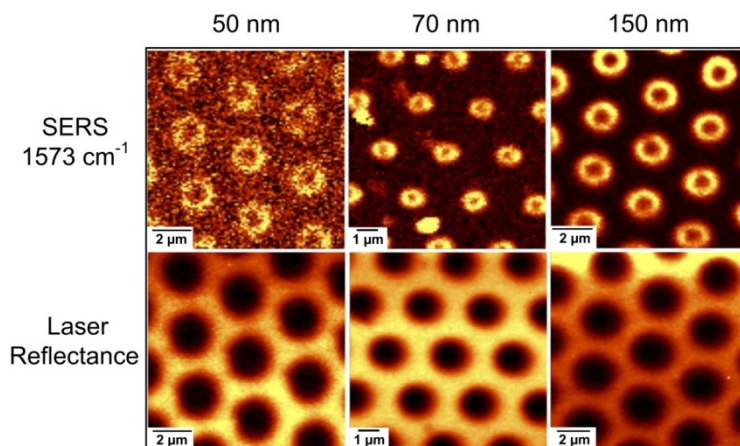


Figure S1 – False color images of the SERS response and laser reflectance for microhole arrays of different thickness.

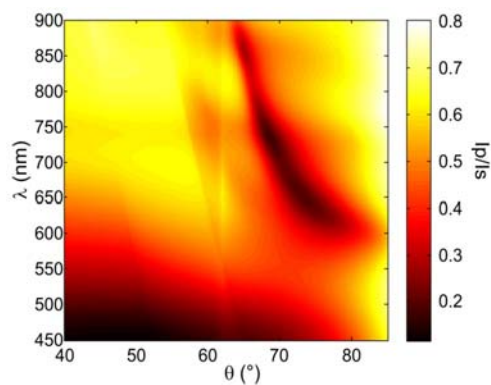


Figure S2 – RCWA simulation of the angulo-spectral dispersion curve for microhole arrays in water.

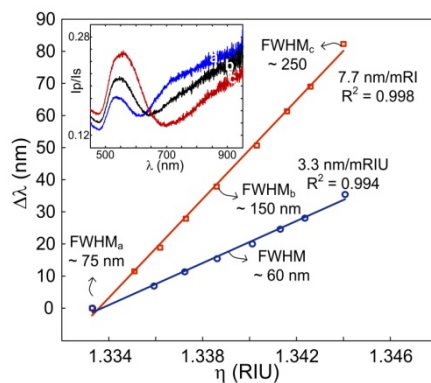


Figure S3 – Analytical comparison of microhole arrays (red) to continuous film (blue) for the linearity of the RI calibration curve and full-width half-maximum (FWHM).

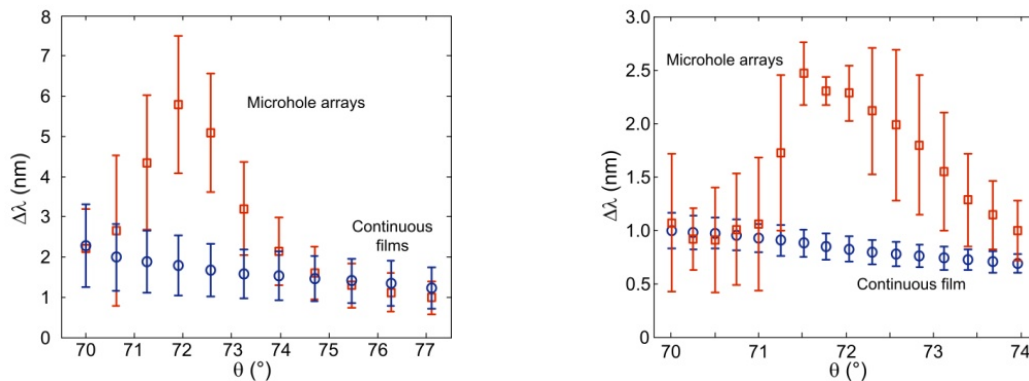


Figure S4 – SPR response for (Left) the immobilization of 153 nM anti-IgG and (Right) the detection of IgG.

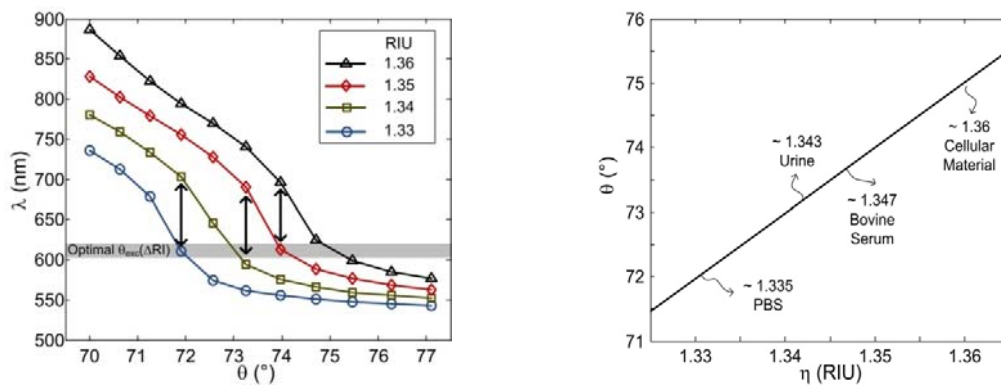
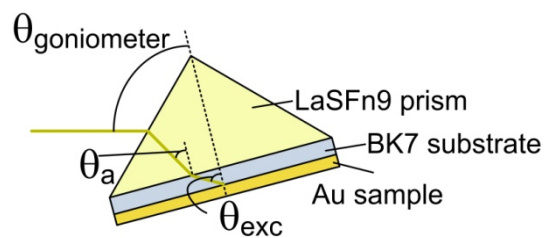


Figure S5 – (Left) The optimal SPR shift in the dispersion relations curves with RI from 1.33 to 1.36 RIU is consistent at  $\lambda \sim 610$  nm as indicated by the black arrows. (Right)  $\theta_{exc}$  at  $\lambda = 610$  nm for various RI was calculated (black line) from experimental data, which is related to various biological matrices.



$$\theta_a = [\arcsin ((\eta_{\text{air}} \times \sin (\theta_{\text{gonio}}-45))/\eta_{\text{LaSFn9}})] + 45$$

$$\theta_{\text{exc}} = [\arcsin (\eta_{\text{LaSFn9}} \times \sin(\theta_a))/\eta_{\text{BK7}}]$$

$$\eta_{\text{LaSFn9}} = 1.850$$

$$\eta_{\text{BK7}} = 1.517$$

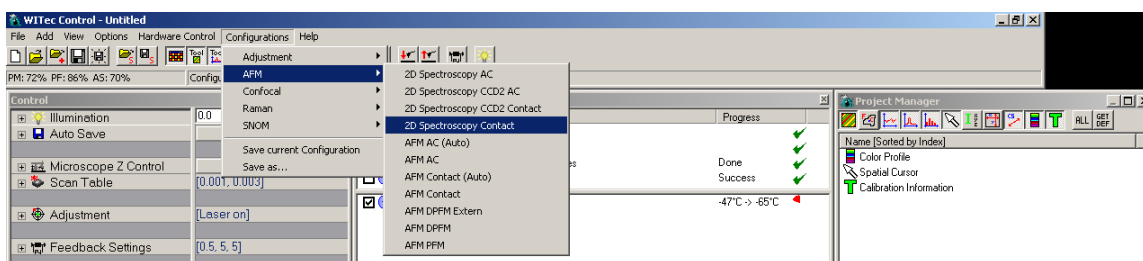
$\theta_{\text{gonio}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{exc}} (^{\circ})$
55.0	70.0
55.5	70.6
56.0	71.2
56.5	71.9
57.0	72.6
57.5	73.2
58.0	74.0
58.5	74.7
59.0	75.5
59.5	76.3
60.0	77.1

Figure S6 – Schematic of the optical configuration for the angulo-spectral SPR instrument and calculation of the excitation angle.

## Annexe 4 – Information supplémentaire: Vers l'intégration du SPR à la microscopie à force atomique (AFM)

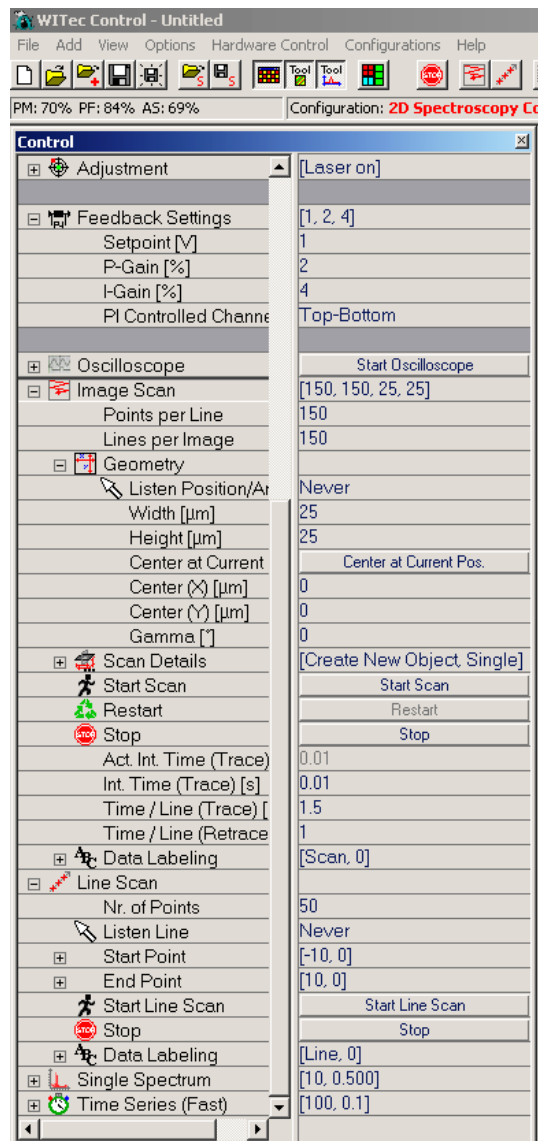
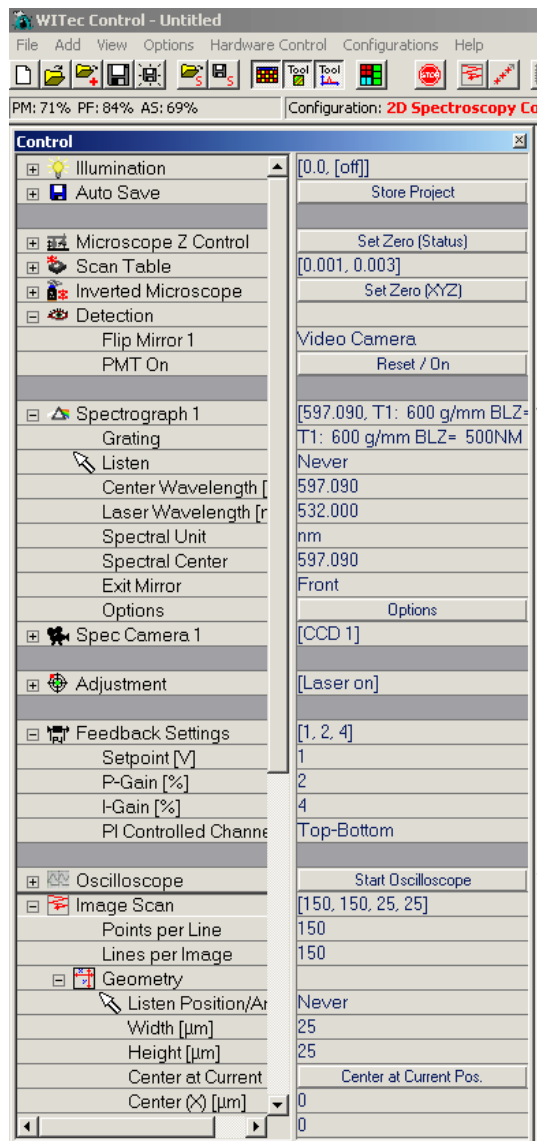
### A4.1 Traitement des images par WITec Project

Le traitement d'images collectées en spectroscopie peut être fait directement sur le logiciel que fournit la compagnie *WITec* avec le *Alpha SNOM 300 S*. Pour faire la capture de spectre en simultanée avec le balayage AFM de la surface, il faut travailler en mode *AFM 2D Spectroscopy Contact* qui se trouve dans l'onglet *Configuration/AFM*.

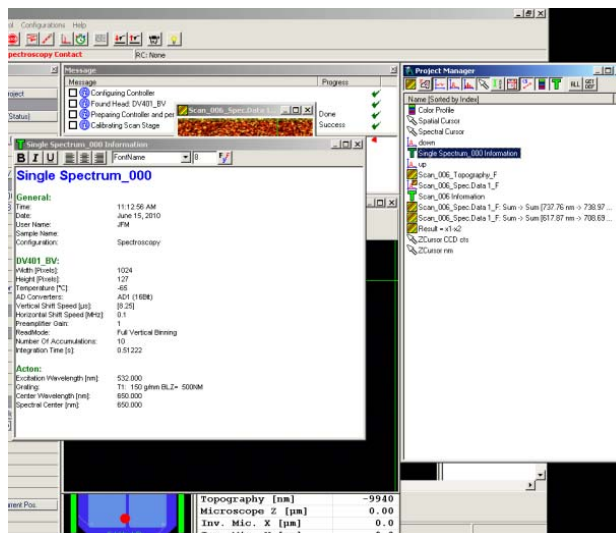


Dans ce mode, le panneau de contrôle permet de changer, entre autres, les paramètres du spectrographe, le miroir de détection dans le parcours en transmission, la force de retour sur le cantilevier (*Feedback Settings*), le nombre de pixel par image et l'aire balayé et le temps d'acquisition spectrale par point (*Time Series (Fast)*).

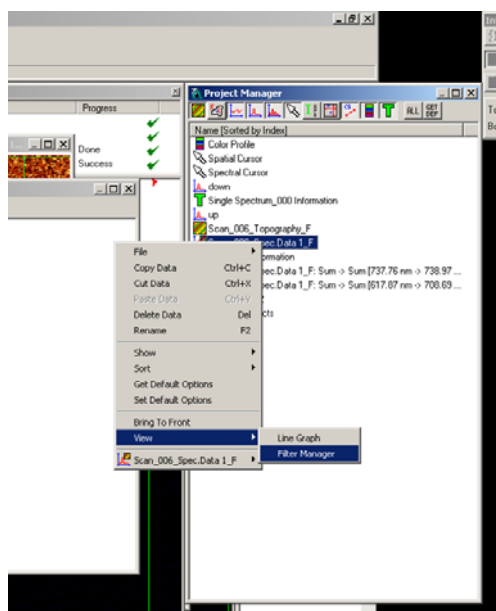




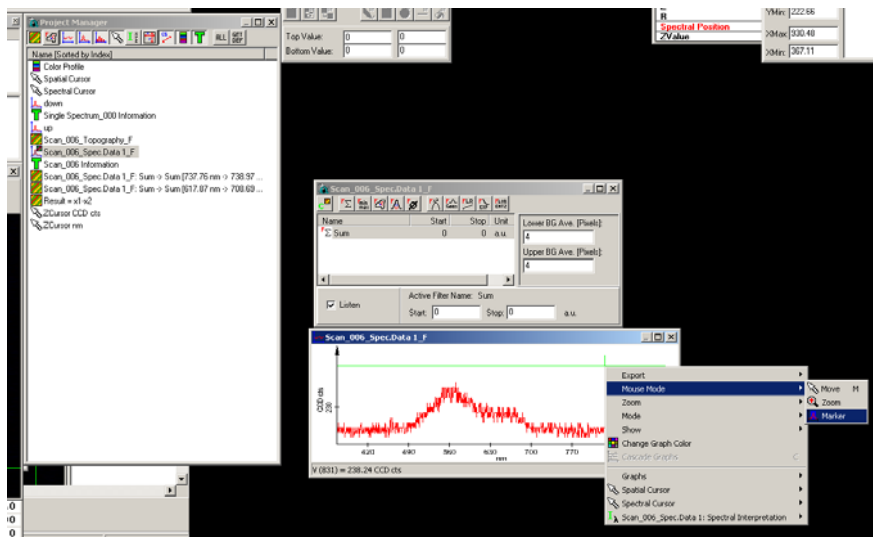
Les paramètres sur les images précédentes ne sont pas ceux employés pour faire de l'imagerie AFM-SPR. Ceux-ci doivent être adaptés selon l'application visée. Une fois les paramètres établis, il est possible de travailler en mode *oscilloscope* pour valider si tout fonctionne comme prévu sur le montage et ensuite le balayage débute lorsqu'on appuis sur le bouton *Start Scan*. À ce moment, une fenêtre ouvre pour suivre la topographie de l'échantillon par AFM et simultanément à chaque point un spectre est enregistré. Une fois terminée, les données sont enregistrées dans *Project Manager*. Notez que les spectres peuvent changer selon le pixel sélectionné sur l'image topographique.



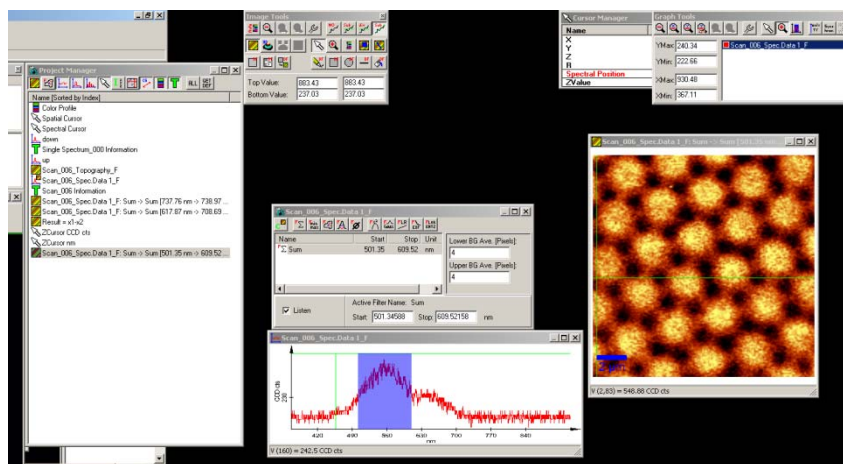
L'information sur les paramètres du balayage sont enregistrés dans un fichier dont le logo est un « T » vert. L'image AFM et les spectres se trouvent chacun dans un fichier qu'il est possible de consulter en cliquant directement dessus dans le *Project Manager*. Pour construire une image à partir des spectres, il faut cliquer avec le bouton de droite de la souris sur le fichier des spectres du balayage et sélectionner *Filter Manager* dans l'onglet *View*.



Une nouvelle boîte apparaît avec le nom du fichier correspondant ainsi qu'une fenêtre avec les spectres. Pour construire une image à partir de l'intensité d'une plage de longueur d'onde spécifique sur les spectres, il faut sélectionner *Sum* dans la boîte *Filter Manager* et cliquer sur *Listen*. Par la suite, il faut cliquer sur le bouton de droite de la souris sur les spectres et sélectionner *Marker* dans *Mouse Mode*.



L'option *Marker* permet de cliquer sur le spectre et sélectionner une région en tenant enfoncé le bouton de gauche de la souris.



Pour obtenir l'image, il faut appuyer sur le premier à gauche dans la boîte *Filter Manager* ce qui lance le calcul et génère l'image dans *Project Manager*. Il faut cliquer sur l'image pour l'ouvrir et dans la boîte *Image Tools*, il est possible de soustraire les artéfacts de balayage ainsi que d'ajuster l'intensité de l'image.

Ces images peuvent être exportées en JPEG ou tout autre format désiré (voir le manuel de WITec).

#### A4.2 Paramètres de l'image

##### A4.1 Paramètres AFM-SPR figures 5.3 et 5.4

<b>Image Scan:</b>	
<b>Points per Line:</b>	150
<b>Lines per Image:</b>	150
<b>Scan Width [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	10.000
<b>Scan Height [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	10.000
<b>Scan Origin X [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Origin Y [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Z-Rotation [<math>^\circ</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Speed (Trace) [s/Line]:</b>	4.831
<b>Scan Speed (Retrace) [s/Line]:</b>	3.000
<b>Integration Time (Trace) [s]:</b>	0.03221
<b>P-I Controller:</b>	
<b>Setpoint [V]:</b>	1.5
<b>P-Gain [%]:</b>	2
<b>I-Gain [%]:</b>	2
<b>Controlled Channel:</b>	Top-Bottom

## A4.2 Paramètres AFM-SPR figure 5.5

---

<b>Image Scan:</b>	
<b>Points per Line:</b>	150
<b>Lines per Image:</b>	150
<b>Scan Width [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	10.000
<b>Scan Height [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	10.000
<b>Scan Origin X [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Origin Y [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Z-Rotation [<math>^\circ</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Speed (Trace) [s/Line]:</b>	4.831
<b>Scan Speed (Retrace) [s/Line]:</b>	3.000
<b>Integration Time (Trace) [s]:</b>	0.03221
<b>P-I Controller:</b>	
<b>Setpoint [V]:</b>	1.5
<b>P-Gain [%]:</b>	2
<b>I-Gain [%]:</b>	2
<b>Controlled Channel:</b>	Top-Bottom

---

## A4.3 Paramètres AFM-SPR figure 5.6

---

<b>Image Scan:</b>	
<b>Points per Line:</b>	150
<b>Lines per Image:</b>	150
<b>Scan Width [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	15.000
<b>Scan Height [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	15.000
<b>Scan Origin X [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Origin Y [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Z-Rotation [<math>^\circ</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Speed (Trace) [s/Line]:</b>	4.831
<b>Scan Speed (Retrace) [s/Line]:</b>	3.000
<b>Integration Time (Trace) [s]:</b>	0.03221

---

<b>P-I Controller:</b>	
<b>Setpoint [V]:</b>	1
<b>P-Gain [%]:</b>	2
<b>I-Gain [%]:</b>	4
<b>Controlled Channel:</b>	Top-Bottom

#### A4.4 Paramètres AFM-SPR figure 5.7.

<b>Image Scan:</b>	
<b>Points per Line:</b>	150
<b>Lines per Image:</b>	150
<b>Scan Width [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	10.000
<b>Scan Height [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	10.000
<b>Scan Origin X [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Origin Y [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Z-Rotation [<math>^\circ</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Speed (Trace) [s/Line]:</b>	4.831
<b>Scan Speed (Retrace) [s/Line]:</b>	3.000
<b>Integration Time (Trace) [s]:</b>	0.03221
<b>P-I Controller:</b>	
<b>Setpoint [V]:</b>	1
<b>P-Gain [%]:</b>	2
<b>I-Gain [%]:</b>	2
<b>Controlled Channel:</b>	Top-Bottom

## A4.5 Paramètres AFM-SPR figure 5.8

---

<b>Image Scan:</b>	
<b>Points per Line:</b>	150
<b>Lines per Image:</b>	150
<b>Scan Width [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	15.000
<b>Scan Height [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	15.000
<b>Scan Origin X [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Origin Y [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Z-Rotation [<math>^\circ</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Speed (Trace) [s/Line]:</b>	4.831
<b>Scan Speed (Retrace) [s/Line]:</b>	3.000
<b>Integration Time (Trace) [s]:</b>	0.03221
<b>P-I Controller:</b>	
<b>Setpoint [V]:</b>	1
<b>P-Gain [%]:</b>	2
<b>I-Gain [%]:</b>	2
<b>Controlled Channel:</b>	Top-Bottom

---

## A4.6 Paramètres AFM-SPR triangles figure 5.9

---

<b>Image Scan:</b>	
<b>Points per Line:</b>	150
<b>Lines per Image:</b>	150
<b>Scan Width [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	15.000
<b>Scan Height [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	15.000
<b>Scan Origin X [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Origin Y [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Z-Rotation [<math>^\circ</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Speed (Trace) [s/Line]:</b>	4.831
<b>Scan Speed (Retrace) [s/Line]:</b>	3.000
<b>Integration Time (Trace) [s]:</b>	0.03221

---

**P-I Controller:**

<b>Setpoint [V]:</b>	1
<b>P-Gain [%]:</b>	2
<b>I-Gain [%]:</b>	2
<b>Controlled Channel:</b>	Top-Bottom

## A4.7 Paramètres AFM-SPR trous figure 5.9

**Image Scan:**

<b>Points per Line:</b>	150
<b>Lines per Image:</b>	150
<b>Scan Width [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	15.000
<b>Scan Height [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	15.000
<b>Scan Origin X [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Origin Y [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>	0.000
<b>Z-Rotation [<math>^\circ</math>]:</b>	0.000
<b>Scan Speed (Trace) [s/Line]:</b>	4.831
<b>Scan Speed (Retrace) [s/Line]:</b>	3.000
<b>Integration Time (Trace) [s]:</b>	0.03221

**P-I Controller:**

<b>Setpoint [V]:</b>	1
<b>P-Gain [%]:</b>	2
<b>I-Gain [%]:</b>	2
<b>Controlled Channel:</b>	Top-Bottom



