

Université de Montréal

# **Études et applications des propriétés plasmoniques des réseaux nanostructurés**

par Maxime Couture

Département de chimie  
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.) en chimie

Août 2016

© Maxime Couture, 2016

## Résumé

Cette thèse porte sur l'étude des propriétés plasmoniques de réseaux nanostructurés dans le but de développer des applications de bioanalyse. L'intérêt de travailler avec ces structures est dû à leur grande sensibilité de surface, leur facilité de fabrication et leur simplicité d'analyse par spectrophotométrie en transmission. L'objectif était de fabriquer un dispositif capable d'effectuer du criblage à haut débit pour des fins biomédicales.

Le premier objectif de la thèse porte sur l'étude des propriétés plasmoniques des réseaux de nanotrous. Une compréhension approfondie de ces structures a permis d'exploiter efficacement leur performance pour des applications de bioanalyse plasmonique. Une solution analytique fut établie pour étudier les modes de diffractions des polaritons de plasmons de surface d'onde de Bloch (BW-SPP). Cette équation a permis de corroborer les observations expérimentales avec des calculs théoriques par rapport au couplage plasmonique des réseaux de nanotrous. De plus, la variation de l'angle d'incidence a permis de déplacer la fréquence à laquelle les modes plasmoniques sont excités. Il était donc possible d'ajuster la position des BW-SPP de façon à maximiser un couplage à une longueur d'onde désirée. Cet effet a été exploité avec la technique d'amplification de surface de diffusion Raman exaltée (SERS). Finalement, la sensibilité en surface de réseaux de nanotrous a été amplifiée selon l'angle d'excitation en transmission. Ce gain en sensibilité permet la détection de protéines d'IgG humain pour des basses concentrations de l'ordre du nanomolaire (nM).

Le second objectif de la thèse traite du développement d'un lecteur multipuits couplé avec la technologie des réseaux de nanotrous afin de créer une plateforme de détection plasmonique pour du criblage à haut débit. Cet instrument offre une analyse en transmission d'échantillons nanostructurés à l'aide d'une plaque 96-puits pour des angles d'incidence allant jusqu'à 50°. Une nouvelle méthode de microfabrication de réseaux de nanotrous par photolithographie fut établie. Cette technique a permis de fabriquer des réseaux de nanotrous sur de grandes surfaces avec uniformité. L'efficacité du système fut démontrée pour la détection de protéines d'IgG humain, du méthotrexate (MTX) et le criblage d'anticorps de l'antigène prostatique spécifique (PSA).

Le dernier volet de la thèse discute de l'étude des propriétés plasmoniques de réseaux de nanodisques recouverts d'un film d'or pour amplifier plus fortement la sensibilité des capteurs plasmoniques. Cette section de la thèse a démontré la performance des réseaux de nanodisques en tant que capteur plasmonique. En effet, les réseaux de nanodisques ont l'avantage d'exciter un mode de Bragg (BM, *Bragg modes*) en transmission directe générant une bande plasmonique fine ayant un facteur de mérite (FOM, *figure of merit*) élevé (sensibilité/réponse plasmonique). L'excitation de ces structures en transmission directe a simplifié énormément l'utilisation du robot multipuits par l'excitation à incidence normale tout en offrant une FOM supérieure aux réseaux de nanotrous. Pour continuer, des simulations 3D et une image Raman du signal SERS des structures ont démontré que le champ plasmonique des BM est grandement confiné autour des nanodisques. Ce confinement du champ plasmonique des réseaux de nanodisques à générer un facteur d'amplification SERS de l'ordre de  $10^7$ .

En somme, cette thèse démontre une étude des propriétés plasmoniques de réseaux nanostructurés pour des applications de bioanalyse par criblage à haut débit. Les études rapportées dans cette thèse ont prouvés que le champ plasmonique des réseaux de nanotrous peut être contrôlé afin d'amplifier leur sensibilité. De plus, la thèse rapporte la première plateforme de bioanalyse plasmonique utilisant un lecteur multipuits. Finalement, la fabrication de structures plasmoniques composés de nanodisques d'or a permis de mettre en évidence des propriétés optiques qui peuvent être mises à profit pour des mesures optiques ultras sensibles.

**Mots-clés** : Plasmonique, réseaux de nanotrous, réseaux de nanodisque, biocapteur, lecteur multipuits, SERS

## Abstract

This thesis describes the plasmonic properties of nanostructured arrays towards development of biosensing applications. These structures exhibited several advantages such as high surface sensitivity, ease of microfabrication and simple excitation setup in transmission spectroscopy. The goal was to design a plasmonic device able to achieve high throughput analysis for biomedical purposes.

The first section of the thesis covers a study of the plasmonic properties of nanohole arrays. An analytical solution was derived to assess plasmonic properties of the diffraction modes of Bloch-Wave surface plasmon polaritons (BW-SPP). Tuning of the excitation angle allowed for a precise control of the plasmonic signal's position and an optimal coupling at a specific wavelength. This feature of nanohole arrays was demonstrated for applications in surface-enhanced Raman scattering (SERS). Finally, this section described the enhancement of the surface sensitivity of nanohole arrays through variation of the excitation angle in transmission. Such enhancement of the sensitivity allowed for detection of the concentration of human IgG proteins in the low nanomolar range.

The second section of the thesis discusses the development of a multi-well plate reader coupled with the nanohole arrays technology. A custom-built plasmonic reader, designed at University of Montreal, allowed analysis of plasmonic structures in transmission with a 96-well plate for excitation where the incident angle is up to  $50^\circ$  relative to normal. A novel microfabrication technique of nanohole arrays, based on photolithography, is described. This technique allowed fabrication of nanohole arrays on a large scale with great surface uniformity. The performance of the plasmonic reader is demonstrated for sensing of human IgG proteins, methotrexate (MTX) and screening of prostate specific antigen (PSA) antibodies.

The final section of the thesis describes studies on the plasmonic properties of nanodisk arrays coated with a gold film. This section described the performance of nanodisk arrays for plasmonic sensing. This structure benefited from the excitation of Bragg modes (BM) in direct transmission, which generated a sharp plasmonic band with a high figure of merit (FOM). The excitation of nanodisk arrays in direct transmission simplified the design of the plasmonic reader while providing a greater FOM than nanohole arrays. Furthermore, 3D simulations and a Raman

image of the nanodisk arrays' SERS intensity showed the confinement of the plasmonic field of the BM at the edges of the nanodisk. Such confinement of the plasmonic field of nanodisk arrays led to high SERS enhancements to a factor of  $10^7$ .

In summary, this thesis studied the plasmonic properties of nanostructured arrays towards development of applications for high throughput biosensing. These studies proved that the plasmonic field of nanohole arrays can be tuned to enhance their surface sensitivity. Furthermore, the thesis revealed the first plasmonic sensing platform using a multiwell plate reader. Finally, the thesis describes a novel plasmonic structure with outstanding optical properties; the gold coated nanodisk arrays.

**Keywords:** Plasmonic, nanohole arrays, nanodisk arrays, biosensor, multi-well plate reader, SERS

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xx
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Avant-propos.....	1
1.1.1 Contexte .....	1
1.1.2 Organisation de la thèse .....	3
1.2 Les structures plasmoniques .....	4
1.3 La résonance des plasmons de surface.....	7
1.3.1 Historique.....	7
1.3.2 Théorie des plasmons de surface .....	8
1.3.3 Instrumentation, performance et limitations de la SPR .....	11
1.4 Résonance des plasmons de surface localisés.....	14
1.4.1 Théorie de la LSPR .....	14
1.4.2 Performance et limitations de la LSPR.....	15
1.5 Les réseaux de nanotrous .....	17
1.5.1 Historique.....	17
1.5.2 Théorie .....	18
1.5.3 Performance, applications et limitations.....	20
1.6 Les réseaux de nanodisques .....	24
1.7 Bioanalyse plasmonique .....	26
1.7.1 Principes d'un biocapteur plasmonique .....	26
1.7.2 Cinétique de bioanalyse plasmonique.....	27

1.7.3 Chimie de surface des biocapteurs plasmoniques.....	30
1.8 Diffusion Raman exaltée par effet de surface.....	33
1.8.1 Théorie de la spectroscopie Raman .....	34
1.8.2 Théorie du SERS.....	34
1.9 Méthodes de fabrication des réseaux nanostructurés.....	36
1.9.1 Fabrication par faisceau ionique focalisée.....	37
1.9.2 Lithographie de nanosphères .....	38
1.9.3 Photolithographie.....	39
1.9.4 Lithographie par interférence laser .....	41
1.9.5 Lithographie par nanoimpression .....	43
1.10 Directions et perspective de la thèse.....	44
Chapitre 2 : Tuning the 3D plasmon field of nanohole arrays.....	47
2.1 Abstract.....	48
2.2 Introduction.....	49
2.3 Materials and Methods.....	51
2.3.1 Fabrication and characterization of the sensors .....	51
2.3.2 Optical measurements.....	52
2.3.3 SERS .....	52
2.3.4 FDTD.....	53
2.4 Results and discussion .....	54
2.4.1 Tunable plasmonic properties.....	54
2.4.2 Biosensing.....	58
2.4.3 Surface enhanced spectroscopies.....	62
2.5 Conclusions.....	66
2.6 Acknowledgements.....	67
2.7 Supporting information.....	67
2.7.1 Derivation of the SPP equation for nanohole arrays.....	67
2.7.2 FDTD simulation of the hole diameter and metal thickness : impacts on the plasmonic signal.....	70

2.7.3 Experimental details about the fabrication of gold nanohole arrays and the optical measurements.....	71
2.7.4 Plasmon resonance energy with incident angle and periodicity .....	72
2.7.5 Assessing the surface sensitivity and penetration depth .....	74
Chapitre 3: 96-Well Plasmonic Sensing with Nanohole Arrays.....	76
3.1 Abstract .....	77
3.2 Introduction.....	77
3.3 Experimental section.....	80
3.3.1 Nanohole array fabrication .....	80
3.3.2 Instrumentation .....	80
3.3.3 Plasmonic sensing.....	82
3.3.4 IgG detection.....	83
3.3.5 Anti-PSA screening .....	83
3.3.6 MTX monitoring.....	83
3.4 Results and discussion .....	84
3.4.1 Nanohole arrays .....	84
3.4.2 Multi-well plate reader.....	86
3.4.3 Validation of the plate reader in plasmonic sensing .....	87
3.4.4 Plasmonic biosensing.....	88
3.4.5 Antibody Screening .....	90
3.4.6 MTX Monitoring .....	91
3.5 Conclusion .....	93
3.6 Acknowledgments.....	93
3.7 Supporting information.....	94
Chapitre 4 : High figure of merit (FOM) of Bragg modes in Au-coated nanodisk arrays for plasmonic sensing .....	96
4.1 Abstract .....	97
4.1 Introduction.....	98
4.2 Results and discussion .....	100
4.3 Conclusion .....	112



4.4 Acknowledgements.....	112
Chapitre 5 : Conclusions.....	113
5.1 Perspectives.....	114
Bibliographie.....	117
Annexe 1) Microabrication des réseaux nanostructurés par photolithographie.....	I
Annexe 2 ) Fonctionnement du robot lecteur multipuits .....	III
Annexe 3) Lithographie par interférence laser .....	VI

## Liste des tableaux

<b>Table 3.1</b> Plasmonic shift for anti PSA screening upon secondary detection of 1 $\mu$ M of PSA. .....	90
<b>Table 4.1</b> Plasmonic sensing properties of gold-coated nanodisk arrays.....	105

# Liste des figures

<b>Figure 1.1</b>	Schématisation des différentes structures plasmoniques et leurs modes d'excitation respectifs. ....	5
<b>Figure 1.2</b>	Schématisation des plasmons de surface (SP) à l'interface métal-diélectrique (plan X-Z) et propagation des polaritons de plasmon de surface (SPP) lorsqu'excités par une lumière polarisée TM. Le plan XY est perpendiculaire au plan XZ. ....	8
<b>Figure 1.3</b>	Schéma de la dispersion de $k_x$ dans l'air (ligne noire) et de $k_{sp}$ (courbe bleu). Le couplage via un prisme (ligne rouge) ou un réseau (ligne verte) augmente $k_x$ et permet l'excitation des SP. ....	9
<b>Figure 1.4</b>	Déplacement bathochromique du signal SPR d'un film d'or suite à l'augmentation de l'indice de réfraction du milieu diélectrique. $I_p/I_s$ correspond au ratio d'intensité de lumière polarisée p ( $I_p$ ) et polarisée s ( $I_s$ ). ....	10
<b>Figure 1.5</b>	Schéma d'un montage SPR basé sur la configuration Kretschmann à interrogation de longueur d'onde. ....	11
<b>Figure 1.6</b>	Schéma d'un instrument SPR à imagerie. ....	13
<b>Figure 1.7</b>	Schéma du phénomène de résonance des plasmons de surface localisés. ....	15
<b>Figure 1.8</b>	A) Schéma de la diffraction de la lumière à travers un nanotrou B) Spectre de transmission théorique selon la relation entre $T(\lambda)$ et $(r/\lambda)^4$ . ....	17
<b>Figure 1.9</b>	Schéma d'un réseau de nanotrous ayant une périodicité avec une configuration hexagonale (A) ou carrée (B). ....	19
<b>Figure 1.10</b>	Schéma d'un réseau hexagonal de nanotrous en or. « P » est la périodicité et « d » est le diamètre des trous. ....	21
<b>Figure 1.11</b>	Schéma des différentes méthodes de détection avec les réseaux de nanotrous selon A) Flux au-dessus et B) Flux à travers. ....	22
<b>Figure 1.12</b>	Réseaux de nanodisques en or B) Réseaux de nanodisques sur un espaceur de $\text{SiO}_2$ et un film d'or C) Réseaux de nanodisques sur un film d'or. ....	24
<b>Figure 1.13</b>	Schématisation d'un sensorgramme lors d'une bioanalyse plasmonique. ....	27
<b>Figure 1.14</b>	A) Sensorgramme pour la bioanalyse successive de concentrations croissantes d'analytes. B) Courbe d'étalonnage correspondante de $1/\Delta\lambda_{spr}$ en fonction de $1/[A]$ . ....	29

<b>Figure 1.15</b>	Variation de la fraction de surface recouverte ( $\theta_A$ ) en fonction de la concentration d'analyte selon trois régimes de $[A]$ : faible, élevée et très élevée. ....	30
<b>Figure 1.16</b>	Schématisation du processus d'immobilisation d'une SAM d'alcane thiol sur un film d'or. ....	31
<b>Figure 1.17</b>	Représentation d'un sensorgramme lors de la construction d'un biocapteur afin de détecter un analyte.....	32
<b>Figure 1.18</b>	A) Schéma d'une analyse Raman d'un marqueur. B) Schéma d'une analyse SERS d'un marqueur à l'aide d'un film de nanosphères d'or ; l'excitation d'un LSP (champ rouge) amplifie le signal Raman. ....	35
<b>Figure 1.19</b>	Image par microscopie électronique à balayage (SEM) d'un réseau de nanotrous fabriqués par FIB. ....	37
<b>Figure 1.20</b>	Principe de fabrication des réseaux de nanotrous par NSL. ....	38
<b>Figure 1.21</b>	Image par microscopie à force atomique (AFM) d'un réseau de nanotrous en or fabriqué par NSL.....	39
<b>Figure 1.22</b>	Concept de microfabrication de réseaux de nanotrous en or par photolithographie. ....	39
<b>Figure 1.23</b>	Image SEM d'un réseau de microtrous hexagonale fabriqué par photolithographie à l'aide d'une résine positive. Le réseau a une périodicité de 3,2 $\mu\text{m}$ , le diamètre des trous est de 1,8 $\mu\text{m}$ et l'épaisseur du film d'or est de 65 nm. <sup>146</sup> .....	40
<b>Figure 1.24</b>	Schéma du montage d'interféromètre de Lloyd permettant d'effectuer du LIL. Les flèches blanches correspondent à la direction du faisceau lumineux.....	42
<b>Figure 1.25</b>	Schéma du processus de microfabrication par nanoimpression UV. ....	43
Figure 2.1	Schematic representation of a gold nanohole arrays. ....	51
Figure 2.2	Influence of the incidence angle on the optical properties of nanohole arrays. Top Left: Transmission spectrum of nanohole arrays (820 nm periodicity, 500 nm hole diameter) at normal incidence. All six plasmon bands overlap in a single and narrow band. Top Right: Tilting the nanohole arrays to 7° leads to the splitting in 6 plasmon bands. Bottom: False color image of the plasmon dispersion curves for nanohole arrays (P = 820 nm). Bottom Left: Experimental data collected with a broadband scanning angle transmission setup and Bottom Right: FDTD simulation for the same structure. The	

theoretical values according to equation 2.1 are shown for each plasmon mode (black lines). High and low transmittance are respectively coloured in red and blue. .... 56

Figure 2.3 Influence of the azimuthal rotation angle on the optical properties of nanohole arrays. Top Left: Position of the BW-SPPs modes for a gold nanohole arrays of 820 nm periodicity excited in transmission with an incident angle of  $4^\circ$  for different azimuthal rotation angle. The predicted wavelength of the plasmonic modes is superposed to the experimental values for the (-1,0), (0,1), (1,-1), (-1,1), (0,-1), and (1,0) modes. The color scale ranges from red (high transmittance) to blue (low transmittance). Top Right: Transmission measurements of light with different azimuthal rotation angles. Four different bands are observed at  $-5^\circ$  (red), while for azimuthal rotation angles of  $15^\circ$  (green) and  $35^\circ$  (blue), the degenerescence leads to respectively six and three plasmon bands. Bottom: The FDTD simulation at  $15^\circ$  (azimuthal rotation) for different incident angles shows the 6-fold degenerescence of the plasmon bands. .... 57

Figure 2.4 FDTD simulations of the field distribution in the X-Z plane (Cross section of the nanohole arrays) for incident angles of  $0^\circ$  (Top left),  $10^\circ$  (Top right),  $20^\circ$  (Bottom left), and  $30^\circ$  (Bottom right) at the plasmon resonance wavelength of 950, 784, 623, and 560 nm respectively. The region from  $Z = 60$  to 200 nm corresponds to the glass substrate, the dark blue squares centered at  $Z = 0$  nm are the metal mesh of nanohole arrays and the negative  $Z$  region is filled with water. The field penetration depth is clearly reduced with non-zero incident angles. .... 60

Figure 2.5 Enhanced biosensing by adjusting the field penetration depth of nanohole arrays. IgG calibration curves at different excitation angle for nanohole arrays with a periodicity of 820 nm (blue  $\theta = 0^\circ$  and green  $\theta = 26^\circ$ ) and 1000 nm (red  $\theta = 30^\circ$ ). .... 61

Figure 2.6 FDTD simulations of the electric field intensity distribution for the X-Y plane of gold nanohole arrays of 820 nm periodicity in water. The incident angles were: Top Left:  $\theta = 0^\circ$  ( $\lambda = 950$  nm), Top right:  $\theta = 10^\circ$  ( $\lambda = 784$  nm), Bottom Left:  $\theta = 20^\circ$  ( $\lambda = 623$  nm) and Bottom Right:  $\theta = 30^\circ$  ( $\lambda = 560$  nm). The field distribution was simulated at the peak resonance wavelength for the (1,0) band. The field distribution changes from a relatively delocalized field around the rim of the nanoholes to a quasi-quadrupolar mode at large incidence angle. .... 63

Figure 2.7 Influence of the incidence angle on the SERS properties of nanohole arrays. Top: Experimental setup for the Raman measurement at different incidence angles. Center Left: Experimental plasmon resonance in air of the nanohole arrays of 1000 nm periodicity. Center Right: Raman intensity for a nanohole array of 1000 nm periodicity depending on the incident angle ( $-20^{\circ}$  to  $20^{\circ}$ ). 4-nitrobenzenethiol was monitored with the band at  $1350\text{ cm}^{-1}$ . Bottom left: Depiction of the sandwich SERS bioassay for IgG. Bottom right: Enhanced SERS response by tuning the incident angle to the plasmon band of the nanoparticle-nanohole array dimer. .... 65

Figure 2.S1 Schematic representation of the BW-SPPs modes and azimuthal angle ( $\phi$ ). .... 67

Figure 2.S2 FDTD simulation of the GCAT signal of gold nanohole arrays of 820 nm periodicity. a) Gold thickness of 120 nm for different hole diameter (D). b) Hole diameter of 500 nm for different thicknesses of Au (h). .... 70

Figure 2.S3 Scanning angle-rotation transmission instrument. The sample (sensor) is placed on a 360 degrees rotation mount, which is fixed to a 360 degrees goniometer. A flow cell (without the azimuthal rotation capabilities) was designed with wide apertures to allow large incident angles to be investigated. .... 72

Figure 2.S4 Experimental and simulated (dotted) plasmon resonances of the (1,0) mode in water for gold nanohole arrays of 820 and 1000 nm of periodicity for different incident angle. .... 73

Figure 2.S5 Left: Simulated calibration curve at  $5^{\circ}$  incident angle and  $10^{\circ}$  azimuthal rotation angle. All modes exhibit the same sensitivity for this spectral range. Right: Experimental and theoretical (dotted) bulk refractive index sensitivity of the (1,0) mode for gold nanohole arrays of 820 (red circle) and 1000 nm (blue circle) periodicity for different incident angles. .... 73

Figure 2.S6 Plasmonic wavelength shift of gold nanohole arrays of 820 nm (red) and 1000 nm of periodicity for the adhesion of a PAH/PSS bilayer for different incident angle. .... 74

Figure 2.S7 a) Plasmonic wavelength shift of gold nanohole arrays of 820 nm of periodicity upon successive adsorption of 60 PAH-PSS bilayer to assess the decay length for

different incident angle of 0° (blue), 13° (red), 19° (green) and 25° (pink). b) Calculated decay length for the corresponding incident angle. .... 75

Figure 3.1 Photograph of gold nanohole arrays on a 4" glass wafer. The transparent areas were due to Newton rings. The samples were diced to minimize the presence of these defects in actual samples used for plasmonic studies. (B) SEM image of the nanohole arrays. (C) Plasmonic signal of gold nanohole arrays excited in water at 50° (blue line) and in a sucrose solution (red line) with the multiwell plate reader. .... 85

Figure 3.2 A) Design of the custom multi-well plate. From top to bottom: plexiglass slide, top aluminum part, PDMS spacer, sensors, and bottom aluminum part. (B) Schematic of the multi-well plate reader. (C) Excitation of the multi-well plate in transmission with an incident angle of 50°. .... 86

Figure 3.3 (A) Plasmonic response variation for successive measurements in water and PBS. The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response of 6 wells measured 9 times in each solution. (B) Refractive index calibration curve of sucrose solution using 5 wells (R2 = 0.99). The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response for each well measured 9 times in a different RI solutions. .... 88

Figure 3.4 Calibration curves for IgG using the multi-well plate reader. (A) Direct detection. (B) Sandwich assay for IgG using a secondary detection step with anti-IgG. The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response of a triplicate of wells measured 9 times. .... 89

Figure 3.5 Plasmonic response for the secondary detection of PSA in PBS using the multi-well plate reader. Surface and secondary Anti-PSA are respectively 20-PR-50 and 70-XG69. The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response of a triplicate of wells measured 9 times. .... 91

Figure 3.6 (A) Schematic of the competitive plasmonic sensor for MTX detection(B) Plasmonic response for the detection of MTX in a competitive assay with Fa Au NP using the multi-well plate reader. The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response of a triplicate of wells measured 9 times. .... 92

**Figure 3.S1** Software interface for the control of the multi-well plate reader and camera parameters. .... 94

**Figure 3.S2** Scheme of the bottom aluminium part of the multi-well plate with dimension... 94

**Figure 3.S3** Software interface for the data treatment. .... 95

Figure 4.1 Top) Representation of manufacture process for gold-coated nanodisks; A positive photoresist layer was spin-coated on a 4” glass wafer (A), then UV-light cured through a mask and developed to create an array of holes in the exposed resist (B), followed by the deposition of a gold layer (C), and lift-off of the resist (D) to create an array of nanodisks (E), and finally, the deposition of a gold overlayer to yield the gold-coated nanodisk arrays (F). Bottom left) SEM image of a gold-coated nanodisk arrays with a periodicity of 1200 nm and a disk diameter of 720 nm. Bottom center) Plasmonic response of nanodisk arrays (ND75film75) excited in transmission in air for incident angles of 0° (blue curve) and 5° (red curve). Bottom right) Plasmonic signal of gold nanodisk arrays (without gold film overlayer – see step E) excited in direct transmission showed a strong absorbance at nearly 1600 nm..... 101

Figure 4.2 A) Theoretical plasmonic dispersion curves for different orders of BM for an array with a periodicity of 1200 nm. BM<sub>a</sub> and BM<sub>g</sub> respectively correspond to the BM at the metal/air (a) and metal/glass (g) interface. B) Experimental plasmonic dispersion curves of a gold nanodisk arrays (ND75film75) excited in transmission for incident angles of 0° to 30°..... 102

Figure 4.3 Plasmon dispersion curves of gold nanodisk arrays with different film (top to bottom row) and nanodisk (left to right column) thicknesses of 75 nm, 50 nm, 25 nm and 10 nm. The signal is measured in transmission in air for incident angles of 0° to 30°. The reference signal of each structure corresponds to a gold film with the same thickness. 103

Figure 4.4 Left) Sensorgrams for the detection of IgY with the gold-coated nanodisk arrays (red) and with nanohole arrays (blue). Concentrations of 10, 50, 100, 500 and 1000 nM were successively injected in a fluidic cell. Right) IgY calibration curves for structures of nanohole arrays (blue) and gold-coated nanodisk arrays (red) excited in transmission using a fluidic cell..... 108



Figure 4.5 A) Raman imaging of a gold-coated nanodisk arrays (ND75film75) with 4-nitrobenzenethiol (4-NBT). The image was acquired with a 633 nm laser and 100 nm steps between pixels and 100 ms integration time per pixel. The image represents a false color Raman map of the intensity of 4-NBT peak at  $1335\text{ cm}^{-1}$  for a scanning area of  $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ . The inset shows a cross-section of the Raman intensity corresponding to the white line in the SERS image. B) The field distribution at resonance wavelength (644 nm) was calculated in 3D under TM light for the gold-coated nanodisk arrays. The region of highest field intensity was located at the rim of the nanodisk. C-E) The field distribution at resonance wavelength (644 nm) was calculated in the X-Y plane under TM light for the glass-gold interface ( $Z = 0\text{ nm}$ , C), for the gold film-nanodisk interface ( $Z = 75\text{ nm}$ , D) and for the nanodisk-air interface ( $Z = 150\text{ nm}$ , E). The images also represent normalized false color maps of the field distribution. The field intensity was calculated to be the highest for 150 nm (E). Panels B-E were normalized with the intensity of the incident light field. .... 110

Figure A2.1 Programme du lecteur multipuits ..... III

Figure A2.2 Alignement des collimateurs du lecteur multipuits pour des mesures avec un angle d'incidence élevée. .... IV

**Figure A3.1** Images SEM d'un réseau de piliers obtenus après développement (60s) de la résine S1827 pour des temps d'exposition par LIL de 60s x 60s (gauche) et 90s x 90s (droite)..... VII

**Figure A3.2** Images SEM d'un réseau de piliers obtenus après développement (60s) pour des temps d'exposition par LIL de 40s x 40s pour des ratios de dilution de la résine S1827 de 1:1 (gauche) et de 3:2 (droite)..... VII

**Figure A3.3** Images SEM d'un réseau de piliers obtenus pour des temps d'exposition par LIL de 50s x 50s pour un ratio de dilution de la résine S1827 de 3:2 pour des temps de développement de 60 s (gauche) et 80 s (droite). .... VIII

**Figure A3.4** Images SEM d'un réseau de piliers obtenus après développement (100 s) pour un temps d'exposition par LIL de 45s x 45s et un ratio de dilution de la résine S1827 de 3:2. Vue de haut (gauche) et avec un angle de  $45^\circ$  (droite). .... IX

**Figure A3.5** Images SEM de structures de réseau de « nanotrous » après *liftoff* en déposant 80 nm d'or (gauche) et 70 nm d'or (droite). .... X

## Liste des sigles et abréviations

$\Delta\lambda_{\text{SPR}}$  : réponse plasmonique

16-MHA : *16-mercaptohexadecanoic acid*

3D FEM : *3D finite element method*

4-NBT : *4-nitrobenzene thiol*

ADN : acide désoxyribonucléique

AFM : microscopie à force atomique

BM : mode de Bragg, *Bragg modes*

BW-SPP : polaritons de plasmons de surface d'onde de Bloch

CCD : caméra de dispositif à transfert de charge, *charge-coupled device*

DMF : N,N-diméthylformamide

DUV : UV profond, *deep UV*

EF : facteurs d'exaltation, *enhancement factor*

ELISA : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, *enzyme-linked immunosorbent assay*

EOT : transmission optique extraordinaire, *extraordinary optical transmission*

FDTD : *finite difference time-domain*

FIB : faisceau ionique focalisé, *focused ion beam*

FOM : facteur de mérite, *figure of merit*

GCAT : *grating coupled attenuated transmission*

GUI : *graphic user interface*

HLB : plasmon de réseau hybride, *hybrid lattice plasmon*

kDa : kilodalton

LBL : *layer-by-layer*

LED : diode électroluminescente, *light-emitting diode*

LIL : lithographie par interférence laser, *laser interference lithography*

LOD : limite de détection, *limit of detection*

LSP : plasmons de surface localisée, *localized surface plasmon*

LSPR : résonance des plasmons de surface localisés, *localized surface plasmon resonance*

MEF : exaltation métallique de la fluorescence, *metal-enhanced fluorescence*  
MTX : méthotrexate  
NIL : lithographie par nanoimpression, *nanoimprinting lithography*  
nM : nanomolaire  
SAM: monocouches auto-assemblées, *self-assembled monolayer*  
S/B : rapport du signal sur bruit  
SEM : microscopie électronique à balayage, *scanning electron microscopy*  
NSA : adsorption non spécifique, *non-specific adsorption*  
NSL : lithographie de nanosphères, *nanosphere lithography*  
POC : instruments portables de dépistage, *point of care*  
PSA : antigène prostatique spécifique  
PSP : plasmons de surface qui se propagent, *propagative surface plasmons*  
SERS : diffusion Raman exaltée par effet de surface, *surface-enhanced Raman scattering*  
SP : plasmons de surface, *surface plasmons*  
SPP : polaritons de plasmons de surface, *surface plasmons polaritons*  
SPR : résonance des plasmons de surface, *surface plasmon resonance*  
SPRi : SPR par imagerie  
TM : transverse magnétique

*« Pour réussir, il ne suffit pas de prévoir. Il faut aussi savoir improviser »  
- Isaac Asimov*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier ma femme, Stéphanie Cormier, qui m'a accompagné tout au long de cette aventure qu'était le doctorat ! Avec mes recherches je me suis mis énormément de pression sur mes épaules et tu as toujours été là pour m'encourager ; je t'en remercie mon amour.

De plus, je dédie cet ouvrage à mes parents ; Angela Fronteddu et Pierre Couture. Sans vous je ne me serai jamais rendu aussi loin dans mes études. Mes parents m'ont appris que c'est en mettant l'épaule à la roue qu'on avance. Merci de m'avoir donné tous les outils pour réussir dans la vie. Je remercie mon grand-frère, Mathieu-Olivier Couture, qui trouve toujours le moyen de me faire rire et de me ramener sur terre. Je ne sais pas le nombre de fois où tu m'as niaisé par rapport au nanotrous. Mais bon, je suis prêt à t'autographier cette thèse après ma défense. Je remercie Faye, Livia et Juliette pour tout le bonheur qu'ils m'ont apporté lors des dernières années. D'ailleurs, je remercie tous les membres de ma famille (Couture et Fronteddu) qui se demandait sans cesse quand je prévoyais terminer mon doctorat. Merci de m'avoir écouté toutes ces fois où j'ai tenté de vous expliquer le phénomène des plasmons de surface.

Je dédie cette thèse à des amis de longue date ; Maxime Leduc, Sébastien Simard et Michel Scultety-Ouellet. C'était en 2012 que moi, Max et Seb avons terminé nos maitrises. Cependant, j'ai décidé de suivre un chemin différent du vôtre. Je vous remercie de m'avoir encouragé durant ce long parcours. Je suis vraiment chanceux d'avoir des copains comme vous.

Depuis que je suis dans le groupe Masson, j'ai eu l'occasion de rencontrer plusieurs collègues qui sont maintenant des amis proches. De ce fait, je tiens à remercier Julien Breault-Turcot pour m'avoir épaulé tout au long de mes recherches. Tu as toujours été un modèle pour moi ! D'ailleurs, j'ai grandement apprécié de jouer au badminton contre toi durant ces années...j'espère que l'on continuera dans le futur. Je tiens aussi à remercier Hugo-Pierre Poirier-Richard. Tu es arrivé en 2012 dans le groupe et depuis ce temps-là on est devenu des vrais frères ninjas de laboratoires. J'ai eu tellement de plaisirs à travailler avec toi. Ces moments vont rester à jamais graver dans ma mémoire. Je remercie Alexandra Aubé qui a été capable d'endurer toutes les niaiseries que moi et Hugo avons faites dans le bureau ! Je vais m'ennuyer de tes gâteaux et de ton sens de l'humour. De plus, je tiens à remercier Mathieu Ratel et Jérémie Labrecque-Carbonneau (Jerr). J'ai eu beaucoup de plaisirs lors des nombreuses soirées LAN

que nous avons organisées ensemble afin de donner des corrections à des *noobs*. J'espère que cette tradition ne se perdra pas ! Puis, je dédie cette thèse à de jeunes vétérans du groupe Masson : Félix Lussier et Simon Laporte. Quand il s'agit d'avoir du plaisir au laboratoire, vous êtes toujours capable d'amener cela au niveau supérieur.

Pour continuer, depuis mon arrivée dans le groupe en 2010, j'ai eu l'honneur de côtoyer énormément de scientifiques. Ainsi, je tiens à remercier des anciens collègues : Olivier Bolduc, Ludovic Live, Sandy Shuo Zhao, Kim-Ly Nguyen, Rita Faid, Daniel Pelechacz, Simon Forest, Korak Ray Kumar, Kristy McKeating et Natalya Bukar. Je tiens à remercier d'autres membres actuels du groupe Masson, tels que : Thibault Brulé, Geneviève Granger, Hu Zhu, Marie-Pier Dinel et Benjamin Charron. Évidemment, la réalisation de cette thèse aurait été difficile sans l'aide de Jean-François Myre de l'atelier mécanique. Je te remercie pour toutes ces fois où tu m'as aidé à concevoir mes nombreux projets. J'en profite aussi pour remercier Christophe Clément et Alireza Hajhosseini-Mesgar qui m'ont enseigné l'art de la microfabrication.

Finalement, je dédie cet ouvrage à mon professeur Jean-François Masson ou JF pour les intimes. Je te remercie infiniment d'avoir cru en moi. C'était en 2012 que tu m'as convaincu de faire un doctorat et je ne regretterai jamais cette décision. J'ai eu énormément de plaisirs à travailler avec toi et je vais garder des tonnes de bons souvenirs de mon passage dans ton groupe. JF a toujours été généreux avec nous et m'a permis d'aller en conférence dans plusieurs villes, tels que ; Atlanta, Reno, Philadelphie, Chicago, Nouvelle-Orléans, Newport, Ottawa et Regensburg. Je suis vraiment reconnaissant de la chance que j'ai eue de participer à autant de conférences de niveau international. De plus, c'est tellement agréable de pouvoir tisser des liens d'amitié avec son professeur. Ainsi, à défaut de pouvoir s'affronter un jour au hockey sur glace, j'espère que l'on continuera le pool Masson NHL où j'ai plus de chance de te battre. Sur ce, c'était un honneur de faire un doctorat sous ta supervision !

# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1 Avant-propos

### 1.1.1 Contexte

Depuis le début de mon doctorat, plusieurs de mes proches me questionnent sur le sujet de mes recherches. À leur question, je répondais simplement que j'étudie dans un groupe de recherche qui se spécialise dans le développement de biocapteurs. Évidemment, j'appréhendais avec enthousiasme la question suivante me demandant d'expliquer l'utilité d'un biocapteur. Pour simplifier, un biocapteur c'est un instrument permettant la détection de biomolécules. Ces dispositifs sont simples d'utilisation, à prix abordable, portable et permettent de détecter un analyte rapidement avec une grande sensibilité ainsi qu'une bonne fiabilité dans des matrices complexes (e.g : sang)<sup>1</sup>. Les biocapteurs sont utilisés dans de nombreux domaines : étude clinique, pharmaceutique, environnement, recherche spatiale et militaire, industrie automobile et industrie alimentaire.<sup>2</sup> À ce jour, le biocapteur le plus utilisé est sans aucun doute le glucomètre qui permet la détection du glucose directement dans le sang. D'ailleurs, le marché des biocapteurs dans le domaine biomédical est le plus lucratif et est présentement évalué à 15 milliards USD.<sup>3</sup> Il est estimé que ce marché atteindra une valeur de 22 milliards USD d'ici 2020 du au vieillissement de la population ainsi que de la prévalence des maladies diabétiques.<sup>4</sup> Le développement du marché des biocapteurs est sans aucun doute lié relié aux efforts déployés par des milliers de scientifiques que ce soit au niveau académique ou industriel. En cette année 2016, on estime que plus de 10 000 articles discutant des biocapteurs seront publiés dans des journaux scientifiques.

Pour continuer, le domaine des biocapteurs peut être divisé en deux catégories d'instrumentations.<sup>1</sup> La première catégorie correspond à des instruments portables, fabriqués en grande quantité, simples d'utilisation et pouvant effectuer des analyses in situ ou à domicile. Cet instrument, généralement accessible en vente libre, permet un dépistage rapide de

biomarqueurs associés à une maladie ou une condition médicale. Ainsi, le patient est en mesure d'évaluer soi-même sa condition pour ensuite consulter avec un médecin. En effet, l'intérêt de cet instrument est d'accélérer le processus du dépistage afin d'acheminer rapidement l'information au médecin. Il ne serait pas étonnant que d'ici quelques années, des instruments portables de dépistage (POC, *point of care*) soient utilisés directement dans l'ambulance ou dans le bureau du médecin. De ce fait, un dépistage précoce d'une maladie (e.g : cancer) augmente considérablement les chances de guérison du patient.<sup>5</sup> D'ailleurs, de nombreuses recherches portent sur le développement de biocapteurs capables de détecter dans le sang des marqueurs associés à divers cancers tels que : le cancer de la prostate et le cancer du sein. La deuxième catégorie de biocapteur correspond à des instruments sophistiqués, robustes et capables d'effectuer du criblage à haut débit permettant l'étude simultanée de nombreuses interactions biologiques. Ces instruments sont généralement dispendieux et nécessitent d'être manipulés par un personnel spécialisé. Ces dispositifs ont un énorme impact dans l'industrie pharmaceutique pour la découverte de drogues. D'ailleurs, le développement de ce type d'instrument analytique est un des objectifs de la thèse.

Souvent rapportées dans la littérature, un grand nombre de recherches ont pour but d'améliorer certaines composantes d'un biocapteur tels que le biorécepteur et le transducteur.<sup>6</sup> Le choix du biorécepteur est crucial afin de garantir une détection sélective et spécifique de notre analyte. Ainsi, une bioanalyse correspond à la détection d'un analyte effectué à l'aide de biomolécules. D'ailleurs, selon le type de récepteur, de nombreuses stratégies de bioanalyses peuvent être élaborées pour détecter différentes cibles telles que : des anticorps, des enzymes, de l'acide désoxyribonucléique (ADN), des cellules et des microorganismes. Le second élément d'un biocapteur est le transducteur dont le rôle est de détecter l'évènement de reconnaissance moléculaire et de le convertir en un signal analytique. La transduction du signal chimique peut être mesurée par des techniques optiques, électrochimiques, acoustiques ou calorimétriques. Le développement d'un transducteur sensible sera un autre objectif de la thèse.

Dans le groupe du professeur Masson, nous développons des transducteurs optiques basés sur la spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR, *surface plasmon resonance*). La SPR est une technique très utilisée en recherche académique et industrielle pour effectuer de la bioanalyse optique sans marquage.<sup>7</sup> Le premier instrument basé sur la SPR fut



commercialisé en 1990 par la compagnie BIAcore qui appartient depuis 2006 à General Electric (GE). La SPR offre de nombreux avantages pour l'analyse de biomolécules sans séparation chromatographique : grande sensibilité, détection sans marquage, réponse rapide, aucune extractions préalables et analyse en temps réel. Cependant, la SPR nécessite une instrumentation optique (ex : prismes et polariseurs) qui limite le nombre d'analyses en simultané et restreint sa miniaturisation. C'est d'ailleurs pour cette raison que des techniques de dosage immuno-enzymatique (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) sont davantage utilisés que la SPR pour effectuer de la bioanalyse par criblage à haut débit.<sup>8</sup> En effet, les méthodes ELISA sont généralement effectuées à l'aide de plaques de 96 puits et analysées par spectrophotométrie ou par l'oeil. Par contre, pour un même test, l'ELISA nécessite davantage de temps d'analyse que la SPR et consomme énormément de réactifs. Présentement, le système SPR développé par BIAcore permet une analyse modeste en parallèle de 16 canaux. Malgré tous les récents progrès d'ingénierie optiques de la SPR, l'ELISA reste le standard dans l'industrie pour la bioanalyse par criblage à haut débit.

Les réseaux nanoplasmoniques peuvent résoudre les limitations de la SPR. En effet, ces structures offrent certains bénéfices tels que : instrumentation peu dispendieuse, miniaturisation et microfabrication à grande échelle. De plus, les réseaux nanostructurés peuvent être excités en transmission directe ce qui les rend compatibles avec des lecteurs de plaque multipuits. C'est d'ailleurs pour ces raisons que les structures nanoplasmoniques sont souvent considérées comme la prochaine génération de capteurs plasmoniques.<sup>9</sup> Cette thèse explorera les possibilités et limitations des structures plasmoniques dans le contexte de bioanalyse par criblage à haut débit.

### **1.1.2 Organisation de la thèse**

L'objectif principal de la thèse est l'étude des propriétés plasmoniques des réseaux de nanotrous et de nanodisques. Le but est d'optimiser ces structures plasmoniques afin d'effectuer de la bioanalyse par criblage à haut débit. L'intérêt est de développer un instrument analytique qui combine les avantages de la SPR et d'un lecteur multipuits.

Avant d'aborder les prochains chapitres de la thèse, il est important de se familiariser avec certains concepts théoriques de la plasmonique. En effet, les notions de base de nombreuses techniques seront définies dans les prochaines sections. En somme, l'objectif du premier chapitre est de résumer l'ensemble des techniques et notions théoriques utilisées lors de la thèse afin de faciliter la compréhension du lecteur. Les 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> chapitres de cet ouvrage portent respectivement sur l'étude des réseaux de nanotrous et le design d'un lecteur plasmonique de plaque multipuits. Par la suite, le 4<sup>e</sup> chapitre discute des propriétés plasmoniques de réseaux de nanodisques recouverts d'or ainsi que leur performance en tant que biocapteur. Une conclusion et des perspectives compléteront la thèse.

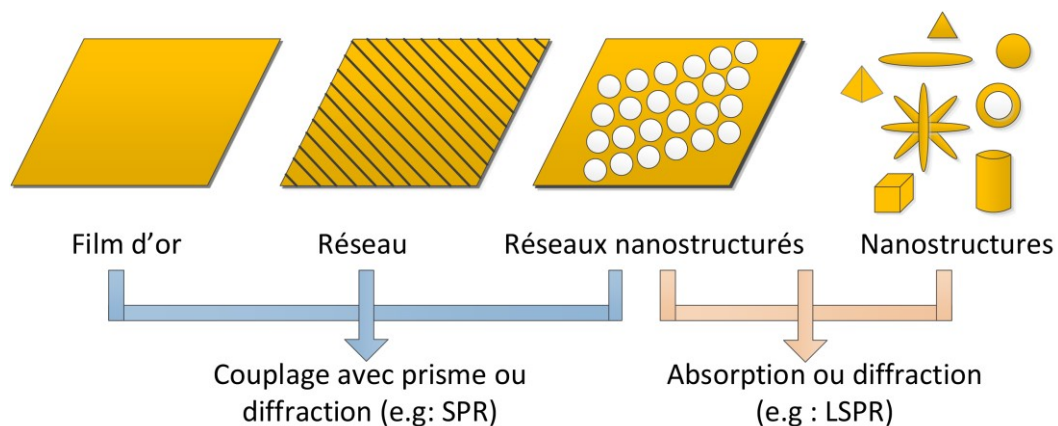
## 1.2 Les structures plasmoniques

Les structures plasmoniques sont des matériaux métalliques supportant un plasma d'électrons conducteurs qu'on appelle les plasmons de surface (*surface plasmons*, SP).<sup>10</sup> De nombreuses études portent sur le développement de capteurs optiques qui supportent le phénomène des SP.<sup>11</sup> De ce fait, le domaine de la plasmonique correspond à l'étude des interactions lumière-métal. Depuis les vingt dernières années, l'intérêt de la communauté scientifique envers les matériaux plasmoniques n'a cessé de croître. En effet, cette popularité des structures plasmoniques est dû à leurs nombreuses applications dans divers domaines de nanotechnologies et de nanosciences. Les matériaux plasmoniques sont notamment utilisés pour des études théoriques de l'interaction lumière-métal<sup>12</sup>, en tant que biocapteur pour des diagnostics médicaux ou thérapeutiques<sup>1, 13</sup> dans les circuits photoniques<sup>10</sup> et dans les cellules solaires<sup>14</sup>.

Afin de supporter un SP, les structures plasmoniques sont composés d'un métal ayant une constante diélectrique avec une partie réelle négative et une partie imaginaire positive. L'or et l'argent sont des métaux conducteurs qui respectent ces conditions et sont les plus efficaces à des fréquences optiques dans le visible et l'infrarouge.<sup>2, 15</sup> De plus, l'or et l'argent offrent une bonne chimie de surface permettant la formation des monocouches auto-assemblées (*self-assembled monolayer*, SAM) avec les composés ayant un groupement thiol (voir section 1.7.2). Par contre, il est important de préciser que l'argent a l'inconvénient de s'oxyder aisément et que l'Ag<sub>2</sub>O n'est pas actif en plasmonique. Pour ces raisons, malgré son prix élevé, l'or est considéré

comme le standard pour effectuer de la plasmonique tant en recherche académique qu'en industrie.

Dans la littérature, il existe une multitude de structures plasmoniques pouvant être utilisées selon les objectifs de recherche.<sup>16</sup> Il est possible de diviser ces structures en trois catégories : film continu, réseaux métalliques et nanostructures (**Figure 1.1**). Ces structures diffèrent entre elles de par leurs méthodes de fabrication, leur sensibilité, leurs domaines d'applications et leurs modes d'excitations.



**Figure 1.1** Schématisation des différentes structures plasmoniques et leurs modes d'excitation respectifs.

De ce fait, le film continu (e.g : film d'or) est une des structures les plus utilisées pour effectuer de la SPR. La structure consiste à un substrat de verre (e.g : verre BK7) recouverte d'une couche d'épaisseur de 1 nm de chrome sur laquelle est déposé 50 nm d'or. Ces films peuvent être excités (e.x : générer des plasmons) à l'aide d'un prisme par SPR conventionnelle (i.e : configuration Kretschmann). La simplicité de fabrication de cette structure et sa sensibilité expliquent pourquoi elle est le standard dans le domaine académique et industriel. Par contre, l'inconvénient du film d'or et de la SPR en général est le besoin de coupler la lumière avec un prisme. Cette particularité technique limite la miniaturisation des montages SPR et diminue son débit d'analyses.

Les réseaux (*grating*) correspondent à des structures plasmoniques en une dimension (1D). Des exemples de ces structures 1D sont le réseau à rainures étroites (*narrow grooves*)<sup>17</sup> ou le réseau de nanofils (*nanowires*) développé par Corn<sup>18</sup>. Ces structures permettent l'excitation de SP par diffraction de la lumière à l'aide d'un montage optique en réflexion.<sup>19</sup> L'excitation de ces structures en SPR ne requiert pas d'angle d'excitation spécifique ce qui simplifie le montage et permet de le miniaturiser.<sup>17</sup>

Pour continuer, les structures plasmoniques les plus étudiées lors des dernières années sont certainement les nanoparticules. L'engouement envers ces structures plasmoniques est due à ses diverses bioapplications : études biophysiques, diagnostic médical, imagerie et photothérapie du cancer.<sup>20-21</sup> Il existe une plénitude de nanoparticules telles que : les nanosphères, les nanoétoiles, les nanotiges et les nanocoquilles.<sup>22-23</sup> De nombreuses voies de synthèses permettent de fabriquer ces différentes nanoparticules via la réduction de sels d'or.<sup>24</sup> Les nanostructures ont l'avantage d'être excités en transmission via un plasmon de surface localisé (voir section 1.4) ; ce qui simplifie le montage optique par rapport à la SPR. Cependant, les nanostructures ont l'inconvénient d'être très sensibles aux variations de pH et de force ionique du milieu, ce qui affecte leur stabilité. Malgré leur grande versatilité, leurs désavantages pourraient limiter leurs applications en chimie analytique.

Pour continuer, les réseaux nanostructurés sont probablement les structures les plus polyvalentes. En effet, ces dernières permettent de coupler la lumière avec les SP selon différentes méthodes : avec prisme, par diffraction et en transmission. Il existe une multitude de réseaux nanostructurés, par exemple : réseaux de nanotrous, réseaux de microtrous, réseaux de nanodisques, réseaux de nanovides, réseaux de nanotriangles, etc.<sup>2, 9</sup> Dépendamment de la structure et de la configuration optique utilisées, il est possible d'exciter divers modes plasmoniques tel que les modes propagatifs, localisés, de Bragg et les ondes de Bloch. Une explication détaillée de chacun de ces modes plasmoniques sera faite dans les prochaines sections. Auparavant, la fabrication de réseaux nanostructurés était grandement limitée à des techniques dispendieuses et lentes telles que la lithographie à faisceau d'électrons ou à faisceau ionique focalisé.<sup>25</sup> De nos jours, il est possible de développer ces structures rapidement et à grande échelle via des méthodes de microfabrication (voir section 1.9).

Pour terminer, le choix d'une structure plasmonique optimale dépend en grande partie de l'objectif de recherche. De ce fait, un des objectifs de la thèse est de développer un dispositif plasmonique pouvant effectuer de la bioanalyse par criblage à haut débit. Pour parvenir à ces fins, il est important d'utiliser une structure plasmonique ayant une grande sensibilité, pouvant être fabriqué à grande échelle et qui requiert une instrumentation optique simple. De ce fait, les réseaux nanostructurés respectent tous ces paramètres, ce qui explique leur importance au coeur de la thèse.

## **1.3 La résonance des plasmons de surface**

Bien que le contenu de la thèse soit axé sur l'étude des réseaux nanostructurés excités en transmission directe, il est important pour le lecteur de comprendre les concepts de base de la SPR. En effet, la compréhension de la théorie de la SPR permettra d'assimiler aisément les notions subséquentes de couplage plasmonique.

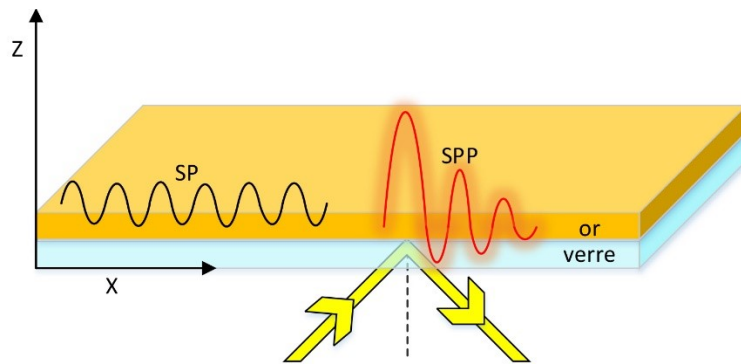
### **1.3.1 Historique**

Tout d'abord, le phénomène des plasmons de surface fut observé pour la première fois en 1902 par Wood.<sup>26</sup> Ce dernier constata que l'excitation d'un réseau de diffraction métallique avec de la lumière polarisée génère par réflexion un patron ayant des bandes sombres et lumineuses. Cependant, Wood n'a pu trouver d'explications à ce phénomène et décida de le qualifier d'anomalie. Quelques années plus tard, en 1907, Lord Rayleigh tenta d'élucider ce phénomène optique avec sa théorie dynamique des réseaux de diffractions.<sup>27</sup> Rayleigh détermina que les longueurs d'onde émises par le réseau de diffraction concordaient avec les anomalies de Wood. Dans les années 1950, Pines décrit théoriquement la perte d'énergie des électrons traversant un film métallique.<sup>28</sup> Pines et Bohm attribuent cette perte d'énergie à l'excitation des électrons de la bande de conduction du métal générant un plasma d'oscillation qu'ils qualifient de plasmons.<sup>28-30</sup> Par la suite, des études ont démontré que les modes plasmoniques existaient à proximité de la surface du métal et que la présence de contaminants affectait l'oscillation du plasma d'électrons.<sup>31-32</sup> C'est en 1968 qu'une interprétation complète du phénomène de résonance des plasmons de surface fut établie par Otto.<sup>33</sup> Au même moment, Kretschmann et Raether<sup>34</sup> décrivent l'excitation de SP par réflectance totale atténuée à l'aide

d'instrumentation optique. D'ailleurs, que ce soit en recherche ou en industrie, la majorité des instruments SPR sont basés sur la configuration de type Kretschmann. Ainsi, le premier exemple de bioanalyse basé sur le concept de la SPR fut réalisé en 1983 par Nylander et Liedberg.<sup>35</sup> Finalement, depuis les années 1990, la SPR est en constante effervescence et est appliquée à de nombreux domaines de recherche.

### 1.3.2 Théorie des plasmons de surface

Tout d'abord, un plasmon de surface est une oscillation collective des électrons libres de la bande de conduction d'un métal noble (Figure 1.2).<sup>12</sup> L'excitation des SP par un photon génère des polaritons de plasmon de surface (*surface plasmon polaritons*, SPP). Ces derniers correspondent à une onde électromagnétique se propageant de façon longitudinale à l'interface métal-diélectrique tout en ayant une amplitude exponentiellement décroissante (Figure 1.2).<sup>12</sup> Les SPP sont ainsi qualifiés de plasmon propagatif capable de sonder des variations d'indice de réfraction ( $\eta$ ) à la surface du capteur plasmonique. En effet, les ondes SPP se propagent sur le film d'or sur des longueurs de l'ordre du  $\mu\text{m}$  et sondent dans le milieu diélectrique avec une distance de pénétration de 200-300 nm.<sup>36</sup>



**Figure 1.2** Schématisation des plasmons de surface (SP) à l'interface métal-diélectrique (plan X-Z) et propagation des polaritons de plasmon de surface (SPP) lorsqu'excités par une lumière polarisée TM. Le plan XY est perpendiculaire au plan XZ.

De ce fait, les SP sont des ondes dites transverses magnétiques (TM) ayant leur composante magnétique dans le plan XY du métal-diélectrique et perpendiculaire à la direction

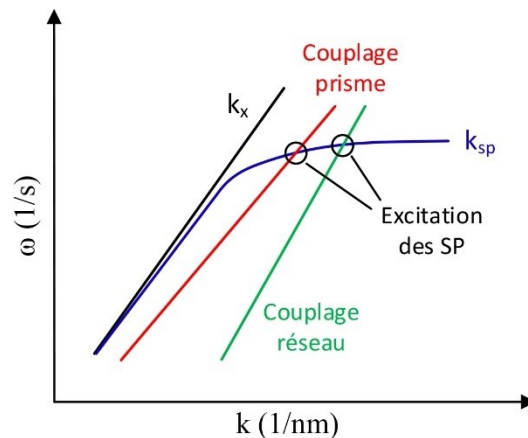
de propagation.<sup>13</sup> Le vecteur d'onde du SP ( $k_{sp}$ ) est défini à l'équation (1.1) où  $\omega$  correspond à la fréquence angulaire,  $c$  à la vitesse de la lumière,  $\epsilon_M$  et  $\epsilon_s$  correspondent respectivement aux constantes diélectriques du métal et du milieu environnant le métal. Une variation de  $\epsilon_s$ , donc de l'indice de réfraction du milieu ( $\epsilon_s = n^2$ ), affecte le couplage plasmonique et permet la détection de composantes près de la surface du capteur.

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\lambda)\epsilon_s(\lambda)}{\epsilon_m(\lambda) + \epsilon_s(\lambda)}} \quad (1.1)$$

Pour continuer, il est nécessaire d'utiliser une lumière polarisée TM (ou polarisée p) afin d'exciter les plasmons de surface du substrat plasmonique (e.g : film d'or). Le vecteur d'onde de la lumière ( $k_x$ ) est défini à l'équation (1.2) où  $\lambda$  correspond à la longueur d'onde.

$$k_x = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (1.2)$$

Lorsque les conditions de couplage sont respectées, il y a un effet de résonance dû à une égalité entre  $k_{sp}$  et  $k_x$ . Par contre, les conditions de couplage ne sont jamais atteintes pour une surface infinie excitée avec de la lumière libre dans le vide (Figure 1.3).<sup>2</sup> En effet, dans ces conditions, le moment de  $k_{sp}$  sera toujours supérieur à celui de  $k_x$ . La figure 1.3 démontre que le vecteur d'onde de la lumière est linéaire et ne croise jamais la courbe de  $k_{sp}$ .

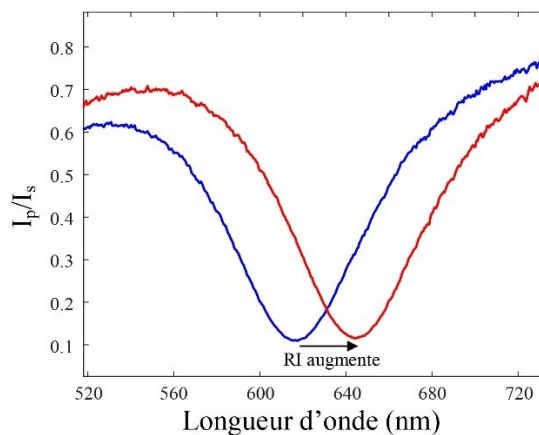


**Figure 1.3** Schéma de la dispersion de  $k_x$  dans l'air (ligne noire) et de  $k_{sp}$  (courbe bleu). Le couplage via un prisme (ligne rouge) ou un réseau (ligne verte) augmente  $k_x$  et permet l'excitation des SP.

Ainsi, afin d'obtenir une résonance ( $k_x=k_{sp}$ ), il est nécessaire d'augmenter le moment de  $k_x$ . En SPR, ceci peut être effectué en augmentant l'indice de réfraction à laquelle la lumière interagit avec les plasmons à l'aide d'un prisme. Dans ce type de montage optique (configuration Kretschmann), la lumière traversant le prisme est dirigée en réflexion totale interne sur la surface du film d'or afin qu'une onde évanescente se couple avec les SP. L'utilisation d'un prisme change la définition du vecteur d'onde de la lumière selon l'équation (1.3) où  $\eta_D$  correspond à l'indice de réfraction du prisme et  $\theta$  à l'angle d'incidence du photon.

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} \eta_D \sin(\theta) \quad (1.3)$$

Une résonance est obtenue s'il y a égalité entre les équations (1.1) et (1.3). Ce qui peut être fait en modulant  $k_x$  selon un balayage de  $\lambda$  (si  $\theta$  est fixe) ou  $\theta$  (si  $\lambda$  est fixe). Le phénomène SPR s'observe ainsi par une absorption de la lumière par les SP pouvant être mesurés par spectroscopie (Figure 1.4). La longueur d'onde à laquelle la bande plasmonique absorbe la lumière est influencé par l'indice de réfraction du milieu environnant le capteur. Lorsque l'indice de réfraction (RI, *refractive index*) augmente, la bande plasmonique effectue un déplacement bathochromique. Ainsi, avec une chimie de surface adaptée, il est possible de détecter une grande variété de cibles chimiques ou biochimiques à l'aide d'un capteur plasmonique (voir section 1.7).



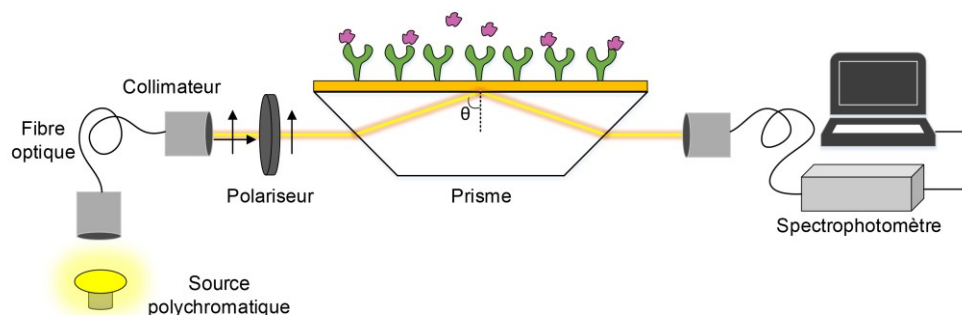
**Figure 1.4** Déplacement bathochromique du signal SPR d'un film d'or suite à l'augmentation de l'indice de réfraction du milieu diélectrique.  $I_p/I_s$  correspond au ratio d'intensité de lumière polarisée p ( $I_p$ ) et polarisée s ( $I_s$ ).



Pour terminer, il est important de préciser qu'il existe une multitude de configurations optiques et de matériaux plasmoniques permettant d'exciter les SP. En effet, il est possible d'utiliser un réseau métallique afin d'augmenter le momentum de  $k_x$  (figure 1.2) pour obtenir un couplage avec les SP. La théorie concernant les propriétés plasmoniques des réseaux nanostructurés sera détaillée à la section 1.5 et 1.6.

### 1.3.3 Instrumentation, performance et limitations de la SPR

Tel que mentionné précédemment, l'excitation des SP avec un montage SPR peut s'effectuer selon un balayage de  $\lambda$  ou  $\theta$  selon la configuration Kretschmann.<sup>13</sup> Dans le groupe du professeur Masson, les instruments SPR sont développés selon un système à interrogation des longueurs d'onde.<sup>37</sup> Ce type de montage requiert entre autres l'utilisation d'un prisme, d'un polariseur, d'une source polychromatique et d'un détecteur à (Figure 1.5).



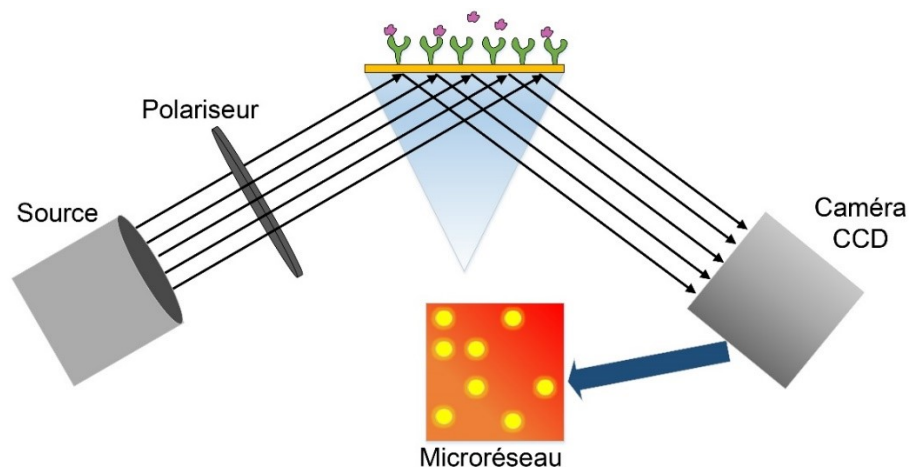
**Figure 1.5** Schéma d'un montage SPR basé sur la configuration Kretschmann à interrogation de longueur d'onde.

La SPR est une technique de spectroscopie qui ne nécessite pas l'utilisation d'une source de forte puissance (e.g : Laser) contrairement à des techniques comme la fluorescence ou le Raman. En effet, la détection en SPR s'effectue selon le déplacement de la bande plasmonique. De ce fait l'intensité du signal réfléchi n'est pas d'un intérêt analytique en SPR. Par contre, il

est important d'utiliser une source de puissance stable capable de générer un signal plasmonique ayant une grande intensité. Ainsi, l'utilisation de diode électroluminescente (LED, *light-emitting diode*) comme source polychromatique est répandue dans les systèmes SPR.<sup>7,38</sup>

Pour continuer, les systèmes à balayage d'angle offrent une résolution supérieure aux variations d'indice de réfraction ( $10^{-7}$  RIU) comparativement au système à angle fixe ( $10^{-6}$  RIU).<sup>37</sup> Par contre, l'avantage du système à interrogation de  $\lambda$  par rapport à celui d'interrogation d'angle est notamment la simplicité de l'alignement optique et la vitesse du balayage. Ainsi, de nombreux instruments commerciaux, basés sur le système à angle fixe, sont développés par des manufacturiers tels que Biacore, SensiQ, Sensia et KMAC.<sup>2</sup> Ces instruments SPR sont robustes, performants, sensibles et peuvent effectuer des analyses automatisées.<sup>2</sup> En effet, ces instruments sont développés de façon à simplifier le travail de son opérateur. De ce fait, le capteur plasmonique pré-fonctionnalisé avec un ligand (la biomolécule de reconnaissance) est inséré aisément dans une cavité de l'instrument. Par la suite, l'opérateur sélectionne un programme d'injection automatisée selon l'étude cinétique désirée. Un système fluide composé de tubes, seringues et de pompes permet d'injecter automatiquement les solutions d'analyte et de tampon sur le capteur plasmonique. Ces systèmes offrent généralement de multiples canaux de fluide permettant d'analyser des dizaines d'interactions biologiques en simultané sur la surface du capteur.<sup>9</sup> Un canal de référence est utilisé afin de corriger le bruit de fond provenant des variations de température et de fluctuation de la source. Le traitement de données est effectué automatiquement à l'aide d'un programme informatique, ce qui permet une interprétation rapide des résultats.

Les instruments commerciaux SPR sont limités par leur faible criblage d'échantillons.<sup>39</sup> De ce fait, les instruments SPR à imagerie (SPRi) peuvent être une solution à ce problème (**Figure 1.6**).<sup>2</sup>



**Figure 1.6** Schéma d'un instrument SPR à imagerie.

En effet, dans un système SPRi, un faisceau monochromatique passe au travers un prisme et vient exciter les SPP sur de multiples points (*spots*) de la surface du capteur d'or. Par la suite, la lumière réfléchie à chaque point de la puce est collectée par une caméra de dispositif à transfert de charge (*charge-coupled device, CCD*). Une variation d'intensité du signal plasmonique est mesurée suite à un changement d'indice de réfraction du milieu environnant le capteur SPR. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de mesurer rapidement des centaines d'interactions biologiques en simultanée à l'aide de microréseaux (*microarray*). Cependant, les capacités de bioanalyse par multiplexage de la SPRi sont très modestes. En effet, il faut préciser qu'un système SPRi fait interagir la même solution d'analyte avec l'ensemble des points de la puce. Afin d'améliorer le criblage de multiples échantillons en SPRi, il est impératif de développer des systèmes microfluidiques permettant des analyses en parallèles.<sup>9</sup> Une autre limitation de la SPRi vient de la faible reproductibilité des points sur la surface des microréseaux. De plus, les instruments SPRi offrent une sensibilité inférieure par rapport au système SPR standard.<sup>9</sup>

En somme, les instruments SPR sont très efficaces pour mesurer de faible variation d'indice de réfraction ( $\sim 10^{-7}$  RIU) correspondant à des concentrations de surface d'environ  $1 \text{ pg/mm}^2$ . Ces systèmes permettent, entre autres, de détecter des protéines pour des limites de détection (LOD) de l'ordre du pM-nM. Ainsi, la versatilité et l'efficacité de la SPR ont été démontrées pour une multitude de domaines d'applications.<sup>13</sup> De ce fait, la SPR est couramment

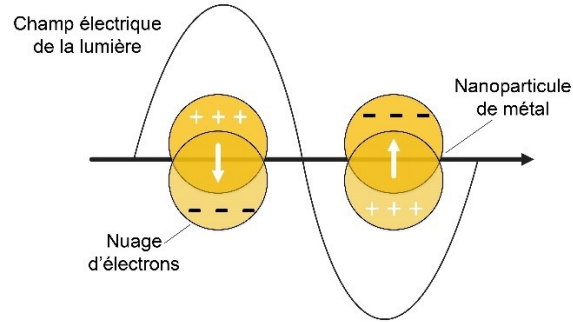
utilisée dans le milieu académique et industriel pour l'étude d'interactions biologiques. Pour terminer, les instruments SPR sont limités par leur sensibilité, leur faible capacité de criblage et leur difficulté de miniaturisation. D'ailleurs, une étude théorique a démontré que la SPR a atteint ses limites de résolution, peu importe la configuration du couplage plasmonique.<sup>40</sup> De ce fait, les nanostructures sont considérées comme la prochaine génération de plateforme de détection plasmonique.<sup>9</sup>

## 1.4 Résonance des plasmons de surface localisés

La popularité des capteurs optiques basés sur la résonance des plasmons de surface localisés (LSPR, *localized surface plasmon resonance*) s'est accrue au cours des dix dernières années.<sup>41</sup> En effet, tel que mentionné précédemment, l'effervescence envers les capteurs LSPR est due à leur potentiel de répondre aux limitations de la SPR. Ainsi, les prochaines sections de la thèse discuteront de la théorie, des performances et des limitations de la LSPR. D'ailleurs, au courant de la thèse, de nombreux parallèles seront tracés entre les capteurs LSPR et les réseaux nanostructurés, d'où l'importance de maîtriser les bases de la LSPR.

### 1.4.1 Théorie de la LSPR

Le phénomène LSPR correspond à une oscillation collective d'électrons à la surface d'une nanostructure composée d'un métal comme l'or ou l'argent (**Figure 1.7**). Les plasmons de surface localisée (LSP, *localized surface plasmon*) sont excités directement par un photon ayant une longueur d'onde plus grande que la taille de la nanostructure.<sup>42</sup> Les nanostructures sont généralement synthétisées en solution ou fabriqués sur un substrat de verre, tels que les nanosphères, nanotriangles, nanofils, nanobâtonnets, *etc.*



**Figure 1.7** Schéma du phénomène de résonance des plasmons de surface localisés.

Ainsi, il y a résonance lorsque le champ électromagnétique de la lumière se couple avec les électrons oscillant à la surface de la nanostructure.<sup>43</sup> Cette résonance de la nanostructure génère une forte absorption et diffusion des photons incidents. Le plasmon de surface d'une nanoparticule entre en résonance à une ou des longueurs d'onde spécifiques comme démontré par l'équation (1.4).

$$E(\lambda) = \frac{24\pi N a^3 \varepsilon_s^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \left[ \frac{\varepsilon_i(\lambda)}{(\varepsilon_r(\lambda) + \chi \varepsilon_s)^2 + \varepsilon_i(\lambda)^2} \right] \quad (1.4)$$

Dans cette équation,  $E(\lambda)$  est l'extinction à une  $\lambda$  spécifique,  $N$  est le nombre de particules,  $a$  est la taille,  $\chi$  est le facteur de forme,  $\varepsilon_r$  et  $\varepsilon_i$  correspondent respectivement à la constante diélectrique réelle et imaginaire du métal. Ainsi, l'intensité et la fréquence du signal LSPR (absorption ou dispersion) dépend énormément de la forme, de la taille, de la composition de la nanoparticule et de l'indice de réfraction du milieu environnant.<sup>44</sup> De plus, la LSPR génère un champ plasmonique intense confinée sur une distance de 10 à 40 nm de la surface de la nanostructure.<sup>2</sup>

## 1.4.2 Performance et limitations de la LSPR

Tout d'abord, grâce aux caractéristiques fondamentales de la LSPR, les nanostructures ont énormément d'applications en tant que biocapteur plasmonique.<sup>45</sup> En effet, les capteurs LSPR peuvent être excités directement par la lumière ce qui simplifie énormément leur

instrumentation optique. Ainsi, l'utilisation de nanostructures permettrait le développement de plateformes miniaturisées pouvant effectuer du multiplexage.<sup>9</sup>

Pour continuer, les nanostructures ont des coefficients d'absorption molaire si élevés qu'il est possible d'observer leurs changements de couleur à l'œil nu.<sup>43</sup> D'ailleurs, une étude a démontré que la dispersion provenant d'une seule nanoparticule d'argent (80 nm de taille) était équivalente à la dispersion de  $10^6$  fluorophores.<sup>44</sup> Cette particularité des nanoparticules en font des substrats plasmoniques idéaux pour la technique SERS (voir section 1.8). De plus, les nanoparticules ont l'avantage de ne pas être affectées par des effets de photoblanchiments à l'instar des fluorophores. Ainsi, les nanoparticules métalliques ont beaucoup d'applications en tant que marqueur pour des études d'imageries biologiques.<sup>20</sup> D'ailleurs, puisque l'excitation des nanoparticules génère de la chaleur, ces dernières sont très utilisées pour des études de photothérapies thermiques du cancer.<sup>21</sup>

Tel que mentionné précédemment, la fréquence d'oscillation d'une nanostructure est directement reliée à l'indice de réfraction du milieu l'environnant. Ainsi, le greffage d'un ligand sur la nanoparticule permet de détecter une multitude de cibles chimiques ou biologiques. La sensibilité en solution des capteurs LSPR ( $\sim 100\text{-}500$  nm/RIU) est très faible par rapport à la SPR ( $\sim 3000$  nm/RIU). Par contre, de nombreuses études ont démontré que la sensibilité de la LSPR pour la détection de protéines était similaire à celle de la SPR.<sup>46-47</sup> Ceci s'explique par l'intense confinement localisé du champ plasmonique autour de la nanostructure.<sup>42</sup> C'est pourquoi il faut distinguer la sensibilité en solution d'un capteur de sa sensibilité en surface.<sup>48</sup>

Pour terminer, certains défis doivent être résolus afin de favoriser le développement de plateformes de bioanalyse basées sur la LSPR. En effet, malgré ses avantages, la LSPR est limitée à un certain nombre d'études par sa sensibilité. Ce faisant, de nombreuses recherches portent sur le développement de nouvelles nanostructures offrant de meilleures performances de détection. Par contre, le défi est aussi de développer ces structures nanoplasmoniques à faible coût et à grande échelle. De plus, la biofonctionnalisation des nanostructures est considérée comme leur talon d'Achille.<sup>9, 43</sup> En fait, l'impact de la chimie de surface menant à la détection d'un analyte via la reconnaissance biologique est souvent sous-estimé dans la littérature. Par exemple, les nanoparticules en solution sont sujettes à des effets d'agrégations indésirables dépendamment du milieu environnant. L'analyse de biomolécules en transmission dans un

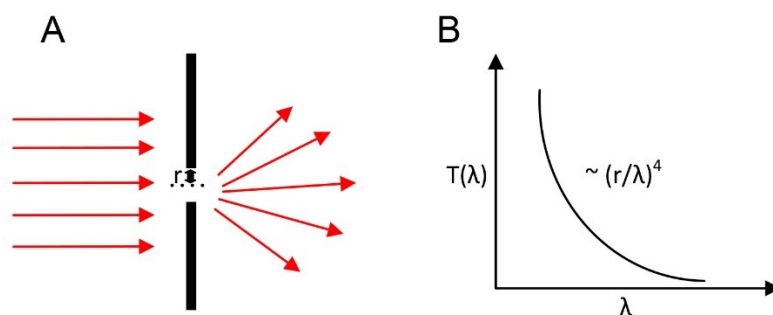
milieu complexe (e.g : sang) est compliquée par des effets de bioadhésion (*biofouling*) à la surface de la nanostructure. Finalement, malgré son potentiel, peu d'instruments basés sur les capteurs LSPR ont été développés afin d'effectuer du criblage à haut débit.<sup>9</sup>

## 1.5 Les réseaux de nanotrous

Pour continuer, les réseaux nanostructurés ont le potentiel de résoudre les problèmes encourus avec les nanoparticules. De ce fait, l'étude des propriétés plasmoniques des réseaux de nanotrous et de nanodisques est au cœur de l'ouvrage. Ainsi, les prochaines sections de la thèse (1.5 et 1.6) faciliteront la compréhension des chapitres 2 et 3.

### 1.5.1 Historique

Tout d'abord, les premières études portant sur les réseaux de nanotrous furent publiées en 1998 par Thomas Ebbesen.<sup>49-50</sup> Ses recherches ont démontré que l'excitation d'un film d'argent perforé par un réseau de nanotrous génère une transmission optique extraordinaire (EOT, *extraordinary optical transmission*) de la lumière. De ce fait, cette observation du phénomène EOT était en contradiction avec la théorie de Bethe.<sup>51</sup> Cette théorie stipule que l'intensité d'un faisceau lumineux diffracté traversant un trou, ayant un diamètre plus petit que la longueur d'onde incidente, soit faiblement transmise (**Figure 1.8a**).



**Figure 1.8** A) Schéma de la diffraction de la lumière à travers un nanotrou B) Spectre de transmission théorique selon la relation entre  $T(\lambda)$  et  $(r/\lambda)^4$ .

Bethe a déterminé théoriquement que l'intensité de transmission diminue selon le rayon du trou ( $r$ ) lorsque la longueur d'onde de la lumière augmente (**Figure 1.8b**). Or, Ebbesen observa une double amplification de l'intensité transmise lorsqu'un faisceau lumineux excite un réseau

2D de trous ayant un diamètre de 150 nm, une périodicité de 600 nm et une épaisseur de 200 nm d'argent. Ebbesen détermina que ce phénomène EOT provenait d'un couplage entre la lumière et les plasmons de surface du réseau de nanotrous. De ce fait, les réseaux nanotroués agissent comme un filtre permettant de transmettre les longueurs d'onde désirées selon leurs propriétés physiques. L'excitation des réseaux de nanotrous génère des bandes plasmoniques sensibles aux variations d'indice de réfraction. D'ailleurs, ces structures ont énormément d'applications en tant que biocapteur plasmonique.<sup>52</sup> Finalement, les recherches pionnières d'Ebbesen ont pavé la voie à plus d'un millier d'études portant sur les réseaux de nanotrous.

## 1.5.2 Théorie

Tout d'abord, de nombreuses théories ont été développées pour expliquer le rôle primordial des SP afin d'obtenir un EOT avec un réseau périodique troué. L'excitation des SP d'un réseau périodique structuré génère des ondes Bloch SPPs (BW-SPP, *Bloch wave SPP*). Les BW-SPP sont des ondes stationnaires qui correspondent à la superposition cohérente de SPP propagatifs.<sup>53</sup> De ce fait, uniquement les SPP respectant les conditions d'onde de Bloch peuvent être excités et se propager sur un réseau périodique structurés.<sup>12</sup>

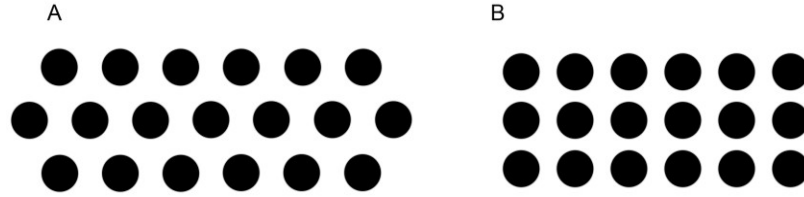
Malgré cette compréhension initiale, le mécanisme exact expliquant l'origine du phénomène EOT est toujours débattu.<sup>12</sup> Une des interprétations physiques de l'EOT décrit un effet tunnel résonant des photons via les modes SPP de Bloch au travers du réseau métallique. Dans ce cas, la lumière se couple au BW-SPP à l'une des interfaces du film puis traverse pour interagir avec les BW-SPP de l'interface opposée. D'autres mécanismes de l'EOT évoquent l'excitation de LSP et d'effet tunnel entre des états de LSP.<sup>54</sup>

L'ensemble des mécanismes d'interprétations du phénomène EOT reconnaissent le rôle clé des BW-SPP.<sup>51</sup> Dans le cas d'un réseau de nanotrous, la diffraction de la lumière sur la structure permet d'exciter ces modes plasmoniques en transmission selon l'équation (1.5).



$$k_x = \frac{2\pi}{P} \eta_D \sin(\theta) \pm i \frac{2\pi}{P} \pm j \frac{2\pi}{P} = k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_m(\lambda)\varepsilon_s(\lambda)}{\varepsilon_m(\lambda)+\varepsilon_s(\lambda)}} \quad (1.5)$$

Dans cette équation, P correspond à la périodicité du réseau (distance entre deux trous),  $\eta_D$  à l'indice de réfraction du verre,  $\theta$  à l'angle d'incidence, i et j aux constantes de résonance de Bragg. Tel que mentionné à la section 1.3.2, le moment du vecteur d'onde de la lumière peut être augmentée par diffraction à l'aide d'un réseau afin d'être couplé avec les SP. Ainsi,  $k_x$  est augmenté par un facteur impliquant les ordres i et j du réseau. Les constantes de résonance de Bragg correspondent à l'orientation d'une rangée de nanotrous par rapport à la diffraction du BW-SPP se propageant dans leur direction.<sup>55</sup> Dans ce cas-ci, l'équation (1.5) est uniquement valide pour un réseau de nanotrous avec une périodicité ayant une configuration carrée (**Figure 1.9b**). Ainsi, si le réseau excité a une périodicité hexagonale, le facteur  $2\pi/P$  de l'équation 1.5 deviendra  $4\pi/\sqrt{3}P$ .<sup>51</sup> D'ailleurs, pour l'ensemble de la thèse, les réseaux de nanotrous étudiés ont une périodicité de type hexagonale (**Figure 1.9a**).



**Figure 1.9** Schéma d'un réseau de nanotrous ayant une périodicité avec une configuration hexagonale (A) ou carrée (B).

Il est possible de dériver l'équation (1.5) afin d'obtenir une formule permettant d'estimer la position des bandes plasmoniques d'un réseau périodique hexagonal de nanotrous.<sup>48</sup>

$$\lambda = \frac{P}{\sqrt{\frac{4}{3}(i^2+ij+j^2)}} \left( \sqrt{\frac{\varepsilon_m(\lambda)\varepsilon_s(\lambda)}{\varepsilon_m(\lambda)+\varepsilon_s(\lambda)}} - \eta_D \sin(\theta) \right) \quad (1.6)$$

L'équation (1.6) permet de prédire la longueur d'onde ( $\lambda$ ) de résonance des modes plasmoniques de BW-SPP selon différentes propriétés du réseau et les conditions d'excitation avec la lumière incidente. Ainsi, différents modes de BW-SPP se propagent dans différentes directions déterminées selon les paramètres i et j.<sup>55</sup> L'excitation d'un réseau de nanotrous en transmission permet de générer de nombreuses bandes plasmoniques qui sont identifiées selon

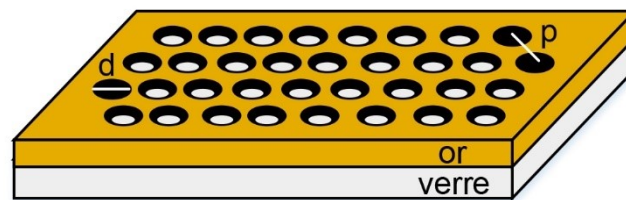
les ordres  $(i,j)$ . Les modes plasmoniques observés sont généralement pour des ordres de  $(\pm 1,0)$ ,  $(0,\pm 1)$  et  $(\pm 1,\pm 1)$ . De plus, la périodicité du réseau a un impact direct sur les conditions de résonance. En effet, lorsque la périodicité du réseau augmente, la position des bandes plasmoniques effectuent un déplacement bathochromique.<sup>56</sup> À l'équation (1.6), il est évident de constater qu'une variation de la constante diélectrique environnant le réseau va affecter la fréquence de résonance des BW-SPP. C'est d'ailleurs ce qui fait en sorte que les réseaux de nanotrous sont très sensibles à des variations d'indice de réfraction. En effet, la sensibilité en solution de ces capteurs optiques est généralement de l'ordre plusieurs centaines de nm/RIU.<sup>56</sup> C'est important de rappeler que les BW-SPP se propagent aux interfaces métal-diélectrique et métal-verre. Ainsi, les modes plasmoniques associés à l'interface métal-verre sont insensibles aux variations d'indice de réfraction du diélectrique et donc inutile en biocapteur. L'angle d'incidence est certainement un des facteurs ayant le plus grand impact sur les conditions de couplage du réseau. D'ailleurs, le chapitre 3 de la thèse démontre comment les propriétés plasmoniques des réseaux de nanotrous varient selon l'angle d'incidence en transmission.

Finalement, il est important de préciser que l'équation (1.6) ne tient pas compte de paramètres physiques tels que : l'épaisseur du film métallique, le diamètre des trous, la forme des trous et la rugosité de la surface. De plus, ce modèle mathématique ne tient pas compte de la symétrie de rotation du réseau de nanotrous lors du couplage plasmonique. En effet, une rotation du réseau de nanotrous varie l'angle azimutal ( $\phi$ ) auquel la lumière est diffractée. De ce fait, le chapitre 3 de la thèse introduit une équation générale décrivant les conditions de résonance des réseaux de nanotrous en tenant compte de  $\phi$ .

### **1.5.3 Performance, applications et limitations**

Les réseaux de nanotrous peuvent être appliqués à de nombreuses études telles que pour le développement de cellule photovoltaïques<sup>57-58</sup>, la spectroscopie d'exaltation de surface<sup>59-60</sup>, la spectro-électrochimie<sup>61</sup> et la bioanalyse<sup>62-63</sup>. L'intérêt de la communauté scientifique envers ces structures est notamment dû à la grande sensibilité et versatilité des réseaux de nanotrous. D'ailleurs, le sujet des réseaux de nanotrous est grandement documenté dans la littérature puisque de nombreuses synthèses de littérature<sup>25, 51, 64-66</sup> leur sont dédiés.

Malgré leur large éventail d'applications, les réseaux de nanotrous ont surtout été étudiés pour le développement de capteurs optiques. En effet, un des avantages d'effectuer la bioanalyse avec ces structures est la simplicité du montage optique. L'excitation des réseaux de nanotrous est généralement faite en transmission directe, ce qui nécessite une instrumentation simple et de faibles coûts. De nombreux groupes de recherche ont exploité cet aspect pour développer des plateformes miniaturisées de bioanalyse basée sur la technologie des réseaux de nanotrous.<sup>67-70</sup> Dans la majorité des cas, ces dispositifs permettent de détecter en simultanément plusieurs interactions biologiques à l'aide d'une puce intégrée à un système microfluidique. Le capteur est généralement excité par un laser ou une source halogène à l'aide d'objectifs de microscope puis le signal plasmonique est analysé par une caméra CCD. Ces puces bénéficient grandement de techniques de microfabrication capable de générer des structures uniformes à grande échelle (voir section 1.9).

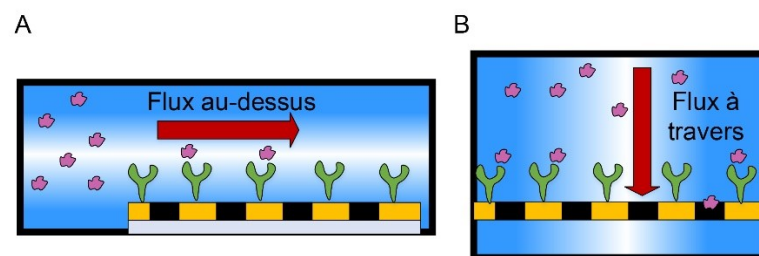


**Figure 1.10** Schéma d'un réseau hexagonal de nanotrous en or. « P » est la périodicité et « d » est le diamètre des trous.

Pour continuer, l'excitation des réseaux de nanotrous génère un signal plasmonique dans la gamme spectrale du visible-NIR. D'ailleurs, il est possible d'ajuster la position des bandes plasmoniques selon différents paramètres structuraux tels que : la composition métallique, la périodicité et le diamètre des trous.<sup>48, 71</sup> La périodicité des nanotrous est généralement de l'ordre de 100 nm à 1000 nm et le diamètre est fixé selon un ratio de  $d/p$  (diamètre/périodicité) d'environ 0,5-0,6. Tel que vu à la section 1.5.2, une structure ayant une périodicité trop élevée excite des modes plasmoniques dans le proche IR. Ceci complique la collecte du signal puisque la majorité des détecteurs commerciaux opèrent pour des plages de longueurs d'onde dans le visible. C'est pour cette raison que les réseaux de nanotrous sont généralement fabriqués avec une périodicité

inférieure à 1  $\mu\text{m}$ . L'optimisation des paramètres structuraux permet aussi d'améliorer la sensibilité en solution des réseaux de nanotrous. D'ailleurs, une augmentation de la périodicité améliore la sensibilité et varie selon les modes de BW-SPP.<sup>71-72</sup> Ainsi, la sensibilité en solution des réseaux de nanotrous excités en transmission est de l'ordre de 300 à 1000 nm/RIU.<sup>66</sup> Ces valeurs sont supérieures à celle des capteurs LSPR ( $\sim 100$  nm/RIU), mais inférieure au capteur SPR ( $\sim 3000$  nm/RIU). Du point de vue de la sensibilité en surface, les réseaux de nanotrous permettent de détecter des protéines avec des LOD de 10 à 100 nM, soit environ un ordre de grandeur plus élevé qu'en SPR.<sup>48, 69</sup>

Pour continuer, malgré leurs avantages, les réseaux de nanotrous excités en transmission sont limités par rapport aux performances de la SPR. Ainsi, certains groupes de recherches ont développé des approches pour amplifier la sensibilité en surface de ces structures. En effet, généralement les réseaux de nanotrous sont développés pour des plateformes de bioanalyses avec un système fluïdique de type flux au-dessus (*flow-over*)<sup>70, 73-74</sup>. Cette méthode consiste à faire circuler les analytes de façon tangentielle à la surface du capteur (**Figure 1.11a**). Dans ce type de détection, les cinétiques de liaison sont limitées par la diffusion des analytes à la surface.



**Figure 1.11** Schéma des différentes méthodes de détection avec les réseaux de nanotrous selon A) Flux au-dessus et B) Flux à travers.

Une autre approche consiste à faire circuler les analytes à travers (*flow-through*) des nanotrous. Ceci est effectué en appliquant un débit de fluide à pression constante afin que les analytes traversent le réseau de nanotrous suspendu (**Figure 1.11b**). Dans cette configuration, les réseaux de nanotrous agissent comme une membrane où les trous correspondent à des nanocanaux. La détection *flow-through* permet d'analyser des interactions biologiques sur les parois internes des nanotrous. D'ailleurs, des études ont démontré que le champ plasmonique des réseaux de nanotrous est davantage sensible à l'intérieur des trous.<sup>75</sup> De plus, la détection par *flow-through* améliore les taux d'adsorption d'analytes à la surface par rapport à la détection par *flow-over*.<sup>76-78</sup> La détection par *flow-through* permet aussi d'amplifier de 6-fois la réponse plasmonique associé à l'adsorption d'un analyte par rapport à la détection *flow-over*.<sup>77</sup> Par contre, il faut préciser que la fabrication de réseaux de nanotrous de type *flow-through* est complexe et que ces derniers sont excessivement fragiles. Ainsi, les réseaux de nanotrous de type *flow-over* sont généralement préférés à cause de leur robustesse et leur simplicité. C'est d'ailleurs ce type de détection qui a été utilisé lors des travaux présentés aux chapitres 2 et 3 de la thèse.

Pour continuer, les réseaux de nanotrous peuvent être appliqués à des techniques d'exaltation de surface comme la diffusion Raman exaltée (voir section 1.8) et l'exaltation métallique de la fluorescence (MEF, *metal-enhanced fluorescence*).<sup>79-80</sup> En effet, l'ajustement de la position des bandes plasmoniques selon la structure du réseau de nanotrous permet d'optimiser le couplage avec le laser ou le fluorophore. D'ailleurs, une étude Raman effectuée par le groupe Masson a démontré que la variation du ratio  $d/p$  d'un réseau de nanotrous affecte la localisation du champ plasmonique.<sup>59</sup> Un autre avantage des réseaux de nanotrous est la possibilité d'ajuster la position des modes plasmoniques selon l'angle d'incidence afin de favoriser un meilleur couplage. Cet aspect sera grandement discuté lors du chapitre 2 de la thèse.

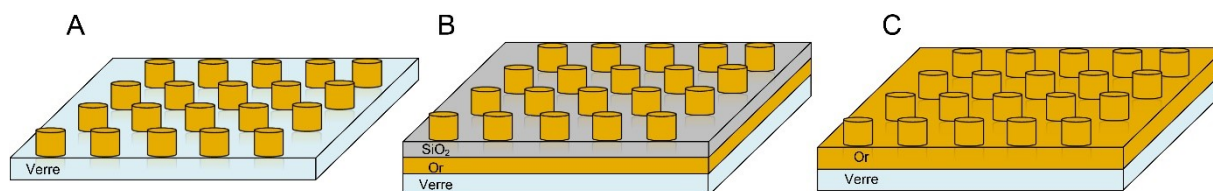
Finalement, les réseaux de nanotrous ont énormément de potentiel pour le développement d'une plateforme de bioanalyse pouvant effectuer du criblage à haut débit. Pour ce faire, des progrès doivent être réalisés afin d'améliorer la sensibilité de ces structures et de développer des techniques de microfabrication à grande échelle. De ce fait, le chapitre 2 de la thèse démontre comment l'excitation des réseaux de nanotrous à des angles d'incidence élevés permet d'amplifier la sensibilité en surface. Puis, le chapitre 3 décrit une nouvelle technique de

microfabrication à grande échelle des réseaux de nanotrous basés sur la photolithographie (voir section 1.9.3). La résolution de ces problèmes permettra d'utiliser les réseaux de nanotrous en combinaison avec un robot lecteur multipuits afin d'effectuer la bioanalyse par criblage à haut débit (voir chapitre 3).

## 1.6 Les réseaux de nanodisques

Les réseaux de nanodisques (**Figure 1.12**) sont un autre type de réseaux nanostructurés ayant des applications similaires aux réseaux de nanotrous. D'ailleurs, l'étude des propriétés plasmoniques de réseaux de nanodisque recouvert d'or est le sujet du chapitre 4 de la thèse. Ainsi, les prochains paragraphes de cette section vont supporter la compréhension du chapitre 4.

Tout d'abord, l'excitation des réseaux de nanodisques s'effectue en transmission via le phénomène LSPR.<sup>81</sup> En effet, pour exciter un LSP, les nanodisques doivent avoir un diamètre inférieur à la longueur d'onde du photon incident. Ainsi, les nanodisques ont généralement des diamètres de l'ordre de 100 à 500 nm.<sup>82-83</sup> Selon la théorie de la LSPR, l'augmentation de la taille de la nanostructure génère un déplacement bathochromique de la bande plasmonique. Donc, il est possible de contrôler la position du mode LSP selon le diamètre des nanodisques.<sup>84</sup>



**Figure 1.12** Réseaux de nanodisques en or B) Réseaux de nanodisques sur un espaceur de SiO<sub>2</sub> et un film d'or C) Réseaux de nanodisques sur un film d'or.

De plus, les nanodisques peuvent interagir entre eux selon leur espacement via un couplage dipôle-dipôle de leur champ électromagnétique.<sup>85</sup> Le groupe de Van Duyne a démontré qu'une

réduction de l'espacement entre des nanoparticules au travers un réseau hexagonal engendre un déplacement hypsochromique du signal LSPR.<sup>86</sup> Par contre, ce phénomène est valide lorsque les dipôles des nanoparticules sont couplés en champ éloigné (*far field*).<sup>87</sup> En effet, si l'espacement est inférieur à 100 nm, les nanoparticules se couplent en champ proche (*near field*) et un déplacement bathochromique est observé lorsqu'elles se rapprochent.<sup>86</sup> Dans le cas des réseaux de nanodisques, l'ajustement de l'espacement entre les nanostructures s'effectue en variant la périodicité du réseau. Dans la littérature, ces réseaux sont généralement fabriqués pour des espacements supérieurs à 100 nm entre les disques. De ce fait, une augmentation de la périodicité du réseau de nanodisque génère un déplacement bathochromique de la bande LSPR.<sup>88</sup>

Afin d'améliorer les performances de ces réseaux, un film d'or peut être inséré en dessous des nanodisques. Une cavité de résonance de 20 nm, composé de SiO<sub>2</sub>, est généralement inséré entre le film d'or et les réseaux de nanodisques (**Figure 1.12b**).<sup>89</sup> Cette modification permet un couplage plasmonique entre les PSP du film d'or et les LSP des nanodisques.<sup>84</sup> Ce couplage amplifie le champ plasmonique des nanodisques ce qui améliore la sensibilité des capteurs en SERS.<sup>90-91</sup> Ainsi, le couplage plasmonique est optimisé selon la périodicité du réseau et le diamètre des nanodisques.

Pour continuer, il est aussi possible d'obtenir un couplage en insérant le film d'or directement en dessous des nanodisques (**Figure 1.12c**). D'ailleurs, le groupe de recherche du professeur Canva a fait énormément d'études sur ce type de structure.<sup>92-95</sup> Ces recherches ont démontrés la présence d'un plasmon de réseau hybride (HLB, *hybrid lattice plasmon*) lorsque les LSP et PSP sont couplés. Ce type de plasmon offre une dispersion similaire à un PSP et amplifie le champ plasmonique localement autour des nanodisques. Cependant, la présence de ce mode fut démontrée expérimentalement pour des réseaux de nanodisques ayant des diamètres de 50 nm et une périodicité de 200 nm. De ce fait, la microfabrication à grande échelle de ce type de structure est assez complexe, ce qui limite leur utilisation.

Les recherches du professeur Canva sur les réseaux de nanodisques dévoilent la présence d'un autre type de plasmon ; les modes de Bragg (BM, *Bragg modes*). Les BM proviennent d'une interférence constructive entre les plasmons propagatifs du film d'or qui se contrepropagent lorsqu'ils sont dispersés par les nanodisques. Ainsi, les BM génèrent un champ

plasmonique intense excessivement confiné autour des nanodisques. D'ailleurs, l'étude des BM de réseaux de nanodisques recouverts d'or est au cœur du chapitre 4 de la thèse.

Pour terminer, peu de groupes de recherche ont utilisé les réseaux de nanodisques pour effectuer de la bioanalyse plasmonique. Dans la majorité des cas, les réseaux sont utilisés pour des études théoriques de couplage plasmonique ou comme substrat pour du SERS. De plus, dans la littérature, uniquement le groupe de Canva a étudié des structures avec le film d'or directement en dessous des nanodisques. Ainsi, le chapitre 4 de la thèse va présenter une variante de la structure de Canva ayant des dimensions supérieures (diamètre de 720 nm et périodicité de 1200 nm). Cette structure est simple à fabriquer à grande échelle et permet d'exciter des BM en transmission. Finalement, le chapitre 4 va démontrer que les réseaux de nanodisques sont une des structures plasmoniques les plus performantes pour effectuer de la bioanalyse en transmission.

## **1.7 Bioanalyse plasmonique**

Les sections précédentes de la thèse ont décrit différentes structures (film d'or, nanostructures et réseaux nanostructurés) et techniques (SPR, LSPR et EOT) pouvant effectuer de la bioanalyse plasmonique. Ainsi, les prochaines sections de la thèse vont détailler des concepts de bioanalyse plasmonique qui sont généralement effectués par SPR et aussi applicables pour les autres techniques de détection plasmonique par réfractométrie.

### **1.7.1 Principes d'un biocapteur plasmonique**

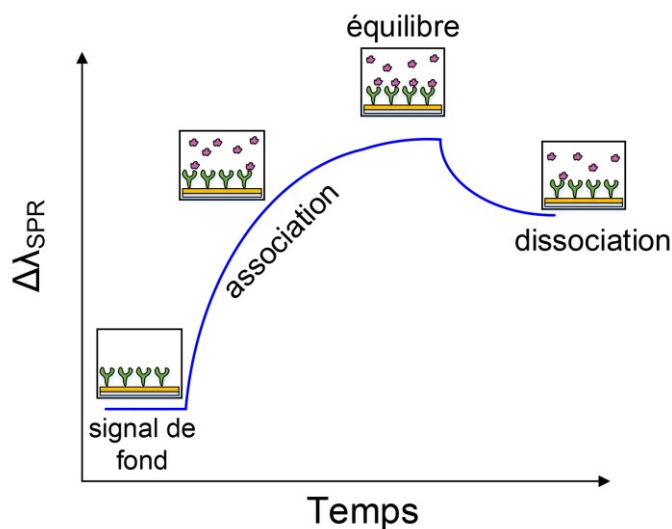
Tel que mentionné précédemment, les capteurs plasmoniques sont sensibles aux variations d'indice de réfraction ce qui en fait des détecteurs quasi universels.<sup>96</sup> Ainsi, dépendamment de la chimie de surface et du récepteur moléculaire utilisé, il est possible de détecter une multitude d'interactions biologiques à la surface du capteur.<sup>13</sup> La SPR permet entre autres d'étudier des interactions protéine-peptide, protéine-protéine, protéine-ADN, protéine-lipide et l'hybridation de brins d'ADN.<sup>97-98</sup> En effet, les capteurs plasmoniques permettent des analyses rapides, sensibles, spécifiques, en temps réel et qui ne nécessitent pas de marquage (*label-free*). Par contre, les capteurs plasmoniques mesurent uniquement les propriétés extrinsèques d'un analyte. Ainsi, en SPR, la détection d'un analyte dépend beaucoup de la masse



molaire de ce dernier. En effet, lorsqu'un analyte occupe davantage d'espace dans le champ plasmonique, il génère une plus grande variation d'indice de réfraction à la surface. Ainsi, la détection directe de petites molécules (< 1 kDa) est limitée en SPR.<sup>99</sup>

### 1.7.2 Cinétique de bioanalyse plasmonique

Les biocapteurs plasmoniques peuvent quantifier la concentration d'analytes à la surface selon la réponse plasmonique ( $\Delta\lambda_{SPR}$ ) obtenue. Lors d'une bioanalyse, la réponse plasmonique correspond à l'écart entre la position de la bande ( $\lambda$  ou  $\theta$ ) avant et après la liaison de l'analyte avec le récepteur. Lors de ces mesures, il est important de conserver la même matrice (e.g : tampon, salinité, température, *etc*) afin d'éviter des variations indésirables d'indice de réfraction. De plus, la concentration de récepteurs doit être faible afin de diminuer les risques d'encombrement stérique à la surface. Aussi, un nombre limité de récepteurs diminue les effets de transport de masses des analytes.<sup>100-101</sup> La mesure en temps réel d'une bioanalyse plasmonique permet de tracer un sensorgramme (**Figure 1.13**).

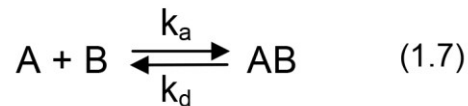


**Figure 1.13** Schématisation d'un sensorgramme lors d'une bioanalyse plasmonique.

Cette mesure cinétique de bioanalyse se divise en quatre étapes ; l'acquisition d'un signal de ligne de base, l'association de l'analyte avec le récepteur, l'atteinte d'un plateau d'équilibre

et la dissociation de l'analyte suite au rinçage avec le tampon. Ainsi, un sensorgramme donne des informations par rapport à la quantité d'analytes liés, l'affinité de l'analyte pour le récepteur et les cinétiques d'association/dissociation entre l'analyte et le récepteur.<sup>102</sup>

Pour continuer, la courbe d'un sensorgramme peut être modélisé selon un isotherme de Langmuir.<sup>15,103</sup> Ce type de modèle est appliqué pour étudié des interactions bimoléculaires (ratio 1:1) en SPR selon une cinétique de pseudo-premier ordre (équation 1.7).<sup>104</sup>



Dans l'équation (1.7), A correspond à l'analyte, B au ligand, AB au complexe formé,  $k_a$  et  $k_d$  sont respectivement les constantes d'association et de dissociation. La cinétique est considérée de pseudo-premier ordre puisque la concentration du ligand est constante et que la concentration de l'analyte est en excès. Ainsi, un modèle de Langmuir peut être appliqué afin d'étudier la variation du taux de recouvrement d'analyte à la surface selon la concentration de ce dernier.<sup>2</sup> De ce fait, la courbe d'attachement SPR est non linéaire due au nombre limité de récepteurs moléculaires immobilisés à la surface. La saturation du signal plasmonique provient d'un équilibre entre les vitesses d'association ( $v_a$ ) et de dissociation ( $v_d$ ) des analytes à la surface (équation 1.8 à 1.10).

$$v_a = k_a[A](1 - \theta_A) \quad (1.8)$$

$$v_d = k_d\theta_A \quad (1.9)$$

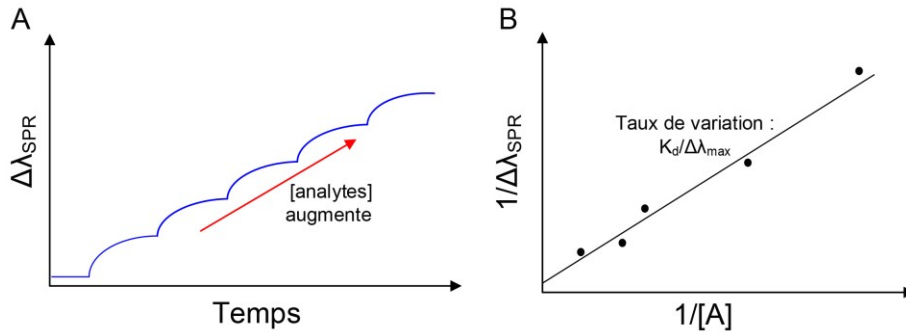
$$v_a = v_d = k_a[A](1 - \theta_A) = k_d\theta_A \quad (1.10)$$

Les équations 1.11 et 1.12 sont obtenues en dérivant les valeurs à l'équilibre de l'équation 1.10. Ainsi,  $[A]$  correspond à la concentration de l'analyte,  $\theta_A$  est la fraction de surface recouverte par l'analyte,  $K$  est la constante d'équilibre ( $K=k_a/k_d$ , en  $M^{-1}$ ),  $\Delta\lambda_{SPR}$  est la réponse plasmonique à une concentration donnée d'analyte et  $\Delta\lambda_{max}$  est la réponse plasmonique à une concentration saturée d'analyte.

$$\theta_A = \frac{\Delta\lambda_{SPR}}{\Delta\lambda_{max}} = \frac{K[A]}{1+K[A]} \quad (1.11)$$

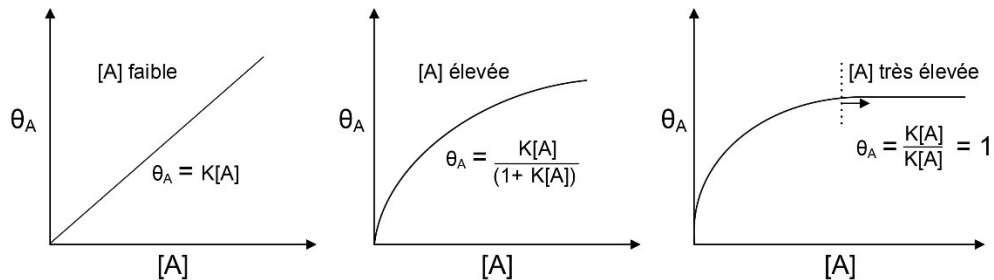
$$\frac{1}{\Delta\lambda_{SPR}} = \frac{1}{K[A]\Delta\lambda_{max}} - \frac{1}{\Delta\lambda_{max}} \quad (1.12)$$

À l'aide de ce modèle, il est possible de déterminer la constante de dissociation d'un complexe biologique ( $K_d = 1/K$ , en M) en dérivant le taux de variation d'une courbe de  $1/\Delta\lambda_{spr}$  en fonction de  $1/[A]$  (**Figure 1.14b**). Ce type de courbe d'étalonnage est obtenu en mesurant la réponse plasmonique du capteur pour des concentrations croissantes d'analytes (**Figure 1.14a**).



**Figure 1.14** A) Sensorgramme pour la bioanalyse successive de concentrations croissantes d'analytes. B) Courbe d'étalonnage correspondante de  $1/\Delta\lambda_{spr}$  en fonction de  $1/[A]$ .

Pour continuer, une courbe d'étalonnage en SPR est divisée en trois régimes déterminés par l'équation 1.11 (**Figure 1.15**). Premièrement, à faible concentration d'analyte, la relation s'apparente à  $\theta_A = K[A]$  et on observe une gamme linéaire de sensibilité. Deuxièmement, à haute concentration d'analyte, la relation approche un plateau et la sensibilité diminue. Troisièmement, à très haute concentration d'analyte, la relation devient  $\theta_A = 1$ , ce qui signifie que la surface est complètement couverte et que la sensibilité est nulle.



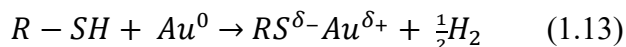
**Figure 1.15** Variation de la fraction de surface recouverte ( $\theta_A$ ) en fonction de la concentration d'analyte selon trois régimes de  $[A]$  : faible, élevée et très élevée.

Pour terminer, il est important de préciser que le modèle de Langmuir se base sur de nombreuses hypothèses telles que : l'adsorption de l'analyte ne dépasse pas le stade de monocouche, tous les sites de liaisons sont équivalents, la surface est uniforme et il n'y pas d'interactions entre les analytes adsorbées.<sup>105</sup> De plus, les mesures cinétiques faites avec un capteur plasmonique peuvent être limités par le transport de masses des analytes<sup>100</sup>, des effets de dérive du signal<sup>106</sup> et la multivalence de l'analyte<sup>104</sup>. Par contre, de nombreuses variantes du modèle de Langmuir permettent de corriger ces effets afin d'améliorer le calcul du  $K_d$ .

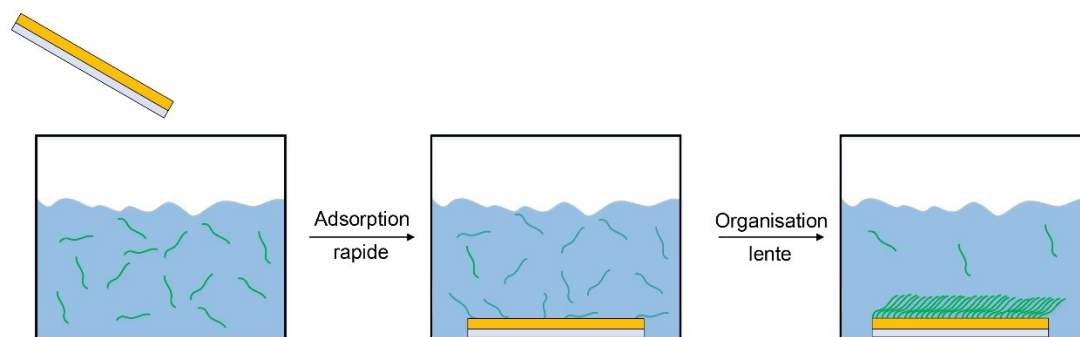
### 1.7.3 Chimie de surface des biocapteurs plasmoniques

Pour continuer, la chimie de surface d'un capteur est un des paramètres clés à considérer lors de la construction d'un biocapteur.<sup>107</sup> Le rôle de la chimie de surface est d'immobiliser le récepteur moléculaire, conserver son activité biologique et diminuer l'adsorption non spécifique de la matrice.<sup>108</sup> Il existe une multitude de méthodes d'immobilisation de récepteurs à la surface tels que : par adsorption physique<sup>109</sup>, par une monocouche auto-assemblées (e.g. : alcane thiol)<sup>101, 110</sup>, par un hydrogel (e.g : carboxyméthyle dextran)<sup>111-112</sup>, par un polymère (e.g : polyéthylène glycol)<sup>113</sup> et par une monocouche de protéines (e.g : protéine A)<sup>114</sup>.

Dans le cadre de cette thèse, l'immobilisation des récepteurs fut effectuée à l'aide de monocouches auto-assemblées (SAM, *self-assembled monolayer*). Ce type de SAM est généralement fonctionnalisé avec des groupements terminaux de types amine, carboxyle, aldéhyde ou époxy.<sup>109-110</sup> Le concept de l'auto-assemblage est l'organisation spontanée de molécules vers un état stable ayant une structure bien définie suite à l'obtention d'un équilibre thermodynamique. Les SAM d'alcane thiol se forme spontanément sur un film d'or suite à la formation d'un lien S-Au selon l'équation 1.13.



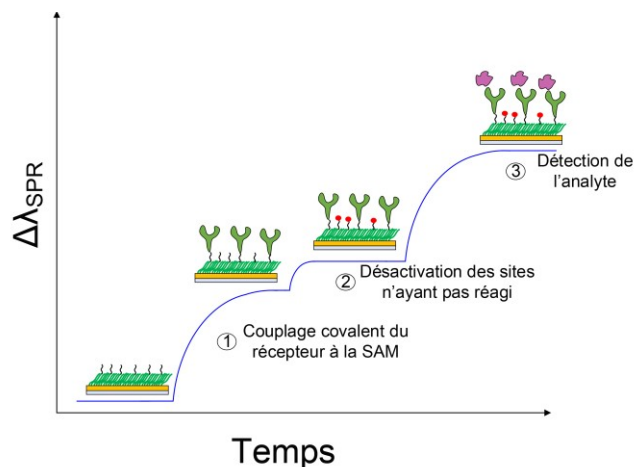
La formation du lien S-Au pourrait provenir d'une addition oxydative du lien SH à la surface d'or, suivit d'une élimination réductive de l'hydrogène.<sup>115</sup> Par contre, il faut préciser que le mécanisme exact de la réaction entre le thiol et l'or est inconnu.<sup>110</sup> Le lien S-Au est stable, résiste à l'oxydation et est considéré comme quasi covalent avec une force d'environ  $\sim 50$  kcal/mol.<sup>110</sup> La SAM est généralement formée en immergeant le capteur d'or dans une solution d'environ 1 mM d'alcane thiol dilué dans de l'éthanol. Le processus d'immobilisation de la SAM est divisé en deux étapes ; l'adsorption rapide en quelques minutes puis l'organisation sur une période de 16 heures (**Figure 1.16**).



**Figure 1.16** Schématisation du processus d'immobilisation d'une SAM d'alcane thiol sur un film d'or.

Lors du processus d'organisation, le solvant est repoussé de la monocouche et le nombre de défauts diminue au fur et à mesure que l'empaquetage est amélioré via la diffusion latérale des alcanes thiols.<sup>116</sup> La structure cristalline de la SAM est caractérisée par un angle d'inclinaison de  $30^\circ$  permettant une maximisation des interactions de Van der Waals entre les chaînes d'alcane thiol.

Suite à la formation de la SAM, la prochaine étape dans la construction du biocapteur est le couplage avec le récepteur (**Figure 1.17** ; étape 1). Une panoplie de récepteurs moléculaires peuvent être utilisés tels que l'ADN<sup>117</sup>, les protéines<sup>109</sup>, les anticorps<sup>107, 118</sup>, les dendrimères<sup>119</sup>, les peptides<sup>120</sup> et les cellules<sup>101</sup>.



**Figure 1.17** Représentation d'un sensorgramme lors de la construction d'un biocapteur afin de détecter un analyte.

Pour continuer, il existe de nombreuses méthodes de couplage covalent ou non covalent de la SAM avec le récepteur.<sup>110</sup> Le choix d'une méthode de couplage dépend de facteurs tels que : l'orientation résultante du récepteur et la stabilité du lien dans les conditions de la cinétique.<sup>102</sup> Dans le cadre des recherches de la thèse, la SAM est fonctionnalisée avec des groupements carboxylates et peut donc se lier au récepteur (e.g : anticorps) via un lien amide. L'inconvénient avec ce couplage est qu'il forme généralement une population hétérogène de récepteurs ayant des orientations aléatoires.<sup>102</sup> Les couplages de type non covalent peuvent être effectués en exploitant l'affinité biologique entre les protéines. Ceci fut d'ailleurs effectué en couplant un récepteur marqué par une étiquette polyhistidine (*His-tagged*) avec un complexe métallique de cuivre.<sup>121</sup> L'utilisation d'une étiquette polyhistidine permet d'optimiser l'orientation du récepteur à la surface et ainsi d'améliorer la sensibilité du biocapteur.

Suite à la liaison du récepteur avec la SAM, il est nécessaire de désactiver (ou bloquer) les sites (e.g : carboxyles) qui n'ont pas réagi avant de procéder à la détection de l'analyte (**Figure 1.17** ; étape 2). Ceci est généralement effectué en adsorbant une protéine non spécifique au récepteur (e.g : BSA) ou via une réaction avec l'éthanolamine.<sup>108</sup> Cette étape est cruciale afin de diminuer l'adsorption non spécifique (NSA, *non-specific adsorption*) lors de la détection de l'analyte. De ce fait, la NSA est négligeable lors d'une détection dans un tampon où les concentrations des contaminants sont très faibles. Cependant, lors d'une détection dans un

milieu complexe (e.g : sérum humain) la NSA augmente énormément. En effet, dans une matrice biologique comme le sérum humain, on retrouve des concentrations élevées de protéines (mg/mL) pouvant s'adsorber à la surface du capteur.<sup>122</sup> La NSA de ces protéines va générer un signal de bruit de fond qui empêche la quantification ou la détection des analytes qui ont une faible concentration (ng/mL). Sans une chimie de surface adaptée, la détection plasmonique dans une matrice complexe générera un signal associé à des faux positifs.<sup>108</sup> De ce fait, la NSA est un des facteurs qui limite énormément l'utilisation de capteurs SPR pour l'analyse d'échantillon sanguin.<sup>123</sup> Ainsi, divers types de SAM ont été développés afin de réduire l'adsorption non-spécifique des protéines à la surface. Dans la littérature, les SAM les plus efficaces sont notamment ; le polyéthylène glycol<sup>124</sup>, les peptides<sup>125-126</sup> et les polymères zwitterioniques<sup>127</sup>.

À ce sujet, les peptides sont très utilisés comme SAM dans le groupe du professeur Masson afin d'effectuer de la bioanalyse dans le sérum humain ou le lysat cellulaire. Un des peptides le plus efficaces, le 3-MPA-LHDLHD-OH, est composé des acides aminés de leucine (L), d'histidine (H) et d'acide aspartique (D). Le peptide est caractérisé par une molécule d'acide 3-mercaptopropionique (3-MPA) à l'extrémité N terminal et par un acide carboxylique du côté C terminal. Ce peptide a notamment permis la détection de méthotrexate dans des échantillons cliniques par SPR.<sup>128</sup> Pour terminer, au courant de la thèse, les peptides ont été utilisés à plusieurs reprises comme SAM afin d'améliorer la détection des analytes.

## **1.8 Diffusion Raman exaltée par effet de surface**

La diffusion Raman exaltée par effet de surface (SERS, *surface-enhanced Raman scattering*) est une technique spectroscopique d'analyse de surface qui amplifie l'effet Raman de molécules adsorbées sur des structures métalliques. Le phénomène SERS fut interprété pour la première fois en 1977 par le groupe de Van Duyne.<sup>129</sup> Depuis cette découverte, la popularité du SERS au sein de la communauté scientifique n'a cessé de croître. En effet, de nos jours des milliers d'articles discutant du SERS sont publiés à chaque année. Le SERS est une technique d'analyse de surface qui est rapide, très sensible, non destructive, permet des analyses en milieu aqueux et sans marquage.<sup>130</sup> D'ailleurs, la technique SERS est appliqué dans plusieurs domaines

; chimie environnementale, sciences judiciaires, biochimie, contrôle qualité de la nourriture, sécurité nationale, diagnostics médicaux et recherche pharmaceutique.<sup>130-131</sup>

### 1.8.1 Théorie de la spectroscopie Raman

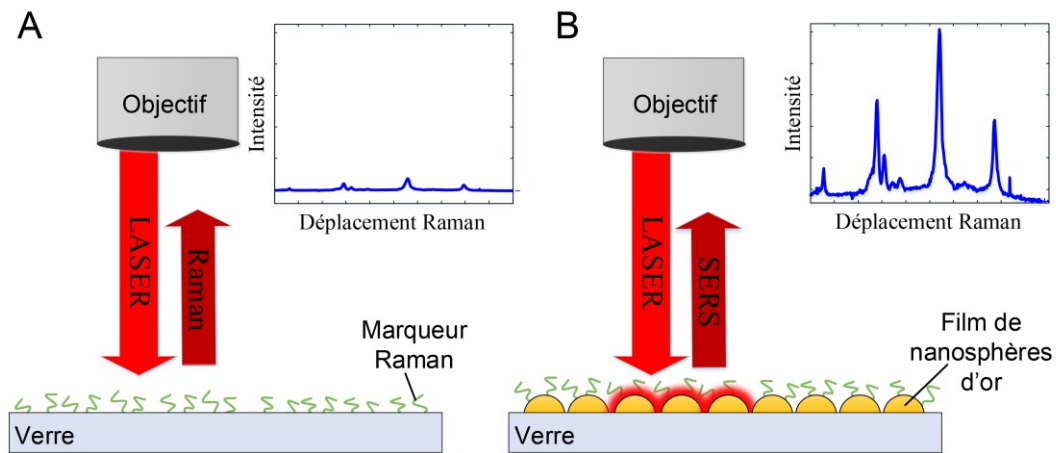
Tout d'abord, l'effet Raman provient de la diffusion inélastique d'un photon. C'est un phénomène physique par lequel une molécule modifie légèrement la fréquence du photon incident via un échange d'énergie. Afin d'être active en Raman, la molécule doit subir un changement de polarisabilité lors d'une transition vibrationnelle. Lorsqu'un faisceau interagit avec la molécule, plus de 99,9 % des photons du faisceau sont transmis directement. Une faible proportion des photons, environ 1 photon sur 10 000, diffuse élastiquement ; c'est la diffusion Rayleigh. Une proportion encore plus faible, environ 1 photon sur 10 000 000, va diffuser inélastiquement selon l'effet Raman.<sup>105</sup> Afin de générer un signal Raman, les molécules sont excitées avec un laser. L'utilisation des lasers comme source en spectroscopie Raman est due à leur cohérence, leur radiation monochromatique et leur forte puissance. L'intensité du signal Raman est inversement proportionnelle à la longueur d'onde du laser. Cependant, l'utilisation de laser émettant à faible longueur d'onde n'est pas idéale en spectroscopie Raman. En effet, à faible longueur d'onde, le signal Raman peut être aisément interféré par un signal fluorescent. Ceci s'explique par une différence de plusieurs ordres de grandeur entre la section efficace de la fluorescence ( $\sigma = 10^{-16} \text{ cm}^2$ ) et celle du Raman ( $\sigma = 10^{-24} \text{ cm}^2$ ).<sup>132</sup> Pour terminer, la spectroscopie Raman est une technique qui permet d'analyser quantitativement et qualitativement un analyte.

### 1.8.2 Théorie du SERS

Tout d'abord, le SERS permet d'amplifier la diffusion Raman (**Figure 1.18**) jusqu'à des facteurs d'amplifications (EF, *enhancement factor*) de  $10^6$ - $10^{10}$ .<sup>133</sup> L'effet SERS provient de couplages entre la structure plasmonique, la lumière et l'analyte. De ce fait, l'EF total en SERS est le produit de mécanismes d'amplification chimique et électromagnétique.<sup>134</sup> Le mécanisme d'amplification chimique provient de transfert de charges entre les électrons de l'analyte et ceux du métal.<sup>135</sup> Ce mécanisme contribuerait à un facteur d'amplification d'environ  $10^2$ .<sup>133</sup> Le mécanisme électromagnétique est celui qui contribue le plus à l'amplification Raman avec un



EF d'environ  $10^4$ .<sup>133</sup> En effet, tel que mentionné précédemment, l'excitation d'une nanostructure plasmonique (e.g : nanoparticule d'or) génère le phénomène LSPR. Ainsi, l'excitation des LSP va créer une amplification locale du champ électrique autour de la nanoparticule ce qui va amplifier la diffusion de la lumière à la surface. Dans ce cas-ci, la sonde Raman est adsorbée à la surface de la nanoparticule. Ainsi, l'énergie du plasmon est transférée sur la sonde et le processus Raman est amplifié.<sup>136</sup> Une étude a démontré que l'amplification est optimale lorsque la sonde est à une distance inférieure à 2 nm de la nanoparticule.<sup>137</sup>



**Figure 1.18** A) Schéma d'une analyse Raman d'un marqueur. B) Schéma d'une analyse SERS d'un marqueur à l'aide d'un film de nanosphères d'or ; l'excitation d'un LSP (champ rouge) amplifie le signal Raman.

L'EF total en SERS est calculé expérimentalement à partir de l'équation (1.14).<sup>133</sup> Dans cette équation,  $I_{SERS}$  correspond à l'intensité du signal SERS,  $I_{DR}$  à l'intensité de la diffusion Raman en solution,  $N_{surf}$  au nombre de molécules liées à la surface du substrat et  $N_{sol}$  le nombre de molécules excitées en solution.

$$EF = \frac{I_{SERS}N_{sol}}{I_{DR}N_{surf}} \quad (1.14)$$

La forme de la structure plasmonique a un énorme impact sur le confinement du champ plasmonique. D'ailleurs, de nombreuses recherches ont été dédiées au développement de structures plasmoniques permettant d'améliorer le EF en SERS.<sup>138</sup> Notamment, des films de nanoparticules partiellement agrégées permettent de générer des points chauds (*hot spots*) entre

les jonctions de nanoparticules.<sup>131, 139</sup> Un *hot spot* est une zone où le champ électromagnétique est excessivement intense et se situe généralement dans les crevasses interstitielles de la structure plasmonique.<sup>140</sup> Les hot spots permettent d'atteindre des facteurs d'amplification pouvant aller jusqu'à  $10^{10}$ - $10^{11}$ .<sup>135</sup> Par contre, la probabilité que la sonde Raman interagisse avec un hot spot est relativement faible. Ainsi, l'excitation de la sonde Raman via un *hot spot* est aléatoire et diminue drastiquement la reproductibilité du signal SERS pour ce type de substrat.

Pour continuer, le signal SERS est amplifié lorsque la fréquence du laser est couplée avec celle de résonance du SP de la structure. En effet, une étude a démontré que le EF est optimal lorsque la bande LSPR d'un film de nanosphères d'argent est légèrement décalée bathochromiquement par rapport à la longueur d'onde du laser.<sup>141</sup> De ce fait, une variation de la position de la bande plasmonique du substrat va affecter l'intensité du signal SERS.

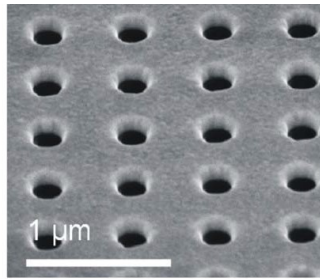
Pour terminer, le matériel plasmonique idéale pour le SERS doit respecter certains paramètres, tel qu'une fabrication reproductible, un signal SERS uniforme à travers la surface, une stabilité à long terme et un EF élevé de l'ordre de  $10^8$ - $10^{10}$ .<sup>138</sup> Pour le moment, aucune structure plasmonique respectant l'ensemble de ces paramètres n'a été généré. Ainsi, le chapitre 4 de la thèse va démontrer que les réseaux de nanodisques ont le potentiel d'être un substrat SERS efficace.

## 1.9 Méthodes de fabrication des réseaux nanostructurés

Tout d'abord, le choix de la méthode de fabrication d'un réseau nanostructuré est dicté par son champ d'application. En effet, certaines recherches requièrent l'utilisation de structures complexes ayant des formes précises fabriquées avec haute résolution. Tandis que d'autres études vont plutôt favoriser des structures qui sont simples à fabriquer à grande échelle, mais qui contiennent des défauts. Ainsi, les prochaines sections de la thèse vont discuter des techniques de fabrication les plus utilisées pour produire des réseaux nanostructurés.

### 1.9.1 Fabrication par faisceau ionique focalisée

La technique par faisceau ionique focalisé (FIB, *focused ion beam*) est une méthode polyvalente qui permet de fabriquer des structures complexes 2D ou 3D avec un contrôle précis sur la taille et la forme de la nanostructure. En effet, le FIB permet de fabriquer des nanostructures avec une taille inférieure à 10 nm.<sup>10</sup> Le principe du FIB est de diriger un faisceau d'ions focalisés de haute énergie (e.g : gallium) sur une surface afin de la pulvériser.<sup>142</sup> Le fraisage (*milling*) d'une surface (e.g : or) par FIB permet de générer le motif désiré. La lithographie FIB permet aussi de créer des patrons sur une couche de résine (e.g : PMMA) et déposer localement un métal avec grande résolution.<sup>143</sup> Le FIB est une technique qui offre des possibilités presque sans limites de nanofabrication de structure plasmonique. D'ailleurs, le FIB fut la première technique utilisée pour la fabrication de réseaux de nanotrous (**Figure 1.19**).<sup>65</sup> L'avantage du FIB est qu'elle permet de fabriquer des échantillons de réseaux nanostructurés sans défauts.

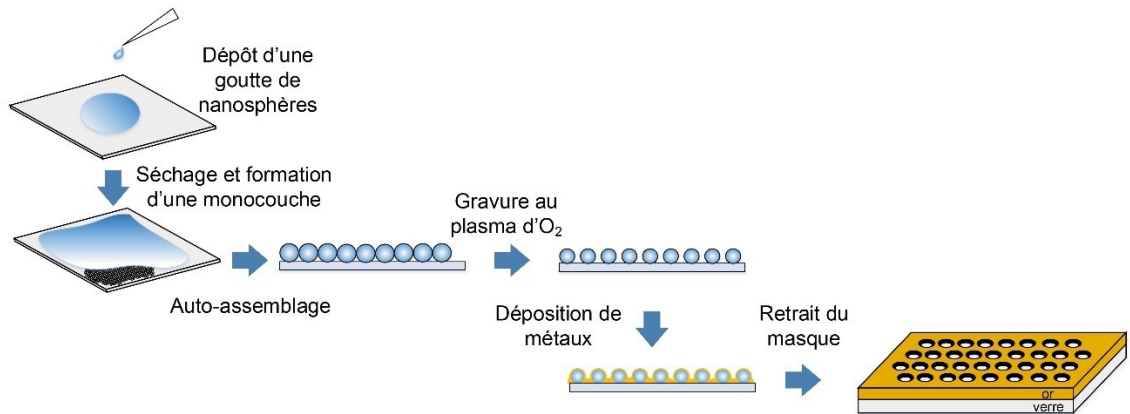


**Figure 1.19** Image par microscopie électronique à balayage (SEM) d'un réseau de nanotrous fabriqués par FIB.

Cependant, la technique FIB est limitée pour fabriquer les échantillons sur de grandes surfaces. En effet, le processus FIB est très lent et nécessite une instrumentation complexe dispendieuse. La surface fabriquée est généralement limitée pour des zones de l'ordre du  $\sim\mu\text{m}^2$  puisque le coût de fabrication d'un échantillon est élevé.<sup>9</sup> Ce faisant le FIB n'est pas une technique idéale pour la fabrication de capteurs plasmonique à grande échelle.<sup>65</sup> En somme, la technique FIB est surtout utilisée lorsqu'il est nécessaire de fabriquer un échantillon avec une extrême précision.

## 1.9.2 Lithographie de nanosphères

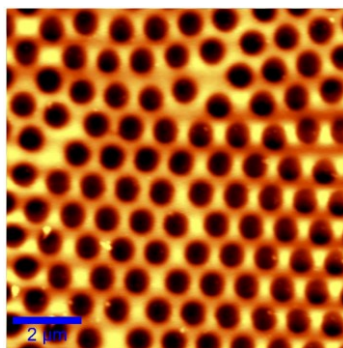
La lithographie de nanosphères (NSL, *nanosphere lithography*) est une technique versatile qui permet de fabriquer des réseaux nanostructurés à faible coût.<sup>10, 144</sup> La NSL a d'ailleurs été utilisée lors du chapitre 2 de la thèse afin de fabriquer des réseaux de nanotrous en or. Le principe de la NSL est d'étaler une solution de nanosphères sur une lamelle de verre (Figure 1.20).



**Figure 1.20** Principe de fabrication des réseaux de nanotrous par NSL.

Par la suite, l'évaporation du solvant va mener à l'auto-assemblage des billes de polymères en un réseau périodique hexagonal. Dépendamment des conditions de déposition, la monocouche de nanosphères s'étend sur une aire d'environ  $1 \text{ cm}^2$ . Puis, le masque de nanosphères est gravé par un plasma d'oxygène ; ceci permet de contrôler la taille des billes. Enfin, une couche de chrome (1 nm) et d'or (125 nm) est déposée sur la structure par pulvérisation cathodique. La mince couche de chrome améliore l'adhésion de l'or sur le verre. La dernière étape consiste à enlever les billes de la surface de l'échantillon par sonication dans l'éthanol.

La NSL offre de nombreuses options d'optimisation de la géométrie du réseau de nanotrous. En effet, le choix du diamètre de la nanosphère (360 nm à 3200 nm) a un impact direct sur la périodicité de la structure. De plus, les temps de gravure au plasma d'oxygène sont optimisés afin de contrôler le diamètre final des nanotrous. Ainsi, la NSL est une technique de fabrication rapide, simple, versatile et à faible coût.

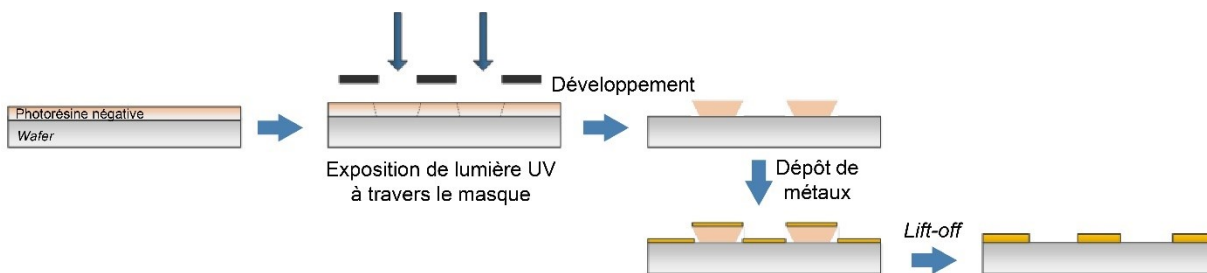


**Figure 1.21** Image par microscopie à force atomique (AFM) d'un réseau de nanotrous en or fabriqué par NSL.

Par contre, la NSL est limitée pour la fabrication de structure plasmonique sans défaut sur de grandes aires.<sup>62</sup> En effet, la NSL ne peut pas générer de grandes zones uniformes dues aux nombreuses imperfections à travers le réseau nanostructuré (**Figure 1.21**). Tel qu'il sera discuté lors du chapitre 3, ces imperfections ont un impact négatif sur la reproductibilité du signal plasmonique des réseaux de nanotrous.

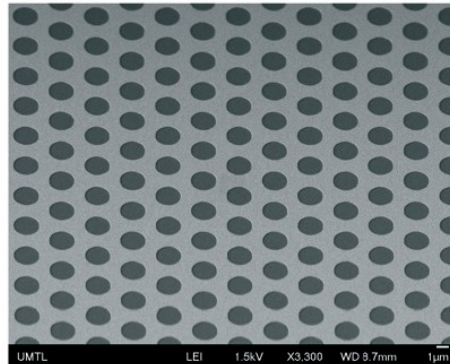
### 1.9.3 Photolithographie

La photolithographie est une technique de microfabrication qui est grandement utilisée pour le développement de microcircuits électroniques<sup>145</sup> et de microstructures métallique.<sup>54</sup> La popularité de la photolithographie est due à sa rapidité, sa haute résolution et son aptitude à fabriquer des structures uniformes sur de grandes surfaces (e.g : 80 cm<sup>2</sup>). Le principe de microfabrication de réseaux nanostructurés par photolithographie est détaillé à la figure 1.22.



**Figure 1.22** Concept de microfabrication de réseaux de nanotrous en or par photolithographie.

Premièrement, une résine photosensible est étalée sur une gaufre (*wafer*) par étalement centrifuge (*spin coating*). La gaufre est généralement composée de silice ou de verre et a un diamètre de 4 à 8 pouces. Par la suite, de la lumière UV est exposée à travers un masque sur la gaufre à l'aide d'un aligneur optique. Le masque est conçu de façon à définir les motifs désirés (ex : trous) sur la gaufre. Le masque est composé d'un substrat de quartz recouvert d'un film de chrome contenant les motifs qui sont généralement fabriqués par FIB. Le transfert de l'image du masque dépend du type de résine photosensible utilisé. En effet, il est possible d'utiliser des résines négatives ou positives qui, suite à la radiation lumineuse, vont respectivement se réticuler ou devenir davantage soluble. Ainsi, une résine positive va effectuer le transfert exact de l'image du masque. Tandis qu'une résine négative va transférer l'image inverse du masque. Par la suite, la résine est développée et le motif désiré est obtenu sur la gaufre. La prochaine étape consiste à métalliser la surface de la gaufre à l'aide d'un évaporateur à faisceau d'électrons. Puis, la résine est retirée de la surface (*lift-off*) à l'aide d'un solvant. Au final, une structure métallique uniforme correspondant à l'image du masque est obtenue (**Figure 1.23**).



**Figure 1.23** Image SEM d'un réseau de microtrous hexagonale fabriqué par photolithographie à l'aide d'une résine positive. Le réseau a une périodicité de  $3,2 \mu\text{m}$ , le diamètre des trous est de  $1,8 \mu\text{m}$  et l'épaisseur du film d'or est de  $65 \text{ nm}$ .<sup>146</sup>

Pour continuer, la résolution obtenue en photolithographie est limitée par la diffraction de la lumière au travers du masque.<sup>147</sup> En effet, la limite de résolution d'un instrument optique est définie selon la limite de Abbe (équation 1.15).

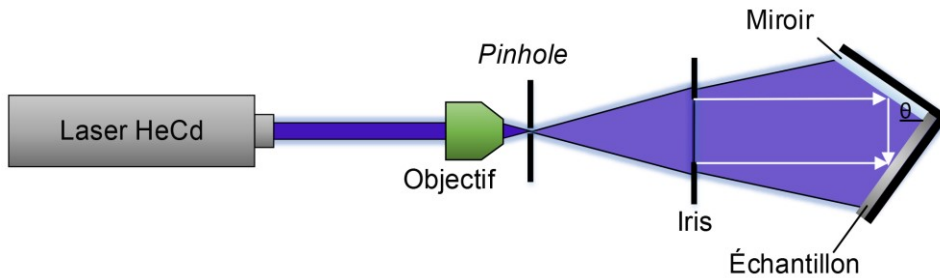
$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.15)$$

Dans cette équation,  $d$  correspond à la résolution transversale, c'est-à-dire : la distance limite en dessous de laquelle deux motifs (e.g : trous) voisins ne seront pas transférés adéquatement par le masque. Ainsi, la résolution dépend de la longueur d'onde d'illumination ( $\lambda$ ) et de l'ouverture numérique (NA) de l'instrument. En photolithographie conventionnelle, l'exposition de la résine se fait généralement avec une lampe à mercure à une longueur d'onde de 365 nm. Avec ce type de lampe et de résine, la photolithographie est limitée pour la fabrication de structures de l'ordre du  $\mu\text{m}$ . Ainsi, afin d'améliorer la résolution il est possible d'utiliser des sources UV profondes (DUV, *deep UV*). La photolithographie par DUV permet d'atteindre une résolution inférieure à 50 nm.<sup>148</sup> Par contre, il faut préciser que très peu d'instruments de photolithographie DUV sont disponibles au Canada et ce n'est pas étranger au fait que les résines DUV sont très dispendieuses.

En somme, la photolithographie est une technique hybride à la NSL et le FIB. En effet, malgré sa modeste résolution, la photolithographie est plus rentable que le FIB et génère des surfaces davantage uniformes qu'en NSL. Ainsi, les chapitres 3 et 4 de la thèse vont démontrer que la photolithographie est une technique viable pour la microfabrication de réseaux nanostructurés.

#### 1.9.4 Lithographie par interférence laser

La lithographie par interférence laser (LIL, *laser interference lithography*) est une technique simple, peu coûteuse et qui peut générer des réseaux nanostructurés métalliques sur une grande surface uniforme.<sup>58</sup> Similairement à la photolithographie conventionnelle, la microfabrication de réseaux de nanotrous en LIL est faite par un procédé *lift-off*.<sup>58</sup> Toutefois, le LIL est une technique qui ne nécessite pas l'utilisation de masque ce qui simplifie le processus de nanofabrication. Le principe du LIL est d'exposer la photorésine à l'aide de deux faisceaux cohérents qui vont générer un patron d'interférence d'ondes stationnaires à la surface du substrat (e.g : verre).<sup>149</sup> Un interféromètre de Lloyd est généralement utilisé afin de séparer la radiation d'une source laser en deux faisceaux cohérents (**Figure 1.24**).



**Figure 1.24** Schéma du montage d'interféromètre de Lloyd permettant d'effectuer du LIL. Les flèches blanches correspondent à la direction du faisceau lumineux.

L'interférence entre les ondes des deux plans va créer un patron avec une périodicité ( $P$ ) qui peut être optimisé selon la longueur d'onde du laser ( $\lambda_{laser}$ ) et l'angle formé entre les faisceaux ( $\theta$ ) (équation 1.16).

$$P = \frac{\lambda_{laser}}{2\sin\theta} \quad (1.16)$$

Une structure périodique 2D est obtenue lorsqu'une rotation du substrat (e.g :  $90^\circ$ ) est effectuée entre deux expositions du patron d'interférence. Par la suite, la photorésine est développée ce qui va générer un réseau de piliers qui est ensuite métallisé par un évaporateur à faisceau d'électrons. Puis, la résine est retirée du substrat à l'aide d'un solvant ce qui va générer un réseau de nanotrous.

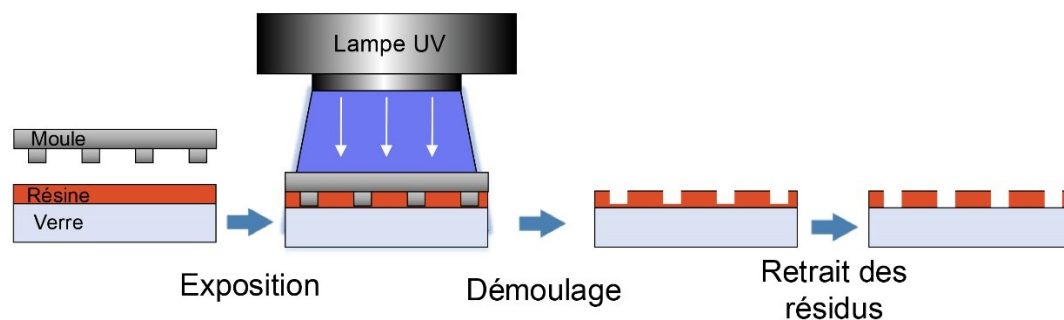
Pour continuer, le LIL est une technique assez polyvalente qui permet de fabriquer des réseaux de nanotrous pour une gamme de périodicité allant de 450 à 1800 nm uniquement en variant  $\theta$  ( $\lambda_{laser} = 458 \text{ nm}$ ). De plus, le diamètre des nanotrous peut être optimisés selon les temps d'exposition et de développement de la photorésine.<sup>58</sup> L'aire de la surface exposée peut être augmenté en variant le grossissement de l'objectif, en augmentant la distance entre le sténopé (*pinhole*) et le substrat et en utilisant un plus grand miroir de Lloyd.<sup>150</sup> De façon similaire à la photolithographie, il est aussi possible d'atteindre des résolutions inférieures à 50 nm en combinant le LIL avec un laser et une photorésine de type DUV.<sup>149</sup>



Au final, le LIL est une technique plus économique et qui offre une meilleure résolution que la photolithographie conventionnelle pour la fabrication de réseaux nanostructurés. De ce fait, l'uniformité de la nanostructure fabriquée en LIL dépend grandement de la stabilité du laser ; qui est la principale dépense associée à un montage LIL. En somme, le LIL est une technique ayant beaucoup de potentiel pour la fabrication de réseaux de nanotrous à grande échelle. D'ailleurs, l'annexe III de la thèse va décrire des expériences de microfabrication par LIL qui ont été faites dans les laboratoires de l'Université Western Ontario.

### 1.9.5 Lithographie par nanoimpression

La lithographie par nanoimpression (NIL, *nanoimprinting lithography*) est une technique qui conçoit des réseaux nanostructurés à grande échelle avec haute résolution et grande uniformité.<sup>151</sup> Contrairement aux techniques de lithographie optique qui sont limités par la diffraction de la lumière, la NIL génère des structures par déformation mécanique directe d'une résine à l'aide d'un moule préfabriqué.<sup>152</sup> Ainsi, la NIL est en mesure d'atteindre des résolutions inférieures à 10 nm; ce qui permet la nanofabrication de réseaux de nanotrous.<sup>153</sup> Le moule correspond à l'image inverse du motif qui est estampé sur un substrat recouvert par un polymère thermoplastique ou un polymère qui se réticule par irradiation UV (*UV curing*).<sup>154</sup> La nanoimpression UV est généralement préférée, car cette technique opère à faible pression, basse température et est plus rapide que la nanoimpression thermique.<sup>151</sup>



**Figure 1.25** Schéma du processus de microfabrication par nanoimpression UV.

Lors de l'étape de moulage, une pression (~10 bar) est appliquée entre le moule et la résine UV durant quelques minutes. Par la suite, le substrat (e.g : verre), le moule et la photorésine sont séchés par la lumière UV (**Figure 1.25**). D'ailleurs, un revêtement antiadhésif sur le moule permet de démouler efficacement le substrat sans l'endommager. Suite au retrait du moule, les résidus indésirables présents sur la surface du substrat sont éliminés à l'aide d'un plasma d'oxygène. Puis, des couches métalliques de chrome (1 nm) et d'or (125 nm) sont déposées sur le substrat à l'aide d'un évaporateur à faisceau d'électrons. La dernière étape consiste à retirer (*lift-off*) la photorésine avec un solvant ; ce qui va générer une structure de réseaux de nanotrous.

Pour continuer, le moule est composé de matériaux ayant une haute résistance mécanique, tel que : le silicium, l'oxyde de silicium ou le nickel.<sup>152</sup> La fabrication du moule est faite par des techniques qui sont dispendieuses et lentes (e.g : FIB), ce qui représente une des limitations principales du NIL.<sup>65</sup> Toutefois, les moules sont réutilisés des milliers de fois avant d'être usés. Ainsi, à long terme, le cout de fabrication du moule devient rentable. En somme, la NIL est une technique ayant énormément de potentiel pour la fabrication de masse de réseaux de nanotrous. D'ailleurs, de nombreux groupes de recherche utilisent le NIL afin de fabriquer des structures plasmoniques à grande échelle.

## 1.10 Directions et perspective de la thèse

Cette thèse porte sur l'étude des propriétés plasmoniques des réseaux nanostructurés afin de développer des applications de bioanalyse plasmonique et de SERS. Le but de la thèse est notamment de concevoir une plateforme de bioanalyse effectuant du criblage à haut débit à l'aide de la technologie des réseaux nanostructurés.

Premièrement, le chapitre 2 de la thèse discute des propriétés plasmoniques des réseaux de nanotrous selon les conditions de couplage en transmission. De ce fait, l'équation générale du couplage plasmonique des modes BW-SPP des réseaux de nanotrous est dérivée afin de tenir compte de l'effet de symétrie de rotation du réseau et l'angle d'excitation. Ainsi, la dispersion du signal plasmonique de réseau de nanotrous selon l'angle d'incidence est corrélé avec des

simulations *finite difference time-domain* (FDTD). La sensibilité en surface des réseaux de nanotrous est amplifiée lorsque l'angle d'incidence en transmission augmente. Ce gain de sensibilité permet de détecter des concentrations de protéines (IgG) avec une LOD comparable à la SPR. De plus, le contrôle de la position de la bande plasmonique à la fréquence désirée améliore le couplage avec le laser pour des études SERS. En somme, ce chapitre démontre que l'angle d'incidence et la symétrie de rotation du réseau contrôle la localisation du champ plasmonique des réseaux de nanotrous. Le chapitre 2 est issu de l'article «*Tuning the 3D plasmon field of nanohole arrays*» publié dans le journal *Nanoscale* en 2013. Cet article a comme co-auteurs mon directeur de thèse, Yuzhang Liang, Hugo-Pierre Poirier Richard, Rita Faïd et la professeure Wei Peng.

Pour continuer, le troisième chapitre de la thèse porte sur le développement d'un robot lecteur multipuits qui effectue de la bioanalyse par criblage à haut débit à l'aide de réseau de nanotrous. Pour ce faire, un robot lecteur multipuits et une plaque de 96 puits ont été fabriqués à l'Université de Montréal. Ce chapitre détaille le design et fonctionnement du lecteur multipuits permettant d'analyser des capteurs plasmoniques à un angle d'incidence élevé. De ce fait, une nouvelle technique de microfabrication à grande échelle des réseaux de nanotrous, basée sur la photolithographie, est démontrée. Ces structures uniformes améliorent le rapport du signal sur bruit (S/B) du signal plasmonique ainsi que la reproductibilité des mesures obtenues avec le robot multipuits. L'efficacité du lecteur multipuits plasmonique est démontrée pour la bioanalyse de l'IgG, de la PSA et du MTX. En somme, cette plateforme de détection permet d'analyser rapidement et avec haute sensibilité une multitude de biomolécules par criblage à haut débit. Les travaux du chapitre 3 sont présentés dans l'article «*96-Well Plasmonic Sensing with Nanohole Arrays*» qui fut publié dans le journal *ACS Sensors* en 2016. Cet article a comme co-auteurs mon directeur de thèse, Korak Kumar Ray, Hugo-Pierre Poirier-Richard et Anthony Crofton.

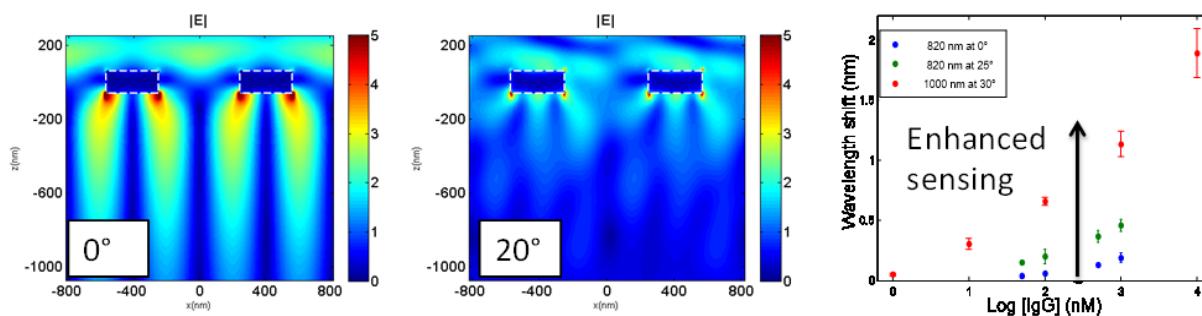
Finalement, le chapitre 4 de la thèse discute des propriétés des réseaux de nanodisques recouverts d'or dans le but d'effectuer la bioanalyse plasmonique et du SERS. L'excitation en transmission directe d'un réseau de nanodisque recouvert d'or (périodicité de 1200 nm et diamètre de 700 nm) génère un signal plasmonique ayant un facteur de mérite élevé. Ce signal plasmonique provient de l'excitation des modes de Bragg. De ce fait, la dispersion des BM est

étudiée selon l'angle d'excitation et une corrélation est obtenue avec les calculs théoriques. Ce chapitre démontre l'efficacité des réseaux de nanodisques en tant que capteur plasmonique par rapport aux nanostructures généralement utilisées dans la littérature. En effet, les réseaux de nanodisques sont simples à fabriquer, sont excités en transmission directe et ont une sensibilité en surface élevée. De plus, des simulations 3D *finite element method* (3D FEM) ainsi que des mesures en imagerie Raman des structures prouvent que le champ plasmonique des BM est fortement localisé sur les bordures des nanodisques. Ainsi, la versatilité de ces capteurs est démontrée pour des analyses SERS avec un EF élevé ( $\sim 10^7$ ). En somme, ce chapitre démontre que les réseaux de nanodisques ont le potentiel d'être un capteur plasmonique idéal pour la bioanalyse plasmonique et du SERS. Le chapitre 4 provient de l'article «*High figure of merit (FOM) of Bragg modes in Au-coated nanodisk arrays for plasmonic sensing*» qui a été soumis dans le journal Nano Letters en août 2016. Cet article a comme co-auteurs mon directeur de thèse, Thibault Brulé, Stacey Laing, Wenli Cui, Mitradeep Sarkar, la professeure Karen Faulds, la professeure Wei Peng et le professeur Michael Canva.

## Chapitre 2 : Tuning the 3D plasmon field of nanohole arrays

Une version de ce chapitre est déjà publiée avec la citation :

Maxime Couture, Yuzhang Liang, Hugo-Pierre Poirier Richard, Rita Faid, Wei Peng and Jean-Francois Masson, *Nanoscale* **2013**, 5, 12399-12408



Je fus responsable des manipulations et du traitement de données de toutes les mesures avec les substrats de réseaux de nanotrous. Jean-François Masson et moi avons élaboré les protocoles expérimentaux et j'ai rédigé les premières versions de l'article. De plus, le professeur Jean-François Masson a élaboré la solution analytique des BW-SPP. Yuzhang Liang et Wei Peng ont effectué les simulations FDTD du champ plasmonique des structures. Hugo-Pierre Poirier-Richard a conçu le montage SERS et nous avons effectué toutes les mesures ensemble. Rita Faid a synthétisé les nanoparticules fonctionnalisées avec un rapporteur Raman.

## 2.1 Abstract

Modern photonics is being revolutionized through the use of nanostructured plasmonic materials, which confine light to sub-diffraction limit resolution providing universal, sensitive, and simple transducers for molecular sensors. Understanding of the mechanisms by which light interacts with plasmonic crystals is essential for developing devices for applications. The strong influence of grating coupling on electromagnetic field distribution, frequency and degenerescence of plasmon bands has now been characterized using hexagonal nanohole arrays. A universal equation for nanohole arrays was derived to demonstrate the strong influence of incidence and rotation angle on optical properties of 2D plasmonic crystals such as nanohole arrays. Consequently, we report experimental data in strong agreement with finite-difference time-domain (FDTD) simulations that clearly demonstrate the influence of the grating coupling conditions on the optical properties (such as plasmon degeneracy and bandwidth) and on the distribution of the plasmon field around nanohole arrays (tunable penetration depth and highly localized field). The tunable 3D plasmon field allowed to control sensing properties, such that enhanced sensitivity was achieved for a protein assay using surface plasmon resonance (SPR) and surface-enhanced Raman scattering (SERS) sensors by employing different grating coupling conditions to tune plasmonic properties and electric field distribution.

## 2.2 Introduction

Surface plasmons (SP) are commonly employed in modern photonic techniques, such as theoretical light-matter interactions<sup>12</sup>, biomedical sensing<sup>13</sup>, and photothermal therapy<sup>155</sup>. These propagating waves of conduction electrons at the interface between a noble metal and a dielectric become excited on irradiation with light on 1D, 2D or 3D plasmonic crystals resulting in surface plasmon polaritons ( $k_{SPP}$ ), which gain momentum through the grating coupling conditions (equation 2.3)<sup>a</sup>. Among the great diversity of 2D plasmonic crystals, nanohole arrays have received significant of attention<sup>156</sup>, because modulation of their periodicity and diameter can augment refractive index sensitivity, enhanced optical transmission (EOT)<sup>49</sup>, improve local field strength<sup>157</sup>, and tune optical transmission windows<sup>158</sup>. Nanohole arrays offer promise for various applications, including theoretical investigations of light-surface plasmon interactions<sup>12</sup>, biosensing<sup>52, 159</sup>, plasmon-enhanced photovoltaics<sup>58</sup>, spectro-electrochemistry<sup>61</sup>, and surface enhanced spectroscopy<sup>59, 160</sup>.

The optical properties of nanohole arrays are well understood for different hole diameter<sup>71</sup>, periodicity<sup>72</sup>, and metal composition<sup>71</sup>; however, grating coupling conditions remain poorly characterized and uncertainty remains concerning the importance of the symmetry (S, rotation symmetry of 60° for hexagonal arrays), incidence angle ( $\theta$ ) and azimuthal rotation ( $\phi$ ) for sensing and optical filtering. Most studies have used polarized light impinging at  $\theta = 0^\circ$  aligned on the (1,0) mode ( $\phi = 0^\circ$ ) of square arrays of nanoholes (S = 90°), because such simplified grating coupling conditions hide the complex nature of the plasmon resonances of 2D crystals. However, the complexity of the plasmon resonances on 2D plasmonic crystals must be accounted for when deriving a universal plasmon coupling equation (equation 2.1; See section 2.7 for derivation).

$$\lambda = \left( \frac{P}{\sqrt{\frac{4}{3}(i^2 + ij + j^2)}} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} - \frac{P}{\sqrt{\frac{4}{3}(i^2 + ij + j^2)}} \eta_D \sin \theta (i \cos(\phi) + j \cos(\phi + 60) + i \sin(\phi) + j \sin(\phi + 60)) \right) \quad (2.1)$$

This equation introduces the influence of rotation symmetry in the model for nanohole arrays. It is based on the assumption proposed by Ebbesen et al.<sup>50</sup> that the coupling of light with

---

<sup>a</sup> L'information supplémentaire de ce chapitre se trouve à la section 2.7.

the SPPs occurs when grating coupling conditions match the wavevector of the SPPs. Odom and Bartlett applied this model to evaluate the influence of incident angles on the resonance wavelength of the plasmon of nanohole arrays.<sup>161-162</sup> Additionally, it was recently applied for evaluating the plasmonic properties of nano-mouth arrays<sup>163</sup> and nanocube arrays.<sup>164</sup> This grating coupling model for nanohole arrays, however, does not take into account factors such as metal thickness, hole diameter and shape, surface roughness, and field distribution, and it does not predict the intensity of transmitted light at all wavelengths. However, we know from experimental reports in the literature that the hole diameter has little influence on the resonance wavelength of nanohole arrays.<sup>71</sup> Small shifts of 10–20 nm are observed with small holes. Equation (2.1) becomes extremely predictive in the case of large hole diameters, as only the absorption of the SPP excitation dictates the plasmon wavelength. Nakamoto et al. showed that the metal thickness does not significantly change the resonance wavelength of the metal-solution plasmon band.<sup>62</sup> In contrast to this enhanced transmission, optically thin films show significantly suppressed transmission.<sup>165-167</sup> Surface roughness will have a strong effect on the bandwidth of the plasmon band,<sup>168</sup> but does not change the resonance wavelength. Currently, we can rely on FDTD simulations as a complement to this grating coupling model as a method of bridging the gap between the theoretical and actual properties of nanohole arrays. Thus, the introduction of rotation symmetry provides an important step forward in understanding the optical properties of this popular plasmonic structure.

The influence of grating coupling conditions has thus been investigated to study the fundamental properties of surface plasmons on 2D metallic crystals. Plasmon filtering has been recently proposed using nanohole arrays of different period and diameter to tune the transmission wavelength<sup>158</sup>. By modifying the orientation of the crystal and the light field, co-excitation (narrow bandwidth) could be accurately switched with degeneration (large bandwidths) in numerous plasmon modes, to actively tune bandpass wavelength and bandwidth.

Achieving high sensitivity is a common challenge in plasmonics. Sensitivity is usually studied by changing the physical dimensions of a plasmonic substrate, a time-consuming and difficult approach. Understanding the plasmonic properties under different excitation conditions is critical for many applications that may require enhanced sensitivity, high local field or broadband excitation. It is well known in surface-enhanced spectroscopies that near-field



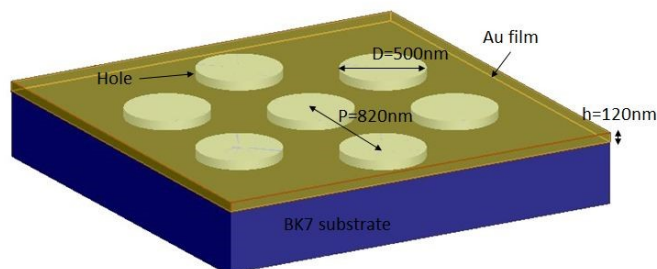
distribution is critical to control the magnitude enhancement observed on plasmonic structures<sup>169</sup>. To achieve optimal sensing conditions, one must tune the plasmon wavelength to the excitation laser for surface-enhanced spectroscopies<sup>133</sup> and reduce the field penetration depth for highly sensitive plasmonic sensing<sup>42</sup>. The orientation of the crystal and the light field also changes the distribution of the plasmon energy on the nanostructure in surprising ways. We demonstrate enhanced SERS and plasmonic biosensing with the precise control of the excitation wavelength and tunable field penetration depth by changing the incident angle. Nanohole arrays recently attracted attention as a substrate for SERS.<sup>59-60, 80, 157, 170-171</sup>

We demonstrate enhanced SERS and plasmonic biosensing with the precise control of the resonance wavelength and tuneable field penetration depth by changing the incident angle. These grating coupling conditions enable simple optimization to achieve higher sensitivity.

## 2.3 Materials and Methods

### 2.3.1 Fabrication and characterization of the sensors

Nanohole arrays substrates were fabricated by modified nanosphere lithography as previously described<sup>48</sup> and summarized in section 2.7. Unless otherwise stated, the nanohole arrays were made of 120 nm thick gold, with 820 nm periodicity and 500 nm hole diameter as shown in figure 2.1. The physical dimensions of the nanohole arrays were confirmed by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM).



**Figure 2.1** Schematic representation of a gold nanohole arrays.

### 2.3.2 Optical measurements

Nanohole arrays were excited in transmission spectroscopy using a homemade fluidic cell and a halogen lamp. The nanohole arrays with a periodicity of 820 nm were analyzed with a portable spectrophotometer (Ocean Optics) covering a wavelength range of 550 to 1000 nm. For a periodicity of 1000 nm, spectra were collected with a PI-Acton spectrophotometer equipped with a grating of 150 grooves mm<sup>-1</sup> (set from 415 to 975 nm) and a CCD camera (Andor model DU401A-BR-DD-152). Data were acquired by collecting an average of 10 spectra at an acquisition rate of 10 Hz. The transmission signal of a 50 nm Au continuous film was used as a reference spectrum. Measurements at various incident angles were performed with a manual goniometer having a precision of 1°. Light transmitted through the samples was aligned relative to the center of the goniometer. The fluidic cell allows an incident angle range in air of 0° to a maximum of 50° (which translate to 0° to 30° at the glass-gold interface). Incident angle values are corrected due to refraction of light with BK7 ( $n = 1.517$ ) glass before interaction with metallic grating. The bulk refractive index sensitivity of the sensors was determined with aqueous sucrose solutions covering a range of 1.33-1.36 RIU. The materials and methods involving the layer by layer polyelectrolyte deposition technique and biosensing of IgG were already reported elsewhere<sup>48</sup>. The IgG biodetection was performed with a SAM of 16-MHA for the 820 nm periodicity and 3-MPA-HHHDD-OH peptide for the 1000 nm periodicity, using a protocole described elsewhere<sup>125</sup>.

### 2.3.3 SERS

A 4-nitrobenzenethiol (4-NBT) monolayer was formed on the gold nanohole arrays by immersing the samples overnight in a 10 mM solution of 4-NBT in DMF. Samples were then rinsed with water and dried with nitrogen. Samples were positioned at the center of the rotation axis of a motorized goniometer allowing variations of incident angle as precise as 0.01°. The laser and the Raman probe were positioned on the  $\theta$  arm of a  $\theta - 2\theta$  stage while the gold nanohole array was rotated with 1° increment from  $\theta = -20^\circ$  to  $20^\circ$ ,  $\theta = 0^\circ$  being perpendicular to the

probe. The Raman spectra were acquired with a portable Raman spectrometer (B&W Tek). The excitation laser at 785 nm was set at 20% power which corresponds to 34 mW. The spot has a diameter of 85  $\mu\text{m}$ , thus providing a power of approximately 150 W/cm<sup>2</sup>. The signal intensity of the 4-NBT band at 1350 cm<sup>-1</sup> was measured for each angle and is the result of an accumulation of 100 spectra at a collection rate of 1 Hz.

Spherical gold nanoparticles (AuNP – 75  $\pm$  5 nm diameter, 4.66 x 10<sup>9</sup> particles/mL) were synthesized by Turkevitch method<sup>172</sup>. Then, 1 mL of the AuNPs suspension was stirred for 16 h with 10  $\mu\text{L}$  of a 2.5 mM solution of 5,5'-dithiobis(succinimidyl-2-nitrobenzoate) (DSNB) in acetonitrile. DSNB was synthesized from 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DNBA) and EDC:NHS<sup>173</sup>. The reporter-labeled colloids were isolated by centrifugation at 10,000 g for 10 min. The clear supernatant was discarded, and the AuNPs were suspended in 1 mL of phosphate buffer (2,0 mM, pH 9). AuNPs were reacted with 35  $\mu\text{g}$  of human anti-IgG antibody (AI) for 16 h, followed by exposure for 16 h to 100  $\mu\text{L}$  of 2.5% BSA to block nonspecific binding sites. The suspension was then centrifuged, the clear supernatant removed, and the AuNP were suspended in 1.0 mL of 2.0 mM borate buffer (pH 9) containing 1% BSA. The centrifugation and suspension process was repeated two additional times, and the particles were subsequently suspended in 0.5 mL of 2.0 mM phosphate buffer containing 1% BSA<sup>174</sup>. SERS measurements were acquired at different incidence angle as detailed above, for the strongest Raman peak of DSNB at 1330 cm<sup>-1</sup> with a laser power of 85 mW.

### 2.3.4 FDTD

The finite difference time domain (FDTD) method<sup>175</sup> with Lumerical FDTD Solution was employed for the modeling and simulation in this paper. We used a single unit cell in the calculation. The grid size in the x, y and z directions were 4 x 4 x 4 nm respectively. The periodic boundary condition was set in x and y direction and a perfectly matched layer was used in  $\pm z$  direction under normal incidence. For oblique incident angle, Bloch boundary conditions in x and y direction were used. All simulation results have been normalized to the incident light power. The gold film was supported on a BK7 glass (n=1.513) substrate. A Drude–Lorentz model (equation 2.2) defined the frequency-dependent permittivity  $\epsilon_m$  of Au<sup>176</sup>.

$$\varepsilon_m(\omega) = \varepsilon_r - \frac{\omega_{p0}^2}{\omega(\omega + i\gamma_0)} - \frac{\Delta\varepsilon_0 \Omega_0^2}{\omega^2 - \Omega_0^2 + i\omega\Gamma_0} \quad (2.2)$$

where  $\varepsilon_r = 5.967$ ,  $\omega_{p0} = 1.326 \times 10^{16}$  rad/s,  $\gamma_0 = 9.874 \times 10^{13}$  rad/s,  $\Delta\varepsilon_0 = 1.090$ ,  $\Omega_0 = 4.077 \times 10^{15}$  rad/s,  $\Gamma_0 = 6.578 \times 10^{14}$  rad/s.

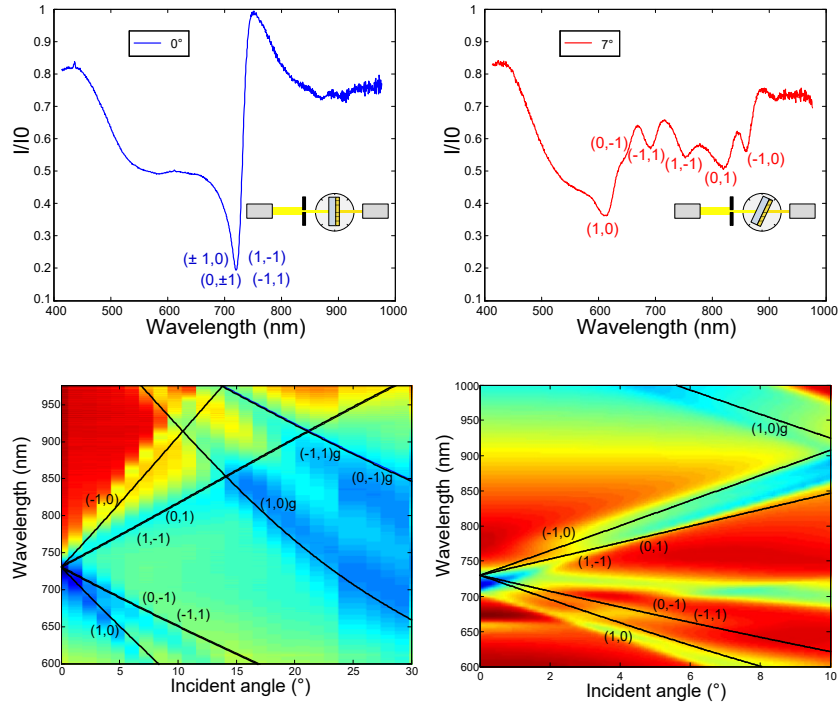
## 2.4 Results and discussion

### 2.4.1 Tunable plasmonic properties

Extraordinary optical transmission (EOT) occurs when light impinges through a metallic nanohole array resulting in an intensity enhancement of the transmitted light beyond the predicted intensity from Bethe's law<sup>50</sup>. To further understand the optical properties of 2D plasmonic crystals, FDTD simulations revealed that grating coupling conditions are not influenced by the thickness of the metal film, while the transmission intensity changes significantly for different hole diameter (**Figure 2.S2a**). Nanoholes with small diameters exhibit EOT, while larger nanoholes support grating coupled attenuated transmission (GCAT), at nearly the same wavelength as EOT (**Figure 2.S2b**). Thus, the optical properties of nanohole arrays can be tuned from transmission to absorption depending on the diameter of the nanohole.

GCAT is advantageous for sensing purposes, as the measured transmission is more intense by about 10-fold due to greater transmission of the larger holes, which improves signal-to-noise ratio of the detector, a contemporary limitation of the resolution for nanohole arrays-based sensors. Thus, we have selected an hexagonal array of nanoholes with a large diameter of 500 nm for a periodicity of 820 nm in 120 nm-thick gold film (**Figure 2.1**), which was previously found to maximizes refractive index sensitivity<sup>59</sup>. The large periodicity of this substrate promotes NIR excitation, due to high sensitivity of plasmonic sensors and transparent window of biofluids in this spectral region.

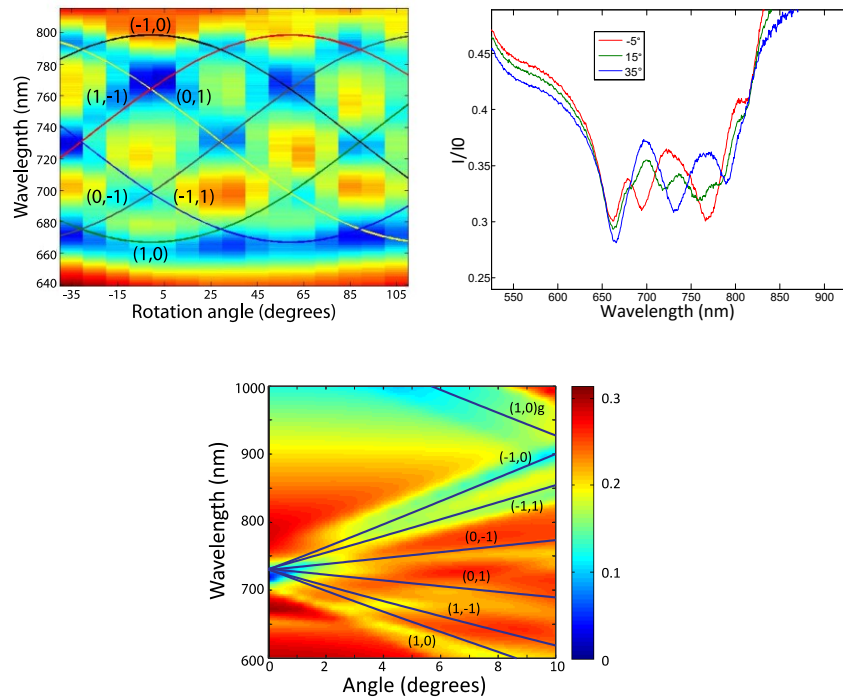
By simply tuning the incident angle, it is demonstrated that large spectral shifts can be obtained for various plasmonic bands of nanohole arrays. The excitation of the plasmonic grating was performed in transmission with light impinging via the glass side (**Figure 2.S3**), which further enhances the splitting of the plasmonic modes due to a higher refractive index and increases the spectral range of the nanohole arrays (see equation 2.1). As expected<sup>72, 177</sup>, the various SPP modes were co-excited at  $\lambda = 720$  nm for normal incidence ( $\theta=0^\circ$ ), while non-zero incident angles induced a splitting of the six modes of the nanohole arrays (**Figure 2.2** – Top panels). Predictions of the excitation wavelengths for each mode are in good agreement with experimental and FDTD values for the plasmon dispersion curves (**Figure 2.2** – Bottom panels), which is further exemplified with the (1,0) mode in water for 820 and 1000 nm periodicities (**Figure 2.S4**). The (0,1)/(1,-1) and (0,-1)/(-1,1) modes are still co-excited at non-zero incidence angle (rotation angle of  $0^\circ$ ), as these pairs of modes have the same orientation for a field aligned with the (1,0) mode.



**Figure 2.2** Influence of the incidence angle on the optical properties of nanohole arrays. Top Left: Transmission spectrum of nanohole arrays (820 nm periodicity, 500 nm hole diameter) at normal incidence. All six plasmon bands overlap in a single and narrow band. Top Right: Tilting the nanohole arrays to  $7^\circ$  leads to the splitting in 6 plasmon bands. Bottom: False color image of the plasmon dispersion curves for nanohole arrays ( $P = 820$  nm). Bottom Left: Experimental data collected with a broadband scanning angle transmission setup and Bottom Right: FDTD simulation for the same structure. The theoretical values according to equation 2.1 are shown for each plasmon mode (black lines). High and low transmittance are respectively coloured in red and blue.

The degenerescence of plasmonic modes occurring at non-zero incident angles<sup>50, 178-179</sup> can be further controlled by the azimuthal rotation of the nanohole arrays. By rotating the crystal azimuthally, we observed a broadband excitation of the plasmonic crystal, which was in excellent agreement with predictions (**Figure 2.3**). The  $60^\circ$  rotation symmetry of hexagonal arrays of nanoholes was clearly observed between 670 and 800 nm. The symmetry of the nanohole arrays (square or hexagonal arrays) influences the number of plasmonic bands excited in the crystal. In comparison, square arrays would only have 4 bands ( $90^\circ$  symmetry) leading to

more discontinuous excitation profiles, which could be detrimental in broadband plasmon filtering. The bandwidth of the excitation profile increases for greater incident angles (covering a range from 575 to 900 nm at  $10^\circ$ ), which can reach the IR regions at relatively small incident angles ( $10\text{-}20^\circ$ ). Thus, we report that precise control of the coloration and bandwidth of transmitted or absorbed light can simply be achieved by tuning the incident and rotation angles, an important concept for active plasmonic filtering.



**Figure 2.3** Influence of the azimuthal rotation angle on the optical properties of nanohole arrays. Top Left: Position of the BW-SPPs modes for a gold nanohole arrays of 820 nm periodicity excited in transmission with an incident angle of  $4^\circ$  for different azimuthal rotation angle. The predicted wavelength of the plasmonic modes is superposed to the experimental values for the (-1,0), (0,1), (1,-1), (-1,1), (0,-1), and (1,0) modes. The color scale ranges from red (high transmittance) to blue (low transmittance). Top Right: Transmission measurements of light with different azimuthal rotation angles. Four different bands are observed at  $-5^\circ$  (red),

while for azimuthal rotation angles of  $15^\circ$  (green) and  $35^\circ$  (blue), the degenerescence leads to respectively six and three plasmon bands. Bottom: The FDTD simulation at  $15^\circ$  (azimuthal rotation) for different incident angles shows the 6-fold degenerescence of the plasmon bands.

## 2.4.2 Biosensing

The azimuthal angle is important to optimize for applications of nanohole arrays. Contrary to the broadband excitation requirement of some photonic crystals applications, sensing applications and surface-enhanced spectroscopy applications are favoured with mode coupling and narrow plasmon resonances. Coupling of plasmonic modes occurs for each azimuthal rotation of  $30^\circ$ . Between these excitation angles, all six modes are splits and result in broadband excitation, lowering resolution of the signal measured in plasmonic sensing. The intensity of the plasmonic signal is 3-fold more intense when light couples into the (1,0) and (-1,1) modes for example. Thus, better signal-to-noise ratios are obtained for rotation angles of  $\phi = 60^\circ m + 30^\circ$  ( $m$  is an integer), and sensors shall be positioned in this orientation for optimal sensing.

In addition, sensing applications strongly depend on the bulk refractive index sensitivity and on the surface sensitivity of nanohole arrays. Plasmonic sensors are sensitive to refractive index variation of the dielectric surrounding the metal, which allows the possibility of biosensing analysis<sup>180</sup>. Typically plasmonic studies involve the optimization of the bulk refractive index sensitivity by tuning the shape of the metallic materials<sup>181-182</sup>. For nanohole arrays, the optimization of the bulk refractive index sensitivity is performed by varying the metallic composition<sup>71</sup>, hole diameter<sup>59</sup> and periodicity<sup>183</sup>. To our knowledge, only Pang's group<sup>72</sup> studied the effect of the incident angle on the bulk refractive index sensitivity using square arrays of nanoholes. While the azimuthal rotation does not seem to influence sensitivity (**Figure 2.S5-Left**), the experimental results indicate that increasing the incident angle for the (1,0) mode slightly decreases the solution sensitivity, as shown for both periodicities of 820 and 1000 nm (**Figure 2.S5-Right**). Also, the solution sensitivity is generally higher for nanohole arrays of greater periodicity, which is in correlation with theory<sup>72</sup>. While these results indicate the bulk properties of nanohole arrays can be improved, they do not indicate the field distribution

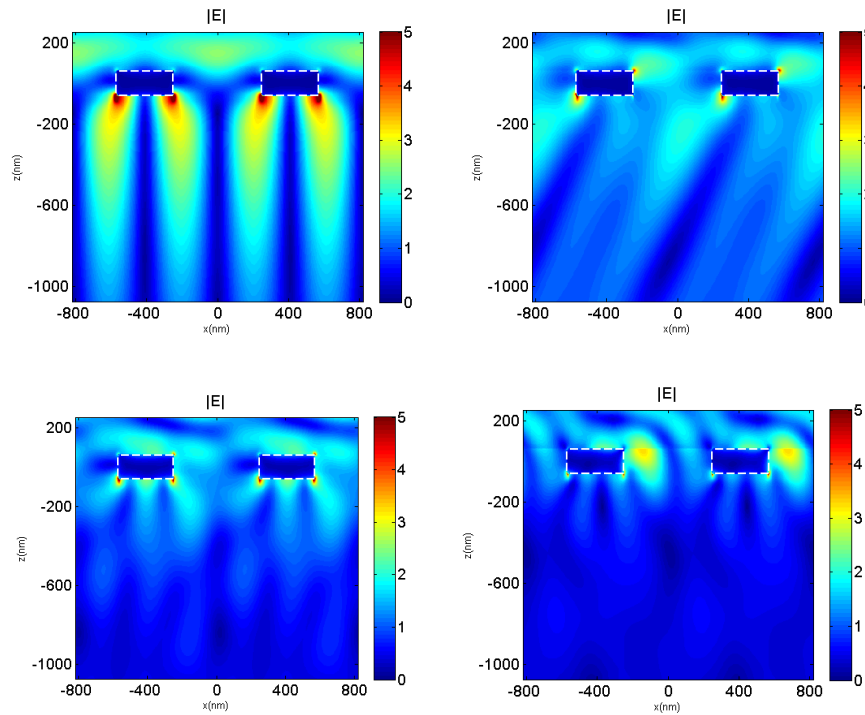


on the nanohole arrays, which is critical for sensing and surface-enhanced spectroscopy applications.

Plasmonic sensors are volume-confined due to the exponentially decaying field in the solution. Although bulk refractive index sensitivity is usually associated to the sensor response towards surface adsorption (surface sensitivity), the distance the field penetrates ( $l_d$ ) in the solution mainly drives the surface sensitivity<sup>106</sup> (equation 2.19). The direct relation of bulk sensitivity and signal measured in plasmonics has triggered the design of structures of extremely high bulk refractive index sensitivity. Such simple correlation does not imply the effect of the decay length of the plasmonic field, which is an equally (if not more) important parameter to consider when maximizing the response of plasmonic sensors. A short penetration depth compensates low bulk sensitivity of LSPR sensors<sup>42</sup>, such that an equivalent sensing performance is obtained with LSPR as for more (bulk) sensitive SPR with the Kretschmann configuration<sup>47</sup>. This example highlights the importance of controlling the penetration depth of plasmonic substrates.

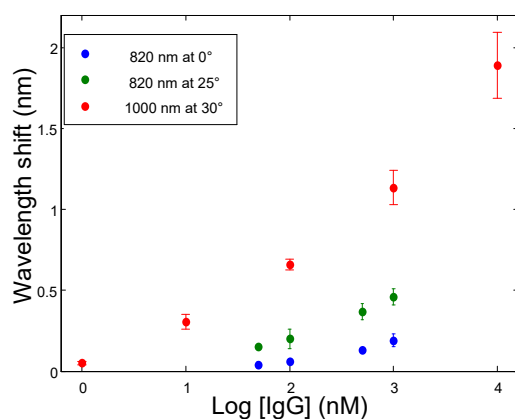
Penetration depth is almost exclusively controlled experimentally by the size<sup>184</sup> and geometry of nanostructures. It is also well known that excitation wavelength plays an important role in the penetration depth of propagating SP and higher incidence angles reduces the penetration depth of evanescent wave techniques. To verify the impact of grating coupling conditions on surface sensitivity, polyelectrolytes of known thickness were deposited on the nanohole arrays using a layer-by-layer (LBL) deposition<sup>185</sup>. The successive adhesion of poly(allylamine) hydrochloride (PAH) and poly(4-styrene sulfonate) (PSS) bilayers on the surface assesses the surface sensitivity of nanohole arrays of 820 and 1000 nm periodicities with increasing incident angle (**Figure 2.S6**). For both periodicities, we found that the sensor's response to bilayer adsorption was enhanced by a factor of 3 when the incident angle was increased from 0° to 25-30°. Since all experimental parameters are maintained constant, the increased sensitivity for PAH-PSS bilayer adsorption at high incident angle can be explained by a smaller decay length. To verify this hypothesis, the multilayer adsorption of polyelectrolytes was extended to fill the sensing field of the plasmonic structure. Thereby, the penetration depth was estimated at respectively 275, 225, 175 and 125 nm for incident angles of 0°, 13°, 19° and 25° (**Figure 2.S7**). The experimental estimation of the penetration depth was in good agreement

with FDTD simulation of the electric field intensity in the X-Z plane for incident angle from  $0^\circ$  to  $30^\circ$  (**Figure 2.4** - (1,0) mode). The decrease of the decay length with increase of the incident angle is the key parameter to explain the surface sensitivity enhancement of nanohole arrays for higher incident angles. This simple tuning of the decay length by adjusting the incident angle is advantageous to optimize biosensing with nanohole arrays. It enables the use of structures with larger periodicities and hole diameter that are simpler to mass-produce with conventional lithographic techniques. In addition, they present shorter penetration depth due to the higher incident angle required to access the NIR range optimal for biosensing.



**Figure 2.4** FDTD simulations of the field distribution in the X-Z plane (Cross section of the nanohole arrays) for incident angles of  $0^\circ$  (Top left),  $10^\circ$  (Top right),  $20^\circ$  (Bottom left), and  $30^\circ$  (Bottom right) at the plasmon resonance wavelength of 950, 784, 623, and 560 nm respectively. The region from  $Z = 60$  to 200 nm corresponds to the glass substrate, the dark blue squares centered at  $Z = 0$  nm are the metal mesh of nanohole arrays and the negative  $Z$  region is filled with water. The field penetration depth is clearly reduced with non-zero incident angles.

The possibility of tuning the decay length of the plasmonic field of nanohole arrays by adjusting the incident angle should lead to enhanced sensitivity in biosensing. While biodetection using BSA/anti-BSA model was reported with nanohole arrays excited at  $18^\circ$  from the normal<sup>159</sup>, we undertook to quantify the gain that biosensors should experience for increasing incident angles. We thus constructed a biosensor for human IgG by immobilizing anti-IgG to a 16-mercaptohexadecanoic acid monolayer formed on the nanohole arrays. As observed for polyelectrolytes, the plasmonic shift was improved by a factor 3 by increasing  $\theta$  from  $0^\circ$  to  $25^\circ$ , corresponding to a 3-fold reduction of the penetration depth (**Figure 2.5**).



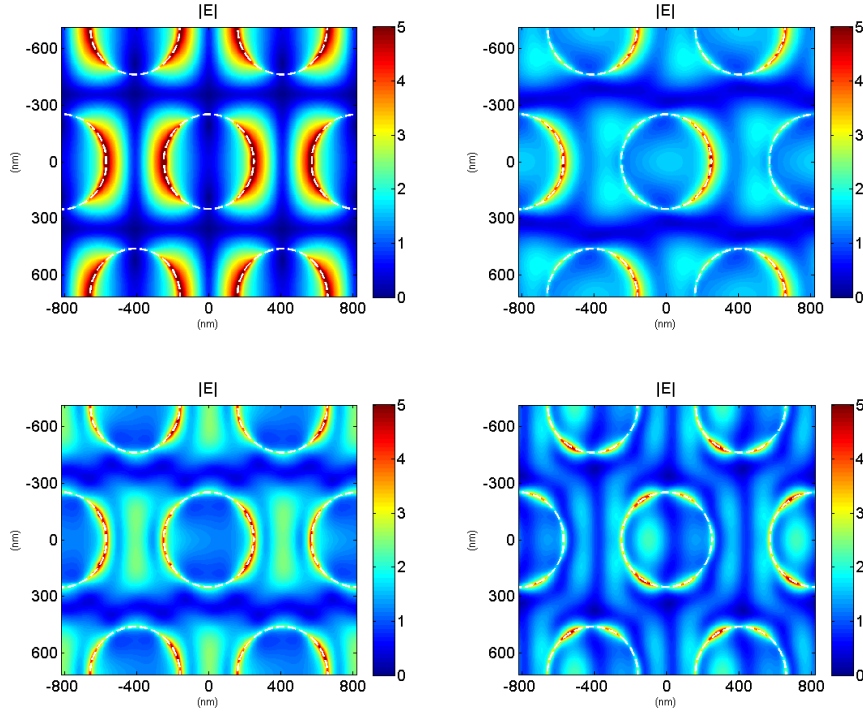
**Figure 2.5** Enhanced biosensing by adjusting the field penetration depth of nanohole arrays. IgG calibration curves at different excitation angle for nanohole arrays with a periodicity of 820 nm (blue  $\theta = 0^\circ$  and green  $\theta = 26^\circ$ ) and 1000 nm (red  $\theta = 30^\circ$ ).

While the IgG biosensor was barely able to detect IgG below 100 nM ( $\Delta\lambda = 0.06$  nm) for  $\theta = 0^\circ$ , the response measured was significantly better for  $\theta = 25^\circ$  ( $\Delta\lambda = 0.20$  nm), leading to a decrease in detection limit. In order to assess the maximal sensing capabilities, the biodetection of human IgG was performed with nanohole arrays of 1000 nm periodicity at an incident angle of  $30^\circ$  with an anti-IgG-modified peptide SAM (3-MPA-HHHDD-OH). This peptide monolayer was previously shown to decrease the nonspecific adsorption of biofluids leading to a higher selectivity SAM (PEG or 16-MHA)<sup>125</sup> and to improved detection limit for biosensors. By implementing these improvements, the IgG biosensor was able to detect human IgG with a limit of detection below 10 nM (**Figure 2.5**). This gain in sensitivity makes nanohole arrays almost

as sensitive as classical SPR instruments. A  $K_d$  of 250 nM was calculated with this sensor, which is near the value we determined in SPR (92 nM) and the detection limit was similar to SPR sensing in the Kretschmann configuration<sup>48</sup>. The high surface sensitivity of nanohole arrays with large incident angle and periodicity is very promising for the future development of biosensors.

### 2.4.3 Surface enhanced spectroscopies

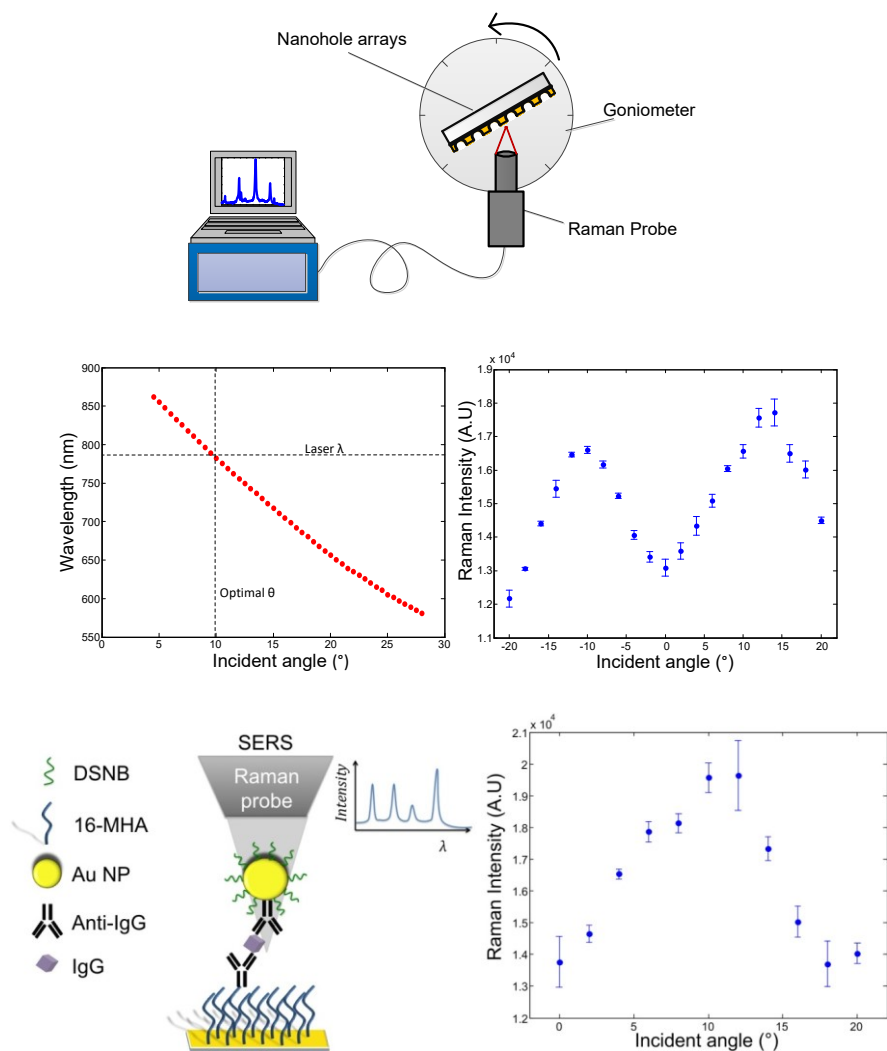
Coupling between the electromagnetic field of the plasmonic substrate and the Raman active molecule is the main contribution to the enhancement factor in surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)<sup>133</sup>. Thus, the 3D distribution of the electric field is of great importance for optimal SERS sensing. We performed FDTD simulations in the X-Y plane, which indicate that increasing the incident angle significantly modifies the distribution of the electric field at the resonant wavelength for each incident angle (**Figure 2.6**). As previously reported<sup>157</sup>, the field describes a donut-shape on the rim of the nanohole for  $\theta = 0^\circ$ .



**Figure 2.6** FDTD simulations of the electric field intensity distribution for the X-Y plane of gold nanohole arrays of 820 nm periodicity in water. The incident angles were: Top Left:  $\theta = 0^\circ$  ( $\lambda = 950$  nm), Top right:  $\theta = 10^\circ$  ( $\lambda = 784$  nm), Bottom Left:  $\theta = 20^\circ$  ( $\lambda = 623$  nm) and Bottom Right:  $\theta = 30^\circ$  ( $\lambda = 560$  nm). The field distribution was simulated at the peak resonance wavelength for the (1,0) band. The field distribution changes from a relatively delocalized field around the rim of the nanoholes to a quasi-quadrupolar mode at large incidence angle.

However, the field becomes asymmetric around the rim of the nanohole for small incident angles ( $\theta = 10^\circ$ ), due to momentum transfer preferentially to the opposite side of the nanohole, resulting in this asymmetric field. Coupling between neighbouring holes occurs at  $\theta = 20^\circ$ , seen from the relatively strong field between holes and a resonance on the opposite side of the hole. Interestingly, the fields distributes in a quadrupolar mode around the nanohole at  $\theta = 30^\circ$ , again due to the propagative coupling (**Figure 2.6**). In addition, a non-negligible part of the field is located inside the hole, which was also observed for the X-Z field distribution at  $\theta = 30^\circ$  (Figure 2.3). The change of the distribution of the electric field in the X-Y plane with incidence angle has major implications for fundamental understanding of the SERS phenomenon. Typical

experiments are achieved with a Raman microscope, signifying that high numerical aperture objectives (often used in Raman experiments) will impact the electric field distribution and excitation wavelength of the plasmonic bands of the nanohole arrays. The role of the incidence angle on SERS measurements was exemplified with a 4-nitrobenzenethiol monolayer. The SERS intensity increased to a maximum for incident angles near  $\pm 10^\circ$ , leading to optimal experimental conditions for SERS with this plasmonic substrate (**Figure 2.7**). As expected<sup>186</sup>, the highest SERS intensity was obtained by coupling the (1,0) plasmon resonance to the 785 nm Raman laser (**Figure 2.7**). Thus, the tuning of the plasmonic properties of the (1,0) BW-SPPs, due to incident angle adjustment, is directly responsible of the observed enhancement of the SERS signal. The azimuthal rotation angle was varied with little effect on the SERS intensity, as the Raman laser always excites a SP resonance due to the broadband plasmonic properties in these conditions. The precise tuning of the plasmonic bands with incident angle ensures optimal SERS excitation for any laser, nanohole substrate, dielectric medium and molecular adsorbate combination by tuning the grating coupling conditions to match the plasmon resonance to the Raman laser.



**Figure 2.7** Influence of the incidence angle on the SERS properties of nanohole arrays. Top: Experimental setup for the Raman measurement at different incidence angles. Center Left: Experimental plasmon resonance in air of the nanohole arrays of 1000 nm periodicity. Center Right: Raman intensity for a nanohole array of 1000 nm periodicity depending on the incident angle ( $-20^{\circ}$  to  $20^{\circ}$ ). 4-nitrobenzenethiol was monitored with the band at  $1350\text{ cm}^{-1}$ . Bottom left: Depiction of the sandwich SERS bioassay for IgG. Bottom right: Enhanced SERS response by tuning the incident angle to the plasmon band of the nanoparticle-nanohole array dimer.

Also, the ability to tune the plasmon resonance energy of the substrate is useful for optimal SERS biosensing. We have thus repeated the IgG detection experiment with a secondary antibody labelled with a Au NP – Raman reporter conjugate (**Figure 2.7**). Once again, the Raman intensity reached a maximum value for the incident angle near  $\pm 12^\circ$ , which promoted coupling of the laser with the plasmon energy of the nanohole arrays. The incident angle for maximal SERS is shifted by a couple degrees in comparison to the 4-NBT experiment due to plasmon coupling between the AuNP and the nanohole arrays further shifting the plasmon resonance to NIR. Thus, a larger angle is required to tune the plasmon resonance to the laser. We observed an improvement of 50% of the Raman intensity and very small errors on the triplicate measurements. Thus, tuning the grating coupling conditions of nanohole arrays leads to further enhancement and optimal coupling of the Raman laser.

## 2.5 Conclusions

Nanohole arrays exhibit multiple plasmonic bands when excited at non-zero incidence and azimuthal angles, while this plasmonic crystal had a narrow bandpass at zero incidence angle. The plasmon resonances were shifted by hundreds of nanometers and cover twice that spectral range by tuning the grating coupling conditions of the plasmonic crystal, which paves the way to the design of broadband plasmonic structures for photovoltaic, tuneable optical filters and for spectroelectrochemistry. In addition, increasing the incident angle significantly reduced the electric field penetration depth in the dielectric medium, essential to improve surface-enhanced spectroscopies and sensing applications of plasmonic crystals. Lower detection limits were achieved with SPR and SERS biosensors by increasing the periodicity and incident angle to monitor the plasmon resonance in the Vis-NIR range, where the optical components perform at their best to achieve high signal-to-noise and the sensor exhibit the shortest penetration depth. The 2D plasmonic crystal equation, the FDTD simulations and the experimental data were in excellent agreement to support these conclusions of importance in photonic applications of plasmonic crystals.



## 2.6 Acknowledgements

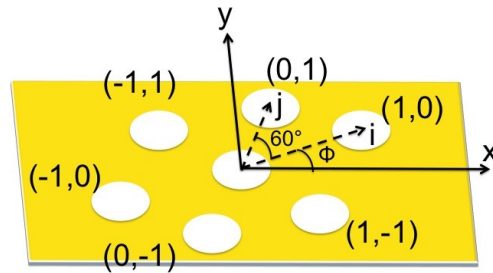
The authors would like to acknowledge Prof. Antonella Badia, Prof. William Lubell, and Prof. Richard Martel of Université de Montréal. We recognize the financial support from the Canadian Foundation for Innovation (CFI - Leaders), the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC – Discovery Grant), Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), the Centre for self-assembled chemical structures (CSACS), Institut Mérieux, the Université de Montréal, and the National Science Foundation of China (NSFC-61137005).

## 2.7 Supporting information

### 2.7.1 Derivation of the SPP equation for nanohole arrays

$$k_{spp} = k_{light}; \quad \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} = |n_D k_0 \sin \theta + iG_x + jG_y + lG_z| \quad (2.3)$$

here  $\omega$  is the angular frequency,  $c$  the speed of light,  $\epsilon_d$  and  $\epsilon_m$  are the real dielectric constants of the dielectric and the metal respectively,  $n_D$  is the refractive index of the medium in which light propagates,  $G_x$ ,  $G_y$  and  $G_z$  corresponds to Bragg vectors, and  $k_0$  the momentum of free-space light at a specific angle of incidence ( $\theta$ ). BW-SPPs modes are characterized by the integers  $i$ ,  $j$  and  $l$  representing the orders of diffraction that couple with the incident light.



**Figure 2.S1** Schematic representation of the BW-SPPs modes and azimuthal angle ( $\phi$ ).

**Wavevector matching conditions for excitation of the SPP for nanohole arrays:**

$$k_{spp} = k_o n_D \sin \theta (x + y) + i G_x + j G_y \quad (2.4)$$

$$k_{spp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (2.5)$$

$$k_o = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.6)$$

Where x and y are the projection of the modes (i,j) in the x and y axis (see figure 2.S1).

**The projection of the (i,j) mode is:**

For hexagonal arrays of nanoholes:

$$x = i \cos(\phi) + j \cos(\phi + 60) \quad (2.7)$$

$$y = i \sin(\phi) + j \sin(\phi + 60) \quad (2.8)$$

For square arrays of nanoholes:

$$x = i \cos(\phi) + j \cos(\phi + 90) \quad (2.9)$$

$$y = i \sin(\phi) + j \sin(\phi + 90) \quad (2.10)$$

**The Bragg vectors are:**

For hexagonal arrays of nanoholes:

$$G = \frac{4\pi}{\sqrt{3} P} \quad (2.11)$$

For square arrays of nanoholes:

$$G = \frac{2\pi}{P} \quad (2.12)$$

Rearranging equations 3-12

**Thus, at normal incidence and with no azimuthal rotation of the sample, we get the original equation of nanohole arrays:**

For hexagonal arrays of nanoholes:

$$\lambda = \frac{P}{\sqrt{\frac{4}{3}(i^2 + ij + j^2)}} \left( \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right) \quad (2.13)$$

For square arrays of nanoholes:

$$\lambda = \frac{P}{\sqrt{(i^2 + j^2)}} \left( \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right) \quad (2.14)$$

**Then, with non-zero incident angle, but with no consideration of the rotation of the sample (aligned with the (1,0) mode):**

For hexagonal arrays of nanoholes:

$$\lambda = \frac{P}{\sqrt{\frac{4}{3}(i^2 + ij + j^2)}} \left( \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} - \eta_D \sin\theta \right) \quad (2.15)$$

For square arrays of nanoholes:

$$\lambda = \frac{P}{\sqrt{(i^2 + j^2)}} \left( \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} - \eta_D \sin\theta \right) \quad (2.16)$$

**With non-zero incident angle and rotation of the sample:**

For hexagonal arrays of nanoholes:

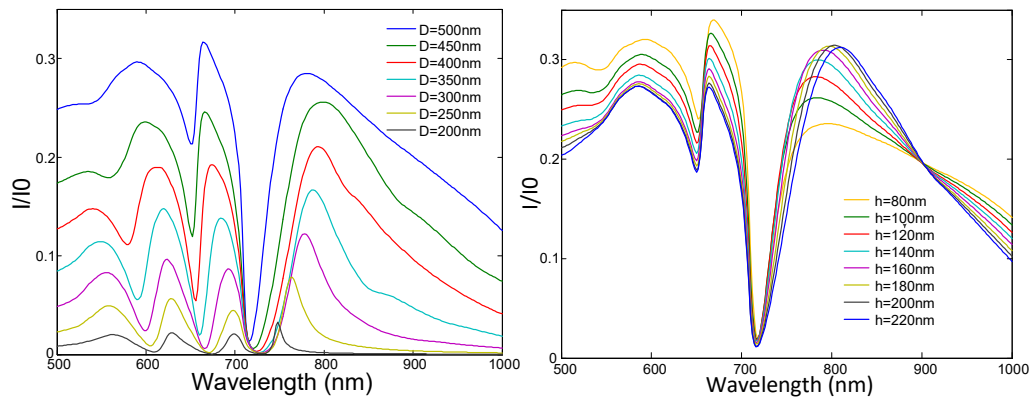
$$\lambda = \left( \frac{P}{\sqrt{\frac{4}{3}(i^2 + ij + j^2)}} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} - \frac{P}{\sqrt{\frac{4}{3}(i^2 + ij + j^2)}} \eta_D \sin\theta (i \cos(\phi) + j \cos(\phi + 60) + i \sin(\phi) + j \sin(\phi + 60)) \right) \quad (2.17)$$

For square arrays of nanoholes:

$$\lambda = \left( \frac{P}{\sqrt{(i^2 + j^2)}} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} - \frac{P}{\sqrt{(i^2 + j^2)}} \eta_D \sin\theta (i \cos(\phi) + j \cos(\phi + 90) + i \sin(\phi) + j \sin(\phi + 90)) \right) \quad (2.18)$$

where all angles are reported in degrees,  $\lambda$  is the excitation wavelength and  $P$  is the periodicity.

## 2.7.2 FDTD simulation of the hole diameter and metal thickness : impacts on the plasmonic signal

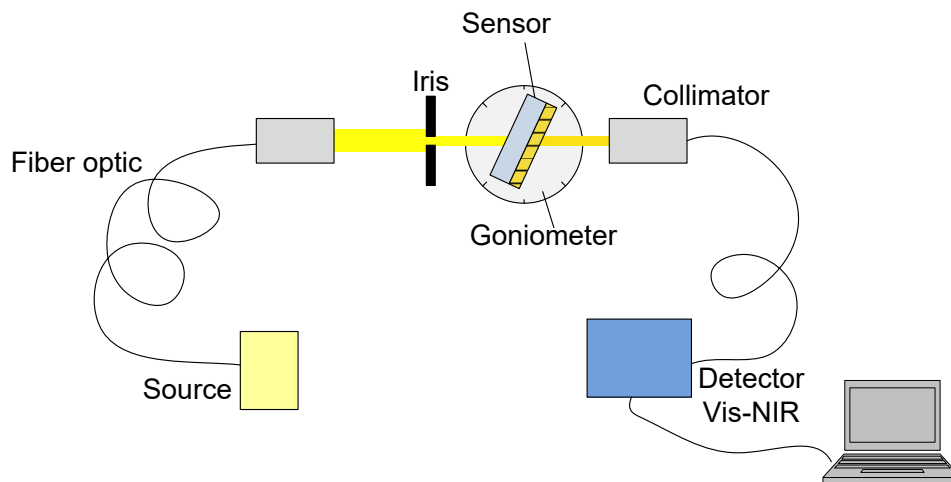


**Figure 2.S2** FDTD simulation of the GCAT signal of gold nanohole arrays of 820 nm periodicity. a) Gold thickness of 120 nm for different hole diameter (D). b) Hole diameter of 500 nm for different thicknesses of Au (h).

Figure 2.S2 exposes the influence of the variation of thickness and hole diameter on the grating coupling condition at normal incidence. The GCAT signal intensity of the (1,0) mode in air weakly increases for thicker gold thicknesses. However, the augmentation of the hole diameter has an high impact on the transmission intensity of light through the hole arrays. An enhanced optical transmission was observed with small diameters of the nanoholes. With larger diameters of nanoholes, the optical properties differ greatly and the nanoholes are then mainly absorptive. Thus, figure 2.S2 exposes the transition from an EOT to GTAC phenomenon with larger hole diameters.

### 2.7.3 Experimental details about the fabrication of gold nanohole arrays and the optical measurements

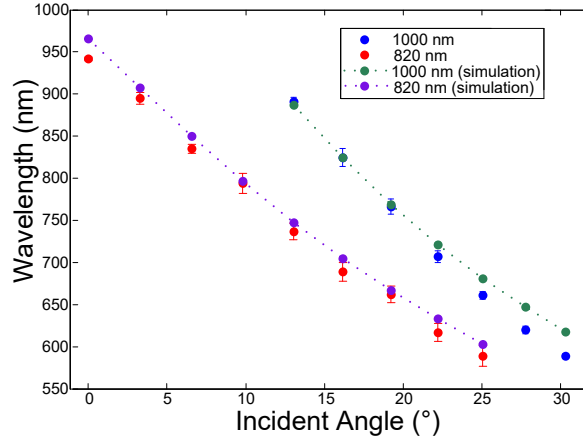
Gold nanohole arrays (**Figure 2.1**) were produced by a nanosphere lithography technique involving the formation of a polymer mask on a glass slides by drop-coating a solution of nanospheres with fixed diameter. Glass sides (22x22 mm<sup>2</sup>, BK7, Fisher Scientific) were successively cleaned in piranha solution for 90 minutes and in a mixture of water, ammonia and hydrogen peroxide at a 5:1:1 ratio for 60 minutes in an ultrasonication bath. The glass slides were copiously rinsed with water between treatments and stored in ultrapure water. The polymer mask was formed by drop-coating a solution of polystyrene nanospheres (Thermo scientific particle technology) mixed with pure water (18 M $\Omega$  cm) on a clean dry glass slides. The drop-coating solution had a 5:1 ratio of water/spheres for both 820 nm and 1000 nm beads. 40  $\mu$ L of the final nanospheres solution was dropped on the glass slide, evenly distributed on the surface and covered with a Petri dish until drying completion. The nanosphere lithography mask results in a hexagonal closed-packed monolayer having about 1x1 cm<sup>2</sup> of patterned area. Both periodicities of 820 nm or 1000 nm were treated by reactive ion etching using oxygen plasma (Harrick Plasma Cleaner PDC-32 G) at 18 W to a final sphere diameter of about 400-500 nm and 500-600 nm respectively. Thereafter, the polystyrene mask was metallized by sputtering 140 nm of Au with a 1 nm Cr adhesion layer (Cressington 308R sputter) for both periodicities. Subsequently, the polystyrene beads were removed by sonication in ethanol for 4 min, resulting in a gold nanoholes array. The optical properties were measured in transmission spectroscopy (**Figure 2.S3**).



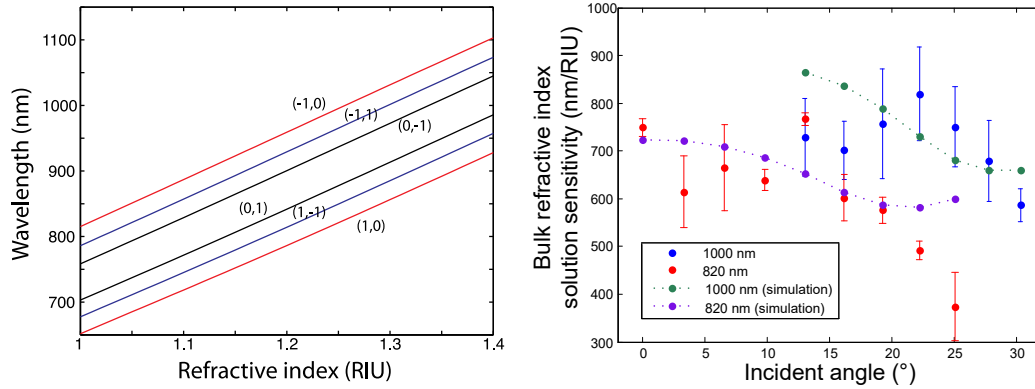
**Figure 2.S3** Scanning angle-rotation transmission instrument. The sample (sensor) is placed on a 360 degrees rotation mount, which is fixed to a 360 degrees goniometer. A flow cell (without the azimuthal rotation capabilities) was designed with wide apertures to allow large incident angles to be investigated.

### 2.7.4 Plasmon resonance energy with incident angle and periodicity

The effect of the incident angle on the (1,0) mode of BW-SPPs mode provides intense GCAT signal covering a broad range of vis-NIR wavelengths depending on the incident angle and the periodicity of the arrays (**Figure 2.S4**). The (1,0) mode was studied for periodicities of 820 and 1000 nm with sensors of diameter/periodicity ratio ( $d/P$ ) of 0.6 and 130 nm thickness. As expected from equation 2.1 of the main article, the position of the (1,0) Au-solution mode and the incident angle exhibit a direct relation for both periodicities of 820 and 1000 nm (**Figure 2.S4**). Theoretical and experimental values in water for both periodicities are in good agreement with predictions, which is confirmed by their RSD values below 2%. Small variations between predicted and experimental values is due to the precision ( $\pm 1^\circ$ ) of the goniometer which is manually adjusted during experiment and small deviation of the mathematical model for the dielectric constant of Au between 550 and 650 nm due to absence of data in this range in the literature (Palik E., Handbook of optical constants of solids, Academic Press). In addition, it is expected that the actual plasmon resonance to be blue-shifted due to the existence of real holes in the metal film.



**Figure 2.S4** Experimental and simulated (dotted) plasmon resonances of the (1,0) mode in water for gold nanohole arrays of 820 and 1000 nm of periodicity for different incident angle.



**Figure 2.S5** Left: Simulated calibration curve at  $5^\circ$  incident angle and  $10^\circ$  azimuthal rotation angle. All modes exhibit the same sensitivity for this spectral range. Right: Experimental and theoretical (dotted) bulk refractive index sensitivity of the (1,0) mode for gold nanohole arrays of 820 (red circle) and 1000 nm (blue circle) periodicity for different incident angles.

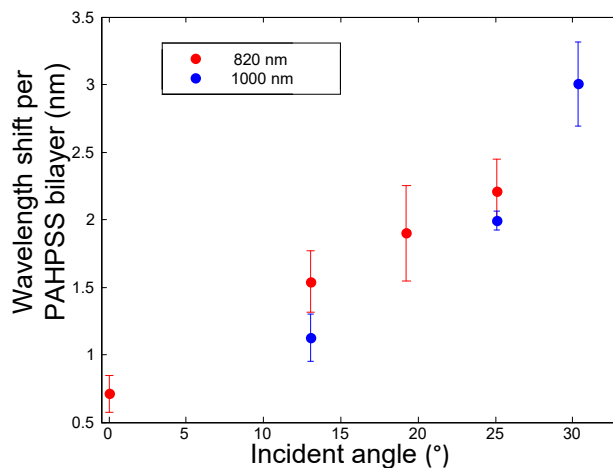
## 2.7.5 Assessing the surface sensitivity and penetration depth

While bulk refractive index sensitivity ( $s$ ) is associated to the sensor response towards surface adsorption (surface sensitivity), the distance the field penetrates ( $l_d$ ) in the solution mainly drives the surface sensitivity<sup>106</sup>.

$$\Delta\lambda = s\Delta n \left[ 1 - \exp\left(\frac{-2d}{l_d}\right) \right] \quad (2.19)$$

where  $\Delta\lambda$  is the transducer response,  $\Delta n$  is the refractive index difference between the medium and the adsorbate layer of thickness  $d$ .

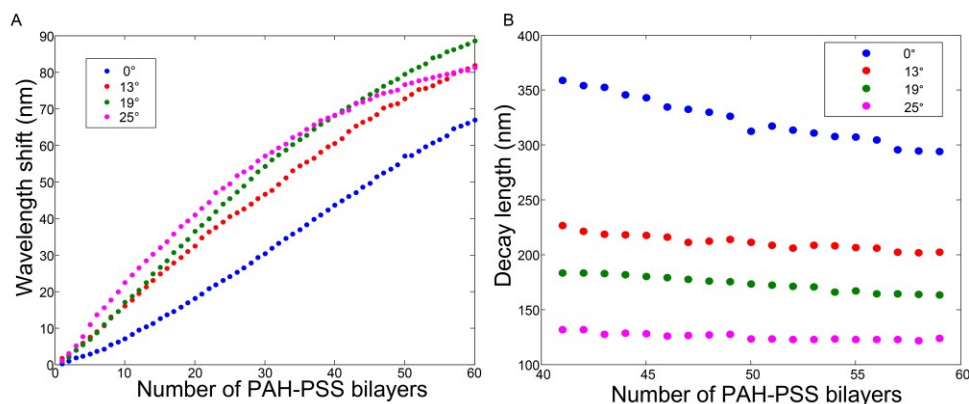
The LBL method exploits the adhesion of positively charged polyelectrolyte (PAH) on a negatively charged surface followed by the adhesion of a negatively charged polyelectrolyte (PSS) due to electrostatic interactions<sup>187</sup>. Successive adhesions of bilayers of polyelectrolytes grows thicker in a linear fashion<sup>188-189</sup> on a gold template<sup>190</sup> allowing the formation of a spacer<sup>191</sup> with controlled thickness. This LBL technique is well known to be simple, inexpensive and repeatable<sup>192</sup>. The plasmonic response associated to the adhesion of polyelectrolytes bilayers is a relevant method to probe the surface sensitivity. Figure 2.S6 present the average plasmonic shift associated to the adhesion of polymer bilayers ( $n=5$ ) for increasing incident angle.



**Figure 2.S6** Plasmonic wavelength shift of gold nanohole arrays of 820 nm (red) and 1000 nm of periodicity for the adhesion of a PAH/PSS bilayer for different incident angle.



With large thicknesses of adsorbed bilayers, the plasmonic wavelength shift should plateau due to filling of the plasmon field with polymer. Such experiment was performed for nanohole arrays of 820 nm periodicity for the (1,0) mode at incident angles of  $0^\circ$ ,  $13^\circ$ ,  $19^\circ$  and  $25^\circ$  (**Figure 2.S7a**). For larger incidence angles, we observed a linear region of the plasmonic shift followed by the plateau when adsorbing 30-40 bilayers. For smaller incidence angles, the number of polyelectrolyte bilayers was larger before reaching the plateau, indicating a larger sensing volume. The decay length associated to each incident angle can be estimated using equation 2.19 (**Figure 2.S7b**). By analyzing the change of the plasmonic response of the nanohole arrays with increasing polyelectrolyte deposition, it was clearly observed that the decay length was decreasing for larger incident angle. It is important to note that such model used to determine the penetration depth gives approximate results. Indeed, the calculated value is dependent of the bulk refractive index sensitivity and the thickness of a bilayer upon multiple successive adsorption steps. In our case, we consider these parameters remain constant through the growth of the polymer film.

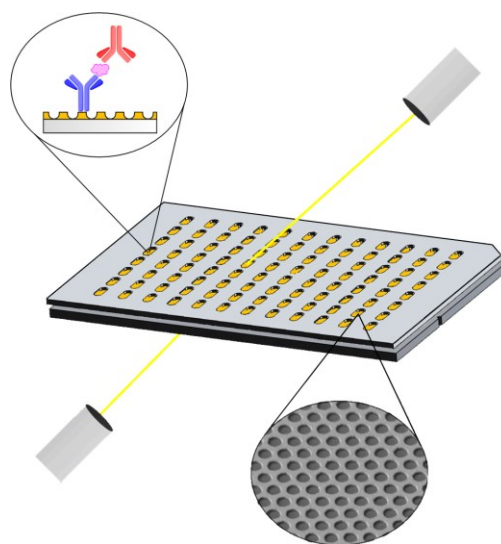


**Figure 2.S7** a) Plasmonic wavelength shift of gold nanohole arrays of 820 nm of periodicity upon successive adsorption of 60 PAH-PSS bilayer to assess the decay length for different incident angle of  $0^\circ$  (blue),  $13^\circ$  (red),  $19^\circ$  (green) and  $25^\circ$  (pink). b) Calculated decay length for the corresponding incident angle.

## Chapitre 3: 96-Well Plasmonic Sensing with Nanohole Arrays

Une version de ce chapitre est déjà publiée avec la citation :

Maxime Couture, Korak Ray Kumar, Hugo-Pierre Poirier-Richard, Anthony Crofton and Jean-François Masson, *ACS Sensors* **2016**, 1, 287-294



Je fus responsable de l'ensemble des manipulations faites en laboratoire et des traitements de données. J'ai développé le protocole de microfabrication des réseaux de nanotrous par photolithographie. Jean-François Masson et moi avons élaboré les protocoles expérimentaux et j'ai rédigé les premières versions de l'article. Korak Ray Kumar a conçu le programme informatique permettant d'accélérer le traitement de données. Hugo-Pierre Poirier-Richard a contribué au design de la plaque multipuits et du lecteur multipuits. Anthony Crofton a fabriqué le lecteur multipuits et modifié le programme du robot afin de coupler le système avec une caméra CCD.

### 3.1 Abstract

A multi-well plasmonic reader was designed and validated for higher throughput analysis of biological interactions with a platform of the same size as standard 96-well plates. While the plasmonic sensor can be read with standard 96-well plate readers, a custom 96-well plate reader was designed to analyze nanohole arrays at high incident angles required for higher sensitivity. Gold nanohole arrays were manufactured on a 4 inch glass wafer using a photolithographic process. In comparison to single channel measurements with nanohole arrays fabricated with nanosphere lithography, the nanohole array sensors greatly enhanced the signal to noise ratio of the plasmonic signal and precision of the measurements with the multi-well plate system. As proof of concept, the detection of IgG in the low nanomolar range was achieved with the multi-well plate reader. The multi-well plasmonic plate reader was also applied to the screening of several prostate specific (PSA) antibodies for secondary detection of PSA and for the analysis of an anti-cancer drug through a competitive assay between methotrexate (MTX) and folic acid Au nanoparticle (FaNP) for human dihydrofolate reductase (hDHFR). The multi-well plasmonic reader based on nanohole array technology offers the rapid, versatile, sensitive and simple high throughput detection of biomolecules.

### 3.2 Introduction

Plasmonic biosensors have been widely studied in the last decades in order to develop applications in biomedical, environmental and clinical fields<sup>9</sup>. The popularity of plasmonic devices is due to their high sensitivity, rapid response, label-free detection and real-time analysis of biological interactions<sup>13</sup>. Plasmonic structures support surface plasmons which can be excited through coupling of incident light with a prism, as with classical surface plasmon resonance (SPR), a diffraction grating or with resonances in nanoparticles or nanostructures resulting in localized surface plasmon resonance (LSPR)<sup>2</sup>. Plasmonic biosensors are sensitive towards refractive index variation, measuring binding events occurring on the surface of a sensor. Due to this refractive index sensitivity and thus the generality of the sensing principle, SPR sensors have been demonstrated for a series of biomarkers<sup>193-194</sup>, drugs<sup>195</sup>, DNA<sup>196</sup>, environmental contaminants<sup>197</sup>, among many other applications.

SPR sensing is now the gold standard in academic research or industry for label-free optical biosensing<sup>7</sup>. However, some concerns were expressed towards the future of SPR biosensors due to several limitations such as low throughput capabilities, difficult miniaturization and sensitivity<sup>9</sup>. Nowadays, commercial SPR systems offer multi-channel analysis in parallel for up to 16 channels. Despite this moderate throughput, conventional SPR systems are still lacking compared to 96 well-plate or higher throughput well-plate technologies based on an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)<sup>8</sup>. Higher throughput SPR sensing can be achieved with the imaging format of SPR. However, the fabrication of the sensor arrays is relatively complex and most applications reported to date with this technology had modest throughput, with  $n \times n$  arrays in which  $n$  is often between 3 and 5. SPR in the imaging format also suffers from poorer refractive index resolution than the classical versions of SPR.

SPR and ELISA share several key features. They are both relying on the interaction of the analyte with a surface-bound receptor. The applications accessible to SPR and ELISA overlaps significantly, especially for the analysis of proteins or molecules for which antibodies exists. Therefore, ELISA is the gold standard for evaluating the performances of SPR. The comparative studies of SPR and ELISA have demonstrated that both techniques benefit from similar analytical performances<sup>146, 198-199</sup>, such as detection limits, linearity and reproducibility on the same order of magnitude. Multi-well plate ELISAs remain the standard analytical tool in clinical analysis despite disadvantages such as being time and reagent consuming compared to SPR. Therefore, the development of an SPR-based technology benefitting from all the advantages of ELISA in the multi-well plate format could increase the throughput of SPR sensors for label-free analysis.

Nanoplasmonic structures can provide benefits such as low-cost instrumentation, miniaturization, large-scale fabrication processes and high throughput capabilities. Sensing with nanoplasmonic structures is typically performed with transmission optical measurements and thus are compatible with multi-well plate readers and therefore nanoplasmonic biosensors are considered to be the next-generation of plasmonic sensing platforms<sup>9</sup>. Several nanoplasmonic structures have been developed for biosensing such as nanostructured arrays<sup>2, 200</sup>. In the last decade, nanohole arrays have attracted significant interest due to their versatility and large domain of applications<sup>64-65</sup>. Ebbesen and coworkers have demonstrated that coupling of light

with an array of holes with a diameter smaller than the incident wavelength generates extraordinary optical transmission (EOT)<sup>49,51</sup>. Coupling of light with surface plasmon polaritons (SPPs) generate Bloch-Wave SPPs that are associated with different orders of diffraction of light<sup>16</sup>. The plasmonic properties and the wavelength of excitation of the plasmon resonance of nanohole arrays can be tuned with several structural parameters such as hole diameter and depth, periodicity, metallic composition and array orientation<sup>48</sup>. We recently demonstrated that the penetration depth of nanohole arrays can be decreased with higher incidence angle of excitation, which led to higher surface sensitivity with holes having a large diameter (~ 500-600 nm) and periodicity (~800-1000 nm)<sup>201</sup>. A higher incidence angle also allowed the excitation of plasmonic modes in the visible region that would normally be excited in the NIR (at 0° in transmission) for array with a large periodicity. Thus, detection of protein was reported in low nM range with performances similar to SPR. Therefore, the gap is closing in the performance of nanohole arrays in comparison to SPR and thus, nanohole arrays are a highly relevant plasmonic structure that have a great potential for multiplexing analysis.

In this paper, we demonstrate the multiplexing capabilities of gold nanohole arrays using a custom built multi-well plate reader. Nanohole arrays were manufactured by photolithography which generated highly uniform structures on a large scale. Commercial plate readers do not possess the ability to control the incidence angle of the light beam necessary for high sensitivity when using nanohole arrays and was thus included in the current plate reader design. The robot was coupled to a commercial spectrophotometer to scan a 96-well plate for plasmonic sensing. The performance and versatility of the system was assessed through the sensing of various biological interactions previously reported elsewhere, such as the detection of IgG in PBS buffer, screening of various antibodies for prostate specific antigen<sup>202</sup> (PSA), and for the detection of methotrexate<sup>128</sup> (MTX) in phosphate buffer.

## 3.3 Experimental section

### 3.3.1 Nanohole array fabrication

Gold nanohole arrays were manufactured according to photolithographic techniques. All the microfabrication steps were performed in a clean room of class 100. Glass BK7 wafers of 4'' (UniversityWafer, Boston, MA) were cleaned by piranha solution (3:1 ratio of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 20 minutes (Caution! piranha solution is highly corrosive). The glass wafers were rinsed thoroughly with ultrapure water and dried under a nitrogen stream. The clean wafers were then coated with 2 nm of chromium using electron beam deposition. This layer of chromium decreased back reflection effect during exposition. A negative photoresist (AZ nLOF 2020, Microchemicals, Ulm, Germany) was spin coated onto the glass wafer according to the manufacturer directives. The chromium mask (Photomask Portal, Richardson, TX) corresponded to an array of holes having a diameter of 720 nm and periodicity of 1200 nm. The spin-coated wafers were exposed with a dose of 88.7 mJ/cm<sup>2</sup> in I-line (365 nm) through the patterned mask using a MA6 aligner (SUSS Microtec, Garching, Germany) in vacuum mode. A post exposure bake was then performed at 115°C for 90 seconds. The wafers were developed in AZ 726 MIF for 3 minutes under constant agitation. Afterwards, 2 nm of Cr and 120 nm of gold were deposited on the patterned wafer using electron beam deposition. The array of pillars was lifted off from the wafer by sonication in Remover PG (Microchem, Westborough, USA). In order to fit in the multi-well plate, the patterned area of the wafer was cut using a 7100 Provectus dicing saw (Advanced Dicing Technology, Horsham, PA). Gold nanohole arrays with a periodicity of 1000 nm and diameter of 600 nm were fabricated by nanosphere lithography according to a previous report<sup>201</sup>. The structure of the nanohole arrays was confirmed by scanning electron microscopy (SEM, Jeol) and atomic force microscopy (AFM, Witec, Ulm, Germany).

### 3.3.2 Instrumentation

The multi-well plate reader was custom built in our research group. A multi-well plate holder stage was controlled in the X-Y plane using linear drives with a lateral movement and a precision of 0.25 mm. Stepper motors (part number: 16M4197) and linear guides (part number:

78T3143) were purchased from Newark element14 (Chicago, IL). The sample holder was designed to host a multi-well plate of standard size and was directly mounted on the X-Y stage. A Raspberry Pi (Model B, single-board computer) powered by a 5V power unit (PTN7800WAH, Texas Instruments) controlled the position of the plate and interface with the spectrophotometer. A custom printed system board was connected to the Raspberry Pi and the stepper driver (DRV8811, Texas Instruments). The whole system is powered by a VGS-100-24 power supply (CUI) of 108W at 24V. The raspberry Pi is configured as a server, which is linked via a TCP/IP connection to a computer. A Java/Swing code was used to design software allowing for control of the position of the multi-well plate upon action of the stepper motors via the raspberry Pi (**Figure 3.S1**). The software allows for the selection of wells to analyze, assign references, define number of sequences, vary acquisition parameters and observe signal in real-time. A mechanical arm allowed the excitation of the multi-well plate with an incident angle up to 50°. The sensors were excited with a broadband halogen source and the signal was collected with a PI-Acton spectrophotometer (Princeton) equipped with a grating of 650 g mm<sup>-1</sup> (set from 584 to 716 nm) and a CCD camera (Andor model DU401A-BR-DD-152). Data was acquired by collecting an average of 10 spectra with an integration time of 100 ms per well.

The 96-well plate was custom made of aluminium parts and a PDMS spacer was placed on the sensors to create the well and to avoid leaking between wells (**Figure 3.2a**). The position of the well and the overall dimension of the plate were identical to commercial 96-well plates (**Figure 3.S2**). However, the wells have an oval shape with a length of 7 mm and width of 3 mm, which allowed for the collection of higher signal intensity with incident angles. A top aluminum mount was used to compress the PDMS spacer on the sensors and maintain the assembly of the plate. A PMMA slide was used to cover the plate in order to eliminate a lensing effect from the solution inside the wells due to surface tension. The volume of the wells was controlled from the thickness of the PDMS spacer for a total volume of 90 µL. The solutions were delivered to the multi-well plate with an 8-channel pipette, however, robots designed for fluid handling with multi-well plates could also be used.

The program used for data treatment was written in Python 3.4, using the tkinter module to implement the graphic user interface (GUI). The GUI consists of 96 buttons used to represent each well and a number of functions to plot and analyse the spectra from the wells selected

(Figure 3.S3). The raw intensity spectrum was divided by the reference spectrum to cancel out artefacts from the light source. This spectrum was then fitted to a parabola. The derivative of the parabola was computed and its root was calculated to find the minimum of the curve. Because the spectrum was only parabolic in a certain region near the minimum, the range of the spectrum to be fitted to a parabola was manually inputted after inspection of the intensity plot. To avoid divergences in the calculated minima depending on the input of the calculation boundaries, the range was increased by adding 10 pixels at the end, and the minimum was again computed. If the new minimum differed from the previous one by a large amount (more than 0.1 nm), the program generated a warning that the range may not be the optimal one for the analyses.

### 3.3.3 Plasmonic sensing

For all sensors, the plasmonic shift ( $\Delta\lambda_{SP}$ ) corresponded to the difference between the measurement of the plasmonic response in buffer before and after the detection of the target. The measurements were acquired in a single-measurement mode rather than the real-time kinetics common to SPR instruments. The nanohole arrays were excited at an incident angle of  $50^\circ$  to maximize sensitivity and a typical plasmonic signal of the sensors is shown in Figure 3.1c. The stability of the plate was assessed with successive detection of water and PBS and a calibration curve of sucrose solutions was made for refractive index units (RI) of 1.33 to 1.37. For every biosensing analysis, a self-assembled monolayer (SAM) of 3-MPA-LHDLHD-OH peptide was formed on the sensor's surface as described in previous reports<sup>125</sup>. The plasmonic signal was measured 3 times for each well during a sequence of analysis. A total of 3 sequences was done for each measurement step, thus every sensor in the multi-well plate was scanned 9 times to measure repeatability. Between each sequence, the multi-well plate was removed and inserted back in the plate holder to measure the variation in response due to different alignments of the plate. The transmission signal of a 50 continuous nm Au film was used as a reference for the normalization of the plasmonic signal. The thickness of this reference Au film has been selected to efficiently compensate the intensity profile of the light source, absorption and scattering of Au. Au films of an equivalent thickness to the nanohole arrays are opaque and cannot be used to compensate the light source, while thin Au films are not accurately compensating for the absorption and scattering properties of Au.



### **3.3.4 IgG detection**

The materials and methods involving biosensing of IgG and secondary detection of PSA have been reported elsewhere and used without change in this study<sup>48, 146</sup>. A calibration curve was performed for IgG concentrations ranging from 10 to 1000 nM via secondary antibody detection to enhance the plasmonic shift. For every assay, multiple wells were used as controls and references to validate the results.

### **3.3.5 Anti-PSA screening**

PSA antibodies (labelled 20-PR50, 70-XG69, 10-P21A and 10-20A by the manufacturer) and PSA protein were purchased from Fitzgerald (Acton, MA). For the antibody screening test, multiple combinations of surface and capture antibodies were tested for detection of 1  $\mu$ M of PSA in PBS. For each assay, the concentration of both surface and capture anti-PSA injected in the wells was 75  $\mu$ g/mL. The optimal anti-PSA pair (20-PR50 and 70-XG69) was used to perform a calibration curve of PSA for concentrations ranging from 1 to 1000 nM in PBS.

### **3.3.6 MTX monitoring**

The competitive detection of MTX in phosphate buffer (PB) using FaNP and hDHFR was performed as previously reported<sup>128</sup>. MTX is a toxic compound and special care must be taken during its manipulation; wearing a protective mask is highly suggested. MTX was calibrated in the concentration range from 1 to 1000 nM in phosphate buffer, which coincides with the clinical range of interest.

## 3.4 Results and discussion

### 3.4.1 Nanohole arrays

Subwavelength<sup>b</sup> nanohole arrays can be complex and expensive to manufacture for large areas due to the expensive and time-consuming microfabrication methodologies based on electron beam lithography<sup>200</sup> or focus ion beam lithography.<sup>203</sup> Nanoimprinting lithography (NL) can also be used to achieve mass fabrication of uniform substrate on wafers<sup>65, 151</sup>, but is limited by availability and the somewhat expensive procedures for the fabrication of the molds. In our group, we previously fabricated nanohole arrays by nanosphere lithography<sup>48, 71</sup>, which is a low-cost, versatile, and simple technique. However, this is an imperfect process with several defects including areas missing nanostructures, different crystal orientations, and other local defects which affect the optical properties of nanohole arrays. Structural uniformity is highly important with nanohole arrays to avoid any signal variation due to probing of different areas of the sensor. For these reasons, we adapted a microfabrication technique for nanohole arrays based on photolithography since it offers high uniformity (<10% variation) and large area fabrication on 4" wafers.

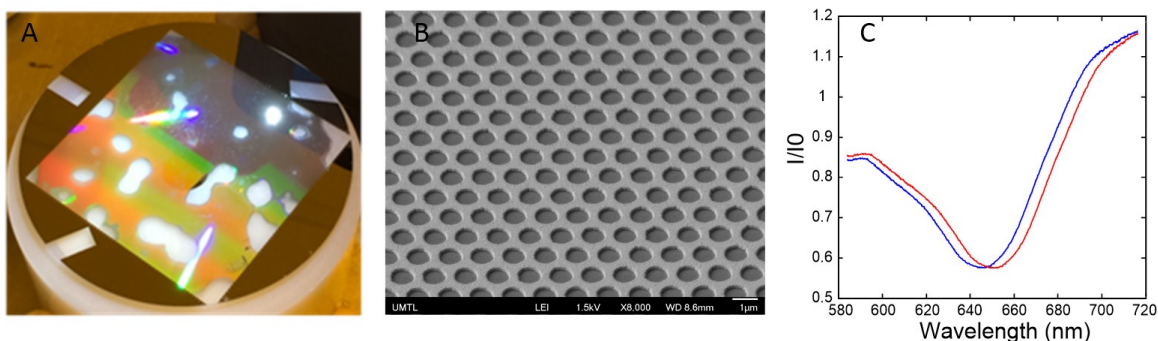
Photolithographic techniques are widely reported in the literature<sup>204</sup> for microfabrication of semiconductor integrated circuits due to its speed, large-scale fabrication, and resolution. However, photolithography<sup>54</sup> remains uncommon<sup>203</sup> for the manufacture of plasmonic substrates on a glass wafer, due to the small size of the plasmonic features in most cases. In this study, the use of large periodicity Au nanohole arrays facilitated the use of photolithography for the fabrication of nanohole arrays. Large periodicities for nanohole arrays typically result in excitation of the plasmon in the near-infrared to infrared region; however, the use of high incidence angles blue-shifted the plasmon resonance to the visible to NIR region, suitable for the plate reader.<sup>201</sup>

This photolithographic technique greatly improved the reproducibility of the fabrication process. However, we still experienced issues that limited the fabrication to around 70% of a

---

<sup>b</sup> The term subwavelength describes an object whose size is less than the wavelength of light interacting with it.

glass wafer that could be covered with gold nanohole arrays (**Figure 3.1a**). The transparent areas observed on Figure 3.1a were due to Newton ring's effect<sup>205</sup>, which is a common issue in photolithography, especially with glass wafer. Some of the issues reported here were due to the use of transparent glass wafers, in opposition to the common opaque Si wafers. However, glass wafers were necessary to transmit light in the EOT experiments reported in this manuscript. Among the challenges that were encountered in the fabrication process, the limit of resolution of the I-line (365 nm) of the MA6 mask aligner ( $\sim 700$  nm) and the scattered light effect<sup>206</sup> due to the chuck's aligner, were important. The optimal parameters for the nanohole arrays were a diameter of 720 nm and a periodicity of 1200 nm for a hexagonal array and thus the photomask mask was designed to expose features at the limit of resolution of the instrument. This was a compromise between the ease of the fabrication process and the excitation of the plasmon band near 700 nm at the maximum angle accessible using the plate reader. A vacuum contact was applied during exposition of the wafer to enhance the resolution<sup>205</sup>. Furthermore, the glass wafers were coated with a Cr layer of 2 nm to minimize back-reflections coming from the chuck, which overexposed the resin. The performance of the microfabrication process could be enhanced in the future with higher quality glass wafers, with a lower total thickness variation (TTV), which were not accessible to us at this stage. Overall, we obtained a plasmonic wafer with a very uniform structure (**Figure 3.1b**) and few local defects on a large surface. The plasmonic signal of nanohole arrays excited at  $50^\circ$  with the multi-well plate reader is shown at Figure 3.1c. Such structures offer an intense plasmonic signal near 650 nm with a FWHM of 50 nm.

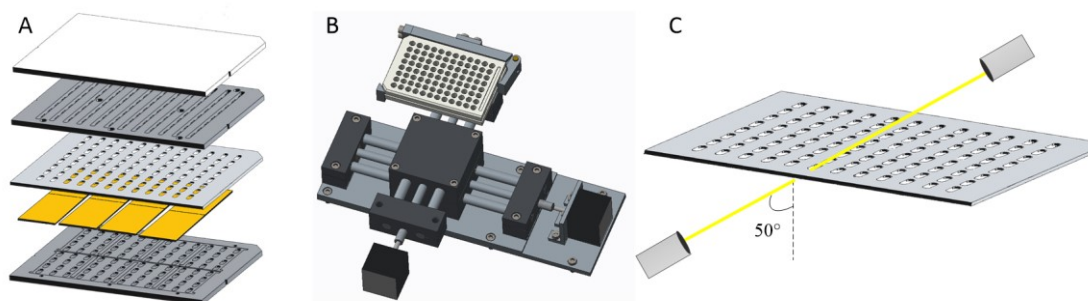


**Figure 3.1** Photograph of gold nanohole arrays on a 4" glass wafer. The transparent areas were due to Newton rings. The samples were diced to minimize the presence of these defects in actual

samples used for plasmonic studies. (B) SEM image of the nanohole arrays. (C) Plasmonic signal of gold nanohole arrays excited in water at  $50^\circ$  (blue line) and in a sucrose solution (red line) with the multiwell plate reader.

### 3.4.2 Multi-well plate reader

The multi-well plate reader was custom built to provide access to high excitation angles, unavailable on commercial plate readers. The system allowed for the analysis of a custom 96-well plate (**Figure 3.2a**). A raspberry PI controlled the movement of the robot in the X-Y axis upon motion of the motor stepper (**Figure 3.2b**). The raspberry PI communicated remotely with a computer via software in order to control the position of the plate. Thereby, the system will only analyze the wells that were selected in the software for a sequence. Calibration of the position of the plate is automatically performed every time the system is returned to its original position at well A1. The instrument was built in order to excite nanohole array samples for high incident angle up to  $50^\circ$  (**Figure 3.2c**), which was the highest angle mechanically accessible with the robotics without blocking the light beam with a mechanical part. The system was coupled to a CCD camera, which provided low background noise and the signal from all 96 wells can be collected in less than 7 minutes.



**Figure 3.2** A) Design of the custom multi-well plate. From top to bottom: plexiglass slide, top aluminum part, PDMS spacer, sensors, and bottom aluminum part. (B) Schematic of the multi-well plate reader. (C) Excitation of the multi-well plate in transmission with an incident angle of  $50^\circ$ .

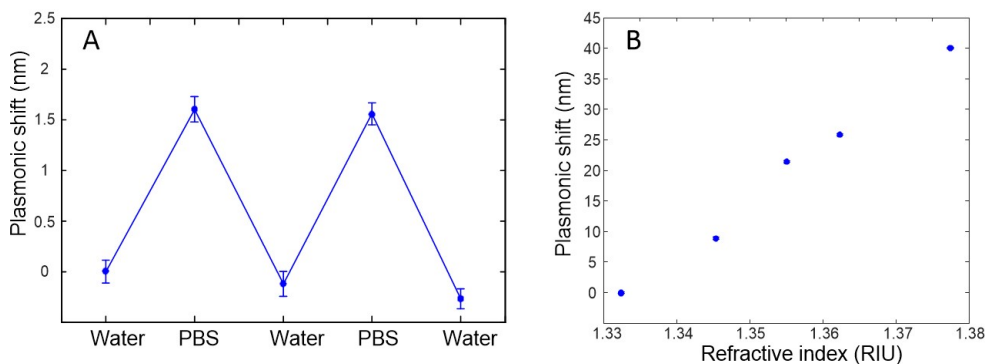
### 3.4.3 Validation of the plate reader in plasmonic sensing

The reproducibility of the measurements on a plasmonic plate reader is of the utmost importance. As a single-point measurement, the response was measured as a difference in plasmon resonance between reference measurements acquired in a reference buffer before and after a detection event because differences in the plasmon resonance measurements unrelated to the detection event could affect the reproducibility of the measurement. The reproducibility of the positioning of the plate reader to probe roughly the same region of the nanohole array sample limits the accuracy of the plasmon resonance measurement. Indeed, this can be a potential issue since the plasmonic band shifts depending on the physical structure of the nanohole arrays, which can lead to divergences in the measurements obtained. This explains the requirement of nanohole arrays fabricated with photolithography, which are highly uniform and reproducible.

Thus, the variation of the plasmonic signal was assessed for multiple wells containing water during a sequence. The accuracy of positioning the robot led to a standard deviation of the plasmonic signal for a single well of less than 0.05 nm ( $n=3$ ), similar to the floor value expected from the noise of the CCD camera and the accuracy of estimating the wavelength. The high reproducibility of the plasmonic resonance on multiple wells was mainly attributed to the uniformity of the nanohole arrays fabricated with photolithography, as they showed a 5-fold improvement in the precision on the plasmonic signal in comparison to nanohole arrays fabricated with nanosphere lithography and analyzed under the same conditions.

Biosensing assays using this platform required the reaction of multiple solutions in order to construct the biosensors and to analyze the targeted analyte. Therefore, the multi-well plate had to be mounted/dismounted from the plate reader multiple times in a run. The influence of mounting and dismounting the plate from the reader was analyzed from the plasmonic shift of multiple wells with successive cycles of refractive index change using water and PBS (**Figure 3.3a**). A plasmonic shift of 1.7 nm was observed between PBS and water and the standard deviation of the signal for the different sequences varied by 0.1 nm. A calibration curve (**Figure 3.3b**) for sucrose was also constructed from data collected in 5 different wells, with a different refractive index solution between 1.33 and 1.38 in consecutive wells. The curve exhibited a

good linearity ( $R^2 = 0.99$ ) and precision (0.10 to 0.15 nm) for different RI solution with a bulk refractive index sensitivity of 900 nm/RIU. These results clearly demonstrated the stability and reliability of the multi-well plate reader for detection of refractive index variation.

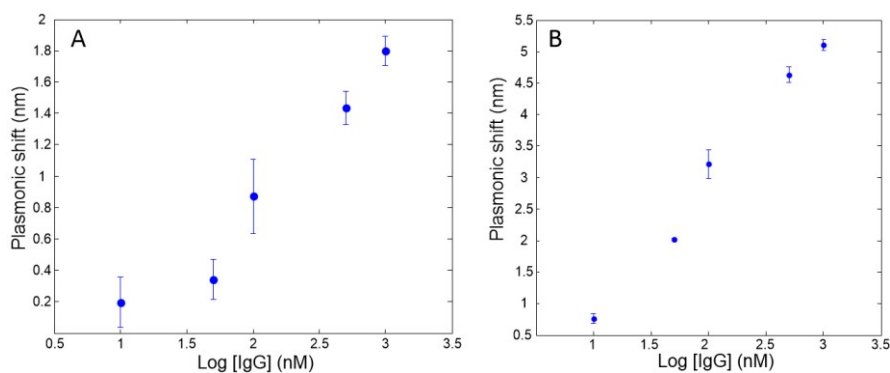


**Figure 3.3** (A) Plasmonic response variation for successive measurements in water and PBS. The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response of 6 wells measured 9 times in each solution. (B) Refractive index calibration curve of sucrose solution using 5 wells ( $R^2 = 0.99$ ). The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response for each well measured 9 times in a different RI solutions.

### 3.4.4 Plasmonic biosensing

Plasmonic biosensing of IgG was performed to demonstrate the efficiency of the multi-well plate reader and nanohole arrays to detect proteins. The nanohole arrays were modified with a 3-MPA-LHDLHD-OH peptide to decrease any non-specific adsorption<sup>125</sup> during the assay. Capture anti-IgGs were immobilized on the sensor surface with standard EDC-NHS coupling chemistry. The assay was carried out using 15 wells in the plate for detection of varying IgG concentrations in triplicate in the range of 10 to 1000 nM. To validate the performance of the multi-well plate reader, the plasmonic signal was recorded before and after the binding of the anti-IgG. The average plasmonic shift for anti-IgG immobilization was  $1.4 \pm 0.2$  nm, showing the reproducibility of protein attachment and of the measurements with the plate reader. Following the deactivation of any remaining NHS groups with ethanolamine, a blocking agent,

the wells were rinsed abundantly with PBS before analyzing different concentrations of IgG (**Figure 3.4a**).



**Figure 3.4** Calibration curves for IgG using the multi-well plate reader. (A) Direct detection. (B) Sandwich assay for IgG using a secondary detection step with anti-IgG. The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response of a triplicate of wells measured 9 times.

Direct detection of IgG was shown in the low nanomolar range (**Figure 3.4a**) with a limit of detection (LOD) of 50 nM. A sandwich assay was performed with a secondary anti-IgG to enhance the plasmonic response (**Figure 3.4b**) with a LOD of 8 nM. During this assay, a trio of wells was used as a control with no IgG to validate the secondary detection step. Indeed, if no IgG was injected into the wells before secondary detection, we obtained a response of  $0.1 \pm 0.1$  nm, showing low nonspecific adsorption of the secondary antibody to the surface. Several advantages were noted with the multiwell plate reader over conventional SPR, most importantly the time required to calibrate the sensor. Indeed, calibration curves that are carried out in triplicate usually require around an hour per IgG concentration with secondary detection, meaning that for a complete calibration curve and control analysis it would take at least 7 hours of measurements using a conventional SPR instrument. The benefit of the multiwell plate was clearly shown here with a complete calibration run in triplicate measurements in less than 90 min with similar sensitivity to a gold film in SPR.<sup>207</sup>

### 3.4.5 Antibody Screening

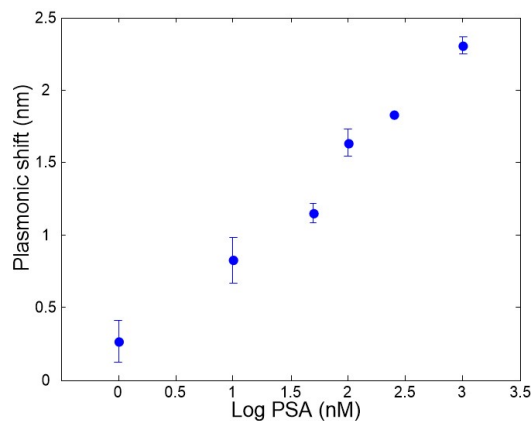
The multiplexing capabilities of the multiwell plate reader served to screen several combinations of surface and capture anti-PSA antibodies for a sandwich assay for PSA. PSA is a small protein (28 kDa), which usually requires a secondary antibody for the amplification of the plasmonic signal.<sup>208</sup> However, PSA antibodies are likely to interact differently with PSA depending on their affinity constant, cross-reactivity, and number of recognition sites. Due to the large number of PSA antibodies available and for demonstration of the concept only, a selection of four anti-PSAs was tested. Several combinations of anti-PSA pairs were screened for the secondary detection of 1  $\mu$ M of PSA in PBS. The plasmonic response was highest for the 20-PR-50/70-XG69 combination of anti-PSA (**Table 3.1**). The 20-PR-50 and 70-XG69 antibodies are both polyclonal, which could explain the larger response due to the possibility of interaction with different sites of PSA.

**Table 3.1** Plasmonic shift for anti PSA screening upon secondary detection of 1  $\mu$ M of PSA.

Surface PSA Antibody	Secondary PSA Antibody	Plasmonic shift (nm)
20-PR-50	10-20-A	0.1 $\pm$ 0.1
20-PR-50	70-XG69	2.3 $\pm$ 0.1
10-P21-A	10-P20-A	0.7 $\pm$ 0.1
10-P21-A	70-XG69	0.9 $\pm$ 0.2
10-P21-A	20-PR-50	0.3 $\pm$ 0.1
70-XG69	10-20-A	0.4 $\pm$ 0.1
70-XG69	20-PR50	0.1 $\pm$ 0.1

A calibration curve was then constructed for the secondary antibody detection of PSA using the 20-PR-50/70-XG69 anti-PSA pair (**Figure 3.5**). PSA concentrations as low as 1 nM were detected with a linear correlation ( $R^2 = 0.98$ ) up to 1000 nM. These results validate the efficiency of the optimal PSA pair for detection of low concentrations of PSA with a LOD of 0.1 nM.





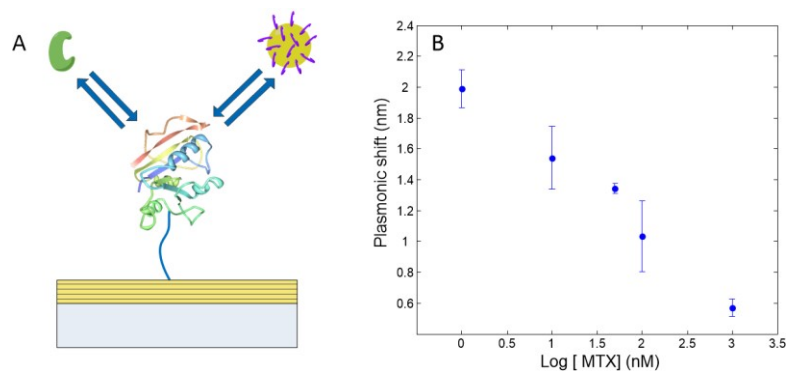
**Figure 3.5** Plasmonic response for the secondary detection of PSA in PBS using the multi-well plate reader. Surface and secondary Anti-PSA are respectively 20-PR-50 and 70-XG69. The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response of a triplicate of wells measured 9 times.

Similar to the IgG assay, a control was performed for a triplicate of wells where no PSA was injected. A response of  $0.1 \pm 0.1$  nm was registered, indicating that nonspecific adsorption of PSA antibodies is similar to the background noise level. Thus, the system was successfully used to study several combinations of anti-PSA in a higher throughput format to identify the optimal antibody pair in order to achieve detection of PSA in the low nanomolar range.

### 3.4.6 MTX Monitoring

The versatility of the system toward various analytes was demonstrated with the detection of methotrexate (MTX). MTX is an anticancer drug used routinely in chemotherapy treatments.<sup>209</sup> During cancer treatment, monitoring the MTX concentration in the sera of patients is required to avoid toxic effects at high doses.<sup>210</sup> We have previously developed a competitive assay using SPR for the detection of MTX<sup>128, 211</sup>. This assay was based on the competition of MTX and folic acid Au nanoparticles (Fa Au NP) for human dihydrofolate reductase (hDHFR) immobilized on the surface of the sensor. The principle of the assay exploits the high response of Fa Au NP toward hDHFR, which is decreased with increasing concentrations of preferentially binding MTX (**Figure 3.6a**). A low concentration of MTX

generated a high plasmonic shift since Fa AuNP are more freely available to interact with the enzyme and they carry a larger plasmonic signal than MTX.



**Figure 3.6** (A) Schematic of the competitive plasmonic sensor for MTX detection (B) Plasmonic response for the detection of MTX in a competitive assay with Fa Au NP using the multi-well plate reader. The error bars represent the standard deviation of the plasmonic response of a triplicate of wells measured 9 times.

The multiwell plate reader was used to demonstrate that the previously reported competitive assay for MTX can also be performed in a high throughput format. For this assay, 18 wells were used for the detection of MTX for concentrations of 0 nM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, and 1000 nM. A triplicate of wells was used for each of the concentrations and the control. A linear calibration curve was observed for the detection of MTX using competitive assay with a limit of detection of 10 nM (**Figure 3.6b**). The standard deviation of measurements for this assay was larger due to a slight variability of enzyme activity of our preparations during the course of the series of assays. A blank measurement in the absence of MTX led to a plasmonic response of  $1.9 \pm 0.3$  nm, similar to the response for 1 nM MTX; therefore the limit of detection was between 1 and 10 nM. The control in the absence of hDHFR led to a response of  $0.3 \pm 0.2$  nm, which indicates the specificity of the adsorption of the Fa Au NP with hDHFR on the nanohole arrays. These results validate the efficiency of the assay to detect concentrations of MTX between 10 and 1000 nM, which overlaps the clinical concentration range<sup>212</sup> with LOD similar to SPR.<sup>128</sup>

### **3.5 Conclusion**

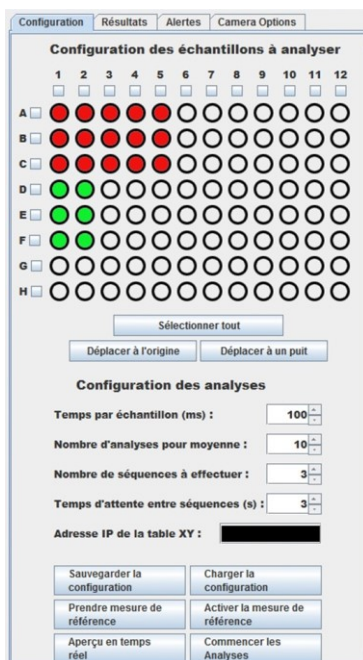
In conclusion, we have developed a multiwell plate reader based on nanohole array technology that is a versatile, fast, sensitive, and simple instrument for high throughput biosensing. The microfabrication technique of gold nanohole arrays by photolithography allowed for the manufacture of a sensor surface that is highly uniform. The custom plate reader and multiwell plate combined with these nanohole arrays excited at high incidence angle allowed for highly reproducible measurements, exhibiting sensitivity to proteins in the low nanomolar range, in a high throughput format. The versatility of this instrument was demonstrated via the analysis of IgG and PSA as well as MTX and thus confirmed the potential to screen multiple biological interactions, which will be useful for multiplexing studies. Furthermore, the multiwell plate reader could benefit from already available infrastructures that are routinely used for ELISA measurements including automated pipetting systems and antibody kits. The plasmonic multiwall plate reader described herein provides an excellent novel sensing tool for high throughput label-free biosensing.

### **3.6 Acknowledgments**

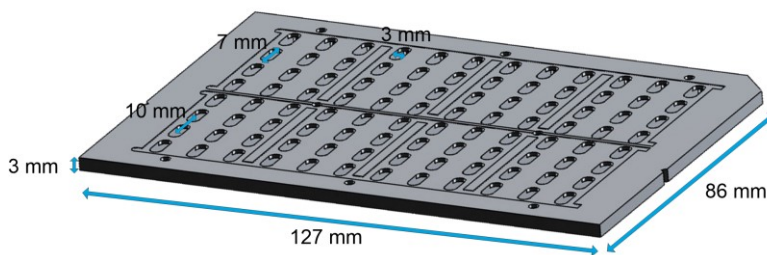
The authors thank Joelle Pelletier of the Université de Montréal for providing human dihydrofolate reductase. The authors would like to acknowledge financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Centre for Self-assembled Chemical Structures (CSACS), and the Canadian Foundation for Innovation (CFI).

### 3.7 Supporting information

Figures 3.S1 to 3.S3 are provided as supporting information. These figures report technical details regarding the software and design of the 96-well plate reader.



**Figure 3.S1** Software interface for the control of the multi-well plate reader and camera parameters.



**Figure 3.S2** Scheme of the bottom aluminium part of the multi-well plate with dimension.

Intensity	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	<	Start pixel:	<input type="text"/>		Start	Save Result
Wavelength	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	<	End pixel:	<input type="text"/>			
Select all	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	<	<input type="checkbox"/>	Increment:	<input type="text"/>		
Apply Ref	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	<					
Plot	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	<					
Reset	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	<					
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	<					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	<					
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						

Sample Directory	Enter address: <input type="text"/>		Load	Browse
Reference Directory	Enter address: <input type="text"/>		Load	Browse
Save Spectrum	Enter directory: <input type="text"/>	Browse		
	Enter name: <input type="text"/>	Save Result		

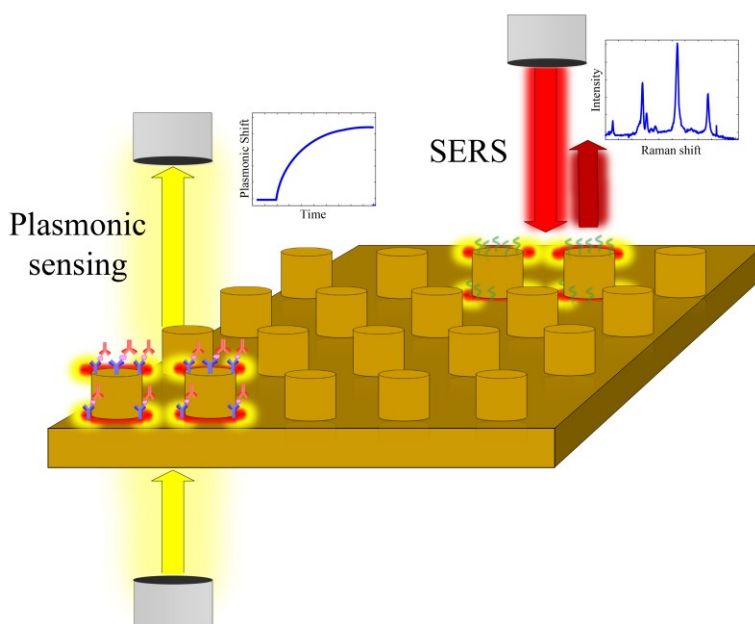
Apply reference

**Figure 3.S3** Software interface for the data treatment.

## Chapitre 4 : High figure of merit (FOM) of Bragg modes in Au-coated nanodisk arrays for plasmonic sensing

Une version de ce chapitre est déjà publiée avec la citation :

Maxime Couture, Thibault Brulé, Stacey Laing, Wenli Cui, Mitradeep Sarkar, Karen Faulds, Wei Peng, Michael Canva and Jean-Francois Masson, *ACS Photonics*, **2016**, soumis pour révision



Je fus responsable de l'ensemble des manipulations expérimentales et traitement de données à l'exception des analyses Raman. J'ai développé le protocole de microfabrication des réseaux de nanodisques et fabriqué toutes les structures. Jean-François Masson, Thibault Brulé et moi avons élaboré l'ensemble des protocoles expérimentaux. Jean-François Masson et j'ai rédigé les premières versions de l'article. Thibault Brulé a effectué les analyses SERS pour le calcul de l'EF. Stacey Laing et Karen Faulds ont effectué les images Raman. Wenli Cui et Wei Peng ont fait les simulations par 3D FEM des réseaux de nanodisques. Mitradeep Sarkar et Michael Canva ont participé à l'élaboration de la solution analytique des modes de Bragg et validé les propriétés plasmoniques des réseaux de nanodisques recouverts d'or.

## 4.1 Abstract

We report that gold-coated nanodisk arrays of nearly micron periodicity have high figure of merit (FOM) and sensitivity necessary for plasmonic refractometric sensing, with the added benefit of suitability for surface-enhanced spectroscopy and electrochemical measurements. Gold nanodisk arrays of nearly micron size and periodicity were covered with a gold layer to couple the wavevector of the propagative surface plasmons (PSP) of the gold film and the Bragg vector of the array, which generated Bragg modes (BM) that rapidly scattered on the nanodisks and led to highly localized fields. The surface plasmon dispersion curves confirmed the excitation of BM in the structure and were in good agreement with theoretical calculations. A mapping of the SERS intensity of the gold-coated nanodisk arrays and numerical simulations with 3D finite element method (3D FEM) revealed that the plasmonic field of the BM was highly localized at the edges of the nanodisks, providing large enhancement of the near-field light intensity. Hence, the SERS enhancement factor (EF) was conservatively estimated at  $10^7$  for the gold-coated nanodisk arrays and with high reproducibility (CV = 7%). The optimal gold-coated nanodisk arrays were applied for refractometric sensing in transmission spectroscopy with better performance than nanohole arrays and they were integrated to a 96-well plate reader for detection of IgY proteins in the nM range in PBS. The potential of this plasmonic structure for sensing in biofluids was assessed with IgG detection in 1:1 diluted urine. Gold-coated nanodisk arrays benefitted from high surface sensitivity, large-scale microfabrication using standard photolithographic techniques and a simple instrumental setup. The structure exhibits a high FOM of up to 46, exceeding the FOM of structures supporting surface plasmon polaritons (SPPs) and comparable to more complex structures requiring the excitation of Fano resonances and index matching

## 4.1 Introduction

The field of plasmonics has generated great interest in the past years due to a broad applicability for a series of important contemporary issues.<sup>2</sup> Specifically, the usefulness of plasmonics has been shown for biomedical, environmental and food safety applications.<sup>7, 9, 13</sup> Essential to reaching its potential, the fabrication and characterization of reproducible nanostructures with high sensitivity that are broadly applicable in multiple plasmonic techniques (*i.e.* refractometric sensing, surface-enhanced Raman scattering (SERS) or metal-enhanced fluorescence, among others) are subject to intensive research activities.

Plasmonic substrates support surface plasmons (SP), which are coherent oscillations of free electrons at the interface of a metal and a dielectric.<sup>12</sup> SPs are sensitive to refractive index variation, which allows a suite of plasmonic techniques to be used to detect binding events at the vicinity of the sensor's surface, hence the source of the general applicability and popularity of the technique to detect (bio)molecules. The coupling of light with SP in the classical technique of surface plasmon resonance (SPR) generates SPP that propagates on a thin gold film.<sup>2, 13, 213</sup> Other coupling methods of light with SPs involve the use of nanoplasmonic structures such as 2D grating structures (in reflection or in transmission) or through resonances with nanoparticles leading to localized surface plasmon resonance (LSPR).<sup>2</sup> Nanoplasmonic structures can solve current limitations of classical SPR, such as low-throughput capabilities and difficulty in miniaturization of equipment,<sup>25</sup> and are highly sensitive for use in surface-enhanced spectroscopy such as SERS and metal enhanced fluorescence (MEF).<sup>133</sup>

Different nanostructures have been proposed to achieve highly sensitive and high figure of merit (FOM) plasmonic sensing. Individual nanostructures supporting localized surface plasmon resonances (LSPR) have been widely popular due to recent advances in synthesis of metal colloids.<sup>10, 214-215</sup> These nanostructures are characterized with strong extinction in the visible to near-infrared (NIR) spectral region, moderate sensitivity to bulk refractive index, but high sensitivity to molecular adsorbates in plasmonic sensing and in SERS. These structures are of different shapes and sizes such as nanorods,<sup>216</sup> nanospheres,<sup>217</sup> nanocubes,<sup>218</sup> or nanostars,<sup>219</sup> among others. Arrays of individual nanostructures have also been fabricated on solid substrates



with properties similar to colloids in suspension, including arrays of nanotriangles,<sup>220</sup> nanorings<sup>221</sup>, nanocrescents<sup>222</sup>, or nanodisks<sup>223</sup> among others. Alternatively, there has also been a lot of interest in developing nanostructures that support propagating SPPs. These nanostructures typically have higher sensitivity than LSPR, higher FOM and achieve lower refractive index resolution.<sup>224</sup> For example, nanoslits<sup>225</sup>, nanovoids<sup>226</sup>, nanohole arrays<sup>64</sup>, and nanogratings<sup>227</sup> have been reported for plasmonic sensing. We have previously used nanohole arrays to achieve enhanced biosensing, SERS and MEF through tuning of the excitation angle in transmission measurements and optimization of the physical parameters of the arrays.<sup>48, 79, 201</sup> Recently, we also applied nanohole arrays for high throughput and multiplexed biosensing with a 96-well plate reader.<sup>228</sup> However, nanohole arrays remains suboptimal for surface-enhanced spectroscopy with enhancements factors 1-2 orders of magnitude lower than for metallic nanoparticles. Despite all these significant advances in nanostructure design, it remains a contemporary challenge to develop a nanostructure with high sensitivity, high FOM and broad applicability in a series of plasmonic techniques.

To address these challenges, we studied gold-coated nanodisk arrays and report the generation of sharp resonances in transmission spectroscopy measurements in the near-infrared (NIR) region of the spectrum ideal for biosensing applications. In periodic structures with an underlying metallic film, the Bragg Modes (BMs) are excited due to the change of the in-plane wave-vector of the PSP ( $k_{PSP}$ ) owing to the periodicity of the array. At certain conditions a resonance occurs when  $k_{PSP}$  matches the Bragg vector ( $k_B$ ) of the nanodisk arrays.<sup>92</sup> The Bragg condition is described in equation 4.1 where  $m$  is an integer corresponding to the order of the BM and  $k_B$  corresponds to  $2\pi/P$ .

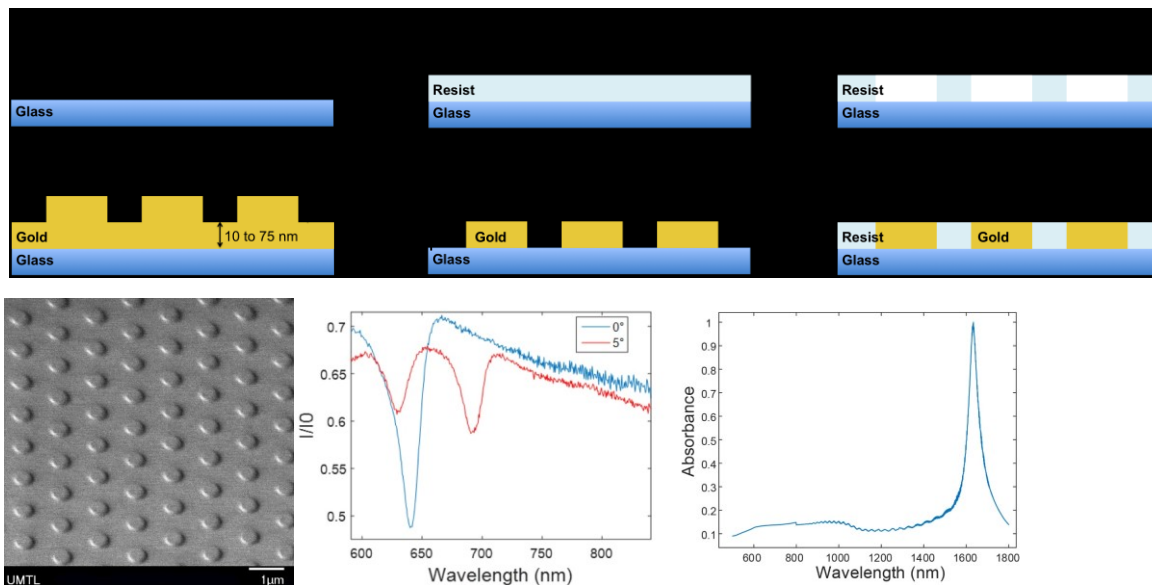
$$k_{BM}(m) = k_{PSP} \pm mk_B \quad (\text{Équation 4.1})$$

In the current nanostructure, the physical excitation of the BMs can be explained by the fact that the PSP of the gold film is partially scattered by the nanodisks, which created a constructive interference of the contrapropagating plasmons. This interference gives rise to a resonance condition and generates a highly confined EM field around the nanodisks.<sup>95</sup> For this work, we selected a nanodisk array structure with a large periodicity (1200 nm) and disk diameter (720

nm) where resonant coupling of the localized and propagative plasmons are not expected to occur. Advantages of working with larger structural parameters include tuning of the resonance in the so-called biological window in the NIR and the possibility to fabricate the arrays by conventional photolithography. Microfabrication on a large scale with high surface uniformity is highly desirable for integration of plasmonic structures in devices.

## 4.2 Results and discussion

Gold nanodisk arrays are usually fabricated by electron beam lithography (EBL) and exhibit sub-wavelength features.<sup>83, 88</sup> The fabrication of gold-coated nanodisk arrays was based on the same approach we used in a recent paper to manufacture nanohole arrays of the same periodicity (**Figure 4.1**).<sup>228</sup> In brief (detailed experimental procedures are provided as Electronic supplementary information), the microfabrication of nanodisk arrays was achieved by exposing UV light through a chromium mask on a positive photoresist, which was spin-coated on a 4" glass wafer. The mask consisted of an array of chromium disks with a periodicity of 1200 nm and a diameter of 720 nm. After the exposition step, the wafer was developed and a nanohole arrays pattern was produced on the glass wafer. Thereafter, the wafer was metalized with a layer of chromium (1 nm) and a layer of gold (10 to 75 nm) was deposited to yield a nanodisk array on the wafer. Then, the photoresist was lifted off the wafer to display the array of gold nanodisks. The last step of the process consisted of coating another layer of gold (10 to 75 nm) onto the nanodisk arrays. The gold-coated nanodisk arrays were named for their nanodisk height (NDXX, where XX is the height in nm) and their gold film thickness (filmYY, where YY is the thickness in nm), thus a substrate with disks of 75 nm and a film of 75 nm is termed ND75film75. This fabrication technique generated gold-coated nanodisk arrays on a large area (SEM image provided in Figure 4.1), with great speed and high surface uniformity (<10% variation).

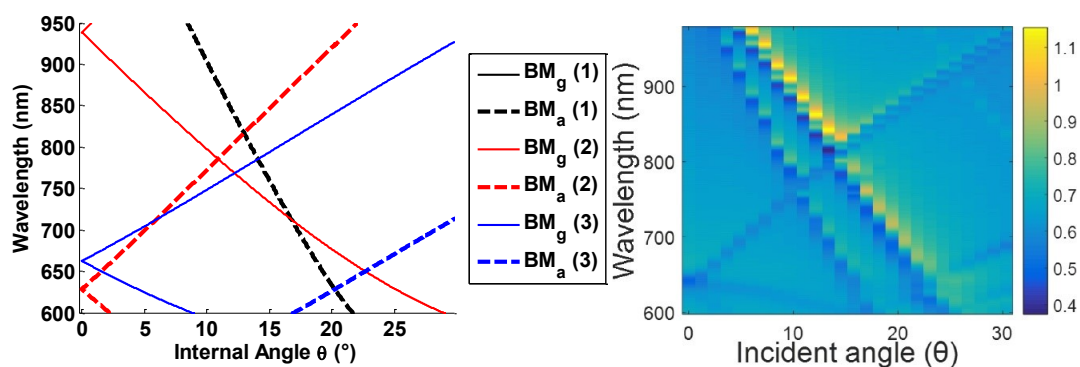


**Figure 4.1** Top) Representation of manufacture process for gold-coated nanodisks; A positive photoresist layer was spin-coated on a 4” glass wafer (A), then UV-light cured through a mask and developed to create an array of holes in the exposed resist (B), followed by the deposition of a gold layer (C), and lift-off of the resist (D) to create an array of nanodisks (E), and finally, the deposition of a gold overlayer to yield the gold-coated nanodisk arrays (F). Bottom left) SEM image of a gold-coated nanodisk arrays with a periodicity of 1200 nm and a disk diameter of 720 nm. Bottom center) Plasmonic response of nanodisk arrays (ND75film75) excited in transmission in air for incident angles of 0° (blue curve) and 5° (red curve). Bottom right) Plasmonic signal of gold nanodisk arrays (without gold film overlayer – see step E) excited in direct transmission showed a strong absorbance at nearly 1600 nm.

Direct excitation in transmission of gold nanodisk arrays (without the gold underlayer) with sub-wavelength features was previously reported to lead to a LSPR resonance in the visible-NIR spectrum.<sup>88</sup> The LSPR band for a nanodisk array with larger disk diameter as prepared here was expected to be excited in the NIR to IR region, which was confirmed by the strong LSPR absorption band at a wavelength of nearly 1600 nm (**Figure 4.1**). This result was consistent with a previous study that demonstrated a red shift of the LSPR band with the increase

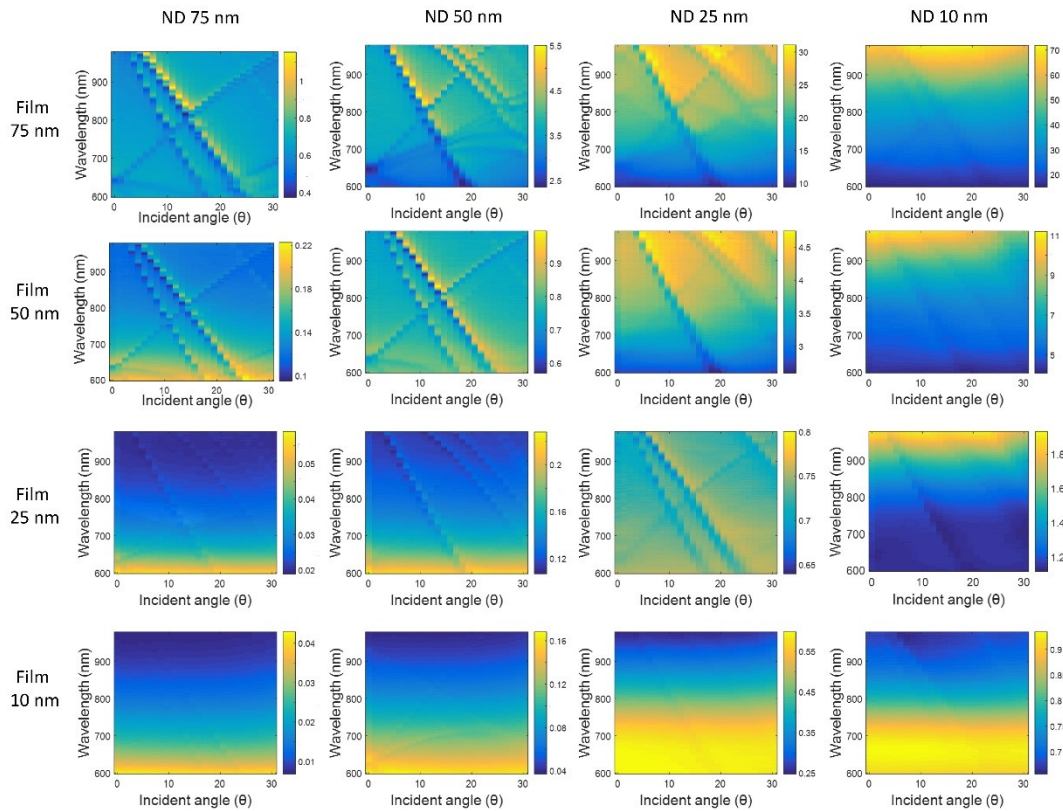
of the diameter of nanodisk arrays.<sup>88</sup> As such, the nanodisk arrays could be a strong candidate for SERS at 1550 nm, a SERS wavelength recently reported<sup>229</sup> and compatible with telecommunications technologies.

The 75 nm layer of gold below the nanodisk arrays (disk height of 75 nm) led to a series of plasmonic bands associated to BM in the visible-NIR region (**Figure 4.2**). Coupling between the wavevector of the PSP and the Bragg wavevector of the array is at the origin of the excitation of BM. These plasmonic modes highly depend on the periodicity of the array rather than the nanodisk shape.<sup>95</sup> Analytical calculations were carried out to estimate the BM coupling conditions and to determine the position of the different orders of BM (**Figure 4.2**), which were in good agreement with the experimental positions of the BM<sub>a</sub> (metal/air interface) for different orders (**Figure 4.2**). The experimental resonance wavelength of 641 nm was also in good agreement with the 3D FEM prediction at 644 nm. It was thus established that the plasmonic signal observed in air for angles of 0° and 5° (**Figure 4.1**) corresponded to the positive and negative branches of the 2<sup>nd</sup> order of the Bragg mode excited in air (BM<sub>a(2)</sub>).



**Figure 4.2** Left) Theoretical plasmonic dispersion curves for different orders of BM for an array with a periodicity of 1200 nm. BM<sub>a</sub> and BM<sub>g</sub> respectively correspond to the BM at the metal/air (a) and metal/glass (g) interface. Right) Experimental plasmonic dispersion curves of a gold nanodisk arrays (ND75film75) excited in transmission for incident angles of 0° to 30°.

We then measured the plasmonic properties of 16 gold-coated nanodisk arrays with various disk and film thicknesses to evaluate the optimal excitation conditions of the BM. These different plasmonic structures were studied in transmission for a range of incident angles of  $0^\circ$  to  $30^\circ$  and all plasmonic dispersion curves are reported in figure 4.3. The strong dependence of the plasmon resonance wavelength with the incidence angle, the presence of multiple plasmon resonances and the generally good agreement with BM excitation conditions were also strong indications of the excitation of the propagative plasmon.



**Figure 4.3** Plasmon dispersion curves of gold nanodisk arrays with different film (top to bottom row) and nanodisk (left to right column) thicknesses of 75 nm, 50 nm, 25 nm and 10 nm. The signal is measured in transmission in air for incident angles of  $0^\circ$  to  $30^\circ$ . The reference signal of each structure corresponds to a gold film with the same thickness.

In addition, the resonance of the gold-coated nanodisk arrays was invariant of the height of the nanodisk. If a localized plasmon was excited in the NIR spectral range, the plasmon resonance would have strongly depended on the aspect ratio of the disk, as previously reported<sup>230</sup>, which was not the case for the gold-coated nanodisk arrays. However, the plasmon resonance slightly increased from 631 to 644 nm for thicker Au films (from 25 to 75 nm), which is also in agreement with a redshift observed for thicker Au films in classical propagative SPR measurement in the Kretschmann configuration. We also observed that nanodisks of heights below 25 nm were insufficient to efficiently excite the BM. Film heights of 25 nm or thinner were also insufficient to efficiently excite the PSP. Overall, these results demonstrate that sufficient thicknesses (50 and 75 nm) of the gold film and nanodisks are the necessary conditions to support a propagative surface plasmon and excite the BMs for gold-coated nanodisk arrays.

The sensitivity of the gold-coated nanodisk arrays was then evaluated for sensing purposes. The excitation of these nanostructures at normal incidence in aqueous solutions shifted the  $BM_{(2)}$  towards wavelengths of nearly 840 nm. The bulk refractive index sensitivity ( $\sim 600$  nm/RIU), and RI resolution ( $1.8 \times 10^{-5}$  RIU) were relatively similar for every structure (**Table 4.1**), which was expected since the RIS of a plasmonic grating nanostructure varies mainly from the variation of the periodicity.<sup>72</sup>

**Table 4.1** Plasmonic sensing properties of gold-coated nanodisk arrays.

	<b>ND50film50</b>	<b>ND50film75</b>	<b>ND75film50</b>	<b>ND75film75</b>
<b>Sensitivity (nm/RIU)</b>	583 ± 1	601 ± 2	599 ± 2	599 ± 3
<b>FWHM (nm)</b>	14 ± 2	14 ± 4	13 ± 1	14 ± 1
<b>FOM</b>	42	43	46	43
<b>RI resolution (RIU)</b>	1.9 × 10 <sup>-5</sup>	1.8 × 10 <sup>-5</sup>	1.8 × 10 <sup>-5</sup>	1.9 × 10 <sup>-5</sup>
<b>S/N</b>	99	285	29	152
<b>Δλ<sub>SPR</sub> (nm) IgY</b>	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1
<b>Δλ<sub>SPR</sub> (nm) anti-IgY</b>	2.3 ± 0.2	2.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.8 ± 0.2

The RI resolution was identical to a cavity-coupled plasmonic device reported recently<sup>224</sup> and was better than RI resolution of nearly 10<sup>-4</sup> typically reported for plasmonic nanostructures. Furthermore, the plasmonic signal of the BM<sub>(2)</sub> in water was very sharp with a full width at half maximum (FWHM) of 14 nm for the gold-coated nanodisk arrays. In comparison, nanodisk arrays had a smaller RI sensitivity than nanohole arrays of the same periodicity (900 nm/RIU) but their FWHM was 5-fold smaller in comparison to the same nanohole arrays.<sup>228</sup> The sensitivity and FWHM of gold-coated nanodisk arrays also compared favorably to other plasmonic nanostructures. In brief, the sensitivity is typically less than 400 nm/ RIU for LSPR nanostructures, and while it varies with the periodicity for arrays of nanostructures, it is generally comprised between 200 and 700 nm/RIU for arrayed nanostructures with resonances below 1000 nm.<sup>224</sup> In addition, the FWHM is typically on the order of a few tens to hundreds of nanometers for LSPR and it was reported within the range of 4 to 36 nm for SPP.<sup>224</sup> Our reported value for the FWHM of 14 nm for gold-coated nanodisk arrays also compared advantageously. The narrow linewidth was due to the excitation of the Bragg mode, which are typically narrower than lossy propagating plasmons. The area of perfectly ordered nanostructure also contribute to narrowing the linewidth and achieving small FWHM.

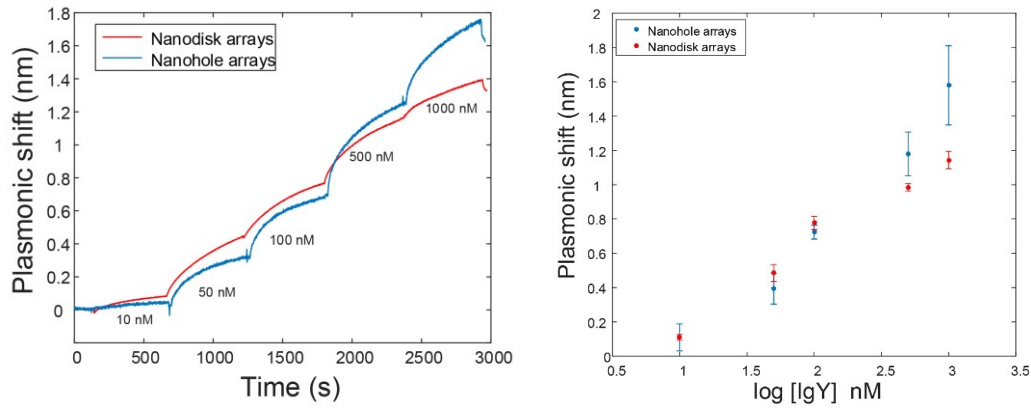
From this data, we obtained a FOM ( $\text{FOM} = \text{RIS}/\text{FWHM}$ ; calculated in using values in nm) that varied from 42 to 46 for gold-coated nanodisk arrays, which once again fared as one of the best overall plasmonic nanostructures reported to date. For example, structures supporting a LSPR resonance such as nanoparticle arrays ( $\text{FOM} = 25$ )<sup>231</sup>, nanobar arrays ( $\text{FOM} = 4.5$ )<sup>232</sup>, nanodisk ( $\text{FOM} = 29$ )<sup>233</sup>, Au octamers ( $\text{FOM} = 5.7$ )<sup>234</sup>, or a “XI” nanostructure ( $\text{FOM} = 4.7$ ) generally had FOM from 0.6 to 29, while if a Wood’s anomaly was excited, the FOM increased to 38<sup>235</sup>. Structures supporting a SPP are generally on the order of  $\text{FOM} = 23$  to 39, which includes the FOM of a thin Au film classically used in SPR sensing ( $\text{FOM} = 25$  to 39)<sup>236</sup>. Significantly higher FOM can be achieved with SPP with Fano resonances, where the FOM ranges from 39<sup>237</sup> and 252<sup>225</sup>, and often exploits subwavelength nanostructures such as the nanoslits structures<sup>225, 238</sup>, grating structures<sup>239</sup>, suspended nanohole arrays<sup>240</sup> or nanomushrooms<sup>241</sup> to reach higher FOM. A more extensive list of FOM for a series of nanostructures was provided elsewhere for comparison purposes.<sup>224</sup> Hence, the gold-coated nanodisk arrays are well positioned due to their high FOM, sensitivity and RI resolution to achieve highly sensitive refractometric measurements. The relatively simple photolithographic fabrication procedure and the fact that they do not require the excitation of Fano resonances or the use of index-matching between the substrate and the solution are also advantages of the gold-coated nanodisk arrays.

The FOM of a plasmonic structure is not necessarily related to the sensing performance and low FOM plasmonic structures have been shown to perform well in sensing.<sup>242</sup> Thus, other spectral properties of a sensor are also important factors to consider when comparing structures. We have thus determined the signal to noise ratio (S/N) of the different structures from the intensity of the  $\text{BM}_{(2)}$  in air (at  $0^\circ$ ) divided by the background noise. The S/N was higher for gold film thickness of 75 nm and lower for a nanodisk height of 75 nm (**Table 4.1**). Also, one of the main parameters dictating the performance of a plasmonic sensor for biosensing purposes is the distribution of the EM field.<sup>9</sup> The surface sensitivity of a sensor characterizes the interaction of the plasmonic field at the metal/air or metal/solution interface for the detection of biological recognition events.



Surface sensitivity of the gold-coated nanodisk arrays was assessed with a biosensor for IgY in PBS. For this test, a custom multi-well plate reader was used in order to achieve a broadly multiplexed platform. The multi-well plate reader allowed monitoring of up to 96 wells in a single experiment and was used without modification from a previous report.<sup>228</sup> The biosensor was constructed with a peptide monolayer<sup>125, 243</sup> for minimizing nonspecific adsorption of biofluids, on which a polyclonal anti-IgY was immobilized with standard EDC-NHS chemistry as previously reported.<sup>48, 201</sup> The sensor was then subjected to direct detection of 100 nM of IgY in triplicate measurements (in different wells of the 96-well plate reader), followed by a secondary detection using the same polyclonal anti-IgY antibody. A control in absence of IgY was performed with a triplicate of wells to validate the specificity of the secondary detection step. We obtained a plasmonic shift of  $0.1 \pm 0.1$  nm in absence of IgY, confirming the specificity of the secondary detection step. Differences in gold film and nanodisk thicknesses did not significantly affect the surface sensitivity of the sensor, but the gold-coated nanodisk array with ND75film75 exhibited the best overall performance (**Table 4.1**) and was thus used for the following experiments.

We then compared the surface sensitivity of the gold-coated nanodisk arrays with nanohole arrays of identical periodicity with a calibration curve of IgY (**Figure 4.4**). Both structures have comparable plasmonic shift towards low concentration of IgY ( $< 100$  nM). Both calibration curves were nearly identical, but the plasmonic response was slightly better for nanohole arrays at higher concentration ( $> 100$  nM). However, to increase the sensitivity and to shift the resonance of the nanohole arrays within the range of our spectrophotometer, we used a relatively large excitation angle of  $50^\circ$  for nanohole arrays, while the gold-coated nanodisk arrays were excited at normal incidence. This high excitation angle for nanohole arrays increased the sensitivity by about a factor of 3 to 5.<sup>201</sup> Therefore, if the nanohole arrays had been excited at normal incidence, the gold-coated nanodisk arrays would have significantly outperformed the nanohole arrays.



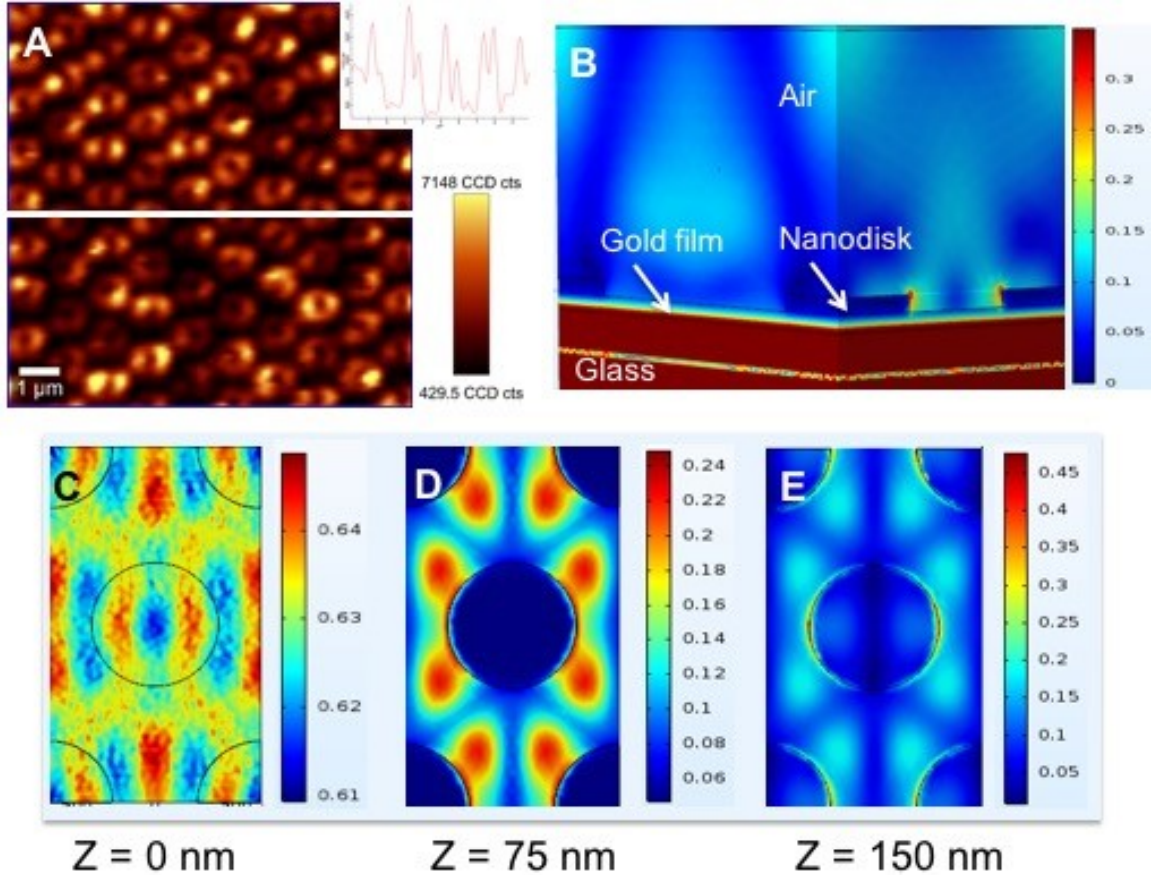
**Figure 4.4** Left) Sensorgrams for the detection of IgY with the gold-coated nanodisk arrays (red) and with nanohole arrays (blue). Concentrations of 10, 50, 100, 500 and 1000 nM were successively injected in a fluidic cell. Right) IgY calibration curves for structures of nanohole arrays (blue) and gold-coated nanodisk arrays (red) excited in transmission using a fluidic cell.

Biosensing in complex matrices is one of the main challenges of plasmonic sensing because of the nonspecific adsorption of background proteins on refractometric sensors.<sup>2, 125</sup> To demonstrate the potential of this sensing platform for more realistic sample measurements, biosensing of human IgG was performed in human urine. IgG detection in urine can serve for detection of urinary tract infections among other pathologies. Since human urine contains IgG at concentrations on the order of a few  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (about a few tens of nanomolar)<sup>244</sup>, we performed a standard addition assay where human urine was spiked with an additional concentration of 100 and 1000 nM of human IgG. Once again, a control consisting of injecting human urine without further spiking with human IgG led to a plasmonic shift 3-fold smaller ( $\Delta\lambda = 0.15 \pm 0.02$  nm) than for the detection of a human urine sample supplemented with 100 nM human IgG ( $\Delta\lambda = 0.39 \pm 0.02$  nm). The shift of the sensor further increased with the addition of 1000 nM IgG in human urine ( $\Delta\lambda = 0.52 \pm 0.03$  nm). This indicated that the sensor was able to differentiate human IgG from background noises from analytes in a complex matrix.

To further characterize the gold-coated nanodisk arrays and to evaluate the potential of this platform in surface-enhanced spectroscopy, we have studied the properties of this plasmonic

substrate in SERS and numerically simulated the field distribution on the nanostructure. Typical nanodisk arrays (without the gold film) have been extensively reported in SERS applications with enhancement factors (EF) of  $10^6$ - $10^7$ .<sup>89, 94, 245</sup> The high localization of the plasmonic field near nanodisks allowed a strong enhancement of the EM field intensity. The optimal conditions will depend on the geometrical parameter of the nanodisk, as the EM enhancement is wavelength-dependent and requires coupling of the wavelength of the laser with the plasmonic resonance of the nanostructure.<sup>133-134</sup> For our gold-coated nanodisk arrays, the plasmon resonance of the BM<sub>(2)</sub> was excited in air ( $\lambda = 641$  nm) and water ( $\lambda = 840$  nm) and these resonances matched with the common Raman lasers of 633 and 785 nm wavelengths respectively.

In order to obtain a SERS signal, the nanodisk arrays were first functionalized with the Raman-active molecule, 4-nitrobenzenethiol (4-NBT). Using confocal Raman microscopy and 633 nm laser excitation to couple with the BM resonance at 641 nm, Raman images were acquired of 10  $\mu\text{m}$  areas with 100 x 100 spectra collected for each image. A false color Raman map of gold nanodisk arrays (ND75film75) was generated to assess the localization of the plasmonic field (**Figure 4.5**) using the intensity of the peak at  $1335\text{ cm}^{-1}$  from the spectrum of 4-NBT. The Raman map revealed that the highest intensity of Raman scattering was located near the edge of the nanodisks. These results correlated with the previously reported theory that the plasmonic field of the BM should be highly confined at the edges of the nanodisk.<sup>92</sup> However, the Raman map could not distinguish if the highest EM field was located at the bottom or top of the nanodisk. Therefore, we simulated the field distribution using 3D FEM. The Raman map was in good agreement with the 3D FEM data of the electromagnetic field distribution in the X-Y plane for the same gold-coated nanodisk arrays (**Figure 4.5**). Indeed, the plasmonic field at a wavelength of 644 nm described a donut-shape on the edges of the nanodisks for Z values of 75 nm (gold film/nanodisk interface) and 150 nm (top of nanodisk). These results demonstrated that the field intensity at the edges of the disk was higher at the interface of the nanodisk and air ( $Z = 150$  nm). In addition, the simulations showed the plasmon field leaking in the gold film and creating interference patterns around the nanodisk ( $Z = 75$  nm). The 3D field simulations demonstrated the high confinement of the field distribution near the top of the nanodisk, a location in agreement with the Raman images.



**Figure 4.5** A) Raman imaging of a gold-coated nanodisk arrays (ND75film75) with 4-nitrobenzenethiol (4-NBT). The image was acquired with a 633 nm laser and 100 nm steps between pixels and 100 ms integration time per pixel. The image represents a false color Raman map of the intensity of 4-NBT peak at  $1335\text{ cm}^{-1}$  for a scanning area of  $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ . The inset shows a cross-section of the Raman intensity corresponding to the white line in the SERS image. B) The field distribution at resonance wavelength (644 nm) was calculated in 3D under TM light for the gold-coated nanodisk arrays. The region of highest field intensity was located at the rim of the nanodisk. C-E) The field distribution at resonance wavelength (644 nm) was calculated in the X-Y plane under TM light for the glass-gold interface ( $Z = 0\text{ nm}$ , C), for the gold film-nanodisk interface ( $Z = 75\text{ nm}$ , D) and for the nanodisk-air interface ( $Z = 150\text{ nm}$ , E). The images also represent normalized false color maps of the field distribution. The field intensity was calculated to be the highest for 150 nm (E). Panels B-E were normalized with the intensity of the incident light field.

Enhancement factors (EF) are often compared to evaluate the potential of plasmonic structures in SERS. The SERS EF of the ND75film75 structure was determined using equation 4.2 where  $I_{SERS}$  and  $I_{Raman}$  correspond respectively to the intensity of the 4-NBT band at  $1335\text{ cm}^{-1}$  for SERS and normal Raman.<sup>133</sup>

$$EF = \left( \frac{\frac{I_{SERS}}{N_{SERS}}}{\frac{I_{Raman}}{N_{Raman}}} \right) \quad (4.2)$$

where  $N_{SERS}$  and  $N_{Raman}$  are respectively the number of excited molecules generating the SERS and Raman signal. The value of  $N_{SERS}$  was based on the surface coverage of 4-NBT around a nanodisk. This value was determined based on the coverage ratio given in Saverot *et al.* ( $0.54\text{ molecules/nm}^2$ )<sup>246</sup> and the estimation of the active area of high intensity EM field was approximately  $12,000\text{ nm}^2$  based on figure 5.  $N_{SERS}$  was thus approximately 6,400 molecules. The value of  $N_{Raman}$  was determined based on the Raman scattering from a solution of 4-NBT where the number of 4-NBT molecules present in the solution within the laser interrogation volume was estimated to be approximately  $4 \times 10^7$  molecules.  $I_{SERS}$  and  $I_{Raman}$  were respectively 3,984 counts/s and 3.3 counts/s. This led to an estimated EF of  $10^7$ , which is slightly higher than that reported by Bryche *et al.* for a similar structure<sup>95</sup> and slightly lower than the SERS enhancement of  $10^8$  recently reported on a nanotriangle arrays on a gold film.<sup>247</sup> SERS EF on the order of  $10^7$  to  $10^8$  were reported to be sufficient for single molecule studies<sup>248</sup> and typical SERS EF reported in the literature ranges from  $10^5$  to  $10^7$ ,<sup>249</sup> but can exceed this value in aggregated nanoparticles. In addition to the relatively large EF of the gold-coated nanodisk arrays, the SERS response from different locations was highly reproducible with about 7% of coefficient of variation measured on 576 spots on the gold-coated nanodisk arrays, which was also evident from the relative homogeneity of the SERS intensity on the Raman map (Figure 5). Thus, gold-coated nanodisk arrays can also serve as effective SERS substrates.

Finally, gold-coated nanodisk arrays also conducted electricity due to the continuous gold network and thus, was evaluated as a working electrode for potential spectroelectrochemical applications. Thus, cyclic voltammograms on a  $0.3\text{ cm}^2$  area of gold-coated nanodisk arrays were recorded with  $1.2\text{ mM Fe(CN)}_6^{3-}$  in  $1\text{ M KCl}$ , where a typical

diffusion limited CV was observed confirming the potential of this plasmonic substrate as a working electrode.

### 4.3 Conclusion

In conclusion, we developed gold-coated nanodisk arrays with great potential for biosensing applications. A screening of the plasmonic properties of 16 structures demonstrated that the S/N of the BM<sub>(2)</sub> is superior for thicker gold film and nanodisk heights ( $\geq 50$  nm). The surface sensitivity, refractive index sensitivity and resolution, and FOM were similar for different gold-coated nanodisk arrays and compared advantageously to other plasmonic substrates. A mapping of the SERS intensity and 3D FEM simulations revealed that the plasmonic field of the BM was highly confined at the edges of the nanodisk. This enhanced EM field generated a high SERS EF of approximately  $10^7$ . Moreover, gold-coated nanodisk arrays showed similar surface sensitivity towards protein detection compared to nanohole arrays, a substrate heralded for its sensitivity. We also demonstrated that gold-coated nanodisk arrays can be easily integrated with a 96-well plate reader and we confirmed their great potential for high throughput label-free biosensing. Finally, we showed that these plasmonic substrates can be used as working electrodes and thus, are highly versatile for different applications.

### 4.4 Acknowledgements

The authors thank financial support from the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (MC and JFM), of the Canada Foundation for Innovation (JFM), the Leverhulme Trust through Research Project Grant RPG-2012-758 (KF and SL), from the National Nature Science Foundation of China Grant Nos. 61137005 and 61520106013 (WC and WP), the project support (ANR-11-IDEX-003-02) from the ANR French National Research Agency as well as MS IDI 2012 thesis funding by the IDEX Paris-Saclay, LN2 is an international joint research laboratory, Unité Mixte Internationale UMI 3463, managed by CNRS, Université de Sherbrooke, UdeS, as well as Université de Lyon, UdL, especially including Ecole Centrale de Lyon, INSA Lyon et CPE Lyon, and Université Grenoble-Alpes, UGA.

## Chapitre 5 : Conclusions

En conclusion, cette thèse démontre les performances et le potentiel des réseaux nanostructurés en tant que capteur plasmonique. Les découvertes effectuées lors de cette thèse ont permis d'établir de nombreuses applications de bioanalyse plasmonique. De plus, ces recherches offrent une compréhension approfondie des propriétés plasmoniques des réseaux de nanotrous et de nanodisques. Les résultats présentés dans cette thèse auront un énorme impact dans le domaine des réseaux nanostructurés pour les années à venir.

En effet, dans la littérature, les réseaux de nanotrous ont surtout été étudiés en transmission directe et peu de groupes de recherche se sont intéressés à l'effet de l'angle d'incidence d'excitation ou de la symétrie de rotation du réseau. Ainsi, en tenant compte de ces paramètres, une solution analytique permettant de calculer la position des modes plasmoniques des réseaux de nanotrous a été établie. La conjonction entre les simulations et les résultats empirique a validé la solution analytique élaborée. Ainsi, il est possible d'estimer théoriquement les propriétés plasmoniques des réseaux de nanotrous selon la configuration optique et les paramètres structuraux utilisés. Dans le futur, des groupes de recherches désirant travailler avec des réseaux de nanotrous pourront utiliser cette équation afin de prédire le signal plasmonique selon les propriétés de leur réseau de nanotrous. Ceci est particulièrement important pour des études de SERS où la fréquence de résonance du signal plasmonique du substrat a un impact majeur sur l'exaltation du signal Raman.

Pour continuer, l'excitation des réseaux de nanotrous avec un angle d'incidence élevé a permis d'améliorer la sensibilité en surface de ces structures. Cette découverte est importante puisque l'utilisation des réseaux de nanotrous est souvent limitée dans la littérature à cause d'un manque de sensibilité. Ainsi, la combinaison des réseaux de nanotrou avec un robot lecteur multipuits a permis d'effectuer de la bioanalyse par criblage à haut débit. Ceci représente une belle avancée dans le domaine des biocapteurs plasmonique. En effet, dans la littérature, la bioanalyse par criblage à haut débit avec des réseaux de nanotrous est surtout effectuée à l'aide de puces microfluidiques par imagerie. Donc, aucun groupe de recherche n'avait combiné la technologie des réseaux de nanotrous avec celle d'un lecteur multipuits. D'ailleurs, cette étude fut possible grâce à l'élaboration d'une nouvelle méthode de microfabrication des réseaux de

nanotrous par photolithographie. Cette technique de microfabrication permet de fabriquer des réseaux nanostructurés sur une grande surface avec une haute uniformité.

Pour terminer, la thèse a démontré que les réseaux de nanodisques recouverts d'or ont un énorme potentiel en tant que capteur plasmonique. En effet, ces structures sont simples à fabriquer à grande échelle et ont une FOM ( $\sim 46$ ) élevée par rapport aux nanostructures rapportées dans la littérature. De plus, les réseaux de nanodisques ont une sensibilité en surface similaire au réseau de nanotrous permettant de détecter des concentrations de protéines de l'ordre du nM. Cependant il faut préciser que les réseaux de nanodisques sont excités en transmission directe, contrairement au réseau de nanotrous qui nécessite un angle d'incidence élevé pour bénéficier d'une haute sensibilité. Ce faisant, l'utilisation des réseaux de nanodisques simplifie le design de la plaque et du lecteur multipuits. De plus, ces structures génèrent un EF élevé d'environ  $10^7$  en SERS avec une grande reproductibilité ce qui fait des réseaux de nanodisques des substrats idéals pour des études SERS. En somme, la thèse démontre les performances des réseaux de nanodisques recouverts d'or pour des applications de bioanalyse plasmonique et de SERS.

## 5.1 Perspectives

Cette thèse a démontré le potentiel des réseaux nanostructurés pour de futures applications de bioanalyse. En effet, le lecteur multipuits plasmonique pourrait être utilisés pour étudier une panoplie d'interactions biologiques. D'ailleurs, l'excitation des réseaux de nanodisques génère un signal dans le proche infrarouge ; qui est une zone spectrale où le sang absorbe peu la lumière. Ainsi, il ne serait pas surprenant que dans un avenir proche le lecteur multipuits soit utilisé pour la détection de protéines dans un milieu complexe (e.g : sérum humain). Pour ce faire, une modification à la structure du réseau de nanodisques devrait être apportée. En effet, le chapitre 4 de la thèse a montré une détection modeste de protéines dans l'urine avec les réseaux de nanodisques. Cependant, on estime que la réponse plasmonique est limitée dans un milieu complexe du au confinement intense du champ plasmonique sur le haut et le bas des nanodisques. De ce fait, le capteur plasmonique sonde un nombre limité d'interactions biologiques à l'intérieur de ce champ. Ceci se complique énormément lorsqu'il



faut détecter spécifiquement une faible concentration d'analyte dans une solution déjà saturée en protéines (e.g : sérum). D'ailleurs, une recherche a démontré que la symétrie du champ électromagnétique de réseau de nanodisques est brisée en direction du substrat de verre.<sup>82</sup> Ce qui signifie qu'une portion significative du champ plasmonique sonde davantage à l'intérieur du substrat de verre où aucune interaction biologique ne peut être détecté. En utilisant un réseau de nanodisque suspendu, il serait possible de contourner ce problème et d'amplifier davantage la sensibilité en surface en milieu complexe.

Pour continuer, certaines modifications devraient être apportées au lecteur multipuits afin d'améliorer ses performances. Tout d'abord, le support à plaque du robot devrait être modifié de façon à stabiliser davantage la plaque sur le lecteur. De plus, le système bénéficierait de moteurs qui opèrent plus rapidement et offrent une meilleure précision sur les déplacements de la plaque. Ces modifications permettraient de réduire au minimum la variation du signal plasmonique des capteurs entre différentes mesures. Par la suite, la méthode d'injection des solutions à l'intérieur des puits devrait être améliorée. Présentement, l'injection se fait manuellement à l'aide d'une pipette automatique à multiples canaux. Cette méthode d'injection est lente et augmente les risques d'erreurs. En effet, lors d'une bioanalyse, il est nécessaire de rincer à multiples reprises les puits pour différentes solutions ; ce qui est éreintant pour le manipulateur. Une possible solution à ce problème serait d'utiliser un robot automatisé échantillonneur. Bien que cette option faciliterait les injections, le système serait tout de même limité par le design de la plaque. En effet, avant chaque mesure, la plaque multipuits doit être recouverte d'un plexiglas afin d'aplanir les gouttes à l'intérieur des puits. Tel que démontré au chapitre 3, ceci permettait de collecter efficacement le signal plasmonique des capteurs en solution aqueuse. Cependant, ce processus implique de constamment enlever et remettre le plexiglas entre chaque étape de détection d'une cinétique ; ce qui ralentit le test et augmente les chances d'erreur. Une solution à ces problèmes est de développer un système fluidique intégré à même la plaque multipuits. De cette manière, des dizaines de canaux pourraient être insérés entre diverses colonnes de puits. Ainsi, lors d'un test, la plaque resterait en place sur le support du lecteur et il suffirait d'injecter les solutions dans les divers canaux à l'aide de seringues. De cette façon, la plaque serait constamment fermée, les rinçages seraient simplifiés et le volume

des puits pourrait être ajusté afin de diminuer la consommation de réactifs. De plus, ce type de plaque multipuits permettrait des mesures cinétiques et simplifierait la manipulation de produits biologiquement dangereux (e.g : échantillon clinique, MTX, etc).

Pour terminer, la thèse a démontré les performances des réseaux de nanodisques pour la bioanalyse plasmonique et le SERS. Il serait intéressant de développer une plateforme qui combinerait ces deux techniques. Par exemple, un module d'excitation avec un laser pourrait être ajouté au lecteur multipuits afin d'effectuer des analyses SERS. L'intérêt avec cette approche serait d'élargir la gamme de sensibilité d'un analyte. Par exemple, une bioanalyse plasmonique pourrait être effectuée lors de la liaison de l'analyte avec le récepteur. Par la suite, une détection secondaire, à l'aide d'un anticorps marqué avec un marqueur Raman, serait effectuée en SERS et confirmerait la détection de l'analyte tout en améliorant la sensibilité de la méthode. Finalement, ce même module d'excitation pourrait effectuer des mesures de fluorescence ; ce qui permettrait de combiner la détection plasmonique avec une méthode ELISA.

## Bibliographie

1. Turner, A. P. F., Biosensors: Sense and Sensibility. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 3184-3196.
2. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J. F., Modern Surface Plasmon Resonance for Bioanalytics and Biophysics. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 11190-11216.
3. Glucose Biosensor Market Size & Forecast by End-Use , by Region and Trend Analysis from 2015 to 2022. <http://www.prnewswire.com/news-releases/glucose-biosensor-market-size-forecast-by-end-use--by-region-and-trend-analysis-from-2015-to-2022-300240521.html>, consulté le 5 juillet 2016.
4. Global Biosensors Market (Size of \$12,964 Million in 2014) to Witness 10% Cagr During 2015 - 2020. <http://www.prnewswire.com/news-releases/global-biosensors-market-size-of-12964-million-in-2014-to-witness-10-cagr-during-2015---2020-520003011.html>, consulté le 5 juillet 2016.
5. Bohunicky, B.; Mousa, S. A., Biosensors: The New Wave in Cancer Diagnosis. *Nanotechnology, science and applications* **2010**, *4*, 1-10.
6. Vo-Dinh, T.; Cullum, B., Biosensors and Biochips: Advances in Biological and Medical Diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, *366*, 540-551.
7. Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M., Towards Integrated and Sensitive Surface Plasmon Resonance Biosensors: A Review of Recent Progress. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, *23*, 151-160.
8. Berg, B., et al., Cellphone-Based Hand-Held Microplate Reader for Point-of-Care Testing of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *ACS Nano* **2015**, *9*, 7857-7866.
9. Estevez, M. C.; Otte, M. A.; Sepulveda, B.; Lechuga, L. M., Trends and Challenges of Refractometric Nanoplasmonic Biosensors: A Review. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *806*, 55-73.
10. Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G., Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 494-521.
11. Murray, W. A.; Barnes, W. L., Plasmonic Materials. *Advanced Materials* **2007**, *19*, 3771-3782.
12. Zayats, A. V.; Smolyaninov, II; Maradudin, A. A., Nano-Optics of Surface Plasmon Polaritons. *Physics Reports-Review Section of Physics Letters* **2005**, *408*, 131-314.
13. Homola, J., Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 462-493.
14. Catchpole, K. R.; Polman, A., Plasmonic Solar Cells. *Optics Express* **2008**, *16*, 21793-21800.
15. Lindquist, N. C.; Nagpal, P.; McPeak, K. M.; Norris, D. J.; Oh, S. H., Engineering Metallic Nanostructures for Plasmonics and Nanophotonics. *Reports on Progress in Physics* **2012**, *75*, 1-61.
16. Henzie, J.; Lee, J.; Lee, M. H.; Hasan, W.; Odom, T. W., Nanofabrication of Plasmonic Structures. In *Annual Review of Physical Chemistry*, Annual Reviews: Palo Alto, 2009; Vol. 60, pp 147-165.

17. Dhawan, A.; Canva, M.; Vo-Dinh, T., Narrow Groove Plasmonic Nano-Gratings for Surface Plasmon Resonance Sensing. *Optics Express* **2011**, *19*, 787-813.
18. Han, Y.; Corn, R. M., Characterization and Application of Surface Plasmon-Enhanced Optical Diffraction from Electrodeposited Gold Nanowire Arrays. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 1601-1606.
19. Piliarik, M.; Vala, M.; Tichy, I.; Homola, J., Compact and Low-Cost Biosensor Based on Novel Approach to Spectroscopy of Surface Plasmons. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24*, 3430-3435.
20. 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. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1578-1586.
21. Huang, X. H.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Plasmonic Photothermal Therapy (Ppht) Using Gold Nanoparticles. *Lasers in Medical Science* **2008**, *23*, 217-228.
22. Chung, T.; Lee, S. Y.; Song, E. Y.; Chun, H.; Lee, B., Plasmonic Nanostructures for Nano-Scale Bio-Sensing. *Sensors* **2011**, *11*, 10907-10929.
23. Hu, M.; Chen, J. Y.; Li, Z. Y.; Au, L.; Hartland, G. V.; Li, X. D.; Marquez, M.; Xia, Y. N., Gold Nanostructures: Engineering Their Plasmonic Properties for Biomedical Applications. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 1084-1094.
24. Jones, M. R.; Osberg, K. D.; Macfarlane, R. J.; Langille, M. R.; Mirkin, C. A., Templated Techniques for the Synthesis and Assembly of Plasmonic Nanostructures. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 3736-3827.
25. Li, W. B.; Zhang, L.; Zhou, J. H.; Wu, H. K., Well-Designed Metal Nanostructured Arrays for Label-Free Plasmonic Biosensing. *Journal of Materials Chemistry C* **2015**, *3*, 6479-6492.
26. Wood, R. W., On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Phil. Mag.* **1902**, *4*, 396.
27. Rayleigh, L., Note on the Remarkable Case of Diffraction Spectra Described by Prof. Wood. *Philos. Mag* **1907**, *14*, 60-65.
28. Pines, D., Collective Energy Losses in Solids. *Reviews of Modern Physics* **1956**, *28*, 184-198.
29. Bohm, D.; Pines, D., A Collective Description of Electron Interactions .1. Magnetic Interactions. *Physical Review* **1951**, *82*, 625-634.
30. Pines, D.; Bohm, D., A Collective Description of Electron Interactions .2. Collective Vs Individual Particle Aspects of the Interactions. *Physical Review* **1952**, *85*, 338-353.
31. Ritchie, R. H., Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Physical Review* **1957**, *106*, 874-881.
32. Powell, C. J.; Swan, J. B., Effect of Oxidation on the Characteristic Loss Spectra of Aluminum and Magnesium. *Physical Review* **1960**, *118*, 640-643.
33. Otto, A., *Z. Phys* **1968**, *216*, 398-410.
34. E. Kretschmann, H. R., *Z. Naturforsch.* **1968**, *23*, 2135-2136.
35. Liedberg, B., *Sens. Actuators* **1983**, *4*, 299-304.
36. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G., Surface Plasmon Resonance Sensors: Review. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1999**, *54*, 3-15.
37. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J.-F., High-Resolution Surface Plasmon Resonance Sensors Based on a Dove Prism. *Talanta* **2009**, *77*, 1680-1687.

38. Abbas, A.; Linman, M. J.; Cheng, Q. A., New Trends in Instrumental Design for Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *26*, 1815-1824.
39. Maynard, J. A.; Lindquist, N. C.; Sutherland, J. N.; Lesuffleur, A.; Warrington, A. E.; Rodriguez, M.; Oh, S.-H., Surface Plasmon Resonance for High-Throughput Ligand Screening of Membrane-Bound Proteins. *Biotechnology Journal* **2009**, *4*, 1542-1558.
40. Piliarik, M.; Homola, J., Surface Plasmon Resonance (Spr) Sensors: Approaching Their Limits? *Optics Express* **2009**, *17*, 16505-16517.
41. Zhao, J.; Zhang, X. Y.; Yonzon, C. R.; Haes, A. J.; Van Duyne, R. P., Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Nanomedicine* **2006**, *1*, 219-228.
42. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. In *Annual Review of Physical Chemistry*, Annual Reviews: Palo Alto, 2007; Vol. 58, pp 267-297.
43. Unser, S.; Bruzas, I.; He, J.; Sagle, L., Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing: Current Challenges and Approaches. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2015**, *15*, 15684-716.
44. Guo, L. H.; Jackman, J. A.; Yang, H. H.; Chen, P.; Cho, N. J.; Kim, D. H., Strategies for Enhancing the Sensitivity of Plasmonic Nanosensors. *Nano Today* **2015**, *10*, 213-239.
45. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P., Biosensing with Plasmonic Nanosensors. *Nature Materials* **2008**, *7*, 442-453.
46. Yonzon, C. R.; Jeoungf, E.; Zou, S. L.; 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. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 12669-12676.
47. Haes, A. J.; Van Duyne, R. P., A Unified View of Propagating and Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *379*, 920-930.
48. Couture, M.; Live, L. S.; Dhawan, A.; Masson, J. F., Eot or Kretschmann Configuration? Comparative Study of the Plasmonic Modes in Gold Nanohole Arrays. *Analyst* **2012**, *137*, 4162-4170.
49. 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*, 667-669.
50. Ghaemi, H. F.; Thio, T.; Grupp, D. E.; Ebbesen, T. W.; Lezec, H. J., Surface Plasmons Enhance Optical Transmission through Subwavelength Holes. *Physical Review B* **1998**, *58*, 6779-6782.
51. Genet, C.; Ebbesen, T. W., Light in Tiny Holes. *Nature* **2007**, *445*, 39-46.
52. 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*, 4813-4815.
53. Stewart, M. E.; Mack, N. H.; Malyarchuk, V.; Soares, J.; Lee, T. W.; Gray, S. K.; Nuzzo, R. G.; Rogers, J. A., Quantitative Multispectral Biosensing and 1d Imaging Using Quasi-3d Plasmonic Crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 17143-17148.
54. Gates, B. D.; Xu, Q. B.; Stewart, M.; Ryan, D.; Willson, C. G.; Whitesides, G. M., New Approaches to Nanofabrication: Molding, Printing, and Other Techniques. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1171-1196.

55. Salomon, L.; Grillot, F.; Zayats, A. V.; de Fornel, F., Near-Field Distribution of Optical Transmission of Periodic Subwavelength Holes in a Metal Film. *Physical Review Letters* **2001**, *86*, 1110-1113.
56. Jonsson, M. P.; Dahlin, A. B.; Jönsson, P.; Höök, F., Nanoplasmonic Biosensing with Focus on Short-Range Ordered Nanoholes in Thin Metal Films (Review). *Biointerphases* **2008**, *3*, FD30-FD40.
57. Lohmuller, T., et al., Nano-Porous Electrode Systems by Colloidal Lithography for Sensitive Electrochemical Detection: Fabrication Technology and Properties. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2008**, *18*, 1-11.
58. Menezes, J. W.; Ferreira, J.; Santos, M. J. L.; Cescato, L.; Brolo, A. G., Large-Area Fabrication of Periodic Arrays of Nanoholes in Metal Films and Their Application in Biosensing and Plasmonic-Enhanced Photovoltaics. *Advanced Functional Materials* **2010**, *20*, 3918-3924.
59. Correia-Ledo, D.; Gibson, K. F.; Dhawan, A.; Couture, M.; Tuan, V. D.; Graham, D.; Masson, J. F., Assessing the Location of Surface Plasmons over Nanotriangle and Nanohole Arrays of Different Size and Periodicity. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 6884-6892.
60. Brolo, A. G.; Arctander, E.; Gordon, R.; Leathem, B.; Kavanagh, K. L., Nanohole-Enhanced Raman Scattering. *Nano Letters* **2004**, *4*, 2015-2018.
61. Nakamoto, K.; Kurita, R.; Niwa, O., Electrochemical Surface Plasmon Resonance Measurement Based on Gold Nanohole Array Fabricated by Nanoimprinting Technique. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 3187-3191.
62. Nakamoto, K.; Kurita, R.; Niwa, O.; Fujii, T.; Nishida, M., Development of a Mass-Produced on-Chip Plasmonic Nanohole Array Biosensor. *Nanoscale* **2011**, *3*, 5067-5075.
63. Sharpe, J. C.; Mitchell, J. S.; Lin, L.; Sedoglavich, H.; Blaikie, R. J., Gold Nanohole Array Substrates as Immunobiosensors. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 2244-2249.
64. Masson, J. F.; Murray-Methot, M. P.; Live, L. S., Nanohole Arrays in Chemical Analysis: Manufacturing Methods and Applications. *Analyst* **2010**, *135*, 1483-1489.
65. Escobedo, C., On-Chip Nanohole Array Based Sensing: A Review. *Lab on a Chip* **2013**, *13*, 2445-2463.
66. Gordon, R.; Sinton, D.; Kavanagh, K. L.; Brolo, A. G., A New Generation of Sensors Based on Extraordinary Optical Transmission. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1049-1057.
67. Escobedo, C.; Chou, Y. W.; Rahman, M.; Duan, X. B.; Gordon, R.; Sinton, D.; Brolo, A. G.; Ferreira, J., Quantification of Ovarian Cancer Markers with Integrated Microfluidic Concentration Gradient and Imaging Nanohole Surface Plasmon Resonance. *Analyst* **2013**, *138*, 1450-1458.
68. Lesuffleur, A.; Im, H.; Lindquist, N. C.; Lim, K. S.; Oh, S. H., Laser-Illuminated Nanohole Arrays for Multiplex Plasmonic Microarray Sensing. *Optics Express* **2008**, *16*, 219-224.
69. 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. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 2491-2498.
70. Im, H.; Sutherland, J. N.; Maynard, J. A.; Oh, S.-H., Nanohole-Based Surface Plasmon Resonance Instruments with Improved Spectral Resolution Quantify a Broad Range of Antibody-Ligand Binding Kinetics. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 1941-1947.

71. Murray-Methot, M. P.; Ratel, M.; Masson, J. F., Optical Properties of Au, Ag, and Bimetallic Au on Ag Nanohole Arrays. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 8268-8275.
72. Pang, L.; Hwang, G. M.; Slutsky, B.; Fainman, Y., Spectral Sensitivity of Two-Dimensional Nanohole Array Surface Plasmon Polariton Resonance Sensor. *Applied Physics Letters* **2007**, *91*, 1-3.
73. Im, H.; Lesuffleur, A.; Lindquist, N. C.; Oh, S. H., Plasmonic Nanoholes in a Multichannel Microarray Format for Parallel Kinetic Assays and Differential Sensing. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 2854-2859.
74. De Leebeek, A.; Kumar, L. K. S.; de Lange, V.; Sinton, D.; Gordon, R.; Brolo, A. G., On-Chip Surface-Based Detection with Nanohole Arrays. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 4094-4100.
75. Ferreira, J.; Santos, M. J. L.; Rahman, M. M.; Brolo, A. G.; Gordon, R.; Sinton, D.; Girotto, E. M., Attomolar Protein Detection Using in-Hole Surface Plasmon Resonance. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 436-437.
76. Escobedo, C.; Brolo, A. G.; Gordon, R.; Sinton, D., Flow-through Vs Flow-Over: Analysis of Transport and Binding in Nanohole Array Plasmonic Biosensors. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 10015-10020.
77. Eftekhari, F.; Escobedo, C.; Ferreira, J.; Duan, X. B.; Girotto, E. M.; Brolo, A. G.; Gordon, R.; Sinton, D., Nanoholes as Nanochannels: Flow-through Plasmonic Sensing. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 4308-4311.
78. Kumar, S.; Cherukulappurath, S.; Johnson, T. W.; Oh, S. H., Millimeter-Sized Suspended Plasmonic Nanohole Arrays for Surface-Tension-Driven Flow-through Sers. *Chemistry of Materials* **2014**, *26*, 6523-6530.
79. Poirier-Richard, H. P.; Couture, M.; Brule, T.; Masson, J. F., Metal-Enhanced Fluorescence and Fret on Nanohole Arrays Excited at Angled Incidence. *Analyst* **2015**, *140*, 4792-4798.
80. 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. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 3404-3406.
81. 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. *Journal of Applied Physics* **2008**, *103*, 1-9.
82. Otte, M. A.; Estevez, M. C.; Carrascosa, L. G.; Gonzalez-Guerrero, A. B.; Lechuga, L. M.; Sepulveda, B., Improved Biosensing Capability with Novel Suspended Nanodisks. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 5344-5351.
83. Lin, E. H.; Pan, M. Y.; Lee, M. C.; Wei, P. K., Enhancing DNA Binding Rate Using Optical Trapping of High-Density Gold Nanodisks. *Aip Advances* **2014**, *4*, 1-6.
84. Chu, Y. Z.; Crozier, K. B., Experimental Study of the Interaction between Localized and Propagating Surface Plasmons. *Optics Letters* **2009**, *34*, 244-246.
85. Sung, J.; Hicks, E. M.; Van Duyne, R. P.; Spears, K. G., Nanoparticle Spectroscopy: Plasmon Coupling in Finite-Sized Two-Dimensional Arrays of Cylindrical Silver Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 4091-4096.
86. Haynes, C. L.; McFarland, A. D.; Zhao, L.; Van Duyne, R. P.; Schatz, G. C.; Gunnarsson, L.; Prikulis, J.; Kasemo, B.; Käll, M., Nanoparticle Optics: The Importance of Radiative Dipole Coupling in Two-Dimensional Nanoparticle Arrays. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 7337-7342.

87. Wang, L.; Nishijima, Y.; Ueno, K.; Misawa, H.; Tamai, N., Effect of Dipole Coupling on near-IR LSPR and Coherent Phonon Vibration of Periodic Gold Pair Nanocuboids. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 17838-17846.
88. Jiang, H.; Li, T. J.; Ertorer, E.; Yang, J.; Sabarinathan, J.; Mittler, S., A Biosensor Based on Periodic Arrays of Gold Nanodisks under Normal Transmission. *Sensors and Actuators A-Physical* **2013**, *189*, 474-480.
89. Shioi, M.; Jans, H.; Lodewijks, K.; Van Dorpe, P.; Lagae, L.; Kawamura, T., Tuning the Interaction between Propagating and Localized Surface Plasmons for Surface Enhanced Raman Scattering in Water for Biomedical and Environmental Applications. *Applied Physics Letters* **2014**, *104*, 1-4.
90. Chu, Y. Z.; Banaee, M. G.; Crozier, K. B., Double-Resonance Plasmon Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering with Enhancement at Excitation and Stokes Frequencies. *Acs Nano* **2010**, *4*, 2804-2810.
91. Liu, G. Q.; Yu, M. D.; Liu, Z. Q.; Liu, X. S.; Huang, S.; Pan, P. P.; Wang, Y.; Liu, M. L.; Gu, G., One-Process Fabrication of Metal Hierarchical Nanostructures with Rich Nanogaps for Highly-Sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 1-9.
92. Sarkar, M.; Bryche, J.-F.; Moreau, J.; Besbes, M.; Barbillon, G.; Bartenlian, B.; Canva, M., Generalized Analytical Model Based on Harmonic Coupling for Hybrid Plasmonic Modes: Comparison with Numerical and Experimental Results. *Optics Express* **2015**, *23*, 27376-27390.
93. Sarkar, M.; Besbes, M.; Moreau, J.; Bryche, J. F.; Olivero, A.; Barbillon, G.; Coutrot, A. L.; Bartenlian, B.; Canva, M., Hybrid Plasmonic Mode by Resonant Coupling of Localized Plasmons to Propagating Plasmons in a Kretschmann Configuration. *Acs Photonics* **2015**, *2*, 237-245.
94. Bryche, J. F., et al., Density Effect of Gold Nanodisks on the SERS Intensity for a Highly Sensitive Detection of Chemical Molecules. *Journal of Materials Science* **2015**, *50*, 6601-6607.
95. Gillibert, R.; Sarkar, M.; Bryche, J. F.; Yasukuni, R.; Moreau, J.; Besbes, M.; Barbillon, G.; Bartenlian, B.; Canva, M.; de la Chapelle, M. L., Directional Surface Enhanced Raman Scattering on Gold Nano-Gratings. *Nanotechnology* **2016**, *27*, 1-8.
96. McKeating, K. S.; Aube, A.; Masson, J. F., Biosensors and Nanobiosensors for Therapeutic Drug and Response Monitoring. *Analyst* **2016**, *141*, 429-449.
97. Gopinath, S. C. B., Biosensing Applications of Surface Plasmon Resonance-Based Biacore Technology. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2010**, *150*, 722-733.
98. Pattnaik, P., Surface Plasmon Resonance - Applications in Understanding Receptor-Ligand Interaction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2005**, *126*, 79-92.
99. Olaru, A.; Bala, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Aboul-Enein, H. Y., Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2015**, *45*, 97-105.
100. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2008.
101. Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G. M., The Interaction of Proteins and Cells with Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold and Silver. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **1999**, *15*, 3-30.
102. Cooper, M. A., Label-Free Screening of Bio-Molecular Interactions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 834-842.
103. Langmuir, I., The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum. *Journal of the American Chemical Society* **1918**, *40*, 1361-1403.



104. Oshannessy, D. J.; Winzor, D. J., Interpretation of Deviations from Pseudo-First-Order Kinetic Behavior in the Characterization of Ligand Binding by Biosensor Technology. *Analytical Biochemistry* **1996**, *236*, 275-283.
105. Atkins P.W.; De Paula J., *Chimie Physique*; De Boeck: Bruxelles, 2004.
106. 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*, 5636-5648.
107. Mullett, W. M.; Lai, E. P. C.; Yeung, J. M., Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays. *Methods-a Companion to Methods in Enzymology* **2000**, *22*, 77-91.
108. Shankaran, D. R.; Gobi, K. V. A.; Miura, N., Recent Advancements in Surface Plasmon Resonance Immunosensors for Detection of Small Molecules of Biomedical, Food and Environmental Interest. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, *121*, 158-177.
109. Rusmini, F.; Zhong, Z. Y.; Feijen, J., Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775-1789.
110. 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. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1103-1169.
111. Lofas, S.; Johnsson, B.; Edstrom, A.; Hansson, A.; Lindquist, G.; Hillgren, R. M. M.; Stigh, L., Methods for Site Controlled Coupling to Carboxymethyl-dextran Surfaces in Surface-Plasmon Resonance Sensors. *Biosensors & Bioelectronics* **1995**, *10*, 813-822.
112. Dutra, R. F.; Kubota, L. T., An Spr Immunosensor for Human Cardiac Troponin T Using Specific Binding Avidin to Biotin at Carboxymethyl-dextran-Modified Gold Chip. *Clinica Chimica Acta* **2007**, *376*, 114-120.
113. Gobi, K. V.; Iwasaka, H.; Miura, N., Self-Assembled Peg Monolayer Based Spr Immunosensor for Label-Free Detection of Insulin. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, *22*, 1382-1389.
114. Lee, W.; Oh, B. K.; Bae, Y. M.; Paek, S. H.; Lee, W. H.; Choi, J. W., Fabrication of Self-Assembled Protein a Monolayer and Its Application as an Immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, *19*, 185-192.
115. Revell, D. J.; Knight, J. R.; Blyth, D. J.; Haines, A. H.; Russell, D. A., Self-Assembled Carbohydrate Monolayers: Formation and Surface Selective Molecular Recognition. *Langmuir* **1998**, *14*, 4517-4524.
116. Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C., Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1805-1834.
117. Altintas, Z.; Uludag, Y.; Gurbuz, Y.; Tohill, I., Development of Surface Chemistry for Surface Plasmon Resonance Based Sensors for the Detection of Proteins and DNA Molecules. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *712*, 138-144.
118. 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*, 1823-1835.
119. Soler, M., et al., Highly Sensitive Dendrimer-Based Nanoplasmonic Biosensor for Drug Allergy Diagnosis. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *66*, 115-123.
120. Rojo, N.; Ercilla, G.; Haro, I., Gb Virus C (Gbv-C) Hepatitis G Virus (Hgv): Towards the Design of Synthetic Peptides-Based Biosensors for Immunodiagnosis of Gbv-C/Hgv Infection. *Current Protein & Peptide Science* **2003**, *4*, 291-298.

121. Bolduc, O. R., et al., Modified Peptide Monolayer Binding His-Tagged Biomolecules for Small Ligand Screening with Spr Biosensors. *Analytist* **2011**, *136*, 3142-3148.
122. Blaszykowski, C.; Sheikh, S.; Thompson, M., Surface Chemistry to Minimize Fouling from Blood-Based Fluids. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 5599-5612.
123. Choi, S.; Chae, J., Methods of Reducing Non-Specific Adsorption in Microfluidic Biosensors. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2010**, *20*, 1-9.
124. Li, L. Y.; Chen, S. F.; Zheng, J.; Ratner, B. D.; Jiang, S. Y., Protein Adsorption on Oligo(Ethylene Glycol)-Terminated Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers: The Molecular Basis for Nonfouling Behavior. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 2934-2941.
125. Bolduc, O. R.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Spr Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide Sam. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 3699-3706.
126. Aube, A.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Non-Specific Adsorption of Crude Cell Lysate on Surface Plasmon Resonance Sensors. *Langmuir* **2013**, *29*, 10141-10148.
127. Vaisocherova, H.; Yang, W.; Zhang, Z.; Cao, Z. Q.; Cheng, G.; Piliarik, M.; Homola, J.; Jiang, S. Y., Ultralow Fouling and Functionalizable Surface Chemistry Based on a Zwitterionic Polymer Enabling Sensitive and Specific Protein Detection in Undiluted Blood Plasma. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 7894-7901.
128. Zhao, S. S.; Bukar, N.; Toulouse, J. L.; Pelechacz, D.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Miniature Multi-Channel Spr Instrument for Methotrexate Monitoring in Clinical Samples. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *64*, 664-670.
129. Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P., Surface Raman Spectroelectrochemistry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1977**, *84*, 1-20.
130. Sharma, B.; Frontiera, R. R.; Henry, A. I.; Ringe, E.; Van Duyne, R. P., Sers: Materials, Applications, and the Future. *Materials Today* **2012**, *15*, 16-25.
131. 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. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *693*, 7-25.
132. Meyer, S. A.; Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Quantifying Resonant Raman Cross Sections with Sers. *Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114*, 5515-5519.
133. Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C.; Van Duyne, R. R., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. In *Annual Review of Analytical Chemistry*, Annual Reviews: Palo Alto, 2008; Vol. 1, pp 601-626.
134. 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. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13*, 11551-11567.
135. Schlucker, S., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications. *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, *53*, 4756-4795.
136. McNay, G.; Eustace, D.; Smith, W. E.; Faulds, K.; Graham, D., Surface-Enhanced Raman Scattering (Sers) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (Serrs): A Review of Applications. *Applied Spectroscopy* **2011**, *65*, 825-837.
137. Dieringer, J. A.; McFarland, A. D.; Shah, N. C.; Stuart, D. A.; Whitney, A. V.; Yonzon, C. R.; Young, M. A.; Zhang, X. Y.; Van Duyne, R. P., Surface Enhanced Raman Spectroscopy: New Materials, Concepts, Characterization Tools, and Applications. *Faraday Discussions* **2006**, *132*, 9-26.

138. Cialla, D.; Marz, A.; Bohme, R.; Theil, F.; Weber, K.; Schmitt, M.; Popp, J., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (Sers): Progress and Trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403*, 27-54.
139. Braun, G.; Lee, S. J.; Dante, M.; Nguyen, T. Q.; Moskovits, M.; Reich, N., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for DNA Detection by Nanoparticle Assembly onto Smooth Metal Films. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 6378-6379.
140. Shiohara, A.; Wang, Y. S.; Liz-Marzan, L. M., Recent Approaches toward Creation of Hot Spots for Sers Detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews* **2014**, *21*, 2-25.
141. McFarland, A. D.; Young, M. A.; Dieringer, J. A.; Van Duyne, R. P., Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 11279-11285.
142. Tseng, A. A., Recent Developments in Nanofabrication Using Focused Ion Beams. *Small* **2005**, *1*, 924-939.
143. *Recent Advances in Nanofabrication Techniques and Applications*; InTech, 2011.
144. Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P., Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 5599-5611.
145. Qin, D.; Xia, Y. N.; Rogers, J. A.; Jackman, R. J.; Zhao, X. M.; Whitesides, G. M., Microfabrication, Microstructures and Microsystems. *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science* **1998**, *194*, 1-20.
146. Breault-Turcot, J.; Poirier-Richard, H. P.; Couture, M.; Pelechacz, D.; Masson, J. F., Single Chip Spr and Fluorescent Elisa Assay of Prostate Specific Antigen. *Lab on a Chip* **2015**, *15*, 4433-4440.
147. Fourkas, J. T.; Petersen, J. S., 2-Colour Photolithography. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 8731-8750.
148. Totzeck, M.; Ulrich, W.; Gohnermeier, A.; Kaiser, W., Semiconductor Fabrication - Pushing Deep Ultraviolet Lithography to Its Limits. *Nature Photonics* **2007**, *1*, 629-631.
149. Seo, J. H.; Park, J. H.; Kim, S. I.; Park, B. J.; Ma, Z. Q.; Choi, J.; Ju, B. K., Nanopatterning by Laser Interference Lithography: Applications to Optical Devices. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2014**, *14*, 1521-1532.
150. Ertorer, E.; Vasefi, F.; Keshwah, J.; Najiminaini, M.; Halfpap, C.; Langbein, U.; Carson, J. J. L.; Hamilton, D. W.; Mittler, S., Large Area Periodic, Systematically Changing, Multishape Nanostructures by Laser Interference Lithography and Cell Response to These Topographies. *Journal of Biomedical Optics* **2013**, *18*, 1-8.
151. Wong, T. I., et al., High Throughput and High Yield Nanofabrication of Precisely Designed Gold Nanohole Arrays for Fluorescence Enhanced Detection of Biomarkers. *Lab on a Chip* **2013**, *13*, 2405-2413.
152. Guo, L. J., Nanoimprint Lithography: Methods and Material Requirements. *Advanced Materials* **2007**, *19*, 495-513.
153. Song, H. Y.; Wong, T. I.; Sadovoy, A.; Wu, L.; Bai, P.; Deng, J.; Guo, S. F.; Wang, Y.; Knoll, W. G.; Zhou, X. D., Imprinted Gold 2d Nanoarray for Highly Sensitive and Convenient Psa Detection Via Plasmon Excited Quantum Dots. *Lab on a Chip* **2015**, *15*, 253-263.
154. Kooy, N.; Mohamed, K.; Pin, L. T.; Guan, O. S., A Review of Roll-to-Roll Nanoimprint Lithography. *Nanoscale Research Letters* **2014**, *9*, 13.

155. Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-Enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems. *Plasmonics* **2007**, *2*, 107-118.
156. Garcia-Vidal, F. J.; Martin-Moreno, L.; Ebbesen, T. W.; Kuipers, L., Light Passing through Subwavelength Apertures. *Reviews of Modern Physics* **2010**, *82*, 729-787.
157. Lee, S. H.; Bantz, K. C.; Lindquist, N. C.; Oh, S. H.; Haynes, C. L., Self-Assembled Plasmonic Nanohole Arrays. *Langmuir* **2009**, *25*, 13685-13693.
158. Yokogawa, S.; Burgos, S. P.; Atwater, H. A., Plasmonic Color Filters for Cmos Image Sensor Applications. *Nano Letters* **2012**, *12*, 4349-4354.
159. Hwang, G. M.; Pang, L.; Mullen, E. H.; Fainman, Y., Plasmonic Sensing of Biological Analytes through Nanoholes. *Ieee Sensors Journal* **2008**, *8*, 2074-2079.
160. Chan, C. Y.; Xu, J. B.; Wayne, M. Y.; Ong, H. C., Angle Resolved Surface Enhanced Raman Scattering (Sers) on Two-Dimensional Metallic Arrays with Different Hole Sizes. *Applied Physics Letters* **2010**, *96*, 1-3.
161. Barnes, W. L.; Murray, W. A.; Dintinger, J.; Devaux, E.; Ebbesen, T. W., Surface Plasmon Polaritons and Their Role in the Enhanced Transmission of Light through Periodic Arrays of Subwavelength Holes in a Metal Film. *Physical Review Letters* **2004**, *92*, 107401.
162. Gao, H. W.; Zhou, W.; Odom, T. W., Plasmonic Crystals: A Platform to Catalog Resonances from Ultraviolet to near-Infrared Wavelengths in a Plasmonic Library. *Advanced Functional Materials* **2010**, *20*, 529-539.
163. Shen, Y.; Chen, X.; Dou, Z. J.; Johnson, N. P.; Zhou, Z. K.; Wang, X. H.; Jin, C. J., Tuning the Plasmon Resonance of a Nano-Mouth Array. *Nanoscale* **2012**, *4*, 5576-5580.
164. Bottomley, A.; Prezgot, D.; Staff, A.; Ianoul, A., Fine Tuning of Plasmonic Properties of Monolayers of Weakly Interacting Silver Nanocubes on Thin Silicon Films. *Nanoscale* **2012**, *4*, 6374-6382.
165. Liu, M.; Song, Y.; Zhang, Y.; Wang, X.; Jin, C., Mode Evolution and Transmission Suppression in a Perforated Ultrathin Metallic Film with a Triangular Array of Holes. *Plasmonics* **2012**, *7*, 397-410.
166. Braun, J.; Gompf, B.; Kobiela, G.; Dressel, M., How Holes Can Obscure the View: Suppressed Transmission through an Ultrathin Metal Film by a Subwavelength Hole Array. *Physical Review Letters* **2009**, *103*, 4.
167. Spevak, I. S.; Nikitin, A. Y.; Bezuglyi, E. V.; Levchenko, A.; Kats, A. V., Resonantly Suppressed Transmission and Anomalously Enhanced Light Absorption in Periodically Modulated Ultrathin Metal Films. *Physical Review B* **2009**, *79*, 161406.
168. Lee, S. H.; Johnson, T. W.; Lindquist, N. C.; Im, H.; Norris, D. J.; Oh, S. H., Linewidth-Optimized Extraordinary Optical Transmission in Water with Template-Stripped Metallic Nanohole Arrays. *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 4439-4446.
169. Hao, E.; Schatz, G. C., Electromagnetic Fields around Silver Nanoparticles and Dimers. *The Journal of Chemical Physics* **2004**, *120*, 357-366.
170. Yang, Z. L.; Li, Q. H.; Ren, B.; Tian, Z. Q., Tunable Sers from Aluminium Nanohole Arrays in the Ultraviolet Region. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 3909-3911.
171. Yu, Q.; Golden, G., Probing the Protein Orientation on Charged Self-Assembled Monolayers on Gold Nanohole Arrays by Sers. *Langmuir* **2007**, *23*, 8659-8662.
172. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Uv-Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 4215-4221.

173. Grubisha, D. S.; Lipert, R. J.; Park, H.-Y.; Driskell, J.; Porter, M. D., Femtomolar Detection of Prostate-Specific Antigen: An Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Immunogold Labels. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 5936-5943.
174. Wang, G.; Park, H.-Y.; Lipert, R. J.; Porter, M. D., Mixed Monolayers on Gold Nanoparticle Labels for Multiplexed Surface-Enhanced Raman Scattering Based Immunoassays. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 9643-9650.
175. Taflove, A.; Hagness, S. C., *Computational Electrodynamics: The Finite-Difference Time Domain Method*; Artech House: Norwood, 2000.
176. Rodrigo, S. G.; García-Vidal, F. J.; Martín-Moreno, L., Influence of Material Properties on Extraordinary Optical Transmission through Hole Arrays. *Physical Review B* **2008**, *77*, 075401.
177. Odom, T. W., Materials Screening and Applications of Plasmonic Crystals. *MRS Bulletin* **2010**, *35*, 66-73.
178. Gao, H.; Yang, J.-C.; Lin, J. Y.; Stuparu, A. D.; Lee, M. H.; Mrksich, M.; Odom, T. W., Using the Angle-Dependent Resonances of Molded Plasmonic Crystals to Improve the Sensitivities of Biosensors. *Nano Letters* **2010**, *10*, 2549-2554.
179. Yang, J.-C.; Gao, H.; Suh, J. Y.; Zhou, W.; Lee, M. H.; Odom, T. W., Enhanced Optical Transmission Mediated by Localized Plasmons in Anisotropic, Three-Dimensional Nanohole Arrays. *Nano Letters* **2010**, *10*, 3173-3178.
180. Homola, J., Present and Future of Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 528-539.
181. Kvasnička, P.; Homola, J., Optical Sensors Based on Spectroscopy of Localized Surface Plasmons on Metallic Nanoparticles: Sensitivity Considerations. *Biointerphases* **2008**, *3*, FD4-FD11.
182. Maria, J.; Truong, T. T.; Yao, J.; Lee, T.-W.; Nuzzo, R. G.; Leyffer, S.; Gray, S. K.; Rogers, J. A., Optimization of 3d Plasmonic Crystal Structures for Refractive Index Sensing. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 10493-10499.
183. Lee, K.-L.; Wang, W.-S.; Wei, P.-K., Comparisons of Surface Plasmon Sensitivities in Periodic Gold Nanostructures. *Plasmonics* **2008**, *3*, 119-125.
184. 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. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 6961-6968.
185. Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y., 1. Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold: Construction and Thickness Determination. *Langmuir* **1997**, *13*, 3422-3426.
186. Camden, J. P.; Dieringer, J. A.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P., Controlled Plasmonic Nanostructures for Surface-Enhanced Spectroscopy and Sensing. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1653-1661.
187. Decher, G., Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.
188. Kim, H.-J.; Lee, K.; Kumar, S.; Kim, J., Dynamic Sequential Layer-by-Layer Deposition Method for Fast and Region-Selective Multilayer Thin Film Fabrication. *Langmuir* **2005**, *21*, 8532-8538.
189. Hoda, N.; Larson, R. G., Modeling the Buildup of Exponentially Growing Polyelectrolyte Multilayer Films. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 4232-4241.

190. Gittins, D. I.; Caruso, F., Multilayered Polymer Nanocapsules Derived from Gold Nanoparticle Templates. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 1947-1949.
191. Jiang, C. Y.; Markutsya, S.; Tsukruk, V. V., Collective and Individual Plasmon Resonances in Nanoparticle Films Obtained by Spin-Assisted Layer-by-Layer Assembly. *Langmuir* **2004**, *20*, 882-890.
192. Von Klitzing, R.; Wong, J. E.; Jaeger, W.; Steitz, R., Short Range Interactions in Polyelectrolyte Multilayers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, *9*, 158-162.
193. Lee, S. J.; Youn, B. S.; Park, J. W.; Niazi, J. H.; Kim, Y. S.; Gu, M. B., Ssdna Aptamer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensor for the Detection of Retinol Binding Protein 4 for the Early Diagnosis of Type 2 Diabetes. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 2867-2873.
194. Huang, L.; Reekmans, G.; Saerens, D.; Friedt, J. M.; Frederix, F.; Francis, L.; Muyldermans, S.; Campitelli, A.; Van Hoof, C., Prostate-Specific Antigen Immunosensing Based on Mixed Self-Assembled Monolayers, Camel Antibodies and Colloidal Gold Enhanced Sandwich Assays. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *21*, 483-490.
195. Navratilova, I.; Hopkins, A. L., Emerging Role of Surface Plasmon Resonance in Fragment-Based Drug Discovery. *Future Medicinal Chemistry* **2011**, *3*, 1809-1820.
196. He, L.; Musick, M. D.; Nicewarner, S. R.; Salinas, F. G.; Benkovic, S. J.; Natan, M. J.; Keating, C. D., Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9071-9077.
197. Stevens, R. C.; Soelberg, S. D.; Eberhart, B. T. L.; Spencer, S.; Wekell, J. C.; Chinowsky, T. M.; Trainer, V. L.; Furlong, C. E., Detection of the Toxin Domoic Acid from Clam Extracts Using a Portable Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Harmful Algae* **2007**, *6*, 166-174.
198. Vaisocherova, H.; Faca, V. M.; Taylor, A. D.; Hanash, S.; Jiang, S. Y., Comparative Study of Spr and Elisa Methods Based on Analysis of Cd166/Alcam Levels in Cancer and Control Human Sera. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24*, 2143-2148.
199. Campbell, K.; Huet, A. C.; Charlier, C.; Higgins, C.; Delahaut, P.; Elliott, C. T., Comparison of Elisa and Spr Biosensor Technology for the Detection of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, *877*, 4079-4089.
200. Zhang, J. L.; Wang, Y.; Wong, T. I.; Liu, X. H.; Zhou, X. D.; Liedberg, B., Electrofocusing-Enhanced Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Nanoscale* **2015**, *7*, 17244-17248.
201. Couture, M.; Liang, Y. Z.; Richard, H. P. P.; Faid, R.; Peng, W.; Masson, J. F., Tuning the 3d Plasmon Field of Nanohole Arrays. *Nanoscale* **2013**, *5*, 12399-12408.
202. Gann, P. H.; Hennekens, C. H.; Stampfer, M. J., A Prospective Evaluation of Plasma Prostate-Specific Antigen for Detection of Prostatic-Cancer. *Jama-Journal of the American Medical Association* **1995**, *273*, 289-294.
203. Valsecchi, C.; Brolo, A. G., Periodic Metallic Nanostructures as Plasmonic Chemical Sensors. *Langmuir* **2013**, *29*, 5638-5649.
204. Pease, R. F.; Chou, S. Y., Lithography and Other Patterning Techniques for Future Electronics. *Proceedings of the Ieee* **2008**, *96*, 248-270.
205. Kim, H. D.; Yoon, G. W.; Yeon, J.; Lee, J. H.; Yoon, J. B., Fabrication of a Uniform Microlens Array over a Large Area Using Self-Aligned Diffuser Lithography (Sadl). *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2012**, *22*, 1-7.

206. Mao, X.; Yang, J. L.; Ji, A.; Yang, F. H., Two New Methods to Improve the Lithography Precision for Su-8 Photoresist on Glass Substrate. *Journal of Microelectromechanical Systems* **2013**, *22*, 124-130.
207. Live, L. S.; Dhawan, A.; Gibson, K. F.; Poirier-Richard, H. P.; Graham, D.; Canva, M.; Vo-Dinh, T.; Masson, J. F., Angle-Dependent Resonance of Localized and Propagating Surface Plasmons in Microhole Arrays for Enhanced Biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *404*, 2859-2868.
208. Rusling, J. F.; Kumar, C. V.; Gutkind, J. S.; Patel, V., Measurement of Biomarker Proteins for Point-of-Care Early Detection and Monitoring of Cancer. *Analyst* **2010**, *135*, 2496-2511.
209. Walling, J., From Methotrexate to Pemetrexed and Beyond. A Review of the Pharmacodynamic and Clinical Properties of Antifolates. *Investigational New Drugs* **2006**, *24*, 37-77.
210. Blum, R.; Seymour, J. F.; Toner, G., Significant Impairment of High-Dose Methotrexate Clearance Following Vancomycin Administration in the Absence of Overt Renal Impairment. *Annals of Oncology* **2002**, *13*, 327-330.
211. Yockell-Lelievre, H.; Bukar, N.; Toulouse, J. L.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Naked-Eye Nanobiosensor for Therapeutic Drug Monitoring of Methotrexate. *Analyst* **2015**, *141*, 697-703.
212. Crom, W. R.; Evans, W. E., Methotrexate in Applied Pharmacokinetics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring. Evans, W. E.; Schentag, J. J.; Jusko, W. J., Eds. Applied Therapeutics Inc.: Vancouver, 1992; pp 1-42.
213. Breault-Turcot, J.; Masson, J.-F., Nanostructured Substrates for Portable and Miniature Spr Biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403*, 1477-1484.
214. Grzelczak, M.; Perez-Juste, J.; Mulvaney, P.; Liz-Marzan, L. M., Shape Control in Gold Nanoparticle Synthesis. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 1783-1791.
215. Tao, A. R.; Habas, S.; Yang, P., Shape Control of Colloidal Metal Nanocrystals. *Small* **2008**, *4*, 310-325.
216. Cao, J.; Sun, T.; Grattan, K. T. V., Gold Nanorod-Based Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors: A Review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *195*, 332-351.
217. Underwood, S.; Mulvaney, P., Effect of the Solution Refractive Index on the Color of Gold Colloids. *Langmuir* **1994**, *10*, 3427-3430.
218. Chen, H.; Kou, X.; Yang, Z.; Ni, W.; Wang, J., Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24*, 5233-5237.
219. Nehl, C. L.; Liao, H.; Hafner, J. H., Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles. *Nano Letters* **2006**, *6*, 683-688.
220. 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. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 10596-10604.
221. Lodewijks, K.; Van Roy, W.; Borghs, G.; Lagae, L.; Van Dorpe, P., Boosting the Figure-of-Merit of Lspr-Based Refractive Index Sensing by Phase-Sensitive Measurements. *Nano Letters* **2012**, *12*, 1655-1659.
222. Bukasov, R.; Shumaker-Parry, J. S., Highly Tunable Infrared Extinction Properties of Gold Nanocrescents. *Nano Letters* **2007**, *7*, 1113-1118.

223. Yun-Chorng, C.; Hsin-Chan, C.; Sih-Chen, L.; Tzung-Fang, G., A Large-Scale Sub-100 Nm Au Nanodisk Array Fabricated Using Nanospherical-Lens Lithography: A Low-Cost Localized Surface Plasmon Resonance Sensor. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 095302.
224. Bahramipناه, M.; Dutta-Gupta, S.; Abasahl, B.; Martin, O. J. F., Cavity-Coupled Plasmonic Device with Enhanced Sensitivity and Figure-of-Merit. *ACS Nano* **2015**, *9*, 7621-7633.
225. Lee, K.-L.; Huang, J.-B.; Chang, J.-W.; Wu, S.-H.; Wei, P.-K., Ultrasensitive Biosensors Using Enhanced Fano Resonances in Capped Gold Nanoslit Arrays. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 8547.
226. Kelf, T. A.; Sugawara, Y.; Cole, R. M.; Baumberg, J. J.; Abdelsalam, M. E.; Cintra, S.; Mahajan, S.; Russell, A. E.; Bartlett, P. N., Localized and Delocalized Plasmons in Metallic Nanovoids. *Physical Review B* **2006**, *74*.
227. Leong, H.-S.; Guo, J.; Lindquist, R. G.; Liu, Q. H., Surface Plasmon Resonance in Nanostructured Metal Films under the Kretschmann Configuration. *Journal of Applied Physics* **2009**, *106*, 124314.
228. Couture, M.; Ray, K. K.; Poirier-Richard, H.-P.; Crofton, A.; Masson, J.-F., 96-Well Plasmonic Sensing with Nanohole Arrays. *ACS Sensors* **2016**, *1*, 287-294.
229. Kearns, H.; Bedics, M. A.; Shand, N. C.; Faulds, K.; Detty, M. R.; Graham, D., Sensitive Sers Nanotags for Use with 1550 Nm (Retina-Safe) Laser Excitation. *Analyst* **2016**.
230. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P., Biosensing with Plasmonic Nanosensors. *Nat Mater* **2008**, *7*, 442-453.
231. Offermans, P.; Schaafsma, M. C.; Rodriguez, S. R. K.; Zhang, Y.; Crego-Calama, M.; Brongersma, S. H.; Rivas, J. G., Universal Scaling of the Figure of Merit of Plasmonic Sensors. *ACS Nano* **2011**, *5*, 5151-5157.
232. Ye, J.; Van Dorpe, P., Improvement of Figure of Merit for Gold Nanobar Array Plasmonic Sensors. *Plasmonics* **2011**, *6*, 665-671.
233. Liu, J.; Xu, B.; Zhang, J.; Song, G., Double Plasmon-Induced Transparency in Hybrid Waveguide-Plasmon System and Its Application for Localized Plasmon Resonance Sensing with High Figure of Merit. *Plasmonics* **2013**, *8*, 995-1001.
234. Lassiter, J. B.; Sobhani, H.; Fan, J. A.; Kundu, J.; Capasso, F.; Nordlander, P.; Halas, N. J., Fano Resonances in Plasmonic Nanoclusters: Geometrical and Chemical Tunability. *Nano Letters* **2010**, *10*, 3184-3189.
235. Shen, Y.; Liu, T.; Zhu, Q.; Wang, J.; Jin, C., Dislocated Double-Layered Metal Gratings: Refractive Index Sensors with High Figure of Merit. *Plasmonics* **2015**, *10*, 1489-1497.
236. Lan, G.; Liu, S.; Ma, Y.; Zhang, X.; Wang, Y.; Song, Y., Sensitivity and Figure-of-Merit Enhancements of Liquid-Prism Spr Sensor in the Angular Interrogation. *Optics Communications* **2015**, *352*, 49-54.
237. Chen, S.; Meng, L.; Hu, J.; Yang, Z., Fano Interference between Higher Localized and Propagating Surface Plasmon Modes in Nanovoid Arrays. *Plasmonics* **2015**, *10*, 71-76.
238. Lee, K.-L.; Chen, P.-W.; Wu, S.-H.; Huang, J.-B.; Yang, S.-Y.; Wei, P.-K., Enhancing Surface Plasmon Detection Using Template-Stripped Gold Nanoslit Arrays on Plastic Films. *ACS Nano* **2012**, *6*, 2931-2939.
239. Li, L.; Liang, Y.; Lu, M.; Peng, W., Fano Resonances in Thin Metallic Grating for Refractive Index Sensing with High Figure of Merit. *Plasmonics* **2016**, *11*, 139-149.
240. Yanik, A. A.; Cetin, A. E.; Huang, M.; Artar, A.; Mousavi, S. H.; Khanikaev, A.; Connor, J. H.; Shvets, G.; Altug, H., Seeing Protein Monolayers with Naked Eye through



- Plasmonic Fano Resonances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 11784-11789.
241. Shen, Y., et al., Plasmonic Gold Mushroom Arrays with Refractive Index Sensing Figures of Merit Approaching the Theoretical Limit. *Nature Communications* **2013**, *4*, 1-9.
242. Junesch, J.; Sannomiya, T.; Dahlin, A. B., Optical Properties of Nanohole Arrays in Metal–Dielectric Double Films Prepared by Mask-on-Metal Colloidal Lithography. *ACS Nano* **2012**, *6*, 10405-10415.
243. Bolduc, O. R., et al., Modified Peptide Monolayer Binding His-Tagged Biomolecules for Small Ligand Screening with Spr Biosensors. *Analyst* **2011**, *136*, 3142-3148.
244. Saravis, C. A.; Wool, M. S.; Selenkow, H. A., Radioimmunoassay of Human Urinary Immunoglobulin G. *Vox Sanguinis* **1967**, *13*, 349-353.
245. Zhang, P. P.; Yang, S. M.; Wang, L. S.; Zhao, J.; Zhu, Z. C.; Liu, B.; Zhong, J.; Sun, X. H., Large-Scale Uniform Au Nanodisk Arrays Fabricated Via X-Ray Interference Lithography for Reproducible and Sensitive Sers Substrate. *Nanotechnology* **2014**, *25*, 1-8.
246. Saverot, S.; Geng, X.; Leng, W.; Vikesland, P. J.; Grove, T. Z.; Bickford, L. R., Facile, Tunable, and Sers-Enhanced Hepes Gold Nanostars. *RSC Advances* **2016**, *6*, 29669-29673.
247. Bryche, J.-F.; Tsigara, A.; Béliet, B.; de la Chapelle, M. L.; Canva, M.; Bartenlian, B.; Barbillon, G., Surface Enhanced Raman Scattering Improvement of Gold Triangular Nanoprisms by a Gold Reflective Underlayer for Chemical Sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *228*, 31-35.
248. Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G., Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 13794-13803.
249. Cialla, D.; Maerz, A.; Boehme, R.; Theil, F.; Weber, K.; Schmitt, M.; Popp, J., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (Sers): Progress and Trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403*, 27-54.

# Annexe 1) Microabrication des réseaux nanostructurés par photolithographie

La microfabrication des réseaux nanostructurés fut effectuée en salle blanche au Pavillon J.-Armand Bombardier de l'École Polytechnique de Montréal. La réussite du projet a été possible notamment grâce aux conseils du personnel de la salle blanche, soit ; Christophe Clément et Alireza Hajhosseini-Mesgar. Il est important de spécifier que de nombreuses semaines de travail ont été effectuées en salle blanche avant de trouver les recettes de fabrications optimales. Ainsi, le protocole qui suit décrit en détail comment fabriquer des réseaux de nanotrous ou de nanodisques par photolithographie.

- 1) Une gaufre de verre BK7 ayant un diamètre de 4 pouces est nettoyée dans une solution piranha (3 :1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> :H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 20 minutes.
- 2) La gaufre est ensuite rincée abondamment avec de l'eau ultra pure et séchée à l'aide d'un jet d'azote.
- 3) Une couche de chrome de 4 nm est déposée sur la gaufre de verre à l'aide d'un évaporateur à faisceau d'électrons.
- 4) La gaufre est ensuite rincée avec de l'isopropanol, de l'acétone puis est séchée avec un jet d'azote pour ensuite être déshydratée pendant 15 minutes dans un four à 80°C. Puis, la gaufre est retirée du four afin qu'il refroidisse quelques minutes.
- 5) Dans le cas des réseaux de nanotrous, la résine AznLOF2020 est étendue sur la gaufre par *spincoating*, suivi d'un *softbake* de 60 secondes à 100°C. Dans le cas des réseaux de nanodisques, une couche sacrificielle (LOR1A) est étendue par *spincoating*, suivi de l'ajout d'une autre couche de résine (OIR 674-11). Les temps et température de *softbake* des résines LOR1A et OIR 674-11 sont respectivement de 180 secondes à 190°C et de 60 secondes à 90°C.
- 6) Lors de l'étape d'exposition, le masque est utilisé afin de créer l'image désirée. Dans le cas des réseaux de nanotrous, le masque correspond à un réseau de disque de chrome ayant une périodicité de 1200 nm et des diamètres de 720 nm. Pour ce qui est des réseaux

de nanodisques, le masque correspond à un réseau de nanotrous sur un film de chrome ayant une périodicité de 1200 nm et des diamètres de 720 nm.

- 7) Les substrats sont ensuite exposés en mode *high vacuum* à l'aide de l'aligneur MA6. Pour les réseaux de nanotrous, une dose de  $88 \text{ mJ/cm}^2$  est nécessaire et un *post-exposure bake* de 60 secondes à  $110^\circ\text{C}$  est effectué. Dans le cas des réseaux de nanodisques, il suffit d'exposer le substrat pour une dose de  $86 \text{ mJ/cm}^2$ .
- 8) Par la suite, pour les réseaux de nanotrous, la gaufre est développée dans une solution de AZ726 MIF pendant 2 minutes. Après développement, les substrats sont rincés abondamment avec de l'eau ultra pure et sont séchés avec un jet d'azote. Ceci va générer un patron de résine correspondant à un réseau de nanodisques.
- 9) Dans le cas des réseaux de nanodisques, il faut diluer le développeur selon un ratio 4 :1 dans l'eau et développer la gaufre pendant 60 secondes. Après développement, les substrats sont rincés abondamment avec de l'eau ultra pure et sont séchés avec un jet d'azote. Ceci va générer un patron de résine correspondant à un réseau de nanotrous.
- 10) Puis, des dépôts métalliques sont effectués à l'aide d'un évaporateur à faisceau d'électrons. Dans le cas des réseaux de nanotrous, une couche de 2 nm de chrome est déposée, suivie d'une couche de 125 nm d'or. Puis, la résine est retirée par sonification durant 10 minutes dans une solution de Remover PG. Les substrats sont ensuite rincés avec de l'isopropanol, puis avec de l'eau ultra pure et séchée avec un jet d'azote.
- 11) Pour les réseaux de nanodisques recouverts d'or, les dépôts se font en deux étapes. Tout d'abord, des couches de chrome (2 nm) et d'or (75 nm) sont déposées. Puis, la résine est *liftoff* pendant 10 minutes par sonification avec une solution de Remover PG. Ceci va former un réseau de nanodisques sur lequel une autre couche d'or (75 nm) sera déposée. Les substrats sont ensuite rincés avec de l'isopropanol, puis avec de l'eau ultra pure et séchée avec un jet d'azote.
- 12) L'étape finale consiste à découper la gaufre en multiples échantillons à l'aide d'une scie automatisée.

## Annexe 2 ) Fonctionnement du robot lecteur multipuits

Une première version du lecteur multipuits a été fabriquée en collaboration avec des étudiants en ingénierie de l'Université Laval. Par contre, la plateforme a été finalisée à l'aide d'Hugo-Pierre Poirier Richard et d'Anthony Crofton. De plus, Korak Ray Kumar a conçu le programme informatique permettant de traiter rapidement les données. Cette annexe de la thèse va détailler le fonctionnement du lecteur multipuits plasmonique pour un utilisateur. Par contre, davantage de détails techniques sont fournis dans le manuel d'instruction (voir le bureau de l'ordinateur connecté au robot).

Premièrement, il faut connecter le robot à une source d'alimentation. Puis, il faut démarrer l'application TableXY sur le bureau de l'ordinateur. Le programme vous demandera quel type de détecteur choisir, sélectionner la caméra CCD.

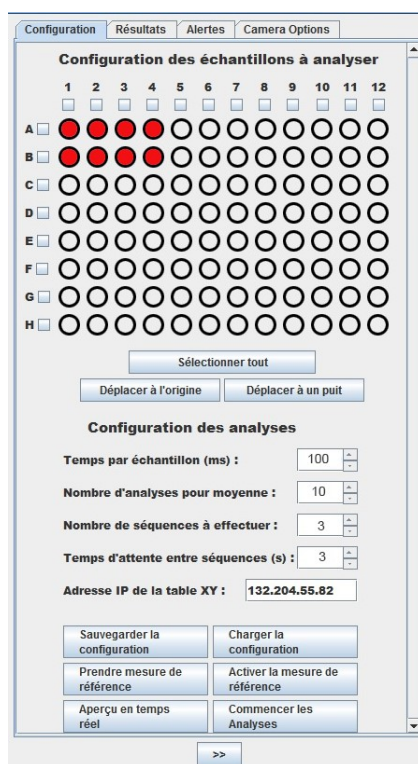
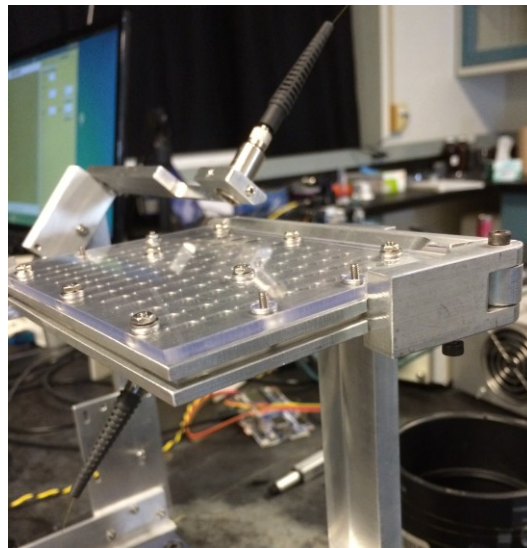


Figure A2.1 Programme du lecteur multipuits

Par la suite, allez dans l'onglet *Camera Options* (**Figure A2.1**) et cliquer sur *Cooler on* pour démarrer le refroidissement de la caméra jusqu'à  $-65^{\circ}\text{C}$ . Ce processus de refroidissement nécessite 15 minutes avant de stabiliser. Ensuite, il faut effectuer un test de déplacement latéral du robot en cliquant sur le bouton *Déplacer à un puits* suivi de la sélection d'un puits (ex : A2). Si le robot ne bouge pas, cela signifie que la connexion avec le serveur est interrompue. Dans ce cas-ci, il faut vérifier les connexions internet avec le serveur Raspberry Pi et valider l'adresse IP. Si le problème persiste, il est possible de reconfigurer le Raspberry Pi (voir manuel d'instructions). Suite au déplacement du robot, cliquer sur le bouton *Déplacer à l'origine*. Ceci permet de déplacer le robot à la position A1 et calibre les moteurs XY. Il est important de faire ce processus avant chaque séquence de mesure afin de garantir une précision lors de la collecte du signal. Par la suite, il faut cliquer sur le bouton *Aperçu en temps réel* ; une fenêtre va s'ouvrir et va permettre d'observer le signal collecté par la caméra. C'est à cette étape qu'il faut valider l'alignement entre le collimateur provenant de la source halogène et celui du détecteur (**Figure A2.2**).



**Figure A2.2** Alignement des collimateurs du lecteur multipuits pour des mesures avec un angle d'incidence élevée.

Il est aussi conseillé d'optimiser le signal mesuré lorsque la plaque (avec des capteurs) est en position sur le support. Ainsi, l'intensité de la source, le temps d'acquisition ou la taille de la fente du spectrophotomètre peuvent être modulés en conséquence. Les paramètres d'acquisition généralement utilisée pour une séquence sont présentés à la figure A2.1. Avant de démarrer les mesures, il faut sélectionner les puits à analyser ; ces derniers auront une couleur rouge. Puis, il faut cliquer sur le bouton *Commencer les analyses* ; une fenêtre apparaîtra pour vous demander le nom des fichiers à créer. Une fois les mesures lancées, on peut sélectionner l'onglet résultat pour observer le signal plasmonique mesuré dans chaque puits selon le fichier. Il faut préciser que pour chaque séquence un nouveau fichier va se créer automatiquement. Lors des acquisitions, il faut laisser la fenêtre *Aperçu en temps réel* ouverte. Dans le cas contraire, un bogue d'intégration du signal génère un bruit de fond indésirable dans le signal enregistré. Une fois l'expérience terminée, il faut retourner à l'onglet *Camera Options* et cliquer sur le bouton *Cooler Off* afin d'éteindre la caméra. Ensuite, il est suggéré de transférer les données dans un autre dossier afin de ne pas surcharger le programme. À la fin de chaque expérience, l'utilisateur doit s'assurer que le Raspberri Pi, la source d'alimentation du robot et la source halogène soient fermés.

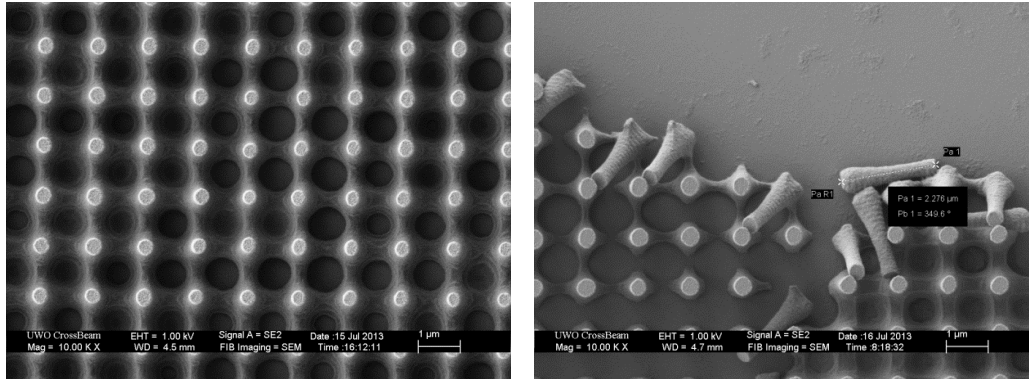
Pour continuer, le traitement des données s'effectue avec un autre programme informatique. Ce programme (Spectra96) permet d'analyser des banques de spectres pour des ratios d'intensité ou des déplacements de bande plasmonique. Ainsi, il est possible d'interpréter des centaines de résultats en quelques minutes. Les détails concernant le fonctionnement du programme sont inscrits dans un manuel (*Spectra 96 manual*) qui est inséré dans l'ordinateur connecté au lecteur multipuits.

## Annexe 3) Lithographie par interférence laser

Les expériences de LIL ont été effectuées à l'Université Western Ontario de London en 2013. Ce projet était en collaboration avec le groupe du professeur Silvia Mittler. Le but était de développer une recette de microfabrication de réseaux de nanotrous en or ( $p = 1000 \text{ nm}$  et  $d = 500 \text{ nm}$ ) par LIL. Toutes les manipulations ont été effectuées en salle blanche à l'aide des conseils de Erden Ertorer. Les détails techniques du montage LIL utilisé lors de ces expériences sont présentés ailleurs dans la littérature.<sup>150</sup>

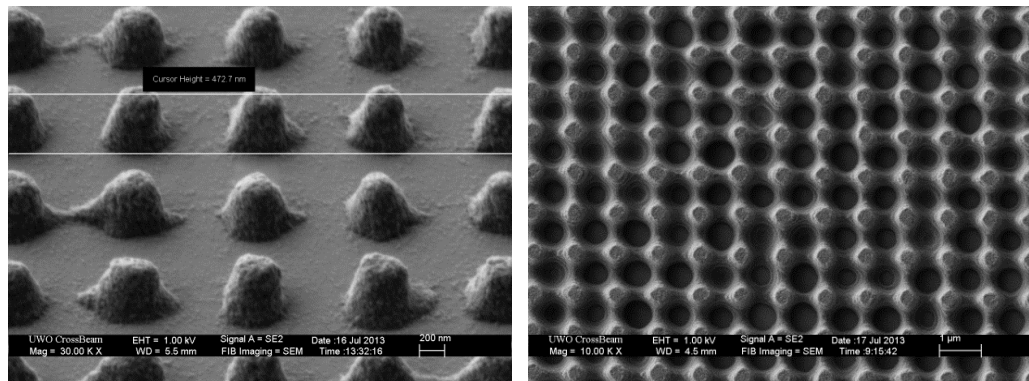
Tout d'abord, le principe de microfabrication avec le LIL (nettoyage de la gaufre, *spincoating*, exposition, développement et métallisation) est très similaire à celui de la photolithographie. La différence principale étant qu'en LIL le substrat est exposé à l'aide de l'interféromètre de Lloyd (pas besoin de masque). Pour l'ensemble des tests faits en LIL, des substrats de verre BK7 ayant une surface de  $1 \text{ cm}^2$  ont été utilisés. Il n'était pas possible d'utiliser de plus larges substrats, car nous étions limités par la taille du miroir de Lloyd. De plus, le support du montage LIL pouvait uniquement fabriquer des réseaux avec une orientation carrée.

Pour commencer, les premiers substrats ont été recouverts d'une résine positive S1827 et exposés pour divers temps (40s x 40s, 60s x 60s et 90s x 90s) à un angle de  $13^\circ$ . L'étape de développement était faite à l'aide d'une solution de MF-319 pendant 80 secondes. Par la suite, les substrats sont recouverts d'Osmium par pulvérisation afin d'être en mesure de les analyser avec un SEM. Le but était de fabriquer un réseau de nanopiliers qui va servir de patron pour générer le réseau de nanotrous. Donc, il est primordial de générer un masque ayant des piliers avec un ratio d'aspect élevé facilitant le processus de *liftoff*. La figure A3.1 démontre que les temps d'exposition n'étaient pas assez élevés, car énormément de connexions entre les piliers étaient observables par SEM (**Figure A3.1**).



**Figure A3.1** Images SEM d'un réseau de piliers obtenus après développement (60s) de la résine S1827 pour des temps d'exposition par LIL de 60s x 60s (gauche) et 90s x 90s (droite).

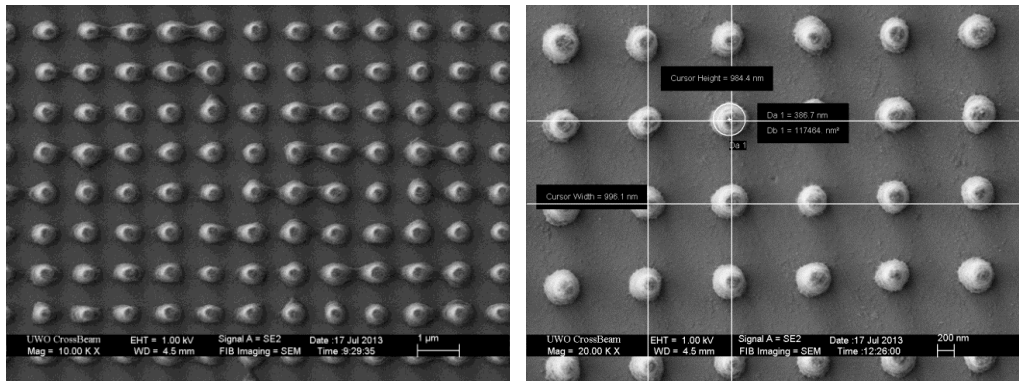
Afin de contourner ce problème, la solution de résine S1827 a été diluée afin de former des couches plus minces à la surface. Ceci nous permet d'avoir une autre marge de manœuvre pour optimiser les temps d'exposition. Cependant, en diluant la résine selon un ratio 1:1, l'épaisseur des piliers (450 nm) diminue drastiquement (**Figure A3.2**). Ce faisant, le ratio de dilution a été augmenté à 3:2 afin d'obtenir des piliers plus épais. Malheureusement, davantage de liaison entre les piliers est observée dans ce cas-ci (**Figure A3.2**).



**Figure A3.2** Images SEM d'un réseau de piliers obtenus après développement (60s) pour des temps d'exposition par LIL de 40s x 40s pour des ratios de dilution de la résine S1827 de 1:1 (gauche) et de 3:2 (droite).

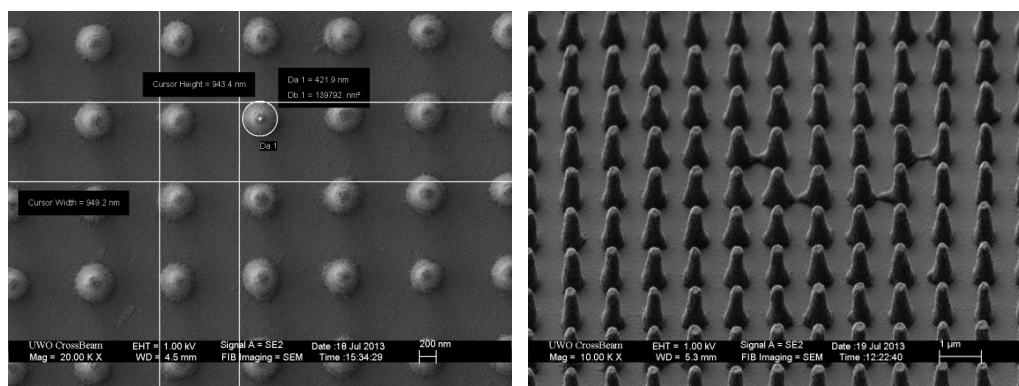


Pour continuer, en augmentant les temps d'exposition à 50s x 50s (avec ratio 3:2 de S1827) il était possible d'enlever une majorité des connexions. De plus, en augmentant le temps de développement à 80 s, la forme des piliers s'arrondit et davantage de connexions sont éliminées (Figure A3.3)



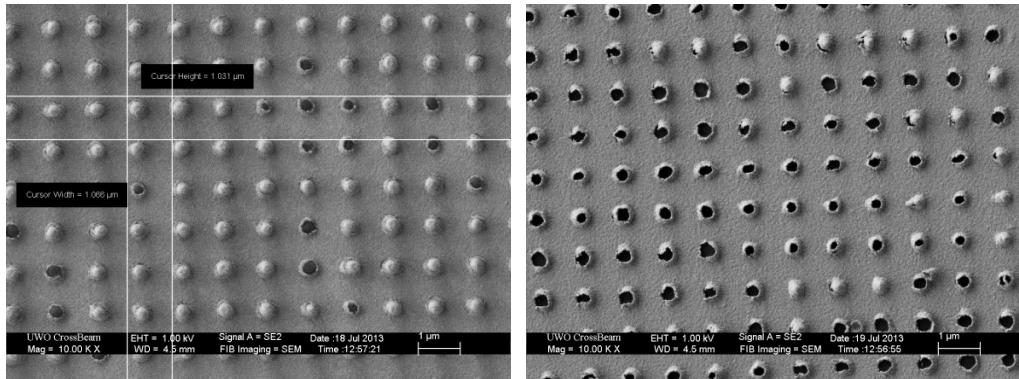
**Figure A3.3** Images SEM d'un réseau de piliers obtenus pour des temps d'exposition par LIL de 50s x 50s pour un ratio de dilution de la résine S1827 de 3:2 pour des temps de développement de 60 s (gauche) et 80 s (droite).

Par contre, le problème est que le diamètre des piliers était petit (380 nm) par rapport à notre objectif de 500 nm. Ainsi, les temps d'exposition ont été diminués à 45 s x 45 s et le temps de développement augmenté à 100 s (**Figure A3.4**).



**Figure A3.4** Images SEM d'un réseau de piliers obtenus après développement (100 s) pour un temps d'exposition par LIL de 45s x 45s et un ratio de dilution de la résine S1827 de 3:2. Vue de haut (gauche) et avec un angle de 45° (droite).

Ceci permet de générer des piliers relativement cylindriques avec un diamètre d'environ 450 nm et une hauteur de 1 µm. Ainsi, nous étions assez confiants des chances que la résine puisse être retiré après l'étape de métallisation. Nous avons donc déposé une couche de 80 nm d'or sur ces substrats. Malheureusement, après l'étape de *liftoff*, on n'obtient pas un réseau de nanotrous (**Figure A3.5**). En fait, il semble que la majorité des trous soient encore bouchés par la résine. Mais, en diminuant l'épaisseur d'or (70 nm) on constate que les trous sont légèrement moins obstrués (**Figure A3.5**).



**Figure A3.5** Images SEM de structures de réseau de « nanotruss » après *liftoff* en déposant 80 nm d'or (gauche) et 70 nm d'or (droite).

En somme, ces expériences de LIL n'ont pas permis de développer de réseau de nanotruss selon les paramètres désirés. En effet, afin d'obtenir une recette optimale, davantage de tests d'optimisation sont nécessaires. En conclusion, ce séjour de 1 semaine nous a permis de prendre connaissance des limites du LIL et d'évaluer son potentiel pour la fabrication de masse de réseaux nanostructurés.