

**UNIVERSITÉ PARIS 13**

« UFR de Santé, médecine et biologie humaine »

**N° attribué par la bibliothèque**

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**T H E S E**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13**

**Discipline : Chimie**

présentée et soutenue publiquement

par

Médéric Lequeux

Le 29 Novembre 2019

**Titre :**

**Biodétection d'analytes de faible taille par l'intermédiaire de nanostructures résonantes**

---

**JURY**

Dr. Michèle Salmain	Présidente
Pr. Bernard Humbert,	Rapporteur
Pr. Nordin Felidj,	Rapporteur
Pr. Philippe Savarin,	Examineur
Dr. Nadia Djaker-Oudjhara	Examineur
Pr. Marc Lamy de la Chapelle	Co-directeur de thèse
Pr Souhir Boujday	Co-directeur de thèse



*« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. »*

**Marie Curie**



## Remerciement

Je souhaite remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je remercie les professeurs Bernard Humbert et Nordin Felidj qui ont accepté d'être rapporteur. Je tiens aussi à remercier le professeur Philippe Savarin et les docteurs Michèle Salmain et Nadia Djaker-Oudjhara d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examinateur.

Je remercie aussi les professeurs Hélène Pernot, directrice du LRS, et Philippe Savarin, directeur du CSPBAT, de m'avoir intégré leur laboratoire. Je remercie aussi le personnel des deux laboratoires qui m'ont accueilli dans la joie et la bonne humeur.

De plus je remercie les partenaires autrichiens, le professeur Wolfgang Knoll et le docteur Jakub Dostalek, qui m'ont donné l'opportunité de venir plusieurs fois dans leur laboratoire à Tulln en Autriche pour m'enseigner de nouvelles techniques dans le cadre du projet ANR.

Je tiens aussi particulièrement à remercier les professeurs Souhir Boujday et Marc Lamy de la Chapelle qui ont dirigé ma thèse et leur soutien. Ils m'ont permis d'avoir la chance de mener une thèse dans des conditions que je pourrais qualifier de « privilégiées » car ils m'ont permis de participer à l'ANR et à de nombreuses conférences en Europe et au Canada durant lesquels j'ai pu présenter mes travaux.

Je remercie également Alexandre Chevillot pour son aide lors des métallisations et Jeanne Solard pour son aide à la salle blanche.

Je remercie Maroua Ben Haddada, Célia Arib, Hanane Moustouai, Qi Qian Liu et tous les stagiaires pour leur bonne humeur et qui ont permis de rendre vivant mon bureau au CSPBAT. Je remercie Somia Tomane, Yacine Mazouzi, David Hu, Vincent Pellas mes compagnons de bureau pour avoir rempli le bureau de bonne humeur et pour les sorties au bar pour décompresser. Je remercie aussi Nadia Nazi, Estelle Palierse, Lise Bedoin, Lu Zhang, Alexis Loiseau pour leur présence et pour les repas partagés. Et je remercie François Payan pour ces conseils pour Word.

Plus personnellement, je remercie Ondine Picot et Thomas Marchandier qui m'ont soutenu pendant ma thèse et pendant les moments importants de ma vie. Je remercie aussi tous mes amis, qui même s'ils ne comprennent pas pourquoi je fais tout ça, qui sont toujours là qu'importe le moment. Je remercie aussi ma famille qui m'accompagne depuis toujours.

Finalement, je dédie cette thèse et remercie énormément Adeline, la femme qui partage ma vie, pour son écoute, ses attentions et son soutien infaillible même si j'ai dû partir plusieurs fois loin d'elle pour présenter mes travaux.



Abréviation

## Abréviation :

A : Adénine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AmEA : Agence Européenne pour l'évaluation des médicaments

ARN : Acide ribonucléique

AuNP : Nanoparticules d'or

BPE : 1,2-Bis(4-pyridyl)éthylène

BSA : Albumine de sérum bovin (bovine serum albumin)

C : Cytosine

G : Guanine

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IPA : Isopropanol

IR : Infrarouge

ITO : Oxyde d'indium dopé à l'étain

LIL : Lithographie par Interférence Lumineuse (laser interference lithography)

LSPR : Résonance Plasmon de Surface Localisé (Localized Surface plasmon resonance)

MBA : Acide 4-mercaptobenzoïque

MBAM : 4-Aminothiophénol

MEB : Microscope électronique à balayage

MIBK : Méthylisobutylacétone

NIR : Proche infrarouge (Near Infrared)

ON : Ouverture Numérique (Numerical Aperture)

OPLS : Projection Orthogonale sur Structure Latente (orthogonal projection on latent structure)

OTA : Ochratoxine A

PCA : Analyse en Composantes Principales (principal component analysis)

PEG : Polyéthylène Glycol

PMMA : Polyméthacrylate de Méthyle

PSL : Plasmon Localisé de Surface

QCM : microbalance à quartz (Quartz Crystal Microbalance)

RNase-A : ribonuclease-A

SDS : dodécylsulfate de sodium (Sodium Dodecyl Sulfate)

SEIRS : Diffusion Infrarouge exaltée de surface (Surface-Enhanced Infrared spectroscopy)

SELEX : évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)

SERS : Diffusion Raman exaltée de surface (Surface-Enhanced Raman spectroscopy)

SNOM: microscope en champ proche (Scanning Near-field Optical Microscopy)

SPP : polariton de plasmon de surface (Surface plasmon polariton)

SPR : résonance de plasmon de surface (Surface Resonance Plasmon)

T : Thymine

## Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1: INTRODUCTION</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES EQUATIONS</b>	<b>3</b>
<b>A) CAPTEUR ET BIOCAPTEUR</b>	<b>4</b>
<b>B) CAPTEURS PLASMONIQUES</b>	<b>6</b>
1) Les différents types de plasmons	6
2) Le cas particulier des nanoparticules	8
3) La spectroscopie Raman	11
4) Diffusion Raman exaltée de surface (SERS)	13
5) Capteurs SERS	14
<b>C) LA MICROBALANCE A QUARTZ</b>	<b>16</b>
1) L'effet piézoélectrique	16
2) La microbalance à cristal quartz (QCM)	16
3) Des exemples de capteurs QCM	18
<b>D) LES INTERETS D'UN COUPLAGE QCM/SERS</b>	<b>20</b>
<b>E) BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE 2: OPTIMISATION DES SUBSTRATS PLASMONIQUES</b>	<b>25</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>26</b>
<b>TABLE DES EQUATIONS</b>	<b>28</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>28</b>
<b>A) L'OPTIMISATION DE LA PREPARATION</b>	<b>29</b>
1) La lithographie électronique	29
2) La sélection de la dose	30
3) L'étude plasmonique et SERS des réseaux de nanocylindres d'or sur ITO.	31
<b>B) RESEAUX DE NANOCYLINDRES D'OR SUR UN FILM D'OR</b>	<b>34</b>
<b>C) PROPRIETES PLASMONIQUES</b>	<b>35</b>
1) Le dispositif expérimental	35
2) Plasmons de surface	36



<b>D) ÉTUDE SERS</b>	<b>45</b>
1) Efficacité SERS pour une hauteur de cylindre de 50nm	45
2) Efficacité SERS pour une hauteur de cylindre de 40nm	48
<b>E) CONCLUSION</b>	<b>56</b>
<b>F) BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>57</b>
<b>CHAPITRE 3: DETECTION BIMODALE</b>	<b>59</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>60</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>61</b>
<b>A) LA STREPTOMYCINE ET SON APTAMERE</b>	<b>62</b>
<b>B) DEVELOPPEMENT DU TRANSDUCTEUR BIMODAL</b>	<b>65</b>
1) Les instruments de mesure	65
2) Le transducteur	65
3) Nettoyage des quartz	66
<b>C) ETUDE DE L'EFFICACITE SERS AVEC UNE MOLECULE SONDE</b>	<b>67</b>
<b>D) VALIDATION DU TRANSDUCTEUR EN QCM ET EN SERS</b>	<b>69</b>
1) Les mesures de QCM-D	69
2) Les mesures de SERS	76
<b>E) CONCLUSION</b>	<b>83</b>
<b>F) BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>84</b>
<b>CHAPITRE 4: DETECTION QCM/SERS SIMULTANEE</b>	<b>85</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>86</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>86</b>
<b>TABLE DES EQUATIONS</b>	<b>87</b>
<b>A) MATERIELS ET METHODES</b>	<b>88</b>
<b>B) MESURES COUPLEES</b>	<b>90</b>
1) L'effet du LASER sur la mesure QCM	90
2) Le spectre SERS de la surface avant la fonctionnalisation	90
3) Accroche de l'aptamère	91
4) Accroche du PEG	93
5) Détection de la streptomycine	94
6) Conclusion sur le capteur couplé QCM/SERS	99



<b>C) LA LITHOGRAPHIE PAR INTERFERENCE D'UN LASER (LIL)</b>	<b>100</b>
1) Le Principe	100
2) Le protocole	100
3) Les réalisations avec le LIL	101
<b>D) CONCLUSION</b>	<b>111</b>
<b>E) BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>112</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>113</b>

## Introduction

**E**n France entre les années 1950 et 2012 la consommation de médicaments a été multipliée par 350, en euros. Les êtres humains ne sont pas les seuls à consommer des médicaments la consommation concerne également les animaux d'élevage. De plus, l'agriculture utilise beaucoup de produits potentiellement dangereux comme les pesticides et certains engrais. Du fait de cette importante consommation il est possible de retrouver des traces de ces médicaments et produits chimiques dans différentes matrices (stations d'épurations d'eau, nappes phréatiques, nourriture, ...). C'est pourquoi il est devenu important en ce début de XXI<sup>ème</sup> siècle de trouver des moyens de les détecter à l'état de traces dans des milieux complexes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet ANR Franco-Autrichienne NANOBIOSENSOR qui consiste à concevoir un capteur capable de détecter des traces de molécules de faibles masses molaires en couplant les méthodes de microbalance à quartz (QCM) et de diffusion Raman exaltée de surface (DRES, plus connue sous son acronyme anglais Surface Enhanced Raman Scattering ou SERS). Ce projet réunit trois laboratoires : le Laboratoire de Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT) de l'Université Paris XIII, le Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS) de Sorbonne Université et l'Austrian Institute of Technology (AIT) en Autriche.

Ma thèse s'intègre dans le cadre de ce projet collaboratif et des deux laboratoires français, le CSPBAT et le LRS. Ainsi j'ai pu profiter des savoir-faire des trois partenaires et combiner les différentes connaissances en lithographie, en plasmonique, en spectroscopie Raman et SERS, en QCM et en fonctionnalisation de surfaces.

Dans ce manuscrit, je consacrerai le premier chapitre à la description des capteurs et des biocapteurs, des plasmons, de la spectroscopie Raman et du SERS, de la QCM et de l'intérêt du couplage SERS/QCM. Puis dans le deuxième chapitre je présenterai mes résultats sur l'optimisation du transducteur développé dans le cadre du couplage combinant à la fois les propriétés plasmoniques et SERS des nanostructures et les contraintes des quartz QCM. Dans le troisième chapitre je mettrai en avant l'optimisation du protocole de conception du biorécepteur et la détection de streptomycine tout en apportant une preuve de concept de notre approche. Dans le quatrième chapitre, je montrerai les résultats du couplage SERS/QCM avec la détection simultanée de l'accroche de molécules à la surface du transducteur par mesure de fréquence en QCM et par mesure spectroscopique en SERS. Pour finir je finirai par une conclusion globale et les perspectives possibles pour ce projet.

## Chapitre 1: Introduction

### Table des matières

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES EQUATIONS</b>	<b>3</b>
<b>A) CAPTEUR ET BIOCAPTEUR</b>	<b>4</b>
<b>B) CAPTEURS PLASMONIQUES</b>	<b>6</b>
<b>1) Les différents types de plasmons</b>	<b>6</b>
<b>2) Le cas particulier des nanoparticules</b>	<b>8</b>
<i>a) Le type de métal</i>	<i>8</i>
<i>b) La taille</i>	<i>9</i>
<i>c) La forme</i>	<i>9</i>
<i>d) Le milieu environnant</i>	<i>10</i>
<i>e) La distance entre nanoparticules</i>	<i>10</i>
<b>3) La spectroscopie Raman</b>	<b>11</b>
<b>4) Diffusion Raman exaltée de surface (SERS)</b>	<b>13</b>
<i>a) Le processus électromagnétique</i>	<i>13</i>
<i>b) Le processus chimique</i>	<i>13</i>
<b>5) Capteurs SERS</b>	<b>14</b>
<b>C) LA MICROBALANCE A QUARTZ</b>	<b>16</b>
<b>1) L'effet piézoélectrique</b>	<b>16</b>
<b>2) La microbalance à cristal quartz (QCM)</b>	<b>16</b>
<b>3) Des exemples de capteurs QCM</b>	<b>18</b>
<b>D) LES INTERETS D'UN COUPLAGE QCM/SERS</b>	<b>20</b>
<b>E) BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>21</b>

## Table des figures

Figure 1 : Schéma d'un biocapteur	4
Figure 2 : oscillation des charges dans un métal du à une onde électromagnétique	6
Figure 3 : schéma de la résonance de plasmon localisé	6
Figure 4 : courbe de dispersion du plasmon de surface à l'interface métal/diélectrique, en bleu : courbe de dispersion de la lumière et en rouge : courbe de dispersion du plasmon, trait pointillé rouge : fréquence plasma du métal	8
Figure 5 : longueur d'onde de résonance du PSL en fonction de la forme de la nanoparticule, figure tirée de <sup>17</sup>	10
Figure 6 : principe de la spectroscopie Raman	12
Figure 7 : exemples de défauts	14
Figure 8 : a) Schéma d'une QCM, b) représentation de la fréquence	17

## Table des équations

Équation 1 : Loi de Beer-Lambert	7
Équation 2 : Équation de Gans	10
Équation 3 : Calcul du facteur d'exaltation d'une molécule	13
Équation 4 : équation de Sauerbrey	16
Équation 5 : équation de Sauerbrey simplifiée, $C=17.7\text{ngHz}^{-1}$ pour un cristal de quartz à 5MHz, $n= 1,3,5,7, \dots$ le rang de l'harmonique	17

De nos jours, il est important de pouvoir développer des techniques nous permettant de détecter rapidement et efficacement des substances toxiques pour l'être humain. C'est pour cela que la conception, le développement et la validation de nouveaux biocapteurs est devenue un important sujet de recherche. Ainsi, de nombreux efforts ont été déployés pour améliorer les performances, la rapidité et la spécificité de tels systèmes. Les biocapteurs peuvent être utilisés dans de très nombreux domaines d'application comme la biologie (observation de biomolécules et de leurs interactions...), la médecine (détection de biomarqueurs, diagnostic de maladie...) ou l'agro-alimentaire (détection de contaminants, contrôle qualité et sécurité alimentaire...). Il existe de nombreuses méthodes de détection comme les méthodes optiques (résonance de plasmon de surface (SPR) (Surface Plasmon Resonance)), électrochimiques, piézo-électriques (microbalance à quartz (QCM) (Quartz Crystal Microbalance)) ou spectroscopiques (fluorescence, absorption IR...). Dans le cadre de ma thèse, l'objectif est de concevoir un biocapteur capable de détecter des analytes de faibles tailles (masse molaire inférieure à 500 g/mol) et en faible concentration. Pour atteindre cet objectif, mon travail a consisté au développement d'une nouvelle méthodologie basée sur le couplage de deux techniques de caractérisation complémentaires : la microbalance à quartz (QCM) et la diffusion Raman exaltée de surface (DRES, plus connue sous son acronyme anglais Surface Enhanced Raman Scattering ou SERS).

Je commencerai par présenter le principe d'un biocapteur. Je poursuivrai par une description des capteurs plasmonique et piézo-électrique qui sont les deux méthodes que j'ai utilisées au cours de ma thèse. Enfin, j'expliciterai les avantages d'un système bimodal couplant ces deux méthodes et la méthodologie que nous avons adoptée pour réaliser ce couplage.

4

### A) Capteur et biocapteur

Un capteur est un dispositif transformant une ou plusieurs grandeurs physiques, chimiques ou biologiques en une donnée utile. Il est notamment constitué d'un transducteur permettant la transformation de la grandeur à mesurer en une grandeur exploitable par l'expérimentateur.

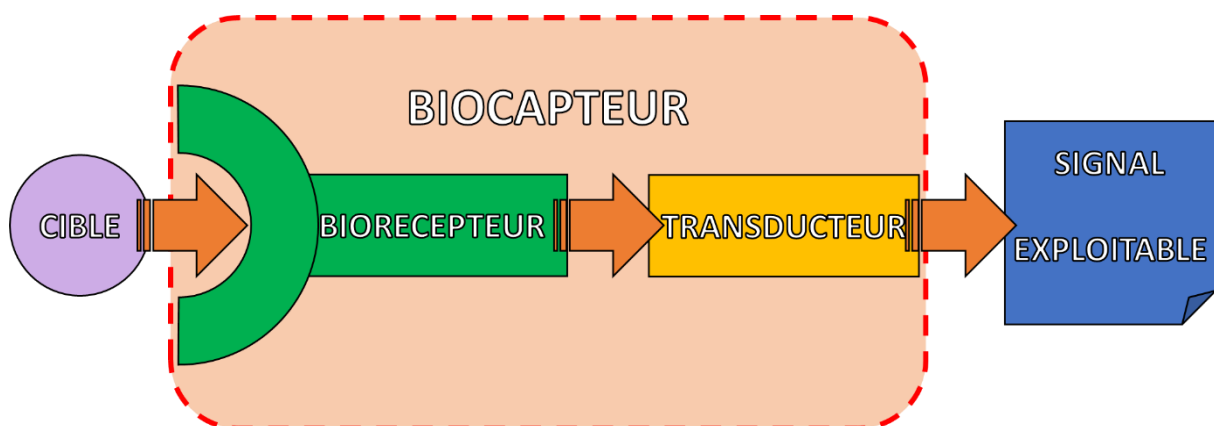


Figure 1 : Schéma d'un biocapteur

Dans le cas d'un biocapteur, **Figure 1**, le dispositif est également composé d'un élément biologique actif (anticorps, protéines,...) appelé biorécepteur et couplé au transducteur. Le biorécepteur va interagir directement avec l'analyte et permettre sa capture à la surface du transducteur. Ces dispositifs sont élaborés dans le but de détecter une cible,

spécifiquement et rapidement, même à l'état de traces et dans un environnement complexe. L'un des plus grands défis dans le domaine des biocapteurs est la sensibilité. Cela est particulièrement vrai dans le cas de la détection d'analytes cibles de petites tailles (toxines, substances odorantes), car la réponse des techniques de détection classiques est généralement dépendante de la taille de l'analyte, et pour ces cibles, inférieure à la limite de détection requise. La sensibilité de détection des biocapteurs peut être augmentée soit en améliorant l'affinité du biorécepteur, soit en amplifiant le signal mesuré par les techniques de transduction.

L'exemple historique<sup>1</sup> d'un biocapteur est le glucomètre qui permet aux diabétiques de pouvoir mesurer leur taux de glucose dans le sang. Ici, c'est la Glucose oxydase qui va capter le glucose en le transformant en acide gluconique. Il y a plusieurs moyens de mesurer la concentration de glucose<sup>1</sup>, mais aujourd'hui on utilise préférentiellement la méthode électrochimique. Le sang va être aspiré par des capillaires pour arriver contre une électrode enzymatique (transducteur chimique qui combine une procédure électrochimique avec l'activité d'une enzyme immobilisée à la surface de l'électrode) contenant du glucose oxydase ou du glucose déshydrogénase flavine adénine dinucléotide qui va réagir avec le glucose. L'enzyme est oxydée par un ion ferricyanure ( $[(FeCN)_6]^{3-}$ ) qui va lui-même être ensuite réoxydée au niveau des électrodes en générant un courant électrique proportionnel à la concentration en glucose réagissant avec l'enzyme.

La détection et l'observation de biomolécules par spectroscopie infrarouge (IR) en est un autre exemple<sup>2</sup>. Pour ce type de détection, une monocouche auto-assemblée (Self Assembled Monolayer, SAM) est dans un premier temps formée sur une surface permettant la mesure en IR (cristal ATR, surface d'or,...). Une biomolécule qui va interagir avec la molécule cible est ensuite greffée à la SAM pour former le biorécepteur. À la suite de l'interaction entre l'analyte et le biorécepteur, la surface peut être caractérisée par différentes techniques comme la réflectance totale atténuée (Attenuated Total Reflectance, ATR) ou la spectroscopie d'absorption infrarouge en réflexion (Infrared Reflection Absorption Spectroscopy) (IRRAS). En caractérisant l'échantillon avant et après l'interaction, des différences spectrales pourront être observées permettant ainsi de déduire la présence ou non de la cible et éventuellement sa concentration après calibration de la méthode de détection<sup>3</sup>.

## B) Capteurs plasmoniques

Dans cette partie, je vais présenter les différents types de plasmons par la suite, je vais faire un aparté sur le cas particulier des nanoparticules et l'effet des différents paramètres (le métal, la taille, la forme, le milieu environnant, la distance interparticulaire). Ensuite, je vais présenter la spectroscopie Raman et le SERS. Et je vais terminer par quelques exemples de capteurs SERS.

### 1) Les différents types de plasmons

Les métaux ont la particularité de posséder un gaz d'électrons libres non liés aux noyaux atomiques. Sous l'action d'un champ électromagnétique, (longueur d'onde beaucoup plus grande que la taille des nano-objets), il y a interaction de type coulombienne entre le nuage et les noyaux métalliques avec création d'une force de rappel caractérisée par une fréquence propre d'oscillation. Lorsque la fréquence de l'onde incidente correspond à cette fréquence, il y a un phénomène de résonance. Autrement dit, il y a oscillation collective et en phase des électrons. Les conditions sont alors réunies pour observer la résonance plasmon. (Figure 2). La fréquence propre dépend notamment de la nature du métal et des interactions inter-particules.

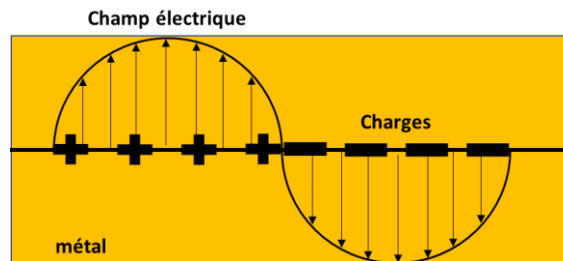


Figure 2 : Oscillation des charges dans un métal dû à une onde électromagnétique

On observe ce phénomène soit en volume (plasmon de volume), soit à l'interface (plasmon de surface) entre le métal et un milieu diélectrique comme l'air, le verre, ..., soit dans des nanostructures.

Dans le deuxième cas, le plasmon est confiné à la surface (onde évanescente) et ne peut se propager que le long de la surface (plasmon de surface propagatif ou délocalisé).

Dans le cas de nanoparticules ou de nanostructures, la longueur de pénétration du champ électromagnétique (épaisseur de peau) est de l'ordre de grandeur ou supérieure à la taille du nano-objet. Le plasmon est alors confiné à l'intérieur des nanostructures et est appelé plasmon de surface localisé (PSL). Si la fréquence de l'onde excitatrice correspond à celle du plasmon, on observe alors un phénomène de résonance (Figure 3).

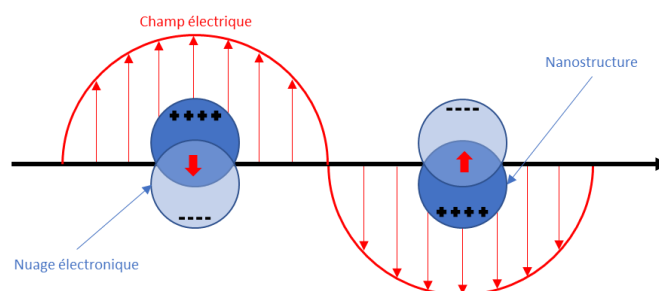


Figure 3 : Schéma de la résonance de plasmon localisé



On peut mesurer cette résonance par spectroscopie d'extinction. Elle permet d'observer l'interaction de la lumière (absorption et diffusion) avec un matériau en fonction de son énergie ou de sa longueur d'onde. Le matériau est alors éclairé avec une lumière blanche contenant ainsi l'ensemble du spectre visible (dans mon cas, je me limiterai à la gamme spectrale comprise entre 500 et 900 nm), et ainsi repérer les longueurs d'onde pour lesquelles l'interaction se produit.

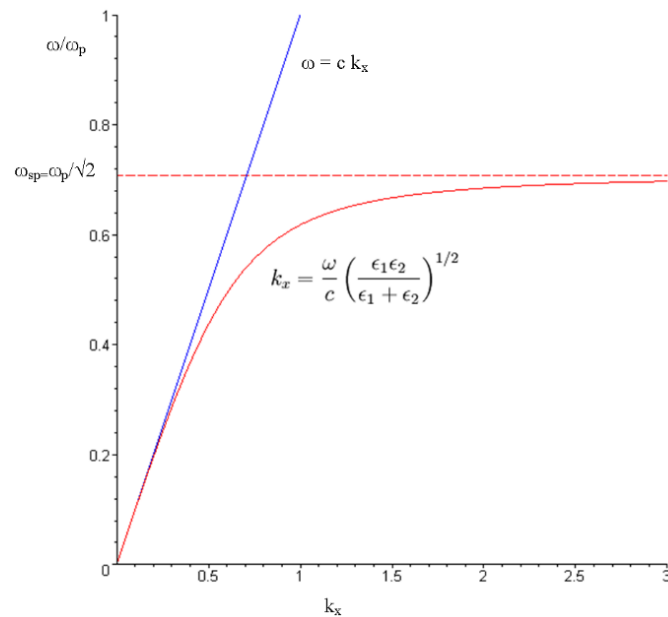
Cette technique est basée sur la loi de Beer-Lambert qui définit le rapport logarithmique de l'intensité transmise  $I$  sur l'intensité incidente  $I_0$  à travers un matériau (**Équation 1**).

$$A_\lambda = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot C$$

**Équation 1 : Loi de Beer-Lambert**

Dans cette loi,  $A$  est l'absorbance (sans unité) à une longueur d'onde  $\lambda$ ,  $I/I_0$  est la transmittance de la solution (sans unité),  $\epsilon_\lambda$  est le coefficient d'extinction molaire (en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Ce dernier est une propriété fondamentale de l'objet étudié dépendant du solvant, de la température et de la pression donnée.  $l$  est la longueur du trajet optique dans la solution traversée qui est assimilé à l'épaisseur de la cuvette utilisée (en cm).  $C$  est la concentration molaire de la solution (en  $mol \cdot L^{-1}$ ). Cette loi est additive ce qui revient à dire que l'on somme l'absorbance de tous les produits pour obtenir l'absorbance totale. Lorsque l'on mesure des spectres d'extinctions, il est possible d'éliminer une partie du signal que l'on considère comme référence pour ne conserver que le signal pertinent. Par exemple, on mesure le spectre d'un produit A puis du mélange AB pour en déduire la contribution du produit B.

Dans le cas de nanostructures fixées sur une surface diélectrique, nous n'observerons que le mode de plasmon de surface localisé (détaillé dans la section suivante) dont les paramètres dépendent de la nature du métal, de la taille et de la forme de la nanostructure<sup>4,5</sup> et son environnement<sup>6,7</sup>. Si ces nanoparticules sont réparties de manière périodique, il peut exister des couplages en champ proche ou en champ lointain (effet de réseau). Si les nanostructures sont déposées à la surface d'un film métallique, il y a alors excitation de plasmons propagatifs par l'intermédiaire de l'excitation laser (sous incidence angulaire) ou par l'intermédiaire du réseau de nanostructures (création d'un vecteur d'onde lié à la période du réseau). La présence des nanostructures à la surface du métal peut également faire apparaître des couplages entre les plasmons localisés produits par les nanoparticule et les plasmons propagatifs (modes hybrides).<sup>8</sup> Ce point particulier sera traité plus en détail dans le chapitre suivant.



**Figure 4 : Courbe de dispersion du plasmon de surface à l'interface métal/diélectrique, en bleu : courbe de dispersion de la lumière et en rouge : courbe de dispersion du plasmon, trait pointillé rouge : fréquence plasma du métal**

Sur la **Figure 4** est représenté la courbe de dispersion du plasmon de surface à une interface métal/diélectrique. Pour les faibles nombres d'onde  $k$ , on peut remarquer que la courbe de dispersion du plasmon suit la courbe de dispersion de la lumière et pour les grands nombres d'onde les plasmons s'éloignent de la courbe de dispersion de la lumière pour tendre de manière asymptotique vers la valeur de la fréquence plasma du métal.

8

## 2) Le cas particulier des nanoparticules

Comme indiqué précédemment dans le cas de nanoparticules le métal possède des dimensions très inférieures à la longueur d'onde incidente. Ainsi, la symétrie du nuage électronique diffère de manière significative par rapport au cas classique dans un film ou en volume. Le plasmon est alors confiné dans les dimensions nanométriques de la particule pour former un plasmon de surface localisé (PSL). Le nuage d'électrons va osciller en phase avec l'onde électromagnétique incidente (**Figure 3**). Cette variation de la densité électronique quasi ponctuelle possède la symétrie d'un dipôle oscillant ce qui permet à l'onde incidente d'entrer en résonance avec le plasmon quel que soit l'angle d'incidence. De plus le PSL émet en champ proche lorsqu'il est excité, si la symétrie de son nuage électronique oscillant est majoritairement dipolaire. La résonance du PSL d'une nanoparticule métallique apparaît à une fréquence caractéristique, différente de celle du plasmon du même métal continu. Comme les métaux présentent une très haute densité en électron de conduction, cela confère une intensité remarquable à l'oscillation plasmonique.

### a) Le type de métal

Les métaux les plus utilisés comme couche métallique nanométrique ou nanoparticule pour la génération de plasmons de surface sont l'or et l'argent. La position des plasmons va changer avec le type de métal : l'argent a une résonance plasmon vers le bleu alors que l'or est plutôt vers le rouge. En revanche, l'argent fournit une résonance plus étroite, ce qui permet d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit. Le décalage en longueur d'onde dépend

de la partie réelle de la constante diélectrique du métal, laquelle est plus faible pour l'or que pour l'argent. L'étalement de la résonance dépend quant à elle de la partie imaginaire de cette constante qui est plus importante pour l'argent. Dans la pratique, l'argent ( $E^\circ(\text{Ag}^+/\text{Ag} = 0,80)$ ) s'oxyde dès qu'il est exposé à l'air, rendant difficile la reproductibilité des résultats alors que l'or est stable chimiquement ( $E^\circ(\text{Au}^+/\text{Au} = 1,83)$ ) et est un bon candidat pour le greffage de biorécepteurs. De ce fait, l'or est le métal le plus utilisé. On peut aussi noter que le cuivre et l'aluminium ont également été employés pour la génération de plasmons de surface<sup>9-11</sup>.

### *b) La taille*

La taille des nanoparticules a évidemment une influence conséquente sur le spectre d'extinction d'un métal donné. Si on augmente la taille des nanoparticules, la résonance plasmon va se déplacer vers de plus hautes longueurs d'onde.

En pratique, pour des particules de tailles inférieures à 10 nm et donc de volume restreint, c'est la diffusion due aux collisions entre les électrons et les parois de la particule qui prédomine. Ce phénomène a pour effet d'élargir le pic de résonance. On peut voir en pratique que les solutions de nanoparticules d'or de moins de 4 nm en suspension ont une teinte brunâtre<sup>12</sup>. Pour une taille entre 5 et 15 nm, la position et la largeur du pic plasmon demeurent relativement constantes en fonction de la taille avec une position à 525 nm. La position du pic va ensuite évoluer pour aller à 530 pour une taille de 35 nm<sup>13</sup>. Il confère aux suspensions colloïdales d'or leur coloration rouge brique<sup>12</sup>. Le comportement optique des particules dont la taille est inférieure à la longueur d'onde de la lumière peut être décrit par le modèle de diffusion de Rayleigh<sup>14</sup>. Il considère que tous les électrons libres de la particule oscillent en phase, ne formant ainsi qu'un seul dipôle résultant. Cette approximation dite quasi-statique reste valable tant que le diamètre des particules est inférieur au dixième de la longueur d'onde incidente. D'après ce modèle, la lumière est soit absorbée, soit diffusée (absorption puis réémission de manière élastique par l'oscillation du dipôle excité). Par contre quand la taille de la particule dépasse  $\lambda/10$ , les électrons de conduction provenant de différentes zones de la particule ne sont pas tous soumis à la même amplitude du champ électrique et il en résulte un déphasage entraînant l'apparition de modes multipolaires dont la fréquence de résonance diffère de celle du dipôle. Ces modes supérieurs de résonance absorbent, mais ne réémettent pas ce qui a pour conséquence l'amortissement de la résonance et son décalage vers les hautes longueurs d'ondes.

### *c) La forme*

La forme de la particule est le paramètre qui modifie le plus le spectre d'extinction. En effet, la moindre modification de la forme par rapport à une sphère impacte considérablement le plasmon de la particule.

Dans le cas des nanosphères il est possible de calculer la résonance plasmon grâce à la théorie de Mie<sup>15</sup>. Le spectre d'extinction ne présentera qu'une seule bande plasmon. En revanche, pour les autres géométries, le spectre d'extinction va présenter trois bandes décalées par rapport au cas de la sphère : une bande pour chaque dimension de la nanostructure. Le décalage spectral vers le bleu ou vers le rouge dépendra de la proportion de chaque dimension par rapport au cas de la sphère.

En effet, la déformation du nuage électronique entraîne l'apparition de plusieurs polarisabilités effectives (P) différentes selon chaque axe de la particule. Dans le cas des nanobâtonnets pour lesquels ils existent deux axes principaux (identifiés par A et B), les polarisabilités peuvent être approximées à l'aide de l'équation de Gans<sup>16</sup> (**Équation 2**). Cette

équation nous permet de calculer la polarisabilité effective dans chaque direction, A étant la plus courte.

$$P_A = \frac{1 - e^2}{e^2} \left\{ \frac{1}{2e} \ln \left( \frac{1 + e}{1 - e} \right) \right\}; P_B = \frac{1 - P_A}{2}; e = \sqrt{1 - \left( \frac{B}{A} \right)^2}$$

Équation 2 : Équation de Gans

On peut avoir accès avec cette équation à la fréquence du pic B en connaissant le rapport A/B.

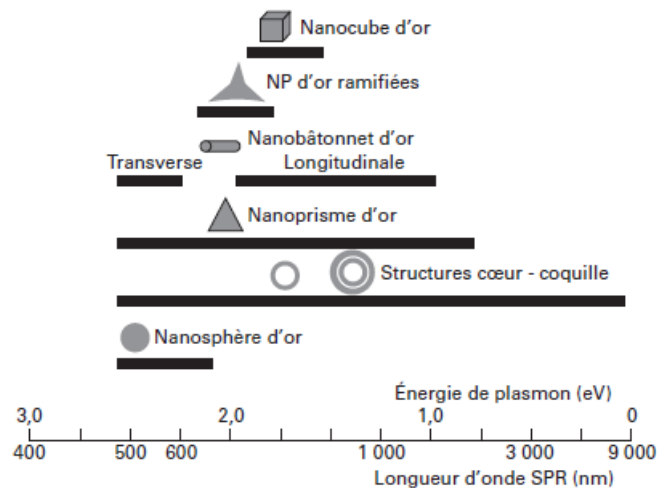


Figure 5 : Longueur d'onde de résonance du PSL en fonction de la forme de la nanoparticule, figure tirée de <sup>17</sup>

La **Figure 5** nous montre l'impact de la forme sur la position de la bande plasmon. On peut alors accorder le PSL sur une large gamme spectrale allant du visible à l'infra-rouge moyen en jouant sur la forme de la nanostructure.

#### d) Le milieu environnant

Le milieu environnant va aussi jouer un rôle important dans la réponse des nanoparticules. En effet, la constante diélectrique du milieu va impacter la polarisabilité de la nanoparticule. Lors d'un changement croissant de l'indice de réfraction, la bande va être décalée vers le rouge<sup>7,18</sup>.

#### e) La distance entre nanoparticules

Un autre facteur important est la distance interparticulaire. Si deux nanoparticules sont assez proches de leurs modes plasmon peuvent se coupler pour donner naissance à de nouveaux modes différents du cas individuel<sup>19,20</sup>. C'est notamment le cas lorsque les nanoparticules s'agrègent. De manière générale, les différentes configurations des particules peuvent être décrites par la théorie d'hybridation de Prodan et Norlander<sup>21-23</sup>, qui décrit la résonance résultant du couplage comme étant une composition des modes hybrides de chacune des particules de la même manière que pour les orbitales moléculaires avec les orbitales atomiques.

Depuis les années 2000, les systèmes relevant un effet de résonance de type Fano attirent particulièrement l'attention<sup>24-26</sup>. Ce type de résonance fait généralement intervenir des interférences destructives entre deux modes ce qui permet d'obtenir des spectres avec des formes asymétriques plus sensibles que dans les systèmes classiques.

### 3) La spectroscopie Raman

Le principe de la spectroscopie Raman a été théorisé en 1923 par Adolf Smekal<sup>27</sup>. Il faudra attendre le 21 février 1928 pour que Leonid Mandelstam observe le phénomène expérimentalement en l'appelant diffusion combinée. Il présenta ses résultats en russe<sup>28</sup> et en allemand<sup>29,30</sup>. Indépendamment de Leonid Mandelstam, le 28 février 1928 Chandrashekhara Venkata Râman et ses collaborateurs l'observent également expérimentalement et publient un article complet sur le phénomène le 7 mai 1928<sup>31</sup> dans la revue Nature. Ces travaux ont permis à Chandrashekhara Venkata Râman d'obtenir le prix Nobel de physique en 1930.

L'effet Raman consiste en la diffusion inélastique d'un photon par un cristal ou une molécule. Lorsque le photon interagit avec l'échantillon, il va se produire un échange d'énergie entre le photon et les niveaux vibrationnels du matériau excité. Ce transfert d'énergie peut se faire au profit du photon ou du matériau. Il en résulte une modification de l'énergie (fréquence) du photon diffusé. Le décalage en énergie est alors de l'ordre de quelques dixièmes d'eV ou de quelques dizaines à quelques milliers de  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant aux énergies des modes vibrations du matériau. La mesure du décalage spectral entre les photons diffusés et incidents permet d'étudier les niveaux vibrationnels des molécules ou des cristaux et ainsi d'étudier leurs propriétés. L'excitation du matériau se fait par l'intermédiaire d'une source de lumière monochromatique dans le visible comme un LASER. Cette spectroscopie a pour avantage d'être une technique non destructive ce qui permet de réutiliser les échantillons pour pouvoir faire des expériences complémentaires.

La différence entre l'absorption Infra-rouge (IR) et le Raman est que pour cette dernière technique, l'énergie excitatrice est très supérieure aux énergies des niveaux vibrationnels, ne permettant pas d'induire des transitions directes entre les niveaux vibrationnels comme en IR (**Figure 6**). Le matériau est donc dans un premier temps excité sur un niveau d'énergie virtuel puis le matériau va se désexciter soit vers le niveau vibrationnel fondamental (diffusion Rayleigh sans modification d'énergie) soit vers un niveau d'énergie excité (diffusion Stokes avec diminution de l'énergie du photon diffusé). Il existe une troisième possibilité pour laquelle le niveau de départ est un niveau vibrationnel excité et le niveau final est le niveau vibrationnel fondamental (diffusion anti-Stokes). Pour les diffusions Stokes et anti-Stokes, seuls les modes de vibration induisant une variation de la polarisabilité pendant l'excitation sont autorisés.

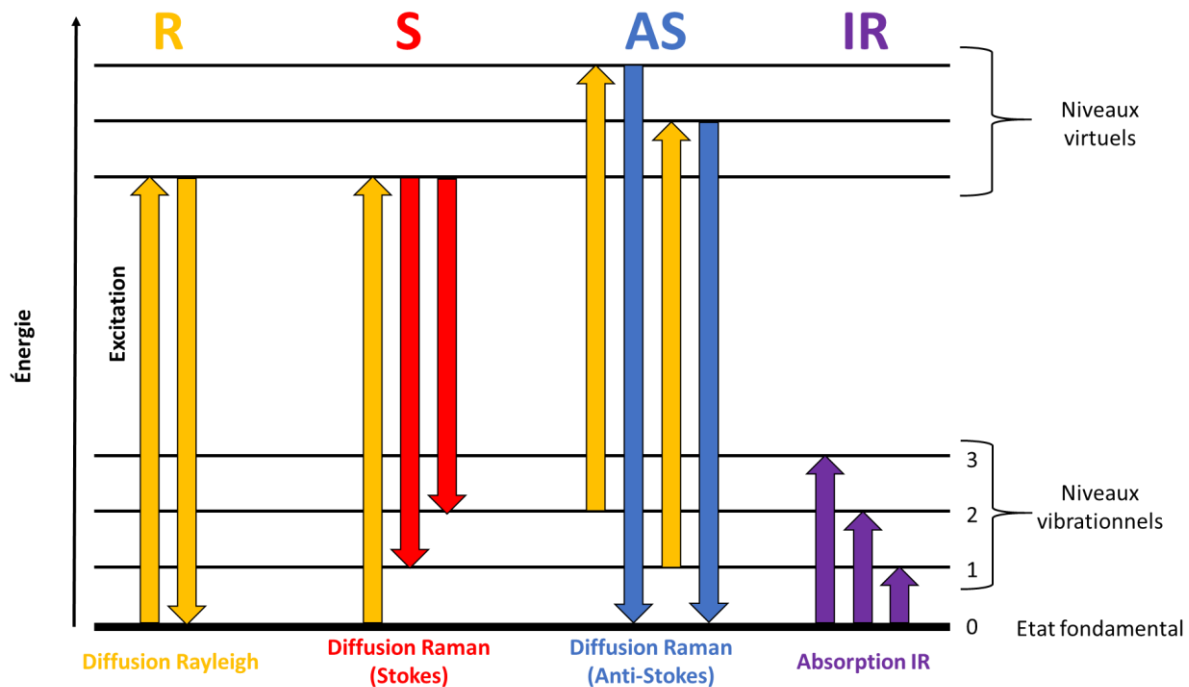


Figure 6 : Principe de la spectroscopie Raman

Il a donc trois types de diffusion que l'on peut observer en diffusion Raman (Figure 6). La diffusion Rayleigh (Figure 6 R) est le cas où les niveaux de départ et d'arrivée correspondent à l'état fondamental. Cette diffusion va émettre un photon de même énergie. Cette diffusion est dite élastique car il n'y a pas de perte ou de gain d'énergie.

Ensuite, deux phénomènes inélastiques peuvent se produire : les diffusions Raman Stokes et anti-Stokes. Pour la diffusion Stokes (Figure 6 S), la transition se fait entre le niveau fondamental et un niveau vibrationnel excité en émettant un photon de plus basse énergie. Pour le deuxième phénomène (Figure 6 AS), la transition se fait entre un niveau vibrationnel excité et le niveau fondamental. Dans ce cas l'énergie du photon diffusé est supérieure à celle du photon incident. Cette diffusion est la moins probable car le niveau fondamental est beaucoup plus peuplé que les niveaux d'énergies excités.

Dans la pratique on s'intéresse essentiellement à la diffusion Raman Stokes pour pouvoir obtenir un maximum d'informations. Les deux autres diffusions peuvent être observées, mais ne sont généralement pas exploitées, notamment la diffusion Raman anti-Stokes contient les mêmes informations que la diffusion Stokes mais est beaucoup moins intense. Dans ce manuscrit je montrerai donc uniquement les spectres de diffusion Raman Stokes.

Même dans le cas de molécules simples, on peut obtenir un spectre Raman complexe dû à la multitude de bandes provoquées par les différentes fonctions chimiques. Dès que l'on commence à avoir plusieurs groupements chacun va fournir des bandes différentes et dans le cas de groupements proches, il peut y avoir des regroupements de bandes, ce qui peut compliquer l'attribution. En revanche, les spectres sont en général bien définis avec des positions des modes de vibration bien établies. Ainsi, il est possible de reconnaître et d'identifier une molécule grâce à son « empreinte » Raman. Mais les phénomènes de diffusion mis en jeu en spectroscopie Raman ont une section efficace très faible (un photon diffusé pour cent millions de photons incidents). Ceci rend difficile l'analyse d'échantillons en faible

quantité. Généralement, on utilise cette technique sur des solutions concentrées (concentration de l'ordre du mM) ou des échantillons solides. Pour pallier ce problème, on peut utiliser des techniques qui permettent d'augmenter le signal Raman comme la diffusion Raman résonante ou la diffusion Raman exaltée de surface utilisant des structures plasmoniques.

#### 4) Diffusion Raman exaltée de surface (SERS)

Le SERS fut observé pour la première fois, en 1974, par Martin Fleischmann et ses collaborateurs lors de l'étude de l'adsorption de la pyridine sur des électrodes rugueuses d'argent<sup>32</sup>. Initialement, il attribua ce phénomène à une augmentation de la surface spécifique de l'électrode due à la rugosité mais cette hypothèse ne permettait pas d'expliquer l'ampleur de l'augmentation du signal. Ce ne fût que quelques années plus tard, en 1977, que l'origine de ce phénomène fut reliée aux plasmons de surface<sup>33-36</sup>. Le mécanisme d'exaltation du SERS est encore débattu mais repose sur deux effets principaux : les processus électromagnétiques et chimiques.

##### a) Le processus électromagnétique

Dans le cas de nanostructures métalliques, le champ électromagnétique local peut être exalté par l'intermédiaire de l'excitation des plasmons avec un LASER. Un premier processus vient de l'interaction électromagnétique entre la lumière et les nanoparticules et va provoquer une forte exaltation locale du champ. Aux points chauds, l'exaltation du champ est de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  ce qui fait que le signal Raman de la molécule proche de ces points chauds va être fortement exalté. Ce signal Raman exalté peut ensuite interagir avec la nanoparticule, induisant une exaltation supplémentaire du signal Raman. Ce deuxième processus est appelé processus de re-radiation. Le facteur d'exaltation  $G$  peut alors être estimé à partir de l'Équation 3.

$$G(\lambda_0, \lambda_R) = M_{loc}^2(\lambda_0) \cdot M_{rad}^2(\lambda_R)$$

Équation 3 : Calcul du facteur d'exaltation d'une molécule

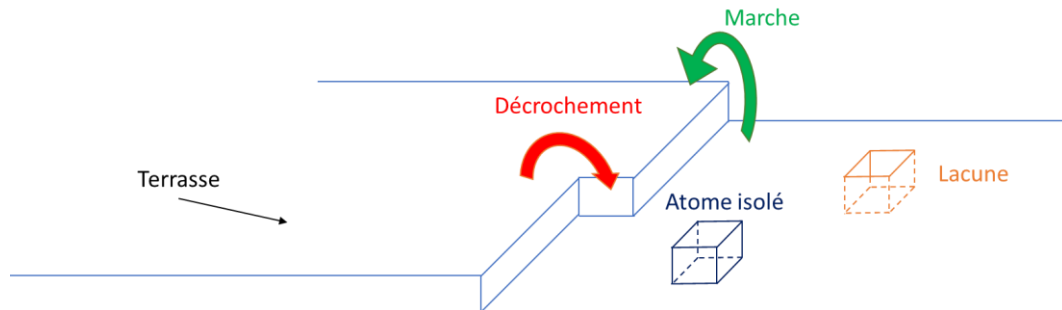
Dans l'Équation 3,  $\lambda_0$  représente la longueur d'onde incidente,  $\lambda_R$  la longueur d'onde Raman,  $M_{loc}$  le facteur d'exaltation local à  $\lambda_0$ ,  $M_{rad}$  le facteur d'exaltation de re-radiation à  $\lambda_R$ . Si on considère  $\lambda_0$  et  $\lambda_R$  proches alors  $M_{loc} \approx M_{rad}$  et on peut réduire l'équation à  $G \approx M^4$ . En revanche si  $\lambda_0$  et  $\lambda_R$  sont éloignés de plusieurs dizaines de nanomètres on ne peut plus les considérer comme égaux. L'exaltation maximale n'est plus alors obtenue pour une résonance plasmon proche de la longueur d'onde d'excitation mais pour des règles d'optimisation précises dépendantes de la longueur d'onde d'excitation et de la forme des nanostructures. Ainsi pour des nanoparticules cylindriques ou triangulaires, il a été montré que le plasmon doit se situer entre les deux longueurs d'onde  $\lambda_0$  et  $\lambda_R$  pour que  $G$  soit maximal (étude faite avec la molécule BPE<sup>37</sup> pour un LASER à  $\lambda_0=633$  nm et  $\lambda_R=685$  nm).

L'exaltation peut être si forte que dans certains cas, la sensibilité de la molécule unique a pu être atteinte<sup>38,39</sup>. La contribution électromagnétique est estimée à  $10^8$ .

##### b) Le processus chimique

On débat encore aujourd'hui de la contribution de l'effet chimique en SERS et son interprétation n'est toujours pas complètement établie. Toutefois, il est communément admis que si une molécule s'adsorbe à la surface d'une nanostructure métallique, sa configuration électronique sera modifiée soit par la création de complexes métal-molécule, soit par

transfert de charge entre la molécule et le métal. Dans les deux cas, cela va induire un changement de la polarisabilité de la molécule<sup>40,41</sup>. Cette modification peut se traduire par une exaltation du signal Raman. Si la surface sur laquelle s'adsorbe la molécule a des défauts comme des atomes isolés, des lacunes d'atomes ou des marches ou encore des décrochements, **Figure 7**, cela peut augmenter cet effet chimique<sup>42</sup>.



**Figure 7 : Exemples de défauts**

La littérature conclut sur le fait que la contribution chimique à l'intensité du signal, de l'ordre  $10^2$ , est beaucoup plus faible que la contribution électromagnétique de l'ordre  $10^8$  et peut être négligée<sup>41</sup>.

### 5) Capteurs SERS

Grâce à sa haute sensibilité allant jusqu'à la molécule unique, le SERS peut-être utilisé pour détecter et observer de très faible quantité de molécules et donc permettre le développement de capteurs ultra-sensibles pouvant atteindre des concentrations de l'ordre du pM. En fonctionnalisant les nanostructures d'or avec un biorécepteur, il est également possible de former un biocapteur permettant non seulement la détection mais également l'observation de l'interaction moléculaire biorécepteur-analyte. En calibrant le signal SERS avec des concentrations connues, une mesure quantitative de la quantité de molécules dans une solution peut être effectuée.

Ces avantages permettent d'obtenir des capteurs performants et rapides. Le laboratoire CSPBAT a été impliqué dans plusieurs projets de recherche ayant pour objectif de concevoir et de valider ce genre de capteurs SERS pour différentes applications.

Par exemple dans le projet européen Nanoantenna (2009-2013), l'objectif était de développer un biocapteur SERS pour détecter des protéines à des concentrations de l'ordre du pM. Pour obtenir une sélectivité élevée, des aptamères ont été utilisés comme biorécepteurs et des nanostructures d'or comme transducteurs plasmoniques.

Tout d'abord, les nanostructures ont été optimisées pour atteindre le signal SERS le plus élevé. Il a ensuite été montré<sup>43</sup> que l'utilisation de nanostructures conçu par lithographie électronique couplée avec des aptamères permettaient la détection de la superoxyde dismutase 2 (MnSOD, un biomarqueur du cancer du foie) à des concentrations de l'ordre du nM aussi bien dans une solution pure que dans un fluide biologique (sérum, salive, ...). Ce projet a apporté la preuve de concept d'un tel biocapteur. Des mesures plus récentes ont montré que ce capteur avait la possibilité de réduire la limite de détection à des concentrations de l'ordre du pM, permettant une amélioration significative par rapport aux méthodes cliniques actuelles (Elisa notamment)<sup>44</sup>.



Dans le cadre du ANR Piranex (2013-2017), l'objectif était de proposer un système bimodal couplant les méthodes de détection par imagerie SPR (SPR imaging, SPRi) et par SERS dans un même instrument. La SPRi permet ainsi la détection et la quantification en temps réel des cibles à détecter alors que le SERS permet leur identification. Le projet s'est alors focalisé sur la conception d'un substrat plasmonique unique permettant l'excitation simultanée de plasmons de surface propagatifs (PSP) et localisés (PSL). L'option choisie fut l'étude théorique et expérimentale des propriétés optiques de substrats constitués de nanostructures d'or (pour les PSL) déposées à la surface d'un film d'or (pour les PSP). Après une fonctionnalisation avec des aptamères, ce type de substrats a pu être utilisé comme biopuces.

Dans ce projet une étude<sup>45</sup> a notamment été réalisée sur la détection de l'ochratoxine A (OTA, un contaminant en agro-alimentaire) par SERS. Pour cette étude, les échantillons SERS sont des surfaces rugueuses de 6 nm d'or. Ces surfaces ont été fonctionnalisées avec un aptamère spécifique de l'OTA. Avec ce type d'échantillon, il a été possible d'atteindre une concentration limite de l'ordre du pM. Pour obtenir ce résultat, des méthodes statistiques multivariées comme la méthode par analyse par composantes principales (Principal Component Analysis, PCA) ou la méthode des moindres carrés (Partial Least Square, PLS) ont été utilisées. Elles permettent une analyse fine des variations spectrales du signal SERS en fonction des conditions expérimentales de manière supervisée (PLS, prise en compte de la concentration) ou non (PCA). Ces méthodes ont permis de séparer les différentes concentrations sur une large gamme (de 10 pM à 1  $\mu$ M) et de proposer un modèle prédictif des concentrations basé notamment sur les variations des bandes de l'aptamère. La sélectivité du capteur a également été démontrée sur d'autres molécules comme la BSA ou la toxine DON.

## C) La microbalance à quartz

La microbalance à quartz fonctionne sur le principe de l'effet piézoélectrique. Donc je vais commencer cette partie par présenter l'effet piézoélectrique puis je passerai ensuite au fonctionnement de la microbalance à quartz. Je vais finir par montrer des exemples de capteur réalisé avec la microbalance à quartz.

### 1) L'effet piézoélectrique

L'effet piézoélectrique est une propriété spécifique de certains matériaux qui consiste en la faculté de se polariser électriquement sous une contrainte mécanique (effet piézoélectrique direct) ou de se déformer sous une contrainte électrique (effet piézoélectrique indirect). Cet effet est utilisé de façon indirecte dans les montres à quartz.

Au début du XVIII<sup>e</sup> siècle, des travaux précurseurs ont été réalisés sur l'étude de l'effet pyroélectrique qui consiste au changement de la polarisation d'un quartz sous échauffement. en 1817, René Just Haüy a étudié en détail l'effet pyroélectrique et Antoine Becquerel reprit son étude sur plusieurs matériaux et mesura l'électricité créée par ce phénomène pour chaque matériaux 1823 et 1827<sup>46,47</sup>.

L'effet piézoélectrique fut découvert en 1880 par Pierre et Jacques Curie. En combinant leurs savoirs sur la pyroélectricité et la cristallographie, ils prédirent et démontrèrent l'effet piézoélectrique dans le sens direct sur des cristaux de quartz. L'effet indirect fut prédit par Gabriel Lippmann<sup>48</sup> en 1881 via des calculs thermodynamiques et prouvé par les Curie immédiatement<sup>49</sup>. Mais c'est cette même année que Wilhelm Hankel un scientifique allemand qui proposa le terme piézoélectricité venant du grec « piezin » pour appuyer/presser.

En pratique, l'effet piézoélectrique fut utilisé par les frères Curie pour construire la balance à quartz piézoélectrique. Pierre et Marie Curie s'en servirent en 1900 pour mesurer la radioactivité des sels d'uranium, radium et de polonium. En 1929, Cady démontre que l'effet piézoélectrique inverse permet d'obtenir des matériaux avec des oscillations particulièrement stables. Lorsque l'on applique en continu cet effet indirect sur un quartz, on peut entretenir l'oscillation qui, en régime permanent reste à une fréquence très précise. Ceci donne naissance à la microbalance à quartz.

### 2) La microbalance à cristal quartz (QCM)

Lors de la Seconde Guerre mondiale, des résonateurs à quartz étaient utilisés pour avoir une fréquence stable pour les communications radios et on accordait la fréquence en faisant une marque au crayon sur une des électrodes<sup>50</sup>. Lors du marquage au crayon, une partie du carbone de la mine se déposait à la surface et cela induisait un changement de fréquence du quartz. Cet effet fut modélisé par Sauerbrey ce qui a donné l'équation portant son nom (**Équation 4**).

$$\Delta f = \frac{-2f^2}{A\rho c} \Delta m$$

Équation 4 : équation de Sauerbrey

Cette équation relie la différence de masse à la différence de fréquence. Ici  $\rho = 2650 \text{ kg.m}^{-3}$  est la masse volumique du quartz,  $c$  est la célérité d'une onde acoustique dans le quartz,  $A$  est l'aire du recouvrement par les électrodes et  $f$  est la fréquence de résonance. Cette équation est utilisée pour suivre le dépôt sous vide de couches fines de matériaux sur des surfaces dans les évaporateurs. Cette nouvelle utilisation des résonateurs est appelée microbalance à cristal de quartz (QCM). Cette technique permet de mesurer des écarts en masse de l'ordre du  $\text{ng.cm}^{-2}$ . De plus, si on regarde la dissipation, capacité du quartz à s'arrêter s'il n'y a plus de tension, on peut avoir accès aux interactions entre le fluide et la surface (couche dure ou couche molle).

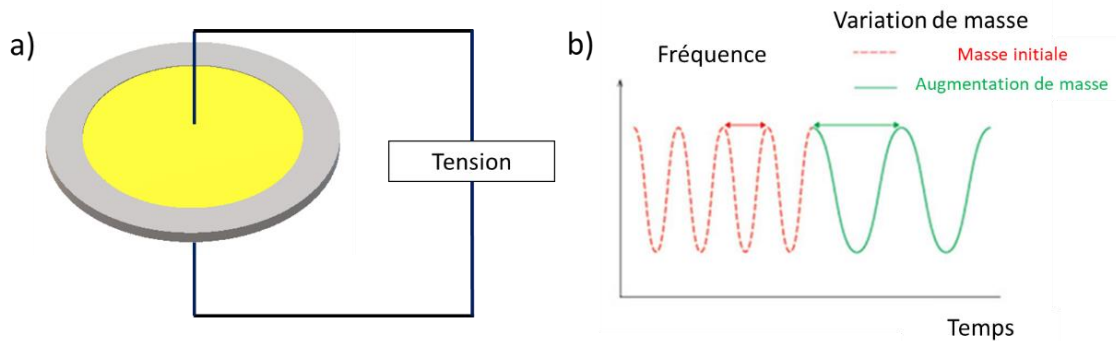


Figure 8 : a) Schéma d'une QCM, b) représentation de la fréquence

La QCM est une microbalance piézoélectrique dans laquelle on utilise un quartz comme surface piézoélectrique, sur lequel les deux faces sont recouvertes d'électrodes. Cette technique a pour principe de faire osciller un quartz en appliquant une tension entre les deux électrodes (Figure 8 a), cette oscillation va avoir une fréquence bien précise. Lorsque l'on va adsorber des molécules sur la surface du quartz, on va alors ralentir la fréquence de résonance du quartz (Figure 8 b). Si on se place dans des conditions où le changement de milieu n'est pas trop important, on peut relier la différence de fréquence à la masse de molécules adsorbées à la surface via l'équation de Sauerbrey (Équation 5) dans laquelle on suppose que la masse ajoutée est beaucoup plus faible que celle du quartz. On peut modifier cette équation pour obtenir l'Équation 5.

$$\Delta m = - \frac{C \Delta f}{n}$$

Équation 5 : Équation de Sauerbrey simplifiée,  $C=17.7\text{ngHz}^{-1}$  pour un cristal de quartz à 5MHz,  $n= 1,3,5,7, \dots$  le rang de l'harmonique

Dans cette équation on fait apparaître une constante  $C$  qui réunit tous les paramètres constants de l'Équation 4,  $f$ ,  $c$ ,  $\rho$  et  $A$ . La valeur de la constante  $C$  dépend du type d'électrode sur le quartz utilisé, ici les électrodes sont en or. Pour mon travail, j'ai utilisé des quartz recouverts d'électrodes d'or. Je prendrai donc cette formule pour les calculs liés aux expériences QCM.

Cette technique nous permet de suivre l'adsorption de molécules sur la surface de l'électrode en temps réel et nous permet d'avoir accès à certains paramètres cinétiques et thermodynamiques comme les coefficients d'adsorption. De plus, on peut avoir accès à la quantité de molécules adsorbées ainsi qu'à la rigidité de la couche.

### 3) Des exemples de capteurs QCM

Il y a plusieurs façons d'utiliser la QCM pour obtenir un biocapteur, on peut soit l'utiliser directement soit l'utiliser avec un biorécepteur.

Par exemple, un immunocapteur direct<sup>51</sup> a été conçu pour la détection et la quantification rapides de l'entérotoxine A staphylococcique (SEA) dans des solutions tamponnées en utilisant une microbalance à cristal de quartz à dissipation (QCM-D) comme méthode de transduction. La couche de détection comprenant l'anticorps anti-SEA a été construite par chimisorption d'une monocouche auto-assemblée de cystéamine sur les électrodes en or placées sur les cristaux de quartz, puis par activation des groupes amino de surface avec l'agent de réticulation 1,4- phénylène diisothiocyanate (PDITC) et liaison covalente de la protéine de liaison. Quatre anticorps anti-SEA ont été sélectionnés pour constituer le dispositif de détection le plus sensible. Avec la couche de détection optimisée, une courbe standard pour le test direct de la SEA a été établie à partir des réponses QCM-D dans une plage de travail de 50-2000 ng mL<sup>-1</sup> avec une limite de détection de 20 ng mL<sup>-1</sup>. En utilisant un test de type sandwich, la réponse était environ deux fois plus élevée et, par conséquent, la concentration mesurable la plus basse est descendue à 7 ng mL<sup>-1</sup> pour une durée totale de dosage plus longue. La comparaison des anticorps de capture provenant de différentes sources a mis en évidence la supériorité de l'anticorps polyclonal anti-SEA de lapin pour la liaison d'une grande quantité de protéines cibles et inversement la très faible capacité des deux anticorps monoclonaux. La saturation du capteur correspond à 75 % de l'occupation totale des sites de liaison à la surface par les molécules SEA. Le format de l'analyse sandwich a donné une amplification de la réponse et la quantité de seconds anticorps liés était égale à 230 ng cm<sup>-2</sup> à la saturation du capteur. Une monocouche compacte de molécules d'IgG correspond à une densité de surface allant de 200 (orientation latérale) à 370 (orientation finale) ng cm<sup>-2</sup>. La densité de la deuxième couche d'anticorps semble se situer entre ces deux configurations, ce qui correspond à l'orientation attendue lorsqu'un deuxième anticorps se lie à un antigène. En résumé, l'immunocapteur piézoélectrique pour la détection et la quantification de l'entérotoxine A staphylococcique dans la plage des faibles concentrations dans les 15 minutes, permet d'obtenir de bonne performance de biocapteur. La configuration optimisée du capteur immunitaire associe une monocouche d' amino-thiol auto-assemblée et l'immobilisation d'un anticorps polyclonal anti-SEA via la protéine A. La construction d'un tel système assure un contrôle de la densité et de l'orientation des anticorps, permettant ainsi de détecter et de quantifier les cibles. Ces systèmes ont un potentiel considérable pour la détection rapide et fiable de cibles à l'état de traces dans divers milieux.

On peut aussi utiliser la QCM avec un transducteur comme des nanoparticules<sup>52</sup>. On peut déposer des nanoparticules d'or (AuNP) sur des puces de capteur à cristal de quartz afin de mettre au point des biocapteurs piézoélectriques à entérotoxine A (SEA) staphylococcique à réponse amplifiée. Les nanoparticules ont été assemblées sur des puces de capteurs à cristaux de quartz revêtus d'or ou de silicium par un processus de chimisorption sur des monocouches auto-assemblées à terminaison thiol et amine. L'objectif de cette nanostructuration était de modifier la topographie de la surface et d'améliorer l'accessibilité des sites de liaison à la surface. Des biointerfaces, comprenant un anticorps polyclonal contre l'entérotoxine A staphylococcique (SEA), ont ensuite été développées sur ces capteurs recouverts de nanoparticules d'or et leur capacité à capturer une SEA a été contrôlée en temps réel avec une

microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation. Il a été découvert que la densité de surface de l'anticorps de capture était similaire pour les capteurs nanostructurés et plans. La réponse du capteur lors de la liaison de la SEA à l'anticorps, était significativement plus élevée pour les capteurs nanostructurés que pour les capteurs plans. De plus, la limite de détection était plus basse pour les capteurs nanostructurés : 8 ng/mL contre 20 ng/mL pour les capteurs plans. Ceci a été rationalisé par une accessibilité éventuellement meilleure des sites de liaison à l'antigène plutôt que par une conséquence d'une augmentation spécifique de la surface.

Avant l'immobilisation de nanoparticules les substrats de silicium et d'or ont été fonctionnalisés afin de générer des couches terminées par une amine. À ceci on a rajouté un thiol à terminaison acide pour former de multiples points d'ancrage pour fixer les nanoparticules. Les caractérisations spectroscopiques des couches fonctionnalisées ont montré des différences dans la réactivité de l'or et du silicium. Par conséquent, pour obtenir des densités et des dispersions similaires sur les substrats plans, des nanoparticules d'or ont été déposées selon différentes méthodes sur les substrats. Des interfaces de détection comprenant des anticorps anti-SEA immobilisés par affinité pour la protéine A ont été construites sur ces capteurs nanostructurés et les puces résultantes ont été utilisées comme transducteurs piézoélectriques pour capturer et détecter les SEA dans un milieu tampon. Il est apparu que, bien que le nombre de sites de liaison tel que déterminé à partir des mesures de QCM soit le même pour les capteurs plans et revêtus de nanoparticules d'or, la détection était significativement améliorée avec les capteurs nanostructurés. Cette amélioration est probablement due à une meilleure activité des anticorps lorsqu'ils sont liés à des nanoparticules, résultant d'une meilleure accessibilité des sites de liaison à l'antigène. L'amplification de la réponse du capteur a été obtenue en appliquant l'anticorps polyclonal anti-SEA après l'étape de capture de l'analyte, ce qui a permis de réduire la limite de détection jusqu'à 1 ng / mL.

Pour cette étude, j'ai utilisé des cristaux de quartz avec des nanostructures et je me suis ainsi placé dans le cas du deuxième exemple.

## D) Les intérêts d'un couplage QCM/SERS

Ce projet de thèse d'inscrit dans le cadre du projet ANR Franco-Autrichien NANOBIOSENSOR, qui a pour but de concevoir un biocapteur QCM/SERS pour capter des molécules de faibles poids moléculaires. Le développement de transducteurs nanostructurés pourrait nous permettre d'avoir une meilleure reproductibilité et fiabilité des mesures. En effet, l'utilisation des nanostructures doit nous permettre d'obtenir le signal SERS des molécules attachées à la surface et de les identifier. De plus, coupler ces nanostructures avec un quartz de QCM doit nous permettre de quantifier le nombre de molécules déposées à la surface. Nous serions donc en mesure d'observer, d'identifier et de quantifier les analytes à détecter.

Dans ce contexte, ce couplage a deux objectifs distincts : (i) améliorer la compréhension des interactions moléculaires entre une cible (la streptomycine dans notre cas) et son biorécepteur (un aptamère ici) et (ii) coupler ces deux méthodes pour développer un capteur permettant la détection d'analytes de petites tailles.

Ce couplage a été envisagé car cette combinaison peut améliorer les performances des deux techniques. Premièrement, la méthode QCM fournit une détection rapide de toutes les interactions entre le biorécepteur et la cible choisie, ouvrant la voie à une étude détaillée du mécanisme d'interaction au niveau moléculaire de manière quantitative. Deuxièmement, le SERS peut nous donner accès à l'identification des analytes ainsi qu'à toute modification structurale liée à l'interaction avec le biorécepteur. En combinant les techniques vibrationnelles et piézoélectriques dans une même configuration, nous pouvons proposer un biocapteur rapide, fiable, spécifique et très sensible.

Dans ce manuscrit, je vais dans un premier temps présenter l'optimisation des transducteurs permettant le couplage QCM/SERS (nanocylindres d'or sur surfaces d'or) (**Chapitre 2**). Dans ce chapitre, je présenterai les résultats de l'étude plasmonique et de l'étude du signal SERS de ces transducteurs. Dans un deuxième temps, je détaillerai l'optimisation du protocole mise au point pour la QCM pour la détection de la streptomycine (**Chapitre 3**). Enfin, je terminerai par le couplage direct des deux techniques (**Chapitre 4**).

## E) Bibliographie

1. Oliver NS, Toumazou C, Cass AEG, Johnston DG. Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabetic Medicine*. 2009;26(3):197-210. doi:10.1111/j.1464-5491.2008.02642.x
2. Boujday S, Chapelle ML de la, Srajer J, Knoll W. Enhanced Vibrational Spectroscopies as Tools for Small Molecule Biosensing. *Sensors*. 2015;15(9):21239-21264. doi:10.3390/s150921239
3. Boujday S, Méthivier C, Beccard B, Pradier C-M. Innovative surface characterization techniques applied to immunosensor elaboration and test: Comparing the efficiency of Fourier transform–surface plasmon resonance, quartz crystal microbalance with dissipation measurements, and polarization modulation–reflection absorption infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry*. 2009;387(2):194-201. doi:10.1016/j.ab.2009.01.031
4. Grand J, Adam P-M, Grimault A-S, et al. Optical Extinction Spectroscopy of Oblate, Prolate and Ellipsoid Shaped Gold Nanoparticles: Experiments and Theory. *Plasmonics*. 2006;1(2):135-140. doi:10.1007/s11468-006-9014-7
5. Chen H, Kou X, Yang Z, Ni W, Wang J. Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2008;24(10):5233-5237. doi:10.1021/la800305j
6. Link S, El-Sayed MA. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*. 2000;19(3):409-453. doi:10.1080/01442350050034180
7. Mock JJ, Smith DR, Schultz S. Local Refractive Index Dependence of Plasmon Resonance Spectra from Individual Nanoparticles. *Nano Lett*. 2003;3(4):485-491. doi:10.1021/nl0340475
8. Baumberg JJ, Kelf TA, Sugawara Y, et al. Angle-Resolved Surface-Enhanced Raman Scattering on Metallic Nanostructured Plasmonic Crystals. *Nano Lett*. 2005;5(11):2262-2267. doi:10.1021/nl051618f
9. Sharma AK, Gupta BD. On the performance of different bimetallic combinations in surface plasmon resonance based fiber optic sensors. *Journal of Applied Physics*. 2007;101(9):093111. doi:10.1063/1.2721779
10. Gillibert R, Colas F, Yasukuni R, Picardi G, de la Chapelle ML. Plasmonic Properties of Aluminum Nanocylinders in the Visible Range. *J Phys Chem C*. 2017;121(4):2402-2409. doi:10.1021/acs.jpcc.6b11779
11. Gillibert R, Tafer T, Chapelle ML de la. Strong coupling between localized surface plasmon and Bragg mode on aluminum nanocylinders grating deposited on aluminum film. *physica status solidi (a)*. 2017;214(8):1600793. doi:10.1002/pssa.201600793
12. Liz-Marzán LM. Nanometals: formation and color. *Materials today*. 2004;7(2):p.26-31.



13. Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2001;17(22):6782-6786. doi:10.1021/la0104323
14. Rayleigh L. On the scattering of light by small particles. *Philosophical Magazine*. 1871;A41:p447-454.
15. Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*. 1908;330(3):377-445. doi:10.1002/andp.19083300302
16. Kreibig U, Vollmer M. Theoretical Considerations. In: Kreibig U, Vollmer M, eds. *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer Series in Materials Science. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1995:13-201. doi:10.1007/978-3-662-09109-8\_2
17. CAUCHETEUR C. Plasmons de surface : principes physiques et applications. Ref : TIPO53WEB - "Physique Chimie." <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/sciences-fondamentales-th8/etats-de-la-matiere-42109210/plasmons-de-surface-principes-physiques-et-applications-af3565/>. Published July 10, 2014. Accessed July 22, 2019.
18. Lee YH, Chen H, Xu Q-H, Wang J. Refractive Index Sensitivities of Noble Metal Nanocrystals: The Effects of Multipolar Plasmon Resonances and the Metal Type. *J Phys Chem C*. 2011;115(16):7997-8004. doi:10.1021/jp202574r
19. Su K-H, Wei Q-H, Zhang X, Mock JJ, Smith DR, Schultz S. Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *Nano Lett*. 2003;3(8):1087-1090. doi:10.1021/nl034197f
20. Jain PK, Huang W, El-Sayed MA. On the Universal Scaling Behavior of the Distance Decay of Plasmon Coupling in Metal Nanoparticle Pairs: A Plasmon Ruler Equation. *Nano Lett*. 2007;7(7):2080-2088. doi:10.1021/nl071008a
21. Nordlander P, Oubre C, Prodan E, Li K, Stockman MI. Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers. *Nano Lett*. 2004;4(5):899-903. doi:10.1021/nl049681c
22. Prodan E, Radloff C, Halas NJ, Nordlander P. A Hybridization Model for the Plasmon Response of Complex Nanostructures. *Science*. 2003;302(5644):419-422. doi:10.1126/science.1089171
23. Wang H, Brandl DW, Nordlander P, Halas NJ. Plasmonic Nanostructures: Artificial Molecules. *Acc Chem Res*. 2007;40(1):53-62. doi:10.1021/ar0401045
24. Luk'yanchuk B, Zheludev NI, Maier SA, et al. The Fano resonance in plasmonic nanostructures and metamaterials. *Nature Materials*. 2010;9(9):707-715. doi:10.1038/nmat2810
25. Miroshnichenko AE, Flach S, Kivshar YS. Fano resonances in nanoscale structures. *Rev Mod Phys*. 2010;82(3):2257-2298. doi:10.1103/RevModPhys.82.2257
26. Rahmani M, Luk'yanchuk B, Hong M. Fano resonance in novel plasmonic nanostructures. *Laser & Photonics Reviews*. 2013;7(3):329-349. doi:10.1002/lpor.201200021



27. Smekal A. Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften*. 1923;11(43):873-875. doi:10.1007/BF01576902
28. Landsberg GS, Mandelstam LI. New phenomenon in scattering of light (preliminary report). *Journal of the Russian Physico-Chemical Society*. 1928:p335.
29. LANDSBERG G, Mandelstam LI. Eine neue Erscheinung bei der Lichtzerstreuung in Krystallen. *Naturwissenschaften*. 1928;16:558.
30. Landsberg Gr, Mandelstam L. Über die Lichtzerstreuung in Kristallen. *Z Physik*. 1928;50(11):769-780. doi:10.1007/BF01339412
31. Raman CV, Krishnan KS. A New Type of Secondary Radiation. *Nature*. 1928;121(3048):501. doi:10.1038/121501c0
32. Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*. 1974;26(2):163-166. doi:10.1016/0009-2614(74)85388-1
33. Gersten J, Nitzan A. Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces. *J Chem Phys*. 1980;73(7):3023-3037. doi:10.1063/1.440560
34. Le Ru EC, Meyer M, Blackie E, Etchegoin PG. Advanced aspects of electromagnetic SERS enhancement factors at a hot spot. *J Raman Spectrosc*. 2008;39(9):1127-1134. doi:10.1002/jrs.1945
35. Champion A, Ivanecky JE, Child CM, Foster M. On the Mechanism of Chemical Enhancement in Surface-Enhanced Raman Scattering. *J Am Chem Soc*. 1995;117(47):11807-11808. doi:10.1021/ja00152a024
36. Wu D-Y, Liu X-M, Huang Y-F, Ren B, Xu X, Tian Z-Q. Surface Catalytic Coupling Reaction of p-Mercaptoaniline Linking to Silver Nanostructures Responsible for Abnormal SERS Enhancement: A DFT Study. *J Phys Chem C*. 2009;113(42):18212-18222. doi:10.1021/jp9050929
37. Guillot N, de la Chapelle ML. The electromagnetic effect in surface enhanced Raman scattering: Enhancement optimization using precisely controlled nanostructures. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2012;113(18):2321-2333. doi:10.1016/j.jqsrt.2012.04.025
38. Nie S, Emory SR. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science*. 1997;275(5303):1102-1106. doi:10.1126/science.275.5303.1102
39. Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, et al. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys Rev Lett*. 1997;78(9):1667-1670. doi:10.1103/PhysRevLett.78.1667
40. Otto A. Surface-enhanced Raman scattering: "Classical" and "Chemical" origins. In: Cardona M, Güntherodt G, eds. *Light Scattering in Solids IV: Electronics Scattering, Spin*

*Effects, SERS, and Morphic Effects*. Topics in Applied Physics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1984:289-418. doi:10.1007/3-540-11942-6\_24

41. Campion A, Kambhampati P. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem Soc Rev*. 1998;27(4):241-250. doi:10.1039/A827241Z
42. Otto A, Timper J, Billmann J, Pockrand I. Enhanced Inelastic Light Scattering from Metal Electrodes Caused by Adatoms. *Phys Rev Lett*. 1980;45(1):46-49. doi:10.1103/PhysRevLett.45.46
43. Cottat M, D'Andrea C, Yasukuni R, et al. High Sensitivity, High Selectivity SERS Detection of MnSOD Using Optical Nanoantennas Functionalized with Aptamers. *J Phys Chem C*. 2015;119(27):15532-15540. doi:10.1021/acs.jpcc.5b03681
44. David C, Guillot N, Shen H, Toury T, Chapelle ML de la. SERS detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible SERS biosensor. *Nanotechnology*. 2010;21(47):475501. doi:10.1088/0957-4484/21/47/475501
45. Gillibert R, N. Triba M, Chapelle ML de la. Surface enhanced Raman scattering sensor for highly sensitive and selective detection of ochratoxin A. *Analyst*. 2018;143(1):339-345. doi:10.1039/C7AN01730H
46. Becquerel A-C. Expériences sur le développement de l'électricité par la pression ; lois de ce développement. *Annales de chimie et de physique*. 1823;XXII:p5-34.
47. Becquerel A-C. De quelques phénomènes électriques produits par la pression et le clivage des métaux. *Annales de chimie et de physique*. 1827;XXXVI:p265-271.
48. Lippmann G. Principe de la conservation de l'électricité. Gallica. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k348640>. Published 1881. Accessed July 4, 2019.
49. Curie P (1859-1906) A du texte. *Oeuvres de Pierre Curie / publ. par les soins de la société française de physique.*; 1984. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k2282p>. Accessed July 4, 2019.
50. Rodahl M, Höök F, Krozer A, Brzezinski P, Kasemo B. Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Review of Scientific Instruments*. 1995;66(7):3924-3930. doi:10.1063/1.1145396
51. Salmain M, Ghasemi M, Boujday S, et al. Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;29(1):140-144. doi:10.1016/j.bios.2011.08.007
52. Ben Haddada M, Salmain M, Boujday S. Gold colloid-nanostructured surfaces for enhanced piezoelectric immunosensing of staphylococcal enterotoxin A. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;255:1604-1613. doi:10.1016/j.snb.2017.08.180

## Chapitre 2: Optimisation des substrats plasmoniques

### Table des matières

<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>26</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>28</b>
<b>TABLE DES EQUATIONS</b>	<b>28</b>
<b>A) L'OPTIMISATION DE LA PREPARATION</b>	<b>29</b>
1) La lithographie électronique	29
2) La sélection de la dose	30
3) L'étude plasmonique et SERS des réseaux de nanocylindres d'or sur ITO.	31
<b>B) RESEAUX DE NANOCYLINDRES D'OR SUR UN FILM D'OR</b>	<b>34</b>
<b>C) PROPRIETES PLASMONIQUES</b>	<b>35</b>
1) Le dispositif expérimental	35
2) Plasmons de surface	36
a) Les mesures d'extinction pour la hauteur de nanocylindre de 50nm	36
b) Identification des différents modes	37
c) Étude de la distribution du champ électrique par FDTD	39
d) Étude angulaire	41
e) Les échantillons avec une hauteur de nanocylindre de 40nm	43
f) Conclusion sur les propriétés plasmoniques	44
<b>D) ÉTUDE SERS</b>	<b>45</b>
1) Efficacité SERS pour une hauteur de cylindre de 50nm	45
a) La molécule sonde	45
b) Étude SERS à 785nm	46
c) Étude SERS à 660nm	47
d) Conclusion	48
2) Efficacité SERS pour une hauteur de cylindre de 40nm	48
a) La molécule sonde	48
b) Étude SERS à 785nm	49
c) Étude SERS à 638nm	50
d) Le SERS à 532nm	52
e) Influence de la longueur d'onde d'excitation sur le signal SERS	53
<b>E) CONCLUSION</b>	<b>53</b>
<b>F) BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>57</b>

## Table des figures

Figure 9 : schéma du processus de lithographie électronique	30
Figure 10 : schéma de nanostructures d'or sur ITO	30
Figure 11 : Image MEB pour la dose de $210 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ a) diamètre 200nm b) diamètre 250, avec une échelle de 200nm	31
Figure 12 : spectres d'extinction des réseaux de nanocylindres pour différents diamètres (voulus) pour une période de 400 nm	32
Figure 13 : a) Spectre SERS de la BPE pour le diamètre 250 nm (période de 400 nm) à 785 nm, b) intensité du signal SERS en fonction des différents diamètres, en bleu avec un LASER à 633 nm et en vert avec un laser à 785 nm. Les données en vert clair et en bleu clair correspondent à la bandes Raman à $1620 \text{ cm}^{-1}$ et les données en vert foncé et en bleu foncé correspondent à la bandes Raman à $1202 \text{ cm}^{-1}$ . Le signal des deux courbes vertes a été multiplié par 50.	32
Figure 14 : Image MEB de réseaux de nanocylindres de hauteur 50 nm et de diamètre 80 nm (a) et 250 nm (b) pour une épaisseur de film d'or de 50 nm, échelle = 100nm	34
Figure 15 : Schéma des échantillons de nanostructures d'or sur surface d'or avec une épaisseur allant de 20 à 50 nm	34
Figure 16 : a) photographie du spectromètre XploRA b) Schéma de principe du spectromètre XploRA et de la mesure par spectroscopie d'extinction (incidences normale et inclinée)	35
Figure 17 : Spectres d'extinction de réseaux de nanocylindres avec une épaisseur de film d'or de 20nm et une hauteur de cylindres de 50nm	36
Figure 18 : spectres d'extinction pour une hauteur de cylindres de 50nm, pour différents diamètres (250nm courbe en noir, 230 nm courbe en rouge, 210 nm courbe en bleu, 190 nm courbe en vert, 170 nm courbe en rose) et différentes épaisseurs de film d'or : a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm.	37
Figure 19 : Courbes de dispersion calculées (Équation 7) pour différentes épaisseurs d'or, $d_m$ , pour les modes $\text{TM}_0$ (en noir : 20 nm, en rouge : 30 nm et en vert : 40 nm) et $\text{TM}_1$ (en rose). La ligne en tiret correspond aux ordres de diffraction $(\pm 1, 0)$ et $(0, \pm 1)$ et la ligne pointillée aux ordres $(\pm 1, \pm 1)$ (Équation 8). La couleur du contour des points correspond à l'appariement entre les ordres de diffraction et les courbes de dispersions pour les résonances A, B et C.	38
Figure 20 : Évolution de la position des bandes plasmons (données expérimentales : symboles pleins et données théoriques : symboles vides) pour différentes épaisseurs de film.	39
Figure 21 : Distributions du champ électrique autour des nanostructures de 200nm de diamètre et pour les épaisseurs d'or de 20, 30 et 40nm calculées par FDTD pour les résonances A, B et C. Sur la gauche de chaque image est indiquée l'exaltation du champ électrique (amplitude du champ incident égale à 1)	39
Figure 22 : Distribution du champ autour des nanostructures de 100 à 250 nm de diamètre et pour les épaisseurs d'or de 20-40 nm calculée par FDTD pour la résonance A dont la position est indiquée en haut de chaque colonne. Sur la gauche est indiquée l'exaltation du champ pour un champ incident égal à 1	40
Figure 23 : Évolution du spectre d'extinction après avoir incliné l'échantillon entre 0 et $51^\circ$ pour un diamètre de 250 nm et pour une épaisseur de a) 20 nm et b) 30 nm. c) et d) Évolution de la position expérimentale (symboles pleins) pour les différents angles et	

les deux épaisseurs de film 20 (c) et 30 (d) nm. Les carrés bleus représentent le mode  $\{(-1,0) \text{ et } (0,-1)\}$  /TM<sub>0</sub>, les losanges bleus nuit le mode  $\{(1,0) \text{ et } (0,1)\}$  /TM<sub>0</sub>, les triangles rouges le mode  $(-1,1)$  /TM<sub>0</sub>, les triangles roses le mode  $(-1,1)$  /TM<sub>0</sub> pour c) et le mode  $(1,1)$  /TM<sub>0</sub> pour d), les pentagones verts le mode  $(-1,0)$  ou  $(0,-1)$  /TM<sub>1</sub>, les gris et noirs sont des modes non attribués. Les symboles vides correspondent aux positions calculées analytiquement. Les carrés bleus représentent le mode  $\{(-1,0) \text{ et } (0,-1)\}$  /TM<sub>0</sub>, les losanges bleus nuit le mode  $\{(1,0) \text{ et } (0,1)\}$  /TM<sub>0</sub>, les triangles rouges le mode  $(-1,1)$  /TM<sub>0</sub>, les triangles roses foncés le mode  $(-1,1)$  /TM<sub>0</sub> et les roses le mode  $(1,1)$  /TM<sub>0</sub>, les pentagones verts le mode  $(-1,0)$  ou  $(0,-1)$  /TM<sub>1</sub>. 41

Figure 24 : Courbes de dispersion expérimentales en pointillé et théoriques en trait plein pour différentes épaisseurs, 20 nm en rouge et 30 nm en noir. a) constante de propagation en fonction de la longueur d'onde, b) pulsation en fonction du nombre d'onde 42

Figure 25 : spectres d'extinction pour une hauteur de cylindre de 40nm, pour différents diamètres (250 nm courbe noire, 230 nm rouge, 210 nm bleue, 190 nm verte, 170 nm rose) et différentes épaisseurs de film d'or : a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm. 43

Figure 26 : Évolution de la position des bandes plasmons (nanocylindres avec une hauteur de 40 nm : symboles pleins et nanocylindres avec une hauteur de 50 nm : symboles vides) pour différentes épaisseurs de film 44

Figure 27 : spectre SERS du 4—Aminothiophenol mesuré sur un réseau de nanocylindres de diamètre 250nm et de hauteur 50 nm sur un film d'or de 20nm d'épaisseur avec un LASER à 785nm. En insert : représentation chimique du 4—Aminothiophenol 45

Figure 28 : i) schéma réactionnel de la réaction entre deux MBAB pour former une double liaison N=N, tirée de <sup>17</sup> ii) Spectre SERS avec l'apparition des bandes liés à la formation d'un dimère de MBAM a) spectre Raman de la MBAM b) spectre SERS sous excitation à 514nm sur des nanoparticules d'argent tirée de <sup>18</sup> 46

Figure 29 : spectres SERS mesurés à 785 nm pour les épaisseurs : a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm pour les diamètres de 250 nm (courbe noire), 230 nm (courbe rouge), 210 nm (courbe bleue), 190 nm (courbe verte), 170 nm (courbe rose) 46

Figure 30 : Intensité intégrée des bandes à 1080cm<sup>-1</sup> (carrés noirs) et à 1580cm<sup>-1</sup> (ronds rouges) en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20nm, b) 30nm, c) 40nm et d) 50nm pour une excitation à 785nm 47

Figure 31 : spectres SERS à 660 nm pour les épaisseurs de a) 20nm et b) 30nm pour différents diamètres (250nm : courbe noire, 230nm : courbe rouge, 210nm : courbe bleue, 190 : courbe verte et 170 : courbe rose). Intensité SERS pour les bandes à 1080cm<sup>-1</sup> (carrés noirs) et à 1580cm<sup>-1</sup> (ronds rouges) pour une épaisseur de c) 20nm et d) 30nm 48

Figure 32 : a) spectre SERS de l'acide 4-mercaptobenzoïque (MBA) sur des nanocylindres de diamètres 250 nm sur surface de 20 nm d'or avec en bleu un LASER à 532 nm, en vert un LASER à 638 nm, en rouge un LASER à 785 nm. En b) la représentation de la MBA 49

Figure 33 : Intensité SERS des bandes à 1070 cm<sup>-1</sup> (ronds noirs) et à 1590cm<sup>-1</sup> (carrés rouges) en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20nm, b) 30nm, c) 40nm et d) 50nm pour une excitation à 785nm. En noir les courbes de tendance pour la bandes à 1070 cm<sup>-1</sup> et en rouge la bande à 1590cm<sup>-1</sup> 50

Figure 34 : Intensité SERS des bandes à 1070cm<sup>-1</sup> (ronds noirs) et à 1590cm<sup>-1</sup> (carrés rouges) en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20nm, b) 30nm, c) 40nm et d) 50nm 50

50nm pour une excitation à 638 nm En noir les courbes de tendance pour la bandes à 1070 $\text{cm}^{-1}$ et en rouge la bande à 1590 $\text{cm}^{-1}$	51
Figure 35 : Intensité SERS des bandes à 1070 $\text{cm}^{-1}$ (ronds noirs) et à 1590 $\text{cm}^{-1}$ (carrés rouges) en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20nm, b) 30nm, c) 40nm et d) 50nm pour une excitation à 532 nm	52
Figure 36 : Rapport d'intensité du signal SERS de la bande à 1590 $\text{cm}^{-1}$ sur la bande à 1070 $\text{cm}^{-1}$ pour une excitation à 532 nm et pour différents diamètres et différentes épaisseurs en rouge 20 nm, en noir 30 nm en bleu 40 nm et en orange 50 nm.	53
Figure 37 : Intensité SERS normalisée des bandes à 1590 $\text{cm}^{-1}$ en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20nm, b) 30nm, c) 40nm et d) 50nm pour les trois longueurs d'onde d'excitation : 532 nm (points rouges), 638 nm (points bleus) et 785 nm (points noirs). La normalisation a été effectuée par rapport l'intensité Raman du silicium mesurée aux trois mêmes longueurs d'onde.	54
Figure 38 : Évolution de la position expérimentale (symboles pleins) pour les différents angles et les deux épaisseurs de film 20 (a) et 30 (b) nm. Les carrés bleus représentent le mode $\{(-1,0) \text{ et } (0,-1)\} / \text{TM0}$ , les losanges bleus nuits le mode $\{(1,0) \text{ et } (0,1)\} / \text{TM0}$ , les triangles rouges le mode $(-1,1) / \text{TM0}$ , les triangles roses le mode $(-1,1) / \text{TM0}$ pour c) et le mode $(1,1) / \text{TM0}$ pour d), les pentagones verts le mode $(-1,0) \text{ ou } (0,-1) / \text{TM1}$ , les gris et noirs sont des modes non attribués. Les symboles vides correspondent aux positions calculées analytiquement. Les carrés bleus représentent le mode $\{(-1,0) \text{ et } (0,-1)\} / \text{TM0}$ , les losanges bleus nuits le mode $\{(1,0) \text{ et } (0,1)\} / \text{TM0}$ , les triangles rouges le mode $(-1,1) / \text{TM0}$ , les triangles roses foncés le mode $(-1,1) / \text{TM0}$ et les roses le mode $(1,1) / \text{TM0}$ , les pentagones verts le mode $(-1,0) \text{ ou } (0,-1) / \text{TM1}$ . En lignes pointillées sont représenté les longueurs d'onde des LASER utilisés en rouge pour le 785 nm, en vert le 638 nm et en bleu le 532 nm.	55

### Table des équations

Équation 6 : formule de l'écart relatif	31
Équation 7 : équation de dispersion	37
Équation 8 : condition de couplage entre les courbes de dispersion et les ordres de diffraction	38

### Table des tableaux

Tableau 1 : moyenne des écarts types pour les différentes doses	31
Tableau 2 : paramètres des courbes de tendance de la Figure 33	49
Tableau 3 : paramètres des courbes de tendance de la Figure 34	51
Tableau 4 : paramètres des courbes de tendance de la Figure 35	53



Les substrats plasmoniques composés de nanostructures métalliques déposés sur un film métallique d'épaisseur nanométrique présentent des propriétés particulières<sup>53</sup>. En effet si les nanostructures sont déposées en réseau sur une surface de nouveaux vecteurs d'onde reliés aux paramètres du réseau (période, forme) vont être créés. Ces vecteurs d'onde peuvent être utilisés pour exciter les modes plasmons à l'intérieur du film. Ces modes sont appelés modes de Bragg et correspondent à l'excitation résonante de plasmons de surface délocalisés à l'intérieur du film<sup>11,52-55</sup> par l'intermédiaire du réseau de nanostructures. Une telle configuration présente certains avantages et confère au substrat certaines propriétés plasmoniques spécifiques, comme démontré précédemment dans d'autres études<sup>56-61</sup>. Il a été démontré que ce type de substrat améliore la résolution spatiale en imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRI)<sup>56</sup> et permet d'obtenir une intensité Raman plus élevée par rapport à celle mesurée avec des nanostructures sur des substrats diélectriques comme l'ITO ou le verre<sup>57-60</sup>. Mon travail sur ces substrats s'est fait dans la continuité de ces études dans le but de les approfondir tout en conservant certains paramètres expérimentaux comme l'utilisation de nanocylindres et une périodicité du réseau de 400 nm.

Pour ce projet, je souhaite déposer des nanostructures sur des quartz de QCM qui sont recouverts d'un film d'or. Pour cette raison, il est intéressant de réaliser une étude plasmonique sur des échantillons de nanostructures d'or sur surface d'or. Les quartz de QCM ont un coût assez élevé, j'ai donc décidé de commencer cette étude des substrats plasmoniques avec des échantillons déposés sur verre.

### A) L'optimisation de la préparation

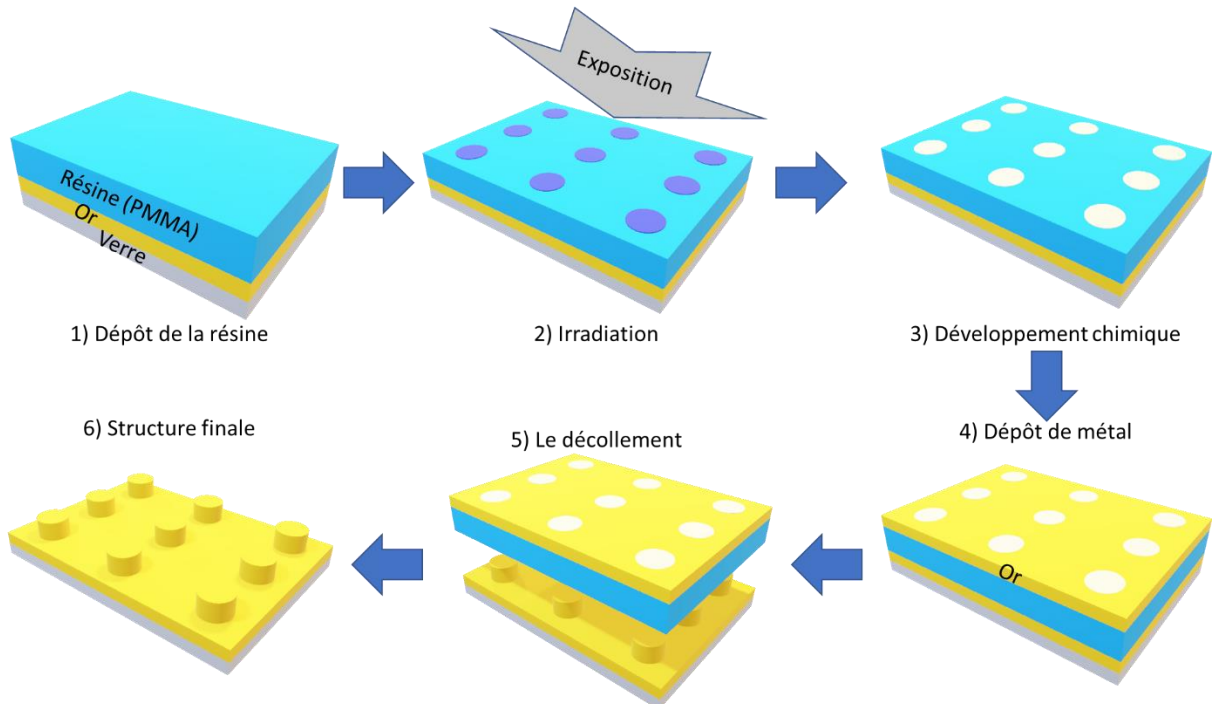
En vue d'optimiser les substrats de nanocylindres d'or sur surface d'or j'ai tout d'abord commencé par optimiser les conditions de préparation de lithographie électronique avec des nanocylindres d'or sur une surface d'ITO d'une épaisseur de 160 nm. J'ai ensuite fait varier le diamètre des nanocylindres pour sélectionner le diamètre optimal pour notre système.

#### 1) La lithographie électronique

Pour réaliser les nanostructures j'ai utilisé la méthode de lithographie électronique (**Figure 9**). Avant tout, il est nécessaire de nettoyer les échantillons sur lesquels seront déposées les nanostructures. Pour cela il faut plonger pendant 5 min les échantillons dans de l'acétone puis pendant 5 min dans l'éthanol et enfin pendant 5 min dans de l'eau ultra pure.

La première étape est de recouvrir la surface d'ITO d'un film mince de 150 nm de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) à  $60 \text{ g.mol}^{-1}$  par induction centrifuge (spincoater) pour obtenir une surface homogène (**Figure 9 1**). Ensuite, l'échantillon est inséré dans un microscope électronique à balayage (MEB). Le faisceau d'électrons sera utilisé pour exposer la couche de PMMA en suivant les motifs d'un masque reproduisant les nanostructures souhaitées (**Figure 9 2**). Par la suite, on insère l'échantillon dans une solution de méthylisobutylcétone/isopropanol (MIBK/IPA) avec un rapport de 1:3 qui va permettre d'éliminer les zones du PMMA qui ont été exposées au faisceau d'électrons. Il se forme alors des trous dans le PMMA de la taille et de la forme des nanostructures désirées formant un masque à la surface de l'ITO (**Figure 9 3**). L'échantillon est ensuite placé dans un évaporateur pour métalliser le substrat d'une épaisseur définie ainsi remplir les zones évidées dans le PMMA pour former les nanostructures (**Figure 9 4**). La dernière étape est le lift-off qui

consiste à plonger l'échantillon dans une solution d'acétone pour enlever la couche de PMMA de la surface pour ne garder que les nanostructures à la surface d'ITO (**Figure 9 5**).

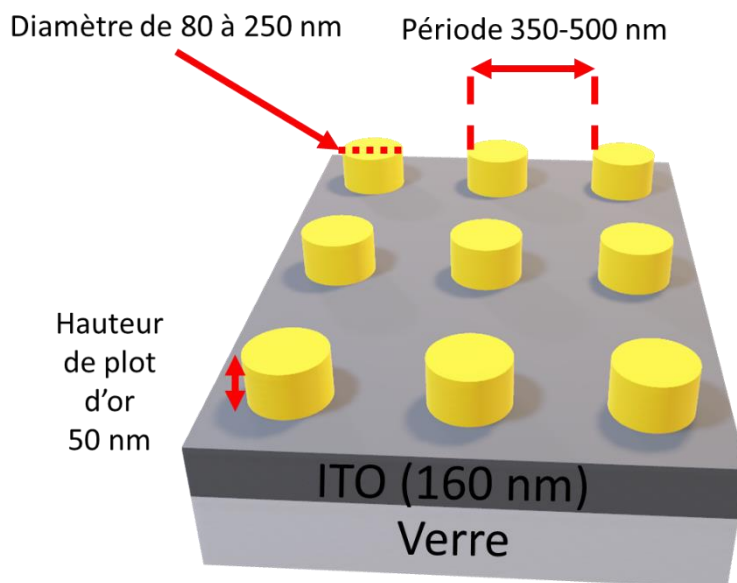


**Figure 9 : Schéma du processus de lithographie électronique**

Cette technique permet d'obtenir des structures avec des tailles contrôlés et avec la forme souhaitée.

### 2) La sélection de la dose

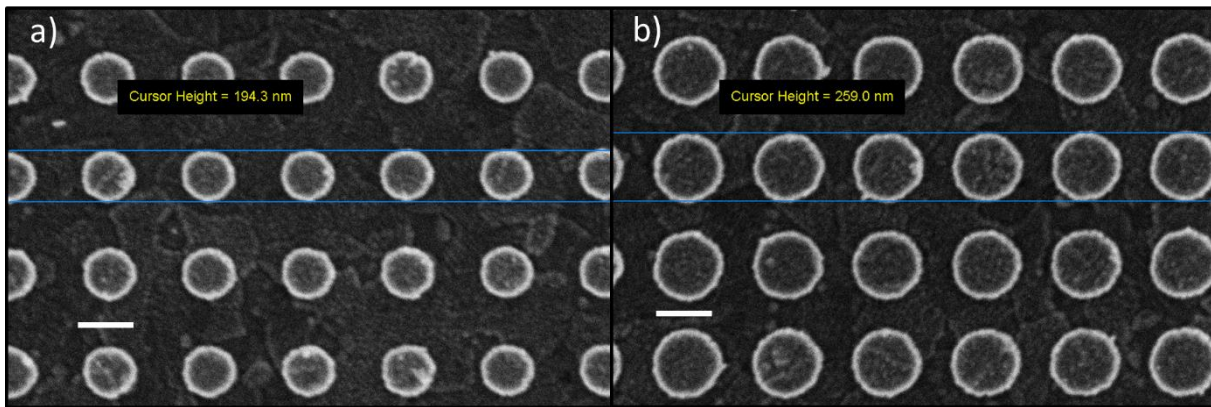
Pour nanostructurer la surface j'ai utilisé la lithographie électronique sur une surface d'ITO de 160 nm. J'ai conçu un échantillon type pour pouvoir étudier différents paramètres. J'ai conçu l'échantillon pour pouvoir trouver la dose adaptée pour la conception de mes échantillons. De plus, j'ai décidé de faire varier le diamètre des nanocylindres et j'ai fait varier la période du réseau.



**Figure 10 : schéma de nanostructures d'or sur ITO**



Pour ce premier échantillon (**Figure 10**) j'ai produit des réseaux carrés de nanocylindres dont les diamètres varient entre 80 et 250 nm. J'ai aussi fait varier la périodicité entre 350 et 500nm et j'ai modifié la dose du faisceau d'électrons entre 100 et 250  $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Toutes ces structures ont été produites sur le même échantillon avec une hauteur de nanocylindres de 50nm. Grâce à cet échantillon j'ai pu décider de la dose à utiliser pour obtenir des nanostructures sur une surface d'or en examinant l'effet de la dose sur les images MEB. J'ai pu me rendre compte que pour les plus petites doses les nanostructures n'étaient pas correctement imprimées pour les grands diamètres. J'ai pu repérer le même problème pour les fortes doses mais cette fois-ci avec les petits diamètres. Lors de mon investigation j'ai pu voir que pour une dose de 210  $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ , on pouvait obtenir des structures bien résolues, **Figure 11**.



**Figure 11** : Image MEB pour la dose de 210  $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$  a) diamètre 200 nm b) diamètre 250 nm, avec une échelle de 200 nm

Il est possible d'avoir un aperçu des motifs avec les images MEB, sur la **Figure 11**, et ainsi voir que pour cette dose les structures sont bien définies et ont un diamètre proche de celui attendu.

Dose ( $\times 100 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	1.3	1.6	1.8	2	2.1	2.2	2.5
Moyenne de l'écart relatif (%)	0.210	0.152	0.135	0.118	0.110	0.132	0.128

**Tableau 1** : Moyenne des écarts types pour les différentes doses

Sur le **Tableau 1**, j'ai calculé l'écart relatif sur le diamètre en calculant :

$$\text{écart relatif} = \frac{|\text{diamètre mesuré} - \text{diamètre attendu}|}{\text{diamètre voulu}}$$

**Équation 6** : Formule de l'écart relatif

On peut voir que la dose avec le plus petit écart relatif est celle de 210  $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cette étude a été faite pour plusieurs périodes et plusieurs diamètres et donc j'ai sélectionné cette dose pour la lithographie sur l'ITO. Dans mon cas, je vais faire des nanostructures sur des surfaces d'or. Or, les surfaces d'or sont plus conductrices que celles d'ITO donc les nanostructures seront mieux résolues sur les surfaces d'or que sur les surfaces d'ITO.

### 3) L'étude plasmonique et SERS des réseaux de nanocylindres d'or sur ITO.

Je me suis centré sur la dose 210  $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$  et j'ai effectué des spectres d'absorbance et SERS pour pouvoir comparer aux nanostructures d'or sur surface d'or.

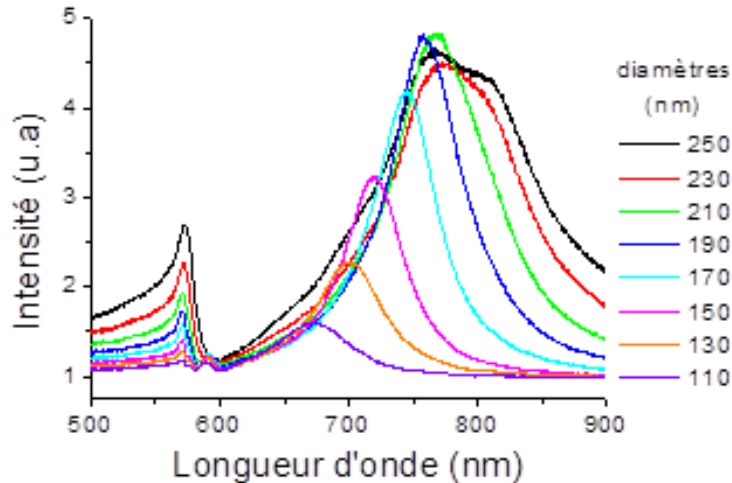


Figure 12 : spectres d'extinction des réseaux de nanocylindres pour différents diamètres (voulus) pour une période de 400 nm

Sur la **Figure 12**, on peut observer les différents modes actifs pour ce type d'échantillon. Il est possible de voir proche de 575 nm une bande très fine et un creux prononcé proche de 600 nm liés à la périodicité des réseaux qui ne va pas bouger pour toutes les mesures. En effet lorsque les nanostructures sont ordonnées il va y avoir l'apparition d'une anomalie de Wood plasmon directement reliée à la périodicité du réseau. Une autre résonance de plasmons de surface localisé (PSL) est observable entre 650 et 850 nm dont la position se décale vers les hautes longueurs d'onde avec l'augmentation du diamètre.

32

J'ai ensuite utilisé ces échantillons pour réaliser une étude SERS pour une période de 400 nm, une dose de 210  $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$  et des diamètres allant de 80 à 250 nm. La surface a été fonctionnalisée en la plongeant dans une solution de 1,2-Bis(4-pyridyl) éthylène (BPE) à 2 mM pendant 2h. Pour cette étude SERS, j'ai utilisé deux longueurs d'onde d'excitation différentes, 633 (Hélium/Néon) et 785 nm, pour étudier l'effet des différentes bandes plasmoniques sur le signal SERS. Les deux LASERS n'ayant pas la même puissance, il ne m'a pas été possible de conclure sur l'impact de la longueur d'onde sur le signal SERS, mais cela me permet d'observer l'effet du diamètre sur la variation du signal SERS.

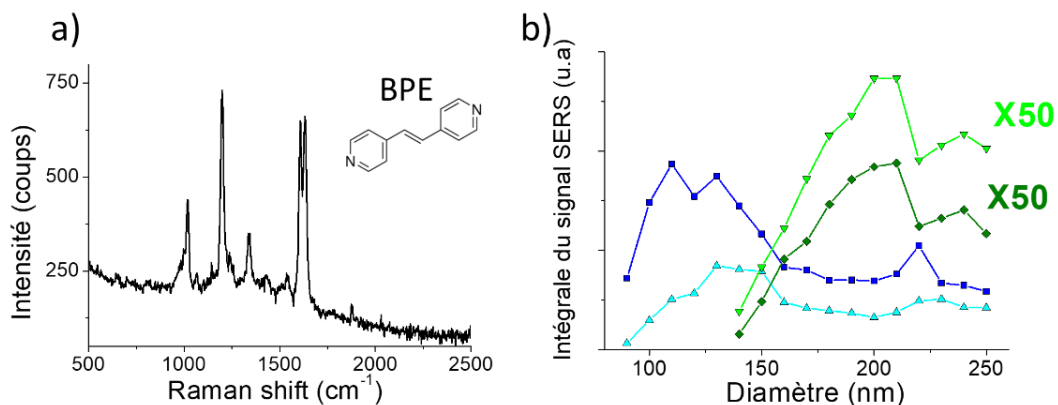


Figure 13 : a) Spectre SERS de la BPE pour le diamètre 250 nm (période de 400 nm) à 785 nm, b) intensité du signal SERS en fonction des différents diamètres, en bleu avec un LASER à 633 nm et en vert avec un laser à 785 nm. Les données en vert clair et en bleu clair correspondent à la bandes Raman à 1620  $\text{cm}^{-1}$  et les données en vert foncé et en bleu foncé correspondent à la bandes Raman à 1202  $\text{cm}^{-1}$ . Le signal des deux courbes vertes a été multiplié par 50.

Sur la **Figure 13 a**), on peut voir le spectre SERS de la BPE sous l'excitation d'un LASER à 785 nm pour le diamètre de 250 nm. Il y a deux bandes importantes que j'ai étudiées : la première est celle à  $1202\text{ cm}^{-1}$  et la deuxième est la double bande à  $1620\text{ cm}^{-1}$ . Pour étudier l'influence du diamètre sur le signal SERS, j'ai calculé l'intensité SERS pour chaque diamètre (**Figure 13 b**). Les symboles carrés représentent l'intensité SERS pour les deux longueurs d'onde pour la bande à  $1202\text{ cm}^{-1}$  et les triangles pour la double bande à  $1620\text{ cm}^{-1}$ . On peut ainsi constater que dans le cas du laser à 633 nm, le signal SERS atteint un maximum pour les diamètres entre 110 et 130 nm ce qui est attendu car les résonances de PSL sont situées entre la longueur d'onde d'excitation et la position de la bande Raman<sup>62-64</sup>. Dans le cas du LASER à 785 nm, on peut remarquer que le maximum est déplacé aux alentours du diamètre de 200 nm car en augmentant le diamètre la résonance va se déplacer vers les hautes longueurs d'onde. Au sein du laboratoire CSPBAT, une étude similaire sur ce type d'échantillons avait déjà été effectuée et mon étude reproduit parfaitement les résultats de cette étude<sup>65</sup>.

Cette étude m'a permis de sélectionner la dose pour la lithographie et d'effectuer des premières études plasmons et SERS de mes échantillons. J'ai ensuite poursuivi mes travaux avec des échantillons nanostructurés sur surface d'or.

## B) Réseaux de nanocylindres d'or sur un film d'or

Dans le cadre du couplage QCM/SERS, j'ai étudié les propriétés plasmoniques et SERS de réseaux de nanocylindres d'or déposés sur un film d'or d'épaisseur contrôlée. J'ai fait varier la hauteur et le diamètre des plots d'or et l'épaisseur du film d'or pour étudier l'influence de ces paramètres sur la position de la résonance PSL et le signal SERS. Pour m'aider à mieux comprendre les signaux, j'ai réalisé des échantillons avec une périodicité constante de 400 nm.

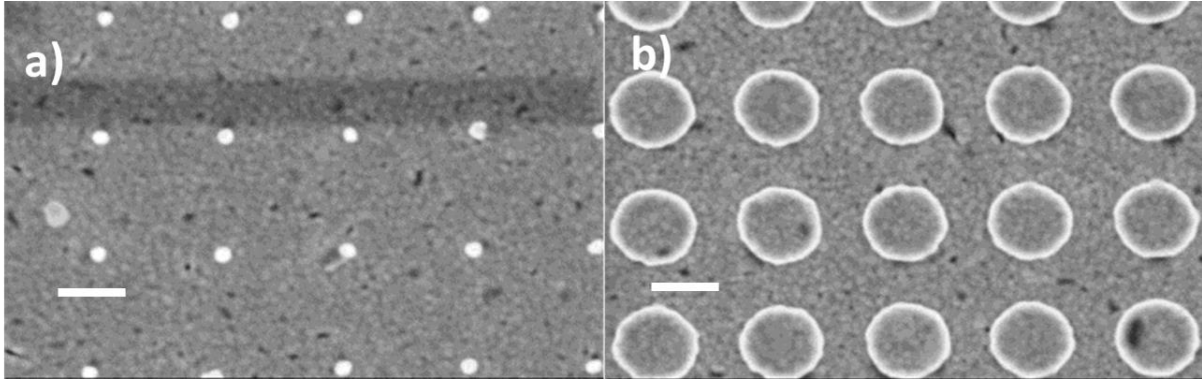


Figure 14 : Image MEB de réseaux de nanocylindres de hauteur 50 nm et de diamètre 80 nm (a) et 250 nm (b) pour une épaisseur de film d'or de 50 nm, échelle = 100 nm

J'ai vérifié les dimensions des nanocylindres par microscopie électronique à balayage (MEB), **Figure 14**. Les plots ont bien une forme cylindrique et sont bien définis avec les diamètres souhaités.

34

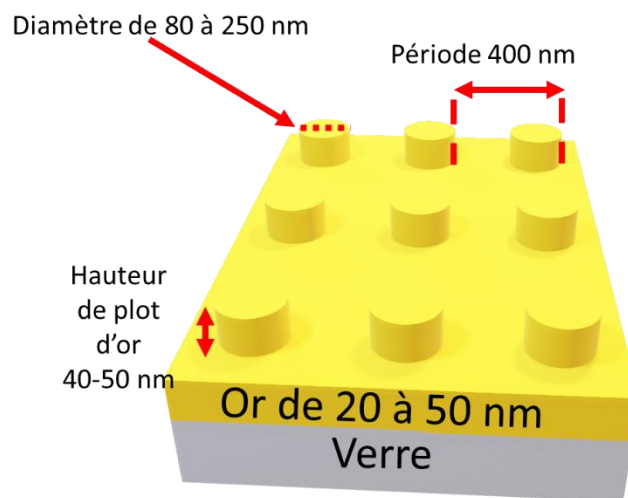


Figure 15 : Schéma des échantillons de nanostructures d'or sur surface d'or avec une épaisseur allant de 20 à 50 nm

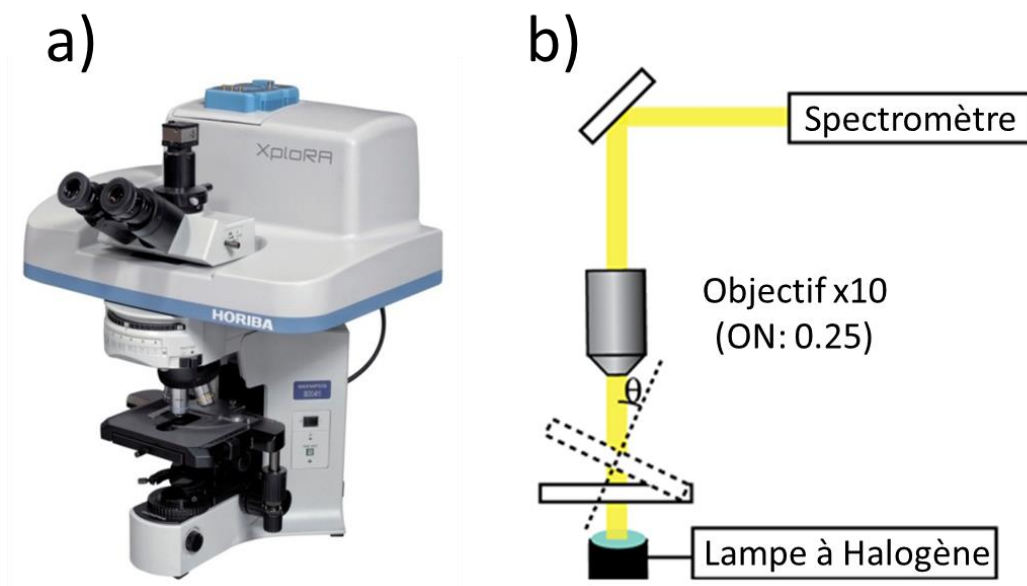
Sur la **Figure 15** j'ai indiqué tous les paramètres modifiés pendant cette étude. La hauteur des plots a été fixée à 40 et 50 nm. J'ai aussi fait varier l'épaisseur du film entre 20 et 50 nm par pas de 10 nm et enfin, j'ai fait varier les diamètres des nanocylindres entre 80 et 250 nm par pas de 10 nm. Ces échantillons ont été fabriqués par lithographie électronique comme pour les échantillons sur surface de verre et avant le dépôt d'or. Je n'ai pas déposé de couche de chrome entre le verre et l'or ce qui permet d'avoir un signal sans atténuation dû à la forte absorption du Cr. Sur chaque échantillon, il y a deux fois les mêmes structures pour reproduire les mesures deux fois.

## C) Propriétés plasmoniques

J'ai tout d'abord étudié les propriétés plasmoniques de ces échantillons en faisant des mesures de résonance plasmon en transmission. La connaissance de ces propriétés est importante pour comprendre les phénomènes mis en jeu avec ce type d'échantillons.

### 1) Le dispositif expérimental

Les spectres d'extinction ont été enregistrés avec un spectromètre Raman confocal XploRA (Horiba Scientifics, **Figure 16 a**), après avoir retiré les filtres edge. L'échantillon est éclairé en transmission à l'aide d'une lampe blanche non polarisée. La lumière transmise a été collectée avec un objectif à faible grossissement (10 ×, ouverture numérique (ON) de 0,25) pour collecter principalement la lumière transmise. Un spectre de référence a été enregistré sur le film mince d'or à l'extérieur des nanocylindres et le spectre d'extinction est calculé comme le rapport entre le spectre en transmission et le spectre de référence. Grâce à ce montage, j'ai aussi pu incliner l'échantillon pour modifier l'angle d'illumination, **Figure 16 b**, entre 0° et 51°.



**Figure 16 : a) Photographie du spectromètre XploRA b) schéma de principe du spectromètre XploRA et de la mesure par spectroscopie d'extinction (incidence normale et inclinée)**

Des calculs numériques ont été réalisés par Priyamvada Venugopalan à l'institut autrichien de Technologie (Austrian Institute of Technology, AIT) pour m'aider à confirmer nos attributions. Pour cela, une méthode tridimensionnelle de Finite Difference Time Domain (3D-FDTD) a été utilisée via un logiciel commercial (Lumerical Inc.) pour calculer les sections efficaces d'extinction et les distributions de champ électrique au voisinage des nanocylindres d'or sur le film mince d'or. Le réseau de nanocylindres a été défini pour les calculs avec des coordonnées cartésiennes (axe x et y dans le plan et avec l'axe z perpendiculaire au plan des réseaux correspondant à la hauteur des nanocylindres). Les mailles sont des cubes de  $2 \times 2 \times 2$  nm<sup>3</sup>. Des tests de convergence ont permis de conclure que ce maillage était suffisant pour obtenir des résultats pertinents. Des couches PML (absorption totale) ont été utilisées comme conditions aux limites dans la direction des z afin d'éviter les réflexions et des conditions aux limites périodiques de Bloch ont été utilisées pour les axes x et y. L'indice de réfraction des

milieux diélectriques a été fixé à 1,00 pour l'air et à 1,50 pour le substrat de verre. Les champs électromagnétiques à proximité des nanocylindres ont été calculés en supposant une illumination en ondes planes, avec des longueurs d'onde variant entre 500 nm et 900 nm. Les calculs FDTD ont été effectués pour une polarisation le long de l'axe des réseaux de nanocylindres et les constantes optiques de l'or ont été tirées de la littérature<sup>66</sup>.

## 2) Plasmons de surface

J'ai réalisé les mesures d'extinctions pour deux hauteurs de cylindres différentes, 40 et 50 nm. J'ai aussi relié les phénomènes physiques aux bandes observées lors des mesures.

### a) Les mesures d'extinction pour la hauteur de nanocylindre de 50 nm

J'ai réalisé dans un premier temps les mesures d'extinctions sur chaque échantillon en incidence normale, puis j'ai incliné les échantillons avec des angles compris entre 0 et 51° pour permettre l'identification des modes.

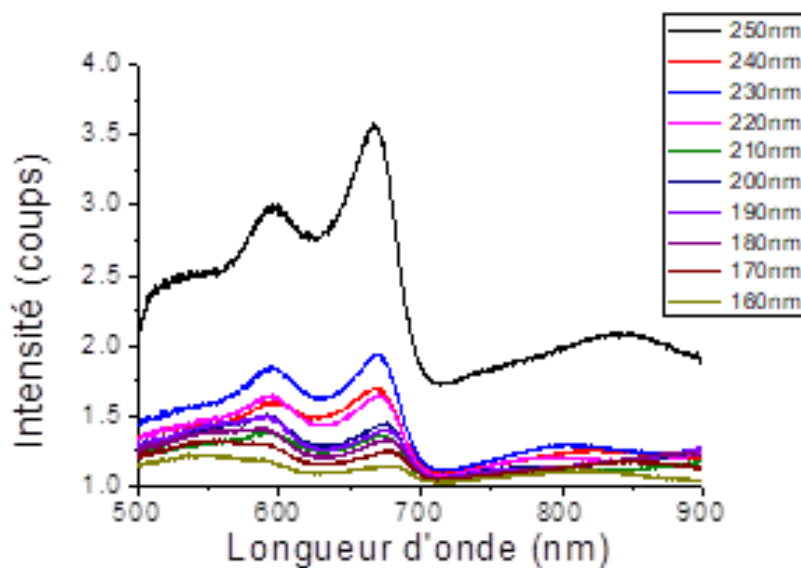


Figure 17 : Spectres d'extinction de réseaux de nanocylindres avec une épaisseur de film d'or de 20 nm et une hauteur de cylindres de 50 nm

Sur la **Figure 17**, j'ai regroupé les spectres d'extinction des réseaux de nanocylindres pour une épaisseur de film d'or de 20 nm et une hauteur de cylindres de 50 nm. On peut remarquer qu'il y a deux bandes présentes sur les spectres, en particulier une bande entre 650 et 680 nm. On peut noter que l'intensité des bandes augmente avec l'augmentation du diamètre. On peut aussi remarquer que lorsque l'on modifie le diamètre les bandes restent pratiquement fixes.



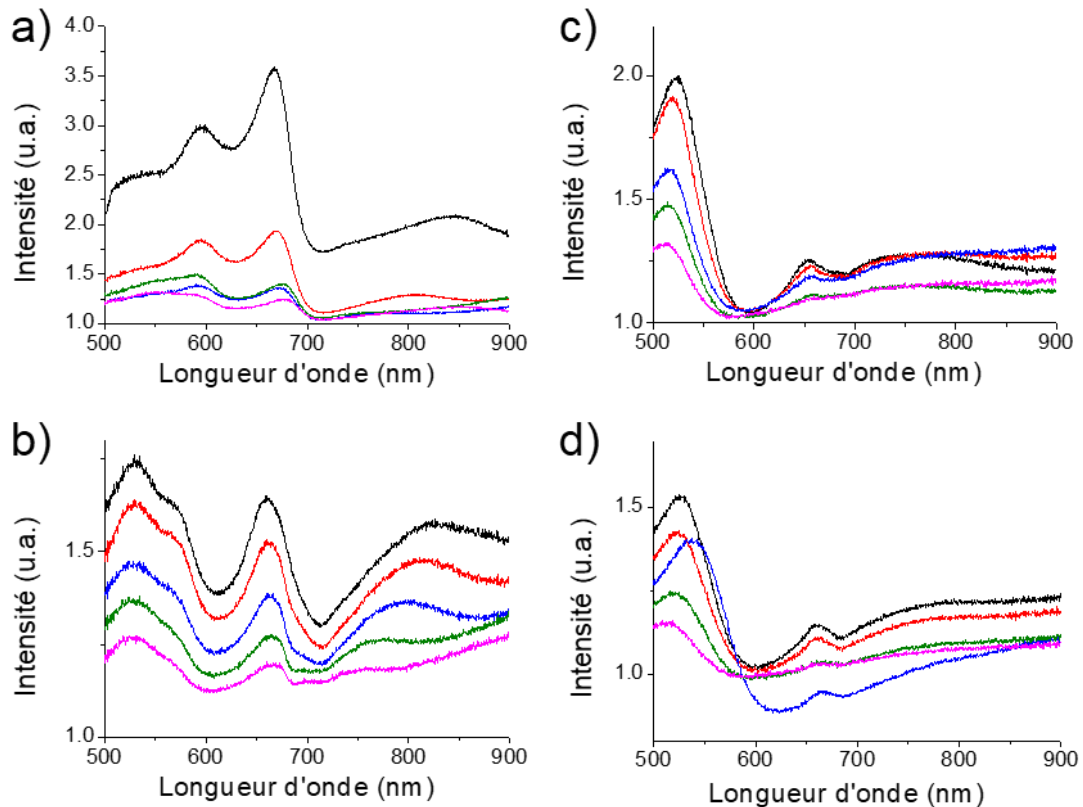


Figure 18 : Spectres d'extinction pour une hauteur de cylindres de 50 nm, pour différents diamètres (250 nm courbe en noir, 230 nm courbe en rouge, 210 nm courbe en bleu, 190 nm courbe en vert, 170 nm courbe en rose) et différentes épaisseurs de film d'or : a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm.

Sur la **Figure 18**, il est possible de remarquer que quelle que soit l'épaisseur, le signal augmente avec le diamètre et que la position des bandes se décale légèrement lorsque le diamètre augmente. De plus, lorsque l'on augmente l'épaisseur on peut voir que l'intensité du signal diminue fortement. Ce phénomène est particulièrement visible pour la bande à 660 nm qui diminue fortement pour les grandes épaisseurs.

Afin d'attribuer les modes plasmon, j'ai utilisé un modèle analytique permettant de calculer la relation de dispersion des plasmons dans un film mince

*b) Identification des différents modes*

Pour identifier les modes plasmons, nous pouvons simuler les modes de la surface d'or à partir d'un modèle analytique de plasmon - polariton de surface (PPS). Les nanocylindres sont assimilés à des perturbations et les modes plasmons ont été calculés pour des films minces d'or d'indice de réfraction  $n_m$  et d'épaisseur  $d_m$  pris entre l'air d'indice  $n_a$  et le verre d'indice  $n_g$ , **Figure 19**. La constante de propagation de polarisation transversale magnétique (TM)  $\beta$  est déterminé par la résolution de l'équation de dispersion suivante.

$$\tan(k_0 \kappa d_m) - \frac{\frac{\kappa}{n_m^2} \left( \frac{\gamma_g}{n_g^2} + \frac{\gamma_a}{n_a^2} \right)}{\frac{\kappa^2}{n_m^4} - \frac{\gamma_g \gamma_a}{n_g^2 n_a^2}} = 0$$

Équation 7 : Équation de dispersion

L'Équation 7, dérive des équations de Maxwell avec les conditions aux limites précisées précédemment.  $k_0=2\pi/\lambda$  correspond au vecteur d'onde de la lumière dans le vide pour une longueur d'onde  $\lambda$ ,  $\kappa=(\beta^2-k_0^2n_m^2)^{1/2}$ ,  $\gamma_a=(\beta^2-k_0^2n_a^2)^{1/2}$ , et  $\gamma_g=(\beta^2-k_0^2n_g^2)^{1/2}$ . Généralement, le film d'or est le support d'un mode  $TM_0$  correspondant au PPS à l'interface or-verre. Un mode similaire nommé  $TM_1$  peut également apparaître à l'interface or-air. Il y a alors possibilité de couplage entre le vecteur d'onde de l'excitation, les ordres de diffraction et les PPS lorsque ceux-ci vérifient l'accord de phase suivant :

$$k_0 \sqrt{\left(n_a \sin(\theta) \sin(\phi) + m \frac{\lambda}{\Lambda}\right)^2 + \left(n_a \sin(\theta) \cos(\phi) + n \frac{\lambda}{\Lambda}\right)^2} = Re\{\beta\}$$

Équation 8 : Condition de couplage entre les courbes de dispersion et les ordres de diffraction

Dans l'Équation 8,  $\theta$  correspond à l'angle en coordonnées polaires,  $\phi$  est l'angle azimutal,  $m$  et  $n$  sont les ordres de diffractions et  $\Lambda = 400 \text{ nm}$  correspond à la périodicité du réseau. Avec cette relation il est possible d'obtenir la longueur d'onde des différents ordres de diffractions que l'on obtient sur les spectres d'extinction, Figure 19.

Sur la Figure 19 sont représentés avec la ligne en tiret les ordres  $(\pm 1, 0)$  et  $(0, \pm 1)$  et la ligne pointillée l'ordre  $(\pm 1, \pm 1)$ . Ses ordres de diffraction vont intercepter le mode  $TM_0$  aux trois points de résonance A, B et C. En revanche, pour nos épaisseurs, ces ordres ne vont pas interceptés le mode  $TM_1$ . Pour l'observer il faut incliner l'échantillon. La résonance A résulte des premiers ordres de diffraction  $(\pm 1, 0)$  et  $(0, \pm 1)$  le long des axes du réseau et va apparaître autour de 700 nm (Figure 19). Les résonances B et C correspondent aux ordres de diffraction  $(\pm 1, \pm 1)$  le long de la diagonale du réseau.

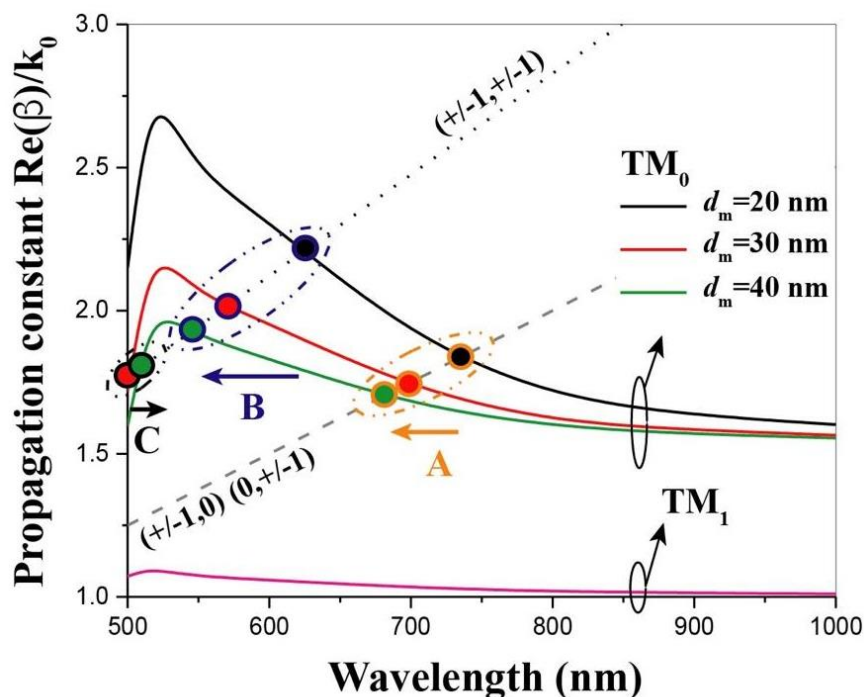
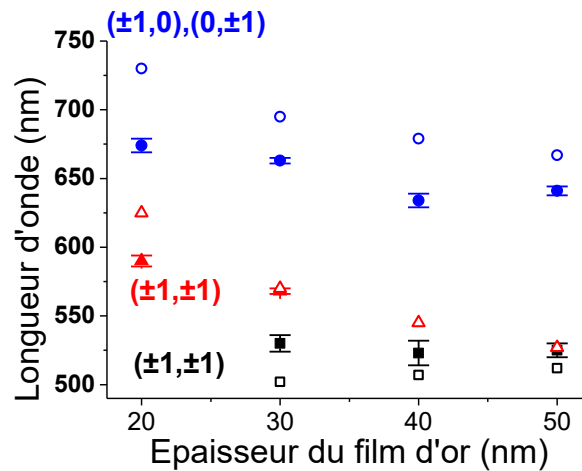


Figure 19 : Courbes de dispersion calculées (Équation 7) pour différentes épaisseurs d'or,  $d_m$ , pour les modes  $TM_0$  (en noir : 20 nm, en rouge : 30 nm et en vert : 40 nm) et  $TM_1$  (en rose). La ligne en tiret correspond aux ordres de diffraction  $(\pm 1, 0)$  et  $(0, \pm 1)$  et la ligne pointillée aux ordres  $(\pm 1, \pm 1)$  (Équation 8). La couleur du contour des points correspond à l'appariement entre les ordres de diffraction et les courbes de dispersions pour les résonances A, B et C.



On peut observer que lorsque l'épaisseur du film augmente les résonances B et C se rapprochent pour se confondre, **Figure 20**

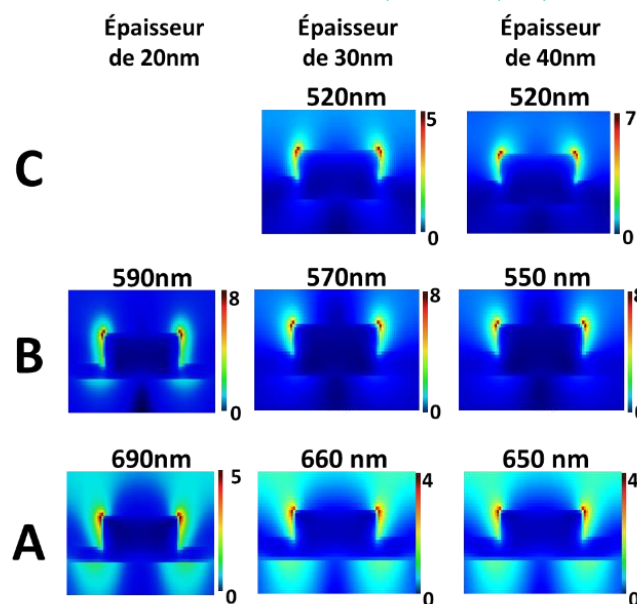


**Figure 20 :** Évolution de la position des bandes plasmons (données expérimentales : symboles pleins et données théoriques : symboles vides) pour différentes épaisseurs de film.

Comme on peut le voir sur la **Figure 20**, les valeurs expérimentales sont proches des valeurs théoriques. Cela nous permet de proposer l'attribution des modes comme indiquée sur la **Figure 20** et l'ensemble des modes correspond bien aux résonances A, B et C provenant de l'accord de phase en incidence normale entre le mode  $TM_0$  et les ordres de diffraction. On peut observer l'apparition de la résonance C (ordre  $(\pm 1, \pm 1)$ ) et carrés noirs sur la **Figure 20** qu'à partir de l'épaisseur de 30 nm et sa position reste pratiquement constante avec l'épaisseur comme attendu.

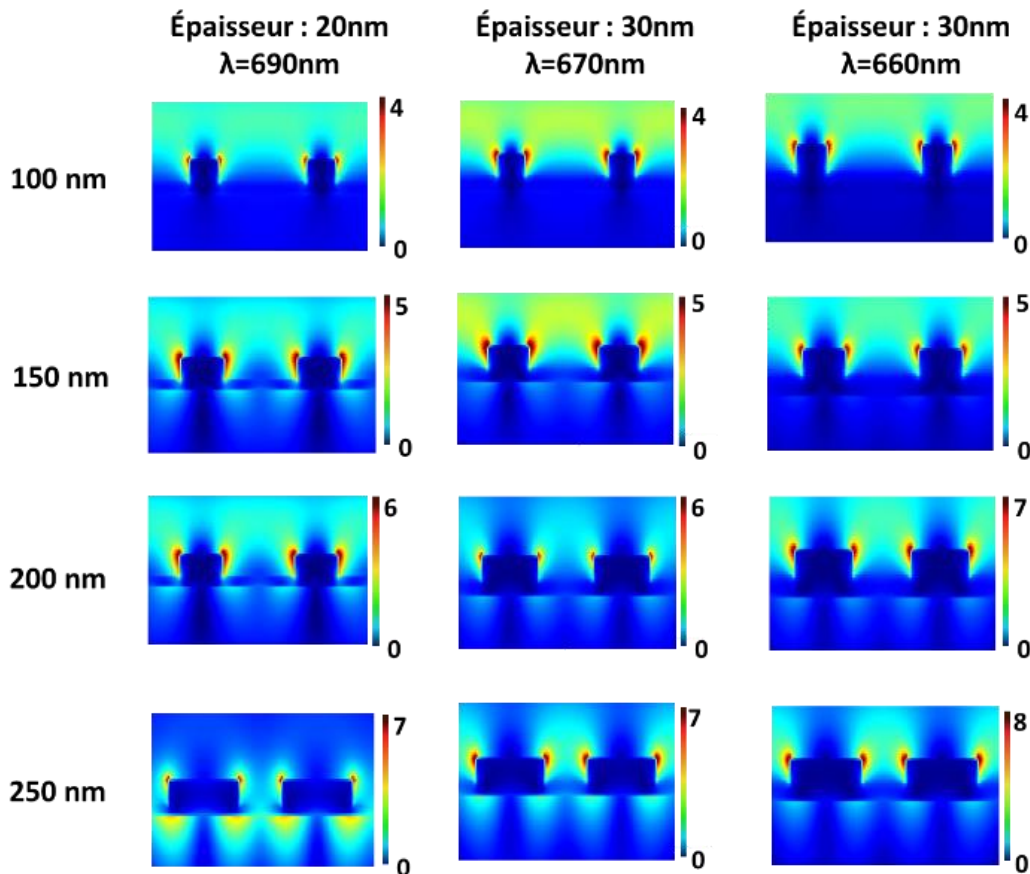
Connaissant l'origine des modes, je me suis intéressé à la distribution du champ électrique dans le substrat plasmonique à partir de simulation en FDTD.

*c) Étude de la distribution du champ électrique par FDTD*



**Figure 21 :** Distributions du champ électrique autour des nanostructures de 200 nm de diamètre et pour les épaisseurs d'or de 20, 30 et 40 nm calculées par FDTD pour les résonances A, B et C. Sur la gauche de chaque image est indiquée l'exaltation du champ électrique (amplitude du champ incident égale à 1)

On peut voir sur la **Figure 21** la distribution du champ obtenu par la méthode FDTD. À l'exception du mode à 520 nm pour les épaisseurs de 30 et 40 nm, on peut noter une forte exaltation du champ électrique à l'intérieur du verre sous le film d'or, ce qui confirme notre attribution aux modes PPS excités à l'interface verre-or. L'exaltation du champ diminue lorsque l'épaisseur du film augmente dans tous les cas. Deuxièmement, on peut observer que l'exaltation du champ est plus intense aux coins et sur les bords des nanocylindres quels que soient les modes excités et l'épaisseur. Cela signifie que dans tous les cas il y a une forte exaltation du champ à la surface des nanostructures. Cela est d'une importance primordiale, car ce type de substrat pourrait être utilisé efficacement pour des applications de spectroscopies exaltées, telles que le SERS.



**Figure 22 :** Distribution du champ autour des nanostructures de 100 à 250 nm de diamètre et pour les épaisseurs d'or de 20-40 nm calculée par FDTD pour la résonance A dont la position est indiquée en haut de chaque colonne. Sur la gauche est indiquée l'exaltation du champ pour un champ incident égal à 1

De plus, sur la **Figure 22**, nous pouvons constater que le comportement précédent se reproduit pour tous les diamètres. Nous pouvons également observer que l'exaltation du champ à l'interface verre-or ou à la surface des nanocylindres augmentent avec le diamètre. Un chevauchement des champs entre les nanocylindres se produit également pour le plus grand diamètre (250 nm) ce qui indique l'existence d'un couplage entre les nanocylindres adjacents.

J'ai ensuite effectué des mesures angulaires en inclinant l'échantillon afin de modifier le vecteur d'onde d'excitation et ainsi de modifier les conditions d'accord de phase données par l'**Équation 8**.

## d) Étude angulaire

Pour compléter l'étude plasmonique j'ai réalisé une étude angulaire sur les échantillons d'épaisseur 20 et 30 nm car ce sont les échantillons avec le plus fort signal.

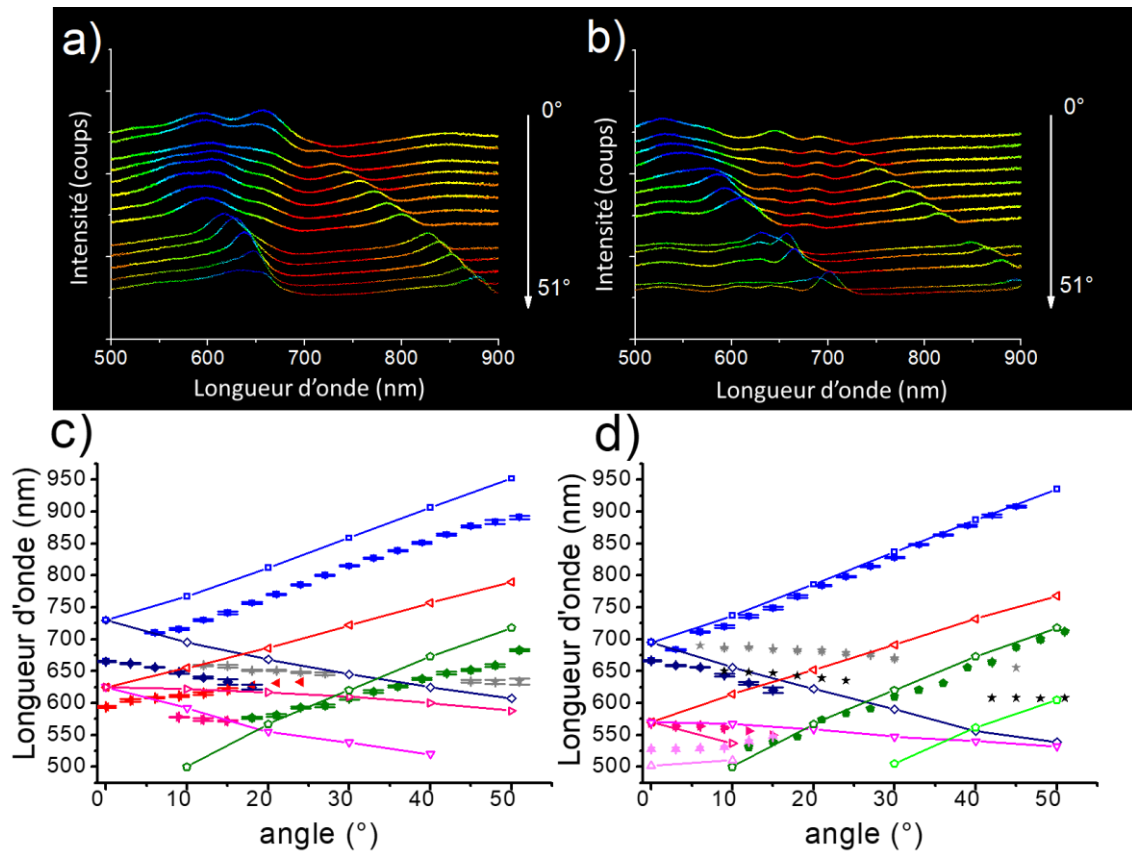
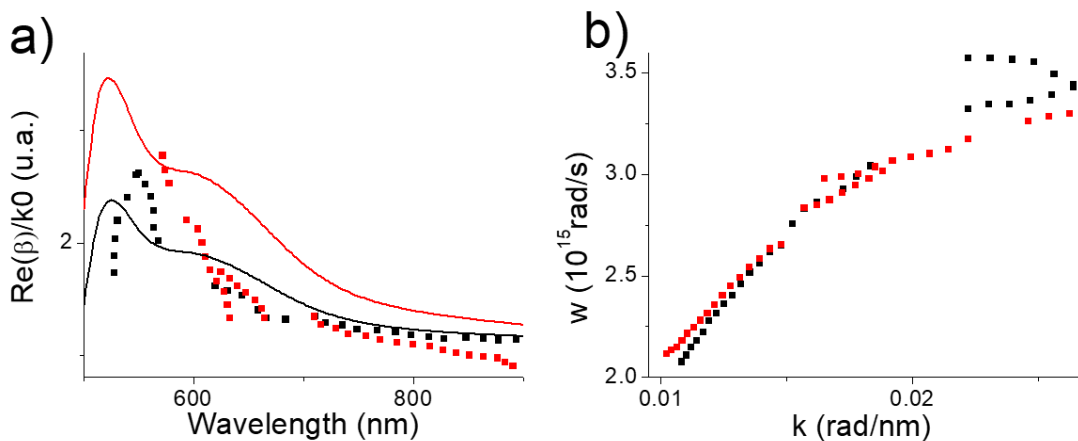


Figure 23 : Évolution du spectre d'extinction après avoir incliné l'échantillon entre 0 et 51° pour un diamètre de 250 nm et pour une épaisseur de a) 20 nm et b) 30 nm. c) et d) Évolution de la position expérimentale (symboles pleins) pour les différents angles et les deux épaisseurs de film 20 (c) et 30 (d) nm. Les carrés bleus représentent le mode  $\{(-1,0) \text{ et } (0,-1)\} / \text{TM}_0$ , les losanges bleu nuit le mode  $\{(1,0) \text{ et } (0,1)\} / \text{TM}_0$ , les triangles rouges le mode  $(-1,1) / \text{TM}_0$ , les triangles roses le mode  $(-1,1) / \text{TM}_0$  pour c) et le mode  $(1,1) / \text{TM}_0$  pour d), les pentagones verts le mode  $(-1,0) \text{ ou } (0,-1) / \text{TM}_1$ , les gris et noirs sont des modes non attribués. Les symboles vides correspondent aux positions calculées analytiquement. Les carrés bleus représentent le mode  $\{(-1,0) \text{ et } (0,-1)\} / \text{TM}_0$ , les losanges bleu nuit le mode  $\{(1,0) \text{ et } (0,1)\} / \text{TM}_0$ , les triangles rouges le mode  $(-1,1) / \text{TM}_0$ , les triangles roses foncés le mode  $(-1,1) / \text{TM}_0$  et les roses le mode  $(1,1) / \text{TM}_0$ , les pentagones verts le mode  $(-1,0) \text{ ou } (0,-1) / \text{TM}_1$ .

Sur la **Figure 23**, on peut voir le décalage des bandes lorsque l'on change l'angle d'incidence. Les résonances plasmons sont fortement décalées et plusieurs séparations de bandes se produisent lorsque l'on incline l'échantillon. On peut aussi remarquer l'apparition de nouvelles résonances. En effet, le vecteur d'onde incident n'étant plus perpendiculaire à l'interface, la composante angulaire du vecteur d'onde  $n_a \cdot \sin[\theta] \cdot \sin[\phi]$ , dans l'**Équation 8**, n'est plus nulle. Cela induit la division des 2 ordres de diffraction  $(0, \pm 1)$  ou  $(\pm 1, 0)$  et  $(\pm 1, \pm 1)$  en cinq nouveaux ordres de diffraction :  $(0, +1)$  ou  $(+1, 0)$ ,  $(0, -1)$  ou  $(-1, 0)$ ,  $(+1, +1)$ ,  $(-1, -1)$  et  $(+1, -1)$  ou  $(-1, +1)$ . Ces ordres interceptent le mode  $\text{TM}_1$  à différentes longueurs d'onde par rapport à l'angle d'incidence normal. Par exemple, les modes  $(0, +1)$  ou  $(+1, 0)$  et  $(-1, -1)$  sont décalés vers le bleu alors que les modes  $(0, -1)$  ou  $(-1, 0)$ ,  $(+1, +1)$  et  $(+1, -1)$  ou  $(-1, +1)$  sont décalés vers le rouge, **Figure 23 c) et d)**. Sur ces figures on peut voir la différence entre les positions théoriques de ces modes et les positions expérimentales. On peut observer un bon accord pour l'épaisseur de 30 nm (pentes de courbe identiques en fonction de l'angle et

positions de mode similaires). Des écarts plus importants sont observés pour l'épaisseur de 20 nm. Ces écarts peuvent être dus à une influence plus grande des nanocylindres sur le PPS du film ou à un écart entre l'épaisseur de film demandée et l'épaisseur réelle, ce qui va avoir un effet important sur la position du PPS. En utilisant un tel modèle, presque tous les modes peuvent être attribués à un ordre de diffraction. Cependant certaines bandes (étoiles noir et gris sur les **Figure 23c) et d)**) ne correspondent à aucun ordre de diffraction.

Avec de tel substrat plasmonique, nous sommes en mesure d'accorder la résonance plasmon sur une large gamme de longueurs d'onde dans le visible, de 500 nm à 900 nm, simplement en inclinant le substrat. Un tel comportement n'est pas réalisable avec un réseau de nanocylindres sur un substrat diélectrique, ce qui constitue un avantage certain. De plus, si nous excitons la surface avec un objectif à grande ouverture numérique (0,9 pour un objectif de microscope x 100, par exemple), un grand nombre d'angles incidents sont inclus à l'intérieur du cône d'éclairage (de 0° à près de 65° pour une ouverture numérique de 0,9). Ainsi, quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, un accord de phase doit toujours se produire entre le vecteur d'onde d'excitation et l'un des modes PPS. En conséquence, l'excitation de l'un des modes PSP devrait toujours se produire, induisant une exaltation importante du champ à la surface du substrat. Cette propriété est très importante dans le cas des spectroscopies exaltées et suggère qu'un seul substrat pourrait être optimisé afin de fournir une exaltation du signal spectroscopique à toutes les longueurs d'onde d'excitation et donc une exaltation indépendante de la longueur d'onde.



**Figure 24 : Courbes de dispersion expérimentales en pointillé et théoriques en trait plein pour différentes épaisseurs, 20 nm en rouge et 30 nm en noir. a) constante de propagation en fonction de la longueur d'onde, b) pulsation en fonction du nombre d'onde**

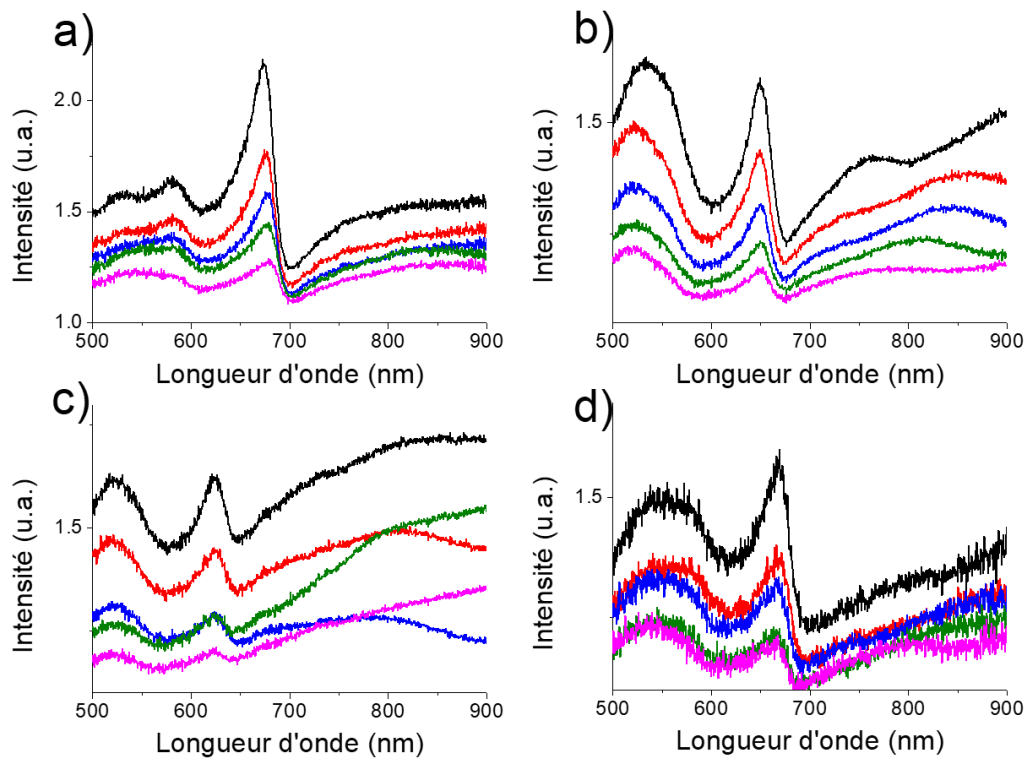
Enfin, à partir des attributions des modes, nous sommes en mesure de déterminer pour chaque résonance le module du vecteur d'onde pour chaque mode et sa position en longueur d'onde. Nous pouvons alors reconstituer la relation de dispersion du plasmon à l'intérieur du film mince d'or comme indiqué sur la **Figure 24**. Si nous comparons nos relations expérimentales et les relations théoriques (calculées à partir de l'**Équation 7**), nous pouvons remarquer que nous retrouvons une forme similaire. Pour l'épaisseur de 30 nm, l'accord est presque parfait pour les longueurs d'onde supérieures à 700 nm (**Figure 24**), mais la courbe dévie fortement aux longueurs d'onde plus basses même si nous obtenons toujours un maximum comme pour la courbe théorique. Ce maximum se produit à une longueur d'onde supérieure et atteint une valeur plus élevée pour la constante de propagation. Pour l'épaisseur de 20 nm, on peut observer un comportement similaire même si l'écart est plus grand. La constante de propagation est surestimée par le modèle analytique pour les longueurs d'onde

inférieures à 600 nm. Nous supposons que ces écarts peuvent être dus à la présence des nanocylindres qui ne sont pas pris en compte dans le modèle. En effet, dans ce cas, l'indice de réfraction à l'interface air-or ne peut être égal à 1 et un indice de réfraction effectif doit être pris en compte. Pour aller plus loin, nous pouvons également déterminer que la déviation devient importante pour des longueurs d'onde inférieures à 700 nm. Autour de cette longueur d'onde, on peut observer un comportement étrange de la relation de dispersion avec un plateau pour les deux épaisseurs. La pente de la courbe au début et à la fin du plateau suggère également un effet d'anti-croisement, peut-être en raison du couplage entre les modes PPS et un mode lié aux nanocylindres ou au réseau.

Cependant, en utilisant cette méthodologie, nous sommes capables de mesurer la courbe de dispersion de notre substrat plasmonique en fonction de l'épaisseur du film.

*e) Les échantillons avec une hauteur de nanocylindre de 40 nm*

Des spectres d'extinction ont été mesurés pour des échantillons avec une hauteur de cylindre de 40 nm (**Figure 25**).



**Figure 25** : spectres d'extinction pour une hauteur de cylindre de 40 nm, pour différents diamètres (250 nm courbe noire, 230 nm rouge, 210 nm bleue, 190 nm verte, 170 nm rose) et différentes épaisseurs de film d'or : a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm.

Nous pouvons constater que comme pour les échantillons avec une hauteur de 50 nm, l'intensité du signal diminue lorsque l'on augmente l'épaisseur du film d'or, ce qui est particulièrement visible pour la bande aux alentours de 650 nm.

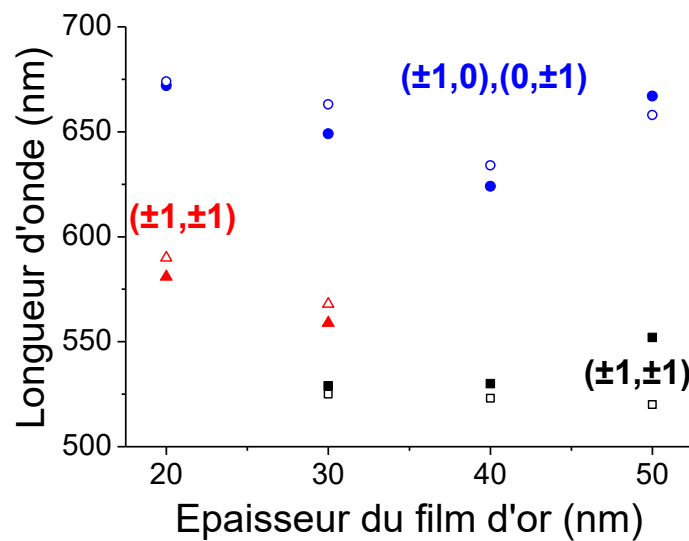


Figure 26 : Évolution de la position des bandes plasmons (nanocylindres avec une hauteur de 40 nm : symboles pleins et nanocylindres avec une hauteur de 50 nm : symboles vides) pour différentes épaisseurs de film

Sur la **Figure 26**, j'ai regroupé les résultats concernant l'évolution de la position des bandes plasmons pour les nanostructures avec une hauteur de 40 nm (symboles pleins) et pour celles de 50 nm de hauteur (symboles vides). L'évolution des bandes est similaire dans les deux cas mais les bandes sont légèrement décalées pour la hauteur de nanocylindres de 40 nm.

On peut en conclure que lorsque l'on varie la hauteur des nanocylindres, cela ne modifie pas les spectres d'extinction et que les modes plasmon sont faiblement dépendants de la hauteur des nanocylindres. C'est pour cela que j'ai décidé de conserver cette hauteur de 50nm pour mon application biocapteur.

#### *f) Conclusion sur les propriétés plasmoniques*

Ici, j'ai étudié les propriétés optiques de substrats plasmoniques composés de réseaux de nanocylindres d'or déposés sur un film mince d'or en fonction de l'épaisseur du film. J'ai pu observer plusieurs résonances plasmons et effectuer leur attribution en considérant l'effet du réseau de nanocylindres et l'excitation des PPS du film par l'intermédiaire des différents ordres de diffraction définis par le réseau. En utilisant les conditions d'incidence adéquates (angle d'incidence, longueur d'onde d'excitation), plusieurs plasmons peuvent être excités simultanément et accordés sur une large plage de longueurs d'onde en tirant parti des propriétés des plasmons propagatifs.

De plus, de tels modes produisent une exaltation importante du champ électrique à l'interface or-verre mais plus important encore à la surface des nanostructures contrairement aux modes PPS. Ainsi, ces substrats plasmoniques combinent à la fois les avantages des plasmons de surface propagatifs et des plasmons de surface localisés et pourraient avoir d'importantes applications en spectroscopies exaltées comme le SERS.



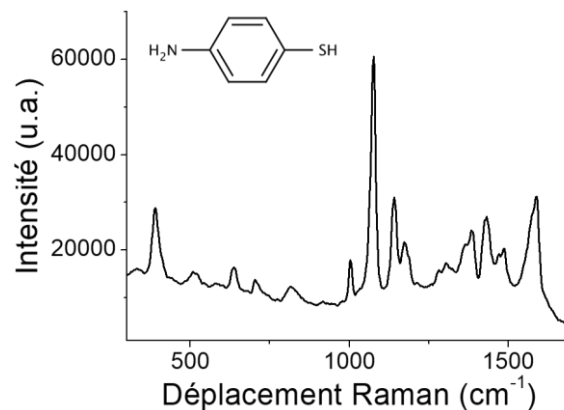
## D) Étude SERS

Pour l'étude SERS, je présenterai dans un premier temps les résultats obtenus pour les hauteurs de nanocylindres de 50 nm et dans un deuxième temps ceux pour une hauteur de 40 nm. Pour cette étude, j'ai utilisé le même spectromètre XploRA que celui présenté à la section **C) 1)**.

### 1) Efficacité SERS pour une hauteur de cylindre de 50 nm

#### a) La molécule sonde

Pour étudier le signal SERS, les échantillons ont été fonctionnalisés avec la molécule 4-Aminothiophenol (MBAM). Ils ont été plongés dans une solution à 1 mM de MBAM pendant une journée pour obtenir une monocouche auto-assemblée. Un exemple de spectre obtenu est présenté sur la **Figure 27** pour une épaisseur de film d'or de 20 nm.



**Figure 27 : Spectre SERS du 4—Aminothiophenol mesuré sur un réseau de nanocylindres de diamètre 250 nm et de hauteur 50 nm sur un film d'or de 20 nm d'épaisseur avec un LASER à 785 nm. En insert : représentation chimique du 4—Aminothiophenol**

Le spectre SERS de la MBAM a deux bandes intenses à 1080 et 1580  $\text{cm}^{-1}$ . Ce sont donc sur ces deux bandes que je concentrerai mon étude pour comparer l'efficacité SERS de mes substrats. Ces bandes sont intenses car elles correspondent à la vibration du cycle aromatique. Le choix s'est aussi tout d'abord porté sur cette molécule car il est possible d'utiliser le groupement amine pour d'autres réactions et ainsi fonctionnaliser les surfaces avec d'autres molécules.

Cette molécule sonde est adéquate pour des expériences avec un LASER à 785 nm. Mais si on utilise des LASER de plus basses longueurs d'onde les groupements amines entre deux molécules de MBAM adjacentes réagissent pour former une double liaison N=N induisant l'apparition de nouvelles bandes sur le spectre SERS (**Figure 28**).

Sur la **Figure 28 i)**, on peut voir le schéma réactionnel de la réaction de "dimérisation" du MBAM<sup>67</sup>. Lorsque l'on apporte assez d'énergie lors de l'illumination, la dimérisation va se produire. Sous illumination avec un LASER à 514 nm, on va fortement "dimériser" les amines et on voit apparaître de nouvelles bandes entre 1080 et 1580  $\text{cm}^{-1}$ . Les trois plus intenses sont situées à 1144, 1390 et 1435  $\text{cm}^{-1}$ , **Figure 28 ii**. Cette modification structurale de la molécule sonde sera donc dépendante de l'énergie du laser excitateur utilisé. Il sera donc possible de comparer les intensités SERS pour une même longueur d'onde en supposant que la quantité de dimères produits est constante sur toute la surface. Par contre, nous ne pourrions pas comparer les résultats SERS obtenus avec différents LASER.

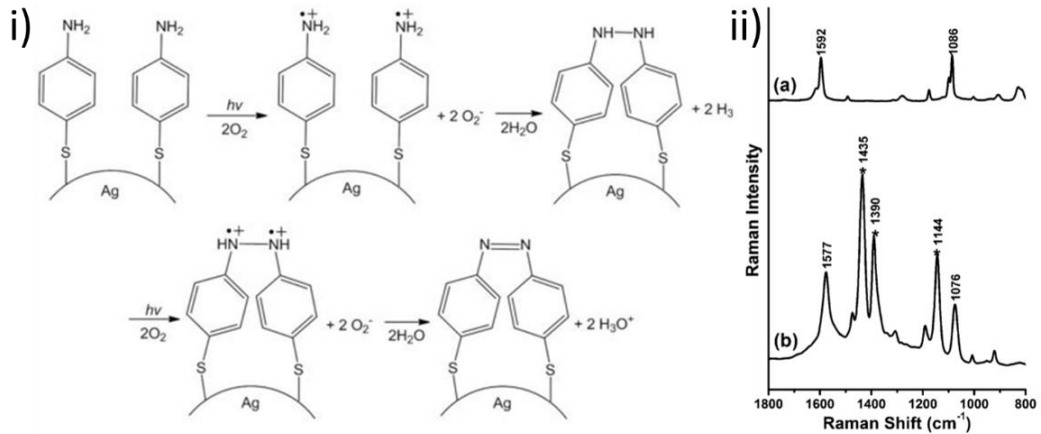


Figure 28 : i) Schéma réactionnel de la réaction entre deux MBAB pour former une double liaison N=N, tirée de <sup>67</sup> ii) Spectre SERS avec l'apparition des bandes liés à la formation d'un dimère de MBAM a) spectre Raman de la MBAM b) spectre SERS sous excitation à 514 nm sur des nanoparticules d'argent tirée de <sup>68</sup>

b) Étude SERS à 785 nm

J'ai collecté le signal avec un objectif x 100 (ouverture numérique = 0.9). L'acquisition des spectres a été faite durant 20 s (deux accumulations) avec une puissance de LASER de 3.5 mW à 785 nm.

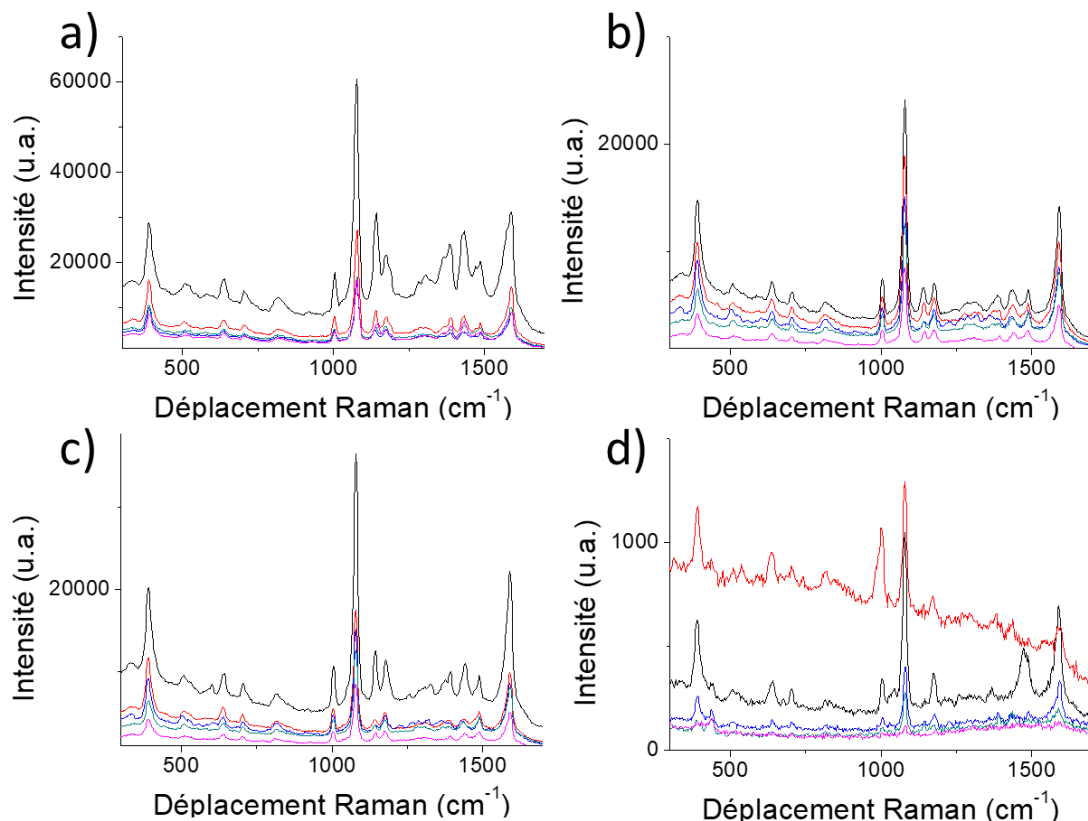


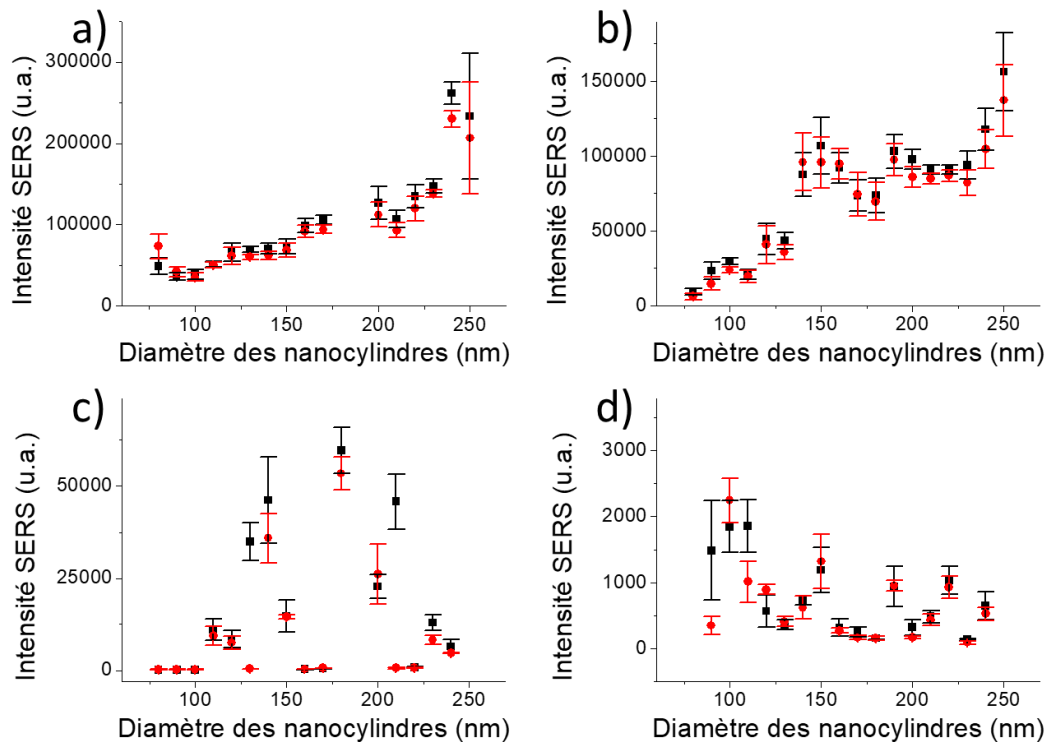
Figure 29 : spectres SERS mesurés à 785 nm pour les épaisseurs : a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm pour les diamètres de 250 nm (courbe noire), 230 nm (courbe rouge), 210 nm (courbe bleue), 190 nm (courbe verte), 170 nm (courbe rose)

Sur la Figure 29, j'ai regroupé l'ensemble des spectres SERS collectés à 785 nm, correspondant au spectre du MBAM. On peut ainsi voir l'effet de l'épaisseur et du diamètre sur le signal SERS. En premier lieu, quand on passe de l'épaisseur de 20 nm à 50 nm, on peut



observer une diminution du signal SERS. Ceci rejoint les observations remarquées dans l'étude plasmonique, qui montrent que l'exaltation diminue lorsque l'épaisseur augmente. Par contre, quelle que soit l'épaisseur, le signal SERS semble augmenter avec le diamètre des nanocylindres.

Pour confirmer ces observations, j'ai mesuré l'intensité intégrée des bandes principales de la MBAM à  $1580$  et  $1080\text{ cm}^{-1}$  pour les différents diamètres et les différentes épaisseurs.



**Figure 30 :** Intensité intégrée des bandes à  $1080\text{ cm}^{-1}$  (carrés noirs) et à  $1580\text{ cm}^{-1}$  (ronds rouges) en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm pour une excitation à  $785\text{ nm}$

Sur la **Figure 30**, sont représentées les intensités des deux bandes en fonction du diamètre pour les quatre épaisseurs. Ces résultats confirment que l'augmentation de l'épaisseur du film d'or provoque une diminution du signal SERS. Pour les épaisseurs de 20 et 30 nm, le signal SERS augmente avec l'augmentation du diamètre. Dans le cas des épaisseurs de 50 et 40 nm, les intensités sont plus faibles et leur variation n'est pas monotone. Il est donc difficile de conclure pour ces deux derniers cas.

### c) Étude SERS à $660\text{ nm}$

Au vu des résultats précédents, je me suis concentré sur les épaisseurs de 20 et 30 nm pour avoir les résultats les plus exploitables possible. Nous avons collecté le signal avec un objectif x 100 (ouverture numérique de 0.9). L'acquisition des spectres a été faite durant 20 s (deux accumulations) avec une puissance de LASER à 5 mW.

Sur la **Figure 31**, on peut voir les spectres SERS pour les épaisseurs de 20 et 30 nm ainsi que l'intensité du signal pour les bandes à  $1080$  et  $1580\text{ cm}^{-1}$  en fonction du diamètre. On peut voir en **Figure 31 a)** et **b)** que l'intensité de ces deux dernières bandes a diminué par rapport à l'intensité des bandes due à la "dimérisation" de la MBAM. En effet, l'énergie fournie par le LASER est plus grande et va donc provoquer la dimérisation. De plus, on peut noter que l'intensité du signal SERS est plus grande pour l'épaisseur de 30 nm que pour celle de 20 nm

(Figure 31). Cela peut s'expliquer par le fait que la position de la résonance plasmon est plus proche de la longueur d'onde excitatrice à 660 nm pour l'épaisseur de 30 nm.

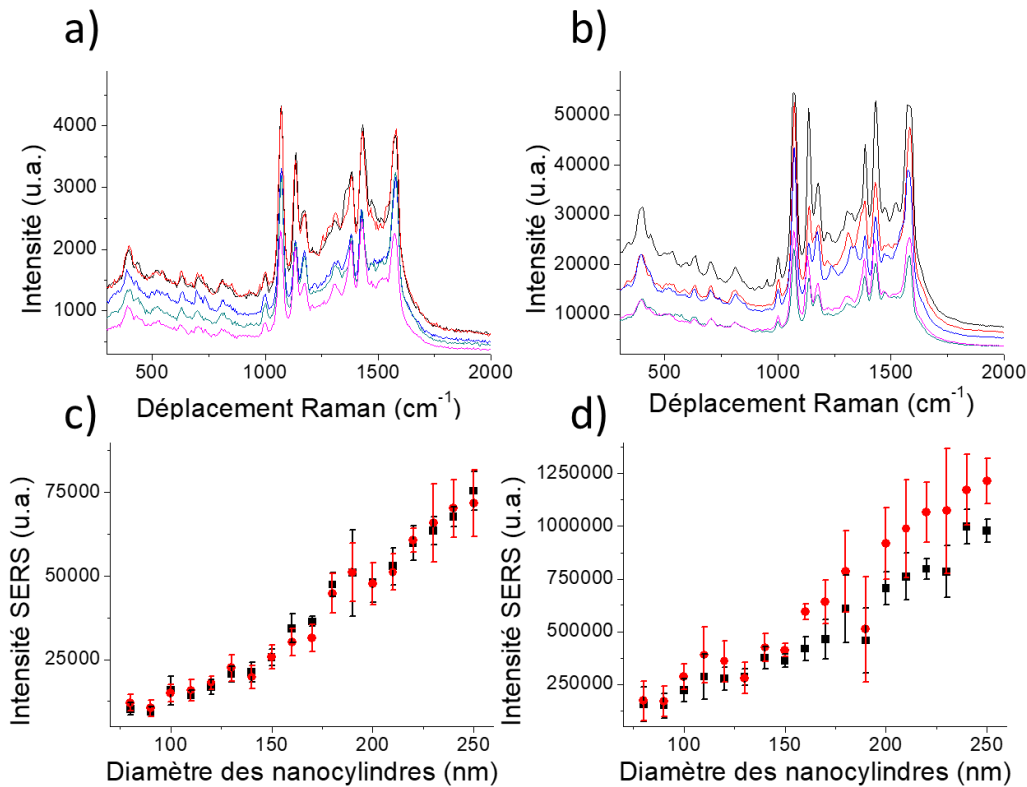


Figure 31 : spectres SERS à 660 nm pour les épaisseurs de a) 20 nm et b) 30 nm pour différents diamètres (250 nm : courbe noire, 230 nm : courbe rouge, 210 nm : courbe bleue, 190 : courbe verte et 170 : courbe rose). Intensité SERS pour les bandes à 1080 cm<sup>-1</sup> (carrés noirs) et à 1580 cm<sup>-1</sup> (ronds rouges) pour une épaisseur de c) 20 nm et d) 30 nm

#### d) Conclusion

Les bandes liées à la dimérisation sont présentes sur les mesures avec un LASER à 660 nm donc on peut difficilement comparer les résultats obtenus pour le LASER à 785 nm. Dans mon cas, nous avons décidé d'utiliser la longueur d'onde de 785 nm pour effectuer les mesures SERS sur le couplage QCM/SERS. En effet, c'est la seule présente sur le spectroscopie Raman permettant la mesure du signal SERS dans la cellule fluide de la microbalance à quartz. Donc en me concentrant sur cette longueur d'onde, je peux déterminer les nanostructures optimales pour le couplage : nanocylindres ayant un diamètre de 250 nm sur un film d'or d'épaisseur 20 nm.

Par la suite j'ai modifié la hauteur des nanocylindres pour regarder l'influence de ce paramètre sur le signal SERS.

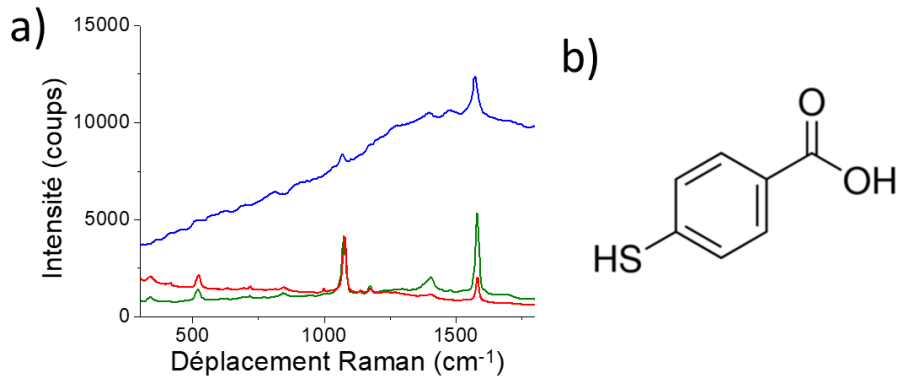
### 2) Efficacité SERS pour une hauteur de cylindre de 40 nm

Pour cette hauteur, j'ai eu l'opportunité de faire l'étude SERS à trois longueurs d'onde différentes 532, 638 et 785 nm. Et j'ai utilisé un x100 (ouverture numérique de 0.9) pour toutes les mesures.

#### a) La molécule sonde

Pour faire ce type d'échantillon, j'ai utilisé une nouvelle molécule sonde pour éviter le phénomène de dimérisation à la surface qui ne me permettait pas de comparer l'influence de la longueur d'onde d'excitation sur le signal SERS. J'ai donc décidé de changer le groupement

amine par un groupement acide carboxylique. J'ai choisi comme candidat l'acide 4-mercaptobenzoïque (MBA). Cette molécule n'étant pas très différente du MBAM cela permet de conserver les mêmes bandes principales sur le spectre SERS, **Figure 32**. Cependant comme le groupement en position 4 du cycle (COOH au lieu de NH<sub>2</sub>) est différent, les bandes sont légèrement décalées à 1070 et 1590 cm<sup>-1</sup>.



**Figure 32 : a) Spectre SERS de l'acide 4-mercaptobenzoïque (MBA) sur des nanocylindres de diamètres 250 nm sur surface de 20 nm d'or avec en bleu un LASER à 532 nm, en vert un LASER à 638 nm, en rouge un LASER à 785 nm. En b) la représentation de la MBA**

Lorsque la longueur d'onde du LASER va être modifiée les spectres SERS vont être différents car en fonction de la longueur d'onde différents modes plasmoniques vont être mis en jeu lors du SERS. Ainsi il est possible de voir que pour le LASER avec une longueur d'onde de 532 nm la bande à 1070 cm<sup>-1</sup> baisse en intensité

*b) Étude SERS à 785 nm*

Sur la **Figure 33**, sont représentées les intensités SERS pour les deux bandes principales à 1070 cm<sup>-1</sup> (ronds noirs) et à 1590 cm<sup>-1</sup> (carrés rouges). On peut observer qu'à la longueur d'onde de 785 nm plus le diamètre augmente plus le signal SERS est intense comme pour une hauteur de nanocylindres de 50 nm. Il est notable que quelque soit la bande sélectionnée, l'intensité SERS suit le même comportement.

F(x)=A*exp(x/t0)								
	20 nm				30 nm			
	1590 cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>		1590 cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>	
	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type
R <sup>2</sup>	0.700		0.660		0.780		0.810	
A	3397	2209	13748	5518	2597	1131	6242	2146
t <sub>0</sub>	68	14	104	20	78	12	89	12
	40 nm				50 nm			
	1590 cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>		1590cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>	
	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type
R <sup>2</sup>	0.590		0.630		0.110		0.470	
A	2311	977	5354	2002	3755	832	5493	1110
t <sub>0</sub>	110	24	115	24	445	238	235	57

**Tableau 2 : paramètres des courbes de tendance de la Figure 33**

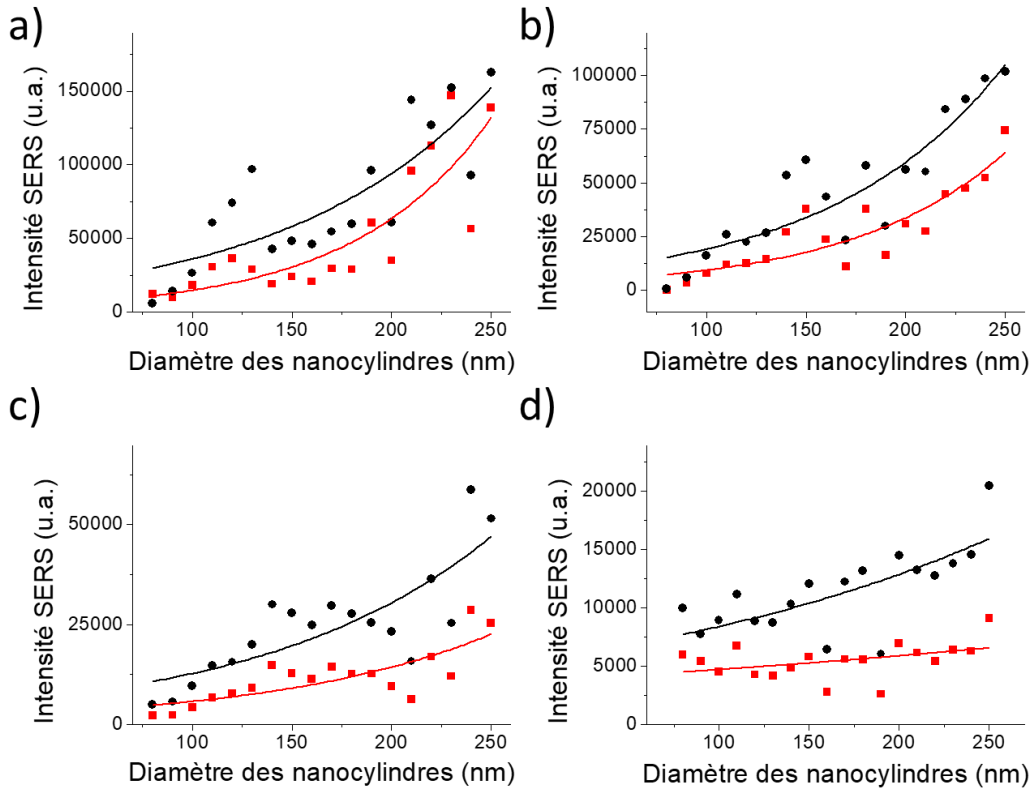


Figure 33 : Intensité SERS des bandes à  $1070\text{ cm}^{-1}$  (ronds noirs) et à  $1590\text{ cm}^{-1}$  (carrés rouges) en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm pour une excitation à 785nm. En noir les courbes de tendance pour la bande à  $1070\text{ cm}^{-1}$  et en rouge la bande à  $1590\text{ cm}^{-1}$

50

Sur la **Figure 33** et le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, j'ai déconvolué l'augmentation de l'intensité en fonction du diamètre en utilisant une exponentielle croissante. Lorsque l'épaisseur du film d'or augmente il est possible d'observer une diminution de la pente de la courbe exponentielle. Dans le cas de l'épaisseur de 50 nm, le signal est quasiment constant lorsque l'on change le diamètre. L'intensité SERS diminue lorsque l'épaisseur du film augmente. Ce résultat confirme bien les observations faites dans le cas de la hauteur de nanocylindres de 50nm et est cohérent avec l'étude plasmonique. En effet, nous avons montré que les modes plasmon excités étaient les modes localisés à l'interface verre/or. En augmentant l'épaisseur du film, on peut donc supposer que l'exaltation du champ à l'interface air/or sera donc moins importante, l'intensité du plasmon décroissant avec la distance à l'interface verre/or.

*c) Étude SERS à 638 nm*

L'acquisition a été faite durant 10 s (deux accumulations) avec une puissance de LASER de 1.4 mW à 638 nm.

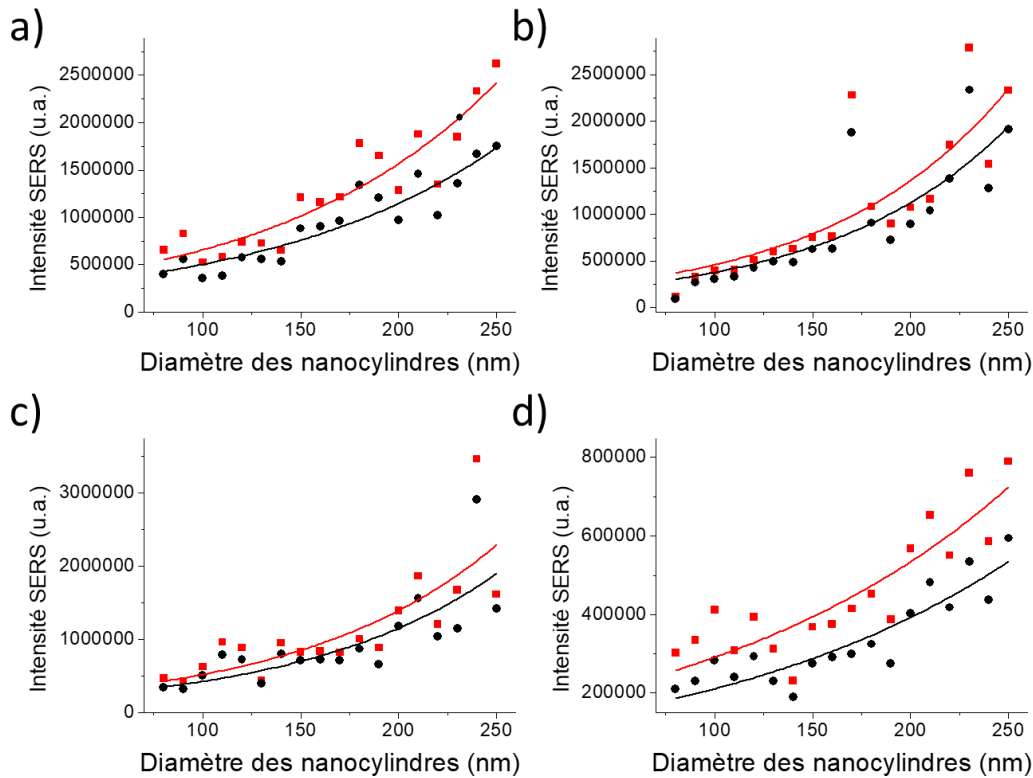


Figure 34 : Intensité SERS des bandes à 1070 cm<sup>-1</sup> (ronds noirs) et à 1590 cm<sup>-1</sup> (carrés rouges) en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm pour une excitation à 638 nm En noir les courbes de tendance pour la bandes à 1070 cm<sup>-1</sup> et en rouge la bande à 1590 cm<sup>-1</sup>

F(x)=A*exp(x/t0)								
	20 nm				30 nm			
	1590 cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>		1590 cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>	
	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type
R <sup>2</sup>	0.850		0.850		0.660		0.660	
A	275682	56963	220521	43004	125896	61805	154744	75440
t <sub>0</sub>	115	13	121	14	91	19	92	19
	40				50			
	1585		1070		1585		1070	
	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type
R <sup>2</sup>	0.590		0.580		0.750		0.800	
A	193221	88953	156913	74845	158473	27074	113385	17515
t <sub>0</sub>	101	22	100	22	164	23	161	20

Tableau 3 : paramètres des courbes de tendance de la Figure 34

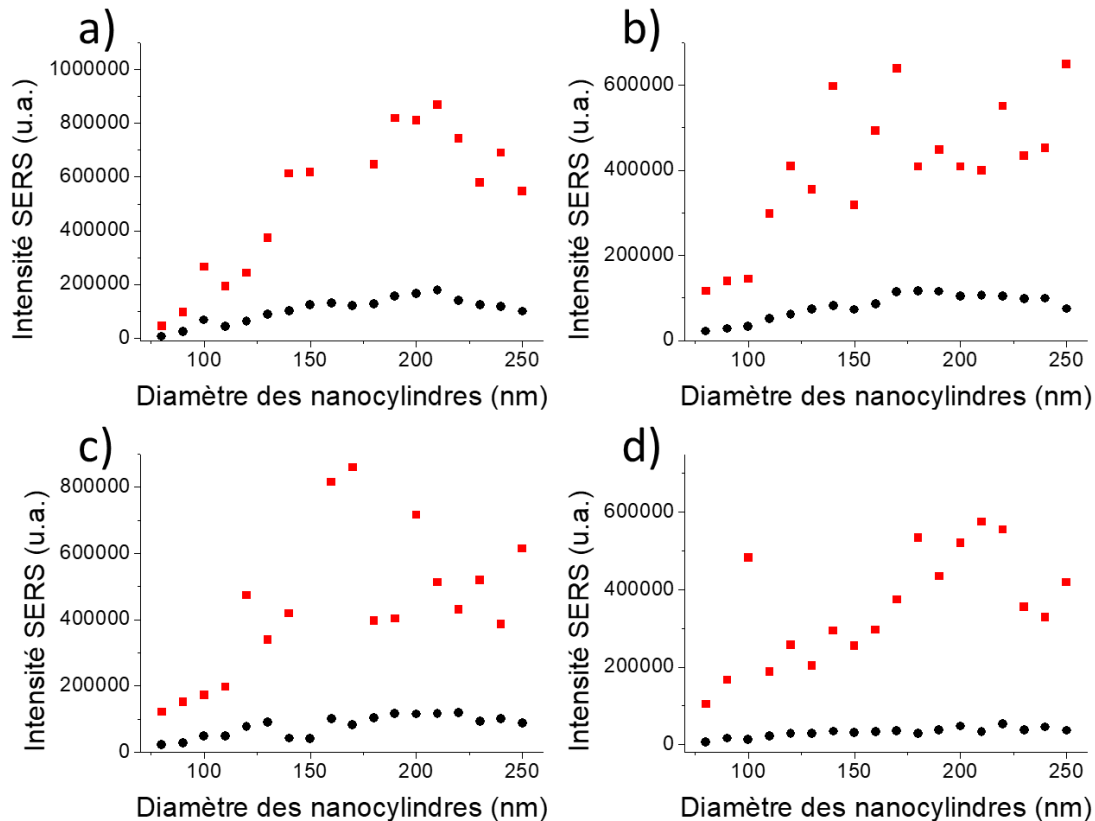
L'évolution de l'intensité SERS en fonction du diamètre est identique quelle que soit l'épaisseur de film, **Figure 34**. Il est possible d'observer qu'à la longueur d'onde de 638 nm plus le diamètre augmente plus le signal SERS est intense comme pour une hauteur de nanocylindres de 50 nm.

Sur la **Figure 34** et sur le **Tableau 3**, j'ai calculé, comme dans le cas de la **Figure 33**, la courbe de tendance d'évolution de l'intensité en prenant comme modèle une exponentielle croissante. Il est possible de voir que pour les épaisseurs de 20, 30 et 40 nm les évolutions de

l'intensité du signal SERS sont similaires. Mais au contraire du cas précédent pour l'épaisseur de 50 nm, il y a des variations du signal avec le diamètre.

*d) Le SERS à 532 nm*

L'acquisition a été faite durant 10 s (deux accumulations) avec une puissance de LASER à 5.6 mW de 532 nm.



**Figure 35 : Intensité SERS des bandes à  $1070\text{ cm}^{-1}$  (ronds noirs) et à  $1590\text{ cm}^{-1}$  (carrés rouges) en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm pour une excitation à 532 nm**

Sur la **Figure 35**, il est possible de voir que le signal SERS pour la bande à  $1070\text{ cm}^{-1}$  est plus faible pour une irradiation avec un LASER à 532 nm. Il est possible d'observer ce phénomène pour tous les diamètres (**Figure 35**). Pour les deux bandes Raman, l'intensité SERS augmente jusqu'à ce que le diamètre soit autour de 170 nm pour devenir constant (**Figure 35**).

La raison vient du fait que le mode plasmon que l'on excite à cette longueur d'onde est peu modifié avec le diamètre.

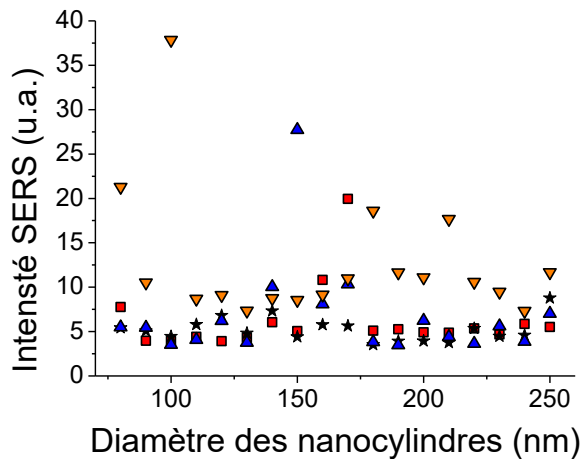


Figure 36 : Rapport d'intensité du signal SERS de la bande à 1590 cm<sup>-1</sup> sur la bande à 1070 cm<sup>-1</sup> pour une excitation à 532 nm et pour différents diamètres et différentes épaisseurs en rouge 20 nm, en noir 30 nm en bleu 40 nm et en orange 50 nm.

Sur la Figure 36, il est possible que pour les épaisseurs de 20, 30 40 nm le rapport des deux bandes est constant est vaut environ 6. Par contre pour l'épaisseur de 50 nm le rapport est constant mais il est plus grand que précédemment et est proche de 9. Le rapport constant nous permet de constater que malgré la faible intensité de la bande à 1070 cm<sup>-1</sup> il n'y a pas eu de problème lors de la fonctionnalisation. De plus la faible intensité n'est donc pas liée à la molécule.

F(x)=B*ln(x-a)								
	20 nm				30 nm			
	1590 cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>		1590 cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>	
	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type
R <sup>2</sup>	0.172		0.655		0.566		0.691	
A	79	3	79	1	78	2	78	2
B	167616	27751	26122	1563	98638	5890	19590	954
	40 nm				50 nm			
	1590 cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>		1590cm <sup>-1</sup>		1070 cm <sup>-1</sup>	
	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type	Valeur	Écart type
R <sup>2</sup>	0.262		0.580		0.402		0.732	
A	78	4	78	2	77	4	78	1
B	117250	12631	19524	1195	85077	6316	7649	343

Tableau 4 : Paramètres des courbes de tendance de la Figure 35

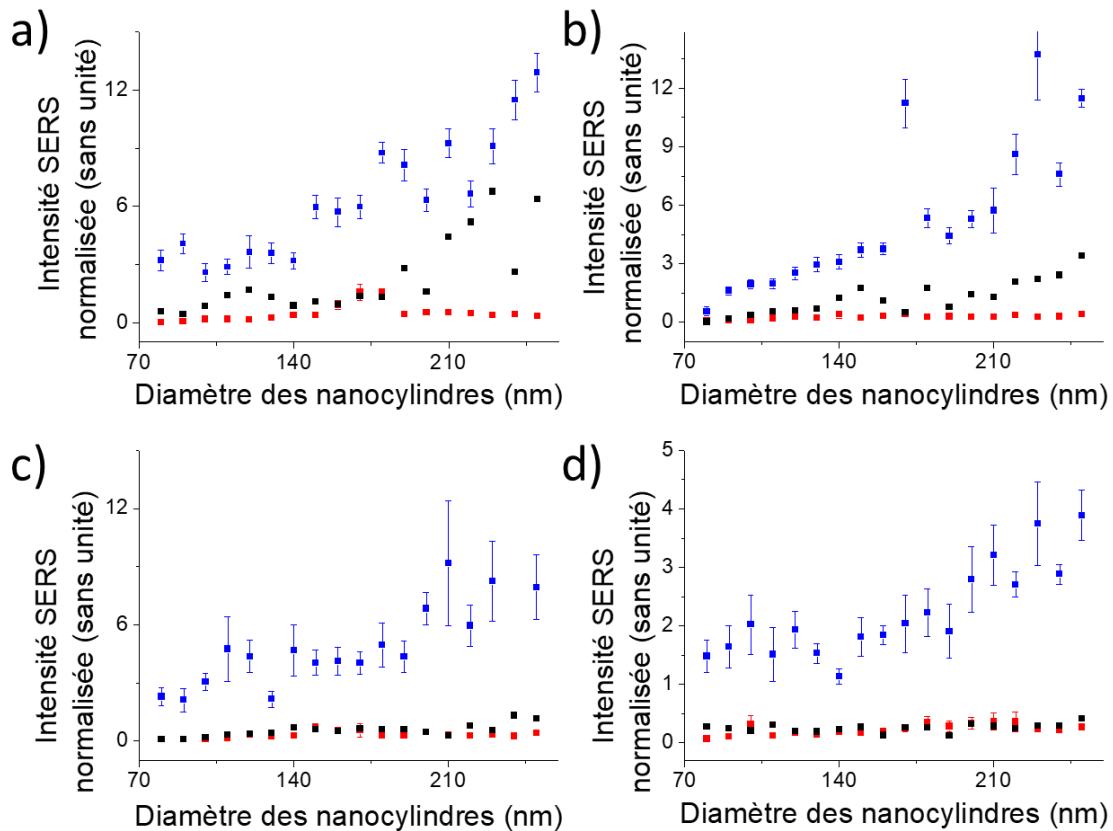
Sur la Figure 35 et le Tableau 4 j'ai calculé la courbe de tendance sous la forme d'une fonction logarithme. Il est possible de voir que les courbes de tendance sont similaires et augmentent moins que pour les autres longueurs d'onde.

*e) Influence de la longueur d'onde d'excitation sur le signal SERS*

Comme les positions des bandes Raman de la MBA ne sont pas modifiées lors du changement de LASER il est alors possible de comparer les différents LASER entre eux. De plus, cela m'a permis de déterminer un facteur d'exaltation relatif entre les différents échantillons et les différentes longueurs d'ondes d'excitation.

Pour comparer les intensités SERS obtenues aux différentes longueurs d'onde et pour s'affranchir des paramètres de mesure de l'instrument, nous avons comparé ces intensités par

rapport à un spectre Raman mesurer sur un matériau de référence. Ce matériau est une lame de silicium dont le spectre Raman a été collecté dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées en SERS. Les intensités SERS ont ensuite été normalisées par rapport à l'intensité du silicium ce qui nous permet de comparer l'efficacité relative des différentes longueurs d'ondes (**Figure 37**).



**Figure 37 : Intensité SERS normalisée des bandes à  $1590\text{ cm}^{-1}$  en fonction du diamètre pour les épaisseurs de film de a) 20 nm, b) 30 nm, c) 40 nm et d) 50 nm pour les trois longueurs d'onde d'excitation : 532 nm (points rouges), 638 nm (points bleus) et 785 nm (points noirs). La normalisation a été effectuée par rapport à l'intensité Raman du silicium mesurée aux trois mêmes longueurs d'onde.**

Quelle que soit l'épaisseur du film d'or, l'excitation à 638 nm fournit le signal plus important par rapport aux deux autres longueurs d'onde. Bien que dans l'étude plasmonique on ne voit pas de bande à 785 nm les intensités SERS pour les épaisseurs de 20 et 30 nm sont proches de celles mesurées à 638 nm. Ceci peut être expliqué par le fait que lors de la mesure SERS le cône d'excitation va inclure de nombreux angles incidents d'illumination et induire l'excitation de plusieurs modes plasmons.



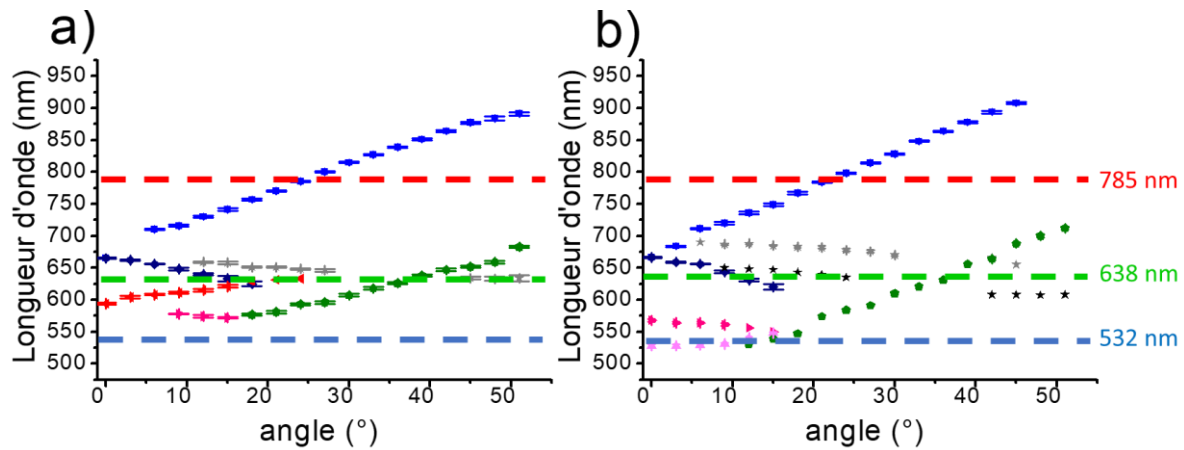


Figure 38 : Évolution de la position expérimentale (symboles pleins) pour les différents angles et les deux épaisseurs de film 20 (a) et 30 (b) nm. Les carrés bleus représentent le mode  $\{(-1,0) \text{ et } (0,-1)\} / \text{TM}_0$ , les losanges bleu nuit le mode  $\{(1,0) \text{ et } (0,1)\} / \text{TM}_0$ , les triangles rouges le mode  $(-1,1) / \text{TM}_0$ , les triangles roses le mode  $(-1,1) / \text{TM}_0$  pour c) et le mode  $(1,1) / \text{TM}_0$  pour d), les pentagones verts le mode  $(-1,0) \text{ ou } (0,-1) / \text{TM}_1$ , les gris et noirs sont des modes non attribués. Les symboles vides correspondent aux positions calculées analytiquement. Les carrés bleus représentent le mode  $\{(-1,0) \text{ et } (0,-1)\} / \text{TM}_0$ , les losanges bleu nuit le mode  $\{(1,0) \text{ et } (0,1)\} / \text{TM}_0$ , les triangles rouges le mode  $(-1,1) / \text{TM}_0$ , les triangles rose foncé le mode  $(-1,1) / \text{TM}_0$  et les roses le mode  $(1,1) / \text{TM}_0$ , les pentagones verts le mode  $(-1,0) \text{ ou } (0,-1) / \text{TM}_1$ . En lignes pointillées sont représentées les longueurs d'onde des LASER utilisés en rouge pour le 785 nm, en vert le 638 nm et en bleu le 532 nm.

La Figure 38 est tirée de la Figure 23 c) et d), sur laquelle j'ai ajouté les longueurs d'ondes des LASER pour voir leur recouvrement avec les bandes plasmons. En effet dans le cas du LASER à 638 nm, la longueur d'onde d'excitation intercepte des bandes plasmons à différents angles d'où l'exaltation importante pour cette longueur d'onde. Dans le cas du LASER à 785 nm, il y a aussi un recouvrement mais il commence pour des angles plus importants que pour le cas à 638 nm. En revanche pour le cas à 532 nm, il n'y a presque aucun recouvrement ce qui explique la faible intensité des mesures SERS.

Dans cette étude, il est possible de voir que lorsque l'épaisseur du film diminue le signal augmente jusqu'à atteindre un maximum pour les plus faibles épaisseurs (20 et 30 nm).

## E) Conclusion

Lors de cette étude, il a été possible de faire varier les réponse plasmonique et SERS en changeant plusieurs paramètres comme l'épaisseur du film d'or, le diamètre et la hauteur des nanocylindres, la longueur d'onde excitatrice ou la molécule cible.

L'étude plasmonique a montré qu'il était possible d'accorder la réponse plasmonique pour optimiser les échantillons à une longueur d'onde précise.

De plus avec les calculs effectués par les partenaires autrichiens, il m'a été possible d'expliquer les différents phénomènes présents. Par ailleurs, la distribution du champ électrique autour des nanostructures calculée m'a permis de mieux connaître les zones des nanostructures où le champ est intense.

L'étude angulaire a permis de voir le décalage des différentes bandes plasmons et m'a permis de comparer l'efficacité SERS pour les différents LASER.

L'étude SERS a été effectuée sur les échantillons avec plusieurs longueurs d'onde pour observer les différents phénomènes présents dans l'étude plasmonique. Il a été possible de voir que le signal SERS augmente lorsque le diamètre augmente et diminue lorsque l'épaisseur augmente. En effet, cette évolution est attendue car l'augmentation du diamètre va modifier l'emplacement de certaines bandes plasmons et seront ainsi plus efficaces en SERS.

Globalement, lorsque le changement d'épaisseur affecte seulement l'intensité du signal et non l'évolution de signal. Dans la dernière partie de l'étude SERS il a été possible de comparer l'exaltation liée aux différents LASERS. C'est le LASER à 638 nm qui permet d'obtenir le meilleur signal SERS car il coïncide avec beaucoup de bandes plasmoniques présentes à différents angles d'excitation. Ensuite le LASER à 785 nm permet d'obtenir malgré tout une bonne exaltation mais moins importante que pour celle à 638 nm.

Pour la suite de ce projet j'ai utilisé un LASER à 785 nm car c'est le seul LASER commun aux deux laboratoires français (CSPBAT et LRS) et j'ai fixé les différents paramètres pour les nanostructures. Comme les nanostructures seront déposées sur des quartz de QCM je n'ai pas eu à décider de l'épaisseur du film d'or. Par contre, j'ai utilisé des nanocylindres avec une hauteur de 50 nm, une périodicité de 400 nm et un diamètre de 250 nm pour les transposer sur les quartz de QCM et ainsi passer à l'optimisation du transducteur en QCM. Ces nanostructures me permettent d'obtenir un bon signal SERS et sont transposables facilement sur les quartz recouverts d'or.

## F) Bibliographie

11. Gillibert R, Tafer T, Chapelle ML de la. Strong coupling between localized surface plasmon and Bragg mode on aluminum nanocylinders grating deposited on aluminum film. *physica status solidi (a)*. 2017;214(8):1600793. doi:10.1002/pssa.201600793
52. Ben Haddada M, Salmain M, Boujday S. Gold colloid-nanostructured surfaces for enhanced piezoelectric immunosensing of staphylococcal enterotoxin A. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;255:1604-1613. doi:10.1016/j.snb.2017.08.180
53. Sarkar M, Besbes M, Moreau J, et al. Hybrid Plasmonic Mode by Resonant Coupling of Localized Plasmons to Propagating Plasmons in a Kretschmann Configuration. *ACS Photonics*. 2015;2(2):237-245. doi:10.1021/ph500351b
54. Sarkar M, Bryche J-F, Moreau J, et al. Generalized analytical model based on harmonic coupling for hybrid plasmonic modes: comparison with numerical and experimental results. *Opt Express, OE*. 2015;23(21):27376-27390. doi:10.1364/OE.23.027376
55. M. C. M. Baltar HT, Drozdowicz-Tomsia K, Goldys EM. Plasmonic Properties of Periodic Arrays of Ag Nanocylinders and Dimers, and the Effects of an Underlying Ag Layer. *J Phys Chem C*. 2018;122(38):22083-22093. doi:10.1021/acs.jpcc.8b05902
56. Banville FA, Moreau J, Sarkar M, Besbes M, Canva M, Charette PG. Spatial resolution versus contrast trade-off enhancement in high-resolution surface plasmon resonance imaging (SPRI) by metal surface nanostructure design. *Opt Express, OE*. 2018;26(8):10616-10630. doi:10.1364/OE.26.010616
57. Bryche J-F, Gillibert R, Barbillon G, et al. Plasmonic Enhancement by a Continuous Gold Underlayer: Application to SERS Sensing. *Plasmonics*. 2016;11(2):601-608. doi:10.1007/s11468-015-0088-y
58. Bryche J-F, Gillibert R, Barbillon G, et al. Density effect of gold nanodisks on the SERS intensity for a highly sensitive detection of chemical molecules. *J Mater Sci*. 2015;50(20):6601-6607. doi:10.1007/s10853-015-9203-x
59. Bryche J-F, Tsigara A, Bélier B, et al. 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. doi:10.1016/j.snb.2016.01.018
60. Magno G, Bélier B, Barbillon G. Gold thickness impact on the enhancement of SERS detection in low-cost Au/Si nanosensors. *J Mater Sci*. 2017;52(23):13650-13656. doi:10.1007/s10853-017-1445-3
61. Gillibert R, Sarkar M, Moreau J, Besbes M, Canva M, de la Chapelle ML. Near-Field Enhancement Localization on Plasmonic Gratings. *J Phys Chem C*. 2016;120(48):27562-27570. doi:10.1021/acs.jpcc.6b09717
62. Guillot N, de la Chapelle ML. The electromagnetic effect in surface enhanced Raman scattering: Enhancement optimization using precisely controlled nanostructures. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2012;113(18):2321-2333.

doi:10.1016/j.jqsrt.2012.04.025

63. Lamprecht B, Krenn JR, Schider G, et al. Surface plasmon propagation in microscale metal stripes. *Appl Phys Lett*. 2001;79(1):51-53. doi:10.1063/1.1380236
64. Grand J, de la Chapelle ML, Bijeon J-L, Adam P-M, Vial A, Royer P. Role of localized surface plasmons in surface-enhanced Raman scattering of shape-controlled metallic particles in regular arrays. *Phys Rev B*. 2005;72(3):033407. doi:10.1103/PhysRevB.72.033407
65. Guillot N, Shen H, Frémaux B, et al. Surface enhanced Raman scattering optimization of gold nanocylinder arrays: Influence of the localized surface plasmon resonance and excitation wavelength. *Appl Phys Lett*. 2010;97(2):023113. doi:10.1063/1.3462068
66. Johnson PB, Christy RW. Optical Constants of the Noble Metals. *Phys Rev B*. 1972;6(12):4370-4379. doi:10.1103/PhysRevB.6.4370
67. Xu P, Kang L, Mack NH, Schanze KS, Han X, Wang H-L. Mechanistic understanding of surface plasmon assisted catalysis on a single particle: cyclic redox of 4-aminothiophenol. *Scientific Reports*. 2013;3:2997. doi:10.1038/srep02997
68. Kim K, Choi J-Y, Shin KS. Surface-Enhanced Raman Scattering of 4-Nitrobenzenethiol and 4-Aminobenzenethiol on Silver in Icy Environments at Liquid Nitrogen Temperature. *J Phys Chem C*. 2014;118(21):11397-11403. doi:10.1021/jp5015115
69. Sanvicens N, Mannelli I, Salvador J-P, Valera E, Marco M-P. Biosensors for pharmaceuticals based on novel technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30(3):541-553. doi:10.1016/j.trac.2011.01.006

## Chapitre 3: Détection bimodale

### Table des matières

<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>60</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>60</b>
<b>A) LA STREPTOMYCINE ET SON APTAMERE</b>	<b>62</b>
<b>B) DEVELOPPEMENT DU TRANSDUCTEUR BIMODAL</b>	<b>65</b>
1) Les instruments de mesure	65
2) Le transducteur	65
3) Nettoyage des quartz	66
<b>C) ETUDE DE L'EFFICACITE SERS AVEC UNE MOLECULE SONDE</b>	<b>67</b>
<b>D) VALIDATION DU TRANSDUCTEUR EN QCM ET EN SERS</b>	<b>69</b>
1) Les mesures de QCM-D	69
a) L'adsorption de l'aptamère	69
b) L'injection de streptomycine	71
c) La protection de la surface	72
d) La quantification du PEG à la Surface	74
2) Les mesures de SERS	76
a) Matériels et méthodes	76
b) Mesures SERS après l'adsorption de l'aptamère	77
c) L'effet de l'ajout du PEG	77
d) Interaction avec la streptomycine	79
<b>E) CONCLUSION</b>	<b>83</b>
<b>F) BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>84</b>

## Table des figures

<b>Figure 39 : représentation de la molécule d'Adénine (A), de Cytosine (C), de Guanine (G) et de Thymines (T)</b>	<b>62</b>
<b>Figure 40 : a) Structure de la streptomycine b) structure de l'aptamère c) visualisation de l'interaction entre l'aptamère et la streptomycine</b>	<b>63</b>
<b>Figure 41 : a) Qsense Analyser b) Pompe péristaltique : Ismatec IPC-N 4</b>	<b>65</b>
<b>Figure 42 : a) schéma des quartz nanostructurés b) image MEB avec une échelle de 1µm</b>	<b>66</b>
<b>Figure 43 : Spectres SERS avant (spectre noir) et après (spectre rouge) lavage</b>	<b>66</b>
<b>Figure 44 : en dégradé de rose, spectres SERS sur la surface d'or plane (intensité multipliée par 5), en noir spectre SERS pour des nanostructures sur une surface d'or (intensité multipliée par 0.5) et en dégradé de bleu spectres SERS sur les nanostructures sur quartz pour la molécule de MBA</b>	<b>67</b>
<b>Figure 45 : Suivi de l'accroche de l'aptamère par QCM-D. En noir les courbes d'écart en fréquences et en rouge celles de dissipations pour l'harmonique 9. a) Quartz QCM avec nanostructures pour une concentration en aptamères de 2.3µM b) Quartz QCM sans nanostructures pour une concentration en aptamères de 2.3µM c) Quartz QCM avec nanostructures pour une concentration en aptamères de 5.6µM d) Quartz QCM sans nanostructures pour une concentration en aptamères de 5.6µM. Indiqué en traits pointillés verts les injections de d'aptamère à 2.3 et 5.6 µM et en traits pointillés bleus les injections de tampons.</b>	<b>69</b>
<b>Figure 46 : Mesure QCM-D de l'accroche de l'aptamère sur les surfaces d'or. En noir : les courbes d'écart en fréquences et en rouge celles de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère de 5µM. a) et b) Quartz de QCM avec nanostructures et c) Quartz de QCM plane sans nanostructure. Indiqué en traits pointillés verts les injections d'aptamère à 5 µM et en traits pointillés bleus les injections de solution tampon.</b>	<b>70</b>
<b>Figure 47 : Mesures QCM-D de la détection de la streptomycine. En noir les écarts en fréquences et en rouge courbes de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de 5µM et pour différentes concentrations de streptomycine. a) et b) avec des nanostructures et c) sans nanostructures. Indiqué en traits pointillés verts les injections de streptomycine en nM et en traits pointillés bleus les injections de tampons.</b>	<b>71</b>
<b>Figure 48 : Structure du PEG contenant 8 groupements éthylène glycol, une terminaison OH et une terminaison SH</b>	<b>72</b>
<b>Figure 49 : Mesures QCM-D de l'accroche de l'aptamère. Courbes noires : écart en fréquences et courbes rouge : courbes de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de T de 5µM pour une biopuce QCM nanostructurée a) et sans nanostructure b). Indiqué en pointillé vert les injections d'aptamère à 5 µM et en bleu les injections de tampons.</b>	<b>73</b>
<b>Figure 50 : Mesures QCM-D de détection de la streptomycine. Courbes noires : écart en fréquences et courbes rouge : courbes de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de T de 5µM et pour différentes concentrations de streptomycine. a) Biopuce QCM nanostructurées et avec le PEG et b) biopuce QCM sans nanostructure et sans le PEG. Indiqué en pointillé vert les injections de streptomycine en nM et en bleu les injections de tampons.</b>	<b>73</b>

- Figure 51 : Mesures QCM-D de l'accroche de l'aptamère et du PEG. Courbe noire : écart en fréquences et courbe rouge : courbes de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de T de 5 $\mu$ M et pour une concentration de PEG de 50 $\mu$ M pour une biopuce QCM nanostructurées. Indiqué en trait pointillé vert les injections d'aptamère à 5  $\mu$ M et de PEG à 50 $\mu$ M et en trait pointillé bleu les injections de tampons. 74**
- Figure 52 : schéma de la disposition supposée de l'aptamère avec l'espaceur et du PEG 75**
- Figure 53 : Mesures QCM-D de détection de la streptomycine. Courbes noires : écart en fréquences et courbes rouge : courbes de dissipation pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de T de 5 $\mu$ M avec une biopuce QCM nanostructurées et une couche de blocage de PEG pour différentes concentrations de streptomycine. a) concentration de 50nM et b) concentrations de 100 à 800nM. Indiqué en pointillé vert les injections de streptomycine en nM et en bleu les injections de tampons. 75**
- Figure 54 : a) Evolution du décalage en fréquence mesuré par QCM-D en fonction de la concentration en streptomycine (points noirs : mesures expérimentales, courbe rouge : modèle de l'isotherme de Langmuir) b) tableau indiquant la formule du modèle de l'isotherme de Langmuir utilisé ainsi que les paramètres de déconvolution obtenus. 76**
- Figure 55 : Spectre SERS de l'aptamère sans espaceur (concentration de dépôt de 5 $\mu$ M) sous excitation à 785nm 77**
- Figure 56 : Spectres SERS mesurés à 785nm. Spectre rouge : aptamère seul, spectre noir : aptamère et PEG. Les deux mesures ont été normalisées par rapport à la bande Raman à 418 $\text{cm}^{-1}$  78**
- Figure 57 : Spectres SERS mesurés à 785nm. Spectre rouge : aptamère seul, spectre noir : aptamère et PEG Les spectres ont été normalisés par rapport à la bande à 418 $\text{cm}^{-1}$ . 79**
- Figure 58 : Spectres SERS à 785 nm. Spectre noir : aptamère et PEG, spectre rouge : aptamère, PEG et streptomycine déposée pour une concentration de 800nM. Les deux spectres ont été corrigés de leur ligne de base. 80**
- Figure 59 : Spectres SERS à 785nm. Spectre noir : aptamère et PEG, spectre rouge : aptamère, PEG et streptomycine déposée pour une concentration de 800nM. Les deux spectres ont été corrigés de leur ligne de base. 80**

### Table des Tableaux

- Tableau 5 : moyennes et écarts types de la position et de l'intensité SERS sur les neuf zones pour les bandes à 1076 et 1587  $\text{cm}^{-1}$  de la molécule de MBA 67**
- Tableau 6 : décalage en fréquence mesuré pour des concentrations de streptomycine de 50 à 600nM et conversion en taux de recouvrement massique et en molaire 75**
- Tableau 7 : récapitulatif des positions moyennes des bandes (colonnes 1 et 3) avec leur attribution (dernière colonne) avec (colonnes 1 et 2) et sans streptomycine (colonnes 3 et 4) 81**

Dans le chapitre précédent, j'ai montré comment le transducteur plasmonique pouvait être optimisé en fonction de ses paramètres géométriques (tailles des nanostructures et épaisseur du film mince) en vue de son intégration sur des cristaux de quartz en QCM. Je vais maintenant présenter la molécule cible et l'aptamère que j'ai utilisés pour tester et valider les deux méthodes de transduction du biocapteur (SERS et QCM) séparément (les résultats du couplage seront présentés dans le **Chapitre 4**).

### A) La streptomycine et son aptamère

Les animaux élevés dans le but d'une production alimentaire (pour leur lait ou leur viande) peuvent être exposés à divers antibiotiques en cas d'infections ou de maladies. Par conséquent, un de ses agents thérapeutiques peut être présent dans les aliments produits à partir d'animaux traités et donc devenir dangereux pour la santé des consommateurs en produisant une résistance à ces antibiotiques<sup>69-71</sup>. Parmi ces antibiotiques, la streptomycine (MW : 583.6 g.mol<sup>-1</sup>) associée à la pénicilline a été couramment utilisée par les vétérinaires pour traiter les infections chez les bovins comme la mammite, l'inflammation des pies de la vache. Bien que cet antibiotique ne soit pas utilisé pour traiter les humains, il est ainsi possible de retrouver de la streptomycine dans les produits d'origine bovine, ce qui peut avoir de graves conséquences sur la santé humaine (insuffisance rénale, problème d'oreille interne, éruptions cutanées, ...). La surveillance et la détection de cet antibiotique dans la chaîne alimentaire sont donc indispensables avant son entrée sur le marché et sa commercialisation<sup>72-74</sup>. L'agence européenne pour l'évaluation des médicaments (AmEA) et la commission de régulation européenne (Règlement n° 37/2010) ont mis en vigueur une limite maximale de sécurité pour la streptomycine de 200 µg.kg<sup>-1</sup> pour le lait et de 500 µg.kg<sup>-1</sup> pour la viande<sup>75,76</sup>.

Il existe déjà plusieurs méthodes pour détecter la présence de streptomycine comme par exemple, des méthodes microbiologiques, photométriques ou séparatives comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Malheureusement, les méthodes microbiologiques sont lentes (entre plusieurs heures à plusieurs jours). Ce temps d'expérimentation va ralentir la prise en charge du problème et rallonger le traitement associé. De plus, ces techniques ont une reproductibilité, une fiabilité (il peut y avoir des faux positifs) et une sensibilité assez faible et une LOD d'environ une centaine de µM. Les autres techniques de caractérisation comme l'HPLC sont généralement très coûteuses et demandent un personnel très qualifié<sup>69,77,78</sup>.

Ainsi, il est important de trouver une méthode simple (pour être accessible), rapide (diminuer le temps avant le traitement et du traitement), sensible, à faible coût et portable (pour pouvoir utiliser le capteur facilement sur site). Les biocapteurs optiques sont alors de bons candidats (voir **chapitre 1 A**).

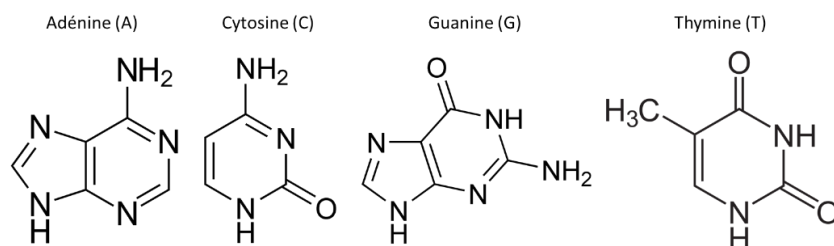
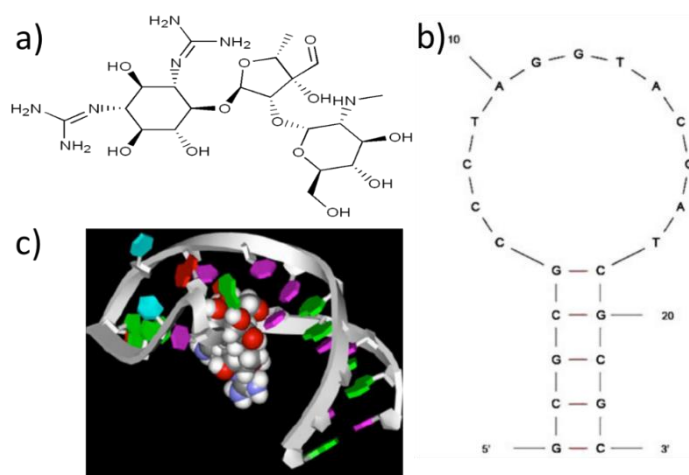


Figure 39 : Représentation de la molécule d'Adénine (A), de Cytosine (C), de Guanine (G) et de Thymine (T)



Dans le cas de la streptomycine, il est possible d'utiliser un aptamère comme biorécepteur. Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques le plus souvent d'acides désoxyribonucléiques (ADN). Les bases utilisées sont l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T) (**Figure 39**). Un aptamère est composé d'un simple brin d'ADN ayant une séquence spécifique. Cette séquence lui confère une conformation présentant une forte affinité avec l'analyte à détecter. Les séquences sont définies à partir de la méthode SELEX. Le principe est d'isoler et de sélectionner *in vitro* les oligonucléotides qui se lient avec la plus haute affinité à une cible donnée. Ceci se fait à partir de banques combinatoires d'un grand nombre de séquences aléatoires et d'une méthode de sélection itérative appelée évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel. Ensuite, il faut séparer les différentes séquences ayant réagi avec la cible par chromatographie d'affinité en gel natif, par séparation sur membrane ou avec des billes magnétiques. L'étape suivante est de séparer les oligonucléotides de la cible et de les amplifier par clonage ou par réaction en chaîne par polymérase. Ces étapes sont renouvelées plusieurs fois jusqu'à l'obtention des oligonucléotides ayant la plus grande affinité pour la cible. Les propriétés particulières et leur capacité de repliement en trois dimensions leur permet d'avoir une sélectivité, une spécificité et une affinité très élevées<sup>71,77,79</sup>. En effet, un aptamère a l'avantage de pouvoir être spécifique d'une molécule particulière (plus de 90 %) et très peu pour des molécules ayant presque les mêmes caractéristiques chimiques (moins de 5 %). Les aptamères sont plus avantageux par rapport aux anticorps notamment, car ils ont une meilleure stabilité (se détériorent peu avec le temps, et peuvent être conservés plusieurs mois), une plus grande pureté (>85 %), des modifications de chaîne ou de terminaison plus facile, une plus grande facilité de stockage (congélateur sous forme d'aliquots ou sous forme solide), aucune variation d'un lot à l'autre, ... Ces avantages ont permis aux aptamères d'être de plus en plus utilisés.



**Figure 40 :** a) Structure de la streptomycine b) structure de l'aptamère c) visualisation de l'interaction entre l'aptamère et la streptomycine

On peut voir sur la **Figure 40 a)**, que la structure de la streptomycine comporte plusieurs groupements chimiques, notamment des groupements amine et des cycles aromatiques procurant à la molécule une section efficace importante et pouvant donner un signal Raman intéressant. Sur la **Figure 40 b)**, on peut également voir la structure de l'aptamère que j'ai utilisé pour capturer la streptomycine. Sa séquence a été définie à la suite d'une étude sur trois structures différentes<sup>78</sup>. Dans cette étude, une constante de dissociation de 132.3 nM a été calculée pour cet aptamère. Une étude de la spécificité a été réalisée montrant une spécificité de plus de 90 % pour la streptomycine et a une très faible spécificité

pour les autres molécules proches (gentamycine 10 %, amikacine 20 %, chlorphéniramine 5 %, clindamycine 5 % et ampiciline 1 %) <sup>78</sup>. La **Figure 40 c)** montre une étude théorique de la conformation de l'aptamère lors de son interaction avec la streptomycine qui se lierait alors à l'aptamère par l'intermédiaire des bases A14, G16, A17, T18 et C19.

Pour concevoir le biocapteur, l'aptamère doit être accroché à la surface d'or. Pour cela, j'ai choisi de greffer un groupement thiol en position 5' à l'extrémité de la séquence de l'aptamère. Ce groupement m'a permis d'obtenir une couche d'aptamères à la surface des nanostructures et de la surface d'or du quartz de QCM.

Pour assurer la reconnaissance entre la streptomycine et l'aptamère, j'ai utilisé un tampon spécifique composé des éléments suivants : 5 mM de  $MgCl_2$  + 0.1 M de NaCl + 20 mM de TrisHCl.

## B) Développement du transducteur bimodal

Pour réaliser les expériences QCM et SERS j'ai dû concevoir un transducteur type pouvant être utilisé aussi bien en QCM qu'en SERS. Ce transducteur a ensuite été reproduit plusieurs fois pour déterminer ses propriétés et estimer la reproductibilité de la méthode de préparation, l'objectif étant dans un premier temps de démontrer qu'un tel transducteur permettait la détection de molécules par QCM et par SERS.

### 1) Les instruments de mesure

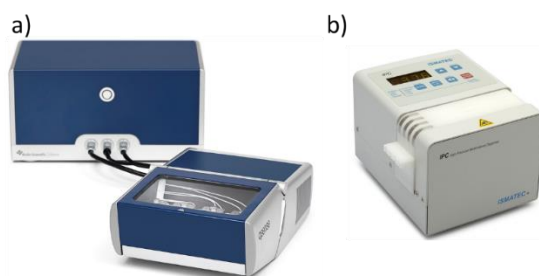


Figure 41 : a) Qsense Analyser b) Pompe péristaltique : Ismatec IPC-N 4

Pour effectuer les mesures en QCM j'ai utilisé différents instruments présentés sur la **Figure 41 a)**. Le Qsense A Analyser m'a permis d'effectuer des expériences de QCM avec 4 quartz différents et 4 voies d'injection fluide différentes. Pour injecter les solutions d'aptamères et de streptomycine sur les transducteurs, cet instrument est équipé d'une pompe péristaltique permettant d'avoir un flux entre 5 et 200  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (**Figure 41 b)**. Pour une mesure en QCM, on place entre un dans la cellule QCM. Puis le quartz est stimulé pour vibrer à sa fréquence fondamentale (5 Mhz) ainsi qu'à plusieurs harmoniques. L'étape suivante est de faire passer un flux d'air pour stabiliser les fréquences des harmoniques. Au bout de deux heures un flux de tampon permet de restabiliser les fréquences. Au bout d'une heure, on peut injecter dans le système la molécule à accrocher à la surface du quartz de QCM. Après chaque injection d'intérêt, il est nécessaire de nettoyer la surface avec une solution tampon pour éliminer les molécules non adsorbées sur la surface.

Pendant et après les mesures QCM il est possible de suivre les différentes harmoniques des quartz. Pour calculer les décalages en fréquences il est préférable de choisir une harmonique supérieure à 5. Pour pouvoir comparer une suite de mesures il faut toujours suivre la même harmonique.

Ce type d'expérience m'a permis d'obtenir plusieurs informations. La différence de fréquences d'oscillation du quartz avant et après l'injection de molécules d'intérêt m'a permis de mesurer la masse de molécules adsorbées ou accrochées à la surface de l'or. On peut aussi en étudiant la courbe de dissipation déterminer si la couche déposée à la surface dissipe vite son énergie ou non. La dissipation est liée aux propriétés viscoélastiques de la couche à la surface du quartz. Lorsque l'on considère à la fois les écarts en fréquence et en dissipation, la mesure se nomme QCM-D.

### 2) Le transducteur

Sur la **Figure 42**, je présente le transducteur type sur lequel j'ai réalisé mon étude. Il consiste en un échantillon de cristal de quartz classique de 1.4 cm de diamètre recouvert d'une couche d'or servant d'électrode pour la mesure QCM que je nanostructure par lithographie électronique en suivant le protocole du **Chapitre 3** :

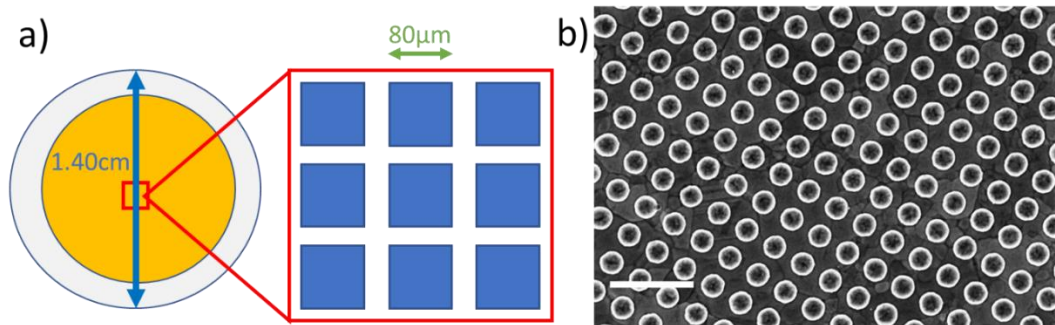


Figure 42 : a) Schéma des quartz nanostructurés b) image MEB avec une échelle de 1 µm

Les nanostructures choisies utilisent les paramètres définis au **Chapitre 2**, soit des réseaux de nanocylindres de 250 nm de diamètre et de 50 nm de hauteur avec une périodicité de 400 nm sur une zone de 80X80 µm<sup>2</sup>. De plus pour pouvoir effectuer plusieurs mesures dans des conditions identiques j'ai reproduit 9 fois le même motif au centre du quartz.

### 3) Nettoyage des quartz

Les transducteurs de quartz nanostructurés étant longs et coûteux à préparer j'ai dû adapter une technique de nettoyage pour me permettre de réutiliser les mêmes transducteurs plusieurs fois.

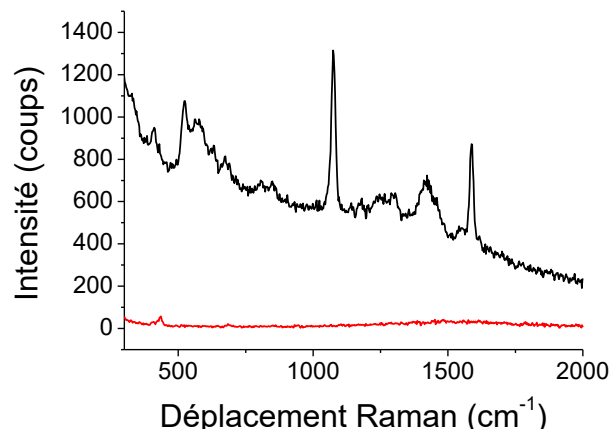


Figure 43 : Spectres SERS avant (spectre noir) et après (spectre rouge) lavage

Pour nettoyer les quartz je commence tout d'abord par préparer une solution de dodécylsulfate de sodium (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) à 2 %. 1 g de SDS est alors dissout dans 50 mL d'eau ultra pure. Pendant l'homogénéisation de la solution je dépose les quartz sous ozoneur pendant 20 min ce qui me permet d'éliminer les groupements chimiques organiques sur la surface. Par la suite, les quartz sont plongés dans la solution de SDS préparée préalablement pendant 4h et à température ambiante. Cette étape permet d'enlever tous les résidus organiques restants à la surface. Pour finir, je rince les quartz avec de l'eau ultra pure puis je les sèche avec un flux d'azote (**Figure 43**).

Ainsi après ce lavage la présence de composés organiques est réduite au maximum et il est possible de réutiliser les échantillons avec le minimum de pollution à la surface.

### C) Etude de l'efficacité SERS avec une molécule sonde

Pour vérifier que les transducteurs bimodaux étaient opérationnels en SERS, je les ai fonctionnalisés avec du MBA. Pour fonctionnaliser la surface, le transducteur a été immergé dans une solution de MBA (3 mM) pendant une journée sous agitation magnétique pour garder la solution homogène.

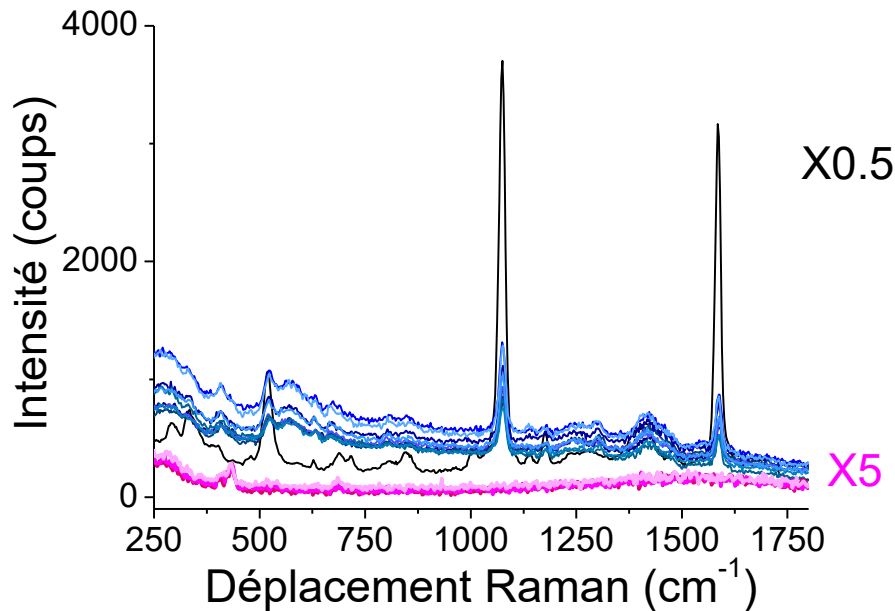


Figure 44 : En dégradé de rose, spectres SERS sur la surface d'or plane (intensité multipliée par 5), en noir spectre SERS pour des nanostructures sur une surface d'or (intensité multipliée par 0.5) et en dégradé de bleu spectres SERS sur les nanostructures sur quartz pour la molécule de MBA

Sur la **Figure 44**, il est possible de voir deux types de mesures. En dégradé de rose, on peut voir les mesures SERS en trois points différents de la surface d'or plane loin des nanostructures. Sur ces zones, aucun signal provenant de la molécule de MBA n'est visible. Les bandes observables en dessous de  $500\text{ cm}^{-1}$  proviennent de la surface de quartz et ne sont pas attribuables à la molécule de MBA déposée dessus. Les spectres en dégradé de bleu sont les spectres acquis sur les nanostructures en neuf points différents. En comparant les spectres bleus et le spectre noir (spectre SERS obtenu sur des nanostructures déposées sur un film d'or d'épaisseur ...), il est possible de voir que les bandes Raman sont les identiques (mêmes positions et mêmes intensités relatives) et correspondent donc bien à la molécule de MBA. On peut également constater que l'intensité sur les quartz est plus faible d'un ordre de grandeur environ. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'épaisseur du fil d'or sur la puce QCM n'est pas contrôlée et donc n'est pas optimale pour l'exaltation du signal Raman.

	Position de la bande à $1076\text{ cm}^{-1}$	Intensité de la bande à $1076\text{ cm}^{-1}$	Position de la bande à $1587\text{ cm}^{-1}$	Intensité de la bande à $1587\text{ cm}^{-1}$
Moyenne ( $\text{cm}^{-1}$ )	1076.0	9113	1587.72	4257
Écart type ( $\text{cm}^{-1}$ )	0.7	1652	0.8	710

Tableau 5 : Moyennes et écarts types de la position et de l'intensité SERS sur les neuf zones pour les bandes à  $1076$  et  $1587\text{ cm}^{-1}$  de la molécule de MBA

J'ai calculé la moyenne et l'écart type pour les bandes principales du MBA que j'ai regroupés dans le **Tableau 5**. Ces données nous montrent que la réponse SERS est pratiquement constante en position ou en intensité. Il est donc possible de collecter le spectre SERS en n'importe quels points de la surface nanostructurée et le signal sera constant. De plus les nanostructures nous permettent d'exalter le signal Raman pour obtenir un signal exploitable des molécules déposées sur la surface du transducteur.

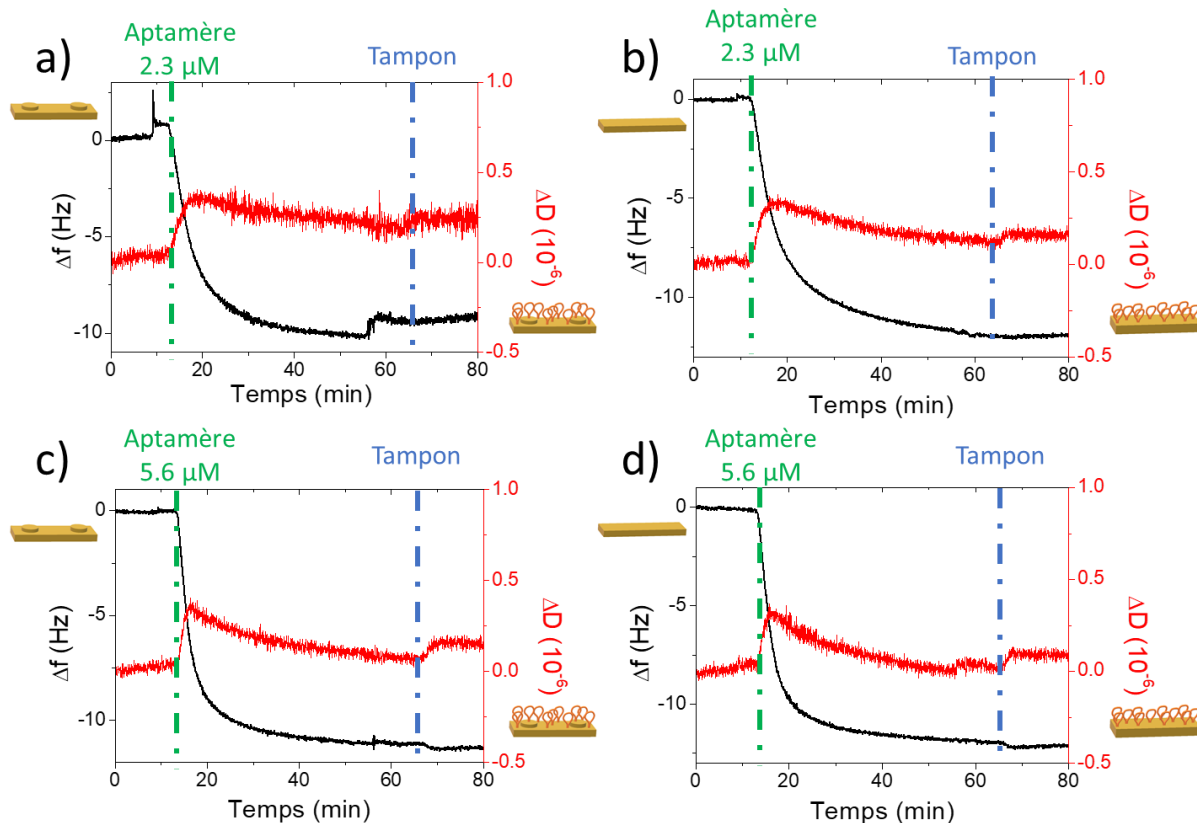
Cette étude démontre que les transducteurs nanostructurés permettent d'acquérir un signal SERS suffisamment intense pour identifier les molécules. J'ai donc continué de travailler avec ces échantillons pour étudier la détection de la streptomycine avec son aptamère.

## D) Validation du transducteur en QCM et en SERS

Pour valider le transducteur bimodal et par conséquent notre méthodologie, j'ai accroché l'aptamère modifié par un thiol ( $M_w=7222.8\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) à la surface d'or pour obtenir un biocapteur. L'accroche de l'aptamère à la surface a été faite après des injections de solutions contenant une concentration de 2.3 et 5.6  $\mu\text{M}$  d'aptamères sous flux ( $50\mu\text{L}/\text{min}$ ).

### 1) Les mesures de QCM-D

#### a) L'accroche de l'aptamère

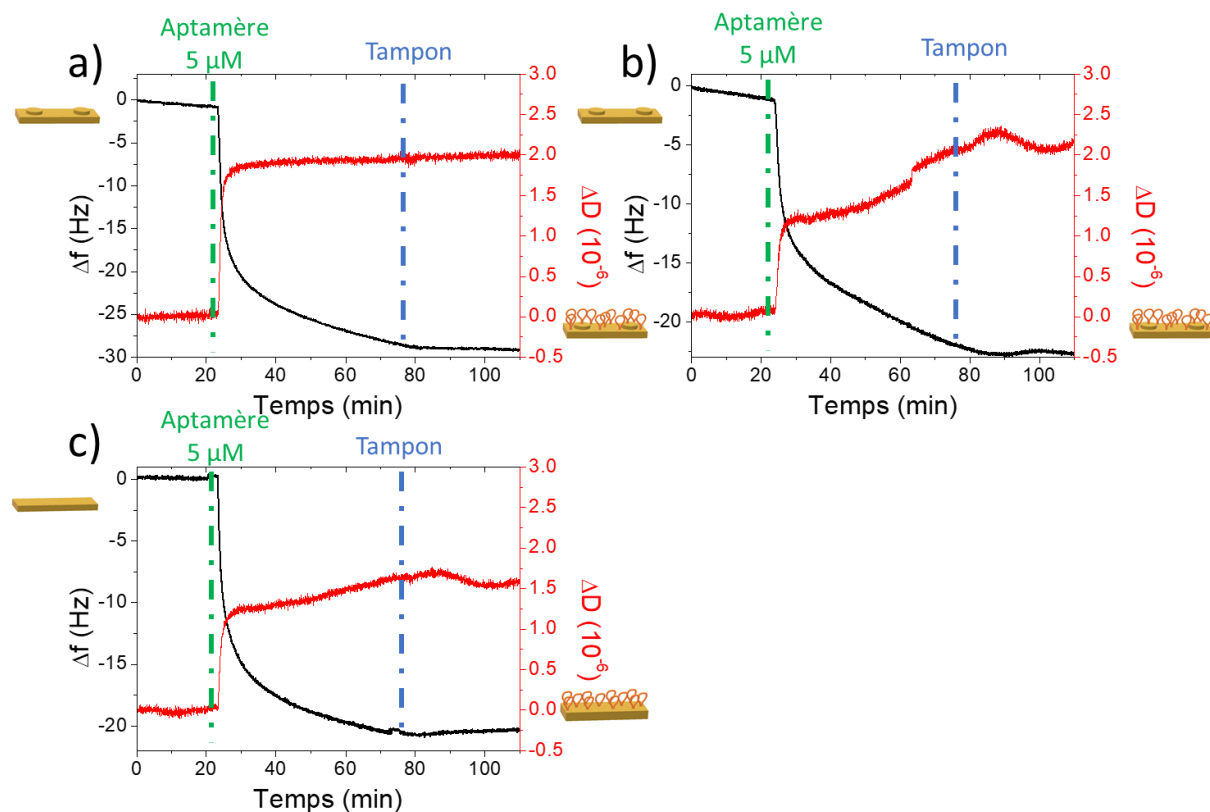


**Figure 45 :** Suivi de l'accroche de l'aptamère par QCM-D. En noir les courbes d'écart en fréquences et en rouge celles de dissipations pour l'harmonique 9. a) Quartz QCM avec nanostructures pour une concentration en aptamères de 2.3 $\mu\text{M}$  b) Quartz QCM sans nanostructures pour une concentration en aptamères de 2.3 $\mu\text{M}$  c) Quartz QCM avec nanostructures pour une concentration en aptamères de 5.6 $\mu\text{M}$  d) Quartz QCM sans nanostructures pour une concentration en aptamères de 5.6 $\mu\text{M}$ . Indiqué en traits pointillés verts les injections de d'aptamère à 2.3 et 5.6  $\mu\text{M}$  et en traits pointillés bleus les injections de tampons.

Sur la **Figure 45**, sont présentées les mesures QCM-D pour deux concentrations différentes en aptamères : 2.3 $\mu\text{M}$  (a et b) et 5.6 $\mu\text{M}$  (c et d) et pour des quartz avec des nanostructures (a et c) et sans nanostructures (b et d). Durant ces mesures j'ai fait deux injections : une à 12 min avec de l'aptamère et une autre à 63 min avec le tampon. J'ai pu observer sur les différentes mesures que la présence de nanostructures ne perturbe pas les mesures en QCM-D. On observe le même décalage en fréquence et la même dissipation avec ou sans nanostructures. La présence de nanostructures à la surface va juste décaler vers de plus basses fréquences les fréquences harmoniques. La deuxième chose notable est l'observation d'une faible augmentation de la dissipation lorsque l'aptamère est accroché à la surface. Ceci est lié au fait que l'aptamère rend la surface moins rigide et va par conséquent décaler le temps de dissipation. On peut alors utiliser l'équation de Sauerbrey (**Chapitre 1**

**équation 5)** et ainsi calculer la masse d'aptamères déposée sur la surface. Les résultats obtenus sont les suivants en fonction de la présence des nanostructures ou non et de la concentration de la solution : **a)**  $20.21 \text{ ng.cm}^{-2}$  **b)**  $23.48 \text{ ng.cm}^{-2}$  **c)**  $22.32 \text{ ng.cm}^{-2}$  **d)**  $24.31 \text{ ng.cm}^{-2}$ . On peut constater que lorsque l'on augmente la concentration en aptamères, le nombre d'aptamères accrochés à la surface augmente légèrement (10 % pour une concentration double). Ce résultat était attendu car d'après la référence <sup>(78)</sup> l'accroche à la surface atteint un palier de saturation à partir de  $3 \mu\text{M}$ . J'ai donc décidé de conserver une concentration de  $5 \mu\text{M}$  pour les fonctionnalisations suivantes ce qui permettra de saturer la surface en aptamères. Comme la différence de fréquence entre le cas avec et sans nanostructures est faible il est possible d'utiliser le cas sans nanostructures pour le comparer avec les échantillons avec nanostructures lorsque l'on change les différents paramètres.

Pour donner plus de flexibilité à l'aptamère et le rendre plus accessible à la streptomycine, j'ai ajouté un brin de 14 thymines (T) à son extrémité 5' ( $M_w=11481 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Ce brin joue alors le rôle d'espaceur et permet ainsi d'éloigner l'aptamère de la surface d'or. J'ai alors effectué de nouvelles mesures en QCM-D pour ce 2e aptamère (**Figure 46**). Pour faire ces mesures j'ai utilisé un flux de  $50 \mu\text{L/min}$ .



**Figure 46 : Mesure QCM-D de l'accroche de l'aptamère sur les surfaces d'or. En noir : les courbes d'écart en fréquences et en rouge celles de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère de  $5 \mu\text{M}$ . a) et b) Quartz de QCM avec nanostructures et c) Quartz de QCM plane sans nanostructure. Indiqué en traits pointillés verts les injections d'aptamère à  $5 \mu\text{M}$  et en traits pointillés bleus les injections de solution tampon.**

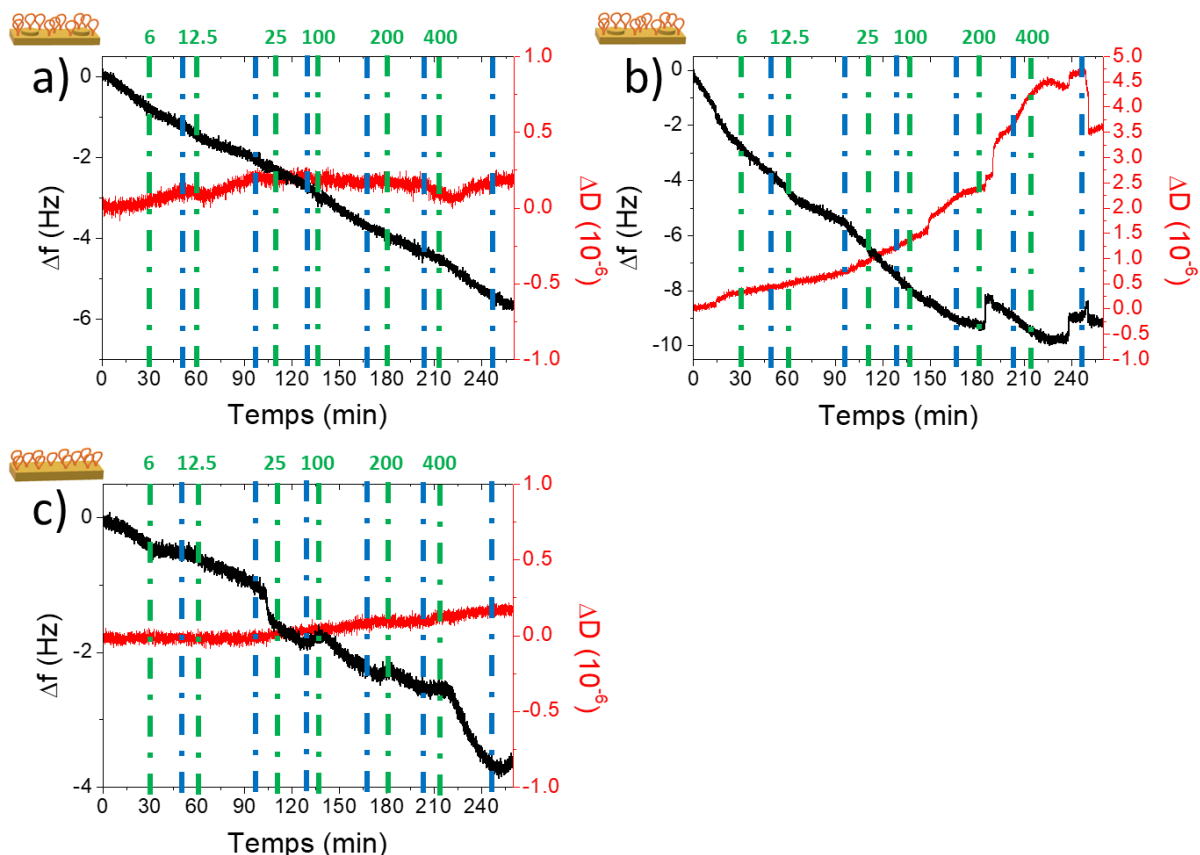
Pour les mesures de QCM-D de la **Figure 46**, il y a deux types d'échantillons en **a)** et **b)** les échantillons sont nanostructurés et en **c)** la surface est plane sans nanostructures. Durant cette mesure j'ai réalisé deux injections : pour la première, l'injection de l'aptamère s'est déroulée pendant une durée de 20 min alors que pour la deuxième du tampon a été injecté pendant 75 min. En comparant l'écart de fréquence avec la mesure précédente (**Figure 45**) il



est possible de remarquer que le déplacement de fréquences dans le dernier cas (**Figure 46**) est plus important. Ceci est dû au fait que l'aptamère est plus long avec l'espaceur et donc plus lourd induisant un décalage en fréquences plus grand. Comme pour les mesures précédentes de la **Figure 45**, il n'y a pas de différence entre les échantillons avec et sans nanostructures. La différence de l'écart en fréquences entre les deux cas avec les nanostructures (**Figure 46a et b**) est due au fait que dans le cas **a**) le quartz est neuf alors que dans le cas **b**) le quartz a été réutilisé après avoir été lavé. En mesurant les différences de fréquence il est possible de calculer la masse d'aptamères adsorbée à la surface. Pour **a**) la masse ajoutée est de  $55.54 \text{ ng.cm}^{-2}$  alors qu'elle est de  $42.28 \text{ ng.cm}^{-2}$  pour **b**) et de  $40.63 \text{ ng.cm}^{-2}$  pour **c**).

### b) Détection de la streptomycine

Pour tester la détection de la streptomycine, j'ai effectué plusieurs injections de streptomycines à des concentrations croissantes.



**Figure 47 : Mesures QCM-D de la détection de la streptomycine. En noir les écarts en fréquences et en rouge courbes de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de  $5 \mu\text{M}$  et pour différentes concentrations de streptomycine. a) et b) avec des nanostructures et c) sans nanostructures. Indiqué en traits pointillés verts les injections de streptomycine en nM et en traits pointillés bleus les injections de tampons.**

Sur la **Figure 47**, j'ai regroupé les mesures pour deux biopuces QCM nanostructurées (**Figure 47 a) et b**) et une avec une surface plane sans nanostructure (**Figure 47 c**). Ce sont les mêmes quartz que ceux utilisés pour les expériences QCM présentées à la **Figure 46**. Les mesures du quartz **b**) ont été faites avec un quartz nettoyé grâce au protocole décrit à la section B-3 et réutilisé. J'ai effectué plusieurs injections à différentes concentrations de streptomycine : 30 min concentration de 6 nM, 60 min concentration de 12.5 nM, 110 min concentration de 25 nM, 137 min concentration de 100 nM, 180 min concentration de 200

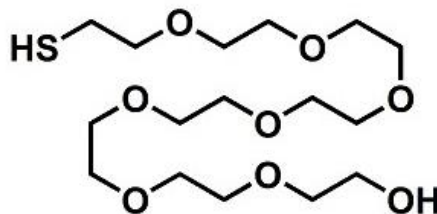
nM, 213 min concentration de 400 nM.

En comparant les mesures obtenues dans les cas a) et b), pourtant ayant des protocoles identiques, il est possible de remarquer qu'elles sont totalement différentes. Il est possible d'expliquer ceci par le fait que l'une des biopuces était utilisée pour la première fois alors que la seconde avait été nettoyée en utilisant le protocole décrit à la section B-3. Il est possible de voir un décalage entre le cas avec et sans nanostructures mais il ne vient pas de la quantité d'aptamères à la surface. Pour comprendre ce phénomène j'ai calculé le déplacement théorique de la fréquence QCM en cas de capture de la streptomycine par l'aptamère. Si on considère un écart de fréquences de 21Hz dans le cas des **Figure 46 b) et c)**, cela permet d'obtenir une masse d'aptamère de 41 ng et soit des taux de recouvrement surfacique de  $3.7 \text{ pmol.cm}^{-2}$  pour **b)** et de  $3.5 \text{ pmol.cm}^{-2}$  pour **c)**. Si on prend pour valeur moyenne  $3.5 \text{ pmol.cm}^{-2}$  d'aptamères sur la surface d'or, on peut alors estimer le taux de recouvrement de la streptomycine dans le cas où il y aurait une streptomycine pour un aptamère (saturation de l'ensemble des sites des aptamères). Dans ce cas, cela correspondrait à une masse de streptomycine de 2.04 ng soit un déplacement en fréquence de l'ordre de 1.0 Hz. Or lors des mesures (**Figure 46**), les déplacements sont de plusieurs Hz. Ceci indique que soit l'aptamère adsorbe plusieurs molécules de streptomycine, soit la streptomycine n'interagit pas uniquement avec l'aptamère mais aussi avec la surface. En effet les groupements amines de la streptomycine peuvent interagir avec la surface d'or.

Pour empêcher cette interaction j'ai changé mon protocole de fonctionnalisation et ajouté une étape de blocage après l'étape d'adsorption de l'aptamère à la surface.

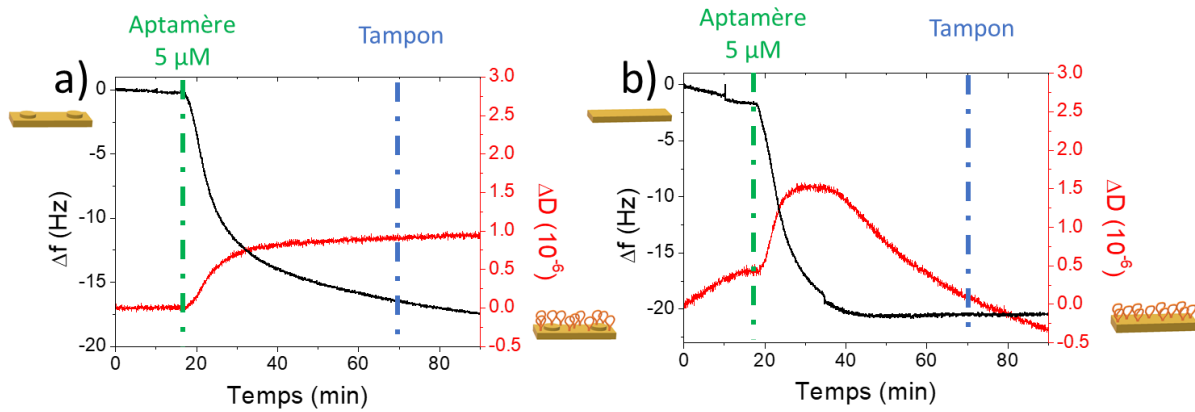
#### *c) Blocage de la surface*

Pour protéger la surface de l'adsorption de la streptomycine ou de tout autre contaminant lors de la mesure de détection, un polyéthylène glycol (PEG) avec 8 groupements d'éthylène glycol, une terminaison OH à une extrémité et un groupement thiol à l'autre extrémité (masse molaire :  $386.5 \text{ g.mol}^{-1}$ ) (**Figure 48**) a été greffé sur la surface d'or.



**Figure 48 : Structure du PEG contenant 8 groupements éthylène glycol, une terminaison OH et une terminaison SH**

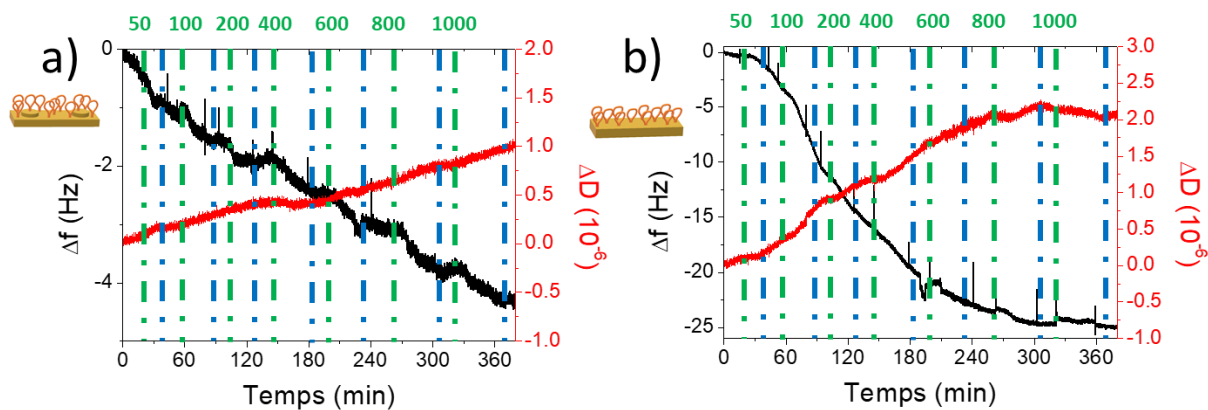
Ce PEG thiol permet d'obtenir une monocouche auto-assemblée de PEG pour remplir les zones de la surface d'or sans aptamère. J'ai choisi un groupement terminal OH pour éviter toute interaction entre le PEG et la streptomycine. Le PEG convient bien pour éviter toute interaction de la streptomycine avec la surface et ainsi ne garder que l'interaction entre la streptomycine et l'aptamère.



**Figure 49 : Mesures QCM-D de l'accroche de l'aptamère. Courbes noires : écart en fréquences et courbes rouge : courbes de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de T de 5 μM pour une biopuce QCM nanostructurée a) et sans nanostructure b). Indiqué en pointillé vert les injections d'aptamère à 5 μM et en bleu les injections de tampons.**

J'ai donc fonctionnalisé deux nouveaux quartz avec l'aptamère : un nanostructuré et un avec une surface d'or plane (**Figure 49**). L'écart de fréquence après accroche de l'aptamère est de 18Hz après rinçage au tampon. Par la suite j'ai fonctionnalisé les surfaces avec le PEG-Thiol. Pour cela j'ai immergé ma surface dans une solution d'eau ultra pure contenant 3 mM de PEG durant 2h après fonctionnalisation par l'aptamère. J'ai rincé la surface avec de l'eau ultra pure puis je l'ai séchée avec un flux d'azote. Cette fonctionnalisation n'a pas été faite dans un solvant trop agressif comme de l'éthanol pour ne pas endommager la surface déjà fonctionnalisée.

J'ai ensuite injecté différentes concentrations de streptomycine et suivi l'évolution de la variation de fréquence en QCM-D.



**Figure 50 : Mesures QCM-D de détection de la streptomycine. Courbes noires : écart en fréquences et courbes rouge : courbes de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de T de 5μM et pour différentes concentrations de streptomycine. a) Biopuce QCM nanostructurées et avec le PEG et b) biopuce QCM sans nanostructure et sans le PEG. Indiqué en pointillé vert les injections de streptomycine en nM et en bleu les injections de tampons.**

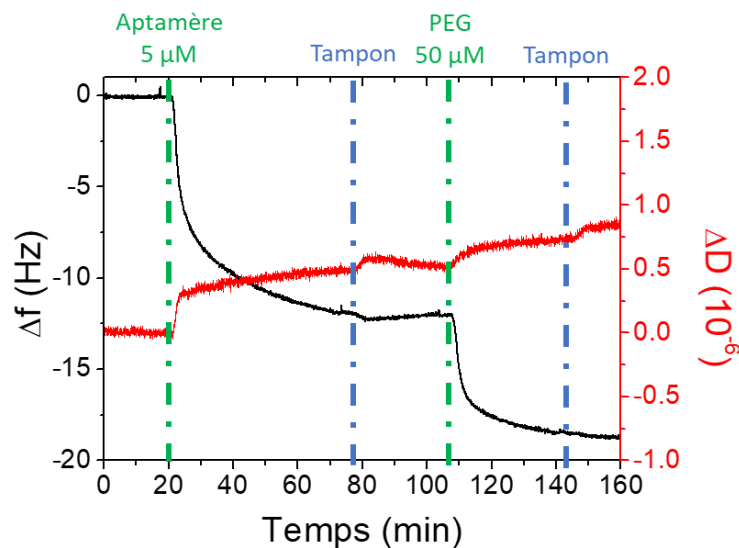
Sur la **Figure 50**, j'ai regroupé les mesures de détection de la streptomycine pour une biopuce QCM nanostructurée et bloquée avec le PEG (**Figure 50 a**) et une biopuce QCM sans nanostructure et sans blocage avec le PEG (**Figure 50 b**). J'ai effectué plusieurs injections à différentes concentrations de streptomycine : 15 min concentration de 50 nM, 53 min concentration de 100 nM, 93 min concentration de 200 nM, 145 min concentration de 400 nM, 200 min concentration de 600 nM, 263min concentration de 800 nM, 321 min concentration de 1000 nM.

Il est possible de voir que la streptomycine est plus adsorbée dans le cas sans PEG que dans le cas avec PEG. Cela confirme le fait que le PEG protège bien la surface d'or de l'accroche de la streptomycine.

Cette expérience démontre que l'ajout de PEG nous permet bien de protéger la surface non recouverte par l'aptamère. J'ai alors quantifié la quantité de PEG accroché sur la surface pour ainsi avoir un système totalement connu.

#### d) La quantification du PEG à la Surface

Pour quantifier la quantité de PEG à la surface par rapport au nombre d'aptamères j'ai utilisé des quartz nanostructurés que j'ai nettoyé avec le protocole présenté à la section **Chapitre 3:B)3**.



**Figure 51 : Mesures QCM-D de l'accroche de l'aptamère et de PEG. Courbe noire : écart en fréquences et courbe rouge : courbes de dissipations pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de T de 5  $\mu\text{M}$  et pour une concentration de PEG de 50  $\mu\text{M}$  pour une biopuce QCM nanostructurées. Indiqué en trait pointillé vert les injections d'aptamère à 5  $\mu\text{M}$  et de PEG à 50  $\mu\text{M}$  et en trait pointillé bleu les injections de tampons.**

Pour la **Figure 51**, j'ai effectué les injections suivantes : 17 min injection de l'aptamère, avec une concentration de 5  $\mu\text{M}$ , 73 min injection du tampon (rinçage de la surface), 103 min injection de PEG à 50  $\mu\text{M}$ , 141 min injection du tampon (rinçage de la surface).

Dans cette mesure, le décalage en fréquence pour l'accroche de l'aptamère est de 12 Hz ce qui représente une quantité de 23.6  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$  et donc de 2.10  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$  (soit un aptamère pour une surface d'environ 9x9  $\text{nm}^2$ ). Puis le décalage lors de l'adsorption du PEG est de 6.7 Hz ce qui représente une quantité de 13.2  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$  et donc de 34.1  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . De plus il est possible de remarquer que la dissipation augmente avec l'accroche de l'aptamère et du PEG ce qui indique que la couche formée est souple et mais plus de temps à dissiper son énergie.

Sur la **Figure 52**, j'ai reproduit avec un modèle 3D l'agencement possible entre l'aptamère en orange et le PEG en vert sur la surface. D'après les calculs de concentration surfacique il y a un aptamère tous les 9 nm et un PEG tous les 2 nm. Et il y a sur la surface 17 fois plus de molécules de PEG que d'aptamère, ce qui justifie l'utilisation du PEG pour bloquer la surface.

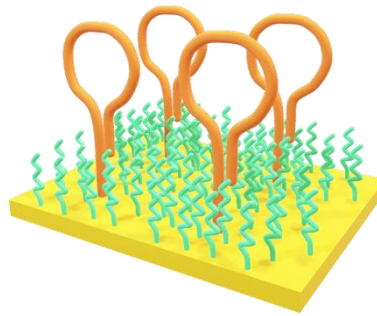


Figure 52 : schéma de la disposition supposée de l'aptamère avec l'espaceur et du PEG

e) Détection de la streptomycine

Sur les **Figure 53 a) et b)**, sont présentés les résultats QCM-D pour les différentes concentrations de streptomycine. Pour la figure 56 a) : 19 min concentration de 50  $\mu\text{M}$ , 50 min injection du tampon et pour la **Figure 53 b)** : 3 min concentration de 100 nM, 80 min concentration de 200 nM, 171 min concentration de 400 nM, 254 min concentration de 600 nM.

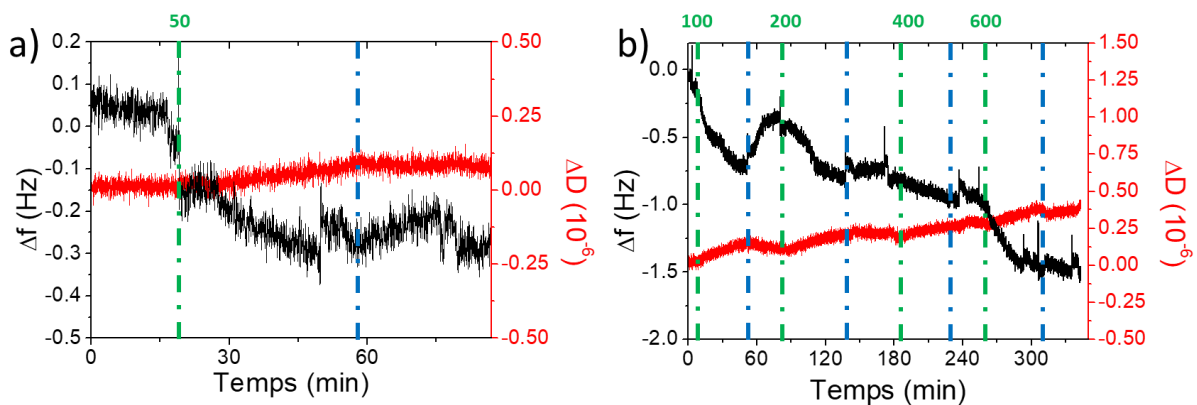
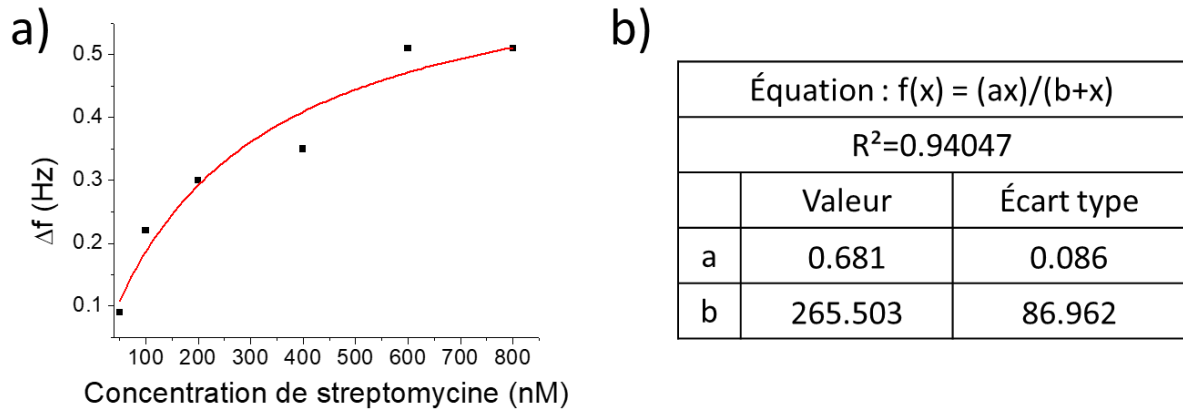


Figure 53 : Mesures QCM-D de détection de la streptomycine. Courbes noires : écart en fréquences et courbes rouge : courbes de dissipation pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de T de 5 $\mu\text{M}$  avec une biopuce QCM nanostructurées et une couche de blocage de PEG pour différentes concentrations de streptomycine. a) concentration de 50 nM et b) concentrations de 100 à 800 nM. Indiqué en pointillé vert les injections de streptomycine en nM et en bleu les injections de tampons.

Concentration de streptomycine (nM)	$\Delta f$ (Hz)	$\Delta m$ ( $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$\Delta n$ ( $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
50	0.09	0.18	0.30
100	0.22	0.43	0.74
200	0.30	0.59	1.01
400	0.35	0.69	1.18
600	0.51	1.0	1.72

Tableau 6 : décalage en fréquence mesuré pour des concentrations de streptomycine de 50 à 600 nM et conversion en taux de recouvrement massique et en molaire

Dans le **Tableau 6**, j'ai regroupé les mesures obtenues pour les différentes concentrations de streptomycine. À partir des résultats de la **Figure 51** j'ai estimé la quantité d'aptamère sur la surface à 2.1  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Pour une concentration de streptomycine de 600 nM, la quantité de streptomycine déposée sur la surface est estimée à 1.72  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ .



**Figure 54 : a) Evolution du décalage en fréquence mesuré par QCM-D en fonction de la concentration en streptomycine (points noirs : mesures expérimentales, courbe rouge : modèle de l'isotherme de Langmuir) b) tableau indiquant la formule du modèle de l'isotherme de Langmuir utilisé ainsi que les paramètres de déconvolution obtenus.**

D'après la **Figure 54**, le comportement du décalage en fréquences suit un modèle d'isotherme de Langmuir ce qui correspond à ce que l'on attendait pour ce système.

Après injection de la concentration de streptomycine de 600 nM, j'ai injecté une concentration de 800 nM mais je n'ai pas observé de décalage en fréquence supplémentaire, indiquant que les molécules de streptomycine supplémentaires n'interagissent pas avec l'aptamère et que la couche d'aptamères est saturée. En faisant le rapport des taux de recouvrements en aptamère et en streptomycine, il est possible de déterminer que 82 % des aptamères sont en interaction avec une molécule de streptomycine.

En parallèle de l'étude QCM-D, j'ai fait des mesures SERS sur les différentes biopuces QCM nanostructurées. Les mesures QCM et SERS ont été faites successivement et non simultanément.

## 2) Les mesures de SERS

Pour vérifier l'effet des nanostructures présentes sur les quartz de QCM, j'ai réalisé une étude SERS des molécules déposées à leur surface. Toutes les mesures ont été effectuées sur les échantillons après avoir réalisé les mesures en QCM-D.

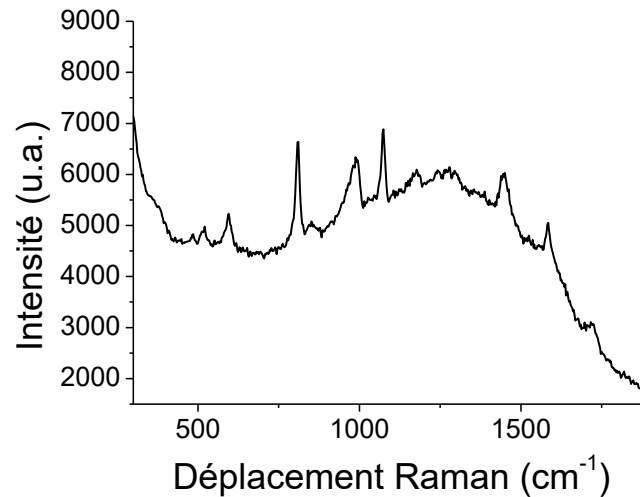
### a) Matériels et méthodes

Pour réaliser les mesures SERS j'ai utilisé deux instruments de mesures : le même appareil que pour l'étude SERS du **Chapitre 2** (Xplora, Horiba Scientifics) et un autre appareil que j'utiliserai également pour le couplage final entre le SERS et la QCM-D (**Chapitre 4**). Ce dernier appareil est un spectroscopie Raman Analyzer RXN1 microprobe (Kaiser Optical System) équipé d'une diode laser à 785 nm. Cet instrument permet de collecter des spectres sur une gamme spectrale entre 100 et 3450  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution spectrale de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Pour les mesures en SERS j'ai utilisé un objectif X 50 (ON=0.55).

Etant donné que j'ai par la suite utilisé ce deuxième instrument pour effectuer le couplage entre la QCM et le SERS, j'ai effectué une grande partie des mesures avec cet appareil dans cette partie.

### b) Mesures SERS après l'accroche de l'aptamère

Après avoir fonctionnalisé la surface des quartz avec l'aptamère (**Figure 45**) j'ai effectué des mesures SERS sur les surfaces pour voir si les nanostructures permettaient d'acquérir un signal SERS de la couche d'aptamères avec le spectroscope Raman XploRa. Ces mesures ont été prises avec un objectif X 80 (ON=0.80) pendant 30 s avec une puissance LASER de 20 mW.



**Figure 55 : Spectre SERS de l'aptamère sans espaceur (concentration de dépôt de 5  $\mu\text{M}$ ) sous excitation à 785 nm**

Sur le spectre de la **Figure 55**, il est possible de voir le spectre SERS de l'aptamère sur l'une des 9 zones nanostructurées. Ici je ne montre qu'un seul spectre car j'ai indiqué précédemment (**Chapitre 3:C**) que quelle que soit la zone nanostructurée étudiée, le signal est identique. Le spectre SERS possède plusieurs bandes assez intenses vers 800, 990, 1072 et 1447  $\text{cm}^{-1}$ . Ces bandes sont liées aux bases A, T, G et C et la bande à 1072  $\text{cm}^{-1}$  correspond à l'étirement symétrique de  $\text{PO}_2^-$  qui forme le squelette de l'ADN et relie les différentes bases entre elles.

### c) L'effet de l'ajout du PEG

Comme dit précédemment (**Chapitre 3:D**1)c)), j'ai utilisé une molécule de PEG pour bloquer la surface. J'ai déterminé l'impact de l'ajout du PEG sur le signal SERS. Pour cela j'ai utilisé le second instrument de mesure avec un objectif X50 (temps d'accumulation : 50 s) avec une puissance de 20 mW pour le LASER à 785 nm.



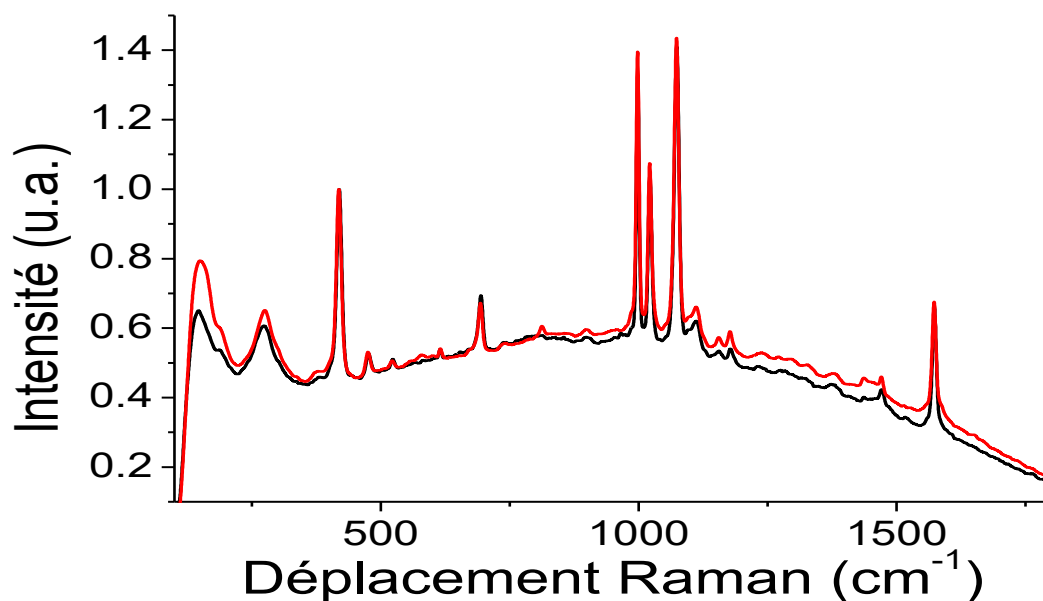
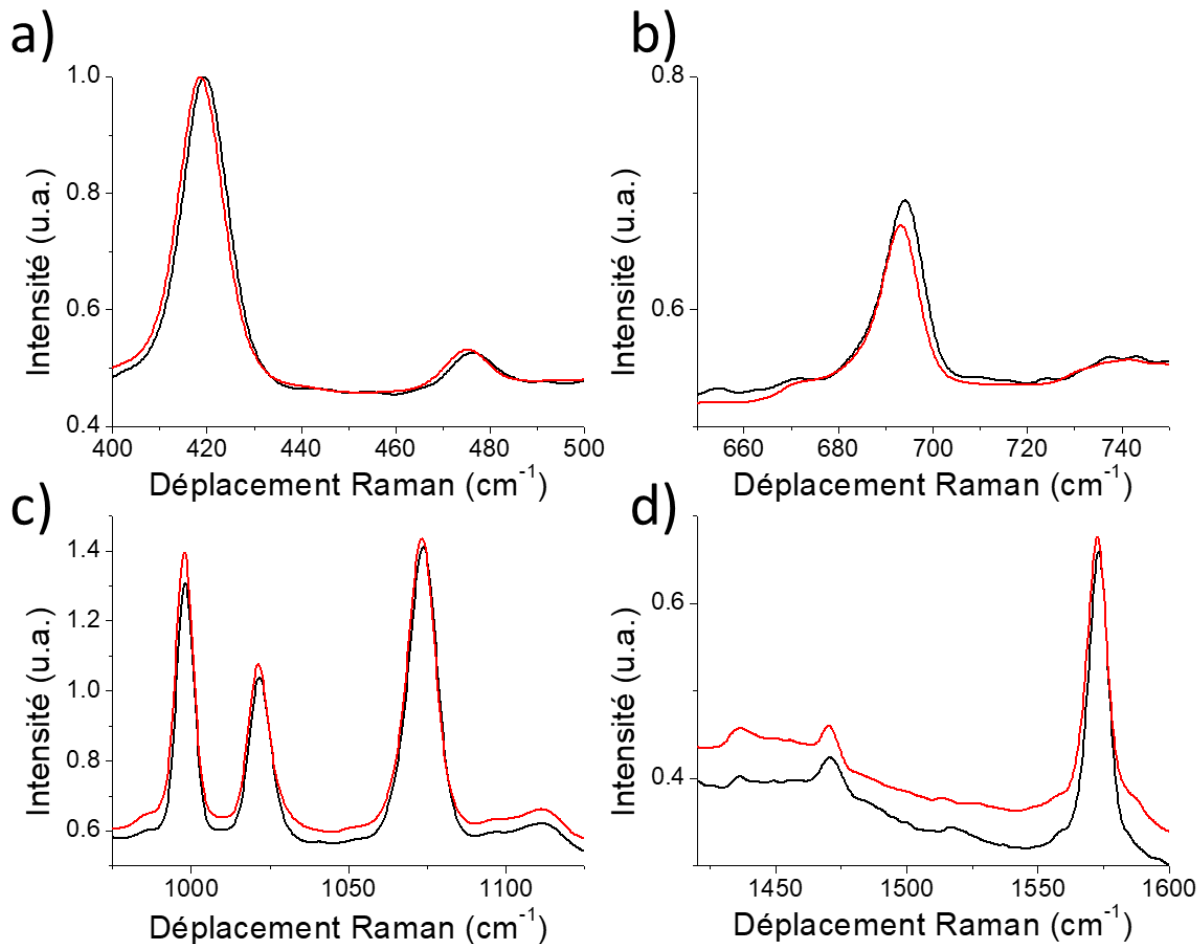


Figure 56 : Spectres SERS mesurés à 785 nm. Spectre rouge : aptamère seul, spectre noir : aptamère et PEG. Les deux mesures ont été normalisées par rapport à la bande Raman à  $418 \text{ cm}^{-1}$

Sur la **Figure 56**, je compare les spectres SERS de l'aptamère seul (spectre rouge) et de l'aptamère avec le PEG (spectre noir). Ces deux spectres ont été normalisés par rapport à la bande à  $418 \text{ cm}^{-1}$  pour pouvoir comparer le décalage potentiel des bandes après l'ajout du PEG. Sur cette figure, il est possible d'avoir une vue globale de la signature de l'aptamère coupler avec le PEG. Il est alors possible d'apercevoir que le signal SERS de l'aptamère est toujours présent et est peu changé par rapport au cas sans PEG. Pour voir le mouvement des bandes il faut faire des zooms sur les différentes gammes spectrales (**Figure 57**).

Sur la **Figure 57 a)**, il est possible de voir le décalage des bandes à  $420 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à l'étirement symétrique  $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ , et à  $470 \text{ cm}^{-1}$  le mode attribué aux bases azotées. Sur la **Figure 57 b)** on observe une bande à  $695 \text{ cm}^{-1}$  correspondant au mode de respiration des bases G. Sur la **Figure 57 c)** la bande à  $1000 \text{ cm}^{-1}$  correspond à l'étirement des C-C des cycles aromatiques, celle à  $1020 \text{ cm}^{-1}$  correspond aux amines primaires et tertiaires et celle à  $1072 \text{ cm}^{-1}$  correspond à l'étirement symétrique du groupement  $\text{PO}_2^-$ . Sur la **Figure 57 d)** la bande à  $1475 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux bases G et A et celle à  $1575 \text{ cm}^{-1}$  aux modes de respiration de A et G. Toutes ces bandes présentent des décalages vers les hautes fréquences de valeur variable après la fonctionnalisation avec le PEG vers les hautes fréquences. Par exemple la bande à  $1000 \text{ cm}^{-1}$  se décale d'environ  $0.5 \text{ cm}^{-1}$  alors que celles à  $420$  et  $1072 \text{ cm}^{-1}$  se décalent de plus de  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Ces différents décalages de bandes peuvent être dus à l'interaction entre le PEG et l'aptamère.





**Figure 57 : Spectres SERS mesurés à 785 nm. Spectre rouge : aptamère seul, spectre noir : aptamère et PEG. Les spectres ont été normalisés par rapport à la bande à 418  $\text{cm}^{-1}$ .**

Ces mesures nous ont permis de voir qu'avec la présence du PEG, le signal SERS de l'aptamère est peu modifié et garde ces principales bandes. Ceci indique que la structure de l'aptamère est très peu influencée par la présence des molécules de PEG à la surface.

#### *d) Interaction avec la streptomycine*

Après l'injection de la solution de streptomycine à 800 nM (Figure 53) je n'ai pas injecté de tampon pour pouvoir utiliser cet échantillon en SERS. Pour faire la différence entre le cas sans streptomycine et le cas avec streptomycine j'ai utilisé deux échantillons différents. Le premier échantillon provenant de la mesure présentée sur la Figure 51 où j'ai fonctionnalisé deux échantillons nanostructurés avec l'aptamère et le PEG. Puis j'ai utilisé l'un des deux échantillons pour effectuer la mesure présentée sur la Figure 53 avec les différentes concentrations de streptomycine.

Ainsi, j'ai pu étudier deux surfaces nanostructurées pour lesquelles j'avais pu déposer de l'aptamère et de la streptomycine et quantifier leur masse à la surface en utilisant les mêmes solutions d'aptamères et de PEG et les mêmes conditions expérimentales. Mon objectif était alors de déterminer l'impact de la streptomycine sur le spectre SERS de l'aptamère. Pour faire ces mesures, j'ai utilisé le deuxième instrument de mesures avec un objectif X 100 (temps d'acquisition 30 s) avec un LASER à 785 nm (puissance de 20 mW).

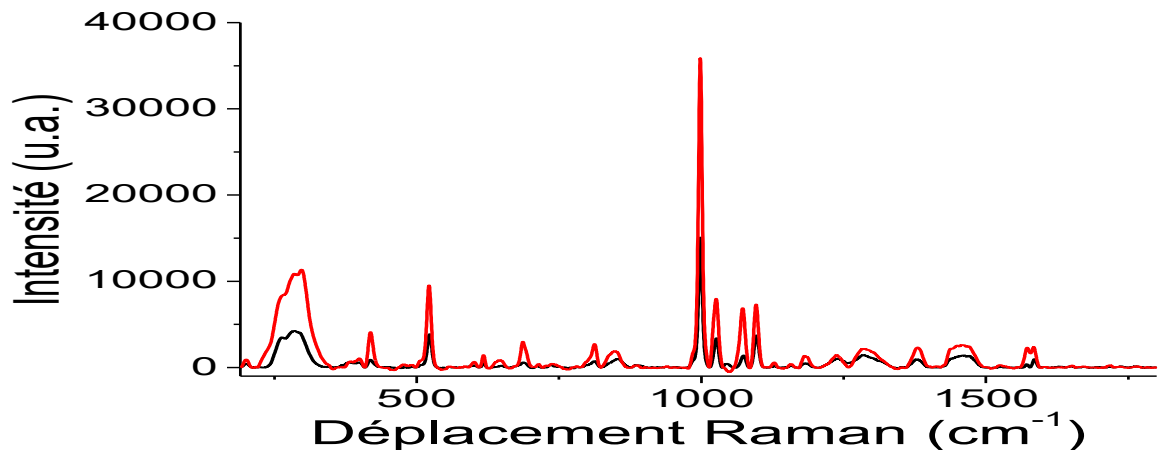


Figure 58 : Spectres SERS à 785 nm. Spectre noir : aptamère et PEG, spectre rouge : aptamère, PEG et streptomycine déposée pour une concentration de 800 nM. Les deux spectres ont été corrigés de leur ligne de base.

Sur la **Figure 58** il est possible d'observer les modifications spectrales provoquées par l'ajout de la streptomycine. La première chose que l'on peut observer est la différence d'intensité entre les deux spectres. L'interaction avec la streptomycine induit une augmentation significative de l'intensité SERS. Ceci peut être dû au changement d'orientation des aptamères après accroche de la streptomycine. Il est difficile de voir sur cette vue d'ensemble les décalages de chaque bande individuelle. C'est pour cela qu'il est nécessaire de faire des zooms sur différentes parties du spectre (**Figure 59**).

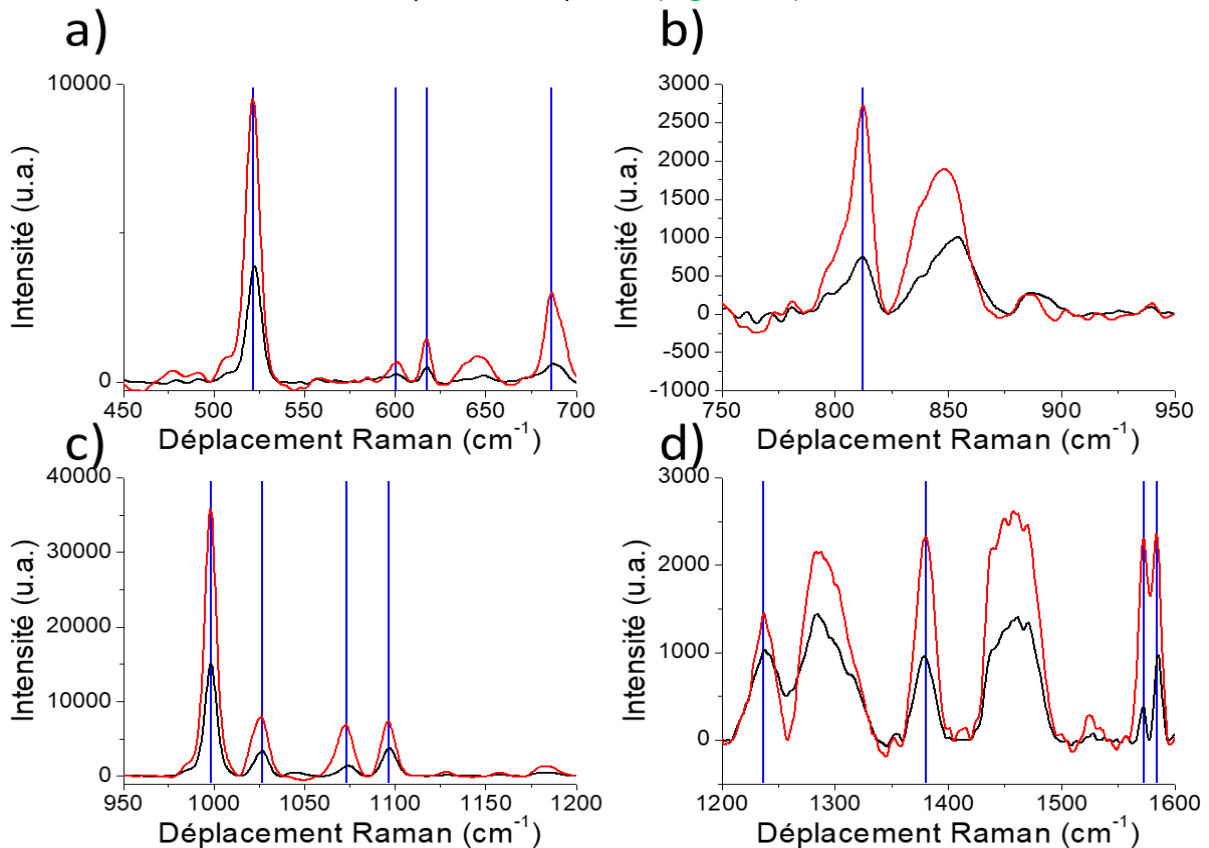


Figure 59 : Spectres SERS à 785 nm. Spectre noir : aptamère et PEG, spectre rouge : aptamère, PEG et streptomycine déposée pour une concentration de 800 nM. Les deux spectres ont été corrigés de leur ligne de base.

Sur la **Figure 59** j'ai regroupé les spectres zoomés pour les plages spectrales suivantes

: **a)** 450-700  $\text{cm}^{-1}$  **b)** 750-950  $\text{cm}^{-1}$  **c)** 950-1200  $\text{cm}^{-1}$  **d)** 1200-1600  $\text{cm}^{-1}$ . J'ai mis des traits verticaux bleus pour montrer le décalage des bandes Raman. Pour observer les déplacements des bandes j'ai acquis 10 spectres sur des zones différentes de la surface nanostructurée. J'ai alors pu calculer les positions moyennes des bandes et les écarts types pour déterminer le déplacement de chaque bande (**Tableau 7**).

Moyenne : Avec cible ( $\text{cm}^{-1}$ )	Écart type : Avec cible ( $\text{cm}^{-1}$ )	Moyenne Sans cible ( $\text{cm}^{-1}$ )	Écart type : Sans cible ( $\text{cm}^{-1}$ )	Écart entre les deux cas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Attribution
418.04	0.17	418.20	0.37	0.16	Étirement symétrique de $\text{PO}_2^-$
<b>522.54</b>	<b>0.18</b>	<b>521.43</b>	<b>0.36</b>	<b>-1.11</b>	Amine primaire
<b>602.27</b>	<b>0.75</b>	<b>601.27</b>	<b>0.46</b>	<b>-1.00</b>	Nucléotide
617.55	0.23	616.96	0.53	-0.59	Torsion des C-C des cycles aromatiques
<b>686.81</b>	<b>0.39</b>	<b>686.06</b>	<b>0.30</b>	<b>-0.75</b>	Respiration du cycle aromatique de G
812.52	0.19	812.70	0.26	0.18	Étirement des O-P-O
998.33	0.08	997.96	0.33	-0.37	Étirement des C-C aromatique
<b>1026.25</b>	<b>0.35</b>	<b>1025.31</b>	<b>0.40</b>	<b>-0.95</b>	Amine primaire et tertiaire
<b>1042.86</b>	<b>0.42</b>	<b>1039.17</b>	<b>0.32</b>	<b>-3.69</b>	Étirement symétrique de $\text{PO}_2^-$
<b>1047.15</b>	<b>0.27</b>				Étirement des C-N
<b>1073.64</b>	<b>0.17</b>	<b>1072.63</b>	<b>0.38</b>	<b>-1.01</b>	Étirement symétrique de $\text{PO}_2^-$
<b>1096.71</b>	<b>0.15</b>	<b>1096.04</b>	<b>0.26</b>	<b>-0.67</b>	$\nu$ C-N et $\text{PO}_2^-$
<b>1237.31</b>	<b>0.47</b>	<b>1236.69</b>	<b>0.53</b>	<b>-0.62</b>	Amide tertiaire
<b>1572.03</b>	<b>0.40</b>	<b>1571.43</b>	<b>0.54</b>	<b>-0.60</b>	$\text{N}_3$ des G et A
<b>1584.78</b>	<b>0.17</b>	<b>1583.93</b>	<b>0.35</b>	<b>-0.85</b>	Étirement des C-C

**Tableau 7** : récapitulatif des positions moyennes des bandes (colonnes 1 et 3) avec leur attribution (dernière colonne) avec (colonnes 1 et 2) et sans streptomycine (colonnes 3 et 4)

Dans le **Tableau 7**, j'ai regroupé la position des bandes Raman avant et après interaction avec la streptomycine ainsi que les déplacements des bandes. Dans les **colonnes 1 et 2** les mesures ont été faites sur l'échantillon avec la streptomycine. Pour les **colonnes 3 et 4** les mesures ont été faites sans streptomycine. La colonne 5 indique les déplacements dus à l'interaction entre l'aptamère et la streptomycine. Ces décalages peuvent être comparés aux écarts-types mesurés pour chaque bande (**colonnes 2 et 4 du Tableau 7**), ce qui me permet de déterminer si le décalage observé est dû à la streptomycine ou bien est simplement lié à une variation spectrale liée à la localisation. En effet comme les spectres SERS peuvent être dépendants de l'orientation de l'aptamère variable en fonction de la zone étudiée sur la surface, il peut y avoir un décalage Raman dû aux différentes orientations de l'aptamère sur les nanostructures sans impliquer une quelconque interaction avec la streptomycine. J'ai indiqué en vert les bandes pour lesquels le déplacement est supérieur à l'écart type et peut

donc être considéré comme significatif. De plus j'ai essayé d'attribuer chaque bande à un mode de vibration (dernière colonne du **Tableau 7**).

Il est possible de remarquer que la bande située à  $1047\text{ cm}^{-1}$ , indiquée en rouge dans le **Tableau 7**, disparaît lorsque l'aptamère est en présence de la streptomycine. Ceci peut être dû au fait que lors de l'interaction avec la streptomycine les liaisons C-N bougent dans une position qu'il n'est pas possible d'observer en SERS. De plus il est possible de voir que la streptomycine semble avoir un effet sur les bases A et G. En effet comme indiqué au **Chapitre 3:A)** et sur la **Figure 40 c)**, des simulations<sup>78</sup> ont mis en évidence que la streptomycine se lierait avec l'aptamère via les bases A14, G16, A17, T18 et C19. Dans cet aptamère il y a 3 A, 9 C, 8 G, 3 T (en dehors de ceux de l'espaceur). Il est donc normal que l'interaction entre la streptomycine et la guanine soit visible. Cependant, l'interaction entre la cytosine et la streptomycine n'est pas visible et elle apparaît peut-être dans une partie du spectre peu visible.

### E) Conclusion

**D**ans cette étude, j'ai pu réaliser des mesures SERS et QCM-D séparément sur le même biocapteur et donc sur les mêmes surfaces couvertes d'aptamères et de streptomycines. Ce capteur est capable non seulement de détecter la présence de streptomycine mais également de quantifier la quantité d'aptamères ou de streptomycines à la surface du biocapteur. Les mesures SERS m'ont également permis d'observer l'interaction entre l'aptamère et la streptomycine et de déterminer le site d'interaction entre les deux molécules.

De plus, j'ai pu quantifier le nombre d'aptamères et de PEG à la surface et imaginer une disposition possible sur la surface de l'échantillon.

Maintenant que j'ai eût la possibilité de démontrer l'efficacité du capteur pour chaque méthode de détection (SERS et QCM) de manière découplée, je vais coupler les deux techniques pour obtenir des mesures simultanées et ainsi faire fonctionner le capteur dans les conditions voulues.

## F) Bibliographie

69. Sanvicens N, Mannelli I, Salvador J-P, Valera E, Marco M-P. Biosensors for pharmaceuticals based on novel technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30(3):541-553. doi:10.1016/j.trac.2011.01.006
70. Huet A-C, Delahaut P, Fodey T, Haughey SA, Elliott C, Weigel S. Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010;29(11):1281-1294. doi:10.1016/j.trac.2010.07.017
71. Liu C, Lu C, Tang Z, Chen X, Wang G, Sun F. Aptamer-functionalized magnetic nanoparticles for simultaneous fluorometric determination of oxytetracycline and kanamycin. *Microchim Acta*. 2015;182(15):2567-2575. doi:10.1007/s00604-015-1628-z
72. Edder P, Cominoli A, Corvi C. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *J Chromatogr A*. 1999;830(2):345-351. doi:10.1016/S0021-9673(98)00917-0
73. Viñas P, Balsalobre N, Hernández-Córdoba M. Liquid chromatography on an amide stationary phase with post-column derivatization and fluorimetric detection for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in foods. *Talanta*. 2007;72(2):808-812. doi:10.1016/j.talanta.2006.12.006
74. Hormazábal V, Østensvik Ø. Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Milk and Meat by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2009;32(18):2756-2764. doi:10.1080/10826070903245987
75. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2002) Streptomycin. *Committee for Veterinary Medicinal Products*. 2002;809/01:1.
76. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. (470):72.
77. Van Dorst B, Mehta J, Bekaert K, et al. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;26(4):1178-1194. doi:10.1016/j.bios.2010.07.033
78. Soheili V, Taghdisi SM, Khayyat MH, Bazzaz BSF, Ramezani M, Abnous K. Colorimetric and ratiometric aggregation assay for streptomycin using gold nanoparticles and a new and highly specific aptamer. *Microchimica Acta*. 2016;5(183):1687-1697. doi:10.1007/s00604-016-1798-3
79. Gao H, Pan D, Gan N, et al. An aptamer-based colorimetric assay for chloramphenicol using a polymeric HRP-antibody conjugate for signal amplification. *Microchim Acta*. 2015;182(15):2551-2559. doi:10.1007/s00604-015-1632-3

## Chapitre 4: Détection QCM/SERS simultanée

### Table des matières

<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>86</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>86</b>
<b>TABLE DES EQUATIONS</b>	<b>87</b>
<b>A) MATERIELS ET METHODES</b>	<b>88</b>
<b>B) MESURES COUPLEES</b>	<b>90</b>
1) L'effet du LASER sur la mesure QCM	90
2) Le spectre SERS de la surface avant la fonctionnalisation	90
3) Accroche de l'aptamère	91
4) Accroche du PEG	93
5) Détection de la streptomycine	94
6) Conclusion sur le capteur couplé QCM/SERS	99
<b>C) LA LITHOGRAPHIE PAR INTERFERENCE D'UN LASER (LIL)</b>	<b>100</b>
1) Le Principe	100
2) Le protocole	100
3) Les réalisations avec le LIL	101
<b>D) CONCLUSION</b>	<b>111</b>
<b>E) BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>112</b>

## Table des figures

Figure 60 : a) cellule QCM b) cellule QCM avec une fenêtre	88
Figure 61 : a) Qsense Analyser b) Qsense Explorer	88
Figure 62 : photo du montage QCM/SERS, a) système de contrôle de l'oscillation du quartz, b) pompe péristaltique, c) support escamotable, d) module QCM à une puce QCM avec la cellule à fenêtre e) spectromètre Raman	89
Figure 63 : Influence de l'utilisation d'un LASER sur la mesure QCM	90
Figure 64 : spectre SERS de la surface avant fonctionnalisation	91
Figure 65 : Mesure QCM-D. Courbe noire : écart en fréquences et courbe rouge : courbe de dissipation pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de 5 $\mu\text{M}$	91
Figure 66 : a) Spectres SERS mesurés lors de l'accroche des aptamères. Spectre noir : spectre mesuré après 27 mn et spectre rouge : spectre mesuré après 83 mn b) Evolution de l'intensité SERS au cours de l'accroche de l'aptamère (Courbe et points verts : bande à 1021 $\text{cm}^{-1}$ , Courbe et points bleus : bande à 997 $\text{cm}^{-1}$ ). Les points correspondent aux données expérimentales alors que les courbes en pointillés représentent les déconvolutions des données expérimentales par un modèle de Langmuir	92
Figure 67 : Mesure QCM-D. Courbe noire : écart en fréquences, courbe rouge : courbe de dissipation pour l'harmonique 9 pour une concentration de PEG de 50 $\mu\text{M}$	93
Figure 68: a) Spectres SERS mesurés lors de l'accroche des aptamères. Spectre noir : spectre mesuré après 27 mn et spectre rouge : spectre mesuré après 83 mn b) Evolution de l'intensité SERS au cours de l'accroche de l'aptamère (Courbe et points verts : bande à 1021 $\text{cm}^{-1}$ , Courbe et points bleus : bande à 997 $\text{cm}^{-1}$ ). Les points correspondent aux données expérimentales alors que les courbes en pointillés représentent les déconvolutions des données expérimentales par une droite	93
Figure 69 : Mesures QCM-D. Courbe noire : écart en fréquences, courbe rouge : courbe de dissipation pour l'harmonique 5 pour plusieurs concentrations de streptomycine de 50 à 1000 nM. a) 0 à 150 min, b) 130 à 300 min, c) 300 à 470 min et d) 450 à 580 min	94
Figure 70 : a) Evolution du décalage en fréquences pour différentes concentrations de streptomycine de 50 à 1000 nM). Points noirs : données expérimentales, courbe rouge pointillée : déconvolution des données expérimentales calculée à partir d'une isotherme de Langmuir b) le tableau avec les paramètres de la déconvolution.	95
Figure 71 : Positions des bandes SERS situées à 419 $\text{cm}^{-1}$ (a), 998 $\text{cm}^{-1}$ (b), 1021 $\text{cm}^{-1}$ (c), 1047 $\text{cm}^{-1}$ (d), 1074 $\text{cm}^{-1}$ (e) et 1573 $\text{cm}^{-1}$ (f). Les symboles blancs correspondent aux intensités mesurées aux injections de tampon, les noires à l'injection de 50nM de streptomycine, les rouges à l'injection de 100 nM de streptomycine, les verts à l'injection de 200nM de streptomycine, les bleus foncés à l'injection de 400 nM de streptomycine, les bleus clairs à l'injection de 600 nM de streptomycine, les roses à l'injection de 800 nM de streptomycine et les violets à l'injection de 1000 nM de streptomycine.	96
Figure 72 : Largeurs à mi-hauteur des bandes SERS situées à 419 $\text{cm}^{-1}$ (a), 998 $\text{cm}^{-1}$ (b), 1021 $\text{cm}^{-1}$ (c), 1047 $\text{cm}^{-1}$ (d), 1074 $\text{cm}^{-1}$ (e) et 1573 $\text{cm}^{-1}$ (f). Les symboles blancs correspondent aux largeurs mesurées aux injections de tampon, les noires à l'injection de 50 nM de streptomycine, les rouges à l'injection de 100 nM de streptomycine, les verts à l'injection de 200 nM de streptomycine, les bleus foncés à l'injection de 400 nM de streptomycine, les bleus clairs à l'injection de 600nM de streptomycine, les roses à	



l'injection de 800 nM de streptomycine et les violets à l'injection de 1000 nM de streptomycine. 97

Figure 73 : a) Evolution de (a) la position et (b) de la largeur à mi-hauteur de la bande à  $1320\text{cm}^{-1}$  pour différentes concentrations de streptomycine. Les symboles bleus clairs correspondent aux mesures effectuées à l'injection de 600nM de streptomycine, les roses à l'injection de 800 nM de streptomycine et les violets à l'injection de 1000 nM de streptomycine. 98

Figure 74 : Evolution de l'intensité des bandes SERS (points noirs :  $419\text{ cm}^{-1}$ , points rouges :  $998\text{ cm}^{-1}$ , points bleus :  $1021\text{ cm}^{-1}$ , points verts :  $1047\text{ cm}^{-1}$ , points roses :  $1074\text{ cm}^{-1}$ , points oranges :  $1320\text{ cm}^{-1}$  et points gris :  $1573\text{ cm}^{-1}$ ). Indiqué en pointillé vert les injections de streptomycine en nM et en bleu les injections de tampons. a) toutes les bandes non normalisées b) Toutes les bandes sont normalisées par rapport à leurs valeurs à  $t=0\text{ min}$ , la bande à  $1320\text{ cm}^{-1}$  a été enlevée 98

Figure 75 : Schéma d'une interférence à deux faisceaux 100

### Table des Tableaux

Tableau 8 : Valeurs des coefficients obtenus après déconvolution des données expérimentales par une fonction isotherme de Langmuir Figure 66b) 92

### Table des équations

Équation 9 : espacement interfrange.....100

Dans les chapitres précédents j'ai présenté les différentes parties du capteur indépendamment les uns des autres et montré leurs performances individuelles. En mettant en commun les résultats des **Chapitre 2:** et **Chapitre 3:** j'ai pu mettre en place une stratégie pour coupler les deux méthodes de mesures : QCM et SERS, et me permettre de faire les deux mesures simultanément.

### A) Matériels et méthodes

Pour coupler les deux méthodes il est nécessaire de pouvoir effectuer les deux mesures en simultanée. Pour effectuer le couplage il est donc nécessaire d'adapter les méthodes de caractérisations pour pouvoir acquiesionner les deux mesures en même temps.



Figure 60 : a) cellule QCM b) cellule QCM avec une fenêtre

Sur la **Figure 60** j'ai regroupé les deux types de cellules qu'il est possible d'utiliser pour faire des mesures QCM. En **a)**, il est possible de voir une cellule sans ouverture qui est un problème pour le couplage car il n'est pas possible de faire des mesures SERS et QCM en simultanée. Pour résoudre ce problème il est possible d'utiliser la cellule **b)** qui a une fenêtre de quartz sur le dessus. Cette ouverture permet de laisser passer de la lumière pour permettre des réactions photoinduites. Dans mon cas, je vais utiliser cette ouverture pour focaliser un LASER sur la surface nanostructurée et effectuer des mesures SERS. Cette cellule a une distance de travail de 3.3 mm. Cette distance de travail est grande et nous empêche d'utiliser un objectif à fort grossissement (X100 par exemple) ayant une distance de travail plus courte. Je vais donc utiliser un objectif X50 (ON = 0.55).

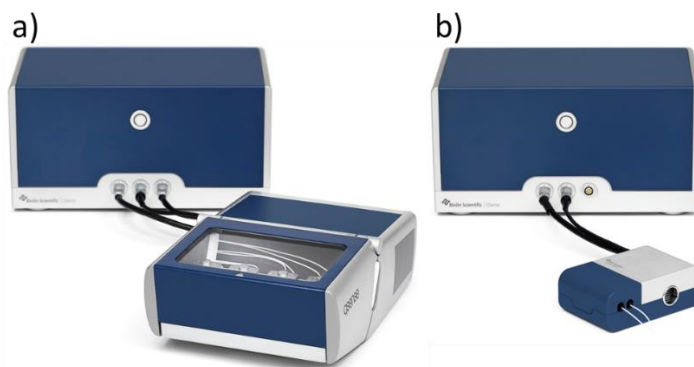


Figure 61 : a) Qsense Analyser b) Qsense Explorer

Dans le **Chapitre 3:B)2)**, j'ai présenté les différents instruments disponibles pour faire des mesures de QCM. J'ai notamment présenté le Qsense Analyser (**Figure 61 a)** qui permet de faire 4 mesures sur 4 quartz en simultanées. Cet instrument possède un couvercle encombrant et est assez encombrant donc j'ai changé d'instrument pour un plus petit le Qsense Explorer (**Figure 61 b)**. Ce nouvel instrument est beaucoup plus petit et il est possible

d'enlever le petit couvercle qui est dessus et ainsi cela permet de pouvoir installer l'instrument sous le spectromètre Raman.

De plus, pour faire un suivi en temps réel du signal SERS simultanément à la mesure QCM, il est préférable de ne pas modifier la zone d'étude en SERS sur le quartz de QCM. J'ai donc focalisé le LASER sur une des zones nanostructurées et fait les mesures SERS sur le même point durant toute la durée de l'expérience. C'est une raison supplémentaire pour utiliser le Qsense Explorer.

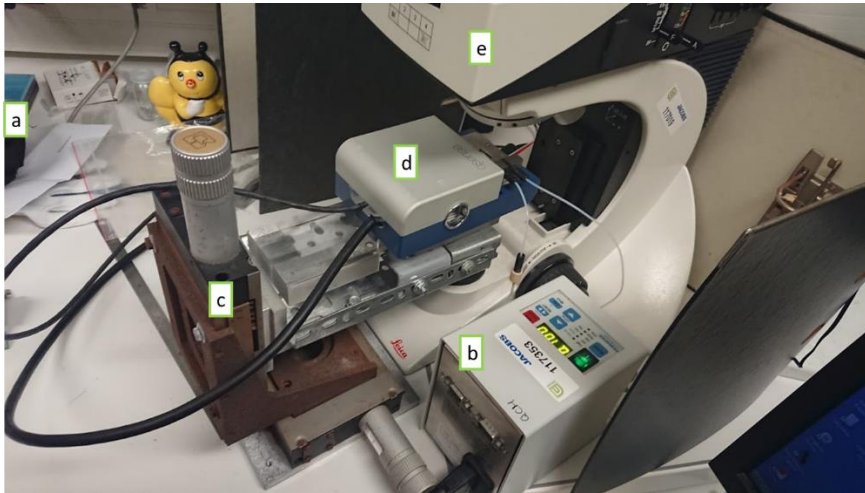


Figure 62 : photo du montage QCM/SERS, a) système de contrôle de l'oscillation du quartz, b) pompe péristaltique, c) support escamotable, d) module QCM à une puce QCM avec la cellule à fenêtre e) spectromètre Raman

Sur la **Figure 62**, il est possible de voir une photo du montage expérimental utilisé pour réaliser le couplage. L'instrument en **a**) est celui qui contrôle l'oscillation du quartz. En **b**) il est possible de voir la pompe péristaltique qui nous permet d'injecter les solutions avec un débit constant de  $40 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Le module QCM avec une cellule à fenêtre (**d**) est disposé sur un support escamotable (**c**) permettant son positionnement précis sous le microscope du spectromètre Raman (**e**) équipé d'un LASER à 785 nm. Pour que les mesures puissent se faire en même temps j'ai enlevé le support du spectromètre Raman pour insérer le module QCM sur le support escamotable. Ce support me permet de déplacer le module dans les trois dimensions de l'espace et ainsi de focaliser le laser sur la surface nanostructurée. J'ai fixé le module une fois les réglages optiques effectués pour qu'il ne puisse pas dériver dans le temps. De plus le support escamotable est assez lourd pour empêcher tout mouvement intempestif pendant les mesures.

Après avoir fixé le module QCM au support sous le spectromètre, j'utilise le microscope optique pour pouvoir trouver la zone nanostructurée. Une fois le laser focalisé sur cette zone je mets en place le protocole de la QCM décrit au chapitre précédent.

## B) Mesures couplées

Comme dit précédemment, j'ai effectué les mesures QCM et SERS en simultanée ce qui implique que j'ai illuminé la surface du quartz QCM avec un LASER de manière ponctuelle. L'un des premiers phénomènes que j'ai étudiés est l'effet de l'illumination des nanostructures par un LASER sur le signal QCM

### 1) L'effet du LASER sur la mesure QCM

Pour voir cet effet, j'ai illuminé la surface pendant la stabilisation du quartz dans la solution tampon.

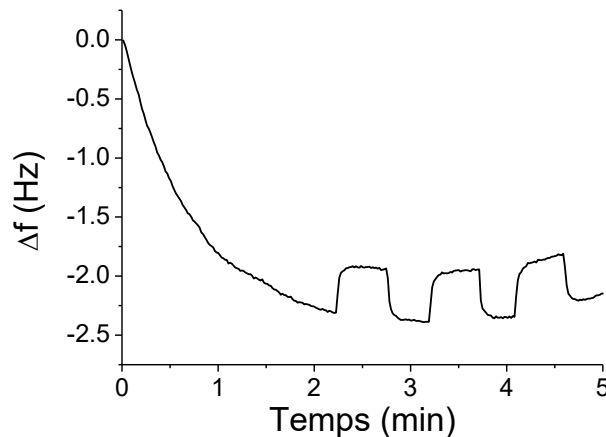


Figure 63 : Influence de l'utilisation d'un LASER sur la mesure QCM

Sur la **Figure 63**, j'ai effectué 3 mesures SERS de 30 s avec le LASER à 785 nm pour une puissance de 10 mW. Lorsque j'illumine la surface avec le LASER je chauffe localement la surface du quartz. Or, la mesure QCM est très sensible au changement de températures d'où l'apparition de décalages en fréquence sous illumination laser. Il est possible de remarquer que malgré le décalage dû au laser, la mesure QCM n'est pas modifiée et revient à son niveau précédent l'illumination. Il est donc possible d'utiliser ses décalages comme repère temporel pour relier le spectre Raman aux mesures temporelles QCM.

J'ai donc gardé sur mes mesures QCM les décalages provoqués par l'illumination du LASER pour déterminer précisément les périodes où les spectres SERS ont été acquis.

### 2) Le spectre SERS de la surface avant la fonctionnalisation

Avant de fonctionnaliser la surface des quartz, j'ai effectué un spectre SERS de la surface car pour cette mesure j'ai utilisé un quartz déjà utilisé plusieurs fois et que j'ai nettoyé grâce au protocole établi à la section **Chapitre 3:B)3**. J'ai illuminé la surface avec un LASER 785 nm pendant 5s avec une puissance de 20 mW et avec un objectif X 50.

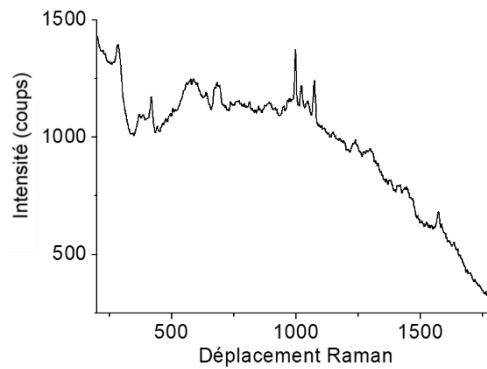


Figure 64 : spectre SERS de la surface avant fonctionnalisation

Grâce à la mesure SERS (Figure 64) sur la surface avant fonctionnalisation, j'ai pu observer la présence d'aptamères à la surface des quartz. En effet, après plusieurs lavages, tous les aptamères ne sont pas éliminés et certains résistent au processus. J'ai dû utiliser cet échantillon car c'était le dernier échantillon qui me restait. Mais cela ne m'a pas empêché de poursuivre les mesures et de déterminer la pertinence du couplage.

En effet, il est possible de comparer les résultats suivants avec le cas des mesures séparées présentées au Chapitre 3. Ce quartz nanostructuré a donc été utilisé pour la suite de mon étude et a été fonctionnalisé avec l'aptamère puis le PEG.

### 3) Accroche de l'aptamère

J'ai tout d'abord fait une injection d'aptamère avec une concentration de 5  $\mu\text{M}$  et un flux de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Durant toutes les mesures de cette expérience j'ai utilisé un tampon adapté à l'aptamère qui est constitué de 5 mM  $\text{MgCl}_2$  + 0.1 M  $\text{NaCl}$  + 20 mM  $\text{TrisHCl}$ .

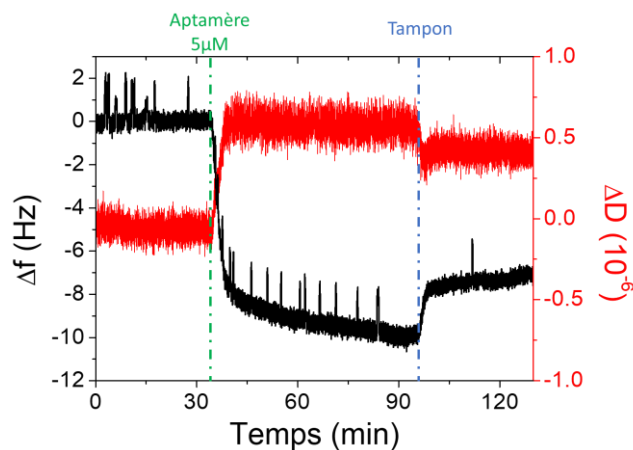


Figure 65 : Mesure QCM-D. Courbe noire : écart en fréquences et courbe rouge : courbe de dissipation pour l'harmonique 9 pour une concentration d'aptamère avec espaceur de 5  $\mu\text{M}$

Sur la Figure 65, il est possible d'observer les différents moments où j'ai effectué des mesures SERS mais cela ne modifie pas l'étude de la cinétique d'accroche. J'ai injecté à 30 min l'aptamère avec un espaceur avec une concentration de 5  $\mu\text{M}$  puis j'ai injecté une solution tampon à 90 min. La fréquence se décale de 7.1 Hz suite à l'accroche de l'aptamère. A partir de ce décalage il est possible de déterminer la quantité d'aptamères à la surface, soit un recouvrement de 14  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$  ce qui donne 1.22  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Dans le Chapitre 3:D)1)d), le déplacement de fréquence était de 12 Hz ce qui représente une quantité de 23.6  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$  et donc de 2.10  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Donc lors de cette mesure il y avait deux fois plus d'aptamères qui s'était accrochés à la surface que dans la mesure de la Figure 65.

J'ai mesuré plusieurs spectres SERS à différents temps d'acquisition : 27, 35, 37, 39, 40, 46, 50, 55, 60, 66, 71, 77 et 83 min.

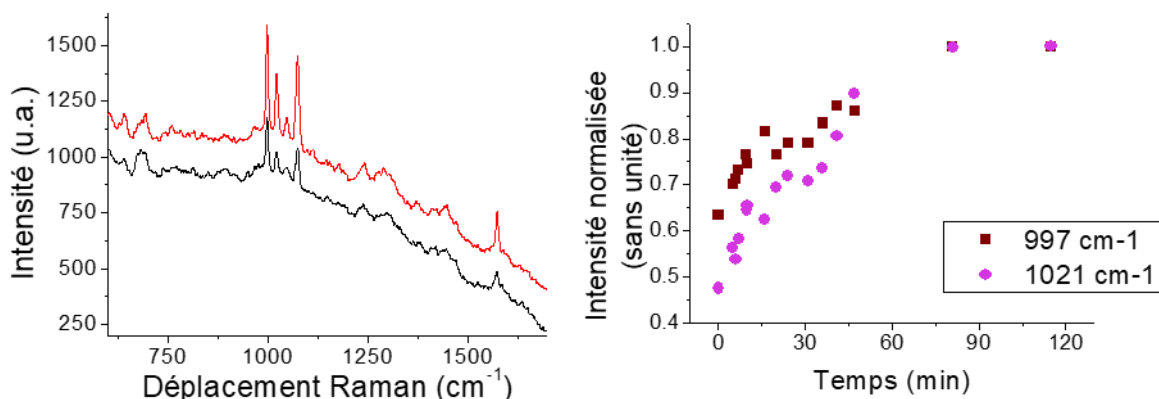


Figure 66 : a) Spectres SERS mesurés lors de l'accroche des aptamères. Spectre noir : spectre mesuré après 27 mn et spectre rouge : spectre mesuré après 83 mn b) Evolution de l'intensité SERS au cours de l'accroche de l'aptamère (points roses : bande à 1021 cm<sup>-1</sup>, points marrons : bande à 997 cm<sup>-1</sup>). Les points correspondent aux données expérimentales alors que les courbes en pointillés représentent les déconvolutions des données expérimentales par un modèle de Langmuir

Équation : $f(x) = (a*x)/(b+x)+c$				
Bande (cm <sup>-1</sup> )	Coefficient	Valeur	Écart type	Coefficient de détermination
997	a	3272	2435	0.899
	b	1947	198	
	c	2160	53	
1021	a	2121	919	0.929
	b	132	87	
	c	849	39	

Tableau 8 : Valeurs des coefficients obtenus après déconvolution des données expérimentales par une fonction isotherme de Langmuir Figure 66b)

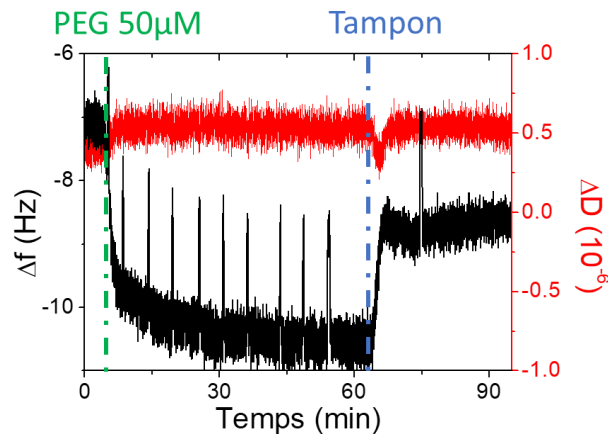
Sur la Figure 66, j'ai présenté en a) le spectre initial à t=27 min (spectre noir) et le final à t=83 min (spectre rouge) de la mesure QCM. Sur la figure 6 b), il est possible de voir l'évolution de l'intensité SERS de deux bandes Raman (997 et 1021 cm<sup>-1</sup>) au cours du temps.

J'ai déconvolué ces données à partir d'un modèle d'isotherme de Langmuir avec une constante, Tableau 8. J'ai ajouté une constante au modèle de l'isotherme de Langmuir car avant l'injection d'aptamère il y avait déjà de l'aptamère à la surface. L'isotherme de Langmuir décrit bien l'adsorption d'une molécule. Il est possible de voir que l'intensité des deux bandes Raman suit des évolutions similaires, Tableau 8. L'intensité des bandes Raman de l'aptamère augmente avec le temps à la suite de l'accroche progressive de l'aptamère sur la surface.

Le rapport des intensités des bandes à 998, 1021 et 1073 cm<sup>-1</sup> pour le spectre enregistré à 83 min et à 27 min est de 2. Ce rapport peut être rapproché de celui obtenu en QCM entre la quantité d'aptamères accrochés à la surface entre la mesure Chapitre 3:D)1)d) et en Chapitre 4:B)3). Ceci me permet d'associer les résultats du cas où les mesures ont été faites en séparément dans le Chapitre 3:D)1)d) et le cas où les mesures ont été faites en simultanée, Chapitre 4:B)3).

#### 4) Accroche du PEG

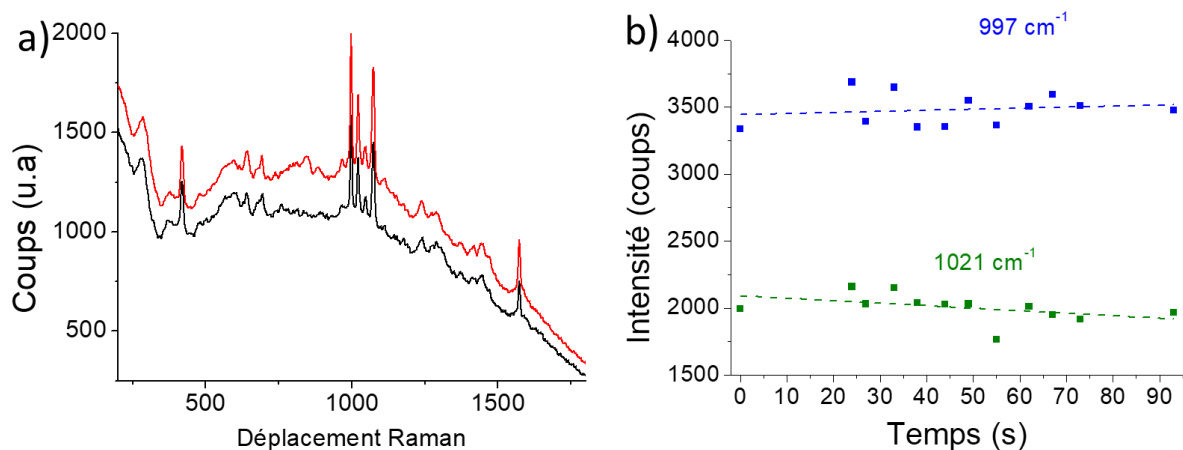
Par la suite, j'ai injecté la solution de PEG avec une concentration de 50  $\mu\text{M}$  et un flux de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  (temps = 5 min **sur la Figure 67**) puis j'ai injecté la solution tampon à partir de 65 min



**Figure 67 : Mesure QCM-D. Courbe noire : écart en fréquences, courbe rouge : courbe de dissipation pour l'harmonique 9 pour une concentration de PEG de 50 $\mu\text{M}$**

Le décalage en fréquence est alors de 1.59 Hz, ce qui correspond à 3.1  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$  soit 8.1  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Dans le **Chapitre 3:D)1)d)**, le déplacement de fréquence était de 12 Hz ce qui représente une quantité de 13.2  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$  et donc de 34.1  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Donc durant cette mesure il y avait quatre fois plus de molécules de PEG qui s'étaient accrochées à la surface que pour la mesure présentée sur la **Figure 67**. Comme le PEG n'apparaît pas dans le spectre SERS il n'est pas possible de dire s'il y avait déjà du PEG au début de cette mesure.

J'ai mesuré plusieurs spectres SERS à différents temps d'acquisition : 24, 27, 33, 38, 44, 49, 55, 62, 67, 73 et 93 min.



**Figure 68 : a) Spectres SERS mesurés lors de l'accroche des aptamères. Spectre noir : spectre mesuré après 27 mn et spectre rouge : spectre mesuré après 83 mn b) Evolution de l'intensité SERS au cours de l'accroche de l'aptamère (Courbe et points verts : bande à 1021  $\text{cm}^{-1}$ , Courbe et points bleus : bande à 997  $\text{cm}^{-1}$ ). Les points correspondent aux données expérimentales alors que les courbes en pointillés représentent les déconvolutions des données expérimentales par une droite**

Sur la **Figure 68**, j'ai présenté en **a)** le spectre initial à  $t=24$  min (spectre noir) et final à  $t=93$  min (spectre rouge) de la mesure QCM. Sur la **Figure 68 b)**, il est possible de voir l'évolution de l'intensité SERS de deux bandes Raman de l'aptamère (997 et 1021  $\text{cm}^{-1}$ ) au

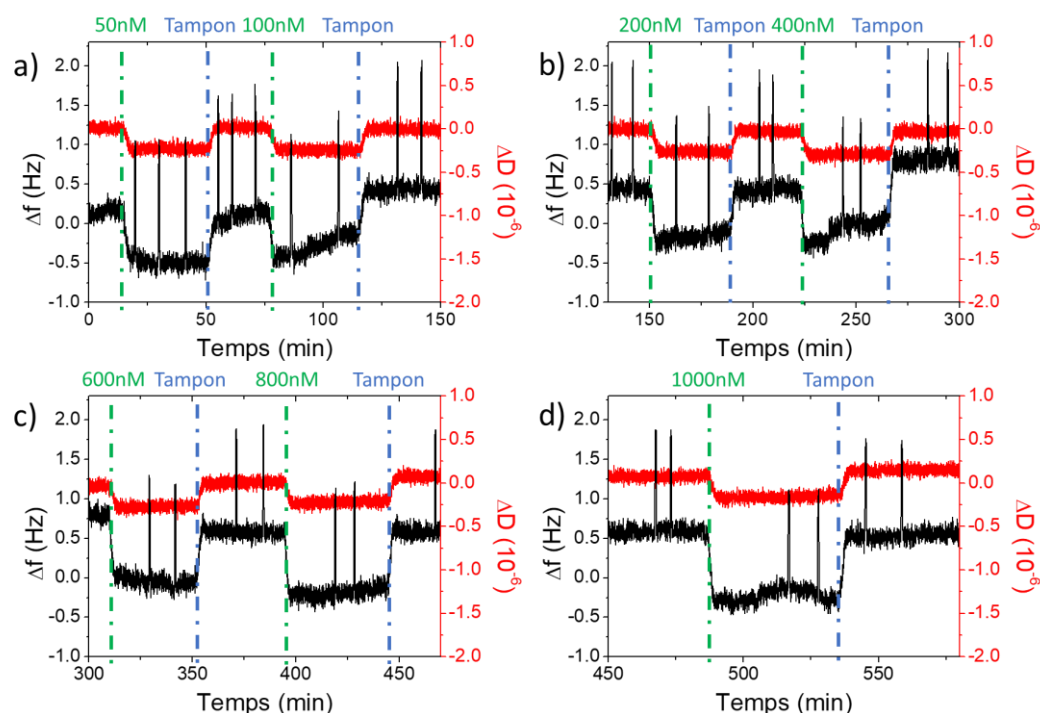


cours du temps. L'intensité de ces bandes est constante avec le temps, ce qui signifie que le PEG ne modifie pas la couche d'aptamères et qu'il n'y a pas d'échange entre l'aptamère et le PEG.

Pour continuer l'expérience j'ai laissé la puce de quartz incubée dans la cellule pendant toute une nuit et j'ai ainsi gardé la puce dans le tampon pour pouvoir continuer les mesures sans changer le milieu et l'organisation du biocapteur.

### 5) Détection de la streptomycine

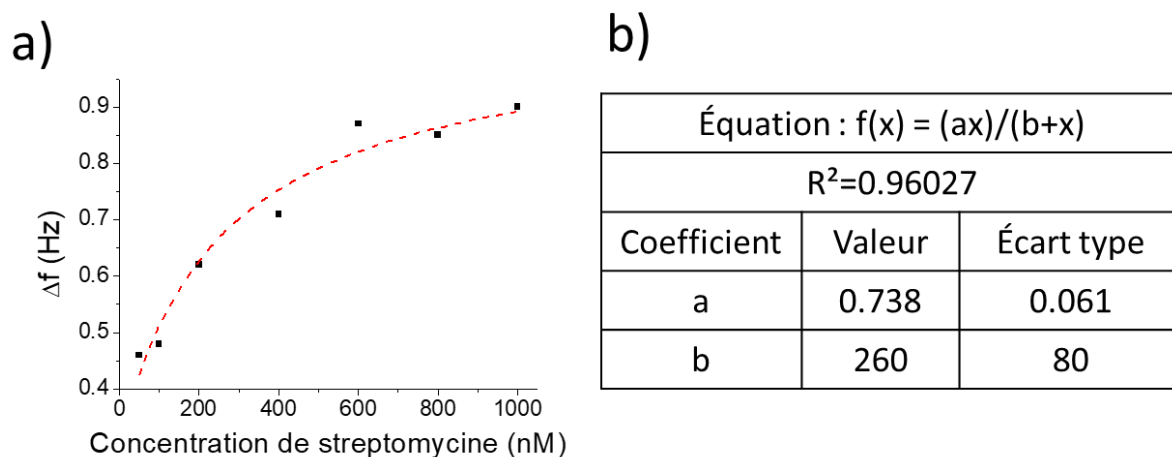
J'ai injecté plusieurs concentrations de streptomycine allant de 50 à 1000 nM.



**Figure 69 : Mesures QCM-D. Courbe noire : écart en fréquences, courbe rouge : courbe de dissipation pour l'harmonique 5 pour plusieurs concentrations de streptomycine de 50 à 1000 nM. a) 0 à 150 min, b) 130 à 300 min, c) 300 à 470 min et d) 450 à 580 min**

Sur la **Figure 69**, j'ai découpé la mesure QCM en quatre parties pour qu'elle soit plus visible et que l'on puisse voir les différentes injections. J'ai injecté plusieurs concentrations de streptomycine suivies à chaque fois d'une injection de tampon. J'ai injecté la streptomycine à 50 nM à 9 min, puis à 100 nM à 71 min, puis à 200 nM à 145 min, puis 400 nM à 220 min, puis 600 nM à 304 min, puis à 800 nM à 387 min et à 1000 nM à 481 min. Après le lavage avec le tampon, l'écart en fréquence diminue pour rejoindre le niveau initial. J'ai donc mesuré le déplacement en fréquence avant l'injection du tampon, soit environ 45 min après chaque injection de streptomycine. Lorsque l'on regarde la courbe de dissipation, il est possible d'observer que la dissipation baisse lorsque l'on ajoute la streptomycine et remonte lors du lavage. Ceci peut s'expliquer par le fait que lorsque la streptomycine interagit avec l'aptamère en changeant sa conformation. La couche à la surface ainsi formée se rigidifie d'où la diminution de la dissipation.





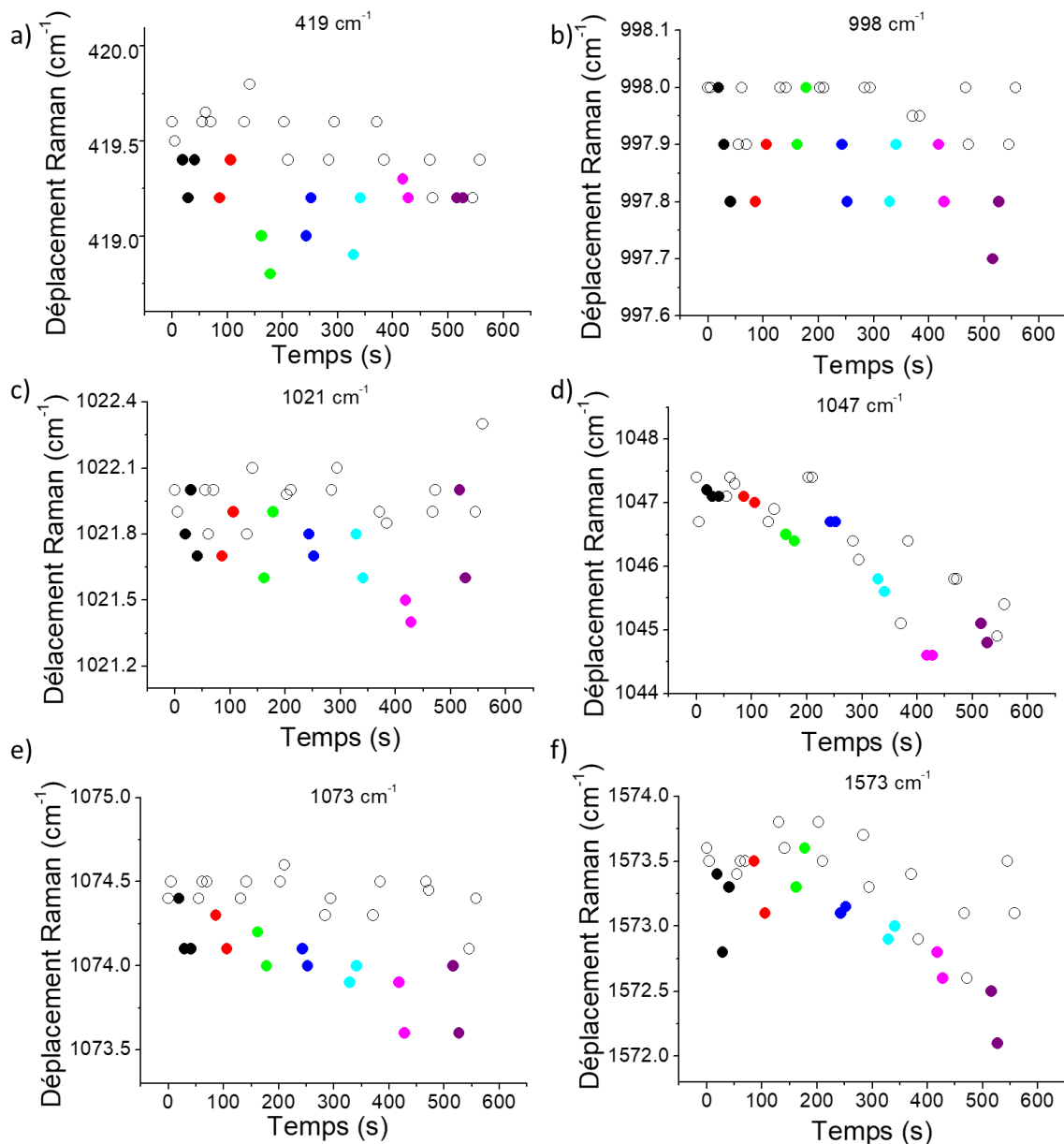
**Figure 70 :** a) Evolution du décalage en fréquences pour différentes concentrations de streptomycine de 50 à 1000 nM). Points noirs : données expérimentales, courbe rouge pointillée : déconvolution des données expérimentales calculée à partir d'une isotherme de Langmuir b) le tableau avec les paramètres de la déconvolution.

Sur la **Figure 70**, il est possible de voir que le décalage en fréquence atteint un palier à partir de la concentration de 600nM. D'après le modèle de Langmuir il est possible de calculer la constante de dissociation,  $k_d=260$  nM qui est proche de la constante de dissociation de 132.3 nM obtenue dans (<sup>78</sup>). La différence vient du fait que dans mon cas l'aptamère est attaché sur une surface et est entouré de molécules de PEG alors que dans l'article (<sup>78</sup>) l'aptamère est accroché sur des nanoparticules d'or.

En parallèle des mesures QCM, j'ai également effectué des mesures SERS. Pour réaliser ces mesures j'ai utilisé un objectif X50 (5s d'accumulation) avec une puissance de 20 mW. Je me suis alors focalisé sur trois données tirées des spectres SERS : (i) la position des bandes Raman principales, (ii) leur largeur à mi-hauteur et (iii) l'évolution temporelle de leur intensité.

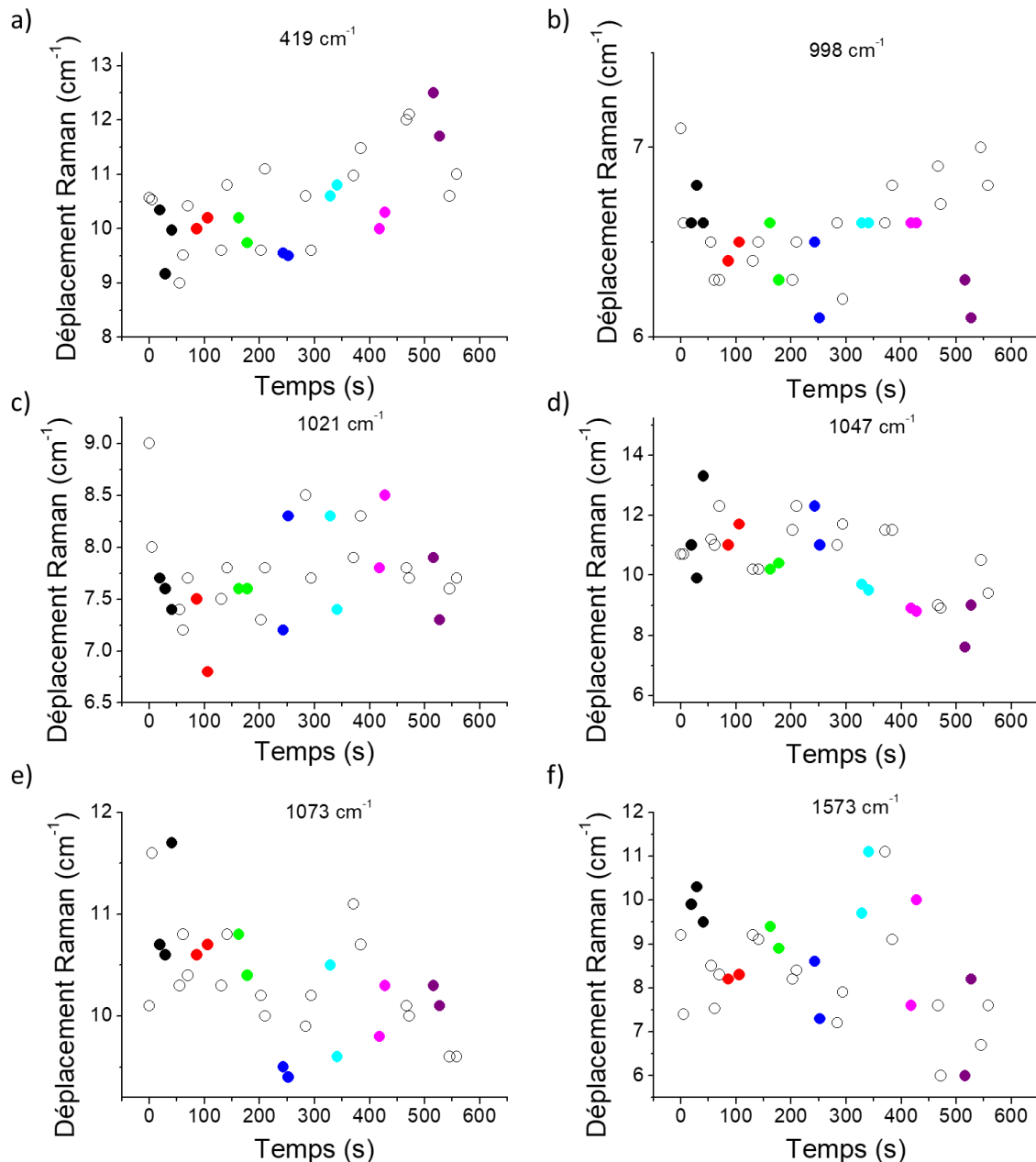
Sur la **Figure 71**, j'ai regroupé les positions des bandes Raman qui se décalent suite à l'ajout de streptomycine : la bande à  $419\text{ cm}^{-1}$  qui correspond au  $PO_4^{3-}$  qui relie les bases dans l'aptamère (**Figure 71 a**), la bande à  $998\text{ cm}^{-1}$  correspondant à l'étirement de liaison C-C dans les cycles aromatiques (**Figure 71 b**), la bande à  $1021\text{ cm}^{-1}$  qui correspond aux amines (**Figure 71 c**), la bande à  $1047\text{ cm}^{-1}$  qui correspond à l'étirement  $\nu_3$  symétrique des  $PO_4^{3-}$  (**Figure 71 d**), la bande à  $1074\text{ cm}^{-1}$  qui correspond à l'étirement symétrique des  $PO_2^-$  (**Figure 71 e**) et la bande à  $1573\text{ cm}^{-1}$  qui correspond aux  $N_3$  des G et A (**Figure 71 f**).

Il est possible d'observer que lorsque l'on ajoute de la streptomycine à différentes concentrations la position des bandes Raman va être décalée vers les basses fréquences alors que lors de l'injection du tampon, la position se redécalle vers les hautes fréquences pour se rapprocher de sa position initiale. Pour les trois premières bandes (**Figure 71 a à c**), la position est pratiquement constante avec la concentration. Par contre, pour les trois dernières (**Figure 71 d à f**), une tendance peut être remarquée. Plus la concentration de streptomycine est grande plus le décalage spectral est important. Il est possible d'expliquer ce phénomène par une augmentation des interactions entre l'aptamère et la streptomycine avec la concentration induisant par conséquent une plus grande modification de la structure de l'aptamère observable en SERS.



**Figure 71 :** Positions des bandes SERS situées à 419  $\text{cm}^{-1}$  (a), 998  $\text{cm}^{-1}$  (b), 1021  $\text{cm}^{-1}$  (c), 1047  $\text{cm}^{-1}$  (d), 1073  $\text{cm}^{-1}$  (e) et 1573  $\text{cm}^{-1}$  (f). Les symboles blancs correspondent aux intensités mesurées aux injections de tampon, les noires à l'injection de 50 nM de streptomycine, les rouges à l'injection de 100 nM de streptomycine, les verts à l'injection de 200 nM de streptomycine, les bleus foncés à l'injection de 400 nM de streptomycine, les bleus clairs à l'injection de 600 nM de streptomycine, les roses à l'injection de 800 nM de streptomycine et les violets à l'injection de 1000 nM de streptomycine.

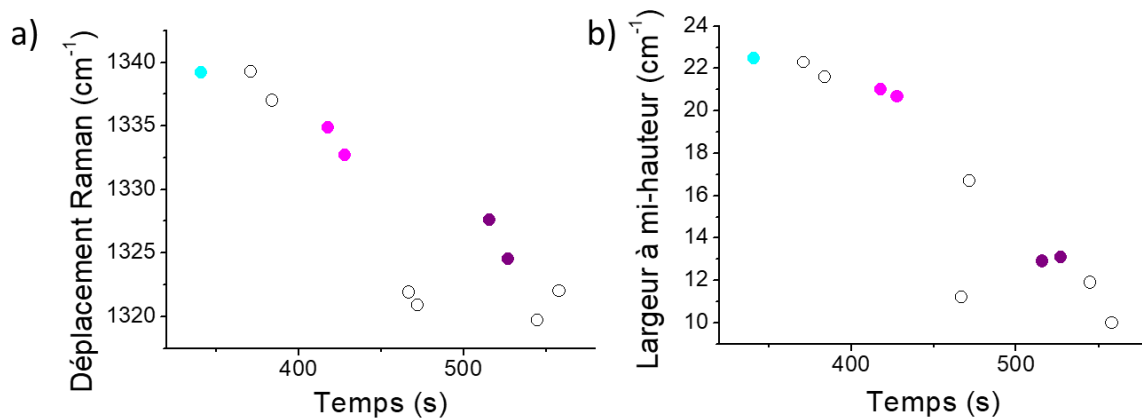
Je me suis ensuite intéressé à l'impact de la concentration sur la largeur à mi-hauteur des bandes (**Figure 72**).



**Figure 72** : Largeurs à mi-hauteur des bandes SERS situées à 419 cm<sup>-1</sup> (a), 998 cm<sup>-1</sup> (b), 1021 cm<sup>-1</sup> (c), 1047 cm<sup>-1</sup> (d), 1073 cm<sup>-1</sup> (e) et 1573 cm<sup>-1</sup> (f). Les symboles blancs correspondent aux largeurs mesurées aux injections de tampon, les noires à l'injection de 50 nM de streptomycine, les rouges à l'injection de 100 nM de streptomycine, les verts à l'injection de 200 nM de streptomycine, les bleus foncés à l'injection de 400 nM de streptomycine, les bleus clairs à l'injection de 600 nM de streptomycine, les roses à l'injection de 800 nM de streptomycine et les violets à l'injection de 1000 nM de streptomycine.

Sur la **Figure 72**, comme dans le cas de la position, la largeur à mi-hauteur des 3 premières bandes est pratiquement constante avec la concentration de streptomycine. À l'inverse, on observe une diminution de cette largeur dans le cas des trois dernières bandes pour lesquelles la position se décalait avec la concentration. Il y a donc une corrélation entre les évolutions de la position et de la largeur des bandes reflétant ainsi l'interaction aptamère/streptomycine. Cette diminution de la largeur pourrait être due à une réduction de la flexibilité de l'aptamère et donc de ses degrés de liberté lors de son interaction avec une molécule de streptomycine ceci est confirmé par les écarts de dissipation vue **Figure 69**. Il est

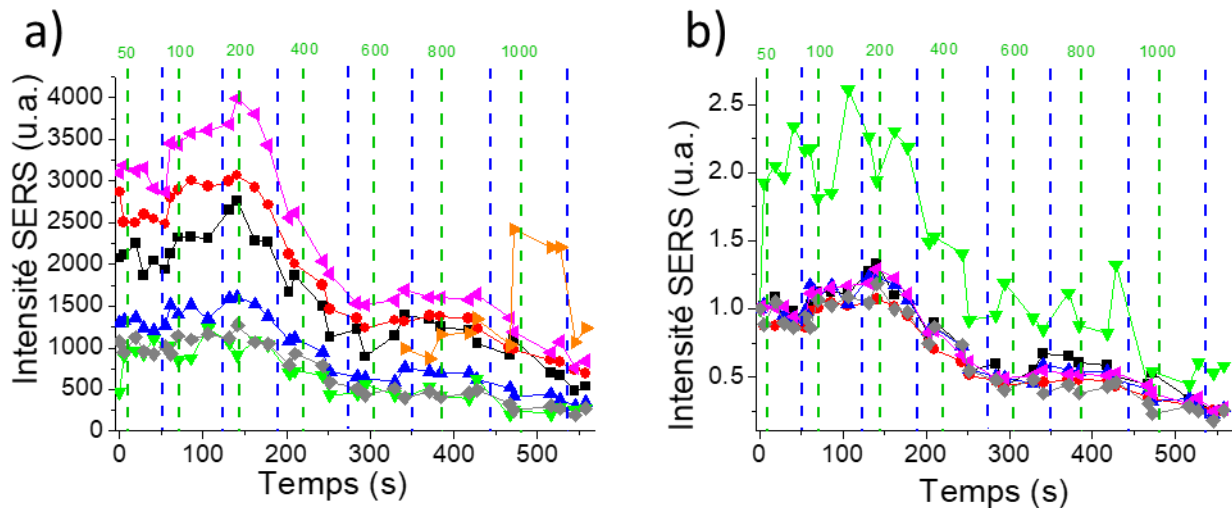
également possible d'identifier les groupements chimiques qui sont perturbés lors de l'interaction.



**Figure 73 :** a) Evolution de (a) la position et (b) de la largeur à mi-hauteur de la bande à  $1320 \text{ cm}^{-1}$  pour différentes concentrations de streptomycine. Les symboles bleu clair correspondent aux mesures effectuées à l'injection de 600 nM de streptomycine, les roses à l'injection de 800 nM de streptomycine et les violets à l'injection de 1000 nM de streptomycine.

Sur la **Figure 73**, j'ai reporté l'évolution de la position et la largeur à mi-hauteur de la bande à  $1320 \text{ cm}^{-1}$ . À partir de l'injection de 600 nM de streptomycine une nouvelle bande apparaît sur le spectre SERS à  $1320 \text{ cm}^{-1}$ . Cette bande correspond à la guanine. Il est possible que lorsque la streptomycine interagit avec l'aptamère, cette interaction implique la guanine à partir d'une certaine concentration.

Je me suis ensuite intéressé à regarder l'évolution des intensités SERS des différentes bandes au cours du temps et en fonction des différentes injections de streptomycine.



**Figure 74:** Evolution de l'intensité des bandes SERS (points noirs :  $419 \text{ cm}^{-1}$ , points rouges :  $998 \text{ cm}^{-1}$ , points bleus :  $1021 \text{ cm}^{-1}$ , points verts :  $1047 \text{ cm}^{-1}$ , points roses :  $1074 \text{ cm}^{-1}$ , points oranges :  $1320 \text{ cm}^{-1}$  et points gris :  $1573 \text{ cm}^{-1}$ ). Indiqué en pointillé vert les injections de streptomycine en nM et en bleu les injections de tampons. a) toutes les bandes non normalisées b) Toutes les bandes sont normalisées par rapport à leurs valeurs à  $t=0 \text{ min}$ , la bande à  $1320 \text{ cm}^{-1}$  a été enlevée

Sur la **Figure 74**, il est possible d'observer l'évolution de l'intensité des différentes bandes en fonction du temps. Ainsi lorsque la concentration injectée de streptomycine augmente, l'intensité SERS augmente légèrement jusqu'à 150 s puis diminue rapidement

jusqu'à 300 s pour ensuite atteindre un plateau, ceci quelle que soit la bande spectrale, sauf pour la bande à  $1047\text{ cm}^{-1}$  qui varie plus que les autres. De plus à part pour la bande à  $1047\text{ cm}^{-1}$  toutes les bandes suivent la même variation en intensité par rapport à leur valeur initiale. Ceci peut être dû au fait que lors de l'expérience il y ait de petites variations de la focalisation (mouvement de la cellule sous le microscope) malgré le fait que je vérifie la mise au point après chaque spectre.

### 6) Conclusion sur le capteur couplé QCM/SERS

Ce capteur m'a permis d'obtenir simultanément des mesures QCM et SERS. Avec ce capteur j'ai pu observer l'interaction entre la streptomycine et l'aptamère.

J'ai pu montrer qu'il est possible de relier les mesures SERS et QCM et ainsi d'expliquer les modifications des spectres SERS directement avec les mesures QCM en déterminant les molécules en présence lors de l'acquisition des spectres SERS. J'ai démontré que la présence de la streptomycine à différentes concentrations a un impact sur la position et la largeur à mi-hauteur de certaines bandes SERS. De plus il est possible de rapprocher le déplacement observé en SERS avec l'allure des mesures de dissipations car il est possible de voir que la dissipation diminue lors de l'ajout de la streptomycine ce qui peut être relié au fait que lors de l'interaction entre l'aptamère et la streptomycine va rigidifier la surface.

Une des limitations actuelles de ce capteur réside dans le fait que les nanostructures ne sont localisées que sur une petite surface du quartz. En effet les nanostructures ne couvrent que 0.0576 % de la surface ce qui est très peu. S'il était possible de recouvrir toute la surface avec les nanostructures il serait possible d'avoir un plus grand taux d'adsorption d'aptamère et de streptomycine et il ne serait pas nécessaire de rechercher les nanostructures avec le microscope. Tout cela rendrait le capteur plus facile à utiliser et plus efficace.

Il serait donc intéressant d'utiliser une méthode permettant de nanostructurer toute la surface de la puce QCM

## C) La lithographie par interférence d'un LASER (LIL)

Pour pouvoir produire les nanostructures sur une large surface et de manière reproductible, j'ai étudié une technique de lithographie qui consiste à structurer une surface en imprimant un motif sur une résine par l'intermédiaire des interférences optiques. Cette technique permet de structurer des matrices avec des objets dont les tailles sont de l'ordre de la centaine de nanomètres sans recourir à des masques complexes.

### 1) Le Principe

Le principe de base est le même qu'en interférométrie : un motif d'interférences entre deux ou plusieurs ondes lumineuses cohérentes est créé et enregistré dans une couche de résine photosensible. Ce motif d'interférences consiste en une série de franges périodiques en deux dimensions représentant les minima et les maxima d'intensité. Lors du traitement post-exposition, un motif d'intensité périodique apparaît sur la résine correspondant aux interférences.

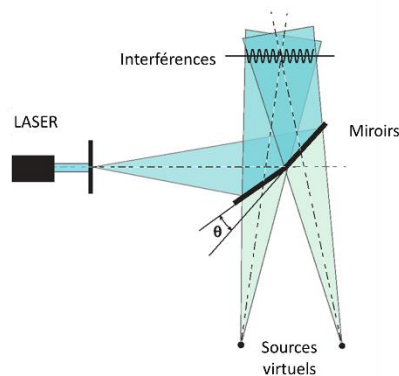


Figure 75 : Schéma d'une interférence à deux faisceaux

Pour une interférence à deux faisceaux, l'espacement entre franges (périodicité des structures) est donné par l'Équation 9, où  $\lambda$  est la longueur d'onde et  $\theta$  est l'angle entre les deux ondes interférentes. La période minimale réalisable est alors égale à la moitié de la longueur d'onde.

$$T = \frac{\lambda/2}{\sin(\theta/2)}$$

Équation 9 : Espacement interfrange

En utilisant cette méthode il est possible d'obtenir des nanostructures de tailles variables sur une surface de plusieurs  $\text{cm}^2$  car l'illumination recouvre toute la surface. En effet cette méthode est utile dans le cas où il faut recouvrir toute la surface avec les mêmes structures.

### 2) Le protocole

Durant ma thèse, je suis allé à l'Austrian Institute of Technology (AIT), nos partenaires dans le projet ANR Nanobiosensor, pour apprendre à utiliser cette technique.

La première étape consiste à obtenir des surfaces de verres très propres car la moindre poussière peut détériorer les échantillons. Pour cela il faut alors baigner les échantillons dans un bain d'eau miliQ plusieurs fois et finir par un bain d'éthanol.

Ensuite il faut déposer une couche métallique sur laquelle seront déposées nos structures. Dans notre cas, nous avons déposé 2 nm de chrome, pour que l'or puisse tenir sur la surface de verre, et 50nm d'or pour obtenir notre surface.

Par la suite la résine est déposée à la surface de l'or par induction centrifuge ce qui permet d'obtenir une fine couche de 100 nm de résine à la surface. Ensuite l'échantillon est chauffé à 100° sur une plaque chauffante pendant 2min. L'échantillon ainsi préparé est disposé dans le montage optique de lithographie pour être illuminé pendant 6 min. Il est ensuite tourné de 90° pour être à nouveau illuminé pendant 6 min.

Pour finir l'échantillon est immergé dans une solution de développeur AZ 303. Le développeur va éliminer la résine autour des zones éclairées lors de l'exposition aux franges d'interférences. La durée d'immersion va permettre de contrôler la taille des nanostructures. Puis l'échantillon va être inséré dans un système de gravure ionique pour graver la surface d'or et obtenir les nanostructures. La dernière étape consiste à insérer l'échantillon dans un réacteur à plasma pour éliminer les dernières traces de résin.

### 3) Les réalisations avec le LIL

Avec notre partenaire autrichien, j'ai réalisé une étude plasmonique et SERS d'échantillons fabriqués par cette méthode, ce qui a donné lieu à l'article inclus par la suite<sup>80</sup>.

Pour cette étude notre partenaire autrichien a réalisé plusieurs échantillons avec des réseaux de nanostructures de diamètres et de périodicités différentes pour étudier les paramètres déterminants dans la production des substrats. Ensuite, j'ai fonctionnalisé les réseaux avec de l'acide 4-mercaptobenzoïque et réalisé plusieurs cartographies SERS pour étudier leur homogénéité et leur reproductibilité.

Les mesures ont démontré que le signal SERS était bien homogène et reproductible pour des tailles de nanostructures supérieures à 100 nm. Pour des tailles inférieures, la reproductibilité et de l'homogénéité sont beaucoup moins bonnes avec une grande déviation du signal SERS sur les surfaces.

Pour notre système couplé QCM/SERS, cette méthode lithographique pourrait nous permettre de recouvrir toute la surface du quartz. Dans ce contexte, j'ai réalisé un test de production de nanostructures sur des surfaces de verres. J'ai essayé d'obtenir des surfaces ayant une réponse plasmonique aux alentours des 785 nm par cette méthode. Malheureusement je me suis confronté à un problème : pour pouvoir obtenir deux échantillons à cette longueur d'onde, j'ai dû produire 25 substrats. Sur l'ensemble des échantillons, la moitié n'a donné aucune réponse plasmonique car les nanostructures avaient disparu. Les autres donnaient des réponses plasmoniques à des longueurs d'onde plus élevées entre 850 et 900 nm.

Ainsi cette méthode consomme beaucoup trop de surfaces afin d'obtenir les nanostructures souhaitées, la grande majorité n'étant pas exploitable par la suite. Dans le cas du couplage QCM/SERS, les puces de quartz conçues pour fonctionner en QCM que je souhaite nanostructurer sont coûteuses. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser ce procédé pour concevoir nos transducteurs.





Cite this: *Nanoscale*, 2018, 10, 10268

## Tunable laser interference lithography preparation of plasmonic nanoparticle arrays tailored for SERS†

Nestor Gisbert Quilis,<sup>a</sup> Médéric Lequeux,<sup>ib, b, c</sup> Priyamvada Venugopalan,<sup>a</sup> Imran Khan,<sup>a, d</sup> Wolfgang Knoll,<sup>a</sup> Souhir Boujday,<sup>ib, c</sup> Marc Lamy de la Chapelle<sup>b, e</sup> and Jakub Dostalek<sup>ib, \*a</sup>

The facile preparation of arrays of plasmonic nanoparticles over a square centimeter surface area is reported. The developed method relies on tailored laser interference lithography (LIL) that is combined with dry etching and it offers means for the rapid fabrication of periodic arrays of metallic nanostructures with well controlled morphology. Adjusting the parameters of the LIL process allows for the preparation of arrays of nanoparticles with a diameter below hundred nanometers independently of their lattice spacing. Gold nanoparticle arrays were precisely engineered to support localized surface plasmon resonance (LSPR) with different damping at desired wavelengths in the visible and near infrared part of the spectrum. The applicability of these substrates for surface enhanced Raman scattering is demonstrated where cost-effective, uniform and reproducible substrates are of paramount importance. The role of deviations in the spectral position and the width of the LSPR band affected by slight variations of plasmonic nanostructures is discussed.

Received 29th November 2017,  
Accepted 21st March 2018

DOI: 10.1039/c7nr08905h

rsc.li/nanoscale

102

### Introduction

Metallic nanostructures exhibiting localized surface plasmon resonance (LSPR) are attracting increasing attention in numerous fields that can benefit from their extraordinary optical properties. These particularly include research in nanophotonics<sup>1,2</sup> and their applications for light management in thin film devices,<sup>3,4</sup> amplified optical spectroscopy, and analytical technologies.<sup>5,6</sup> These nanostructures possess the capability to couple light energy to localized surface plasmons (LSPs), which originate from collective oscillations of electron density and associated electromagnetic field. The excitation of these modes leads to enhanced absorption, scattering and sub-wavelength confinement of light energy at narrow spectral

windows. These phenomena are accompanied by strongly increased electromagnetic field intensity, which is attractive for amplifying weak spectroscopic signals such as Raman scattering, fluorescence, and infrared absorption spectroscopy. Enhancement factors up to several orders of magnitudes were reported to open the door for the ultrasensitive detection of chemical and biological species.<sup>7,8</sup>

In the past decades, nanotechnology research took advantage of rapidly advancing fabrication methods with gradually improved precision and control in the preparation of nanostructured materials. Electron beam lithography and focused ion beam milling<sup>9–11</sup> positioned themselves as irreplaceable tools in the nanophotonics research domain and are routinely used for the fabrication of plasmonic nanostructures with tailored morphology. However, these techniques do not allow fully harnessing the potential of such materials in practical applications. The reasons are that they are not suitable for scaled up production due to their limited throughput, costly instrumentation and are capable of patterning only small areas. In order to overcome these drawbacks, other methods for nanoscale patterning that are simpler and cost-effective have been pursued. These include nanoimprint lithography, which offers the means for repeated replicating of nanoscale features by using a working stamp casted from a pre-fabricated master.<sup>12–14</sup> Other techniques were developed based on the self-assembly of building blocks forming nanoscale periodic

<sup>a</sup>Biosensor Technologies, AIT-Austrian Institute of Technology GmbH, Konrad-Lorenz-Strasse 24, 3430 Tulln, Austria. E-mail: Jakub.dostalek@ait.ac.at

<sup>b</sup>Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire CSPBAT, CNRS, UMR 7244, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France

<sup>c</sup>Sorbonne Université, CNRS, UMR 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, LRS, F75252 Paris, France

<sup>d</sup>AIT-Austrian Institute of Technology, Center for Energy, Photovoltaic Systems, Giefinggasse 2, A-1210 Vienna, Austria

<sup>e</sup>Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM - UMR CNRS 6283), Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7nr08905h



features that can be employed as a lithographic mask.<sup>15–17</sup> This approach was utilized in nanosphere lithography or block copolymer lithography for large area structuring; however, it lacks long range order and suffers from edge defects and lower homogeneity.<sup>18</sup> Chemically synthesized metallic nanoparticles can be assembled into tailored plasmonic nanostructures by using atomic force microscopy<sup>19</sup> or, for instance, end-to-end coupling of metallic nanorods was reported for the preparation of dimers with the use of selective local modification of end tips.<sup>20</sup> Interestingly, chemically synthesized gold nanoparticles were infiltrated into a three-dimensional network of polymer fibers to increase their surface density compared to two-dimensional architectures and to take advantage of their hydrophobic properties.<sup>21</sup> In addition, natural materials carrying hierarchical micro-nano-structures (e.g. rose petal, taro leaf and lotus leaf) were coated with metal and demonstrated to serve as low-cost SERS-active substrates with superhydrophobic properties enabling efficient enrichment of chemical and biological species to specific areas probed with intense electromagnetic field intensity.<sup>22,23</sup>

Laser interference lithography (LIL) represents an alternative method that is suitable for the preparation of periodic nanoscale features with controlled size and shape.<sup>24–26</sup> LIL techniques offer the advantage of mass production-compatible preparation<sup>27,28</sup> and represent an attractive means for (arguably) the simple and fast patterning of large areas of up to hundreds of square centimeters. LIL utilizes the recording of an interference field pattern into a photosensitive resist material<sup>29,30</sup> and in combination with lift-off or ion etching steps, it can be used for the preparation of arrays of metallic nanoparticles. For the lift-off approach, metallic nanoparticles are made by depositing a metal inside cavities formed in a photosensitive resist, which is subsequently removed by a solvent.<sup>31</sup> In this variant of the LIL approach, the size of metallic nanoparticles is controlled by the cavity diameter that is typically proportional to the period length.<sup>32–34</sup> The employment of a sacrificial layer is frequently required in order to facilitate the lift-off as it is often limited by the steepness of the cavity sidewalls.<sup>35,36</sup> The ion etching modality employs a nano-patterned resist that serves as a mask on the top of a metallic layer. This mask is transferred to the metal by a dry etching step, which attacks areas that are not protected by the resist material.<sup>37–40</sup> In both approaches, the tuning of LSPR on prepared arrays of metallic nanoparticles has been mainly achieved by changing the angle  $\theta$  between the interfering beams upon the recording of the mask. Then both the period and diameter of metallic nanoparticles are varied and thus not all geometrical combinations are accessible. In addition, lift-off-based LIL implementations are typically not suitable for the preparation of features with size below hundred nanometers unless very small periods of the arrays are prepared or complex systems such as extreme ultraviolet LIL with a beam emitted from a synchrotron are employed.<sup>41,42</sup>

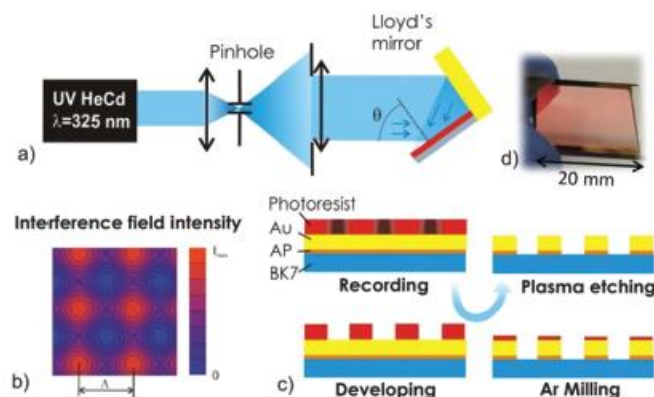
Plasmonic nanostructures need to be carefully engineered to couple light at specific wavelength bands<sup>42,43</sup> for specific applications. This requires highly tunable nanofabrication

methods as plasmonic properties of arrays of metallic nanoparticles strongly depend on multiple parameters including particle size, shape, and inter-particle distance.<sup>43,44</sup> This paper reports on the LIL implementation that enables the highly versatile preparation of arrays of cylindrical metallic nanoparticles with independent control of their diameter and period. In addition, diameters below hundred nanometers can be achieved. The importance of such versatility is illustrated in an experiment where gold nanoparticle arrays that are resonant in the red and infrared part of the spectrum are tailored to serve as SERS substrates.

## Results and discussion

### Preparation of gold nanoparticle arrays over a large area

The LIL set-up employed in the reported experiments utilized a Lloyd's mirror configuration that is depicted in Fig. 1(a). The period of rectangular arrays of metallic nanoparticles  $A$  was controlled by the angle of two collimated interfering beams  $\theta$  hitting a photoresist layer. In order to prepare 2D arrays of metallic nanoparticles, the exposure was performed twice with the substrate rotated by 90° along the axis perpendicular to its surface. The period  $A$  decreases when increasing the angle  $\theta$  according to the formula  $A = \lambda/2 \sin(\theta)$ , where  $\lambda = 325$  nm is the wavelength of herein used coherent interfering beams. It is worth noting that the structured illuminated area depends on the length of the mirror  $L_M$  and in the reported setup it was about 2 cm. (Alternatively, another LIL configuration where the beam is split into two equal parts that are recombined over the resist surface can be used. Such a set-up allows for recording over a larger area but the configuration is more sensitive to fluctuations and more complex to align.<sup>26</sup>) The two exposures of interfering collimated beams form the pattern that is simulated in Fig. 1(b). For the used positive photoresist, the area exposed to high recording light intensity can be etched upon the subsequent development step. By controlling the development time  $t_{dev}$ , the photoresist layer can be fully removed from the exposed area to yield a mask in the form of periodic arrays of resist features. Optimized dose and dilution of the developer enable fine control over the process to create a homogeneous mask with arrays of cylindrically shaped photoresist objects. Afterwards, directional ion milling with argon ions is utilized in order to transfer these features to the gold layer that was deposited underneath the photoresist film. The regions that are not protected by the photoresist are etched away forming gold nanoparticles. The remaining photoresist on top of the gold nanoparticles is then removed with a gentle oxygen plasma treatment of the surface, resulting in regular gold nanoparticle arrays covering macroscopic areas. The fabrication process is briefly illustrated in Fig. 1c and an example of the prepared glass substrate with arrays of metallic nanoparticles is shown in Fig. 1d. An atomic force microscopy study (included in the ESI†) confirms that the oxygen plasma reduces the height of nanostructures by about 20 nm because of the removal of the residual photoresist mask. The height of



**Fig. 1** (a) Schematic of the Lloyd's mirror interferometer setup used for the LIL-based recording. (b) Simulations of the field intensity profile recorded for the photoresist. (c) Development of the photoresist and dry etching of Au NP arrays on a substrate with a thin adhesion promoter (AP). (d) Example of prepared gold nanoparticle arrays on a BK7 glass substrate with the size of  $20 \times 20 \text{ mm}^2$ .

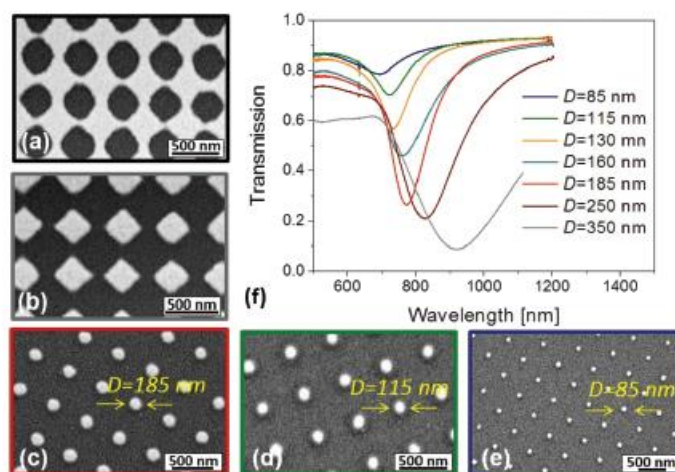
metallic nanoparticles is 55–60 nm, which is slightly above the thickness of the deposited Au film due to the effect of weak etching into the glass substrate.

#### Tunability of the localized surface plasmon resonance

Gold nanoparticle arrays with a period between  $\Lambda = 260 \text{ nm}$  and  $560 \text{ nm}$  were prepared by varying the interference angle  $\theta$  in the LIL recording step. In order to tune the diameter of nanoparticles  $D$ , the exposure dose was kept constant at  $6.75 \text{ mJ cm}^{-2}$  and the development time  $t_{\text{dev}}$  was varied. As illustrated in Fig. 2a, arrays of holes are prepared in the gold

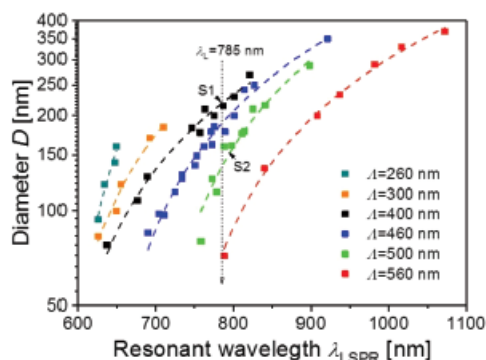
film for the short development time  $t_{\text{dev}} = 95 \text{ s}$ . On increasing the development time to  $t_{\text{dev}} = 110 \text{ s}$ , arrays of rectangular-shaped, not connected nanoparticles are observed in Fig. 2b. Further prolonging the development time from  $t_{\text{dev}} = 165$  to  $220 \text{ s}$  yields arrays of cylindrical gold nanoparticles with diameters decreasing from  $D = 185$  to  $85 \text{ nm}$ , see Fig. 2c–e. The resonant coupling to LSPs supported by prepared gold nanoparticle arrays is manifested as a narrow dip in the transmission spectrum as shown in Fig. 2(f). The wavelength at which the minimum of the dip occurs ( $\lambda_{\text{LSPR}}$ ) shifts towards the near infrared (NIR) part of the spectrum when increasing

104



**Fig. 2** SEM images of metallic arrays with nanoscale features for varied development time  $t_{\text{dev}}$  and fixed period of  $\Lambda = 460 \text{ nm}$ . (a) Nanohole arrays for  $t_{\text{dev}} = 95 \text{ s}$ ; (b) diamond-shaped nanoparticle arrays for  $t_{\text{dev}} = 110 \text{ s}$ , and arrays of cylindrical nanoparticles for (c)  $t_{\text{dev}} = 165 \text{ s}$ ,  $D = 185 \text{ nm}$ ; (d)  $t_{\text{dev}} = 195 \text{ s}$ ,  $D = 115 \text{ nm}$ ; (e)  $t_{\text{dev}} = 220 \text{ s}$ ,  $D = 85 \text{ nm}$ . (f) Transmission spectra measured for indicated gold disk diameters  $D$  and period  $\Lambda = 460 \text{ nm}$  by collimated beam illuminating area of about  $0.5 \text{ mm}^2$ .





**Fig. 3** Measured dependence of the resonant wavelength  $\lambda_{\text{LSPR}}$  on the diameter  $D$  and period between  $\Lambda$  of gold nanoparticle arrays in contact with air.

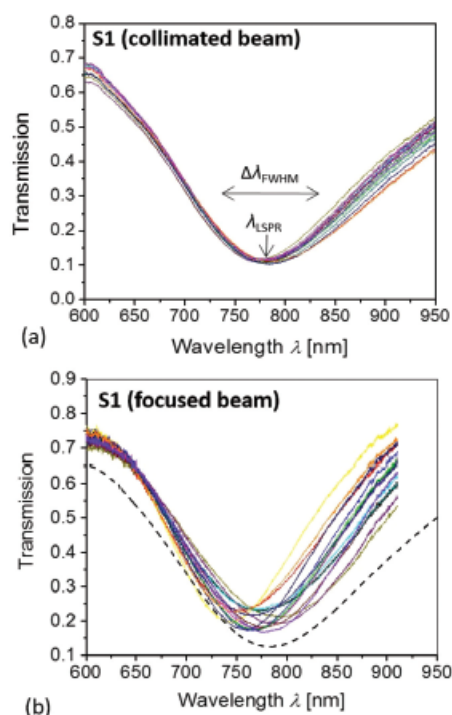
the diameter  $D$ . For example, LSPR can be tuned in the spectral window  $\lambda_{\text{LSPR}} = 700\text{--}900$  nm by changing the diameter from  $D = 85$  to  $350$  nm for the showed period of  $\Lambda = 460$  nm.

In general, the LSPR wavelength  $\lambda_{\text{LSPR}}$  on gold nanoparticle arrays is a function of both period  $\Lambda$  and diameter  $D$ . Its shift towards longer wavelengths by increasing the diameter  $D$  is more pronounced for longer periods  $\Lambda$ . This can be explained by diffraction coupling of LSPs for the interparticle distances that are in the wavelength range of the incident light.<sup>45</sup> The possibility of independent control of both period and diameter is demonstrated in Fig. 3. A series of samples with the period varied in the range of  $\Lambda = 260\text{--}560$  nm and diameter  $D = 70\text{--}350$  nm were prepared and transmission spectra were recorded. The analysis of these spectra confirms the tuning of the LSPR wavelength  $\lambda_{\text{LSPR}}$  between 620 and 1050 nm and reveals that identical  $\lambda_{\text{LSPR}}$  can occur for multiple combinations of  $\Lambda$  and  $D$ .

#### Homogeneity of the prepared nanoparticle arrays

In order to characterize the spatial homogeneity of plasmonic properties of prepared nanostructures, we performed a mapping of the spectral position and width of LSPR bands on two substrates carrying gold nanoparticle arrays with  $\Lambda = 400$  nm and  $D = 215$  nm (S1) and  $\Lambda = 500$  nm and  $D = 165$  nm (S2). Fig. 4 shows an example of the LSPR transmission spectra acquired from a series of spots on the substrate S1 and from such a type of spectra, variations in the resonant wavelength  $\lambda_{\text{LSPR}}$  and the width of the full width in the half minimum  $\Delta\lambda_{\text{FWHM}}$  were determined.

Firstly, let us discuss the measurements performed by using a collimated beam that exhibits a diameter of about 1 mm and which was scanned over arrays of spots arranged on an area of  $1 \times 1$  cm<sup>2</sup>. The determined mean LSPR wavelength  $\lambda_{\text{LSPR}}$  and the width  $\Delta\lambda_{\text{FWHM}}$  are summarized in Table 1 for both substrates S1 and S2. The mean value and standard deviation of these parameters yield  $\lambda_{\text{LSPR}} = 782 \pm 4$  nm and



**Fig. 4** Comparison of LSPR spectra measured on substrate S1 after functionalization with 4-mercaptobenzoic acid on (a) a series of spots with a large 1 mm diameter arranged over  $1 \times 1$  cm with collimated beam and (b) with focused beam diameter  $3 \mu\text{m}$  scanned over  $200 \times 200 \mu\text{m}$ . The dashed line in (b) shows the transmission spectrum measured with a large diameter beam on the same sample for comparison.

$\Delta\lambda_{\text{FWHM}} = 221 \pm 15$  nm for substrate S1. On the second substrate S2 with a longer period, an almost identical spectral position of  $\lambda_{\text{LSPR}} = 782 \pm 5$  nm and narrower resonance  $\Delta\lambda_{\text{FWHM}} = 106 \pm 2$  nm were observed (see the ESI†).

Afterwards, the transmission spectra were measured using a confocal microscope at a series of spots with a smaller diameter of about  $3 \mu\text{m}$ . Interestingly, for substrate S1 the spectral width of such LSPR spectra  $\Delta\lambda_{\text{FWHM}}$  was significantly lower and the variations in the spectral position  $\lambda_{\text{LSPR}}$  were more pronounced than for the data measured with a large diameter beam (compare examples presented in Fig. 4b and a). When probing this smaller area, the spectral position of  $\lambda_{\text{LSPR}} = 770 \pm 13$  nm and the resonance width of  $\Delta\lambda_{\text{FWHM}} = 172 \pm 12$  nm were determined. For substrate S2, similar variations in the spectral position of  $\lambda_{\text{LSPR}} = 787 \pm 7$  nm were measured; however, wider resonances  $\Delta\lambda_{\text{FWHM}} = 122 \pm 14$  nm were observed with a focused beam compared to a large diameter beam. This effect can be ascribed to the proximity of the diffraction edge, which is visible in the transmission spectra measured by a collimated large diameter beam and which becomes smeared by the

**Table 1** Specification of investigated substrates, values measured for a spot area of  $10 \mu\text{m}^2$  are stated and for  $1 \text{mm}^2$  are in the presented brackets

Substrate	$\lambda_{\text{LSPR}}$ [nm]	$\Delta\lambda_{\text{FWHM}}$ [nm]	$I(\Delta\lambda_{\text{R1}})$ [counts]	$I(\Delta\lambda_{\text{R2}})$ [counts]
S1, $\Lambda = 400 \text{ nm}$ , $D = 215 \pm 6 \text{ nm}$	$770 \pm 13$ ( $782 \pm 4$ )	$172 \pm 12$ ( $221 \pm 15$ )	$254 \pm 52$	$248 \pm 73$
S2, $\Lambda = 500 \text{ nm}$ , $D = 165 \pm 8 \text{ nm}$	$787 \pm 7$ ( $782 \pm 5$ )	$122 \pm 14$ ( $106 \pm 2$ )	$66 \pm 15$	$68 \pm 18$

varied angle when performing the measurement with a focused beam (see Fig. S2 in the ESI†).

In general, the variations in the LSPR spectra can be attributed to local deviations in the morphology of gold nanoparticles (particularly diameter  $D$ ) that are related to imperfections of the LIL fabrication process. The analysis of the AFM data (included in the ESI†) reveals that the diameter  $D$  varied with a standard deviation of  $\sigma(D) = 6 \text{ nm}$  on the S1 substrate and  $\sigma(D) = 8 \text{ nm}$  for the S2 substrate. From the slope in dependencies  $D(\lambda_{\text{LSPR}})$  presented in Fig. 3, it can be obtained that the LSPR wavelength changes with the diameter as  $\partial\lambda_{\text{LSPR}}/\partial D = 1$  and 1.3 for the prepared gold nanoparticle arrays with period  $\Lambda = 400$  (S1) and  $500 \text{ nm}$  (S2), respectively. Therefore, the measured variations in diameter  $D$  correspond to standard deviation in the LSPR wavelength of  $\sigma(\lambda_{\text{LSPR}}) = 6 \text{ nm}$  for S1 and  $\sigma(\lambda_{\text{LSPR}}) = 10 \text{ nm}$  for S2. Such values are lower than those experimentally observed when probing an area of about  $10 \mu\text{m}^2$  and this discrepancy can be ascribed to additional effects such as the polycrystalline nature of prepared gold nanoparticles and variations in roughness of the top nanoparticle surface and that of the glass substrate.

#### Surface enhanced Raman spectroscopy on gold nanoparticle arrays

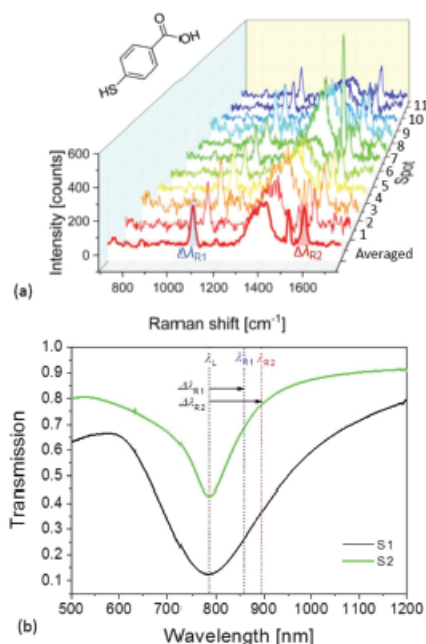
Arrays of gold nanoparticles can serve as an efficient substrate for the amplification of Raman scattering on a probe molecule when exposed to an intense LSP field. This effect occurs when the resonant wavelength  $\lambda_{\text{LSPR}}$  is located in the vicinity of the impinging (laser) light  $\lambda_{\text{L}}$  as well as that of Raman scattered light at specific spectral bands centered at wavelengths  $\lambda_{\text{R}}$ .<sup>46–48</sup> In order to demonstrate the applicability of the used LIL method for SERS, 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA) was selected as a probe and the laser wavelength of  $\lambda_{\text{L}} = 785 \text{ nm}$  was used (see Fig. 5a). In addition, other molecules including 4-aminothiophenol and 1,2-di(4-pyridyl)ethylene were tested for the SERS measurement as seen in the ESI.†

It has been previously reported in several studies that the highest SERS enhancement factor on gold nanocylinders occurs with  $\lambda_{\text{LSPR}}$  located between the  $\lambda_{\text{L}}$  and (red shifted) Stokes vibrational band of the probe of interest, which has been validated for the visible part of the spectrum.<sup>49,50</sup> However, such a rule was found not to be valid for the gold nanoparticles that are resonant in the NIR part of the spectrum. Then the optimum  $\lambda_{\text{LSPR}}$  was observed to be significantly blue shifted with respect to  $\lambda_{\text{L}}$ .<sup>51</sup> This can be partially attributed to the blue-shift of the maximum extinction (measured in far field) compared to the wavelength where the strongest enhancement in the near field occurs.<sup>52–54</sup> Another important factor is a decrease of the near field intensity for nanoparticles

with a larger diameter, supporting resonance in the NIR part of the spectrum compared to that for resonances in the visible,<sup>47</sup> and related more complex spectral dependence of the near field enhancement.<sup>55</sup>

Finite difference time domain (FDTD) simulations were carried out in order to elucidate the spectral dependence of Raman scattering efficiency on the prepared arrays of gold cylindrical nanoparticles. The plasmonically enhanced field intensity strength at laser wavelength  $\lambda_{\text{L}}$  and Raman band wavelengths  $\lambda_{\text{R}}$  were simulated in order to evaluate changes in the Raman scattering efficiency that is proportional to the term  $\sim |E(\lambda_{\text{L}})|^2 |E(\lambda_{\text{R}})|^2$ . As illustrated by the experimental data in Fig. 3, various combinations of period  $\Lambda$  and diameter  $D$  can be chosen to tune  $\lambda_{\text{LSPR}}$  on arrays of gold cylindrical nanoparticles close to the wavelength  $\lambda_{\text{L}}$ . Furthermore, a set of four pairs of period  $\Lambda$  and nanoparticle diameter  $D$  that define a geometry exhibiting  $\lambda_{\text{LSPR}}$  close to wavelength  $\lambda_{\text{L}} = 785 \text{ nm}$  were selected. The determined geometrical parameters that are specified in the inset of Fig. 6a agree well with those determined experimentally (see Fig. 3). The simulated transmission spectra presented in Fig. 6a show that when increasing the period  $\Lambda$  and decreasing the diameter  $D$ , the spectral width of the LSPR band decreases as the experimental data revealed. The spectral width of the resonant feature is a signature of LSP damping that directly affects the electromagnetic field enhancement. For the simulated geometries, the enhancement of electric field amplitude  $|E|/|E_0|$  was obtained from near-field plots (see an example in the inset of Fig. 6b) and it was averaged over the surface of a nanoparticle at  $2 \text{ nm}$  distance from its walls. At the wavelength  $\lambda_{\text{L}} = 785 \text{ nm}$ , the averaged electric field amplitude enhancement  $|E|/|E_0|$  rapidly increases with the period  $\Lambda$  while for the longer wavelengths  $\lambda_{\text{R}} = 850$  and  $900 \text{ nm}$ , the increase of  $|E|/|E_0|$  is slower, see Fig. 6. These simulations predict that the Raman scattering efficiency at these wavelengths  $\lambda_{\text{R}}$  (proportional to  $|E(\lambda_{\text{L}})|^2 |E(\lambda_{\text{R}})|^2$ ) is about 9 times higher for the period  $\Lambda = 500 \text{ nm}$  than for  $\Lambda = 400 \text{ nm}$ .

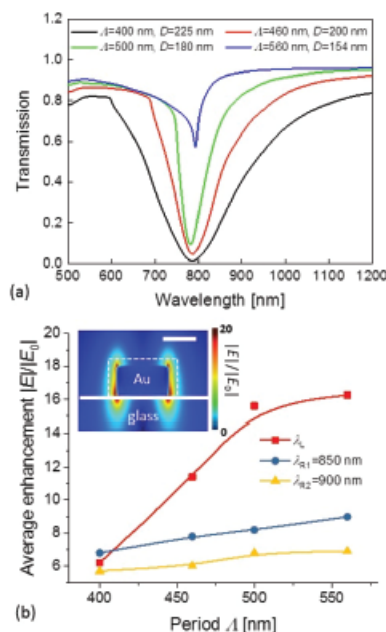
In following experiments, two substrates with the period  $\Lambda = 400 \text{ nm}$  (S1) and  $500 \text{ nm}$  (S2) were used for SERS measurements of 4-MBA. On these substrates, the diameter of the nanoparticle arrays was adjusted to  $D = 215 \text{ nm}$  and  $165 \text{ nm}$ , respectively, in order to set LSPR to the desired spectral region close to  $785 \text{ nm}$ . As can be seen in Fig. 5b and summarized in Table 1, the mean LSPR wavelength on both substrates is almost identical ( $\lambda_{\text{LSPR}} \sim 782 \text{ nm}$  as determined by transmission measurements with a collimated beam) but their resonance width substantially differs. The denser nanoparticle arrays with  $D = 215 \text{ nm}$  show a wider resonance with  $\Delta\lambda_{\text{FWHM}} = 172 \text{ nm}$ , while the sparser arrays support narrower LSPR with  $\Delta\lambda_{\text{FWHM}} = 122 \text{ nm}$ . In order to evaluate the strength and homo-



**Fig. 5** (a) Set of SERS spectra measured at different spots for 4-MBA attached to the S1 substrate (red curve represents the averaged spectrum). (b) LSPR spectra measured on substrates S1 and S2 with a large diameter beam.

generality of the SERS signal on the prepared LIL substrates, the focused laser beam at  $\lambda_L$  was scanned over their surface after 4-MBA was attached. A series of spots on a grid with 50  $\mu\text{m}$  spacing were evaluated on substrates S1 and S2. On every spot, the Raman spectrum was acquired when irradiating an area with a diameter of about 1  $\mu\text{m}$  (to which the beam at  $\lambda_L$  was focused) followed by the recording of the LSPR transmission spectrum at the same location (with a diameter of 3  $\mu\text{m}$  defined by the hole in the used confocal microscope). As can be seen in an example presented in Fig. 5a, the measured Stokes vibrational Raman spectra exhibit two strong bands attributed to the probe 4-MBA molecule located at wavelengths shifted by  $\Delta\lambda_{R1} = 1077 \text{ cm}^{-1}$  (corresponding to  $\lambda_{R1} = 857 \text{ nm}$ ) and by  $\Delta\lambda_{R2} = 1588 \text{ cm}^{-1}$  (corresponding to  $\lambda_{R2} = 896 \text{ nm}$ ).

The obtained SERS intensities are summarized in Table 1 and firstly, one can see that the average SERS peak intensity on S1 is about 3.7 fold higher than that on the S2 substrate. This observation is in stark contrast to performed FDTD simulations that predict that the longer period substrate S2 enhances the Raman scattering efficiency 9-times stronger than the S1 substrate. This discrepancy can be only partially explained by about a two-fold larger area of the cylindrical nanoparticles (normalized by the unit cell area) on the S1 substrate, which can thus accommodate more target analytes. In addition, weaker coupling strength and wider LSP resonance (see Fig. 5b) were experimentally observed on S2 (see Fig. 5b)



**Fig. 6** (a) Simulated LSPR transmission spectra for combinations of  $\Lambda$  and  $D$  ensuring  $\lambda_{\text{LSPR}} \sim 800 \text{ nm}$ . (b) Dependence of the average electric field amplitude enhancement  $|E|/|E_0|$  on the nanostructure period  $\Lambda$  for wavelength  $\lambda_L$  and  $\lambda_R = 850$  and  $900 \text{ nm}$ . The inset shows an example of simulated near field intensity for  $\Lambda = 560 \text{ nm}$  with a dashed line representing the surface over which the field amplitude was averaged. All data were obtained for normally incident waves.

compared to the simulations (see Fig. 6a), which also decrease the SERS signal on this substrate. However, very probably also other parameters such as roughness, which was not taken into account in the model, play an important role.

Secondly, there can be seen that when scanning the laser beam over the surface of S1 and S2 substrates, a standard deviation of SERS peak intensity of 20–30% of the mean value occurs. These variations in SERS peak intensity can be mainly attributed to local changes in the LSPR wavelength  $\lambda_{\text{LSPR}}$ . It is worth noting that probing the area with a diameter of 1  $\mu\text{m}$  corresponds to the excitation of LSPs on  $\sim 3$  nanoparticles, which approaches the situation when individual nanoparticles are monitored.<sup>56</sup> Thus, even stronger variations in LSPR can be expected than those observed in transmission measurements on ensembles of about  $10^6$  nanoparticles carried on an area of 1  $\text{mm}^2$  and of 30 nanoparticles carried on 10  $\mu\text{m}^2$  area (see Fig. 4 and Table 1).

## Experimental

### Materials

A S1805 G2 positive photoresist and AZ 303 developer were purchased from Micro Resist Technology (Germany).



Propylene glycol monomethyl ether acetate was obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Mercaptobenzoic acid, 4-aminothiophenol and 1,2-di(4-pyridyl)ethylene were acquired from Sigma Aldrich (France).

#### Preparation of gold nanoparticle arrays

A 2 nm thick chromium layer (adhesion layer) and a 50 nm thick gold layer were sequentially prepared on clean glass microscope slides ( $20 \times 20 \text{ mm}^2$ ). Both metals were deposited by thermal evaporation (HHVAUTO 306 from HHV Ltd) under a pressure better than  $2 \times 10^{-6}$  mbar. Glass substrates were spin-coated at 4500 rpm for 45 s using a Microposit S1805 G2 positive photoresist diluted (1:2) with propylene glycol monomethyl ether acetate, originating a 100 nm thick film. Afterwards, substrates were soft baked at 100 °C on a hot plate for 120 s. Prior to the exposure, a black tape was attached on the back side of the glass substrates in order to avoid back reflection of the recorded beam. Then, substrates were mounted to the Lloyd's mirror interferometer. Exposure was carried out utilizing a 4 mW HeCd laser (model IK 3031 R-C from Kimmon) at wavelength  $\lambda = 325 \text{ nm}$ . A spatial filter ( $\times 40$  microscope lens and pinhole with a diameter of 10  $\mu\text{m}$ ) was employed to expand the beam. An additional lens with a focal length of 1 m was used to collimate the beam to the interferometer. The distance between the spatial filter and the sample holder was around 1.8 m. The intensity of the laser beam at the sample holder was found to be  $30 \mu\text{W cm}^{-2}$ . The exposure dose was set to  $6.75 \text{ mJ cm}^{-2}$ . The periodicity of the particle arrays  $A_1 = 260 \text{ nm}$ ,  $A_2 = 300 \text{ nm}$ ,  $A_3 = 400 \text{ nm}$ ,  $A_4 = 460 \text{ nm}$ ,  $A_5 = 500 \text{ nm}$  and  $A_6 = 560 \text{ nm}$  was achieved by adjusting the angle of the interfering beams ( $\theta_1 = 38.68$ ,  $\theta_2 = 32.80$ ,  $\theta_3 = 23.97$ ,  $\theta_4 = 20.69$ ,  $\theta_5 = 18.97$ ,  $\theta_6 = 16.87$ ). After exposure, substrates were immersed in a diluted AZ 303 developer solution with distilled water at a ratio 1:15. Typical developing times were between 90–240 s. Directional dry etching with an argon milling system (Roth & Rau IonSys 500) was carried out to transfer the pattern into the underlying gold layer (etching time 450 seconds, 70 degrees). Finally, the remaining resist was removed using oxygen plasma for 5 minutes, 1 mbar and 40 W.

#### Morphology measurements

Atomic force microscopy (PicoPlus from Molecular Imaging, Agilent Technologies) was used to investigate the morphology of nanoparticle arrays in the tapping mode. The average diameter was determined by analyzing the grain distribution of nanoparticle arrays using the free Gwyddion software. Additionally, scanning electron microscopy (Zeiss Supra 40 VP SEM) was employed to acquire complementary images.

#### Attachment of SERS-active molecules

LIL-prepared arrays of gold nanoparticles were cleaned with ozone for two hours. Afterwards, the substrate with gold nanoparticles was rinsed with ethanol and immersed in 4-mercaptobenzoic acid, 4-aminothiophenol or 1,2-di(4-pyridyl)ethylene dissolved in ethanol at a concentration of 1 mM for one day in

order to form a self-assembled monolayer *via* reaction by a thiol group or to physisorb on a gold surface. Finally, the substrate was rinsed with ethanol and dried.

#### Optical measurements

Transmission spectra were obtained by using a Bruker Vertex 70 Fourier transform spectrometer (FTIR) with a diameter of the collimated polychromatic beam of  $0.5 \text{ mm}^2$ . In order to perform combined SERS and LSPR experiments with a focused beam, an Xplora Raman microspectrometer (Horiba Scientific, France) with a  $\times 100$  objective (numerical aperture of 0.9) was used. On each substrate, several spectra were acquired on a square area of  $200 \times 200 \mu\text{m}$  with a distance between neighboring spots of 50  $\mu\text{m}$ . In the case of LSPR measurements, the edge filter was removed and the transmission spectra were measured in the whole spectral range of 400–900 nm. Each spot was illuminated with a white lamp and the recorded spectra were normalized by that acquired on a reference area without the nanostructures. The transmitted light is collected from an area with a diameter of 3  $\mu\text{m}$  defined by the hole of the confocal microscope. The SERS measurements were performed in the backscattering configuration at room temperature with the same lens and a laser beam at  $\lambda_L = 785 \text{ nm}$  focused at a spot 1  $\mu\text{m}$  in diameter. The power of the laser beam at the spot was about 100  $\mu\text{W}$  and the Raman spectrum was accumulated by 20 s and artefacts corresponding to cosmic rays were removed. The transmission spectra were analyzed in order to determine the spectral position and the width of the LSPR band.

#### Numerical simulations

In this work, FDTD calculations based on commercial software (FDTD solution, Lumerical Inc., Canada) are employed for simulating the electromagnetic fields around the arrays of gold nanoparticles arranged in a square lattice, taking into account the size of nanoparticles and the spacing between them. A single unit cell of the array, with a uniform mesh size of 2 nm ( $x$ ,  $y$  and  $z$  directions), was used to calculate the near field electric intensity and far field transmission spectra. Periodic boundary conditions are applied in the lateral directions while perfectly matched layers are placed above and below the structure in the perpendicular direction to absorb the transmitted and reflected electromagnetic waves. The optical constants of gold are taken from the literature.<sup>57</sup> The plane wave source covers a wavelength range of 400 to 950 nm. The structures are studied for the linearly polarized light under the condition of normal incidence.

## Conclusions

This paper reports on the not yet demonstrated tunability of laser interference lithography for the preparation of gold nanoparticle arrays with precisely controlled geometry enabling tailoring their LSPR characteristics over a broad spectral range. A series of substrates with arrays of cylindrical gold nano-

particles exhibiting an LSPR wavelength in the red and near infrared part of the spectrum were prepared by independently varying the diameter between 70 and 350 nm and period between 260 and 560 nm. Plasmonic substrates with identical LSPR wavelengths tuned to the vicinity of 785 nm and different spectral widths for SERS experiments were prepared. The importance of controlling both the LSPR wavelength and resonance width in order to enhance electromagnetic field intensity at both excitation and Raman scattered wavelength is demonstrated and sources of irregularities that affect the homogeneity of the SERS signal over the substrates are discussed. When probing an area of about millimeter diameter, deviations in the LSPR wavelength and spectral width of about several nanometers were typically observed. Interestingly, when such spectra were measured with a beam focused to a smaller area with a diameter of several microns, these standard deviations substantially increased. Such changes were ascribed to local variations in the morphology of disk-shaped nanoparticles (exhibited standard deviation in diameter of between 3 and 5%), which translate to the SERS signal exhibiting standard deviation between 20 and 30% when scanning over spots with an area of about  $1 \mu\text{m}^2$ . The presented methodology provides a tool for the preparation of highly tunable geometries over a large area, opening the door for further development of more complex and efficient plasmonic architectures using the gold nanoparticle arrays as building blocks. In future, this may include engineering of quasi-3D crystals<sup>58</sup> where surface plasmons on nanoparticle and nanohole arrays interplay<sup>59,60</sup> and support narrow multi-resonant features that potentially overlap with excitation wavelength and Raman scattered wavelength bands.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

NGQ acknowledges funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 642787, Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Network BIOGEL, ML and PV from the project jointly funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR) and Austrian Science Fund (FWF) under the grant agreements ANR-15-CE29-0026 and I 2647, respectively. IK is grateful for the support from the FWF through the project TRP 304-N20.

## Notes and references

- 1 M. L. Brongersma, N. J. Halas and P. Nordlander, *Nat. Nanotechnol.*, 2015, **10**, 25–34.
- 2 O. M. Maragò, P. H. Jones, P. G. Gucciardi, G. Volpe and A. C. Ferrari, *Nat. Nanotechnol.*, 2013, **8**, 807–819.

- 3 C. F. Guo, T. Sun, F. Cao, Q. Liu and Z. Ren, *Nat. Nanotechnol.*, 2014, **3**, e161.
- 4 H. A. Atwater and A. Polman, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 205–213.
- 5 C. Valsecchi and A. G. Brolo, *Langmuir*, 2013, **29**, 5638–5649.
- 6 M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson, J. Maria, S. K. Gray, J. A. Rogers and R. G. Nuzzo, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 494–521.
- 7 M. Bauch, K. Toma, M. Toma, Q. Zhang and J. Dostalek, *Plasmonics*, 2014, **9**, 781–799.
- 8 A. Indrasekara, S. Meyers, S. Shubeita, L. C. Feldman, T. Gustafsson and L. Fabris, *Nanoscale*, 2014, **6**, 8891–8899.
- 9 K. Ueno and H. Misawa, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 4093–4099.
- 10 M. Chirumamilla, A. Gopalakrishnan, A. Toma, R. P. Zaccaria and R. Krahn, *Nanotechnology*, 2014, **25**, 235303.
- 11 P. Mühlischlegel, H.-J. Eisler, O. Martin, B. Hecht and D. Pohl, *Science*, 2005, **308**, 1607–1609.
- 12 B. D. Lucas, J. S. Kim, C. Chin and L. J. Guo, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 1129–1134.
- 13 L. J. Guo, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 495–513.
- 14 S.-W. Lee, K.-S. Lee, J. Ahn, J.-J. Lee, M.-G. Kim and Y.-B. Shin, *ACS Nano*, 2011, **5**, 897–904.
- 15 D. O. Shin, J.-R. Jeong, T. H. Han, C. M. Koo, H.-J. Park, Y. T. Lim and S. O. Kim, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 7241–7247.
- 16 S. Krishnamoorthy, C. Hinderling and H. Heinzlmann, *Mater. Today*, 2006, **9**, 40–47.
- 17 C. Stelling, C. R. Singh, M. Karg, T. A. F. König, M. Thelakkat and M. Retsch, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 13.
- 18 C. L. Haynes and R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 5599–5611.
- 19 P. Moutet, N. M. Sangeetha, L. Ressler, N. Vilar-Vidal, M. Comesana-Hermo, S. Ravaine, R. A. L. Vallee, A. M. Gabudean, S. Astilean and C. Farcau, *Nanoscale*, 2015, **7**, 2009–2022.
- 20 I. Haidar, G. Levi, L. Mouton, J. Aubard, J. Grand, S. Lau-Truong, D. R. Neuville, N. Felidj and L. Boubekeur-Lecaque, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 32272–32280.
- 21 J. D. Shao, L. P. Tong, S. Y. Tang, Z. N. Guo, H. Zhang, P. H. Li, H. Y. Wang, C. Du and X. F. Yu, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 5391–5399.
- 22 S.-Y. Chou, C.-C. Yu, Y.-T. Yen, K.-T. Lin, H.-L. Chen and W.-F. Su, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 6017–6024.
- 23 J.-A. Huang, Y.-L. Zhang, Y. Zhao, X.-L. Zhang, M.-L. Sun and W. Zhang, *Nanoscale*, 2016, **8**, 11487–11493.
- 24 I. Wathuthanthri, Y. Liu, K. Du, W. Xu and C. H. Choi, *Adv. Funct. Mater.*, 2013, **23**, 608–618.
- 25 J.-H. Seo, J. H. Park, S.-I. Kim, B. J. Park, Z. Ma, J. Choi and B.-K. Ju, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2014, **14**, 1521–1532.
- 26 C. Lu and R. Lipson, *Laser Photonics Rev.*, 2010, **4**, 568–580.
- 27 A. Rodriguez, M. Echeverría, M. Ellman, N. Perez, Y. K. Verevkin, C. S. Peng, T. Berthou, Z. Wang, I. Ayerdi, J. Savall and S. M. Olaizola, *Microelectron. Eng.*, 2009, **86**, 937–940.

- | Paper   | Nanoscale   |
|---|---|
| 28 D. Xia, Z. Ku, S. Lee and S. Brueck, <i>Adv. Mater.</i> , 2011, <b>23</b> , 147–179.   | 45 B. Lamprecht, G. Schider, R. Lechner, H. Ditlbacher, J. Krenn, A. Leitner and F. Aussenegg, <i>Phys. Rev. Lett.</i> , 2000, <b>84</b> , 4721.  |
| 29 A. J. Wolf, H. Hauser, V. Kübler, C. Walk, O. Höhn and B. Bläsi, <i>Microelectron. Eng.</i> , 2012, <b>98</b> , 293–296.   | 46 N. Féridj, J. Aubard, G. Lévi, J. R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner and F. R. Aussenegg, <i>Appl. Phys. Lett.</i> , 2003, <b>82</b> , 3095.   |
| 30 B. Bläsi, N. Tucher, O. Höhn, V. Kübler, T. Kroyer, C. Wellens and H. Hauser, <i>Proc. SPIE</i> , 2016, <b>9888</b> , 98880H.                                      | 47 W. Lee, S. Y. Lee, R. M. Briber and O. Rabin, <i>Adv. Funct. Mater.</i> , 2011, <b>21</b> , 3424–3429.   |
| 31 S.-K. Meisenheimer, S. Jüchter, O. Höhn, H. Hauser, C. Wellens, V. Kübler, E. von Hauff and B. Bläsi, <i>Opt. Mater. Express</i> , 2014, <b>4</b> , 944.           | 48 N. Guillot and M. L. de la Chapelle, <i>J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer</i> , 2012, <b>113</b> , 2321–2333.  |
| 32 J.-H. Seo, J. Park, D. Zhao, H. Yang, W. Zhou, B.-K. Ju and Z. Ma, <i>IEEE Photonics J.</i> , 2013, <b>5</b> , 2200106–2200106.                                    | 49 I. Sow, J. Grand, G. Lévi, J. Aubard, N. Féridj, J.-C. Tinguely, A. Hohenau and J. Krenn, <i>J. Phys. Chem. C</i> , 2013, <b>117</b> , 25650–25658.  |
| 33 Y. Oh, J. W. Lim, J. G. Kim, H. Wang, B. H. Kang, Y. W. Park, H. Kim, Y. J. Jang, J. Kim, D. H. Kim and B. K. Ju, <i>ACS Nano</i> , 2016, <b>10</b> , 10143–10151. | 50 L. Billot, M. L. de La Chapelle, A.-S. Grimault, A. Vial, D. Barchiesi, J.-L. Bijeon, P.-M. Adam and P. Royer, <i>Chem Phys. Lett.</i> , 2006, <b>422</b> , 303–307.   |
| 34 M. Schade, B. Fuhmann, C. Bohley, S. Schlenker, N. Sardana, J. Schilling and H. S. Leipner, <i>J. Appl. Phys.</i> , 2014, <b>115</b> , 084309.                     | 51 N. Guillot, H. Shen, B. Frémaux, O. Peron, E. Rinnert, T. Toury and M. Lamy de la Chapelle, <i>Appl. Phys. Lett.</i> , 2010, <b>97</b> , 023113.   |
| 35 C. Liu, M. Hong, H. Cheung, F. Zhang, Z. Huang, L. Tan and T. Hor, <i>Opt. Express</i> , 2008, <b>16</b> , 10701–10709.  | 52 B. M. Ross and L. P. Lee, <i>Opt. Lett.</i> , 2009, <b>34</b> , 896–898.   |
| 36 M. Vala and J. Homola, <i>Opt. Express</i> , 2014, <b>22</b> , 18778–18789.  | 53 P. Alonso-González, P. Albella, F. Neubrech, C. Huck, J. Chen, F. Golmar, F. Casanova, L. Hueso, A. Pucci and J. Aizpurua, <i>Phys. Rev. Lett.</i> , 2013, <b>110</b> , 203902.  |
| 37 C. Liu, M. Hong, M. Lum, H. Flotow, F. Ghadessy and J. Zhang, <i>Appl. Phys. A</i> , 2010, <b>101</b> , 237–241.   | 54 J. Zuloaga and P. Nordlander, <i>Nano Lett.</i> , 2011, <b>11</b> , 1280–1283.   |
| 38 H.-J. Ahn, P. Thiagarajan, L. Jia, S.-I. Kim, J.-C. Yoon, E. L. Thomas and J.-H. Jang, <i>Nanoscale</i> , 2013, <b>5</b> , 1836–1842.                              | 55 F. J. Colas, M. Cottat, R. Gillibert, N. Guillot, N. Djaker, N. Lidgi-Guigui, T. Toury, D. Barchiesi, A. Toma, E. Di Fabrizio, P. Giuseppe Gucciardi and M. Lamy de la Chapelle, <i>J. Phys. Chem. C</i> , 2016, <b>120</b> , 13675–13683. |
| 39 S. Bagheri, H. Giessen and F. Neubrech, <i>Adv. Opt. Mater.</i> , 2014, <b>2</b> , 1050–1056.  | 56 M. A. Beuwer, M. W. J. Prins and P. Zijlstra, <i>Nano Lett.</i> , 2015, <b>15</b> , 3507–3511.   |
| 40 A. Tsarogrodskaya, O. El Zubir, B. Darroch, M. L. Cartron, T. Basova, C. N. Hunter, A. V. Nabok and G. J. Leggett, <i>ACS Nano</i> , 2014, <b>8</b> , 7858–7869.   | 57 P. B. Johnson and R. W. Christy, <i>Phys. Rev. Lett. B</i> , 1972, <b>12</b> , 4370–4379.  |
| 41 W. Karim, S. A. Tschupp, M. Oezaslan, T. J. Schmidt, J. Gobrecht, J. A. van Bokhoven and Y. Ekinici, <i>Nanoscale</i> , 2015, <b>7</b> , 7386–7393.                | 58 M. E. Stewart, N. H. Mack, V. Malyarchuk, J. Soares, T. W. Lee, S. K. Gray, R. G. Nuzzo and J. A. Rogers, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , 2006, <b>103</b> , 17143–17148.   |
| 42 J. Huang, D. Fan, Y. Ekinici and C. Padeste, <i>Microelectron. Eng.</i> , 2015, <b>141</b> , 32–36.  | 59 Q. M. Yu, P. Guan, D. Qin, G. Golden and P. M. Wallace, <i>Nano Lett.</i> , 2008, <b>8</b> , 1923–1928.  |
| 43 C. L. Nehl and J. H. Hafner, <i>J. Mater. Chem.</i> , 2008, <b>18</b> , 2415–2419.   | 60 A. Artar, A. A. Yanik and H. Altug, <i>Appl. Phys. Lett.</i> , 2009, <b>95</b> , 051105.   |
| 44 E. Petryayeva and U. J. Krull, <i>Anal. Chim. Acta</i> , 2011, <b>706</b> , 8–24.  |   |



## D) Conclusion

Pour conclure sur cette partie, j'ai apporté la preuve de concept du couplage QCM/SERS et démontré que le capteur QCM/SERS était fonctionnel. J'ai pu observer l'interaction entre la streptomycine et son aptamère. Cette étude a montré que lorsque la streptomycine interagit avec l'aptamère, la signature SERS de l'aptamère est modifiée. Ce capteur pourrait être utilisé pour détecter de la streptomycine mais il reste encore à effectuer des études de calibrage et de reproductibilité. J'ai pu capter une concentration de streptomycine allant de 50 nM à 1000 nM.

De plus j'ai étudié une méthode permettant de réaliser des nanostructures sur de grandes surfaces mais elle n'a pu être exploitée dans notre cas à cause du coût des quartz de QCM utilisés pour notre capteur. Recouvrir totalement la surface de nanostructures n'est pas une nécessité car le capteur fonctionne avec de petites surfaces nanostructurées mais cela nous permettrait d'obtenir un signal SERS plus facilement et nous permettrait de capter plus de streptomycine.

Il est possible de comparer ce capteur avec d'autres pour en évaluer l'efficacité. Dans une étude utilisant un aptamère pour détecter de la thrombine<sup>81</sup> mais sans nanostructures. Dans cette étude, ils ont détecté avec la QCM des concentrations jusqu'à 1 nM de thrombine. En effet, ici il mesure la fluorescence et le potentiel électrochimique qui permet de descendre jusqu'à cette valeur.

Dans une autre étude<sup>43</sup>, un capteur permet de détecter la MnSOD de manière sensible avec des nanostructures et des mesures SERS. Dans cette étude il est possible de voir des mouvements des bandes SERS avec l'accroche de la cible par l'aptamère et ils ont réussi à détecter des concentrations de 10 nM.

Une étude basée sur la QCM pour la détection de l'immunoglobulines (IgE)<sup>82</sup> a été effectuée en recouvrant la surface avec l'aptamère spécifique. Dans ce cas, la limite de détection allant jusqu'à 2.5 µg/L donc environ 13 pM. Ici la limite est très basse mais il n'y a pas d'étude sur l'interaction entre l'aptamère et la cible.

Au vu de ces études, il est possible de voir que en couplant les deux techniques j'ai pu atteindre des niveaux comparables à ce qu'il est possible d'avoir dans la littérature. Par contre le couplage permet de rajouter des informations supplémentaires sur l'interaction entre l'aptamère et la streptomycine.

## E) Bibliographie

43. Cottat M, D'Andrea C, Yasukuni R, et al. High Sensitivity, High Selectivity SERS Detection of MnSOD Using Optical Nanoantennas Functionalized with Aptamers. *J Phys Chem C*. 2015;119(27):15532-15540. doi:10.1021/acs.jpcc.5b03681
78. Soheili V, Taghdisi SM, Khayyat MH, Bazzaz BSF, Ramezani M, Abnous K. Colorimetric and ratiometric aggregation assay for streptomycin using gold nanoparticles and a new and highly specific aptamer. *Microchimica Acta*. 2016;5(183):1687-1697. doi:10.1007/s00604-016-1798-3
80. Quilis NG, Lequeux M, Venugopalan P, et al. Tunable laser interference lithography preparation of plasmonic nanoparticle arrays tailored for SERS. *Nanoscale*. 2018;10(21):10268-10276. doi:10.1039/C7NR08905H
81. Hianik T, Ostatná V, Zajacová Z, Stoikova E, Evtugyn G. Detection of aptamer–protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005;15(2):291-295. doi:10.1016/j.bmcl.2004.10.083
82. Yao C, Qi Y, Zhao Y, Xiang Y, Chen Q, Fu W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(8):2499-2503. doi:10.1016/j.bios.2008.12.036

## Conclusion

Dans ce manuscrit j'ai eu l'occasion de présenter mes travaux de thèses liés au couplage entre deux méthodes de détection : la QCM et le SERS. Il est intéressant de développer un capteur avec ce couplage pour obtenir les informations de ces deux techniques. Le SERS nous permet l'identification des interactions et la QCM nous permet d'obtenir une mesure quantitative des différentes molécules à la surface.

Dans un premier temps, j'ai eu l'opportunité d'optimiser les substrats plasmoniques. En effet j'ai pu optimiser les conditions de préparation de lithographie électronique pour obtenir des échantillons sur lesquels j'ai fait varier le diamètre entre 80 et 250 nm. Cela m'a permis d'étudier le mouvement des bandes plasmoniques lorsque le diamètre est modifié. J'ai réussi à relier les bandes plasmoniques obtenues avec les différents phénomènes mis en jeu pour ce type d'échantillon dans le but d'optimiser la réponse des nanostructures et du substrat plasmonique en vue de son intégration dans le transducteur bimodal. Cette étude plasmonique a été suivie d'une étude SERS pour connaître la réponse des différentes nanostructures en fonction du diamètre. Cette étude m'a permis de voir que la réponse SERS est significative pour une excitation avec un LASER à 785 nm. J'ai aussi pu voir que j'obtenais la meilleure réponse SERS pour les structures avec un diamètre de 250 nm.

J'ai donc pu sélectionner les paramètres de fabrication pour assembler le transducteur sur les quartz de QCM. J'ai donc choisi un diamètre de 250 nm une périodicité de 400 nm et une hauteur de nanocylindre de 50 nm.

Pour concevoir le biocapteur j'ai recouvert 9 zones de ces nanostructures pour pouvoir vérifier l'homogénéité de mes échantillons. J'ai optimisé le protocole de nettoyage ainsi que celui de fonctionnalisation pour ces échantillons particuliers. Ainsi j'ai fonctionnalisé la surface avec l'aptamère conçu pour capter la streptomycine. Puis j'ai bloqué la surface en utilisant un PEG thiol et ainsi pouvoir bloquer la surface. J'ai ensuite fait différentes injections streptomycine pour pouvoir mesurer la différence de fréquence lié à l'interaction de fréquences entre l'aptamère et la streptomycine. De cette étude j'ai pu imaginer une disposition du PEG et de l'aptamère à la surface. De plus j'ai pu confirmer que le capteur me permet de détecter l'arrivée de la streptomycine en faisant des mesures séparées.

Cette étude m'a permis d'envisager de faire la mesure en simultanée afin de faire le lien entre les deux techniques.

Lors de la mesure en simultanée j'ai pu voir que le capteur permet d'obtenir les mesures en parallèle et m'a permis de relier les deux techniques. Cette mesure en simultanée m'a permis de voir que la streptomycine change la conformation de l'aptamère car les bandes SERS ont bougé suite à l'interaction avec la streptomycine. Ceci a pu être confirmé avec la diminution de la dissipation lors des mesures de QCM-D qui montre que la streptomycine va rigidifier la couche à la surface en s'accrochant à l'aptamère.

Cette thèse s'est reposée sur l'ANR Franco-Autrichienne NANOBIOSENSOR qui avait pour but de concevoir un capteur couplant le SERS et la QCM. Cet objectif a pu être atteint. Mais il est possible d'aller plus loin.

Pour ce capteur conçu pour détecter la streptomycine, il reste encore des expériences à mettre en place. Par exemple il pourrait être fait des expériences supplémentaires en milieu simple pour pouvoir connaître la limite de détection du capteur. De plus il serait possible de

## Conclusion

faire des mesures supplémentaires dans un milieu complexe pour déterminer la capacité de ce capteur à détecter un analyte dans une matrice complexe comme le lait.

Une autre modification possible de ce capteur pourrait être de changer la cible du capteur et donc changer de biorécepteur. Il serait ainsi possible de réutiliser le système en optimisant à nouveau la conception du biocapteur.



## RÉSUMÉ

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre du projet ANR Franco-Autrichien NANOBIOSENSOR, qui a pour but de concevoir un biocapteur QCM/SERS pour capter des molécules de faibles poids moléculaires. Le développement de transducteurs nanostructurés m'a permis d'obtenir une meilleure reproductibilité et fiabilité des mesures. En effet, l'utilisation des nanostructures doit m'a permis d'acquérir le signal SERS des molécules attachées à la surface et de les identifier. De plus, en couplant ces nanostructures avec un quartz de QCM, j'ai pu quantifier le nombre de molécules déposées à la surface. Le couplage QCM/SERS ouvre donc la voie à l'observation, l'identification et la quantification des analytes à détecter.

Dans ce contexte, ce couplage a deux objectifs distincts : (i) améliorer la compréhension des interactions moléculaires entre une cible et son biorécepteur ((la streptomycine et un aptamère pour cette thèse) et (ii) coupler ces deux méthodes pour développer un capteur permettant la détection d'analytes de faibles tailles.

DISCIPLINE : Chimie

MOTS-CLÉS : Nanostructures d'or, SERS, Plasmonique, QCM, Aptamère, Streptomycine, Interaction moléculaire, capteur

## Abstract

### Biodetection of small analytes with resonant nanostructures

This project is based on ANR project named Nanobiosensor, have for goal to make a QCM/SERS biosensor to sense small analytes. Development of transducer with nanostructures allow to obtain a better reproducibility and measurement reliability. Gold nanostructures allow me to acquire SERS measurement of molecule on the surface and identify it. Moreover, the nanostructures on quartz ship allow me to quantify how many molecules I have on the surface. The coupling of QCM/SERS allow me the access of identification, quantity and observation of small analyte.

This coupling has two main goal, the first is to improve the understanding of molecular interaction between streptomycin and the bioreceptor. And the second, the coupling of these two methods allow to develop a sensor to detect small analytes.

DISCIPLINE: Chemistry

KEYWORDS: Gold Nanostructures, SERS, Plasmonic, QCM, Aptamer, Streptomycin, Molecular interaction, sensor

Laboratoire CSPBAT UMR7244, UFR Santé, Médecine et Biologie Humaine, Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny

Sorbonne Université, Campus Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Réactivité de Surface, 4, place Jussieu F75005, Paris, France