

Université de Montréal

**Détection de protéines par diffusion Raman exaltée par
effet de pointe (TERS)**

par
Rita Faid

Département de Chimie, Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Juillet 2014

© Rita Faid, 2014

Résumé

La concentration locale des messagers chimiques sécrétés par les cellules peut être mesurée afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés à diverses maladies, dont les métastases du cancer. De nouvelles techniques analytiques sont requises pour effectuer ces mesures locales de marqueurs biologiques à proximité des cellules. Ce mémoire présentera le développement d'une nouvelle technique basée sur la réponse plasmonique sur des leviers AFM, permettant d'étudier les réactions chimiques et biologiques à la surface des leviers grâce au phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR), ainsi qu'à la diffusion Raman exaltée par effet de pointe (TERS). En effet, il est possible de localiser l'amplification du signal Raman à la pointe d'un levier AFM, tout comme le principe de la diffusion Raman exaltée par effet de surface (SERS) basée sur la diffusion de la lumière par des nanoparticules métalliques, et permettant une large amplification du signal Raman. La surface du levier est recouverte d'une nano-couche métallique d'or, suivi par des réactions biologiques pour l'immobilisation d'un récepteur moléculaire, créant ainsi un biocapteur sur la pointe du levier. Une détection secondaire utilisant des nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps secondaire permet également une amplification du signal SPR et Raman lors de la détection d'antigène. Ce mémoire démontrera le développement et la validation de la détection de l'immunoglobuline G (IgG) sur la pointe du levier AFM.

Dans des projets futurs, cette nouvelle technique d'instrumentation et d'imagerie sera optimisée grâce à la création d'un micro-détecteur protéique généralement adapté pour l'étude de la communication cellulaire. En intégrant le signal SPR à la microscopie AFM, il sera alors possible de développer des biocapteurs SPR couplés à une sonde à balayage, ce qui permettra d'effectuer une analyse topographique et de l'environnement chimique d'échantillons cellulaires en temps réel, pour la mesure des messagers moléculaires sécrétés dans la matrice extracellulaire, lors de la communication cellulaire.

Mots-clés : résonance des plasmons de surface, microscopie à force atomique, biodétection, nanoparticules d'or, exaltation du signal Raman diffusé par effet de pointe

Abstract

Measurement of the local concentration of chemical messengers secreted by cells may give a better understanding of molecular mechanisms related to different diseases, such as cancer metastasis. Current techniques are not suited to perform such measurements and thus, new analytical techniques must be developed. This Master's thesis reports the development of a new technique based on the plasmonic response of atomic force microscopy (AFM) tips, which will ultimately allow monitoring of chemical and biological molecules on the surface of a cantilever by use of surface plasmon resonance (SPR) and tip-enhanced Raman scattering (TERS). Indeed, it is possible to localize the enhancement of the Raman signal on the AFM tip using principles associated to surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), based on the absorption of light by nanometer-sized metal particles, resulting in a large enhancement of the Raman signal. The AFM tip was constructed by the deposition of a nanometer-size gold layer, followed by the assembly of a biosensor with a biomolecular receptor. Gold nanoparticles (AuNPs) conjugated with a secondary antibody served as the secondary detection step. In addition, the use of the gold nanoparticles for antigen detection allows an amplification of the SPR and Raman signals. This Master's thesis will demonstrate the development and validation of a biosensor for immunoglobuline G (IgG) at the tip of an AFM cantilever.

This thesis sets the basis for future projects, where this new imaging technique will be developed for monitoring cellular communication by exploiting the plasmonic signal at the AFM tip. Different biosensors will then be developed and coupled to an AFM probe for scanning the chemical environment and detect in real-time chemical messengers secreted in the extracellular matrix in cellular communication.

Keywords : surface plasmon resonance, atomic force microscopy, biodetection, gold nanoparticles, Tip-enhanced Raman scattering

Table des matières

1	Introduction.....	1
1.1	Biocapteurs	2
1.1.1	Fonctionnement d'un biocapteur.....	3
1.1.2	Types de détection biologique	4
1.1.3	Applications des biocapteurs	6
1.2	Spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR).....	7
1.2.1	Origines de la SPR.....	7
1.2.2	Théorie de la SPR	8
1.2.2.1	Résonance des plasmons de surface	9
1.2.2.2	Propriétés physiques du plasmon de surface	10
1.2.3	Aspect instrumental de la SPR.....	16
1.2.3.1	Excitation des plasmons de surface par configuration de Kretschmann.....	17
1.2.4	Acquisition d'un spectre SPR.....	18
1.2.4.1	Spectre SPR par variation des longueurs d'ondes.....	19
1.2.4.2	Variation des angles.....	19
1.2.5	Propriétés plasmoniques des colloïdes.....	20
1.2.5.1	Effet des nanoparticules métalliques	20
1.2.5.2	Phénomène de résonance des plasmons de surface localisé (<i>Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR</i>)	21
1.3	Diffusion Raman et diffusion du signal Raman exalté par effet de surface (SERS) 24	
1.3.1	La diffusion Raman.....	25
1.3.2	La diffusion Raman exaltée par effet de surface (SERS) : une technique d'amplification du signal spectroscopique	29
1.3.2.1	Théorie du SERS.....	29
1.3.2.2	Détection SERS d'une molécule unique.....	31
1.3.2.3	Interactions dipolaires et modes de résonance plasmonique	32
1.4	Exaltation du signal Raman diffusé par effet de pointe (TERS)	34
1.4.1	Théorie du TERS	34
1.4.1.1	Amplification du champ avec une nanoparticule unique.....	35

1.4.1.2	Pointe de levier AFM comme substrat TERS.....	36
1.4.1.3	Couplage plasmonique entre pointe TERS et nanoparticules métallisées	38
1.4.1.4	Propriétés plasmoniques d'une pointe TERS	40
1.4.2	Applications du TERS	40
1.5	Objectifs du projet.....	42
2	Partie expérimentale.....	44
2.1	Biodétection sur substrats nano-structurés.....	44
2.1.1	Préparation des réseaux nano-structurés : nano-triangles d'Au.....	44
2.1.2	Caractérisation des nano-triangles d'or	46
2.1.3	Formation d'un biocapteur à la surface des nano-triangles d'or et analyses cinétiques en SPR	48
2.2	Détection secondaire d'IgG par l'utilisation de nanoparticules d'or	50
2.2.1	Synthèse des nanoparticules d'Au.....	50
2.2.1.1	Synthèse des nanoparticules d'Au sphériques	50
2.2.1.2	Synthèse des nanoparticules d'or framboises (nano-framboises).....	51
2.2.2	Formation de la monocouche auto-assemblée DSNB recouvrant les AuNPs	52
2.2.3	Conjugaison des nanoparticules d'Au sphériques.....	53
2.2.4	Préparation des leviers d'AFM.....	55
2.2.5	Formation des complexes protéine-anticorps à la surface des leviers d'AFM	57
2.2.6	Caractérisation par diffusion Raman	58
2.2.7	Caractérisation par microscopie en champ sombre des complexes protéines-anticorps construits sur les leviers	58
3	Biodétection sur réseaux périodiques nano-structurés.....	60
3.1	Propriétés plasmoniques des réseaux de nano-triangles	60
3.1.1	Localisation de l'amplification du champ électromagnétique aux différentes régions des nano-triangles d'or	61
3.1.2	Caractérisation AFM des nano-triangles d'or.....	64
3.1.3	Spectroscopie LSPR des nano-triangles d'or en réflexion totale interne	65
3.2	Mesures spectroscopiques de la biodétection sur les réseaux périodiques	67
3.2.1	Caractérisation SPR de la biodétection à la surface des films nano-structurés	67
3.2.1.1	Résonance de plasmons de surface pour les nano-triangles fonctionnalisés	67

3.2.1.2	Cinétique SPR observée pour la formation d'un complexe anticorps-protéine à la surface des nano-triangles	69
3.2.2	Caractérisation SERS de la biodétection à la surface des films nano-structurés ..	71
3.3	Perspectives d'intégration instrumentale du SPR à l'AFM	73
4	Biodétection sur des leviers d'AFM.....	75
4.1	Caractérisation des nanoparticules d'Au sphériques conjuguées	75
4.1.1	Caractérisation par TEM et UV-Vis	76
4.1.2	Caractérisation par microscopie électronique à balayage (<i>Scanning Electron Microscopy</i> , SEM)	79
4.1.3	Caractérisation par microscopie en champ sombre (<i>Dark-field Microscopy</i> , DFM)	81
4.2	Biodétection d'anti-IgG sur leviers d'AFM.....	84
4.2.1	Caractérisation TERS.....	85
4.2.1.1	Détection directe d'anticorps	89
4.2.1.2	Détection secondaire d'anticorps	91
4.2.1.3	Courbes d'étalonnage pour la biodétection de l'IgG	93
4.2.1.4	Localisation de l'exaltation du signal.....	104
4.2.1.5	Sélectivité et spécificité du biocapteur pour l'IgG	105
4.3	Utilisation de nanoparticules "framboises".....	108
4.3.1	Caractéristiques physiques des nano-ramboises d'or (AuNFs)	108
4.3.2	Caractérisation SERS des nano-ramboises d'or.....	111
5	Conclusions.....	113
5.1	Perspectives : vers le développement de biocapteurs basés sur le <i>patch-clamp</i> avec l'utilisation de capillaires étirés comme pointes alternatives	115
6	Bibliographie.....	117
7	Annexe	i
7.1	Techniques de caractérisation physiques basées sur la microscopie	i
7.1.1	Microscopie à force atomique (<i>Atomic Force Microscopy</i> , AFM).....	i
7.1.1.1	Principe de la microscopie à force atomique	ii
7.1.1.2	Modes d'analyses AFM	iv
7.1.1.3	Rôles alternatifs d'une pointe AFM.....	vi

7.1.2 Microscopie en champ sombre vii

Liste des symboles et abréviations

16-MHA	Acide 16-mercaptophexadécanoïque / <i>16-mercaptophexadecanoic acid</i>
a	Rayon sphérique d'une particule
AFM	Microscopie à force atomique / <i>Atomic force microscopy</i>
Anti-IgG / AI	Anti-Immunoglobuline G / <i>Anti-Immunoglobulin G</i>
AuNFs	Nano-framboises d'or
AuNPs	Nanoparticules d'or sphériques / <i>Spherical gold nanoparticles</i>
AuNPs / anti-IgG	Nanoparticules d'or sphériques conjuguées aux anti-Immunoglobulines G / <i>Spherical gold nanoparticles conjugated with anti-Immunoglobulin G</i>
ATR	Réflexion totale atténuée / <i>Attenuated total reflection</i>
BSA	Albumine de sérum bovin / <i>Bovine serum albumin</i>
C	Concentration de l'adsorbat
C_s	Concentration saturante
d	Distance inter-particulaire
d_{gap}	Distance de la jonction entre les nanoparticules
DFM	Microscopie en champ sombre / <i>Dark-field microscopy</i>
DLS	Diffusion dynamique de la lumière / <i>Dynamic light scattering</i>
DNBA	5,5' - Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
DSNB	5,5' - Dithiobis (succinimidyl-2-nitrobenzoate)
E	Champ électrique incident
e	Charge des électrons
EDC	Éthyl (diméthyleaminopropyle) carbodiimide
EM	Électromagnétique
$E_{out}(\omega)$	Champ électromagnétique résultant de l'excitation incidente
$E_{out}(\omega-\omega_v)$	Champ électromagnétique résultant du déplacement Raman Stokes
g	Unité d'accélération
h	Épaisseur du film métallique
i	Nombre imaginaire

I_{NRS}	Intensité Raman normale
I_{SERS}	Intensité d'amplification Raman
IR	Infrarouge
IgG	Immunoglobuline G / <i>Immunoglobulin G</i>
$K_{ads.}$	Constante d'équilibre de la réaction d'adsorption d'une molécule de soluté à la surface d'un site actif
k_0	Vecteur d'onde de la lumière incidente
k_{spp}	Vecteur d'onde provenant des plasmons de surface propagatifs
k_x	Vecteur d'onde de la lumière en réflexion totale interne
l_d	Distance de pénétration / <i>Decay length</i>
LSPR	Résonance des plasmon de surface localisée / <i>Localized surface plasmon resonance</i>
m_e	Masse effective
N	Nombre d'Avogadro
Δn	Variation de l'indice de réfraction induite par la liaison entre le récepteur moléculaire et l'analyte
n_e	Densité électronique
$N_{surf.}$	Nombre de molécules liées à la surface métallique amplificatrice
$N_{vol.}$	Nombre de molécules dans le volume d'excitation
NHS	N-hydroxysuccinimide
NSL	Lithographie de nanosphères / <i>Nanosphere lithography</i>
P	Amplitude de la polarisation induite
PBS	Solution tampon phosphate / <i>Phosphate buffer solution</i>
PSA	Antigène prostatique spécifique / <i>Prostate specific antigen</i>
RI	Indice de réfraction / <i>Refractive index</i>
rpm	Tour par minute / <i>Revolution per minute</i>
RTI	Réflexion totale interne
SAM	Monocouche auto-assemblée / <i>Self-assembled monolayer</i>
SECM	Microscopie électrochimique à balayage / <i>Scanning electrochemical microscopy</i>
SEM	Microscopie électronique à balayage / <i>Scanning electron microscopy</i>

SERS	Diffusion du signal Raman exalté par effet de surface / <i>Surface-enhanced Raman scattering</i>
SNOM	Microscopie en champ proche / <i>Scanning near-field optical microscopy</i>
SP	Plasmons de surface / <i>Surface plasmons</i>
SPM	Microscopie à sonde locale / <i>Scanning probe microscopy</i>
SPR	Résonance des smons de surface / <i>Surface plasmon resonance</i>
SPP	Polariton de plasmons de surface / <i>Surface plasmon polariton</i>
STM	Microscopie à effet tunnel / <i>Scanning tunneling microscopy</i>
TE	Onde lumineuse transverse électrique
TEM	Microscopie électronique à transmission / <i>Transmission electron microscopy</i>
TERS	Exaltation du signal Raman diffusé par effet de pointe / <i>Tip-enhanced Raman scattering</i>
TM	Onde lumineuse transverse magnétique
UV-Vis	Spectroscopie ultra-violet visible
α	Polarisabilité moléculaire
Γ	Concentration de surface en masse / aire
ϵ	Constante diélectrique
ϵ_0	Permittivité dans le vide
ϵ_i	Partie imaginaire de la constante diélectrique du métal
ϵ_m	Permittivité diélectrique relative, constante diélectrique externe du métal
ϵ_r	Partie réelle de la constante diélectrique du métal
η	Indice de réfraction
Θ	Fraction de sites d'adsorption
$\theta_{inc.}$	Angle d'incidence
λ	Longueur d'onde
ν	Fréquence de collision des électrons
ν_0	Fréquence du faisceau laser incident
ν_m	Fréquence de la vibration moléculaire
χ	Facteur de forme d'une nanoparticule

ω	Fréquence de radiation angulaire
ω_p	Fréquence de plasma (fréquence de Langmuir)

Liste des tableaux

Tableau 2.1 Caractéristiques et différences structurales des deux types de leviers analysés ... 56

Tableau 4.1 Bandes Raman et attribution aux acides aminés correspondants pour l'immunoglobuline G humaine..... 90

Liste des figures

- Figure 1.1 Représentation schématique d'un récepteur moléculaire (anticorps) immobilisé à la surface du matériel plasmonique (mince couche d'or) grâce à une monocouche auto-assemblée, et de la mesure directe de l'analyte (protéine). Le signal optique (longueur d'onde SPR) varie en fonction des interactions ayant lieu entre l'anticorps et la protéine (association ou dissociation des liens). 3
- Figure 1.2 Représentation schématique d'une détection en sandwich de l'analyte (protéine) par des récepteurs moléculaires primaire et secondaire (anticorps) sur un capteur..... 5
- Figure 1.3 Représentation de la résonance des plasmons de surface en mode propagatif et de la polarisation des charges à la surface d'un métal. Les plasmons se propagent selon les directions x et y le long de l'interface entre métal et milieu diélectrique sur des distances de l'ordre de 10 à 100 μm . Une décroissance d'intensité du champ évanescent selon l'axe z peut être observée jusqu'à une distance de l'ordre de 200 nm, proportionnellement à $1/e$. Reproduit avec la permission de la référence ²⁶. Copyright © 2007. Annual Reviews... 10
- Figure 1.4 Représentation théorique du phénomène de SPR avec équations des vecteurs d'ondes du SPP et de l'onde incidente. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008..... 13
- Figure 1.5 Représentation schématique d'un instrument SPR utilisant un prisme de Dove. Reproduit avec modifications à partir de la référence ⁴¹. Copyright © 2009, avec la permission de Elsevier. 16
- Figure 1.6 Couplage optique par un prisme en configuration de Kretschmann. 18

- Figure 1.7 Spectre SPR expérimental d'une goutte d'eau déposée à la surface d'un film d'or continu avec une sonde de fibre optique à angle constant. Reproduit avec la permission de la référence ⁴³. Copyright © 2009. American Chemical Society..... 19
- Figure 1.8 Phénomène de résonance de plasmons de surface en mode localisé (*Local Surface Plamon Resonance*, LSPR). La lumière interagit avec les particules dont la taille est inférieure à la longueur d'onde incidente. L'oscillation localisée d'un plasmon est observée autour de la nanoparticule. Reproduit avec la permission de la référence ²⁶. Copyright © 2007. Annual Reviews..... 21
- Figure 1.9 Spectre LSPR de nanoparticules d'argent dont les paramètres de taille et forme ont été variés. La longueur d'onde maximale d'extinction λ_{max} (absorption et diffusion) obtenue en spectroscopie UV-Vis change en fonction des variations de taille ; à savoir de largeur (paramètre a) et de hauteur (paramètre b), et de forme des nanoparticules d'argent. Reproduit partiellement à partir de la référence ⁶⁸. Copyright © 2005, avec la permission de Royal Society of Chemistry. 23
- Figure 1.10 Explication du phénomène de diffusion Raman comprenant les raies Stokes et anti-Stokes comparativement au phénomène de Rayleigh, et transitions d'énergies vibrationnels correspondantes. Figures tirées de la page web consultée en avril 2014 : http://eng.thesaurus.rusnano.com/upload/iblock/f85/pic_1.jpg..... 27
- Figure 1.11 Spectres IR et Raman du styrène-butadiène. Figure tirée de la page web consultée en avril 2014 : <http://www.ijvs.com/volume1/edition5> 28
- Figure 1.12 Simulation de la distribution du champ électrique (a) sur la pointe d'un levier AFM recouvert d'or et (b) sur la pointe d'un levier AFM recouvert d'or située à une distance de 2 nm d'un substrat d'or. La polarisation E et le vecteur d'onde k de la lumière incidente sont illustrés dans le schéma, et la composante M définit le maximum d'amplification du

- champ localisé. Reproduit avec la permission de la référence ¹¹³. Copyright © 2009, John Wiley & Sons, Ltd 37
- Figure 1.13 Représentation schématique de la mesure TERS sur une pointe métallique avec une nanoparticule à son extrémité. 38
- Figure 1.14 Spectre TERS obtenu pour la détection de nanoparticules conjuguées sur des membranes cellulaires. Reproduit avec la permission de la référence ¹²³ Copyright © 2012. American Chemical Society. 39
- Figure 1.15 Schéma simplifié de localisation du signal SPR à la pointe d'un levier AFM lors de phénomènes de communication cellulaire.¹⁴⁴ 42
- Figure 2.1 Lithographie de nanosphères (NSL) pour la formation de nano-triangles d'or 44
- Figure 2.2 Arrangement de particules de latex ayant un diamètre de 500 nm observé par A) Microscopie électronique à balayage (SEM) et B) Microscopie à force atomique (AFM). Reproduit à partir de la référence ¹⁴⁵. Copyright © 2005 avec la permission de The Royal Society of Chemistry..... 45
- Figure 2.3 Photo d'un montage SPR miniaturisé utilisant un prisme de Dove. Les composantes principales du montage sont la fibre optique d'entrée (1.a), la fibre optique de sortie (1.b), le prisme sur lequel l'échantillon est déposé (2), et le polariseur (3). 47
- Figure 2.4 Photo d'un montage SPR avec un système de micro-fluidique. Les composantes principales du système sont la fibre optique d'entrée (1.a), la fibre optique de sortie (1.b), le prisme (2) emprisonné à l'intérieur d'une cellule fluidique en Teflon (3), le polariseur (4), et le canal d'entrée (5.a) et de sortie (5.b) de fluide injecté à l'aide d'une seringue.. 49

- Figure 2.5 Activation des sites réactifs du DNBA par ajout d'une solution d'EDC et NHS :
synthèse du DSNB 52
- Figure 2.6 Réaction de conjugaison des AuNPs sphériques. Adapté avec la permission de la
référence ¹⁴⁹. Copyright © 2003. American Chemical Society. 53
- Figure 2.7 a) Image SEM d'une lamelle comportant deux types de pointes (A et B). b)
Grossissement d'une image SEM d'une pointe au bout d'un levier AFM. Images tirées à
partir du site web de la compagnie Nano-World :
Complete_NanoWorld_AFM_Probes_Brochure.pdf 55
- Figure 2.8 a) Image SEM d'un levier d'AFM et b) Intensité du champ réparti sur le levier ... 55
- Figure 2.9 À gauche, photo d'une lamelle de microscope sur laquelle sont collées 10 leviers
d'AFM recouverts d'or à l'aide d'une colle époxy. À droite, photo du système de puits
avec joints d'étanchéité, pour effectuer les réactions chimiques et biologiques à la surface
des leviers d'or emprisonnées entre deux plaques. 57
- Figure 3.1 (a) Intensité d'amplification du champ calculé, (b) dispersion, et (c) distribution du
champ pour un nano-triangle. Reproduit à partir de la référence ¹⁵³. L'éditeur Beilstein
Journal of Nanotechnology ne requiert pas de demande de permission pour la reproduction.
..... 62
- Figure 3.2 (a) Image SEM de la région à la jonction de deux nano-triangles. La flèche indique
une nano-ablation causée par l'irradiation du laser pulsé (pour le dépôt de couche mince),
et (b) distribution d'intensité du champ proche calculé pour la région centrale située entre
deux pointes de nano-triangles. Reproduit à partir de la référence ¹⁵³. L'éditeur Beilstein
Journal of Nanotechnology ne requiert pas de demande de permission pour la reproduction.
..... 63

Figure 3.3 Images AFM de nano-triangles d'or de périodicité (a) 820 nm et de (b) 3,2 μm 64

Figure 3.4 Spectres SPR des nano-triangles de différentes tailles effectuées en configuration de Kretschmann. La courbe verte correspond aux triangles d'une périodicité de 820 nm, la courbe bleue correspond aux triangles d'une périodicité de 1000 nm, et la courbe rouge correspond aux triangles d'une périodicité de 3,2 μm . Il est possible d'observer un déplacement vers de plus grandes longueurs d'ondes lorsque la taille des triangles augmente. 65

Figure 3.5 a) Cinétique SPR observée pour la détection directe d'IgG à la surface des nano-triangles fonctionnalisés à l'aide d'une monocouche de DNBA. La première étape correspond à l'ajout d'EDC / NHS favorisant un déplacement de la bande SPR ; par la suite une solution de phosphate à pH 4,5 a été ajoutée; puis une solution d'anti-IgG a été introduite dans le système, suivi de l'ajout de EtOH-NH₂. Une solution de PBS à pH 7 a ensuite été injectée suivi de l'ajout d'une solution d'IgG, et de nouveau d'une solution de PBS à pH 7. L'encadré rouge correspond au grossissement de l'étape 6 pour la détection d'IgG. b) Cinétique mesurée en SPR pour les mêmes étapes d'une détection immunologique directe typique d'IgG pour un film d'or et pour une surface micro-structurée. Malgré le fait que la réponse soit plus bruyante et la ligne de base moins stable pour les nano-triangles, les réactions sont également observées sur ce substrat. 69

Figure 3.6 Empreinte spectrale Raman du DSNB et groupements caractéristiques identifiés pour chaque pic du spectre. Adaptée et reproduit avec la permission de la référence ¹⁴⁹. Copyright © 2003. American Chemical Society. 71

Figure 3.7 Spectre SERS du DSNB (molécule représentée en haut à gauche du spectre) sur les nano-triangles d'or. Les mesures ont été prises à différentes régions sur les nanostructures. 72

Figure 3.8 Montage instrumental pour le couplage d'un signal SPR à un levier AFM¹⁴⁴ 73

Figure 4.1 Image TEM de AuNPs sphériques d'environ 33 nm.....	77
Figure 4.2 Histogramme de la taille des nanoparticules d'or sphériques déterminé par des mesures en TEM. Le diamètre moyen est de 33 ± 7 nm.....	77
Figure 4.3 Déplacement de la bande d'absorption pour des AuNPs en spectroscopie par UV-Visible avant (courbe orange) et après fonctionnalisation avec la monocouche de DSNB et anti-IgG (courbe bleue).....	78
Figure 4.4 a) Image SEM des AuNPs sur levier d'AFM. b) Grossissement de l'image a) SEM pour la pointe	80
Figure 4.5 Image caméra du levier AFM en microscopie en champ sombre.	82
Figure 4.6 Spectre de diffusion des nanoparticules en microscopie en champ sombre pour les leviers de type A (petits leviers) à différentes concentrations d'IgG détecté comprises entre 0,1 nM et 2000 nM.....	83
Figure 4.7 Spectre de diffusion des nanoparticules en microscopie en champ sombre pour les leviers de type B (grands leviers) à différentes concentrations d'IgG détecté comprises entre 0,1 nM et 1000 nM.....	83
Figure 4.8 Images obtenues à partir de calculs après balayage en DFM de leviers AFM sur lesquels un biocapteur a été construit à l'aide des AuNPs conjuguées pour la détection de 100 nM d'IgG. Les contours du levier ont été surlignés en blanc.	84
Figure 4.9 Schéma d'un système TERS en mode "back-reflection". Reproduit à partir de la référence ¹⁰² . Copyright © 2008, avec la permission de Royal Society of Chemistry.	86

- Figure 4.10 Schéma de la polarisation P de la radiation au niveau de la pointe métallique. Reproduit à partir de la référence ¹⁰². Copyright © 2008, avec la permission de Royal Society of Chemistry..... 87
- Figure 4.11 Spectres TERS des anticorps IgG et Anti-IgG. Les analyses TERS ont été effectuées à l'aide d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations. 89
- Figure 4.12 Schéma pour un système de détection secondaire d'une protéine IgG à l'aide de nanoparticules d'or conjuguées sur une pointe de levier AFM ayant un revêtement métallique..... 92
- Figure 4.13 Spectres TERS pour la détection secondaire d'IgG à différentes concentrations comprises entre 100 nM et 1000 nM. Six concentrations d'IgG détecté ont été analysées. Les analyses TERS ont été effectuées à l'aide d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations. 93
- Figure 4.14 Étalonnage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type A (petit levier) pour des concentrations allant de 1 à 500 nM..... 95
- Figure 4.15 Étalonnage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type B (grand levier) pour des concentrations allant de 1 à 500 nM..... 95
- Figure 4.16 Étalonnage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type A (petit levier) pour des concentrations allant de 0,1 à 1000 nM..... 97

- Figure 4.17 Étalonage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type B (grand levier) pour des concentrations allant de 0,1 à 1000 nM..... 97
- Figure 4.18 Tendence observée pour l'isotherme de Langmuir. Figure tirée du site web : <http://www.chemistrylearning.com/adsorption-isotherm/> 100
- Figure 4.19 Modélisation de l'isotherme de Langmuir appliqué sur la courbe d'étalonnage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type A (petit levier) pour des concentrations allant de 1 à 500 nM..... 101
- Figure 4.20 Comparaison de l'intensité du signal Raman pour la biodétection secondaire de 100 nM d'IgG à l'aide de AuNP-DSNB-anti-IgG sur leviers fonctionnalisés d'une couche d'or et d'anti-IgG à différentes régions du bras du levier. Les analyses TERS ont été effectuées à l'aide d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations. 104
- Figure 4.21 Comparaison de l'intensité du signal Raman pour la biodétection de 100 nM d'IgG à l'aide des AuNPs conjuguées à l'anti-IgG via le DSNB sur leviers fonctionnalisés d'une couche d'or et d'anti-IgG (courbe bleue). On compare cette variation d'intensité Raman à celle obtenue pour la biodétection de 100 nM de BSA (courbe verte), ainsi qu'à celle correspondant à la détection de 100 nM d'IgG par l'anti-IgG directement (courbe rouge). Les analyses TERS ont été effectuées à l'aide d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations. 106
- Figure 4.22 Image TEM de nano-framboises ayant un diamètre d'environ 73 nm..... 108
- Figure 4.23 Histogramme de la taille des nano-framboises d'or déterminé par des mesures en TEM. Le diamètre moyen est de 73 ± 6 nm. 109

- Figure 4.24 Spectre d'absorption UV-Vis des nano-framboises d'or. L'absorbance maximale est observée à une longueur d'onde de 592 nm..... 109
- Figure 4.25 Spectres SERS de nano-framboises d'or fonctionnalisées avec le DNSB. La courbe bleue représente le signal SERS obtenu avec un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm. La courbe rouge représente le signal SERS obtenu avec un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 785 nm. Les analyses TERS ont été effectuées avec un laser à 633 nm ou 785 nm à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations. 112
- Figure 5.1 Images SEM de l'ouverture à la pointe d'un capillaire de verre. L'image de gauche représente le capillaire recouvert d'une fine couche d'or. L'image de droite représente le capillaire recouvert d'or qui a été immergé dans une suspension colloïdale..... 116
- Figure 7.1 Représentation schématique d'un système de balayage AFM..... iii
- Figure 7.2 Courbe représentant les forces de Van Der Waals en fonction de la distance interatomique et des modes AFM. Reproduit avec la permission de la référence ¹⁹³. Copyright © 2010, Springer..... vi
- Figure 7.3 Représentation schématique du principe d'un microscope en champ sombre. Reproduit avec la permission de la référence ¹⁹⁴. Copyright © 2006, Springer. viii

*« Dans la vie, rien n'est à craindre,
tout est à comprendre. »*

Marie Curie

Remerciements

Je dédie ce mémoire à mes parents qui, au-delà de leur soutien et de leur amour inconditionnel, ont toujours su nous faire partager leur passion commune pour l'apprentissage et les études. Je ne serais pas là où j'en suis sans eux, et je les remercie de tout ce qu'ils ont et continuent à m'apporter dans la vie. Je suis fier d'être votre fille, ainsi que de tout ce que vous m'avez inculqué. Je vous aime fort!

Je tiens à remercier de tout cœur mon directeur de recherche Jean-François Masson, pour avoir cru en moi, et m'avoir engagé au sein de son groupe. Merci d'avoir partagé cette passion de la science en étant un modèle de motivation et de persévérance. Un professeur exceptionnel, qui sait encore être présent pour ses étudiants c'est rare, il n'y a aucun doute possible que tu feras un père formidable!

Ce mémoire n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien de ma famille, ni de mes amis qui m'ont supporté durant ma maîtrise. Je remercie mes grands-parents pour leur soutien indéfectible et leur amour. À mes deux sœurs, puisse la vie vous gâter car vous le méritez. Merci à Jul pour son soutien et sa patience, merci à Simon qui a su être présent pour me supporter et m'encourager, merci à Philou, Michèle, Zak, Audrey, Drey, Julien, Carl et sa sambuca, et à tous mes proches que je n'ai pas cités mais que je n'oublie pas, et avec qui j'ai passé mes plus belles années universitaires.

Je remercie tous mes collègues de travail que j'ai côtoyé durant ma maîtrise : Natalia Bukar, merci d'avoir été là pour moi (avec du chocolat) tant dans les moments difficiles que dans les moments joyeux, Julien Breault-Turcot, Simon Forest, Maxime Couture, Hélène Yockell-Lelièvre, Hu Zhu, Marc Vidal, Alexandra Aubé, Hugo-Pierre Poirier Richard, Gabrielle Lajoie, Geneviève Granger, Félix Lussier, Jérémie Labrecque-Carbonneau, Corentin Geny. Petite dédicace aux anciens du groupe qui ont souvent été là pour m'aider dans mes recherches : Ludovic Live, Sandy Shuo Zhao, et Mathieu Ratel.

Merci à tous ceux qui ont contribué de proche ou de loin à la rédaction de ce mémoire.

Rien n'est fini, tout commence...

1 Introduction

Les mesures localisées de messagers chimiques et biologiques sécrétés par les cellules vivantes sont présentement difficiles et peu quantitatives. De nouvelles techniques analytiques, telles que décrites dans ce mémoire, sont requises pour effectuer ces mesures importantes dans la compréhension des phénomènes de communication intercellulaire impliqués dans la biologie de diverses maladies. Ce mémoire présente donc les résultats à la base d'un projet pour le développement d'une nouvelle technique analytique basée sur la réponse plasmonique localisée sur des leviers de microscope à force atomique (AFM). Le mémoire se concentre principalement sur le développement d'un biocapteur localisé sur la pointe d'un levier AFM, prémisses du développement de la technologie, ainsi que sur la mise au point des techniques de mesures associées à ce biocapteur. Les recherches effectuées permettront éventuellement la quantification localisée de messagers chimiques et biologiques à proximité des cellules vivantes grâce à la spectroscopie de résonance de plasmons de surface à la surface des leviers, ainsi qu'à la diffusion Raman exaltée par effet de pointe. Le but de ce projet est donc de développer un nouvel outil spectroscopique basé sur les plasmons de surfaces, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés à la communication cellulaire (*i.e.* métastases du cancer), et permettant la détection et les mesures de concentrations locales de messagers chimiques sécrétés par les cellules.

Depuis de nombreuses années, la plasmonique occupe un intérêt grandissant dans le monde de la recherche. Cette discipline étudie les propriétés des plasmons par le contrôle de la lumière et des propriétés optiques des matériaux métalliques nano-structurés. Plusieurs études contemporaines visent le développement d'outils analytiques capables de détecter des molécules biologiques à l'aide de ces techniques plasmoniques, notamment dans le cadre de recherches médicales.¹⁻⁵ Il est possible d'avoir recours aux propriétés plasmoniques de matériaux dans le but de trouver un moyen de détection assez sensible et spécifique pour être utilisé cliniquement.⁶ Dans le cadre de ce mémoire de maîtrise, il sera essentiel de considérer les phénomènes de localisation d'une réponse plasmonique sur la pointe d'un levier AFM dans le cas d'une détection

de matériel biologique. En intégrant le signal de résonance des plasmons de surface (SPR) à la microscopie AFM, il sera alors possible de développer des biocapteurs SPR couplés à une sonde à balayage, ce qui permettra dans de futurs projets d'effectuer une analyse topographique et de l'environnement chimique d'échantillons cellulaires en temps réel.

Pour établir les bases théoriques nécessaires à la compréhension de ce mémoire, les concepts importants reliés aux techniques analytiques utilisées dans le cadre de ce projet seront expliqués en introduction. Dans ce même chapitre, les principes propres à la résonance de plasmons de surface seront développés afin de mieux comprendre les phénomènes plasmoniques localisés à la pointe d'un levier lors de la construction de biocapteurs à leur surface, ainsi que le fonctionnement et l'utilisation de ces biocapteurs. Dans un deuxième temps, les sections de résultats correspondront aux étapes franchies pour caractériser les biocapteurs sur pointes de leviers d'AFM. Le chapitre 3 présentera une étude SPR de détection de biomolécules sur des substrats nano-structurés similaires à des pointes AFM. La synthèse et la caractérisation de nanoparticules d'or utilisées dans la stratégie de détection sur les pointes d'AFM seront ensuite décrites. Par la suite, les interactions biologiques caractérisant un biocapteur à la surface des leviers AFM pourront être détectées à l'aide de la spectroscopie Raman. Enfin, une ouverture sur les suites du projet sera discutée en conclusion, portant sur les stratégies pour favoriser une intégration du signal spectroscopique à la pointe du levier AFM.

1.1 Biocapteurs

Les capteurs présentent un intérêt grandissant dans le domaine de la recherche et développement pour la détection de nombreux analytes chimiques et biologiques. Les biocapteurs furent appliqués pour détecter quantitativement des analytes de façon spécifique dans de nombreux domaines, tels que les diagnostics médicaux⁷⁻⁹, les analyses environnementales¹⁰⁻¹³, ou encore alimentaires.¹⁴⁻¹⁵ La notion de détection associée à l'utilisation de biocapteurs est essentielle à comprendre dans le cadre de ce mémoire, puisqu'elle constitue l'essence même du projet.

1.1.1 Fonctionnement d'un biocapteur

Un biocapteur est un senseur utilisant des propriétés optique, électrochimique, massique ou magnétique afin d'analyser et mesurer les différentes interactions partagées entre un analyte spécifique et un récepteur moléculaire immobilisé à la surface du capteur. Lorsque la reconnaissance entre l'analyte et le récepteur moléculaire est établie, le signal chimique ou biologique généré par un changement de l'une de ses propriétés est converti en un signal de détection mesurable grâce à un transducteur. Finalement, ce signal est lui-même converti en un signal digital mesuré grâce au traitement de données effectué par un ordinateur convertissant ainsi ce signal en une concentration mesurable.

Une expérience en biocapteur se produit de la façon suivante. Le récepteur moléculaire est préalablement immobilisé à la surface du transducteur. Puis, lorsque l'analyte entre en contact avec le récepteur moléculaire à la surface du transducteur, celui-ci se lie au récepteur moléculaire. Cette liaison implique un changement du paramètre mesuré à la surface du capteur (Figure 1.1). Il est alors possible de mesurer l'interaction d'un récepteur avec son ligand à cause de la proportionnalité du changement des propriétés du transducteur induit par cette interaction. La variation des propriétés spécifiques au biocapteur dépend de la concentration d'analyte ayant interagit avec le récepteur moléculaire.

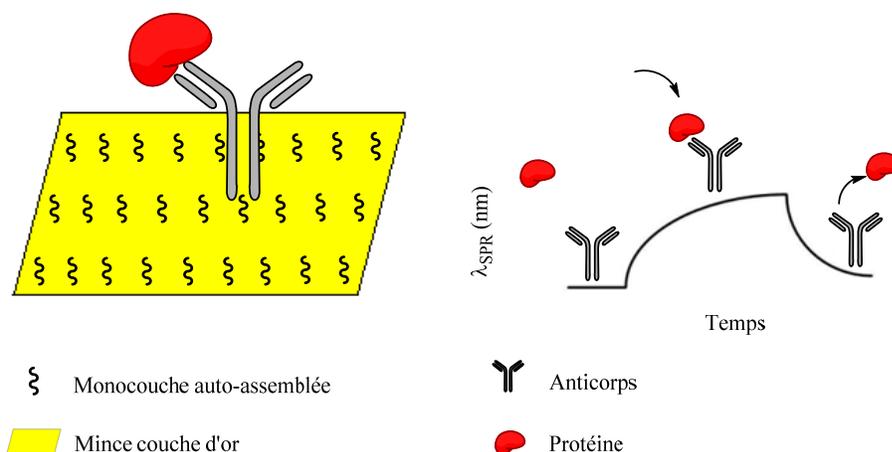


Figure 1.1 Représentation schématique d'un récepteur moléculaire (anticorps) immobilisé à la surface du matériel plasmonique (mince couche d'or) grâce à une monocouche auto-

assemblée, et de la mesure directe de l'analyte (protéine). Le signal optique (longueur d'onde SPR) varie en fonction des interactions ayant lieu entre l'anticorps et la protéine (association ou dissociation des liens).

Les récepteurs moléculaires permettant de lier l'analyte à la surface du transducteur constituent l'étape de reconnaissance pour générer la construction d'un biocapteur spécifique à un analyte, et sont généralement des molécules biologiques, telles que des anticorps, des aptamères, des enzymes, ou encore des brins d'ADN. Le résultat de cette étape de reconnaissance permet alors le changement d'un paramètre mesurable tel qu'un changement d'indice de réfraction ou de signal Raman.

1.1.2 Types de détection biologique

Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour la biodétection d'analytes sont la détection directe, les essais sandwich, et les essais compétitifs dans le cadre de la détection de protéines, cible analytique de ce projet de mémoire de maîtrise.

La détection directe (Figure 1.1) se définit par l'immobilisation du récepteur moléculaire à la surface du capteur, et la mesure directe et en temps réel du signal de détection lors de la liaison d'un analyte au récepteur moléculaire. Cependant, lorsque la molécule ne permet pas une détection directe du fait de sa trop faible réponse, il est possible d'employer d'autres types de détection, tels que l'essai sandwich ou l'essai compétitif.

L'essai sandwich ou détection secondaire (Figure 1.2) se décrit par une mesure en deux étapes. En premier lieu, l'analyte est mis en contact avec le capteur où sont préalablement immobilisés les récepteurs moléculaires (anticorps primaires), et avec lesquels les molécules cibles établiront une liaison. Puis, la surface du capteur comportant les récepteurs moléculaires liés à l'analyte ciblé sera incubée avec un second récepteur moléculaire (anticorps secondaire). Ce dernier sera capable de se lier à l'analyte déjà immobilisé sur le premier anticorps. Ainsi, en augmentant le nombre de biomolécules liés, cette méthode de détection permettra d'amplifier la

réponse du capteur. Pour pallier une réponse trop faible, il est également possible d'ajouter un anticorps secondaire ayant une plus grande masse, ou encore de marquer celui-ci à l'aide d'un fluorophore (détectable en fluorescence), d'un marqueur Raman (détectable en spectroscopie Raman) ou encore de nanoparticules métalliques (détectables en diffusion Raman exaltée par effet de surface). La détection secondaire sera utilisée lors des expériences effectuées dans le cadre du projet. Comme il sera expliqué plus en détail plus loin dans ce mémoire, la détection secondaire s'effectuera grâce à l'utilisation de nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps secondaires permettant la détection d'un analyte reconnu par un anticorps primaire déjà immobilisé sur le capteur.

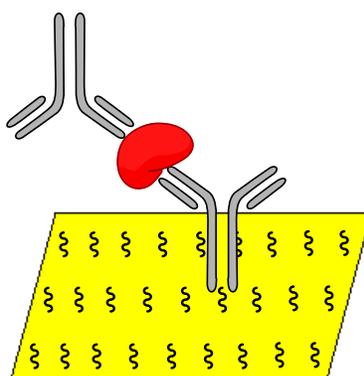


Figure 1.2 Représentation schématique d'une détection en sandwich de l'analyte (protéine) par des récepteurs moléculaires primaire et secondaire (anticorps) sur un capteur.

Deux des plus importants domaines d'application pour les biocapteurs sont la détection et l'identification d'analytes biologiques ainsi que l'analyse biophysique d'interactions biomoléculaires.¹⁶ Plusieurs types de récepteurs biomoléculaires peuvent être utilisés tels que les anticorps¹⁷, les aptamères¹⁸, les peptides¹⁹, ou encore les polymères à empreinte moléculaire.²⁰ Ces récepteurs biomoléculaires doivent préalablement être immobilisés à la surface du senseur de façon à préserver leur activité biologique.¹⁴ Plusieurs techniques d'immobilisation à la surface des substrats existent, cependant, l'une des plus courantes reste la technique par déposition d'une monocouche auto-assemblée (*Self-Assembled Monolayer*, SAM) possédant des groupement thiols et qui réagissent avec l'or sur le substrat.²¹

1.1.3 Applications des biocapteurs

Les biocapteurs permettent ainsi la détection et la quantification d'analytes dans les liquides biologiques tels que le sang ou l'urine, l'environnement ou encore l'alimentation. Ces systèmes de détection, de par leur grande sensibilité, leur spécificité, et leur caractère portatif sont de plus en plus en demande au fil des ans. En effet, au cours de ces vingt-cinq dernières années, le nombre de publications portant sur les biocapteurs a suivi une tendance exponentielle, passant de 109 publications recensées en 1988 à plus de 68 974 en 2013. Les biocapteurs développés sont utilisés dans différents domaines tels que l'analyse des aliments, le contrôle pour la qualité de l'environnement, le domaine médical et pharmaceutique, le bioterrorisme ou encore le domaine spatial.

Deux des exemples les plus connus de biocapteurs restent le glucomètre et le test de grossesse. Le premier est un appareil servant à quantifier la concentration de glucose dans le sang pour les personnes atteintes de diabète et devant surveiller de façon régulière leur taux de glucose. Ce biocapteur est constitué d'une enzyme, la glucose oxydase (GO), piégée à la surface d'une électrode, et permettant l'oxydation du glucose en s'y liant, et en présence d'oxygène. Une fois réduite, l'enzyme est ré-oxydée par l'oxygène moléculaire (O_2), réaction produisant alors du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le H_2O_2 permet la production de protons par l'intermédiaire d'un médiateur, tel qu'un complexe de fer, en remplacement de l' O_2 pour catalyser la réaction d'oxydation du peroxyde d'hydrogène à la surface de l'électrode. Cette réaction d'oxydo-réduction permet de rendre l' H_2O_2 quantifiable grâce au courant qu'il génère, et est proportionnel à la quantité de glucose. Le test de grossesse est quant à lui effectué grâce à l'urine de femmes enceintes, dont l'embryon a la particularité de synthétiser l'hormone de grossesse gonadotrophine chorionique (hCG) en grande concentration. Celle-ci est reconnue de façon spécifique par des anticorps présents sur le test et conjugués à des particules de latex colorées. Le système de détection migre sur la bandelette jusqu'à rencontrer l'antigène anti-hCG bloquant l'anticorps anti-hCG avec le latex de couleur permettant ainsi la coloration de la bande. L'anticorps anti-hCG non capté par l'antigène correspondant migrera plus loin sur la bande jusqu'à rencontrer l'anticorps le fixant sur la deuxième bande et permettant d'effectuer un contrôle d'analyse et la coloration d'une deuxième bande sur la bandelette grâce à la particule

de latex. Suivant ces succès commerciaux, le domaine des biocapteurs a connu un essor fulgurant pour la détection d'une multitude de cibles analytiques dans des domaines très variés.

1.2 Spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR)

Dans cette section, le principe de résonance de plasmons de surface sera largement abordé, tout comme la méthodologie et les principes instrumentaux utilisés pour cette technique spectroscopique. De plus, l'aspect de mesures biologiques sera amplement traité, afin d'expliquer le thème de ce mémoire quant à des fins de détection chimique et biologique. En effet, c'est cette technique, couplée à la microscopie AFM, qui permettra le développement d'un nouvel outil spectroscopique et d'une méthode de détection innovante, sensible et applicable dans le domaine cellulaire. Il est donc essentiel d'en comprendre les principaux fondements, afin d'être capable de manipuler cette technique au mieux lors de son association avec la pointe d'AFM. Ainsi, le phénomène de résonance de plasmons de surface, qu'il soit propagatif ou localisé (dont les notions seront expliquées au cours de ce chapitre), s'inscrit dès lors dans le cadre de ce mémoire comme un concept important à comprendre puisqu'il constitue la base du projet. En effet, l'utilisation de réseaux nano-structurés en spectroscopie SPR, puis plus tard, l'utilisation de nanoparticules d'or dans le cadre de biodétections, nécessitent une bonne compréhension des principes plasmoniques. Le but ultime du projet étant le couplage de la technique SPR avec l'AFM, les propriétés optiques des structures métalliques utilisées seront discutées et assimilées.

1.2.1 Origines de la SPR

La spectroscopie SPR est une technique de surface le plus souvent utilisée pour suivre les interactions chimiques et biologiques en temps réel. C'est au début des années 1900 que Wood observe pour la première fois le phénomène de résonance de plasmons de surface (SPR).²²⁻²³ En effet, grâce à l'observation qu'il a pu entreprendre sur une diffraction inhabituelle de la lumière sur des réseaux de diffraction, ce phénomène a pu être par la suite attribué à l'excitation des ondes de surfaces. L'existence de ces ondes de surfaces, appelées plasmons de

surface, à la surface d'une fine couche métallique est établie au cours des années 1950, puis suivie à la fin des années 1960 par le développement d'appareils spectroscopiques SPR notamment grâce à Otto²⁴ et Kretschmann²⁵. Ces appareils utilisant une configuration en réflexion totale atténuée (*Attenuated Total Reflection*, ATR), sont essentiellement basés sur la réflexion totale interne (RTI) à la surface d'un prisme. De façon condensée, il est possible de décrire la résonance de plasmons de surface comme l'oscillation collective d'électrons, aussi appelée plasmon, existant préalablement dans la bande de conduction d'un métal noble, et ayant lieu grâce à l'excitation préliminaire d'un champ électromagnétique oscillant, tel que la lumière.²⁶ Le phénomène de SPR n'a ensuite cessé de se développer au cours des dernières décennies dans le cadre de la recherche scientifique, et s'identifie depuis lors comme une nouvelle technique optique de plus en plus popularisée, notamment grâce à l'absence de marqueurs, ainsi qu'à sa rapidité d'acquisition des données en temps réel.

1.2.2 Théorie de la SPR

De tous temps, les propriétés optiques des structures métalliques n'ont cessé de fasciner et d'attiser les curiosités. Les couleurs intenses et irisées de certains matériaux utilisés pour les arts décoratifs durant l'Antiquité et le Moyen Âge, telle la coupe de Lycurque fabriquée par les Romains au cours du IV^e siècle, apparaissant d'une couleur rouge "rubis" lorsque la lumière est transmise, et d'une couleur verte lorsqu'elle est réfléchi, ou encore la coloration des vitraux des cathédrales, sont en partie dues à la résonance de plasmons de surface.²⁷ En effet, ce phénomène explique l'origine des couleurs intenses générées par l'ajout de nanoparticules d'or, d'argent ou de cuivre au verre.²⁸ La lumière incidente frappant les nanoparticules est absorbée par celles-ci, puis dispersée, amenant alors à une forte extinction de la lumière et à l'apparition d'une coloration intense du support.

Physiquement, le phénomène de résonance des plasmons de surface est sensible à la constante diélectrique du milieu, et donc à son indice de réfraction (puisque $\varepsilon = n^2$ pour un milieu transparent à une longueur d'onde d'excitation donnée), et repose donc sur la mesure d'un changement local d'indice de réfraction à proximité d'une surface ou d'une nanoparticule

métallique. Ce changement peut être causé par la présence d'une mince couche de solution à la surface du métal, dont les propriétés peuvent induire des changements dans les propriétés optiques de l'onde, mais peut également être la conséquence de la capture d'une molécule à la surface d'un capteur SPR, concept qui sera élaboré plus tard dans le mémoire. Le suivi de l'indice de réfraction du milieu permet à la technique SPR de faire la détection générale (détecteur quasi-universel) d'un grand nombre d'analytes pouvant être de nature gazeuse, liquide ou solide.²⁹ La réponse d'un capteur devient alors proportionnelle à la variation de l'indice de réfraction induite par la liaison établie entre un récepteur moléculaire à la surface d'un film métallique et un analyte, et telle que³⁰ :

$$\Delta n = \left(\frac{dn}{dc} \right) \frac{\Gamma}{h} \quad \text{Équation 1.1}$$

où Δn représente la variation de l'indice de réfraction induite par la liaison entre le récepteur moléculaire et l'analyte, (dn/dc) correspond à l'incrément de l'indice de réfraction des analytes, h constitue l'épaisseur du film métallique, et Γ indique la concentration de surface en masse / aire.³¹

1.2.2.1 Résonance des plasmons de surface

La résonance des plasmons de surface provient de l'oscillation collective des électrons libres existant à la surface d'un métal conducteur ou semi-conducteur à l'interface entre celui-ci et un milieu diélectrique.³² La SPR peut être soit de type propagatif, soit de type localisé. Les plasmons de surface propagatifs sont des oscillations d'électrons, excités par une onde lumineuse, et se déplaçant au niveau de l'interface située entre le métal et un milieu diélectrique. L'onde lumineuse pénétrant le métal interagit donc avec ses électrons libres qui seront alors piégés à la surface du métal pour former des polaritons de plasmons de surface (*Surface Plasmons Polaritons, SPP*).³³ Dans le cas de particules colloïdales plus petites que la longueur d'onde incidente, l'oscillation des électrons devient confinée et forme alors la résonance des plasmons de surface localisée (*Localized Surface Plasmons Resonance, LSPR*). Cette notion de

plasmons localisés à la surface de petites particules métalliques est approfondie à la section 1.2.5.2 de ce mémoire.

Puisque les électrons sont associés à une charge, les oscillations correspondantes sont associées à un champ électromagnétique (EM). Il y a alors résonance entre le champ électromagnétique d'une onde lumineuse et les ondes de surface générées par la densité de charge du métal, constituant ainsi le plasmon de surface.³⁴ Le champ électromagnétique induit par l'excitation des électrons à la surface du métal oscille orthogonalement à la direction de propagation de la lumière, et son intensité décroît de façon exponentielle dans les directions orthogonales à la surface (Figure 1.3).

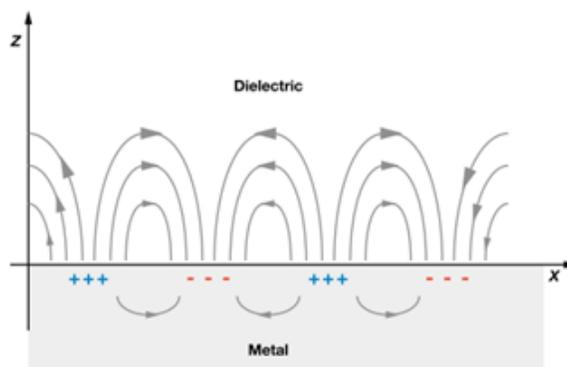


Figure 1.3 Représentation de la résonance des plasmons de surface en mode propagatif et de la polarisation des charges à la surface d'un métal. Les plasmons se propagent selon les directions x et y le long de l'interface entre métal et milieu diélectrique sur des distances de l'ordre de 10 à 100 μm . Une décroissance d'intensité du champ évanescant selon l'axe z peut être observée jusqu'à une distance de l'ordre de 200 nm, proportionnellement à $1/e$.

Reproduit avec la permission de la référence ²⁶.

Copyright © 2007. Annual Reviews.

1.2.2.2 Propriétés physiques du plasmon de surface

Les métaux possèdent des propriétés optiques uniques définies par la constante diélectrique. Ces propriétés peuvent être modifiées en modulant ce paramètre directement relié

à la fréquence angulaire, et donc à la fréquence de la radiation lumineuse incidente frappant la surface selon le modèle de Drude.³⁵ Ce modèle considère les électrons d'un métal comme des particules gazeuses se déplaçant suivant un champ électromagnétique et pouvant subir des collisions. En suivant ce modèle et grâce aux équations de Maxwell, il est alors possible d'obtenir la constante diélectrique (appelée aussi permittivité diélectrique relative ϵ_m) correspondante à la lumière incidente frappant le métal, selon la fréquence de radiation angulaire ω .

$$\epsilon_m(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\nu)} \quad \text{Équation 1.2}$$

où i constitue un nombre imaginaire, tel que $i^2 = -1$, et où ν , la fréquence de collision des électrons fonction du temps entre deux collisions successives des électrons en mouvement ($\nu = \tau^{-1}$), est définie comme une composante de la partie imaginaire de la constante diélectrique du métal caractérisant l'importance des pertes de l'énergie incidente dans le milieu par absorption. La composante ω_p correspond à la fréquence de plasma (ou fréquence de Langmuir), et est définie par la relation suivante :

$$\omega_p = \sqrt{\frac{e^2 n_e}{m_e \epsilon_0}} \quad \text{Équation 1.3}$$

Cette fréquence de plasma tient compte des paramètres de permittivité dans le vide ϵ_0 , de densité électronique n_e , de la masse effective m_e , et de la charge e^2 des électrons et est donc caractéristique des propriétés électroniques du métal. De plus, la fréquence angulaire ω d'une radiation monochromatique peut être définie par une certaine longueur d'onde telle que :

$$\omega = \frac{2\pi c}{\lambda} \quad \text{Équation 1.4}$$

La constante diélectrique d'un métal est en fait définie par une partie réelle et une partie imaginaire³⁴ de cette façon :

$$\epsilon_r = \epsilon'_m + i\epsilon''_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \nu^2} + i \frac{\omega_p^2 \nu}{\omega(\omega^2 + \nu^2)} \quad \text{Équation 1.5}$$

De plus, il est possible de négliger la fréquence de collision ν , tel que : $\omega^2 > \omega / \tau$ si $\omega > 1 / \tau$. Il sera alors possible de simplifier la relation permettant d'obtenir la constante diélectrique :

$$\epsilon_r = 1 - \frac{e^2 n_e}{m_e \epsilon_0} \frac{1}{\omega^2} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad \text{Équation 1.6}$$

Sachant que la partie imaginaire ϵ''_m est négligeable devant la partie réelle ϵ'_m , il y aura alors réflexion totale lorsque $\omega < \omega_p \Leftrightarrow \epsilon'_m < 0$, propagation dans le métal lorsque $\omega > \omega_p \Leftrightarrow \epsilon'_m > 0$, et résonance (oscillation du plasma) quand $\omega = \omega_p \Leftrightarrow \epsilon'_m = 0$.

Ainsi, pour que le champ électrique de l'onde EM puisse se propager à la surface du métal et que ce dernier puisse supporter un plasmon de surface, il faut que la composante réelle de la permittivité relative du métal soit négative ($\epsilon'_m < 0$). Il est donc nécessaire que la fréquence angulaire de la radiation soit inférieure à la fréquence de Langmuir correspondante au métal.³⁶

Dès que les photons se déplacent, ceux-ci transportent un *momentum* défini par le produit de la masse du photon et de la vitesse à laquelle il se déplace. Lors du couplage du champ électrique de l'onde électromagnétique avec les électrons du métal pour former le SPP, ce dernier se déplace à la surface du métal suivant un vecteur d'onde qui lui est associé. Le vecteur d'onde permet de mieux comprendre les phénomènes reliés à la résonance des plasmons de surface. Le vecteur d'onde du plasmon de surface propagatif k_{spp} ainsi généré entre le métal d'indice ϵ_m et un milieu diélectrique (généralement sous forme de solution) d'indice ϵ_s , et à une certaine énergie est défini par la relation suivante :

$$k_{spp} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad \text{Équation 1.6}$$

où k_0 est le vecteur d'onde de la lumière incidente à la même énergie ($k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$).

Les propriétés de l'onde lumineuse sont définies grâce au vecteur d'onde k_x :

$$k_x = k_0 \eta \sin \theta_{inc.} \quad \text{Équation 1.7}$$

où k_x est le vecteur d'onde de la lumière en réflexion totale interne, η est l'indice de réfraction du milieu, et $\theta_{inc.}$ représente l'angle d'incidence de la lumière sur ce milieu.

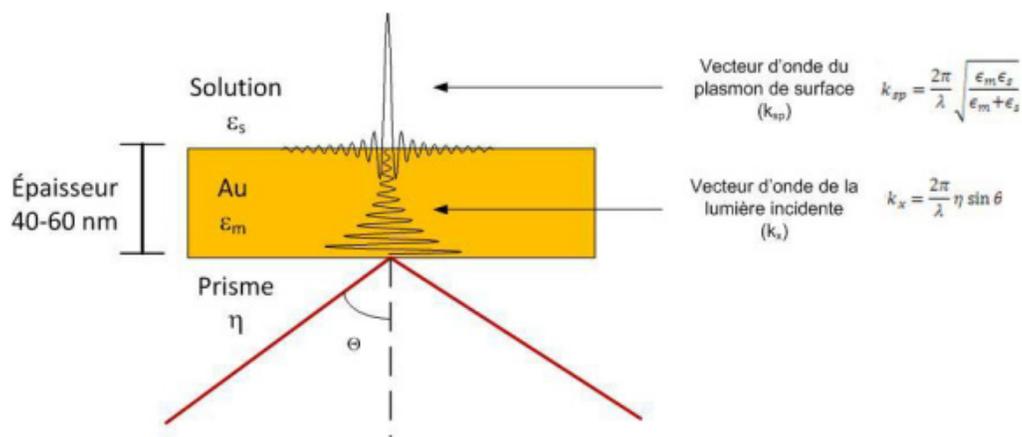


Figure 1.4 Représentation théorique du phénomène de SPR avec équations des vecteurs d'ondes du SPP et de l'onde incidente. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.

L'excitation des plasmons de surface n'est possible que sous certaines conditions physiques. En effet, afin de rentrer en résonance, les plasmons de surface propagatifs doivent avoir un vecteur d'onde k_{spp} qui soit égal au vecteur d'onde k_x de la lumière incidente ($k_x = k_{spp}$), pour permettre à la surface d'absorber le photon. En pratique il est impossible d'exciter le

plasmon directement de cette façon, puisque le vecteur d'onde de la lumière sera toujours plus grand que celui du plasmon de surface. Dans l'optique de diminuer le vecteur d'onde de la lumière et de le faire correspondre à celui du plasmon de surface permettant ainsi la résonance, il est possible de faire rentrer l'onde lumineuse en réflexion totale interne dans un milieu d'indice de réfraction élevé. Lorsque la lumière frappe la surface en mode réflexion totale interne et est réfléchiée, une certaine portion du champ électrique ou magnétique pourra pénétrer dans le deuxième milieu sur une distance très courte : il s'agit du champ évanescent qui permet alors à une molécule adsorbée à la surface du métal d'absorber cette lumière. Une fois le photon absorbé par la surface, celui-ci est retransmis dans le milieu submergeant la sonde, permettant alors la mesure locale de l'indice de réfraction du milieu. Ainsi pour permettre l'absorption d'un photon à travers le couplage du champ évanescent à un SP, pour des angles d'incidence θ supérieurs à ceux correspondant à la réflexion totale interne, il est nécessaire que:

$$k_{spp} = \frac{2\pi}{\lambda} \eta \sin \theta_{inc}. \quad \text{Équation 1.8}$$

où η correspond à l'indice de réfraction du prisme ($n_p > n_d$), et θ_{inc} correspond à l'angle d'incidence.

Lorsque la distance entre le métal et le milieu diélectrique augmente, le champ EM du plasmon de surface concentré à l'interface entre ces deux milieux diminuera de façon exponentielle.¹⁴ La distance de pénétration l_d de l'onde évanescente est définie comme étant la distance à partir de l'interface à laquelle l'amplitude du champ décroît d'un facteur e (e étant la base logarithmique).³⁰ L'onde peut se propager à la surface sur une distance de quelques dizaines de μm lors d'une excitation dans le visible, et de quelques mm dans l'infrarouge. La distance de pénétration en SPR avec une configuration de Kretschmann (voir section 1.2.3.1) est relativement élevée (200 à 300 nm)³⁷ pour des films d'or de faible épaisseur (50 nm) comparativement à la distance de pénétration observée pour les substrats nano-structurés. Une meilleure réponse sera observée pour l'adsorption d'analytes de faible masse (< 10 kDa) à la surface du capteur SPR lorsque la distance de pénétration est plus petite.^{6, 38} En effet, une trop grande distance de pénétration peut limiter la sensibilité de surface d'un mince film d'or excité

en SPR en configuration de Kretschmann. En LSPR, la distance de pénétration varie en fonction de la taille, la forme et la composition des nanoparticules.³⁹ De plus, la distance de pénétration observée se révèle être 40 à 50 fois plus petite que pour les capteurs SPR^{26, 40}, ce qui permet l'analyse de plus petits substrats.⁶ C'est ainsi la faible distance de propagation des capteurs LSPR qui leur confère une plus grande sensibilité de surface.

Toute la théorie énoncée plus haut démontre ainsi que la SPR est un phénomène qui dépend de plusieurs facteurs physiques, et doit respecter différents critères afin d'être observée. En effet, la constante diélectrique du métal générant les plasmons de surface doit être négative pour permettre au champ EM de se propager à la surface du métal et permettre la résonance, le vecteur d'onde correspondant au plasmon de surface doit être égal au vecteur d'onde de la lumière, et la distance de pénétration doit être la plus faible pour permettre aux capteurs SPR d'améliorer leur sensibilité. Ceci introduit ainsi les principes physiques propres à la SPR, et permet d'explorer par la suite les contraintes instrumentales applicables pour l'acquisition d'un spectre SPR.

1.2.3 Aspect instrumental de la SPR

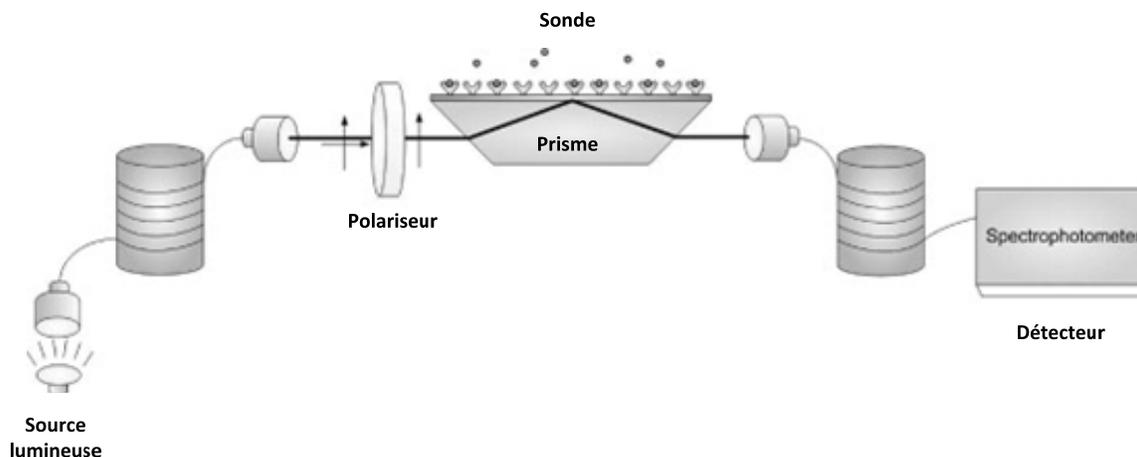


Figure 1.5 Représentation schématique d'un instrument SPR utilisant un prisme de Dove. Reproduit avec modifications à partir de la référence ⁴¹. Copyright © 2009, avec la permission de Elsevier.

Les systèmes SPR utilisent des supports optiques, tels que silice, verre BK7 ou encore saphir.⁴² Ces derniers permettent de soutenir le substrat métallique possédant un plasmon de surface pouvant être excité par une source lumineuse incidente (ex. : source d'excitation LED) ayant une longueur d'onde variable, et ceci avec un angle d'incidence facilement modifiable. Sachant qu'afin d'exciter les plasmons de surface, il est nécessaire que la lumière incidente se trouve en réflexion totale interne, le champ EM du photon de la lumière alors réfléchi pénétrera dans le deuxième milieu pour produire le champ évanescent correspondant.

Le concept de polarisation est ainsi associé à la direction d'oscillation du champ électrique. Deux types de polarisations peuvent être définis : la polarisation S et la polarisation P. La polarisation S est associée à une onde lumineuse "transverse électrique" (TE) impliquant le passage de l'onde magnétique dans le deuxième milieu lorsque le champ électrique se retrouve dans le même plan que celui de l'interface, ne pouvant ainsi pas pénétrer ce milieu. Lors du cas contraire ou le champ magnétique est dans le même plan que l'interface, et que seul le champ

électrique traverse le deuxième milieu, l'onde de polarisation P est appelée "transverse magnétique" (TM). C'est le champ électromagnétique de polarisation transverse magnétique qui est à l'origine du phénomène de résonance de plasmons de surface. L'onde de plasmons de surface générée se propage ainsi le long de l'interface entre le métal (milieu de constante diélectrique négative) et un milieu diélectrique (milieu de constante diélectrique positive).

1.2.3.1 Excitation des plasmons de surface par configuration de Kretschmann

Afin d'observer un signal analytique en SPR, il est nécessaire d'exciter optiquement les plasmons de surface existant à la surface de substrats métalliques, à une interface métal/diélectrique par un champ optique évanescent. Ce champ évanescent est créé lors de la formation d'une réflexion totale interne d'une onde lumineuse progressive. La méthode la plus utilisée à ce jour est l'utilisation de prismes de couplage utilisant une configuration de Kretschmann avec la méthode de réflexion totale atténuée (ATR).²⁵ C'est cette configuration qui a été utilisée dans le cadre des mesures SPR effectuées pour les réseaux périodiques nanostructurés afin d'en déterminer la bande d'absorption du plasmon correspondant. Plus précisément, il s'agit de mettre en contact une couche métallique avec un coupleur optique, comme un prisme ayant un indice de réfraction n élevé. Ce couplage permet à l'onde lumineuse de passer à travers, et d'être totalement réfléchi à la surface du prisme, induisant alors une onde évanescente pouvant pénétrer le substrat métallique.³⁰ L'indice de réfraction du prisme doit être nécessairement supérieur à celui du milieu diélectrique avec lequel il se trouve en contact de façon à obtenir un vecteur d'onde de la lumière égale à celui du plasmon de surface (Équation 1.9), et permettre ainsi l'excitation des plasmons de surface. La couche métallique doit être de faible épaisseur (environ 50 nm) afin de permettre au champ évanescent d'entrer en résonance avec les plasmons de surface, en se propageant le long de l'interface métal-milieu diélectrique.

Dans le dispositif ATR, le spectre de réflexion présente un pic d'absorption pour une incidence et une longueur d'onde donnée. Cette bande d'absorption est le produit de la résonance des plasmons de surface. En effet, en résonance, les plasmons de surface correspondants absorberont l'énergie électromagnétique de l'onde lumineuse incidente. Au contraire, hors résonance, cette onde lumineuse sera réfléchi par le dispositif ATR.

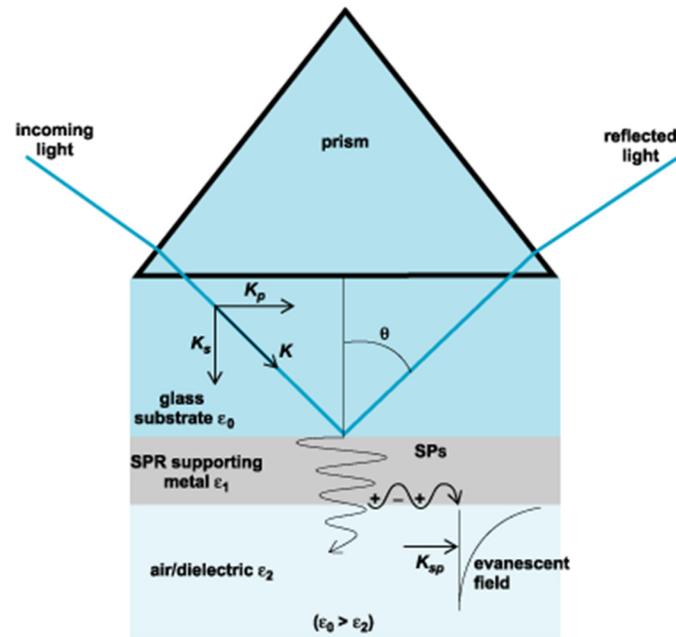


Figure 1.6 Couplage optique par un prisme en configuration de Kretschmann.

1.2.4 Acquisition d'un spectre SPR

L'acquisition d'un spectre SPR peut être obtenue de deux façons ; soit en faisant varier la mesure des angles d'incidence de la lumière, soit en faisant varier la mesure des longueurs d'ondes, et en gardant l'autre variable constante. Chaque type de mesure permet l'obtention d'un spectre SPR dont le rapport d'intensité varie en fonction du paramètre choisi (angle ou longueur d'onde).

1.2.4.1 Spectre SPR par variation des longueurs d'ondes

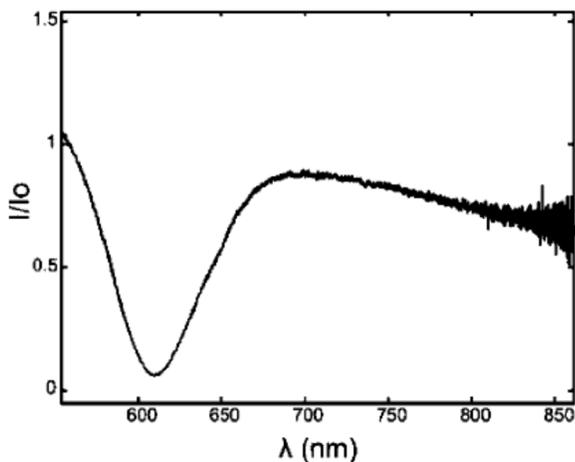


Figure 1.7 Spectre SPR expérimental d'une goutte d'eau déposée à la surface d'un film d'or continu avec une sonde de fibre optique à angle constant. Reproduit avec la permission de la référence ⁴³. Copyright © 2009. American Chemical Society.

Pour obtenir un spectre SPR, il est possible de varier la longueur d'onde d'excitation λ , tout en gardant l'angle d'incidence de la source polychromatique constant. Il est nécessaire de bien orienter la lumière à l'aide d'un collimateur afin d'obtenir un seul angle de propagation, puisque la lumière polychromatique ne possède pas le même angle de réfraction, et tend à diverger, élargissant alors la bande caractéristique dans le spectre SPR. Cette technique, malgré une résolution un peu plus faible que celle utilisant la variation des angles, permet une mesure simple et rapide, ainsi que la miniaturisation du système optique.

1.2.4.2 Variation des angles

Afin de faire l'acquisition d'un spectre SPR, il est également possible de faire varier un autre paramètre tel que l'angle d'incidence θ_{inc} de la source lumineuse monochromatique de différentes façons. La première consiste à balayer successivement un angle à la fois. Cependant, cette technique se révèle lente, et peu utilisable pour des mesures cinétiques nécessitant une bonne résolution temporelle. Il est donc possible, en s'assurant d'un bon alignement optique,

d'employer un instrument effectuant la mesure simultanée des angles d'incidence de la lumière, afin d'effectuer l'acquisition du spectre en une seule mesure, de façon rapide et sensible.

Pour obtenir un spectre SPR, il est donc possible d'utiliser deux modes d'analyses principaux tels que l'interrogation des longueurs d'onde ou encore la variation de l'angle d'incidence de la lumière. Cependant, le montage par interrogation des longueurs d'onde offre une plus grande simplicité d'alignement optique, tout en conservant une bonne rapidité d'acquisition des données. De plus, ce type de montage est principalement utilisé dans les laboratoires du groupe Masson pour l'acquisition des spectres SPR.

1.2.5 Propriétés plasmoniques des colloïdes

Les matériaux plasmoniques peuvent être aussi bien des réseaux structurés que des surfaces planes ou encore des nanoparticules possédant une couche métallique, et ayant une taille comprise entre 1 et 100 nm. Dès lors que les nanoparticules se retrouvent libres en suspension, elles forment un colloïde, dont la taille est comprise entre 1 et 1000 nm, et dont les propriétés plasmoniques diffèrent légèrement. Des nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps ont été utilisées afin de permettre une détection en sandwich d'antigènes. Il est donc important de bien connaître les propriétés optiques de ces structures métalliques afin d'en expliquer le signal plasmonique complexe qu'elles peuvent générer.

1.2.5.1 Effet des nanoparticules métalliques

Les nanoparticules métalliques trouvent, depuis plusieurs années, leur utilisation dans de nombreux domaines tels que la biodétection⁴⁴, la bio-imagerie⁴⁵, la spectroscopie par exaltation de surface⁴⁶, ou encore l'utilisation dans le domaine pharmaceutique.⁴⁷ De nombreux travaux portant sur l'étude et l'utilisation de nanoparticules métalliques, notamment de nanoparticules d'or, ont été réalisés, et connaissent une réelle expansion d'utilisation depuis que les méthodes pour leur synthèse et leur stabilisation ont été développées. En effet, leurs applications comprennent un vaste domaine d'applications biologiques et médicales. Ainsi, Jain *et al.* développent l'utilisation de nanoparticules d'or dans le cadre de la détection de cancers basée

sur l'imagerie cellulaire^{3, 48}, Huang *et al.* étendent leurs fonctions à la thérapie photo-thermale utilisant des propriétés non radiatives^{4, 49-51}, tandis que Ghosh *et al.* tendent à développer les fonctions d'importations géniques et pharmacologiques des nanoparticules possibles grâce à leur grande stabilité, leur faible toxicité intrinsèque et leur large surface disponible.⁵² De plus, l'utilisation de nanoparticules métalliques permet une grande amplification du signal plasmonique. Donc, la conjugaison de ces nanoparticules avec des molécules cibles pousse au développement de l'imagerie et de la détection de certaines maladies telles que le cancer, ou encore à celui de la thérapie photo-thermale utilisant des propriétés non-radiatives.³⁻⁴

1.2.5.2 Phénomène de résonance des plasmons de surface localisé (*Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR*)

Les nanoparticules métalliques présentent généralement une bande d'absorption assez intense dans le domaine de l'UV-vis. Celle-ci correspond à la fréquence d'un photon incident entrant en résonance avec l'excitation collective des électrons du métal recouvrant les nanoparticules, plus connue sous le nom de résonance de plasmons de surface localisée (*Local Surface Plasmon Resonance, LSPR*). Cet effet localisé permet aux nanoparticules métalliques d'être directement excitées par la lumière, contrairement au phénomène SPR exigeant l'utilisation d'un support optique tel qu'un prisme.

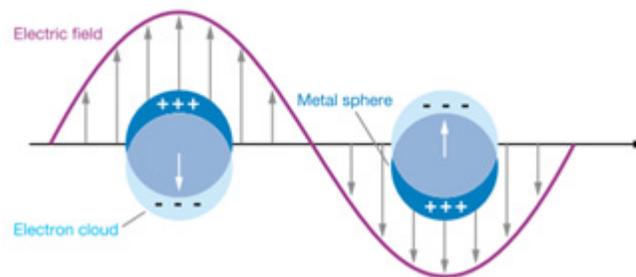


Figure 1.8 Phénomène de résonance de plasmons de surface en mode localisé (*Local Surface Plasmon Resonance, LSPR*). La lumière interagit avec les particules dont la taille est inférieure à la longueur d'onde incidente. L'oscillation localisée d'un plasmon est

observée autour de la nanoparticule. Reproduit avec la permission de la référence ²⁶.

Copyright © 2007. Annual Reviews.

Les plasmons de surface localisés sont des oscillations de densité de charge confinées au niveau des nanoparticules ou nanostructures métalliques. L'excitation de ces plasmons de surface peut être effectuée à l'aide d'un faisceau lumineux incident (champ électrique) à une certaine longueur d'onde à laquelle la résonance peut se produire (Figure 1.8)⁵³. Cette résonance résulte d'une forte diffusion de la lumière provoquant l'apparition d'une bande d'absorption intense caractéristique du plasmon de surface, ainsi que l'amplification du champ électromagnétique local.⁵⁴ Les électrons libres du métal recouvrant la nanoparticule se déplacent dans celle-ci, ce qui crée un dipôle caractéristique de ce mouvement d'oscillation. Le faisceau lumineux excitant la nanoparticule métallique possède une longueur d'onde qui entre en résonance avec un des modes de résonance spécifique à la nanoparticule, ce qui se traduit par une absorption de la lumière par la nanoparticule donnant une couleur caractéristique à la solution colloïdale. Plusieurs effets sont dus à la résonance en LSPR. Premièrement, il est possible d'observer une absorption sélective de la longueur d'onde d'excitation avec de hauts coefficients d'absorptivité molaire ($\sim 3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).⁵⁵ De plus, une diffusion Rayleigh est caractéristique de la LSPR, avec une efficacité équivalente à 106 fluorophores.⁵⁶⁻⁵⁷ Enfin, une amplification locale des champs électromagnétiques proche de la surface des nanoparticules est également le résultat de la résonance en LSPR, permettant ainsi l'observation d'un signal intense en spectroscopie SERS.⁵⁸

La longueur d'onde LSPR des nanoparticules plasmoniques peut être aisément ajustée dans le domaine spectral du visible et du proche IR grâce au contrôle de différents paramètres physiques, tels que leur taille, forme ou composition chimique⁵⁹⁻⁶⁵, ou par le contrôle de leur environnement local, comme la modification de l'indice de réfraction du milieu ou encore des distances inter-particulaires.⁶⁶⁻⁶⁷ De par leur taille, les nanoparticules diminuent l'effet de propagation des plasmons de surface, ce qui a pour conséquence de localiser ce phénomène à une distance plus petite, dans le milieu sondé, que pour les surfaces métalliques macroscopiques sur lesquelles se propagent les plasmons de surface.

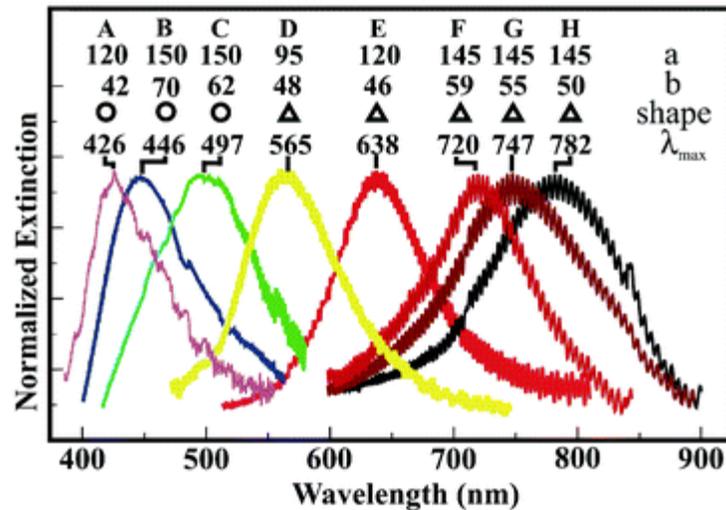


Figure 1.9 Spectre LSPR de nanoparticules d'argent dont les paramètres de taille et forme ont été variés. La longueur d'onde maximale d'extinction λ_{max} (absorption et diffusion) obtenue en spectroscopie UV-Vis change en fonction des variations de taille ; à savoir de largeur (paramètre a) et de hauteur (paramètre b), et de forme des nanoparticules d'argent. Reproduit partiellement à partir de la référence ⁶⁸. Copyright © 2005, avec la permission de Royal Society of Chemistry.

La coloration de la solution colloïdale est caractéristique de la longueur d'onde d'absorption de la lumière par les nanoparticules métalliques. Cela s'explique par le fait que la résonance des plasmons de surface pour les nanoparticules s'effectue dans le visible. De plus, tout comme la SPR conventionnelle, la LSPR s'appliquant aux colloïdes dépend des mêmes propriétés physiques, telles que la constante diélectrique ϵ (et donc l'indice de réfraction) du milieu adjacent aux nanoparticules. Les biocapteurs LSPR, de la même façon que pour les biocapteurs SPR, permettent d'observer un signal en convertissant un changement local d'indice de réfraction en un déplacement de longueur d'onde pour le maximum d'absorption de la bande LSPR (λ_{max}). L'équation suivante montre la relation partagée entre le coefficient d'extinction E (reliée au maximum d'absorption sur le spectre LSPR) en fonction de divers paramètres tels que la taille des nanoparticules, la longueur d'onde d'excitation ou encore la constante diélectrique du milieu adjacent :

$$E(\lambda) = \frac{24\pi^2 Na^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \left[\frac{\epsilon_i}{(\epsilon_r + \chi \epsilon_m)^2 + \epsilon_i} \right] \quad \text{Équation 1.9}$$

où N est le nombre d'Avogadro, a est le rayon sphérique de la particule, ϵ_m est la constante diélectrique externe, ϵ_i et ϵ_r sont respectivement les parties imaginaire et réelle de la constante diélectrique du métal. De plus, le facteur χ permet de prendre en considération les effets dus à la forme de la particule. Une sphère dite « parfaite » aura un facteur χ d'une valeur de 2, et cette valeur augmentera directement en fonction de l'aspect de la particule.⁶⁹

Donc, lorsque la taille des nanoparticules augmente, il y a un déplacement énergétique s'effectuant vers de plus hautes énergies, et donc vers de plus basses longueurs d'ondes. Il devient alors possible d'utiliser des sources lumineuses dans le domaine de l'infrarouge pour exciter le plasmon de surface localisé correspondant aux plus grosses nanoparticules.⁶⁹ De plus, la composition des nanoparticules influence grandement la couleur de la suspension colloïdale. En effet, des nanoparticules d'or ou d'argent ne posséderont pas la même constante diélectrique, ce qui influencera la longueur d'onde d'excitation, et donc la couleur correspondante de la suspension. Ainsi, des nanoparticules d'or sphériques posséderont une couleur rouge caractéristique, alors que des nanoparticules d'argent sphériques auront une couleur jaune.⁶² De la même façon, en variant la forme des nanoparticules, leur longueur d'onde d'excitation est grandement influencée. De ce fait, il est possible d'observer de plus petites longueurs d'onde d'excitation pour des formes sphériques par rapport à des formes triangulaires de nanoparticules.⁶⁸

1.3 Diffusion Raman et diffusion du signal Raman exalté par effet de surface (SERS)

La diffusion Raman est un phénomène de diffusion de la lumière observable en spectroscopie. La spectroscopie Raman se définit comme une spectroscopie moléculaire pouvant identifier de façon qualitative les molécules, ce que ne permet pas la spectroscopie SPR,

qui ne permet qu'une analyse quantitative des analytes. La capacité d'une analyse Raman à mesurer sélectivement les molécules, tout en pouvant effectuer des mesures pour plusieurs molécules parallèlement, confère à cette technique certains avantages proches du multiplexage utilisé en spectroscopie SPR. Les aspects fondamentaux de la technique Raman, ainsi que ces nombreuses adaptations, seront largement abordés afin d'apporter de plus amples informations concernant ce type de caractérisation.

1.3.1 La diffusion Raman

Découvert en 1927 par Mandelstam, Ramân et Krishnan⁷⁰, l'effet Raman décrit le phénomène optique observé pour une lumière incidente (photon) diffractée de façon inélastique à partir d'un échantillon. En spectroscopie Raman, il se produit alors un échange d'énergie entre la lumière et la molécule analysée possédant des vibrations moléculaires caractéristiques, et déplaçant ainsi la fréquence lumineuse initiale. La spectroscopie Raman dépend fortement d'une source de lumière monochromatique et puissante. C'est donc avec l'apparition du laser que le signal Raman obtenu a pu être considérablement amélioré, et ainsi s'octroyer une place de choix dans les techniques spectroscopiques prépondérantes.⁶¹

La technique Raman permet l'analyse structurale et la caractérisation de molécules essentiellement grâce à leurs modes vibrationnels. Cette technique spectroscopique est complémentaire à l'infrarouge (IR). Contrairement à la spectroscopie IR, la spectroscopie Raman ne nécessite aucune préparation de l'échantillon avant l'analyse et ne mesure pas le signal de l'eau, faible diffuseur Raman. L'eau est en effet un élément pouvant s'avérer contraignant par ses effets de matrice dans les solutions aqueuses. Il est donc possible de mesurer des échantillons en solutions aqueuses grâce à la spectroscopie Raman contrairement à la spectroscopie IR. D'autre part, la spectroscopie Raman mesure les fréquences relatives auxquelles l'échantillon diffuse la lumière, tandis que la spectroscopie IR mesure les fréquences absolues auxquelles l'échantillon absorbe la lumière. De plus, l'intensité d'un spectre Raman augmente grâce à la force (covalence) des liens, tandis que la spectroscopie IR est sensible aux liens ioniques et hautement dipolaires.

L'acquisition des spectres Raman s'effectue grâce à l'illumination de l'échantillon par un faisceau laser de haute densité ayant une longueur d'onde comprise entre 200 nm et 1000 nm (gamme UV-Visible). La lumière dispersée est responsable de deux phénomènes : la dispersion de Rayleigh et la dispersion Raman. Lorsque la lumière est dispersée avec la même longueur d'onde que celle du faisceau laser incident (99,999% de la lumière), il s'agit d'une dispersion élastique de la lumière, ou dispersion de Rayleigh. Lorsque la lumière est dispersée avec une longueur d'onde différente de la longueur d'onde du faisceau incident, il s'agit d'une dispersion inélastique de la lumière, ou dispersion Raman. Cette dispersion inélastique peut amener à la formation de deux types de raies spectrales soit les raies Stokes et anti-Stokes. Ces raies se distinguent par les niveaux d'énergie vibrationnels virtuels atteints par la molécule qui est excitée par la lumière. Dans le cas des raies Stokes, la lumière excite la vibration de la molécule, et celle-ci atteint alors un niveau d'énergie vibrationnel ν_m plus élevé correspondant ainsi à la fréquence d'une vibration moléculaire. La lumière dispersée aura alors une fréquence égale à celle du faisceau laser incident moins la fréquence de la vibration moléculaire ($\nu_0 - \nu_m$). Les raies anti-Stokes, quant à elles, impliquent que la molécule se trouve déjà dans un état vibrationnel excité, et que la lumière dispersée correspondra à la fréquence de la lumière incidente plus la fréquence de la vibration moléculaire ($\nu_0 + \nu_m$). Pour qu'une vibration moléculaire soit active en Raman, il faut que la polarisabilité de la molécule varie, grâce à un mode normal de vibration. Ainsi, la lumière pourra être dispersée, et donner des bandes (Stokes et anti-Stokes) actives en Raman. La dispersion élastique de Rayleigh implique que la polarisation reste constante, et constitue ainsi une source de bruit dans les mesures Raman. Un filtre ainsi qu'un monochromateur sont utilisés dans le système Raman afin d'éliminer la dispersion de Rayleigh à la longueur d'onde correspondante au laser.

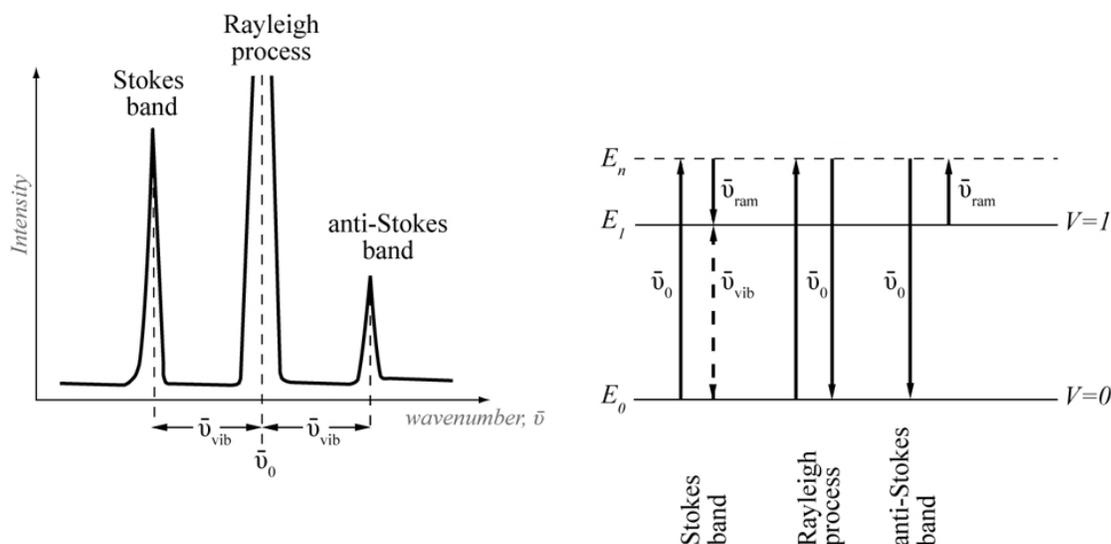


Figure 1.10 Explication du phénomène de diffusion Raman comprenant les raies Stokes et anti-Stokes comparativement au phénomène de Rayleigh, et transitions d'énergies vibrationnelles correspondantes. Figures tirées de la page web consultée en avril 2014 :

http://eng.thesaurus.rusnano.com/upload/iblock/f85/pic_1.jpg.

Une des plus grandes différences entre la spectroscopie IR et la spectroscopie Raman, est l'origine des bandes actives d'une molécule. En IR, elles proviennent du changement de dipôle des vibrations, tandis qu'en Raman elles proviennent du changement de polarisabilité de la molécule lors d'une vibration. Dans le cas de la spectroscopie Raman, l'onde électromagnétique de la lumière incidente qui frappe l'échantillon induit la polarisation de la molécule. Le dipôle induit diffuse alors de la lumière à la fréquence optique de la lumière incidente, avec ou sans échange d'énergie avec les vibrations moléculaires. Ainsi, l'amplitude de la polarisation induite P devient proportionnelle à la polarisabilité moléculaire α et à l'intensité du champ électrique incident E , telle que⁷¹ :

$$P = \alpha E \quad \text{Équation 1.10}$$

La polarisabilité moléculaire décrit la facilité avec laquelle le nuage électronique entourant la molécule peut être distordu par le champ électrique. La force du champ E est

dépendante de la puissance du champ électromagnétique incident ainsi que de sa longueur d'onde.⁷²

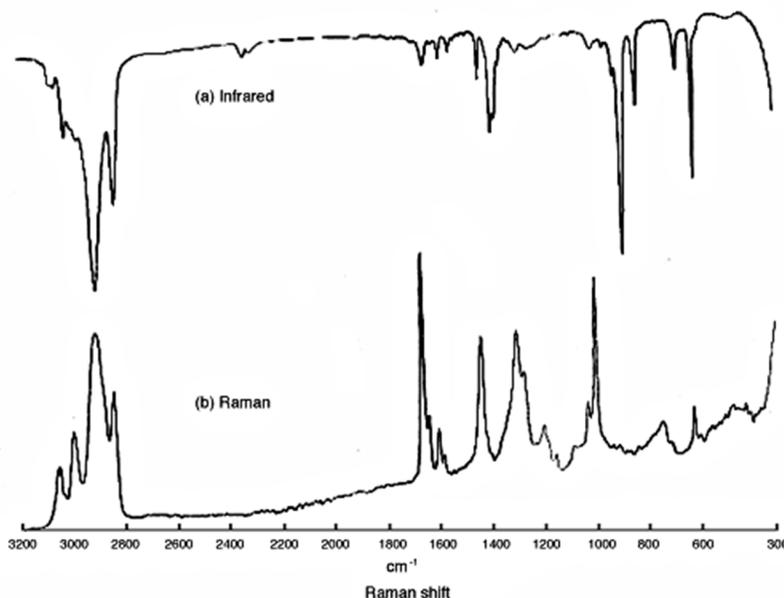


Figure 1.11 Spectres IR et Raman du styrène-butadiène. Figure tirée de la page web consultée en avril 2014 : <http://www.ijvs.com/volume1/edition5>.

La diffusion Raman trouve son application dans divers domaines tels que la caractérisation de matériaux comme effectué dans ce mémoire, la médecine⁷³⁻⁷⁵, le contrôle qualité pour l'alimentation⁷⁶ ou encore la conservation ou l'identification des arts⁷⁷⁻⁷⁸, puisqu'il s'agit d'une technique non-destructive fournissant une information spectrale suffisante pour des échantillons pouvant être solides, liquides ou gazeux. La diffusion Raman est toutefois un phénomène assez inefficace (faible section efficace), puisqu'environ un photon seulement subit une diffusion inélastique sur 10^6 à 10^{10} photons diffusés élastiquement.⁷² Il devient donc difficile d'utiliser cette technique de caractérisation pour des échantillons à l'état de traces ou encore pour l'étude d'échantillons hautement fluorescents⁷¹. Ainsi, il est nécessaire d'augmenter la diffusion Raman de l'analyte observé, et une façon de remédier à ce problème est l'utilisation d'un phénomène d'amplification par effet de surface de l'effet Raman. La diffusion Raman est une technique importante dans le cadre de ce mémoire, puisqu'elle a été tout au long des expériences effectuées, un moyen de caractérisation spectroscopique pour la détection d'anticorps

immobilisés à la surface de leviers d'AFM. En effet, afin de rendre compte d'une biodétection possible sur des pointes AFM, prouvant les interactions pouvant avoir lieu entre ces dernières et un environnement biologique, il a fallu utiliser un outil spectroscopique capable de déterminer de façon qualitative et quantitative la présence d'anticorps détectés.

1.3.2 La diffusion Raman exaltée par effet de surface (SERS) : une technique d'amplification du signal spectroscopique

L'effet Raman se décline en nombreuses variantes, dont une permettant une très grande amplification du signal spectroscopique à partir de molécules actives en Raman adsorbées sur une surface métallique rugueuse ou nano-structurée, il s'agit de la diffusion Raman exaltée par effet de surface (SERS). Ce phénomène est dû à une exaltation du champ électrique local qui s'effectue au niveau de molécules adsorbées à la surface de matériaux métalliques. Ces surfaces métalliques ont pour caractéristique de posséder des électrons libres à leur surface formant une oscillation collective d'ondes de densité électronique. Ces ondes, en se couplant à une lumière laser envoyée par le Raman, permettent alors l'exaltation du champ électrique, et la formation de plasmons de surface, nouvelles particules résultant de ce couplage.

1.3.2.1 Théorie du SERS

La première utilisation du SERS remonte à 1977, année durant laquelle Van Duyne et Jeanmaire⁷⁹, ainsi que Albrecht et Creighton⁸⁰ mesurèrent un signal Raman extrêmement intense correspondant à une molécule de pyridine adsorbée sur une électrode d'argent rugueuse, et conclurent que cet effet était dû à une augmentation de l'efficacité de la diffusion Raman. Le SERS est un phénomène régi par deux principaux mécanismes : un mécanisme chimique, et un mécanisme électromagnétique. Le premier mécanisme correspond à un transfert de charge de résonance donnant lieu à des résonances optiques des niveaux énergétiques entre les orbitales des molécules adsorbées à la surface du substrat et les électrons du métal. Ce transfert de charge permet la résonance Raman ou l'amplification du transfert de charge. Il peut alors se former des complexes à transfert de charge entre la molécule adsorbée et la surface métallique.⁸¹ Cet effet d'amplification est appelé effet chimique et correspond à une amplification de la polarisabilité

de la molécule en raison du transfert de charge entre le métal et la molécule adsorbée.⁸²⁻⁸³ Le deuxième mécanisme correspond à l'amplification du champ électromagnétique. L'amplification du champ ainsi que l'excitation des plasmons de surface localisés (LSPR) correspondante, résultent de la résonance optique de la lumière incidente avec les surfaces ou particules métalliques.⁵⁸ Plus les longueurs d'ondes correspondantes à la lumière incidente et au plasma du métal seront proches, plus les électrons de conduction situés à la surface du métal entreront en résonance dans un état électronique délocalisé. L'effet électromagnétique en SERS provient de l'interaction électromagnétique entre une nanoparticule et la molécule adsorbée à sa surface, qui elle-même est le résultat de deux types d'interactions. La première implique l'interaction entre la nanoparticule et le champ électrique incident, produisant une exaltation locale du champ. La deuxième implique l'interaction du signal Raman diffusé avec une molécule adsorbée à la surface de la nanoparticule cible, permettant l'exaltation du signal Raman.

Cette technique spectroscopique permet ainsi de combiner la spectroscopie laser moderne avec les propriétés optiques de nanostructures métalliques, donnant un fort signal Raman amplifié lors de l'adsorption de molécules aux nanostructures. Au-delà de fournir une grande amplification du signal Raman, le SERS permet une grande sélectivité de surface, et se définit comme une technique hautement sensible. Ainsi, en utilisant des surfaces métallisées comme substrats, l'augmentation du signal Raman peut habituellement croître de l'ordre de 10^4 - 10^6 tout en allant jusqu'à une amplification de 10^8 ou encore 10^{14} pour certains systèmes^{61, 82}. Il est alors possible de décrire le facteur d'amplification de cette façon :

$$EF_{SERS}(\omega_\nu) = \frac{|E_{out}(\omega)|^2 |E_{out}(\omega - \omega_\nu)|^2}{E_0^4} = \frac{\left[\frac{I_{SERS}(\omega_\nu)}{N_{surf}} \right]}{\left[\frac{I_{NRS}(\omega_\nu)}{N_{vol}} \right]} \quad \text{Équation 1.11}$$

L'équation ci-dessus permet de décrire comment les champs électromagnétiques résultants de l'excitation incidente ($E_{out}(\omega)$) ainsi que du déplacement Raman Stokes ($E_{out}(\omega - \omega_\nu)$) ont un effet sur l'amplification du signal Raman. L'intensité d'amplification Raman I_{SERS}

(ω_v) est normalisée par le nombre de molécules liées à la surface métallique amplificatrice, N_{surf} , de même que l'intensité Raman normale $I_{NRS}(\omega_v)$ normalisée par le nombre de molécules dans le volume d'excitation, N_{vol} . Cette équation est utile pour comparer l'amplification obtenue par différents matériaux actifs en SERS selon leur nature géométrique ainsi que leur longueur d'onde LSPR.²⁶

1.3.2.2 Détection SERS d'une molécule unique

L'exaltation produite par l'effet SERS est telle que des molécules ayant des concentrations de plus en plus faibles peuvent être détectées. Nie *et al.* ainsi que Kneipp *et al.* ont pu déterminer que la sensibilité de cette technique lui conférerait également la capacité de détecter une molécule unique.⁸⁴⁻⁸⁹ En effet, la force du signal SERS pour une molécule unique peut être beaucoup plus intense que le signal de luminescence émis par une molécule hautement fluorescente.⁸⁹ Cependant l'adsorption de molécules à la surface de substrats métalliques ne permet pas de donner une densité uniforme. En effet, dans une solution colloïdale, plusieurs molécules peuvent s'adsorber à la surface d'une seule nanoparticule, et cela pour des concentrations d'analyte extrêmement faible (de l'ordre du picomolaire), si la concentration des nanoparticules est faible également. La détection de molécule unique en SERS est toujours associée à la présence de points chauds (ou *hot spots*), typiquement situés à la jonction entre les nanostructures métalliques. Le champ EM localisé au niveau de ces régions peut aller jusqu'à un facteur de 10^{11} .⁹⁰ Ce sont seulement les molécules situés au niveau des points chauds qui produiront alors un signal SERS mesurable.⁹¹ De plus, Shalaev *et al.*⁹² ont développé ce concept de points chauds existant au niveau de surfaces fractales. Grâce à ce phénomène, le signal Raman peut augmenter de 10^4 son facteur d'amplification. L'utilisation de nanoparticules d'or avec un levier AFM recouvert d'une couche d'or également, comme effectuée dans ce mémoire, et où le champ EM est confiné à la pointe favorise ce phénomène dit de « couplage plasmonique ». En effet, il a été démontré que lorsque deux nanoparticules métalliques (de métal noble) se retrouvent à proximité l'une de l'autre (quelques nanomètres) pour former un nanodimère métallique, leurs plasmons de surface localisés respectifs peuvent coupler à travers les interactions en champ proche, et créer ainsi des champs électriques fortement amplifiés, et par

conséquent une grande exaltation du signal SERS à la surface du métal, et plus précisément à l'interstice entre les deux particules.^{65, 93-98}

1.3.2.3 Interactions dipolaires et modes de résonance plasmonique

Les nanoparticules peuvent avoir un effet « antenne » en SERS, puisqu'elles facilitent le couplage entre un oscillateur électrique local et les ondes propagatives du champ EM. Ainsi, les nanoparticules agissant telles des nano-antennes plasmoniques, permettent une intense amplification locale des champs électromagnétiques menant ainsi à l'amplification de la diffusion Raman. Cependant certaines interactions pourront modifier ces propriétés optiques dans le cas où plus d'une nanoparticule métallique est considérée. En effet, lorsque la distance (d) entre deux nanoparticules est de l'ordre de la longueur d'onde incidente, les interactions dipolaires de type champ lointain domineront, et le couplage entre les particules sera inversement proportionnel à la distance les séparant (et dépend donc de d^{-1}). Ceci permettra le déplacement de la bande plasmonique correspondante dans le spectre LSPR.⁹⁶ Cependant, lorsque la distance séparant les nanoparticules devient plus faible que la longueur d'onde incidente, les interactions dipolaires de type champ proche domineront, et le couplage inter-particulaire diminuera en fonction de la distance séparant les deux particules selon d^{-3} . Ce sont ces types d'interactions qui permettront l'utilisation de nanoparticules pour la détection de protéine, dans la mesure où ces faibles distances inter-particulaires mènent à la formation de zones ayant un fort confinement du champ électromagnétique, ou points chauds.⁹⁹⁻¹⁰⁰ Une diminution de la distance inter-particulaire lors d'une polarisation du champ électrique incident parallèlement à l'axe de couplage des nanoparticules, permet d'augmenter la force de couplage perturbant alors les oscillations collectives des électrons, et diminuant leur fréquence d'oscillation. Ceci se traduit par le déplacement de la bande LSPR vers de plus hautes longueur d'ondes, ou déplacement bathochromique (déplacement vers le rouge). Au contraire la diminution de la distance entre particules permet le déplacement de la bande LSPR vers de plus faibles longueurs d'onde, ou déplacement hypsochromique (déplacement vers le bleu) pour une polarisation perpendiculaire.

En termes de modes de résonance plasmonique, lorsque deux particules métalliques se retrouvent à proximité l'une de l'autre, et que leur taille est assez petite afin que leur plasmons respectifs soit dominé par la contribution du mode dipolaire, il y aura alors la possibilité de coupler 4 modes distincts. Deux modes auront leurs dipôles alignés dans le même axe reliant les particules métalliques, et seront appelés « modes longitudinaux », tandis que les deux autres modes auront leurs dipôles dirigés perpendiculairement à l'axe reliant les particules, et seront appelés « modes transversaux ». Chaque type de couplage possèdera un mode dipolaire actif, dit « en phase », et un mode dipolaire inactif, dit « hors phase ». Ces modes contribueront alors au déplacement de la bande plasmonique dans le spectre d'extinction des particules métalliques, mais seulement dans le cas des modes « en phase », car les modes « hors phase » ne pourront pas interagir avec la lumière incidente. De plus, le dipôle induit par le mode longitudinal actif est en phase avec le dipôle induit par le plasmon de la nanoparticule voisine, contrairement au mode transversal (dipôle déphasé). Ceci permet de favoriser énergétiquement le mode longitudinal, qui présentera alors une fréquence de résonance inférieure au mode transversal. Ainsi, le spectre d'extinction associé à une suspension colloïdale dont les nanoparticules sont agrégées sera dominé par le mode de couplage plasmonique longitudinal, et subira alors un déplacement bathochromique.

Ainsi, le SERS permet d'acquérir de l'information spécifique sur les surfaces de matériaux analysés, comme par exemples les monocouches, ou encore de déterminer la résolution spatiale grâce au confinement spatial du champ électrique local à proximité des nanoparticules, et non par la limite de diffraction. Pour certains types de nanostructures, le confinement du champ peut être inférieur à 10 nm, de façon à permettre l'analyse Raman pour de larges biomolécules.¹⁰¹ La dispersion du champ électromagnétique local autour de la nanoparticule est un point important dans ce mémoire. L'amplitude du champ diminue de façon significative avec l'éloignement à la surface de la nanoparticule. Le champ local exaltant doit donc pour cela recouvrir l'analyte que l'on veut détecter afin d'exercer son amplification. Il est donc nécessaire de souligner l'importance du confinement du champ électromagnétique dans l'étude des nanoparticules, notamment dans leur utilisation pour la détection de protéines. Ceci permettra alors de déterminer de la sensibilité du capteur à la protéine analysée, et de justifier du choix de l'utilisation de nanoparticules métalliques dans le cadre de ce mémoire.

1.4 Exaltation du signal Raman diffusé par effet de pointe (TERS)

Malgré la grande sensibilité que procure l'effet d'amplification SERS, cette technique ne permet cependant pas d'analyser des substrats présentant une certaine hétérogénéité.¹⁰² De plus, le degré d'amplification du signal dépend de la nature des molécules à la surface du substrat. Le SERS est également limité pour le choix de substrats, puisque celui-ci nécessite la présence d'un métal tel que l'or l'argent ou le cuivre.¹⁰³ C'est pourquoi une alternative plus judicieuse pourrait être proposée pour pallier ces obstacles. Sachant que le champ électrique est particulièrement élevé en SERS au niveau des sommets et des arêtes des nanostructures grâce à l'effet « antenne » observé, il serait possible d'utiliser les propriétés optiques que possèdent une pointe, comme par exemple une pointe de levier AFM, afin d'amplifier le champ électromagnétique. Les réactions effectuées à la surface de ce nouveau substrat permettraient une analyse quantitative et qualitative de façon localisée. La pointe utilisée permettrait également d'offrir une meilleure résolution spatiale en confinant l'amplification du champ EM, et introduirait ainsi un nouveau type de spectroscopie par diffusion Raman exaltée : la diffusion du signal Raman exalté par effet de pointe (*Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*, TERS).

1.4.1 Théorie du TERS

La diffusion Raman exaltée par effet de pointe (TERS) est une des variantes du SERS basée sur l'absorption de la lumière par une surface ou des nanoparticules métalliques, résultant alors en une exaltation du signal Raman. Dans le cas de la spectroscopie TERS, les nanoparticules métalliques sont remplacées par une pointe ayant une couche métallique à sa surface et permettant de localiser l'amplification du signal. Cette technique de diffusion Raman exaltée découverte en 2000, n'a cessé de se développer afin de prouver ses capacités à générer une amplification du champ électromagnétique de façon localisée. De plus, sa faculté à analyser différents matériaux biochimiques, organiques ou encore inorganiques, et à effectuer une caractérisation chimique et topographique avec une résolution de l'ordre du nanomètre, lui permettent de s'inscrire comme une technique de choix dans l'analyse structurale de haute résolution.¹⁰⁴

1.4.1.1 Amplification du champ avec une nanoparticule unique

Tout d'abord il est nécessaire de décrire la notion d'amplification de champ électromagnétique localisé à l'extrémité d'une sonde, telle une pointe. Une amplification optimale du champ peut se retrouver sur certaines nanostructures métalliques telles que des nanoparticules métalliques de 10 à 100 nm de diamètre, au niveau des courbures, de même qu'elle augmente énormément lors d'une agrégation de ces nanoparticules.¹⁰² Cette amplification intense peut également se produire au niveau d'une sonde métallique utilisée en TERS, et repose sur les deux mêmes principes physiques qui constituent la base de la spectroscopie SERS, à savoir l'effet électromagnétique ainsi que l'effet chimique ou de transfert de charge, appliqué seulement sur la première couche des adsorbats.¹⁰² De façon à garantir une fiabilité d'amplification du champ, il serait alors possible d'utiliser une nanoparticule métallique unique à la surface des pointes utilisées en TERS pour des études de surfaces¹⁰⁵, grâce à laquelle l'exaltation serait encore plus importante.^{88, 105-108} En effet, Nie et Emory⁸⁸ ont étudié l'adsorption d'une molécule unique sur une nanoparticule unique en SERS. En démontrant l'amplification intense de la signature Raman observée pour la molécule et produite par le couplage d'une molécule unique avec les nanoparticules, les auteurs ont pu démontrer que les propriétés dépendantes de la taille des nanoparticules pouvaient être observées à l'échelle d'une nanoparticule unique. De la même façon, Khan *et al.* ont voulu étudier l'activité SERS observée pour une nanoparticule, et ont comparé les résultats à ceux observés pour des petits agrégats de nanoparticules.¹⁰⁹ Leurs résultats ont démontré que les nanoparticules uniques possédaient une intensité SERS moyenne similaire à celle observée pour les dimères ou encore les trimères de nanoparticules. Cependant, les nanoparticules uniques donnaient un signal SERS 3 à 4 fois inférieur à celui observé pour les gros agrégats de nanoparticules, et ceci en dépit d'une meilleure reproductibilité d'analyse. En effet, les molécules adsorbées à la surface des nanoparticules, et se trouvant à la jonction entre au moins deux d'entre elles, sont fortement dépendantes de la polarisation. Les agrégats pouvant ne pas être bien orientés avec le faisceau incident, il peut alors y avoir une fluctuation d'intensité menant à une mauvaise reproductibilité du signal SERS.⁴⁶ Toutefois, travailler avec une particule unique est peu pratique puisqu'il est impossible de la localiser avec précision. De nombreuses publications portant sur la technique TERS ont permis de démontrer que différents substrats pouvaient être utilisés pour localiser le

signal au niveau d'une pointe idéale, tels que des pointes de leviers AFM¹¹⁰, ou encore des pointes de fibres optiques¹¹¹ auxquelles étaient immobilisées des nanoparticules métalliques.

1.4.1.2 Pointe de levier AFM comme substrat TERS

Un des moyens de localiser un nano-objet avec précision est d'utiliser un microscope à sonde locale, dont la microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy*, AFM) fait partie. Une pointe d'un levier AFM, si métallisée, peut devenir un nanomatériau plasmonique et un émetteur Raman. Une activité plasmonique stable de la pointe AFM permettra d'obtenir une amplification fiable du signal Raman, et donc une imagerie chimique hautement résolue. Les paramètres géométriques de la pointe AFM tels que sa rugosité, ou encore sa taille et sa forme, ainsi que les conditions d'illumination utilisées lors des mesures Raman, jouent un rôle crucial dans les propriétés plasmoniques du substrat.¹⁰⁴ En effet, la distribution du champ évanescent sur la pointe variera selon la polarisation du faisceau laser, tout en étant maximale lorsque la polarisation du faisceau lumineux s'effectue le long de l'axe de la pointe AFM.¹¹² Les plasmons de surface localisés associés au champ amplifié sont excités par la lumière incidente, ce qui permet alors de convertir le champ EM propagatif du laser en un champ évanescent comme expliqué dans la section 1.2.2. Ce champ sera alors confiné au niveau de la pointe, et fortement amplifié à l'interstice entre la pointe et la couche métallique à sa surface. Tel qu'illustré à la Figure 1.12, une forte amplification du signal sera avantagée lorsque la pointe serait à proximité d'une surface d'or. En effet, le dipôle associé à la pointe sera excité par le champ EM incident, et ceci en polarisant le faisceau de façon radiale, et non de façon linéaire, puisque seules les composantes du champ parallèles à l'axe de la pointe contribuent à l'amplification du signal. Yang *et al.* ont comparé ainsi une unique pointe recouverte d'or (Figure 1.12.a) à une pointe recouverte d'or située à proximité d'une surface métallique (Figure 1.12.b).¹¹³ La composante M définit le rapport entre le maximum du champ local et le champ incident, et est maximal pour un système comportant à la fois la pointe d'or et la surface métallique, le facteur d'amplification pouvant augmenter jusqu'à un facteur de 10^9 . De plus l'intensité du spectre TERS observé expérimentalement est fortement dépendante de la distance séparant la pointe de la surface métallique. En effet, plus la distance entre les deux substrats augmentera, et plus l'intensité du signal TERS diminuera.¹¹⁴

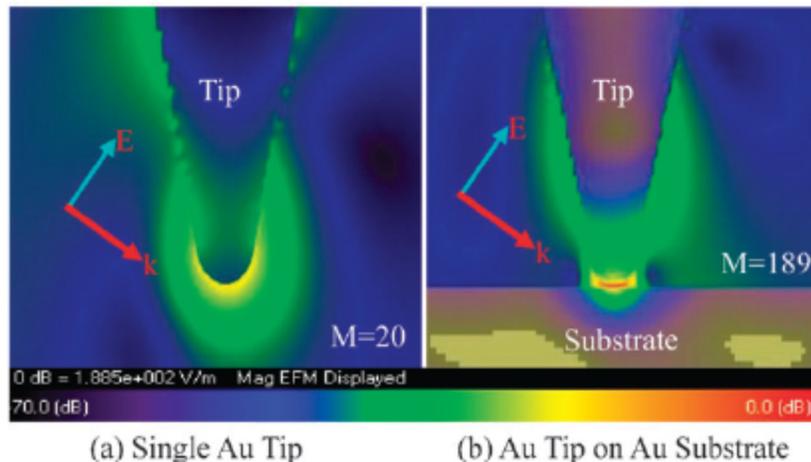


Figure 1.12 Simulation de la distribution du champ électrique (a) sur la pointe d'un levier AFM recouvert d'or et (b) sur la pointe d'un levier AFM recouvert d'or située à une distance de 2 nm d'un substrat d'or. La polarisation E et le vecteur d'onde k de la lumière incidente sont illustrés dans le schéma, et la composante M définit le maximum d'amplification du champ localisé. Reproduit avec la permission de la référence ¹¹³. Copyright © 2009, John Wiley & Sons, Ltd.

Le substrat métallique se trouvant à proximité de la pointe pourrait se définir comme étant une nanoparticule d'or, puisque l'on désire effectuer pour ce projet une détection en sandwich d'un analyte, et ceci grâce à l'utilisation de nanoparticules conjuguées à des anticorps secondaires. Ainsi, les nanoparticules d'or permettraient une intense amplification de champ grâce à leur proximité avec la pointe, de même qu'elles procureraient également une plus grande surface d'absorption pour les anticorps secondaires utilisés dans le cadre de la détection en sandwich. Il serait alors possible d'utiliser une pointe d'un levier AFM pour modèle, et de le recouvrir d'un film métallique par évaporation. En ajoutant des nanoparticules au niveau de cette pointe, le phénomène TERS pourra alors être généré. Wang *et al.*¹¹⁵ ont utilisé une technique d'immersion de la pointe AFM dans une solution colloïdale d'argent. Dans ce mémoire les pointes AFM ont été également utilisées et mises en contact avec des nanoparticules d'or à des fins de détection biologique secondaire. Ainsi, en remplaçant la surface métallique utilisée en SERS, par une fine pointe métallique servant de site actif unique, une seule nanoparticule serait

alors nécessaire pour produire un fort signal spectroscopique (Figure 1.13). En plus de l'exaltation de champ qu'elle procure, le TERS possède une sonde suffisamment petite lui permettant alors d'améliorer la résolution latérale de 10 nm.^{108, 116-119} L'avantage de l'effet TERS est l'excitation efficace des SPP au sommet de la pointe métallique.¹²⁰

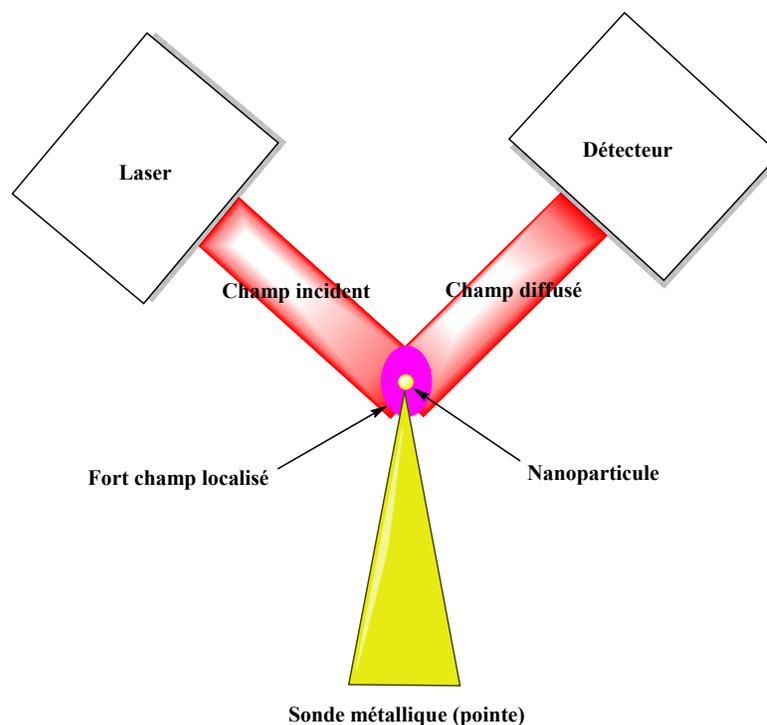


Figure 1.13 Représentation schématique de la mesure TERS sur une pointe métallique avec une nanoparticule à son extrémité.

1.4.1.3 Couplage plasmonique entre pointe TERS et nanoparticules métallisées

La spectroscopie TERS a contribué au développement de recherches pour la détection de matériel chimique et biologique grâce à une approche de caractérisation moléculaire à l'échelle nanoscopique. Une sonde AFM associée à une spectroscopie Raman pourrait donc s'avérer une technique efficace fournissant une augmentation de sensibilité, de sélectivité, et de résolution spatiale.¹¹⁶ L'utilisation de cette technique spectroscopique associée à l'utilisation de leviers AFM peut également être effectuée en immersion dans un liquide tel que l'eau. Schultz *et al.* ont ainsi pu imager des nanoparticules conjuguées à des anticorps sur des membranes cellulaires en utilisant la spectroscopie TERS. En effet la diffusion des nanoparticules est

indicative des particules isolées au niveau des membranes cellulaires où s'effectuent les interactions entre biomolécules spécifiques, et les sondes sur lesquelles elles sont conjuguées, à savoir les nanoparticules. Schultz *et al.* ont pu démontrer qu'en focalisant une source polarisée radialement ceci permettait d'obtenir une combinaison entre le couplage plasmonique entre une pointe TERS et les nanoparticules, et le champ électrique, menant ainsi à la formation d'images Raman dont la résolution spatiale était inférieure à 50 nm. Une augmentation drastique du signal Raman a été observée lors des mesures TERS utilisant les nanoparticules conjuguées à des anticorps, et a pu être expliquée grâce à deux effets. Le premier effet est dû au couplage plasmonique entre les nanoparticules d'or conjuguées et la pointe métallique située à proximité permettant la formation d'un petit espace entre les deux structures métalliques (*gap*) et ayant le même effet d'amplification que pour l'espace entre deux particules formant un dimère (tel qu'expliqué à la section 1.3.2). Le second effet est dû au déplacement de la fréquence plasmonique survenant lors du couplage entre la pointe TERS et les nanoparticules immobilisées à sa surface. En effet, lorsque la pointe sera à proximité des nanoparticules d'or, le LSPR de la pointe et celui des nanoparticules interagiront, causant alors un déplacement de la fréquence vers de plus hautes longueurs d'onde pour la diffusion maximale des nanoparticules.^{94, 96-99, 121-122}

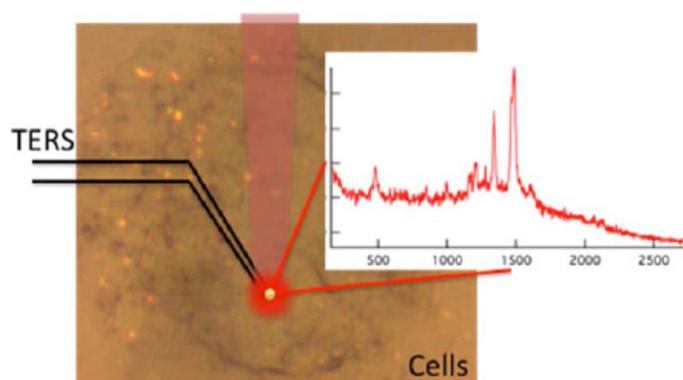


Figure 1.14 Spectre TERS obtenu pour la détection de nanoparticules conjuguées sur des membranes cellulaires. Reproduit avec la permission de la référence ¹²³ Copyright © 2012.

American Chemical Society.

1.4.1.4 Propriétés plasmoniques d'une pointe TERS

La capacité à confiner le champ électromagnétique au sommet d'une pointe métallique reste une des principales caractéristiques de la technique TERS. De par la forme de la sonde, et la résonance des plasmons de surface reliant la longueur d'onde d'excitation de la source lumineuse avec la géométrie de la pointe, le TERS possède une importante résolution spatiale. L'amplification associée au TERS varie en fonction de la position de la particule sur la pointe utilisée. En effet, tout comme le SERS, et l'effet « antenne » associé au phénomène, le confinement du champ EM amplifié est le plus important au niveau des sommets et arêtes des structures utilisées. C'est donc à ces régions précises d'un levier AFM que le champ confiné sera amplifié, donnant ainsi une meilleure exaltation du signal TERS. L'apex de la pointe TERS a donc un rôle de structure plasmonique en TERS. En effet, l'excitation LSPR au niveau de la pointe permet une exaltation du champ EM, et du signal Raman résultant, tout en confinant l'amplification du signal de façon localisée. De plus, les propriétés électriques du métal utilisé ainsi que la taille et forme de la pointe auront une influence considérable sur le facteur d'amplification et sa distribution spatiale dans les différentes régions de la pointe. Ces considérations peuvent être prises en compte grâce à différents modèles décrits théoriquement, telles la méthode de calcul de différences finies dans le domaine temporel (*Finite Difference Time Domain*, FDTD)¹²⁴⁻¹²⁵, et la méthode des éléments finis (*Finite Element Method*, FEM)¹²⁶⁻¹²⁷ permettant de résoudre respectivement les équations de Maxwell et de Helmholtz. C'est grâce à ces différents modèles, qu'il a été possible pour Deckert *et al.*¹⁰² de calculer l'amplification du champ électromagnétique induit par l'illumination d'une nanoparticule métallique ou de la pointe par la source lumineuse. Dès lors, l'immobilisation d'une molécule dans la cavité située entre ces deux nanostructures métalliques (nanoparticules et pointe), permettra d'augmenter grandement son signal Raman.

1.4.2 Applications du TERS

En délivrant de l'information chimique sur des matériaux biologiques caractérisés à la surface d'une sonde en forme de pointe, la spectroscopie TERS s'avère être une technique de choix pour une amplification du signal de la diffusion Raman. Le matériel biologique peut être caractérisé par ses propriétés de structure moléculaire ainsi que conformationnelles. Sachant que

les biomolécules sont de faibles diffuseurs Raman, l'exaltation apportée par l'utilisation du TERS leur apporte une caractérisation efficace.¹²⁸ Ainsi, la caractérisation TERS peut être appliquée à l'étude de protéines, d'ADN et ARN, ou encore de virus et bactéries.^{123, 129-130} En plus des analyses biologiques que cette technique est capable d'effectuer, plusieurs caractérisations inorganiques peuvent également être accomplies, telles que les caractérisations de nano-fils de germanium¹³¹⁻¹³² ou de séléniure de cadmium¹³³, ou encore l'analyse de nanotubes de carbone¹³⁴⁻¹³⁵ ainsi que des caractérisations de cristallographie.¹³⁶ Il est également possible d'utiliser d'autres types de pointes, telles que des fibres optiques modifiées par étirement physique afin d'obtenir la forme de pointe désirée, de façon analogue à l'ouverture des sondes en champ proche.¹³⁷

Tout en conservant une grande sensibilité, le TERS permet d'ajouter certains avantages en combinant une haute résolution spatiale nanométrique due à l'optique en champ proche à la spectroscopie permettant d'obtenir des informations sur la nature chimique.¹³⁸ Le TERS permet également de pallier plusieurs inconvénients que procurent le SERS comme la grande sélectivité à des surfaces ou nanomatériaux métalliques rugueux tous fabriqués à partir de métaux spécifiques tels que l'or¹³⁹⁻¹⁴⁰ ou l'argent.^{79, 140} Il permet d'élargir son domaine d'analyse à toutes les configurations substrat/adsorbat où le substrat rugueux ou lisse¹⁴¹, peut être conducteur⁸¹, semi-conducteur¹⁴²⁻¹⁴³ ou encore isolant, et où l'adsorbat peut être ou non en résonance optique avec la ligne du laser optique. Cette technique combine les avantages fournis par la spectroscopie Raman et la microscopie à sonde locale comme l'AFM, à la haute sensibilité qu'apporte l'amplification due au champ proche. La surface métallique utilisée comme support amplificateur du signal Raman en SERS est remplacée par une pointe métallique, telle qu'un levier AFM sur laquelle le signal peut être localisé. Le TERS est capable de fournir des informations à l'échelle nanoscopique, de telle sorte qu'il est possible d'utiliser des nanoparticules en obtenant un signal très fortement amplifié, ainsi qu'une résolution latérale similaire aux dimensions des particules utilisées.¹⁰² Ainsi, le TERS, spectroscopie dérivant du SERS, et nouvelle technique développée récemment, permet de localiser le signal Raman exalté au sommet d'une pointe grâce à sa capacité à confiner un champ EM fortement amplifié. Dans le cadre de ce projet, la pointe utilisée était une pointe de levier AFM pyramidale à base carrée,

et permettait de développer la formation de biocapteurs à leur surface, éléments ensuite caractérisés par la spectroscopie TERS.

1.5 Objectifs du projet

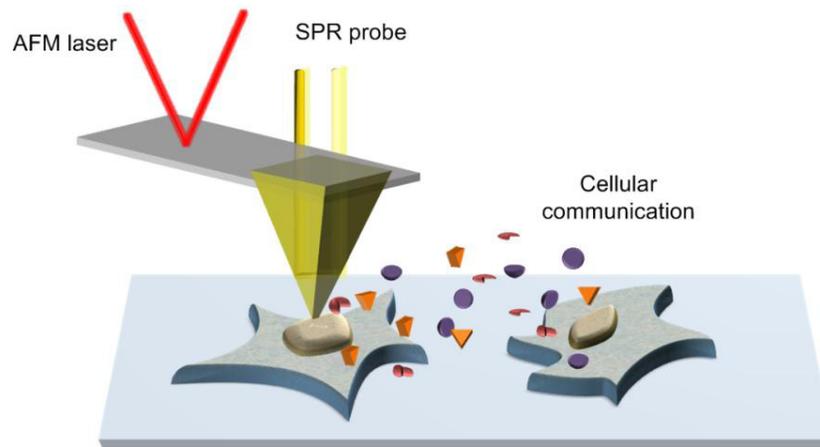


Figure 1.15 Schéma simplifié de localisation du signal SPR à la pointe d'un levier AFM lors de phénomènes de communication cellulaire.¹⁴⁴

L'objectif principal de ces recherches est de permettre la mesure de la concentration locale des messagers chimiques sécrétés par les cellules afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés aux métastases du cancer. Le développement d'une nouvelle technique basée sur la réponse plasmonique sur des leviers AFM permettra d'étudier les réactions chimiques et biologiques à la surface de ces leviers grâce au phénomène SPR ainsi qu'à la diffusion Raman exaltée par effet de pointe (TERS). En effet, il est possible de localiser l'amplification du signal Raman à la surface d'un levier AFM tout comme le principe de la diffusion Raman exaltée par effet de surface (SERS) basée sur la diffusion de la lumière par des nanoparticules métalliques permettant une large amplification du signal Raman.

Spécifiquement, ce mémoire démontrera qu'un biocapteur peut être construit sur une pointe de levier AFM pour développer ce nouvel outil spectroscopique de mesure localisée de

biomolécules basé sur la réponse plasmonique sur des leviers d'AFM. Les avantages de la microscopie à force atomique reliés aux avantages de la spectroscopie TERS permettrait l'acquisition d'une haute résolution spatiale de l'ordre du nanomètre en balayant des aires microscopiques grâce à la sonde AFM, ainsi que l'utilisation de ces sondes (leviers) à l'échelle cellulaire, tout en conservant une bonne sensibilité due à la spectroscopie SPR. La spectroscopie TERS étant une technique relativement nouvelle, peu d'information est disponible sur la réponse Raman de molécules biologiques immobilisées sur la pointe d'un émetteur TERS. En effet, les propriétés plasmoniques des pointes TERS ne sont pas encore bien définies et la détection (semi)-quantitative de biomolécules n'a toujours pas été démontrée. Ces travaux s'inscrivent dans les efforts du groupe Masson pour développer une technique de mesure localisée, adressable dans l'espace et le temps pour mesurer des messagers chimiques moléculaires sécrétés par les cellules. La spectroscopie TERS sera utilisée à des fins de caractérisation des réactions effectuées pour la construction d'un biocapteur sur la pointe des leviers d'AFM. Ainsi, en localisant l'exaltation du signal sur le levier à l'aide d'une caractérisation TERS, les réactions chimiques et biologiques seront observées à la surface de ces leviers.

Au cours des travaux réalisés, la surface du levier a été recouverte d'une nano-couche métallique d'or, puis des réactions biologiques ont ensuite été effectuées pour en faire un biocapteur. Une détection secondaire utilisant des nanoparticules d'or conjuguées à du matériel biologique (anticorps secondaire) permettait d'induire davantage d'amplification du signal spectroscopique SPR et Raman lors de la détection d'antigène. Par la suite, une nouvelle technique d'instrumentation d'imagerie pourrait être développée en miniaturisant le signal SPR sur les pointes AFM grâce à la création d'un micro-détecteur protéique capable de détecter et quantifier en temps réel des messagers moléculaires dans le cadre de l'étude de la communication cellulaire.

2 Partie expérimentale

2.1 Biodétection sur substrats nano-structurés

2.1.1 Préparation des réseaux nano-structurés : nano-triangles d'Au

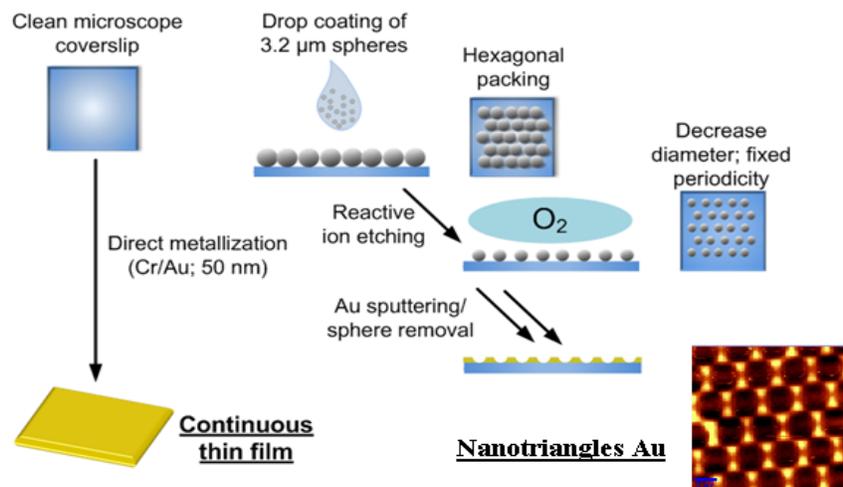


Figure 2.1 Lithographie de nanosphères (NSL) pour la formation de nano-triangles d'or.

Des microstructures ayant une forme triangulaire ont été formés afin de rendre compte le plus précisément possible de la réponse d'un levier d'AFM pyramidal par mimétisme. Des arrangements périodiques de micro-triangles ont été formés par la technique de dépôt d'une goutte de solution grâce à la technique de lithographie de nanosphères (*Nanosphere Lithography*, NSL)⁵⁹ à la surface de fines lamelles de verre de dimensions 24 x 60 mm (Fisher), préalablement nettoyées à l'aide d'une solution de piranha. Trois tailles de billes de polymères ayant des diamètres de 820 nm, 1000 nm et 3,2 μm ont été utilisées pour pouvoir comparer différentes tailles de réseaux périodiques. Un volume de 200 μL de la solution de microsphères de 3,2 μm (polystyrène, Thermo Scientific) de diamètre a été mélangé avec 600 μL d'eau milliQ. De la même façon, un volume de 135 μL de billes de 1000 nm a été mélangé avec 600 μL d'eau,

tandis que 85 μL de billes de 820 nm ont été ajoutés à 600 μL d'eau. Chaque suspension a ensuite été délicatement mélangée et un volume de 130 μL de cette solution a été déposé par revêtement par goutte, ou *drop-coating* sur une lamelle de verre. La solution fut séchée à température pièce sur les lamelles puis celles-ci ont été déposées par deux sur une lame de microscope. Les paires de lamelles recouvertes de solution colloïdales ont été couvertes à l'aide d'un couvercle de Pétri dont un bord a été surélevé par un embout de pipette. Cette manipulation a permis de ralentir l'évaporation du solvant, favorisant l'optimisation de l'auto-assemblage des billes de polymères à la surface du substrat, et ainsi l'organisation structurale du masque bidimensionnel. En effet, un arrangement hexagonal compact est formé lors de l'auto-assemblage des sphères monodisperses. Ce phénomène est largement exploité afin d'obtenir des arrangements organisés de nanosphères formant des patrons lithographiques.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶

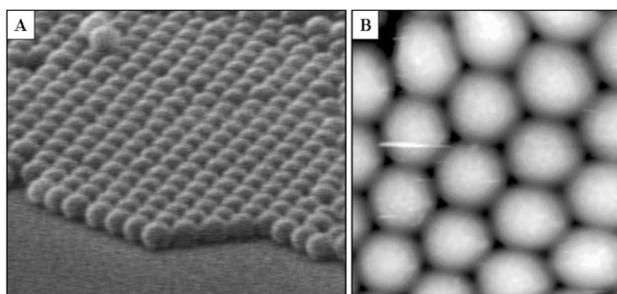


Figure 2.2 Arrangement de particules de latex ayant un diamètre de 500 nm observé par A) Microscopie électronique à balayage (SEM) et B) Microscopie à force atomique (AFM). Reproduit à partir de la référence¹⁴⁵. Copyright © 2005 avec la permission de The Royal Society of Chemistry.

Une fois la surface séchée, il a été possible d'observer à l'œil nu une irisation du masque caractéristique de la formation d'un cristal dû à l'organisation de la monocouche. Les billes de polymères ont par la suite été soumises à une gravure par plasma d'oxygène durant 3 minutes. La gravure au plasma réduit le diamètre des microsphères, tout en conservant l'organisation cristalline. Ceci permet l'obtention de triangles de plus grande taille, améliorant leur signal en SPR. Par la suite, le masque de polymère a été soumis à une déposition de 1 nm d'un film de chrome, ainsi que d'une mince couche d'or d'environ 50 nm par pulvérisation cathodique, ou

sputtering (Cressington). Une fois la déposition terminée, les billes de polymères ont été retirées grâce à l'immersion des lamelles de verre dans une solution d'éthanol soumis à un bain d'ultrasons durant 2 à 3 minutes. Les lamelles dépourvues de leur masque polymérique ont été rincées à l'éthanol pour enlever toute trace de billes de polymère résiduelles, puis séchées grâce à un jet d'azote.

2.1.2 Caractérisation des nano-triangles d'or

Il est possible de d'effectuer la caractérisation physique des substrats de nano-triangles grâce à la microscopie à force atomique (technique AFM détaillée en annexe). En effet, en sondant la surface et les différents reliefs de la surface nano-structurée, il est possible de déterminer l'épaisseur et la taille correspondant aux nano-triangles d'Or. La détermination de l'épaisseur de la couche métallique des nano-triangles a été effectuée pour une moyenne de 10 triangles pour chaque substrat. Les mesures AFM ont pu être réalisées grâce à un montage commercial destiné à la microscopie à balayage en champ proche (SNOM - *Alpha 300 s WITec*). L'objectif (Nikon, E Plan) utilisé avec un mode d'éclairage épiscopique pour observer les surfaces nanostructurées permettait un agrandissement de 20x, et une ouverture numérique de 0,40. Le balayage des substrats a été effectué à l'aide d'une pointe AFM (Vista Probe) en nitrure de silicium Si_3N_4 de forme pyramidale en mode *contact*. Les dimensions de la pointe utilisée étaient de 225 μm de longueur, et de 45 μm de largeur, et le rayon de courbure était inférieur à 10 nm.. La constante de force k de la pointe sur le substrat était de 3 N/m, et la fréquence de résonance de 62 kHz. Les paramètres des images AFM obtenues ont été modifiées de façon à obtenir le balayage d'une aire de 15 μm x 15 μm . La résolution choisie était de 100 nm (15 μm / 150 pixels) pour l'image composée de 150 pixels / ligne, et de 150 lignes / image. Chaque ligne avait un temps d'acquisition de 1 seconde. Les triangles obtenus à partir des masques lithographiques de nanosphères avaient une longueur moyenne de 400 nm pour les billes de 820 nm, 700 nm pour les billes de 1000 nm, et 1,4 μm pour les billes de 3,2 μm .

De plus, des mesures SPR des nano-triangles dans l'eau ont été effectuées, afin d'observer la position du plasmon correspondant. Les différentes périodicités de 3,2 μm , 1000 nm et 820 nm ont été observées, afin de comparer le déplacement de longueur d'onde relatif à

différentes tailles de nano-triangles. Le système SPR qui a été utilisé est un système miniaturisé de la taille d'une carte de crédit, qui a été construit de façon à combiner une fibre optique SPR permettant l'interrogation des longueurs d'ondes, et le mode de réflexion totale interne pour la lumière déviée grâce à un prisme de Dove. La source lumineuse provenait d'une lampe halogène, et était focalisée dans une fibre optique d'excitation ayant un diamètre de 230 μm , et connectée au système SPR. La lumière a pu alors exciter la fibre optique d'excitation, puis le faisceau a par la suite été collimaté grâce à une lentille de collimation SMA, passant à travers un polariseur, le prisme de Dove en verre BK7, sur lequel reposait le capteur SPR dont l'indice de réfraction était mesuré (ici, les nano-triangles d'or), lui-même reposant sur un milieu d'indice de réfraction différent (huile, RI = 1,515). Enfin le faisceau lumineux a été collecté par une seconde fibre optique de 230 μm de diamètre, en passant à travers une lentille de collimation SMA inversée. Un spectrophotomètre Ocean Optics mesurant une gamme de longueur d'onde comprise entre 550 nm et 1100 nm a pu être utilisé pour collecter la lumière, et une caméra CCD a permis d'analyser le faisceau collimaté. La gamme de longueurs d'onde du spectrophotomètre utilisé a permis la mesure de milieux ayant des unités d'indice de réfraction (*Refractive Index Unit*, RIU) comprises entre 1,33 RIU et 1,42 RIU. De plus, toutes les composantes du système SPR ont été alignées dans le même axe optique.⁴¹

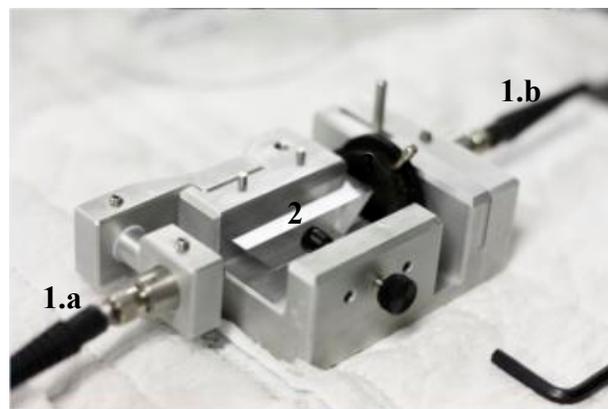


Figure 2.3 Photo d'un montage SPR miniaturisé utilisant un prisme de Dove. Les composantes principales du montage sont la fibre optique d'entrée (1.a), la fibre optique de sortie (1.b), le prisme sur lequel l'échantillon est déposé (2), et le polariseur (3).

2.1.3 Formation d'un biocapteur à la surface des nano-triangles d'or et analyses cinétiques en SPR

Un biocapteur pour l'IgG a été formé sur les nano-triangles et les diverses étapes de fonctionnalisation ont été mesurées cinétiquement en spectroscopie SPR grâce au suivi en temps réel du déplacement de la bande plasmonique correspondante aux substrats nano-structurés. Premièrement, les lamelles de verre sur lesquelles étaient gravés les réseaux périodiques de nano-triangles ont été fonctionnalisés à l'aide de 5 mM d'une monocouche d'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DNBA) dans l'éthanol, et la solution a été placée de façon à recouvrir entièrement les substrats. La monocouche auto-assemblée (*Self-Assembled Monolayer*, SAM) à la surface des substrats nano-structurés a été formée à température ambiante durant 16 heures. Puis les lamelles ont été retirées de la solution contenant la SAM, et ont été rincées à l'éthanol avant d'être délicatement séchées à l'aide d'un fin courant d'azote. Par la suite, grâce à l'utilisation d'un système à micro-fluidique relié à un canal, il a été possible d'emprisonner le substrat à la surface d'un prisme SPR placé à l'intérieur d'une chambre fluidique ayant une capacité volumique de 100 μL où différentes solutions ont pu être injectées à l'aide d'une seringue, et retirées après un temps précis. Le système de micro-fluidique est un montage maison construit à partir d'une cellule en Teflon comportant un canal ayant une profondeur de 0,5 mm. Le système permet d'encelluler le capteur SPR entre la surface du prisme de Dove et la cellule fluidique. Le canal à deux entrées a permis l'injection et l'évacuation d'une solution. Le taux d'écoulement de la solution injectée est estimé à 16 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$.⁴¹

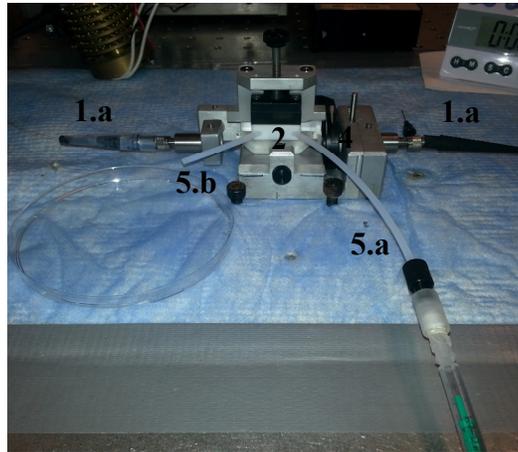


Figure 2.4 Photo d'un montage SPR avec un système de micro-fluidique. Les composantes principales du système sont la fibre optique d'entrée (1.a), la fibre optique de sortie (1.b), le prisme (2) emprisonné à l'intérieur d'une cellule fluidique en Teflon (3), le polariseur (4), et le canal d'entrée (5.a) et de sortie (5.b) de fluide injecté à l'aide d'une seringue.

Ainsi, 1 mL d'eau a été injecté sur le substrat nano-structuré pour amorcer l'expérience en stabilisant la ligne de base, puis a été remplacée par 500 μ L du mélange d'une solution d'éthyl (diméthylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) en proportion 1 : 1 pour une durée de 2 min. Cette solution a par la suite été éjectée grâce à l'ajout de 1 mL d'une solution phosphate à pH 4,5 préparée à partir d'une solution tampon phosphate (*Phosphate Buffer Saline*, PBS, Corning Cellgro), et immergeant le substrat durant 3 min. Un volume de 300 μ L d'une solution d'anti-IgG à 260 nM (Jackson ImmunoResearch), préparée dans du tampon PBS à pH 7,4 a ensuite été introduit dans le canal fluidique durant une période de 15 minutes. Puis, 1 mL d'une solution de PBS 7,4 a été injecté pour une période de 2 min afin de laver la surface des anticorps non liés, puis a été remplacé par 1 mL d'une solution hydrochlorure d'éthanolamine (Sigma-Aldrich) 1 M ajustée à un pH de 8,5 pendant 5 min.. Un volume de 1 mL de PBS 7,4 a par la suite permis de rincer la cellule fluidique en immergeant le substrat durant 5 min. La détection de l'IgG a été effectuée grâce à l'injection de 300 μ L d'une solution d'IgG (Jackson ImmunoResearch) 100 nM dans du PBS 7,4 immergeant le capteur durant 10 minutes. Enfin les substrats de nano-triangles ont été mis en présence de PBS 7,4 durant 5 min suivi d'un lavage à l'eau, et de séchage du substrat.

2.2 Détection secondaire d'IgG par l'utilisation de nanoparticules d'or

2.2.1 Synthèse des nanoparticules d'Au

2.2.1.1 Synthèse des nanoparticules d'Au sphériques

Les nanoparticules d'or sphériques (AuNPs) ont été synthétisées selon la méthode de synthèse de Turkevich¹⁴⁷ reposant sur la réduction de sels d'acide chloraurique HAuCl_4 en solution grâce à l'action du citrate, excellent agent réducteur. En enrobant les cristaux d'or, le citrate habituellement précurseur de la croissance des nanoparticules, forme également une couche à leur surface bloquant ainsi leur croissance de façon exagérée, et créant un équilibre dans la croissance. Ceci empêche donc l'agrégation des nanoparticules, lui donnant alors également un rôle d'agent stabilisant.^{27, 148}

La préparation des nanoparticules d'or sphériques a été effectuée de façon à obtenir des nanoparticules d'un diamètre variant entre 35 et 40 nm. Il a été nécessaire de préparer les germes (*seeds*) de nanoparticules d'or ayant un diamètre de 17 à 20 nm suivant la procédure développée par Grabar *et al.*¹³⁹ Toutes les manipulations ont été faites dans de la verrerie préalablement lavée à l'eau régale $\text{HCl} : \text{HNO}_3$ (3 : 1 vol.). Les solutions mères ont été préparées dans des tubes en plastiques de 15 mL à partir de 50 mg d'acide chloraurique (25,4 mM) (HAuCl_4 , Fisher Scientific) dans 5 mL d'eau millipore, de 171 mg sodium citrate (38,8 mM) (NaCt_3 , Fisher Scientific) dans 15 mL d'eau millipore, et de 70 mg d'hydroxylamine (200 mM) (NH_2OH , Sigma-Aldrich) dans 5 mL d'eau millipore. Il a été nécessaire d'utiliser une spatule en plastique et non métallique pour peser l'acide chloraurique, puisque celui-ci est très réactif avec les autres métaux en raison de son fort pouvoir oxydant, ce qui formerait des cations métalliques et nuirait à la pureté de la solution colloïdale.

La solution de germes a été préparée en ajoutant 125 mL d'une solution fille de HAuCl_4 (254 μM , dilution x100 de la solution mère) dans un ballon rond. La solution a vigoureusement été agitée et chauffée à 100°C à l'aide d'un montage à reflux. Une fois la solution portée à

ébullition, 12,5 mL de NaCl_3 prélevée dans la solution mère (38,8 mM) ont été ajoutés rapidement à l'aide d'une seringue. La solution fut chauffée durant une dizaine de minutes jusqu'à l'observation d'un changement de couleur. Le ballon contenant la suspension de germes colloïdaux a été retiré de la plaque chauffante, tout en maintenant l'agitation durant une quinzaine de minutes. La solution a ensuite été refroidie grâce à un bain de glace.

Ces germes ont été utilisés afin de synthétiser des nanoparticules d'or sphériques ayant un diamètre de plus de 20 nm, suivant la méthode établie par Brown *et al.* La solution de AuNPs ayant un diamètre de 35 à 40 nm a été préparée dans un erlenmeyer de 500 mL à partir de 30 mL de la solution de germes dans un volume d'eau millipore de 270 mL. La suspension a été agitée vigoureusement, et un volume de 3 mL de la solution mère de NH_2OH (200 mM) y a été ajouté très rapidement à l'aide d'une seringue. Un volume additionnel de 2 mL de la solution mère de HAuCl_4 (25,4 mM) fut également ajouté au goutte-à-goutte. Le mélange réactionnel a été agité pendant 10 minutes, puis entreposé à l'abri de la lumière à 4°C.

2.2.1.2 Synthèse des nanoparticules d'or framboises (nano-framboises)

Des nanoparticules d'or ayant une forme analogue aux framboises, ou nano-framboises, ont été synthétisées à partir d'une méthode de synthèse développée par Xie *et al.* De la même façon que pour la synthèse des nanoparticules d'or sphériques, la verrerie a été préalablement nettoyée avec une solution d'eau régale $\text{HCl} : \text{HNO}_3$ (3 : 1 vol.), puis rincée à l'éthanol et à l'eau millipore. Une solution aqueuse d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) a été préparée dans l'eau, et son pH a été ajusté à environ 7,4 à une température de 25°C. Un volume de 1 mL de la solution d'HEPES (100 mM) à pH 7,4 a été mélangé avec 9 mL d'eau déionisée, puis 250 μL de HAuCl_4 (20 mM). La solution contenue dans un erlenmeyer a été agitée durant la nuit, et la solution est passée alors d'une couleur jaune à une couleur rose pour finalement devenir bleue. Le diamètre de 70 nm a été établi par microscope électronique en transmission.

Les paramètres physiques des nanoparticules nouvellement synthétisées ont été définies grâce à différentes techniques de caractérisation, telles que la spectroscopie UV-Vis (taille et

concentration), ou encore la microscopie électronique en transmission (taille et polydispersité), et les résultats sont détaillés à la section 4.1.1. pour les nanoparticules d'or sphériques et à la section 4.3.1. pour les nano-framboises d'or. Pour la caractérisation des nanoparticules en microscopie électronique en transmission (TEM), une goutte de suspension de nanoparticules a été déposée sur une grille de nickel préalablement recouverte d'un film de polymère (Formvar) et laissée à sécher. Le microscope électronique à transmission (Jeol JEM-2100F) a été utilisé avec une tension d'accélération de 200 kV. Pour la caractérisation des nanoparticules en spectroscopie UV-Vis, 1 mL de suspension a été introduit dans une cuvette transparente en plastique pour chacune des mesures faites à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis (Cary100 Bio) et analysées grâce au logiciel Cary WinUV.

2.2.2 Formation de la monocouche auto-assemblée DSNB recouvrant les AuNPs

Le 5,5'-dithiobis (succinimidyl-2-nitrobenzoate) (DSNB) a été synthétisé partir de l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DNBA, Sigma-Aldrich) et du carbodiimide d'éthyl(diméthylaminopropyle) (EDC, Fluka Analytical) avec N-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich), selon le protocole pour la synthèse de DSNB de Grubisha *et al.*¹⁴⁹

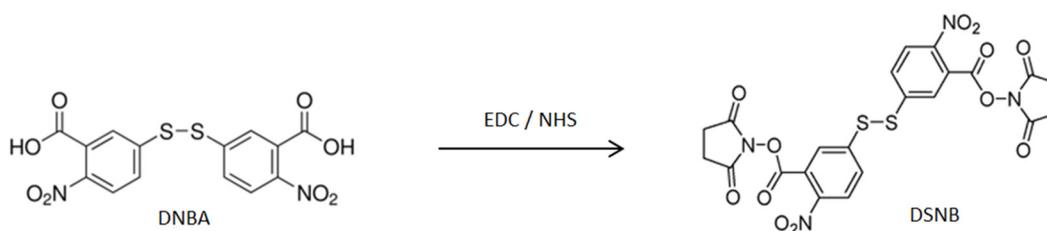


Figure 2.5 Activation des sites réactifs du DNBA par ajout d'une solution d'EDC et NHS : synthèse du DSNB.

Pour la synthèse du DSNB, 479,3 mg de EDC (2,5 mmol) et 287,7 mg de NHS (2,5 mmol) ont été ajoutés à 50 mL de THF sec dans un ballon rond de 100 mL, et le mélange a été agité durant 12 heures à température ambiante. Le mélange a ensuite été filtré puis évaporé et

repassé à la pompe à vide afin d'éliminer le reste du solvant. Une poudre jaune a été obtenue en recristallisant le précipité par ajout goutte-à-goutte d'acétone chauffé, jusqu'à solubilisation du produit. Puis de l'hexane a été ajouté afin de précipiter le produit. Le mélange est refroidi à température ambiante pendant 1 heure, puis est mis au congélateur pour favoriser la cristallisation. Une fois la solution filtrée, le précipité sous forme de cristaux jaunes correspondant au produit a été conservé et passé à la pompe à vide. Les cristaux jaunes de DSNB ont ensuite été solubilisés dans l'acétonitrile pour une solution de 2,5 mM de DSNB.

Par la suite, comme décrit dans la section suivante, les AuNPs ont été fonctionnalisées grâce à cette monocouche de DSNB. Puis les nanoparticules nouvellement fonctionnalisées ont été conjuguées à l'aide d'une solution d'anti-IgG. La fonctionnalisation des AuNPs avec le DSNB puis l'anti-IgG s'est faite selon le protocole de Porter *et al.*¹⁵⁰ avec certaines modifications.

2.2.3 Conjugaison des nanoparticules d'Or sphériques

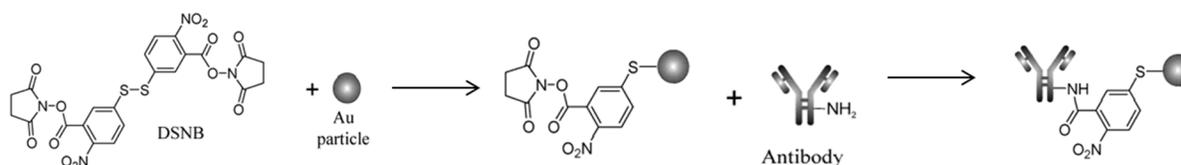


Figure 2.6 Réaction de conjugaison des AuNPs sphériques. Adapté avec la permission de la référence ¹⁴⁹. Copyright © 2003. American Chemical Society.

Afin de fonctionnaliser les AuNPs avec la monocouche de DSNB, 10 μ L de la solution de DSNB dissous dans l'ACN ont été ajoutés à 1 mL de la solution de AuNPs dans un tube eppendorf, et agité durant 16 heures. Le tube est passé à la centrifugeuse à 10 000 g durant 9 minutes, et le surnageant a été délicatement retiré à l'aide d'une pipette. Les nanoparticules nouvellement conjuguées au DSNB ont été soumises une nouvelle fois à des mesures d'absorption à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis. Un déplacement de la bande d'absorption

vers de plus grandes longueurs d'onde a été observé pour chaque échantillon de nanoparticules conjuguées par rapport aux nanoparticules seules.

Pour conjuguer les AuNPs avec les anti-IgG, la solution de AuNPs fonctionnalisées avec le DSNB a été resuspendue dans 1 mL de 2 mM de solution phosphate à pH 9 préparée à partir de sodium phosphate (Omnipur) dans l'eau. Un volume de 15,2 μ L d'une solution d'anti-IgG (2,3 mg/mL, 35 μ g) a été ajouté, et l'incubation a été laissée à 4°C durant 16 heures. La solution de AuNPs conjuguées a ensuite été incubée et conservée à une température de 4°C pendant 16 heures avec 100 μ L d'une solution d'albumine de sérum bovin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) à 2,5% dans une solution phosphate, préparée à partir de sodium phosphate (2 mM, pH 9). L'ajout de BSA permettait de bloquer les sites d'adsorption non spécifiques et donc de minimiser leur disponibilité.¹⁵¹ La solution a été centrifugée 9 minutes à 10 000 g, puis le surnageant a été délicatement retiré. Celle-ci a ensuite été resuspendue avec 1 mL de BSA 1% dans une solution phosphate et centrifugée à 10 000 g pendant 9 minutes. Les étapes de lavages et resuspensions ont été répétées deux fois, puis la solution a finalement été resuspendue une dernière fois dans un volume de 0,5 mL de BSA 1% dans de la solution phosphate.

En raison de certains problèmes d'ajustement de pH pour la solution colloïdale, un deuxième protocole de conjugaison des AuNPs a été élaboré. Les nanoparticules ont été concentrées à l'aide d'une centrifugation à 5500 g durant 2 minutes (environ 100 mL concentrées à 5 mL). Un volume de 10 mL de DSNB a été ajouté aux AuNPs concentrées pour saturer la solution avec la monocouche, et agitée pendant 1h30 dans un erlenmeyer. La solution passait d'une couleur rouge vin à bleue. Puis, la solution a été centrifugée à 8700 g durant 1 min dans des eppendorfs. Trois lavages à l'acétone ont dû être effectués, avec des cycles de centrifugation et resuspension pour bien enlever l'excès de DSNB, avec séchage à l'azote pour enlever toute trace de solvant restant. Les AuNPs ont ensuite été redispersées dans l'eau donnant une solution de couleur rosée, ajustée par la suite à pH 7. Une nouvelle centrifugation a été effectuée à 8700 g pour 1 minute, puis toutes les suspensions AuNPs ont été recombinaées ensemble. Un volume de 75 μ L d'une solution d'anti-IgG à 2,3 mg/mL a ensuite été ajouté à la solution de AuNPs-DSNB, puis le tout a été redispersé dans du PBS 7,4 donnant alors un mélange d'une couleur bleutée, puis placé à une température de 4°C durant la nuit. Les AuNPs

nouvellement conjuguées ont par la suite subit une nouvelle centrifugation à 8700 g pendant 1 minute, puis ont été redispersées dans 1 mL de solution de BSA 2,5% dans du PBS, donnant une solution de couleur mauve mise à 4°C durant la nuit. Une autre centrifugation a été effectuée à 8700 g pour 1 minute, puis la solution a été soumise à trois cycles de lavages à l'eau suivis de centrifugation et redispersion. Finalement, la solution a été redispersée dans 10 mL de solution phosphate (2 mM, pH 9) préparée à partir de PBS, et donnant une solution de couleur rose.

2.2.4 Préparation des leviers d'AFM

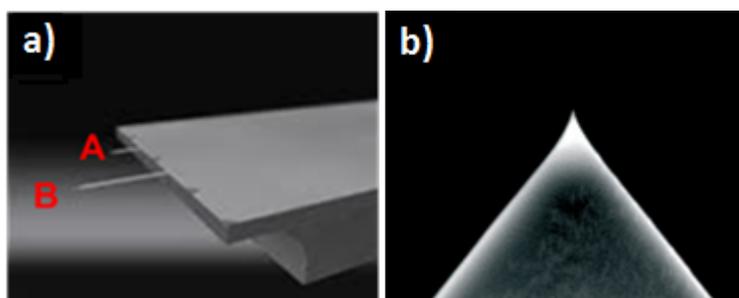


Figure 2.7 a) Image SEM d'une lamelle comportant deux types de pointes (A et B).

b) Grossissement d'une image SEM d'une pointe au bout d'un levier AFM.

Images tirées à partir du site web de la compagnie Nano-World :

[Complete_NanoWorld_AFM_Probes_Brochure.pdf](#).

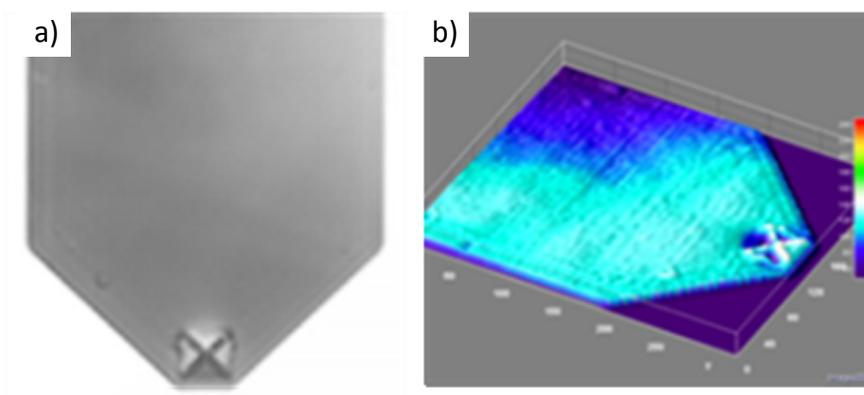


Figure 2.8 a) Image SEM d'un levier d'AFM et b) Intensité du champ réparti sur le levier.

Tableau 2.1 Caractéristiques et différences structurales des deux types de leviers analysés

Caractéristiques des leviers AFM	Levier A (petit levier)	Levier B (grand levier)
Épaisseur globale	600 nm	600 nm
Longueur	100 μm	200 μm
Largeur	40 μm	40 μm
Constante de force	0,48 N/m	0,06 N/m
Fréquence de résonance	67 kHz	17 kHz

La surface de leviers d'AFM initialement à base de pyrex-nitride a été recouverte par déposition d'une couche métallique d'or grâce à la technique de pulvérisation. Une épaisseur d'environ 3 nm de chrome a été préalablement déposée afin de mieux faire adhérer la couche d'or à la surface du levier. Par la suite, une épaisseur d'environ une centaine de nanomètres d'or a été ajoutée. Des séries de dix leviers ont été collés ensemble sur des lamelles de microscopes afin de faciliter leur manipulation (Figure 2.8, à gauche). Ces derniers ont été mis en présence d'une solution de 5 mM d'acide 16-mercaptohexadécanoïque (16-MHA, Sigma-Aldrich) préparée préalablement dans l'éthanol (EtOH, Sigma-Aldrich) durant une période de 16 heures à température ambiante, dans le but de former une monocouche auto-assemblée complète à la surface des leviers AFM recouverts d'or.

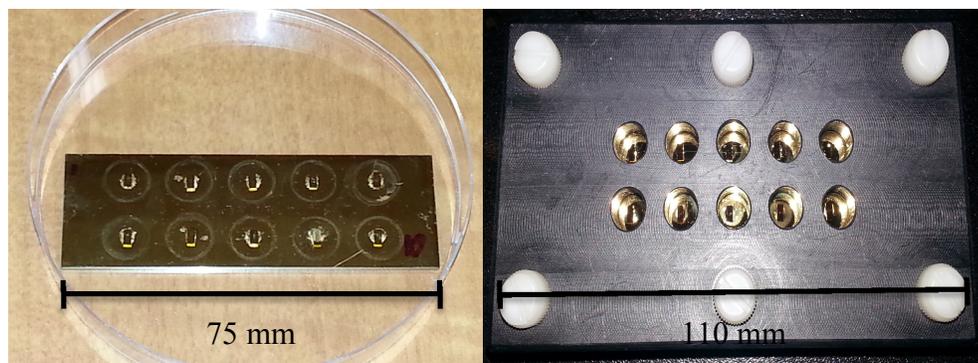


Figure 2.9 À gauche, photo d'une lamelle de microscope sur laquelle sont collés 10 leviers d'AFM recouverts d'or à l'aide d'une colle époxy. À droite, photo du système de puits avec joints d'étanchéité, pour effectuer les réactions chimiques et biologiques à la surface des leviers d'or emprisonnés entre deux plaques.

2.2.5 Formation des complexes protéine-anticorps à la surface des leviers d'AFM

Des leviers d'AFM ont été fonctionnalisés grâce à des éléments de reconnaissance afin de suivre la réaction biomoléculaire localisée à la surface de ces leviers en présence d'analytes spécifiques. Pour ce faire, les leviers d'or ayant une monocouche de 16-MHA à leur surface ont été immergés durant 3 minutes dans une solution d'éthyl (diméthylaminopropyl) carbodiimide / N-hydroxysuccinimide (EDC / NHS) de façon à rendre la surface réactive en modifiant les acides carboxyliques de la monocouche en ester de succinimide. Cette activation du groupement acide carboxylique a pu être possible grâce à l'action de l'EDC, agent couplant permettant au NHS de réagir avec les acides carboxyliques de la molécule de 16-MHA. Par la suite, les leviers ont été rincés trois fois avec une solution phosphate ajustée à pH 4,5 et préparée à partir d'une solution de tampon phosphate à pH 7,4 (*Phosphate Buffer Saline*, PBS, Corning Cellgro). Une solution d'anti-IgG (Jackson ImmunoResearch) 260 nM a été préparée dans du tampon PBS à pH 7,4 et ajoutée aux leviers durant une période de 15 minutes. Une fois la solution retirée, et les leviers rincés à l'aide d'une solution PBS 7,4 afin d'éliminer les anticorps ne s'étant pas fixés à la surface, une solution d'éthanolamine hydrochloride (Sigma-Aldrich) 1 M ajustée à un

pH de 8,5 a été ajoutée durant 5 minutes. La solution d'éthanolamine a permis de rincer et de désactiver les sites NHS non réactifs présents à la surface de la monocouche. Cette étape a été suivie de plusieurs rinçages au PBS 7,4. Puis, une solution d'IgG (Jackson ImmunoResearch) 100 nM dans du PBS 7,4 a été ajoutée et les leviers ont été immergés durant 10 minutes. Ces derniers ont été rincés avec du PBS 7,4 afin de retirer les IgG n'ayant pas réagi avec les anti-IgG à la surface des leviers, et une solution fraîche de nanoparticules d'Or conjuguées avec des anti-IgG (AuNPs / anti-IgG) préalablement préparée a été injectée, immergeant les leviers pendant 15 minutes. La détection de l'IgG a été effectuée pour une gamme de concentrations comprises entre 0,1 et 1000 nM afin de pouvoir établir les courbes d'étalonnage correspondantes à partir de mesures en spectroscopie Raman.

2.2.6 Caractérisation par diffusion Raman

Les analyses Raman ont été effectuées par à l'aide d'un appareil Renishaw RM 3000 couplé à un microscope optique Leica 50x, ainsi qu'à un laser d'une longueur d'onde d'excitation de $\lambda = 633$ nm, envoyé à 1 % de sa puissance (initialement de 15 mW), à savoir 150 μ W. Un réseau de diffraction de 1800 lignes / mm a été choisi. Une caméra vidéo couplée au microscope optique a été utilisée afin de localiser la pointe du levier d'AFM pouvant être déplacée à l'aide d'une platine motorisée permettant un positionnement précis de l'échantillon par rapport au faisceau du laser. Les spectres TERS ainsi que les courbes d'étalonnage effectuées sur les leviers ont été établis à partir d'une moyenne de l'intensité Raman mesurée sur des échantillons préparés indépendamment ($n = 4$ échantillons). Les mesures ont été effectuées sur une plage de déplacement Raman comprise entre 250 et 2500 cm^{-1} avec un temps d'intégration de 15 secondes pour 10 accumulations par mesure.

2.2.7 Caractérisation par microscopie en champ sombre des complexes protéines-anticorps construits sur les leviers

Une acquisition du spectre d'absorption par microscopie en champ sombre a été effectuée pour chaque concentration détectée d'IgG, afin de déterminer la position du plasmon

correspondant au levier AFM en présence des nanoparticules d'or. Les mesures par microscopie en champ sombre ont été réalisées sur le même appareil que pour les mesures AFM, mais en mode microscopie *confocale*. Le levier AFM sondant les surfaces couplées à un objectif a été remplacé par un objectif plan pour éclairage épiscopique (Zeiss EC Epiplan) avec un grossissement de 50x permettant la caractérisation par la microscopie en champ sombre. L'ouverture numérique de l'objectif était de 0,7, son champ de vision de 23 mm, et sa distance de travail de 1,1 mm. La source utilisée est une lumière blanche dont le voltage a été fixé à 21 V. Pour l'observation des échantillons, la puissance lumineuse de cette source était de 122 W. Cependant lors de l'acquisition des mesures la puissance a été modifiée à 152 W, en faisant varier l'intensité lumineuse. Un temps d'intégration de 0,5 seconde a été choisi, et le balayage de l'image a été pris pour 150 points / ligne ainsi que 150 lignes / image. L'accumulation de 100 spectres a été effectuée au même point (centre de la pointe AFM visible par microscopie en champ clair).

Par la suite, une concentration détectée de 100 nM d'IgG a été choisie afin de construire des images du levier grâce à la microscopie en champ sombre, et déterminer la localisation de haut champ électromagnétique, et donc de situer l'amplification du signal plasmonique. Des images ont donc été construites après balayage du levier par le microscope sur une surface de 10 μm x 70 μm , à partir de la sélection d'une longueur d'onde d'intérêt. La somme des bandes intégrées dans la gamme de longueurs d'ondes choisies (500 à 850 nm) a alors permis l'obtention de ces images.

3 Biodétection sur réseaux périodiques nano-structurés

La spectroscopie SPR permet de suivre en temps réel l'évolution de la construction d'un biocapteur par la mesure du changement d'indice de réfraction. Chaque réaction, liaison de molécule à la surface et lavage modifie légèrement l'indice de réfraction et génère un changement du signal SPR. Afin de vérifier qu'un biocapteur peut être construit sur une pointe AFM, il est nécessaire de prouver qu'un signal plasmonique est possible en SPR, et que les réactions se produisent sur la pointe lors de la création d'un biocapteur. Tel que démontré dans l'introduction, nous avons posé l'hypothèse que la pyramide de la pointe AFM pourrait servir de capteur SPR. En étudiant les propriétés optiques de ces pointes, il sera alors possible de déterminer si un plasmon de surface est présent pour une biodétection à leur surface, et ainsi vérifier si l'intégration d'un signal SPR aux pointes d'AFM pour la détection de réactions dans un environnement biologique est possible. Pour mieux comprendre le phénomène de biodétection sur des pointes d'AFM permettant l'obtention d'un signal plasmonique en spectroscopie SPR, des mesures ont été préalablement effectuées sur des substrats simples à fabriquer et à analyser pour accélérer le développement de cette technique. Ainsi, des réseaux périodiques de nano-triangles furent créés sur des lamelles de microscope et analysés par spectroscopie SPR.

3.1 Propriétés plasmoniques des réseaux de nano-triangles

Un réseau périodique de nano-triangles a été utilisé afin d'étudier le comportement plasmonique de ce type de géométrie pour la biodétection protéique à la surface de ce substrat. Cela permettra alors d'évaluer le comportement plasmonique probable d'une forme géométrique typique se rapprochant fortement de celle caractérisant les leviers d'AFM. En effet, les pointes AFM étant de nature pyramidale, une modélisation par mimétisme physique du signal plasmonique peut être effectuée grâce à l'étude de ces patrons triangulaires.

3.1.1 Localisation de l'amplification du champ électromagnétique aux différentes régions des nano-triangles d'or

Les nano-triangles d'or sont des structures plasmoniques intéressantes dans la localisation du champ électromagnétique (EM). En étudiant les différents modes plasmoniques propres à ces structures, il sera alors possible de localiser l'amplification du champ, et de relier ces propriétés à celles des pointes de leviers AFM, structures de forme pyramidale similaires aux nano-triangles. En effet, les nano-triangles possèdent, tout comme les pointes AFM, certaines régions de haut champ EM confiné au niveau des pointes triangulaires. Ces régions permettent de justifier de l'amplification du champ de manière localisée pour ces structures particulières, comme il sera expliqué dans cette section du mémoire.

Ces nanostructures métalliques subissent le phénomène de plasmon de surface localisé, puisque la fréquence d'oscillation des électrons de conduction du métal entre en résonance avec la lumière incidente produisant ainsi une amplification intense du champ EM local confiné au niveau de la surface métallique (voir section 1.2.5.2 sur la résonance des plasmons de surface localisés). Les nanostructures métalliques supportent des modes de résonance plasmoniques pouvant être dipolaires ou multipolaires (quadripôle, octupôle). Un mode multipolaire correspond à un mode qui résonne selon une symétrie supérieure à 2 (4, 6, 8...). Il y a donc 4 pôles de résonance pour un mode quadripolaire au lieu de 2 (mode dipolaire). Plus le nombre de pôles sera élevé, et plus l'énergie sera élevée, amenant les modes à résonner à de plus faibles longueurs d'ondes. Ainsi pour une nanostructure métallique de moins de 100 nm, le mode dipolaire sera dominant. Au-delà, le pic du mode dipolaire s'élargit : le nuage des électrons de surface est trop grand pour que tous les électrons résonnent en phase selon la symétrie dipolaire, ce phénomène est appelé « effet de retardement ». Par ailleurs, le mode quadripolaire commence à apparaître, et ceci à des longueurs d'ondes inférieures, et le pic associé est plus étroit. On dit que les modes supérieurs à 2 sont des modes sombres, parce qu'ils ne réémettent pas dans le champ lointain. Les résonances multipolaires sont souvent observées pour les nanostructures sphériques⁵³, ou encore dans ce cas-ci, pour les nanostructures triangulaires. Les modes multipolaires ont une résonance se produisant à de multiples fréquences, et ne possèdent pas les

mêmes distributions de champ que les modes dipolaires.¹⁵² La taille des nanostructures est donc directement reliée à la forme de leur bande plasmonique dans le spectre correspondant. En effet, lorsque le diamètre des nanostructures augmente, la forme de la distribution de charge sur la surface devient plus complexe, ce qui induit alors un "effet de retard" menant à la présence de bandes plasmoniques multipolaires plus intenses. De plus, quelques bandes plasmoniques multipolaires peuvent être observées en augmentant la longueur des pointes des nano-triangles.

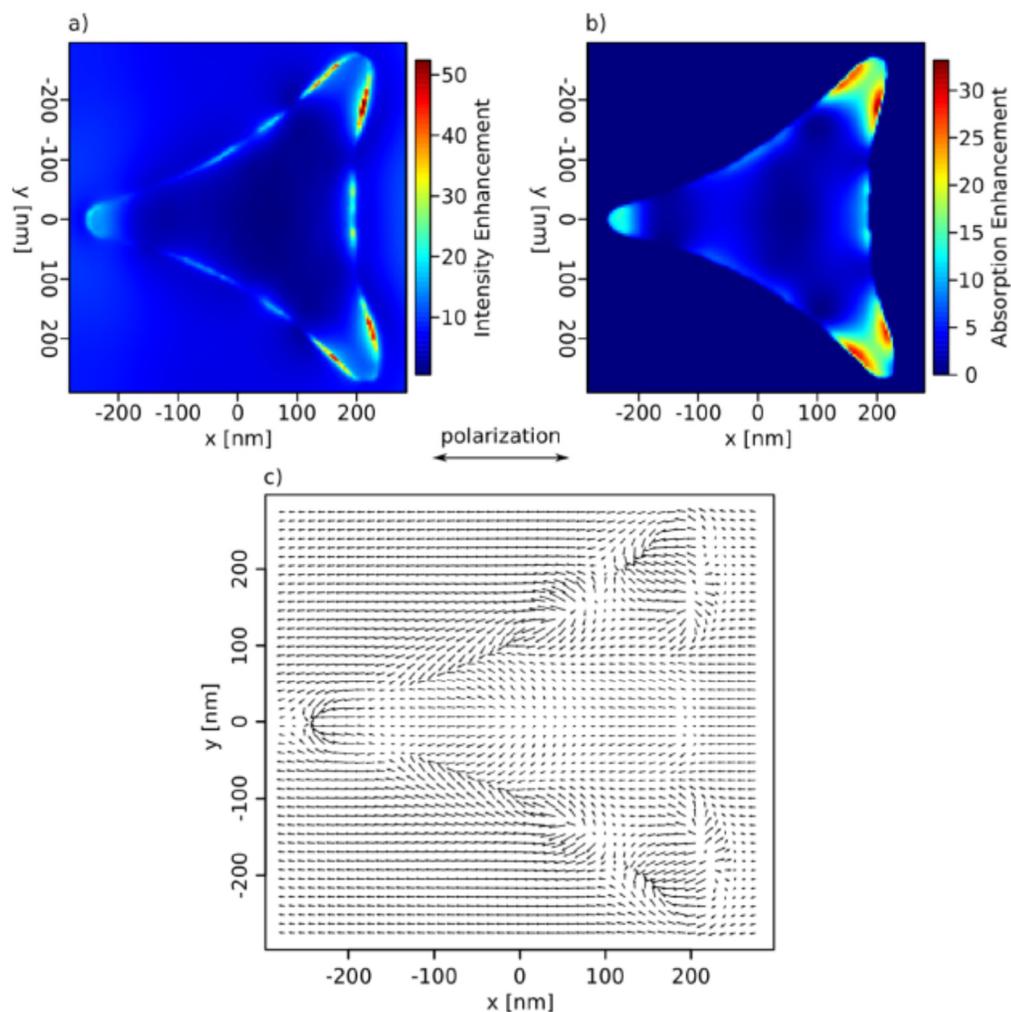


Figure 3.1 (a) Intensité d'amplification du champ calculé, (b) dispersion, et (c) distribution du champ pour un nano-triangle. Reproduit à partir de la référence¹⁵³. L'éditeur *Beilstein Journal of Nanotechnology* ne requiert pas de demande de permission pour la reproduction.

Devant la complexité à prédire la distribution du champ EM pour des structures nanoscopiques plus complexes, plusieurs travaux¹⁵³⁻¹⁵⁴ ont été effectuées sur la résolution des équations de Maxwell grâce à l'utilisation de traitements numériques (chapitre 1.4.1.4). Ainsi les techniques de simulations numériques, telles que la théorie de l'approximation dipolaire discrète (*Discrete Dipole Approximation*, DDA) et la méthode de calcul de différences finies dans le domaine temporel (*Finite Difference Time Domain*, FDTD) peuvent être appliquées à des structures où la distribution de champ peut être extrêmement confinée. De par les extrémités pointues des nano-triangles, l'amplification du champ EM peut être localisée au niveau des pointes de triangles, régions de haut champ électrique, de façon très sensible.³⁸ En variant la taille de ces triangles de sorte à ce qu'ils soient suffisamment grands, il n'existe plus un, mais plusieurs modes dipolaires pouvant être excités par la lumière incidente.

La méthode FDTD utilisée par Dickreuter *et al.* pour obtenir les images de la Figure 3.1, permet de tenir compte de la forme du triangle comme les courbures des arêtes, les angles des sommets, ou encore la rugosité de la surface. Ces paramètres peuvent en effet avoir une influence sur le couplage des nano-triangles avec la lumière incidente.¹⁵³

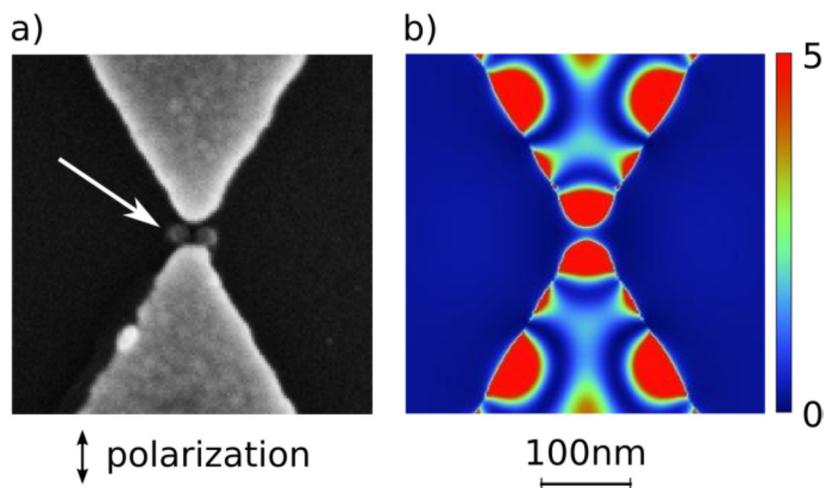


Figure 3.2 (a) Image SEM de la région à la jonction de deux nano-triangles. La flèche indique une nano-ablation causée par l'irradiation du laser pulsé (pour le dépôt de couche mince), et (b) distribution d'intensité du champ proche calculé pour la région centrale située entre deux

pointes de nano-triangles. Reproduit à partir de la référence ¹⁵³. L'éditeur Beilstein *Journal of Nanotechnology* ne requiert pas de demande de permission pour la reproduction.

3.1.2 Caractérisation AFM des nano-triangles d'or

Les nano-triangles d'or ont été préparés par lithographie colloïdale, grâce à l'auto-organisation de billes de polymère retirées par la suite après déposition d'un film d'or. Cette technique de masque lithographique rapide et simple, décrite pour la première fois par Deckman¹⁵⁵, Fischer et Zingsheim¹⁵⁶, permet de former des réseaux périodiques de nanostructures uniformes pouvant être formées sur de grandes aires (de l'ordre du cm^2).¹⁵³ La microscopie à force atomique a été utilisée afin de caractériser ces nanostructures plasmoniques et d'en mesurer les dimensions.

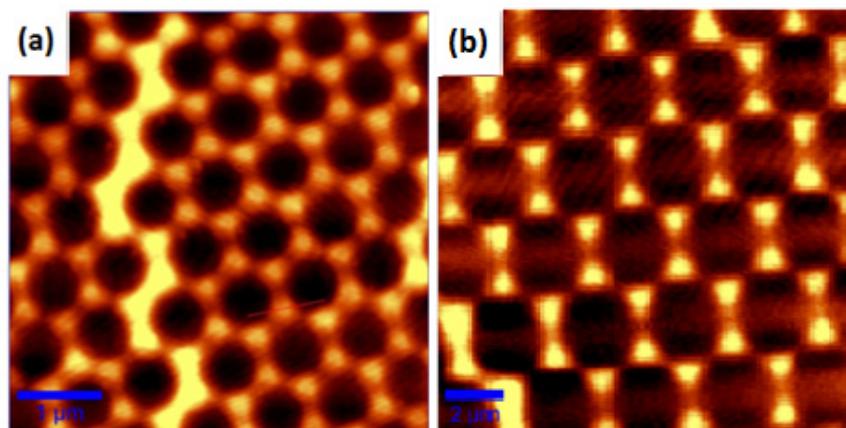


Figure 3.3 Images AFM de nano-triangles d'or de périodicité (a) 820 nm et de (b) 3,2 μm .

Les différentes images AFM obtenues pour des structures plasmoniques ayant des patrons triangulaires de périodicité de 820 nm (a) et de 3,2 μm (b) démontre l'organisation périodique des nano-triangles (Figure 3.3). Malgré l'organisation relativement uniforme des nano-triangles, la présence de défauts tels que des dislocations sont présentes dans les images

AFM (haute intensité jaune Figure 3.3 a). La présence de ces défauts peut induire un élargissement des bandes en SPR.

3.1.3 Spectroscopie LSPR des nano-triangles d'or en réflexion totale interne

Le signal LSPR des nano-triangles d'or a été obtenu en réflexion totale interne pour différentes périodicités de billes de polystyrène utilisées. Ainsi, les patrons triangulaires correspondant à des périodicités de billes de 820 nm, 1000 nm et 3,2 μm ont été analysés et ont permis d'obtenir différentes longueurs d'ondes d'absorption correspondant aux bandes plasmoniques des nano-triangles d'or. Ceci permettait de déterminer si ces nanostructures possédaient bien une résonance de leur plasmon de surface. Les spectres SPR ont donc été obtenus pour les trois périodicités en RTI dans l'eau (Figure 3.4), et la réponse a permis d'observer des pics pour le maximum d'absorption distincts pour chaque taille de nano-triangles.

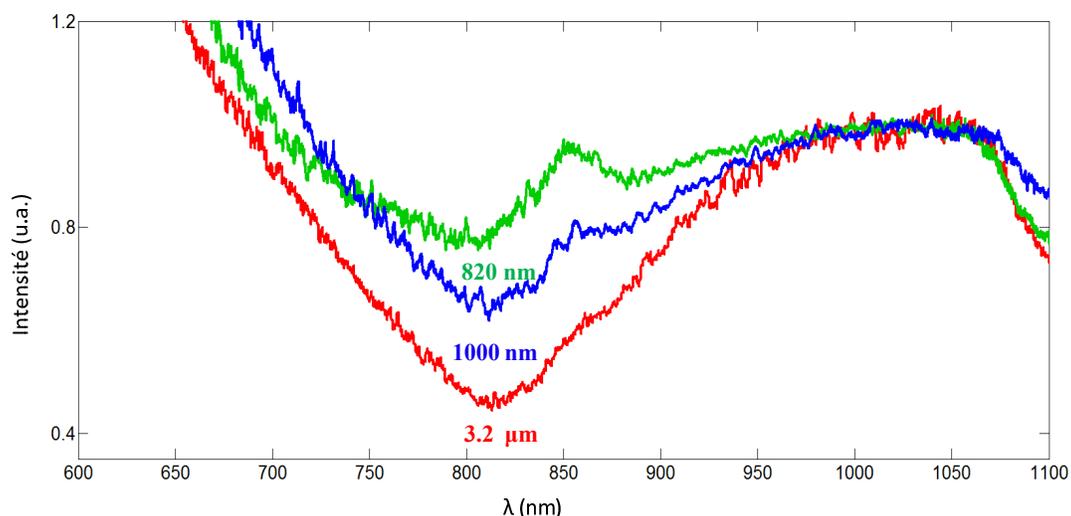


Figure 3.4 Spectres SPR des nano-triangles de différentes tailles obtenus en configuration de Kretschmann. La courbe verte correspond aux triangles d'une périodicité de 820 nm, la courbe bleue correspond aux triangles d'une périodicité de 1000 nm, et la courbe rouge correspond aux triangles d'une périodicité de 3,2 μm . Il est possible d'observer un déplacement vers de plus grandes longueurs d'ondes lorsque la taille des triangles augmente.

Les mesures SPR ont pu démontrer l'existence d'une bande d'absorption à $\lambda = 799$ nm pour les nano-triangles d'une périodicité de 820 nm, une bande visible à $\lambda = 811$ nm pour les nano-triangles d'une périodicité de 1000 nm, et enfin une bande visible à $\lambda = 816$ nm correspondante aux triangles d'une périodicité de 3,2 μm . L'intensité du pic d'absorption augmente avec la taille des nano-triangles. Il est possible d'observer un deuxième pic d'absorption pour les deux plus petites périodicités (820 nm et 1000 nm) dont la présence est due à un artéfact de la source lumineuse. Live *et al.*¹⁵⁷ ont déterminé que les propriétés optiques des deux modes LSPR et SPR pouvaient s'appliquer à des triangles de plus de 500 nm, mais qu'ils montraient différentes longueurs d'ondes d'excitation selon le mode utilisé, suggérant ainsi le fait que les deux modes SPR et LSPR étaient indépendants l'un de l'autre. De plus, la différence pour la longueur d'onde observée pour le maximum d'absorption selon la taille des nano-triangles suggère que le phénomène SPR associé est confiné aux régions limitrophes des triangles, permettant ainsi de différencier le plasmon de surface observé pour nanostructures de celui observé pour les films d'or continus. Live *et al.* ont également pu déterminer les spectres en transmission relatifs aux nano-triangles d'or dont la taille était comprise entre 700 nm et 1,8 μm . Ces mesures ont permis de mettre en évidence la présence de deux minimums de transmission à des longueurs d'ondes de $\lambda = 525$ nm et $\lambda = 800$ nm avec une faible sensibilité de RI. Entre ces deux bandes d'absorption, le maximum de transmission montrait un pic situé à une longueur d'onde de $\lambda = 600$ nm avec une haute sensibilité de RI.¹⁵⁷ Il est important de noter qu'un faible changement de taille des nano-triangles, soit en variant la taille des billes déposées pour former le masque lithographique, soit en variant l'épaisseur de la couche métallique, peut altérer significativement l'allure du spectre LSPR correspondant en déplaçant la bande plasmonique.^{55, 59}

3.2 Mesures spectroscopiques de la biodétection sur les réseaux périodiques

Afin de démontrer la formation d'un biocapteur à la surface des réseaux périodiques de nano-triangles, différentes caractérisations spectroscopiques ont été effectuées. Tout d'abord, les nanostructures métalliques ont été observées en spectroscopie SPR pour déterminer la position de la bande plasmonique dans le spectre. Une monocouche de DNBA a été immobilisée à la surface des substrats nano-structurés afin de permettre la liaison des anticorps anti-IgG aux nano-triangles d'or. Une mesure du signal SPR a donc été effectuée avant et après la déposition de DNBA dans le but de vérifier de la présence de la monocouche auto-assemblée à la surface des nano-triangles. Par la suite, le biocapteur a pu être formé, et les différentes étapes de fonctionnalisation ont été suivies cinétiquement pour permettre de caractériser le déplacement de la bande spectrale à chaque étape de la formation du biocapteur. Par la suite, le biocapteur nouvellement formé à la surface des réseaux périodiques de nano-triangles a été caractérisé en SERS afin d'obtenir une autre confirmation de l'immobilisation de la monocouche DNBA à la surface des substrats. Le DNBA étant un rapporteur Raman puissant, un signal propre à sa signature spectrale pourra être déterminé, et analysé.

3.2.1 Caractérisation SPR de la biodétection à la surface des films nano-structurés

3.2.1.1 Résonance de plasmons de surface pour les nano-triangles fonctionnalisés

L'avantage d'utiliser ce genre de substrat, en plus d'imiter la forme géométrique d'une pointe d'AFM, est qu'il présente des propriétés optiques intéressantes lui procurant la capacité de former un biocapteur hautement sensible à sa surface.¹⁵⁸ En effet, les nano-triangles présentent une plus courte profondeur de pénétration par rapport à des surfaces conventionnelles de films métalliques continus, ce qui augmente sa sensibilité pour la détection de matériel biologique.¹⁵⁷⁻¹⁵⁸ Afin de vérifier l'effet de la monocouche auto-assemblée DSNB sur les propriétés plasmoniques des nano-triangles, une mesure LSPR a été effectuée avant et après

déposition de la SAM. Seuls les nano-triangles issus des billes de périodicité de $3,2 \mu\text{m}$ ont été observés pour le déplacement de la bande SPR avant et après déposition de la SAM. Une différence de longueur d'onde d'une quinzaine de nanomètres a été observée après la déposition de la SAM sur les nano-triangles. Ainsi, lorsqu'une molécule telle que le DNBA est immobilisée à la surface d'un film nano-structuré, un déplacement de la bande SPR s'effectue vers de plus grandes longueurs d'ondes (*redshift*). Ce déplacement est anticipé car la formation de monocouche est généralement accompagnée d'un déplacement de la bande SPR vers les longueurs d'onde plus élevées, induite par l'indice de réfraction élevé des molécules organiques. En effet, l'ajout de cette molécule à la surface de réseaux nano-structurés permettra un léger changement de l'indice de réfraction local menant alors à un déplacement en longueur d'onde de la bande spectrale pour le pic LSPR observé dans le spectre d'extinction. La technique SPR peut être utilisée pour suivre la formation d'une monocouche moléculaire sur des nano-triangles. Des biocapteurs ont été construits sur ces différents réseaux de nano-triangles à l'aide d'un dispositif de micro-fluidique capable de mettre en contact une solution biologique avec le substrat nano-structuré.

3.2.1.2 Cinétique SPR observée pour la formation d'un complexe anticorps-protéine à la surface des nano-triangles

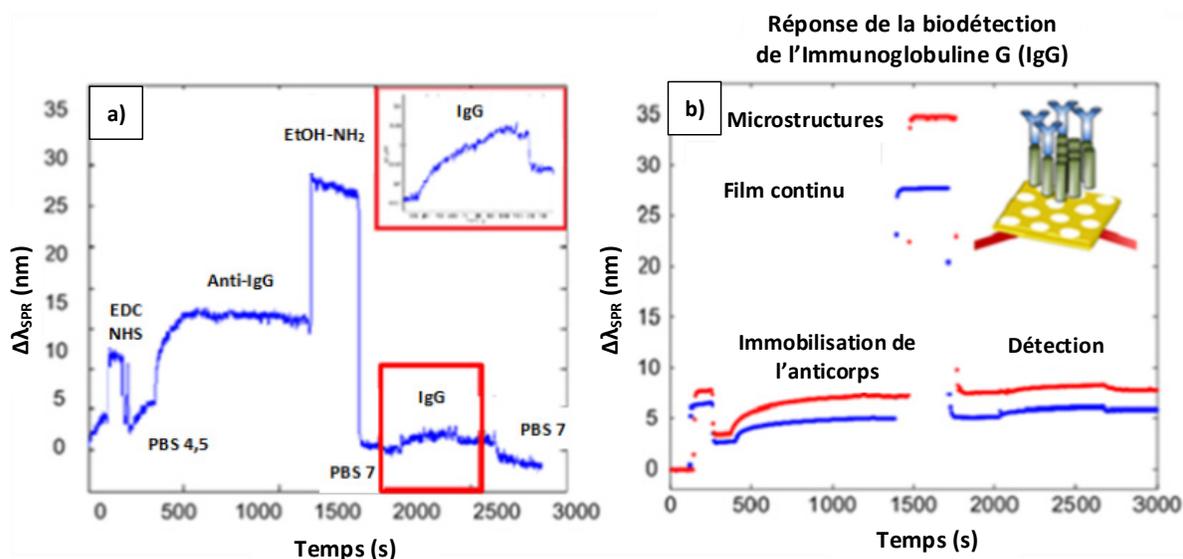


Figure 3.5 a) Cinétique SPR observée pour la détection directe d'IgG à la surface des nano-triangles fonctionnalisés à l'aide d'une monocouche de DNBA. La première étape correspond à l'ajout d'EDC / NHS favorisant un déplacement de la bande SPR ; par la suite une solution de phosphate à pH 4,5 a été ajoutée; puis une solution d'anti-IgG a été introduite dans le système, suivi de l'ajout de EtOH-NH₂. Une solution de PBS à pH 7 a ensuite été injectée suivi de l'ajout d'une solution d'IgG, et de nouveau d'une solution de PBS à pH 7. L'encadré rouge correspond au grossissement de l'étape 6 pour la détection d'IgG. b) Cinétique mesurée en SPR pour les mêmes étapes d'une détection immunologique directe typique d'IgG pour un film d'or et pour une surface micro-structurée. Malgré le fait que la réponse soit plus bruyante et la ligne de base moins stable pour les nano-triangles, les réactions sont également observées sur ce substrat.

Une détection directe des réactions impliquées dans la construction du biocapteur pour l'IgG et pour la détection de l'IgG a été effectuée à la surface des réseaux de nano-triangles. Pour pouvoir suivre l'évolution du signal plasmonique en fonction du temps, une mesure cinétique est effectuée grâce à des mesures spectroscopiques SPR. L'utilisation de matériel tel

qu'une cellule micro-fluidique a nettement contribué à la mise en présence des solutions permettant la formation d'un biocapteur à la surface des nano-triangles. L'introduction des solutions via un canal, permettant aussi leur retrait, a permis de voir en temps réel le déplacement de la bande plasmonique correspondant aux nanostructures en fonction de l'adsorbat à leur surface.

Les différentes étapes entreprises dans la construction du biocapteur furent observées durant la mesure cinétique (Figure 3.5 a). La courbe cinétique obtenue est comparée à celle obtenue pour d'autres substrats plasmoniques tirée de travaux par les autres membres du groupe (Figure 3.5 b). La comparaison est effectuée en suivant les mêmes étapes enregistrées aux mêmes temps. En premier lieu une solution de EDC / NHS permettait l'augmentation de l'indice de réfraction du système initialement en présence d'eau. Puis, grâce à l'ajout de PBS à un pH de 4,5, l'indice de réfraction a été modifié, ce qui a permis de déplacer la bande plasmonique correspondant aux nanostructures vers de plus basses longueurs d'ondes. L'immobilisation de l'anti-IgG, récepteur moléculaire du biocapteur, est facilitée par la liaison des groupements amines primaires de l'anticorps avec les groupements carboxyliques de la monocouche à sa surface activés par l'ajout de EDC / NHS. Cette étape est caractérisée par une augmentation progressive de $\Delta\lambda_{\text{SPR}}$ décrite par l'isotherme de Langmuir. Ce principe permet de justifier la tendance observée pour le signal, et est caractéristique d'une augmentation du signal en fonction de la concentration jusqu'à atteindre une concentration limite à laquelle le signal sature pour la mesure de plus hautes concentrations. Après un rinçage rapide au PBS à pH 7,4, le substrat est mis en présence d'éthanolamine (EtOH-NH₂) à pH 8,5, permettant la désactivation des sites NHS non réactifs à la surface du substrat. Avec l'ajout d'une solution de PBS pour le rinçage de la cellule et du substrat nano-structuré un grand déplacement de la bande plasmonique est observé. L'ajout des IgG, éléments biologiques détectés par les anti-IgG, permet de constater un déplacement de la bande SPR, léger mais présent. Cette observation dans le spectre de cinétique permet de confirmer que l'IgG a bien réagi avec le récepteur moléculaire anti-IgG, et est immobilisé à la surface du substrat, approuvant une détection directe efficace à la surface des nano-triangles d'or. La détection de l'IgG est cependant plus faible que celle observée sur des films d'or continus.

3.2.2 Caractérisation SERS de la biodétection à la surface des films nano-structurés

L'utilisation de monocouches auto-assemblées telles que le DSNB, se définissant également comme un rapporteur Raman extrinsèque (*Extrinsic Raman Labels*, ERL), permet le développement de tests immunologiques de type sandwich, caractérisables par diffusion du signal Raman exalté par effet de surface (SERS).¹⁵⁹ Ces derniers possèdent deux fonctions importantes, à savoir, celle de se lier de façon sélective à un anticorps, et celle de produire une signature Raman ayant un très fort signal spectroscopique, par l'intermédiaire de groupements nitros exerçant une fonction amplificatrice, et ceci grâce à l'effet du SERS. La quantité d'anticorps immobilisés peut être quantifiée grâce à l'intensité spectrale obtenue. La monocouche d'ester de succinimide du DSNB est capable grâce à ses thiols de se lier à la surface d'or du levier. L'acide DNBA activé par le NHS, et formant le DSNB, permet d'offrir à la monocouche des sites réactifs disponibles pour lier les amines des anticorps.

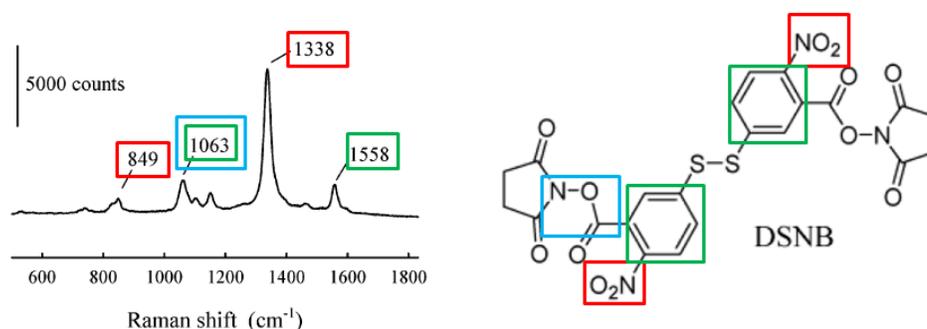


Figure 3.6 Empreinte spectrale Raman du DSNB et groupements caractéristiques identifiés pour chaque pic du spectre. Adapté et reproduit avec la permission de la référence ¹⁴⁹.

Copyright © 2003. American Chemical Society.

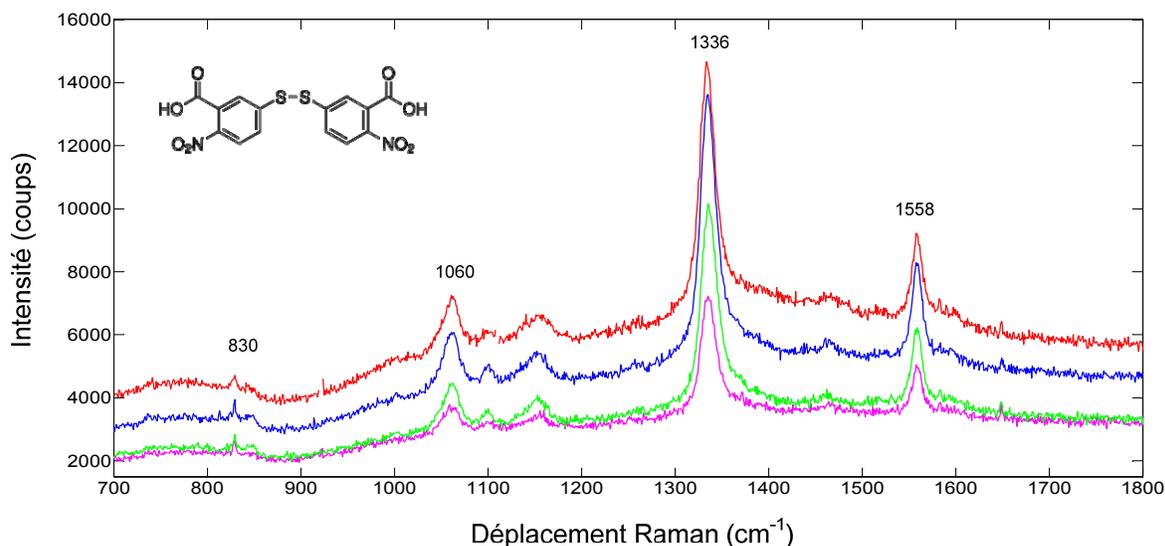


Figure 3.7 Spectre SERS du DSNB (molécule représentée en haut à gauche du spectre) sur les nano-triangles d'or. Les mesures ont été prises à différentes régions sur les nanostructures.

Le spectre SERS du DSNB présente différents pics distincts de groupements caractéristique de la molécule. En effet, il est possible de voir un pic très intense à 1338 cm^{-1} qui caractérise une élongation symétrique du groupement nitro $-\text{NO}_2$. Le pic avec une intensité beaucoup plus faible, à 849 cm^{-1} représente quant à lui une vibration correspondant au cisaillement du même groupement $-\text{NO}_2$. De plus, il est possible de voir un autre pic caractéristique de la molécule DSNB représentant le mode aromatique à 1558 cm^{-1} . Le dernier pic Raman caractérisant le spectre de cette molécule correspond à un nombre d'onde de 1063 cm^{-1} . Celui-ci correspond au chevauchement de deux vibrations distinctes, à savoir celle représentant l'élongation N-C-O et celle représentant le mode aromatique.¹⁴⁹

Ces travaux de biodétection sur les nano-triangles d'or s'inscrivent dans une élaboration pour l'ouverture des travaux vers la spectroscopie SPR sur des leviers AFM. En effet, les résultats obtenus dans cette section prouvent qu'il est possible d'obtenir un signal SPR pour la détection d'IgG sur des réseaux périodiques nano-structurés similaires à des pointes AFM, tant au niveau de la forme géométrique que de la localisation du champ électromagnétique et des

modes de résonance multipolaires. Les perspectives d'intégration d'un signal SPR obtenu à partir du balayage de surface par des leviers AFM ont été élaborés par Live¹⁴⁴, et permettent de mieux visualiser la technique instrumentale dérivant du couplage SPR-AFM.

3.3 Perspectives d'intégration instrumentale du SPR à l'AFM

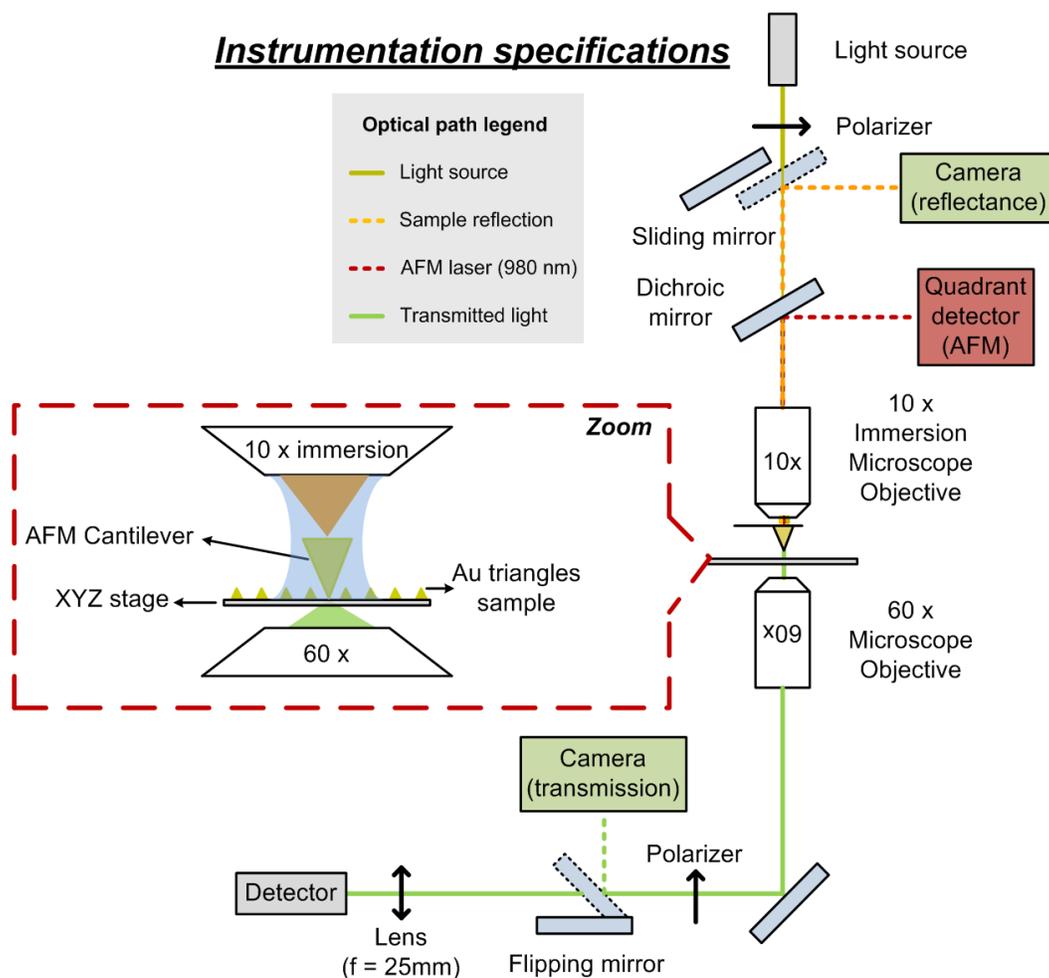


Figure 3.8 Montage instrumental pour le couplage d'un signal SPR à un levier AFM.¹⁴⁴

En couplant la technique SPR à l'AFM en intégrant un signal spectroscopique à la pointe d'un levier, cette dernière pourrait jouer le rôle de prisme microscopique lors de l'excitation du

SPR, grâce au contact avec un milieu diélectrique. Ceci permettrait alors la création d'un micro-biocapteur protéomique formé par la pointe AFM, et pouvant sonder un milieu biologique avec une excellente résolution spatiale. Sur le long terme, ce procédé pourrait servir à faire l'étude de la communication cellulaire lors de mécanismes moléculaires impliqués dans les métastases du cancer.

Ainsi, au même titre que les mesures SPR conventionnelles effectuées en réflexion totale interne, il faudrait utiliser ce même mode appliqué à la sonde AFM pour l'intégration d'un signal optique lors du balayage d'un milieu biologique étudié. Le montage nécessiterait un bon alignement optique lors de l'intégration du signal SPR à la pointe AFM. De plus, pour le balayage effectué par la pointe, il ne faudrait pas utiliser le même mode *contact* que pour une mesure pour des nano-triangles, puisqu'il pourrait détruire l'échantillon au même titre qu'il aurait pu dénaturer les substrats nano-structurés. Le mode *tapping* serait donc privilégié.

Les mesures liées à ce couplage peuvent être effectuées en transmission grâce à un montage de spectroscopie confocale. Le montage développé par Live¹⁴⁴ permettrait de focaliser la lumière derrière la pointe AFM qui serait située entre les deux objectifs du microscope tel qu'illustré dans la Figure 3.8 et les mesures pourront être effectuées en milieu aqueux à l'aide d'un objectif à immersion situé au-dessus du levier sondant le milieu. La lumière transmise serait collectée par le second objectif inversé sur le montage. Avec l'utilisation de plusieurs filtres pour transmettre la lumière selon sa polarisation, ainsi qu'une lentille concave permettant sa focalisation, celle-ci pourrait alors atteindre le spectrophotomètre associé au montage.

4 Biodétection sur des leviers d'AFM

Afin de mener à bien les expériences TERS effectuées sur les pointes de leviers AFM, et la détection protéique correspondante, la technique d'essai sandwich a été utilisée. En explorant les capacités multiples des nanoparticules d'or, telles que l'intense amplification spectrale (SPR, SERS) qu'elles procurent, il est possible d'établir des résultats pour des détections de concentrations nanomolaires d'analytes, notamment lors de l'utilisation des nanoparticules en spectroscopie Raman. En effet, la SPR fortement amplifiée des nanoparticules métalliques confère à ces dernières d'excellentes propriétés de diffusion et d'absorption dans le visible.⁵³ De plus, la détection secondaire d'anticorps permet également d'amplifier le signal Raman, contribuant à une exaltation du signal plasmonique correspondant. Dans ce chapitre, il sera ainsi question d'une biodétection réalisée à la surface de leviers d'AFM grâce à une technique d'essai sandwich utilisant des nanoparticules d'or. Ces nanoparticules préalablement conjuguées sont ajoutées au système de détection, tel que décrit au cours de cette section, et leur fonctionnalisation sera également abordée. Les mesures TERS effectuées pour la biodétection à la pointe de leviers AFM seront alors détaillées et les résultats analysés.

4.1 Caractérisation des nanoparticules d'Or sphériques conjuguées

Les essais biologiques correspondants à la détection secondaire de protéines à la surface de leviers d'AFM ont été effectués à l'aide de nanoparticules d'or sphériques préalablement synthétisées grâce à la méthode de Turkevich.¹⁴⁷ Il a été important de caractériser les nanoparticules métalliques par différentes techniques afin de s'assurer d'une meilleure reproductibilité à chaque test. Pour cela, il a fallu attester d'une taille, forme et concentration relativement identiques pour chaque fournée de nanoparticules nouvellement synthétisées. Les techniques d'absorption par UV-Visible, et de microscopie électronique en transmission ont été utilisées afin de mettre en exergue les caractéristiques physiques des nanoparticules métalliques.

Une taille caractéristique des nanoparticules comprise entre 30 et 40 nm de diamètre a été sélectionnée pour leur utilisation dans le cadre des mesures de détection secondaire tel que décrit dans le protocole élaboré par Grubisha *et al.*¹⁴⁹ pour la conjugaison des nanoparticules avec le DSNB. En effet, selon plusieurs études^{149, 160}, les nanoparticules d'or de 30 nm fonctionnalisées à l'aide d'un rapporteur Raman étaient efficaces à de basses concentrations (~ 30 fM) pour la détection de l'antigène prostatique spécifique (PSA) provenant du sérum humain. De plus ce diamètre a été choisi afin d'assurer un signal de diffusion de la lumière assez intense, contrairement aux nanoparticules inférieures à 20-30 nm, tout en minimisant les effets des particules sur les biomolécules présentes à proximité (protéines, anticorps).¹⁶¹ Les nanoparticules doivent en outre être espacées entre elles d'un certain intervalle (gap) leur permettant de ne pas altérer leur immobilisation sur le substrat lors de la détection de protéines.

4.1.1 Caractérisation par TEM et UV-Vis

Afin de confirmer la taille et la forme des AuNPs caractérisées par UV-Vis, celles-ci ont été observées par microscopie électronique en transmission (*Transmission Electron Microscopy*, TEM). Grâce au grand pouvoir de résolution de cette technique, ainsi qu'à sa capacité à localiser l'information¹⁶², les mesures ont permis d'obtenir des images nettes des nanoparticules nouvellement synthétisées. De plus, de par le haut poids atomique de l'Au, les nanoparticules fournissent un fort contraste en TEM.¹⁶³ Toutes les particules ne sont pas de la même taille, mais une moyenne établie permet de déterminer que leur taille se situe autour de 33 ± 7 nm, ce qui confirme bien les résultats obtenus grâce à la méthode de Haiss *et al.*¹⁶⁴ lors de la caractérisation par spectroscopie UV-Vis.

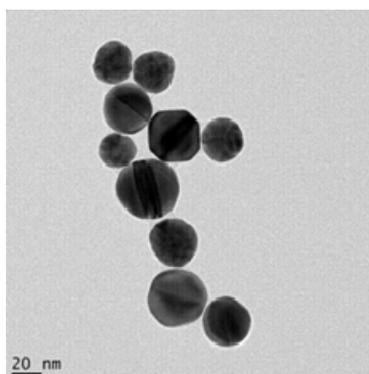


Figure 4.1 Image TEM de AuNPs sphériques d'environ 33 nm.

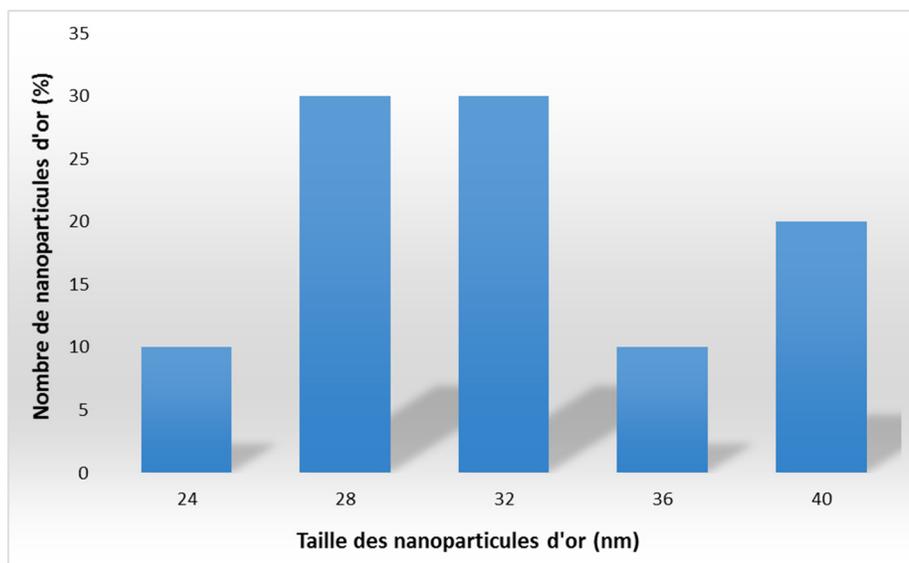


Figure 4.2 Histogramme de la taille des nanoparticules d'or sphériques déterminé par des mesures en TEM. Le diamètre moyen est de 33 ± 7 nm.

La longueur d'onde de résonance des NP est caractéristique de leur taille et de leur concentration. En effet, selon Haiss *et al.*¹⁶⁴ il existe un lien entre les propriétés optiques des nanoparticules d'or sphériques et leur taille et longueur d'onde d'absorption maximale. Cette dépendance a été analysée théoriquement en utilisant la théorie de la diffusion multiple¹⁶⁵, et a permis de déterminer que la taille et la concentration des AuNPs sphériques pouvaient être

définies directement à partir de leur spectre UV-Vis. Ainsi, la bande de résonance des nanoparticules d'or à une longueur d'onde de 527 nm est caractéristique d'une taille comprise entre 35 et 40 nm.¹⁶⁴

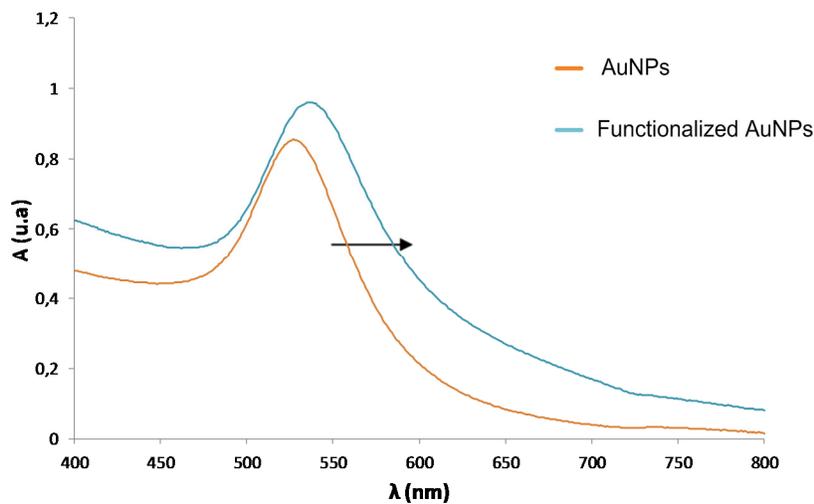


Figure 4.3 Déplacement de la bande d'absorption pour des AuNPs en spectroscopie par UV-visible avant (courbe orange) et après fonctionnalisation avec la monocouche de DSNB et anti-IgG (courbe bleue).

Ainsi, au même titre que les réseaux nano-structurés, une monocouche de DSNB est adsorbée à la surface des nanoparticules métalliques. Le DSNB a la capacité de se coupler de façon covalente avec l'anticorps immobilisé sur la AuNP, grâce à la présence de groupements succinimidyles pouvant réagir avec les groupements amines des anticorps. Les vibrations d'élongations symétriques du groupement nitro $-NO_2$ présentes dans la molécule lui permettent d'avoir un pic très intense en SERS qui sera par la suite pris comme référence pour l'étalonnage de matériel biologique détecté. Ce groupement immobilisé à proximité de la surface des AuNPs, permet au DSNB de maximiser la diffusion Raman.¹⁶⁶ De plus, le groupement disulfure présent également permet l'immobilisation du DSNB à la surface des nanoparticules métalliques grâce à la réaction entre l'or des nanoparticules et les thiols de la molécule.

Ces mêmes nanoparticules, une fois conjuguées avec le DSNB et l'anti-IgG humain ont une nouvelle fois été soumises à une caractérisation spectroscopique par UV-Vis. La Figure 4.3 compare les deux bandes d'absorption correspondant aux nanoparticules avant et après conjugaison. Il est possible de voir que la conjugaison à l'aide de la monocouche DSNB favorise un décalage de la bande d'absorption vers de plus grandes longueurs d'ondes, ou déplacement bathochromique (déplacement vers le rouge, *redshift*). Ainsi, la forte bande d'absorption correspondant aux nanoparticules d'or natives (AuNPs) se trouve à une longueur d'onde de $\lambda = 527$ nm, tandis que celle correspondant aux nanoparticules d'or conjuguées au DSNB et aux anticorps (AuNPs-DSNB-anti IgG) se trouve être à une longueur d'onde plus élevée $\lambda = 537$ nm. Un déplacement de 10 nm est donc observé lors de la conjugaison des AuNPs. Le déplacement de la bande d'absorption des nanoparticules conjuguées peut s'expliquer par la présence de la molécule DSNB à la surface des nanoparticules. En effet, le déplacement bathochromique est le résultat d'un changement induit dans l'environnement diélectrique local autour des nanoparticules⁴⁸, tel que la conjugaison d'une monocouche et d'anticorps liés.

4.1.2 Caractérisation par microscopie électronique à balayage (*Scanning Electron Microscopy, SEM*)

Afin de caractériser et de justifier de l'immobilisation des nanoparticules d'or à la surface d'un levier AFM lors d'une biodétection secondaire, il est possible d'utiliser une des techniques de microscopie optique pouvant imager ce genre de surface : il s'agit de la microscopie à balayage électronique (*Scanning Electron Microscopy, SEM*). Ce type de microscopie est très souvent utilisé pour imager les caractéristiques microscopiques bidimensionnelles de différentes surfaces métalliques ou biologiques de façon rapide et en fournissant une excellente résolution (de l'ordre du nanomètre). Le SEM possède une grande profondeur de champ, et permet la construction d'une image grâce au bombardement d'un faisceau d'électrons qui traverse l'échantillon et interagissent avec la matière. Cette interaction permet de générer des électrons secondaires réémis à une énergie plus faible, puis accélérés vers le détecteur qui permet l'amplification du signal. Les électrons réémis grâce à l'interaction entre électrons et matière correspondent à un point d'impact sur l'échantillon. Cette microscopie nécessite une

compatibilité sous vide des échantillons, qui doivent être électriquement conducteurs ou recouverts d'une couche conductrice afin d'éviter l'accumulation de charge.¹⁶⁷

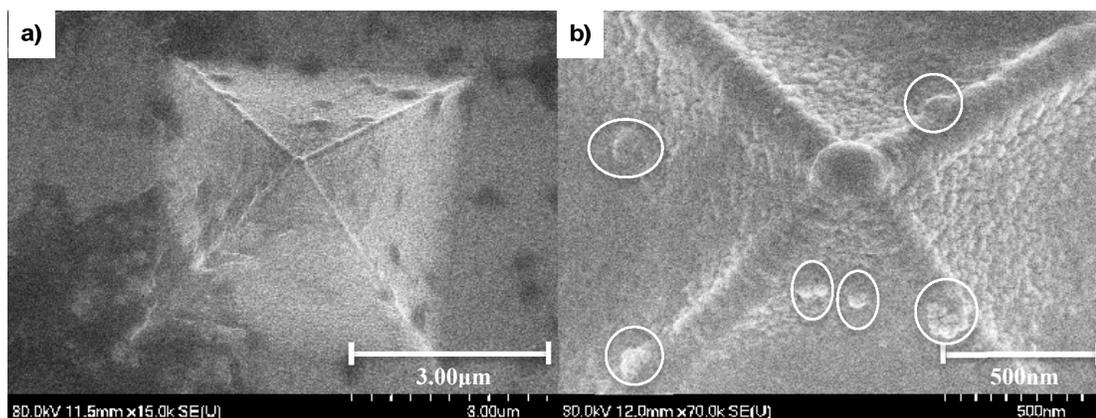


Figure 4.4 a) Image SEM des AuNPs sur levier d'AFM. b) Grossissement de l'image a) SEM pour la pointe. Les agrégats de nanoparticules visibles ont été entourés en blanc.

La détection secondaire d'IgG a été effectuée à l'aide de nanoparticules d'or conjuguées elles-mêmes à des anti-IgG capables de fixer et piéger la protéine IgG. Un moyen de s'assurer de la présence des nanoparticules adsorbées au niveau de la pointe AFM, est donc de les observer grâce au SEM. En effet, des images SEM ont été obtenues après avoir réalisé la détection secondaire par les nanoparticules (Figure 4.4). Il est possible de voir une certaine population de nanoparticules métalliques, et notamment une accumulation au niveau de la pointe du levier d'AFM. Certains agrégats sont également visibles au niveau des arêtes et du sommet de la pointe pyramidale. Ces observations permettent de conclure que les nanoparticules se sont bien adsorbées au niveau de la pointe. Les nanoparticules d'or sont donc bien à l'origine de l'amplification du signal Raman observée sur les pointes, puisque celles-ci portaient à leur surface la monocouche de DSNB responsable de la signature Raman observée. De plus, la présence d'agrégats de nanoparticules visibles au microscope peut expliquer en partie l'hypothèse de la saturation du signal TERS décrite pour le couplage plasmonique entre plusieurs particules.

4.1.3 Caractérisation par microscopie en champ sombre (*Dark-field Microscopy, DFM*)

La technique de microscopie en champ sombre permet de déterminer le spectre de diffusion correspondant aux nanoparticules métalliques utilisées pour les mesures de détection, et ainsi d'identifier à quelle longueur d'onde se trouve leur plasmon. De plus, des images microscopiques peuvent être obtenues en scannant le substrat et permettent de déterminer à l'aide d'une échelle de couleur la localisation d'une plus grande intensité de champ EM relative à la densité de nanoparticules métalliques.

Il est alors possible de faire l'imagerie des nanoparticules d'or de façon assez sensible par microscopie optique conventionnelle avec un éclairage en champ sombre, de façon à les identifier optiquement, et ceci grâce à leur diffusion SPR suffisamment intense.^{5, 168} En effet, lorsqu'une lumière blanche est utilisée afin d'exciter le plasmon des nanoparticules métalliques, seule la fréquence lumineuse correspondant à la résonance du plasmon sera fortement diffusée par les nanoparticules, montrant alors une image de la diffusion SPR sur fond sombre.¹⁶⁹ Les nanoparticules à la surface du levier sont illuminées à l'aide d'une lumière blanche non polarisée, et c'est la lumière diffusée par les AuNPs qui sera alors collectée par le DFM en mode transmission.¹⁶⁸ Les images collectées permettent de localiser un signal plasmonique intense au niveau de la pointe du levier AFM. Celui-ci est caractérisé par une forte illumination, ce qui témoigne de la présence d'une population de nanoparticules agrégées au niveau de la pointe (Figure 4.5 a).



Figure 4.5 Image caméra du levier AFM en microscopie en champ sombre.

Les spectres de diffusion des nanoparticules ont pu être obtenus pour les deux types de leviers à différentes concentrations d'IgG détecté par le système en sandwich construit à la surface des leviers L'accumulation de 100 spectres pris au même point (pointe du levier AFM) a donc été effectuée (Figures 4.6 et 4.7). La présence de AuNPs fonctionnalisées peut être observée par DFM en exploitant la dépendance de la longueur d'onde du plasmon de résonance sur l'indice de réfraction relatif à l'environnement de la particule.¹⁷⁰⁻¹⁷¹ Ces spectres ont permis de déterminer la diffusion maximale observée pour les nanoparticules conjuguées, située à une longueur d'onde de 670 nm pour toutes les concentrations d'analyte détectées. En effet, seule l'intensité de la bande de diffusion maximale varie en fonction de la concentration, mais de façon non linéaire. La technique de microscopie en champ sombre étant utilisée ici pour les mesures qualitatives de diffusion des nanoparticules, l'intensité de la bande maximale n'a pas été considérée.

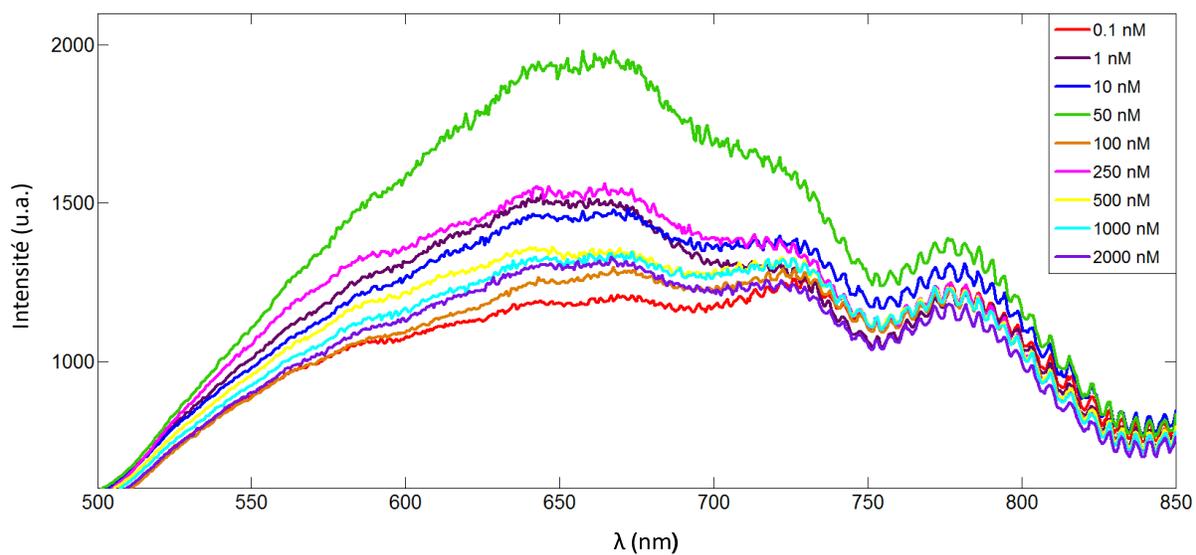


Figure 4.6 Spectre de diffusion des nanoparticules en microscopie en champ sombre pour les leviers de type A (petits leviers) à différentes concentrations d'IgG détecté comprises entre 0,1 nM et 2000 nM.

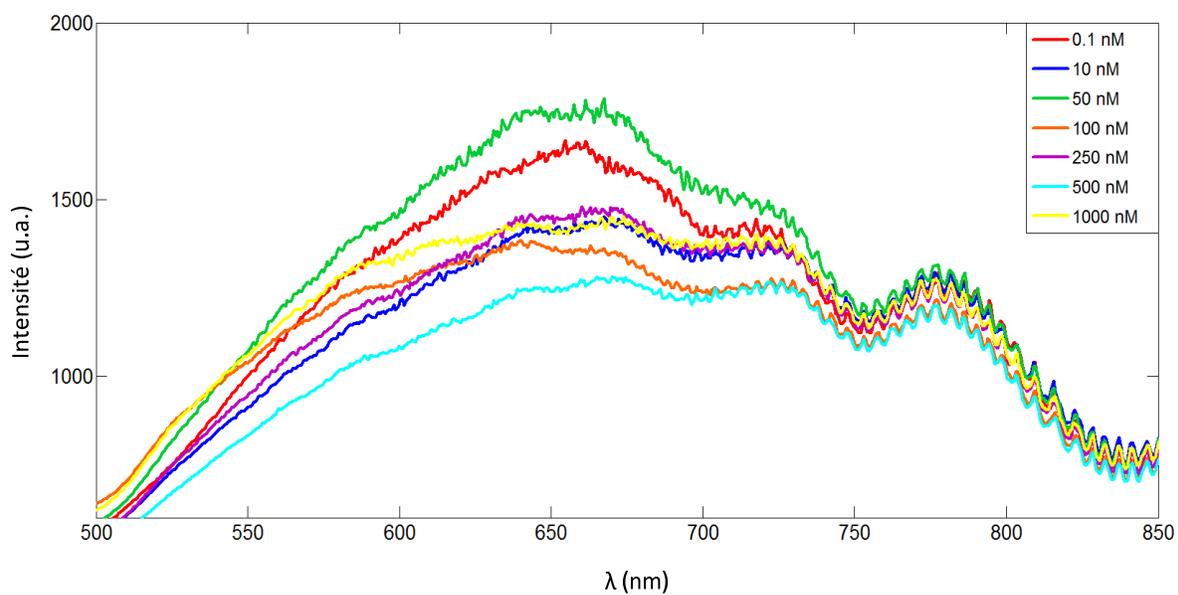


Figure 4.7 Spectre de diffusion des nanoparticules en microscopie en champ sombre pour les leviers de type B (grands leviers) à différentes concentrations d'IgG détecté comprises entre 0,1 nM et 1000 nM.

De plus, des images complètes pour la surface de la pointe du levier AFM ont pu être obtenues (Figure 4.8). Celles-ci démontrent une certaine variation dans le degré d'intensité du champ EM défini en fonction d'un gradient de couleur allant du bleu (pour les régions de faible intensité de champ) au rouge (pour les régions de plus haute intensité de champ). Les images démontrent une concentration de la couleur rouge plus prononcée au niveau du centre de la pointe. Cette couleur correspondant à la plus grande intensité de champ, ceci permet d'affirmer d'une plus forte intensité localisée au niveau du centre de la pointe. En effet, cette région étant hautement diffusante, elle permet au signal d'augmenter fortement son intensité. De plus, l'intensité de champ étant directement liée à la présence de nanoparticules métalliques présentes à la surface du levier, ces images permettent ainsi de témoigner d'une haute densité de population de nanoparticules d'or concentrées au niveau de la pointe du levier AFM.

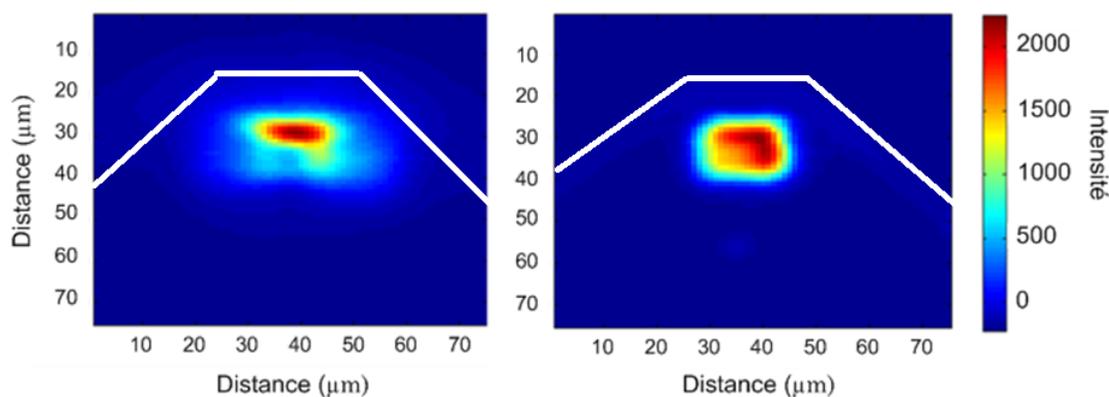


Figure 4.8 Images obtenues à partir de calculs après balayage en DFM de leviers AFM sur lesquels un biocapteur a été construit à l'aide des AuNPs conjuguées pour la détection de 100 nM d'IgG. Les contours du levier ont été surlignés en blanc.

4.2 Biodétection d'anti-IgG sur leviers d'AFM

Grâce à l'utilisation de nanoparticules conjuguées avec un anticorps secondaire, il est possible d'effectuer un essai sandwich pour détecter une protéine spécifiquement à la surface

de leviers d'AFM. Cette détection en sandwich de la protéine IgG pourra par la suite être caractérisée grâce à la spectroscopie TERS. Ceci permettra alors, au-delà d'effectuer une détection sur substrat complexe, de rendre compte des possibles interactions biologiques pouvant s'effectuer à la surface d'une pointe AFM, substrat que l'on veut par la suite utiliser à des fins de détections dans une matrice plus complexe.

4.2.1 Caractérisation TERS

Les leviers d'AFM ont été modifiés par la déposition d'un revêtement métallique d'or par évaporation. Cette manipulation permet d'améliorer grandement les facteurs d'amplification dus à l'effet de pointe.^{129, 172-173} De plus, les leviers ont également été modifiés biologiquement à leur surface par la construction de biocapteurs. Ceux-ci sont caractérisés grâce à la spectroscopie Raman. Du fait de l'utilisation même des leviers, et de par l'exaltation procurée par l'effet de pointe, le signal Raman peut être fortement amplifié. Cette exaltation est due à l'effet de pointe sur le signal spectroscopique (TERS).

La structure des leviers d'AFM utilisés est extrêmement importante dans le cadre de ces recherches. En effet, en fonction de la taille, forme, hauteur ou angle de la pointe, les propriétés plasmoniques associées à cette région ayant une forte amplification de champ peuvent modifier drastiquement les résultats pour l'amplification du signal plasmonique. Pour les expériences effectuées sur des leviers, tous les supports AFM possédaient quatre leviers, deux longs et deux courts, au bout desquels se trouvaient une pointe. Deux types de leviers ont été définis et caractérisés séparément en tenant compte de leurs différents paramètres physiques (Tableau 2.1). Les leviers de type A correspondent aux plus petits leviers (longueur de 100 μm , constante de force $k = 0,48 \text{ N / m}$), tandis que les leviers de type B correspondent aux plus grands leviers (longueur de 200 μm , constante de force $k = 0,06 \text{ N / m}$). De plus, les pointes en oxyde des deux types de leviers avaient toutes une forme pointue de type pyramidal. Elles possédaient également une hauteur de 3,5 μm , ainsi qu'un rayon de courbure typique de moins de 10 nm. L'angle correspondant au demi-cône de la pyramide était de 35°.

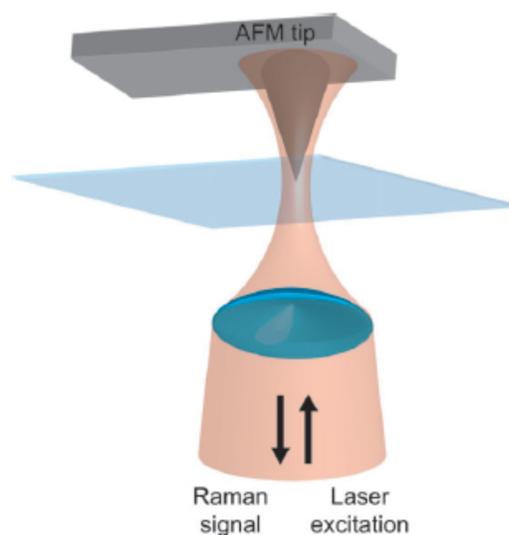


Figure 4.9 Schéma d'un système TERS en mode "back-reflection". Reproduit à partir de la référence ¹⁰². Copyright © 2008, avec la permission de Royal Society of Chemistry.

En appliquant une configuration "back-reflection" pour le TERS (Figure 4.9), il est possible de récolter la lumière rétrodiffusée. Le microscope illumine ainsi la pointe AFM recouverte d'or, et le signal Raman diffusé est collecté à travers le même objectif utilisé pour bloquer le laser. Les lentilles utilisées peuvent avoir une ouverture numérique élevée qui améliore l'efficacité d'illumination du laser ainsi que la collection de la lumière. La focalisation est alors confinée, et le champ électrique de la lumière n'est pas toujours perpendiculaire à la direction de propagation.¹⁷⁴ L'amplification du champ est également dépendante de la polarisation du laser utilisé pour irradier la pointe métallique. Ainsi, pour avoir une amplification du champ encore plus intense, le vecteur du champ électrique de la lumière incidente doit être parallèle (polarisation P) à l'axe de la pointe métallique, afin que les électrons à la surface du métal soient confinés au sommet de celle-ci.¹⁷⁵ Cependant, en dépit de l'importance de la polarisation de la lumière, l'instrument employé au cours des expériences ne permettait pas l'ajustement d'une polarisation, aucun polariseur n'a donc été utilisé durant les mesures, de sorte qu'aucune polarisation (S ou P) n'a été favorisée.

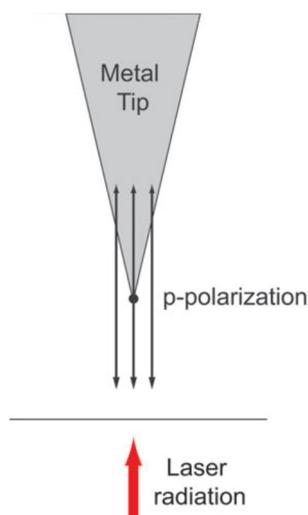


Figure 4.10 Schéma de la polarisation P de la radiation au niveau de la pointe métallique. Reproduit à partir de la référence ¹⁰². Copyright © 2008, avec la permission de Royal Society of Chemistry.

L'amplification du signal observée lors de l'immobilisation des nanoparticules sur les pointes de leviers AFM est due à deux effets. Premièrement, lorsque deux nanoparticules métalliques sont à proximité l'une de l'autre (quelques nm), il s'effectue un couplage de leurs plasmons de surface localisé grâce aux interactions du champ proche, créant alors une intense amplification du champ électrique associé, et donc du phénomène SERS à la jonction entre les deux particules.¹²³ Ce phénomène peut se retrouver dans le cas de ce mémoire mais en remplaçant les deux nanoparticules métalliques par la pointe du levier AFM recouvert d'or, et par la nanoparticule d'or conjuguée à l'anti-IgG, utilisée dans la détection en sandwich de l'IgG. Schultz *et al.* décrivent ainsi que la pointe oscille à une amplitude de quelques nm de distance de la nanoparticule créant alors une amplification du champ EM. Le second effet est dû au déplacement de la bande plasmonique provenant du couplage entre la pointe AFM et la nanoparticule immobilisée à sa surface durant la formation temporaire de l'hétéro-dimère. Les nanoparticules conjuguées au DSNB montraient un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 537 nm (résultats obtenus en spectroscopie UV-Vis). Ainsi, lorsque les nanoparticules sont immobilisées à la surface de la pointe du levier, leurs LSPR respectives interagissent, causant un déplacement de leur bande plasmonique vers de plus grandes longueurs d'onde

(*redshift*).^{94, 96-97, 99, 121-122, 176} Le couplage créé entre les nanoparticules favorise un déplacement de la bande plasmonique proche de la longueur d'onde d'excitation du laser de 633 nm, permettant alors d'augmenter l'amplification du signal Raman des molécules se trouvant à proximité de la surface métallique.¹²³ Il est possible d'observer la position du plasmon correspondant aux nanoparticules d'or utilisées pour la biodétection sur les leviers AFM, grâce au spectre de diffusion des nanoparticules obtenu en microscopie en champ sombre (*dark-field microscopy*) (Figures 4.6 et 4.7). Le spectre obtenu a permis d'observer un maximum de diffusion des AuNPs à une longueur d'onde de 670 nm, ce qui confirme le choix de la longueur d'onde d'excitation du laser à 633 nm. Toutes les mesures Raman ont été effectuées en utilisant un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm. La réponse TERS est donc grandement influencée par le choix de la longueur d'onde d'excitation du laser, puisqu'en fonction de la longueur d'onde du plasmon correspondant aux nanoparticules utilisées pour la détection, il faudra utiliser une longueur d'onde d'excitation la plus proche possible de la longueur d'onde du plasmon des nanoparticules, afin d'optimiser la résonance et par conséquent, les mesures lors de l'acquisition des spectres.

4.2.1.1 Détection directe d'anticorps

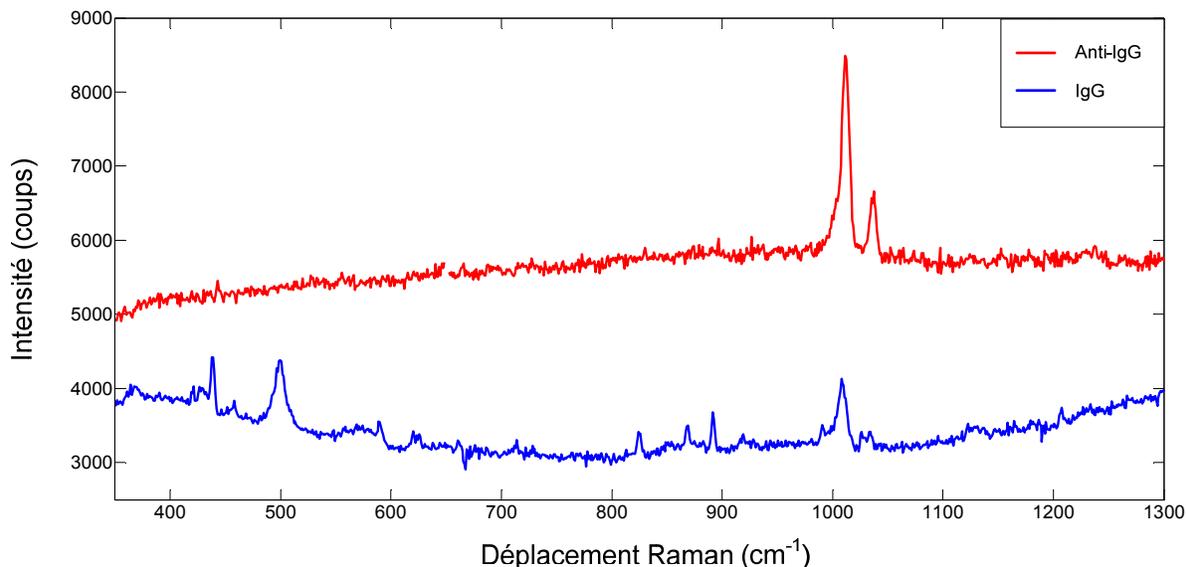


Figure 4.11 Spectres TERS des anticorps IgG et Anti-IgG. Les analyses TERS ont été effectuées à l'aide d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations.

Dans l'optique de caractériser la détection d'un anticorps à la pointe d'un levier, une caractérisation TERS des protéines utilisées pour la biodétection sur les leviers d'AFM a été effectuée. À cet effet, les spectres Raman d'IgG et d'anti-IgG immobilisés ont été obtenus sur des nanoparticules, et ont permis de caractériser les différents pics associés aux acides aminés formant les protéines. Schultz *et al.* ont effectué des mesures Raman pour la détection de nanoparticules métalliques conjuguées à des anticorps anti-IgG afin d'étudier les différentes interactions biomoléculaires à la surface des cellules et tissus. De la même façon que les recherches effectuées pour ce mémoire, les mesures TERS obtenues par Schultz *et al.* ont permis de caractériser un signal Raman spécifique à la présence de ces anticorps conjuguées aux AuNPs. Les anticorps correspondants démontrent de nombreuses similitudes quant aux vibrations moléculaires présentes dans les spectres Raman.

Tableau 4.1 Bandes Raman et attribution aux acides aminés correspondants pour l'immunoglobuline G humaine

Assignement des acides aminés (IgG) ^a	Déplacement Raman observé (cm ⁻¹) ^b	Déplacement Raman littérature (cm ⁻¹) ^c
Trp, Tyr, ν (aromatique)	1594	1605
Trp, Tyr, ν (aromatique)	1562	1562
Trp, Tyr, ν (aromatique)	1488	1487
Trp, Tyr, ν (aromatique)	1374	1321
Trp, ν (aromatique)	1026	1042
Cys, ν (S-S)	498	511
Cys, ν (Au-S)	364	389

^a ν = étirement, Trp = Tryptophane, Tyr = Tyrosine, Cys = Cystéine

^b Mesures relatives à une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 633$ nm du laser

^c Mesures relatives à la littérature¹⁷⁷

Dans le spectre TERS de protéines (IgG dans le cas présent), plusieurs bandes Raman peuvent être observées et interprétées comme des bandes caractéristiques à des acides aminés constituant les protéines analysées (Tableau 4.1). Ces bandes observées expérimentalement sont comparées dans le même tableau avec des valeurs prises dans la littérature obtenues par Grabbe *et al.* pour les acides aminés tryptophane, tyrosine et cystéine. Grabbe *et al.* ont assigné les bandes à partir de mesures SERS de la protéine anti-IgG immobilisée sur une électrode d'argent. Ces valeurs concordent également avec celles obtenues par Schultz *et al.* pour l'étude TERS pour la détection dans des cellules membranaires. En effet, en utilisant la technique TERS afin d'imager des nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps immobilisées sur des cellules membranaires par interaction avec des antigènes, Schultz *et al.* ont pu observer une amplification intense du signal Raman propre à l'anti-IgG immobilisé sur les nanoparticules. Ils ont pu obtenir des bandes propres aux modes aromatiques de certains résidus d'acides aminés tels que la tryptophane et la tyrosine. De plus, la détection d'une bande observée à 485 cm⁻¹, décrivant le changement conformationnel du lien disulfure, indique que le signal Raman est également sensible aux interactions que partagent les anticorps conjuguées aux AuNPs, avec les antigènes présents sur les membranes cellulaires.¹²³

4.2.1.2 Détection secondaire d'anticorps

Comme expliqué précédemment, le but de ce projet était de développer des biocapteurs à la surface de leviers AFM métallisés. La détection d'une protéine IgG a été réalisée en utilisant la méthode de détection en sandwich, ou détection secondaire. Cette détection secondaire a pu être réalisée grâce à la présence de nanoparticules métalliques conjuguées à un anticorps anti-IgG secondaire. Les nanoparticules d'or ont été préalablement fonctionnalisées à l'aide d'une monocouche de DSNB, de la même façon que dans la section 3.2.2 discutant d'une détection directe sur des nano-triangles d'or comportant une monocouche de DSNB à leur surface. Le DSNB est une molécule possédant des propriétés d'amplification du signal Raman, tel que décrit dans la section 3.2.2. De plus, le substrat sur lequel était réalisée la biodétection était la pointe d'un levier d'AFM. Ce substrat a été recouvert d'une fine couche d'or par déposition par évaporation métallique. Par la suite, afin de permettre d'établir des liens covalents entre l'anti-IgG primaire et le levier d'or, il est possible de déposer une SAM à la surface des leviers (16-MHA) puisque cette molécule comporte des thiols capable d'établir des liens covalents avec une surface d'or, ainsi que des groupements carboxyliques réactifs pouvant immobiliser les anti-IgG à la surface. La protéine IgG détectée est ainsi immobilisée grâce aux deux couples « pointe AFM / anti-IgG » et « nanoparticule / anti-IgG », formant ainsi le système en sandwich pour la biodétection (Figure 4.12).

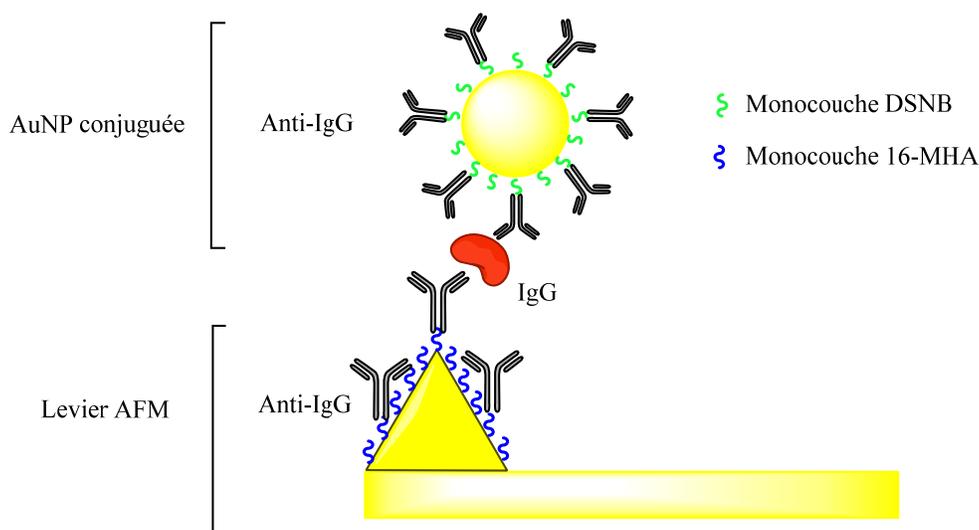


Figure 4.12 Schéma pour un système de détection secondaire d'une protéine IgG à l'aide de nanoparticules d'or conjuguées sur une pointe de levier AFM ayant un revêtement métallique.

L'établissement de ce système secondaire pour la détection de la protéine IgG a permis d'observer le spectre Raman correspondant. Tel que décrit dans la section 3.2.2, le DSNB est un rapporteur Raman possédant une forte signature spectrale, et les bandes spectrales observées pour le système de détection secondaire décrit plus haut, sont caractéristiques de cette molécule adsorbée à la surface des nanoparticules d'or. Il est donc possible d'observer que pour différentes concentrations d'IgG détectées à la surface des pointes AFM, un signal TERS est observé et démontre une position similaire des pics à ceux observés pour la mesure SERS du DSNB (Figures 3.6 et 3.7). L'intensité des spectres TERS observés pour les différentes concentrations d'IgG détectées varie cependant, et ces variations ont permis d'établir des courbes d'étalonnages détaillées dans la section 4.2.1.3.

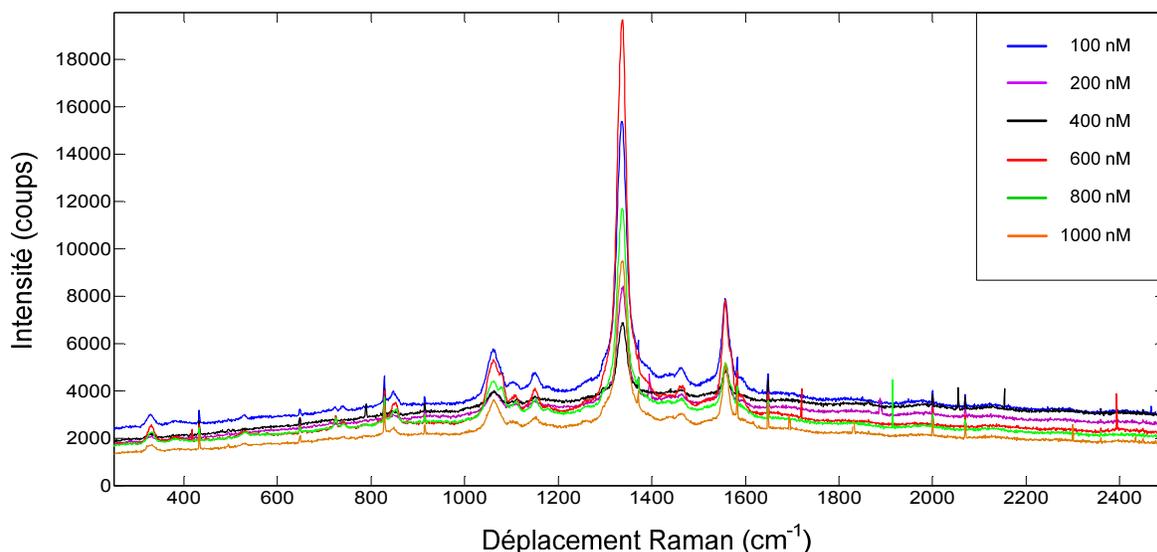


Figure 4.13 Spectres TERS pour la détection secondaire d'IgG à différentes concentrations comprises entre 100 nM et 1000 nM. Six concentrations d'IgG détecté ont été analysées. Les analyses TERS ont été effectuées à l'aide d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations.

4.2.1.3 Courbes d'étalonnage pour la biodétection de l'IgG

Afin d'établir une corrélation entre la quantité de matériel biologique détecté grâce aux nanoparticules d'or, à la surface des leviers AFM, et une augmentation du signal spectroscopique, une caractérisation par diffusion Raman a été effectuée. Selon l'isotherme de Langmuir, la réponse TERS devrait être proportionnelle à la concentration et ceci jusqu'à une concentration limite, puis le signal devrait saturer à de plus hautes concentrations de protéine détectée. En effet, plus la quantité de protéine immobilisée à la surface du levier augmente, plus le nombre de nanoparticules d'or interagissant avec ces protéines s'y fixe, de même que la quantité de monocouche de DSNB à la surface des nanoparticules formant le signal observé en Raman. Cependant, à une certaine concentration limite, le signal cesse d'évoluer de façon linéaire pour former un plateau. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, une caractérisation TERS a été effectuée sur les leviers AFM sur lesquels étaient construits les

biocapteurs pour la détection secondaire d'IgG à différentes concentrations, et ceci afin d'établir le profil d'une courbe d'étalonnage définissant l'évolution du signal spectroscopique en fonction de la quantité d'analyte détecté. Les résultats ainsi obtenus lors de la caractérisation TERS, ont permis d'obtenir un signal propre à chaque levier analysé, et donc caractéristique de la concentration d'IgG détecté par la méthode de détection secondaire utilisant les nanoparticules métalliques conjuguées aux anti-IgG. Ce signal correspond à l'empreinte Raman de la molécule DSNB (Figure 3.6) caractéristique de la monocouche présente à la surface des nanoparticules d'or sur laquelle les anti-IgGs greffés ont réagi avec l'analyte détecté. Ainsi, différentes concentrations d'IgG ont été détectées à l'aide de la détection secondaire utilisant les AuNPs conjuguées. Ces analyses ont permis d'établir des courbes d'étalonnage relatives à chaque type de pointe; A (petit levier, Figure 4.14 et Figure 4.16) et B (grand levier, Figure 4.15 et Figure 4.17). Les courbes d'étalonnage ont été réalisées en mesurant la hauteur du pic principal situé à un nombre d'onde de 1338 cm^{-1} correspondant à l'empreinte Raman du DSNB, et ayant l'intensité relative la plus significative. Ceci a permis de suivre la variation du signal selon la concentration d'IgG détecté par ce système.

Lors de l'analyse TERS pour la détection de différentes concentrations de protéine IgG, il a été observé que l'intensité spectrale du pic principal relatif à la monocouche DSNB ne suivait pas une tendance linéaire. De façon à mieux interpréter les résultats, des courbes d'étalonnages ont été établies en tenant compte de l'intensité du pic principal du DSNB à un nombre d'onde de 1338 cm^{-1} , et ceci en prenant l'intensité du pic à sa base jusqu'au sommet du pic. Les premières courbes d'étalonnage correspondant aux mesures TERS ont été effectuées pour la détection d'IgG à des concentrations variant entre 1 nM et 500 nM.

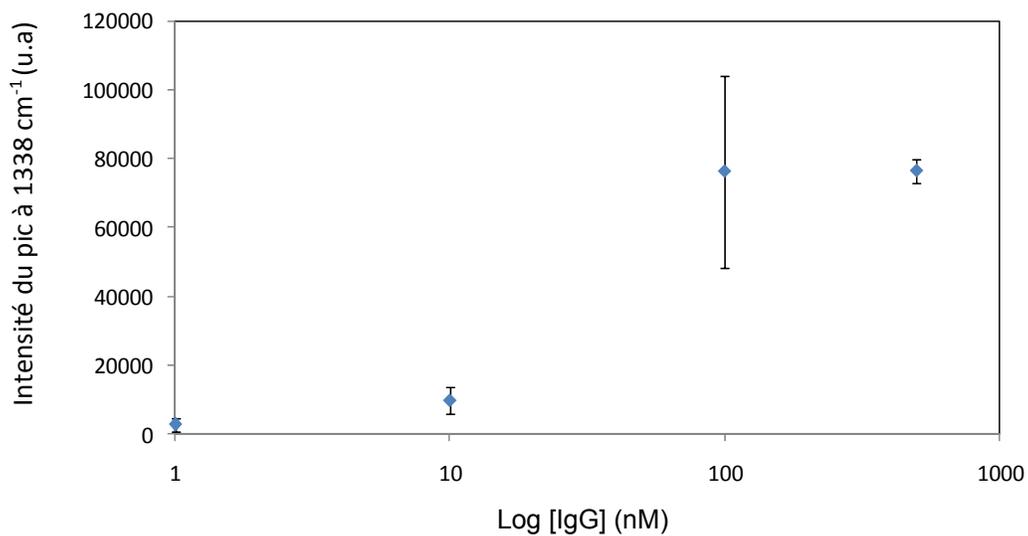


Figure 4.14 Étalonage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type A (petit levier) pour des concentrations allant de 1 à 500 nM.

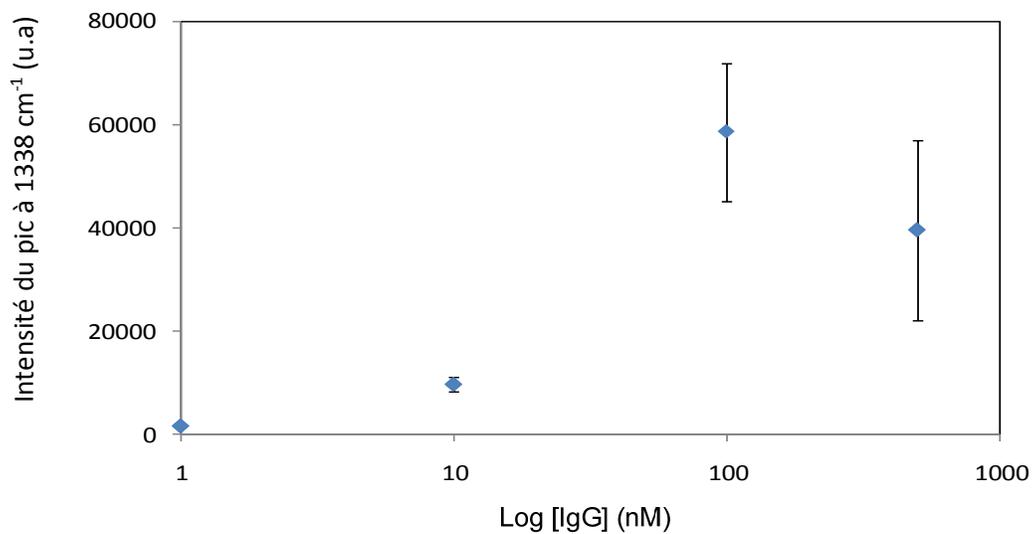


Figure 4.15 Étalonage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type B (grand levier) pour des concentrations allant de 1 à 500 nM.

Pour chaque spectre obtenu, le pic principal ayant un signal très intense à 1338 cm^{-1} correspond à une élongation symétrique du groupement nitro $-\text{NO}_2$ de la molécule DSNB. Cette molécule formant la monocouche auto-assemblée sur les nanoparticules d'or constitue un témoin clé de la détection de l'IgG, c'est donc pour cela que les mesures de courbes d'étalonnage ont été effectuées en tenant compte de la variation d'intensité de ce pic en fonction de l'augmentation de la concentration d'IgG détecté. Ainsi, quatre concentrations d'IgG ont été analysées, et ont permis d'observer un patron similaire pour les deux types de leviers : l'intensité du pic principal augmente jusqu'à atteindre une concentration limite, ici 100 nM (Figure 4.14 et Figure 4.15), à laquelle le signal TERS sature, voire diminue. Cette tendance est prévisible grâce à l'isotherme de Langmuir affirmant que pour des concentrations plus élevées, le signal observé subira l'arrêt de sa croissance, et plafonnera. Afin de mieux vérifier la progression de l'intensité du signal TERS pour le pic principal, la gamme de concentration a été élargie jusqu'à une concentration d'IgG de 1000 nM en partant d'une concentration relativement faible de $0,1\text{ nM}$. De plus, davantage de concentrations (étalonnage de 8 concentrations) ont été analysées par rapport aux précédentes mesures TERS (étalonnage de 4 concentrations). Ces nouvelles mesures ont été établies afin d'observer plus précisément la concentration d'IgG détecté à laquelle le signal TERS ne subissait plus d'augmentation. Les mesures TERS pour la détection d'IgG à des concentrations comprises entre $0,1$ et 1000 nM ont été effectuées avec les mêmes conditions que les premières mesures TERS pour la détection d'IgG à des concentrations de 1 à 500 nM .

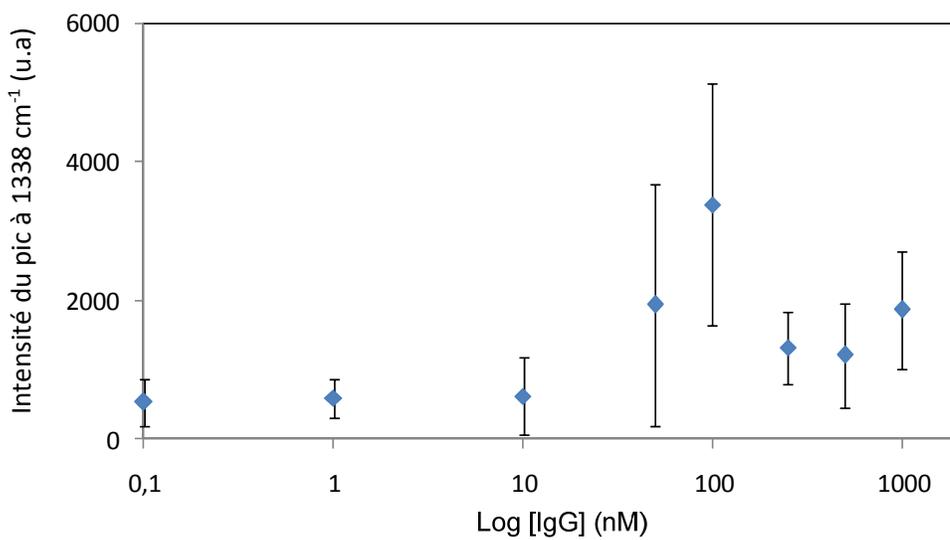


Figure 4.16 Étalonage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type A (petit levier) pour des concentrations allant de 0,1 à 1000 nM.

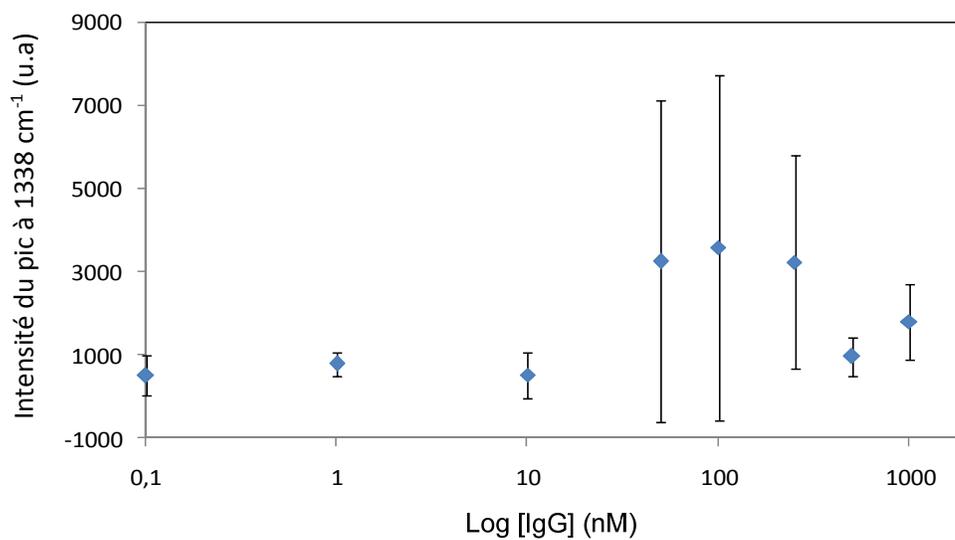


Figure 4.17 Étalonage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type B (grand levier) pour des concentrations allant de 0,1 à 1000 nM.

Les résultats des nouvelles courbes d'étalonnage ont permis d'observer une nouvelle fois que le pic principal du DSNB démontrait une nette augmentation du signal et ceci jusqu'à une certaine concentration limite de 100 nM, (Figure 4.16 et Figure 4.17). Encore une fois, au-delà de cette concentration, une saturation du signal, voire une nette diminution de celui-ci, était observée. Cette tendance, correspond une nouvelle fois à une moyenne effectuée sur les mesures de quatre leviers identiques (A ou B) pour chaque concentration, et est observée pour les deux types de pointes (A et B). Il est également possible d'observer que les barres d'erreur représentées sur les spectres d'étalonnage (Figure 4.14 à Figure 4.17) ont tendance à fortement augmenter lorsque l'intensité du pic principal est la plus grande. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une grande variabilité de mesure est associée aux anticorps et protéines utilisés, rendant par le fait même les essais biologiques beaucoup moins précis. De plus, l'effet Raman amplifié (SERS et TERS) suscite encore de nombreuses questions concernant la reproductibilité de l'exaltation.

L'augmentation du signal pour le pic principal du spectre Raman du DSNB observé à 1338 cm^{-1} , est caractéristique de l'augmentation de la protéine détectée à la surface du capteur. En effet, en augmentant la quantité de matériel biologique en solution, il y aura davantage de nanoparticules conjuguées qui interagiront avec l'IgG pour former le système de détection en sandwich. Davantage de nanoparticules conjuguées impliquent davantage de molécules de DSNB greffées à la surface de celles-ci qui seront présentes à la surface du levier, ce qui impliquera une augmentation du signal spectroscopique en termes d'intensité. Cependant, il est nécessaire de prendre en considération le plafonnement du signal TERS, qui peut également diminuer en intensité. Ces résultats peuvent amener à élaborer des hypothèses pour expliquer cette variation du signal. En effet, l'isotherme de Langmuir permet d'expliquer en majorité la tendance de saturation, mais un autre phénomène permettrait d'interpréter les résultats d'un point de vue plasmonique, en mettant en jeu les interactions et couplage entre structures (couplage plasmonique).

4.2.1.3.1 Saturation d'anticorps ou isotherme de Langmuir

L'allure de la courbe d'étalonnage montrant une saturation du signal Raman en fonction de la concentration en anticorps détectés par le système de détection secondaire, s'explique en partie avec le phénomène de saturation des sites disponibles (anticorps) à la surface du substrat. En effet, la liaison de l'interaction de l'anti-IgG avec l'IgG est spécifique, et donc saturable. Ce phénomène est démontré par l'isotherme d'adsorption de Langmuir. Ce principe se fonde sur trois postulats ; l'adsorption implique l'adhésion d'une seule couche de molécules à la surface du substrat (monocouche), la surface de ce substrat posséderait un nombre spécifique de sites au niveau desquels les molécules pourraient être adsorbées, à raison d'un site actif occupé par une molécule seulement, l'indépendance de ces sites actifs (par rapport aux autres sites à la surface du substrat).¹⁷⁸ L'isotherme de Langmuir dérive de l'adsorption de molécules de gaz sur les surfaces solides, mais peut être appliqué désormais à l'adsorption de solutés sur des surfaces solides dans des systèmes en solution. Ce phénomène a développé un intérêt certain, notamment dans le domaine de la science environnementale tant au niveau de la recherche que des applications industrielles.¹⁷⁸

Afin de mieux comprendre cet isotherme d'adsorption, il est nécessaire d'étudier l'équation de Langmuir utilisée comme modèle théorique. Cependant, les trois postulats définis comme étant la présence d'une monocouche à la surface, l'équivalence des sites d'adsorption, et l'indépendance des sites, sont généralement observés dans le cas d'adsorption de gaz sur des surfaces homogènes.¹⁷⁹ De par l'utilisation de surfaces plus complexes, et d'adsorbats sous forme de solutés, le système utilisé lors des manipulations effectuées dans le cadre de ce mémoire, est un système qui s'oppose à celui décrit par celui de l'adsorption de gaz. En effet, les solutés ont tendance à être adsorbés sur davantage de sites actifs, ce qui modifie l'isotherme de Langmuir original comme proposé par Sohn *et al.*¹⁷⁸ L'équation de Langmuir, en termes de surface de recouvrement, met en relation l'adsorption de molécules à la surface d'un substrat solide¹⁷⁸:

$$\theta = \frac{K_{ads} C}{1 + K_{ads} C} \quad \text{Équation 4.1}$$

où le terme θ définit la fraction de sites d'adsorption auxquels les molécules de solutés sont adsorbées, K_{ads} est la constante d'équilibre de la réaction d'adsorption d'une molécule de soluté à la surface d'un site actif, tandis que C correspond à la concentration de l'adsorbat.

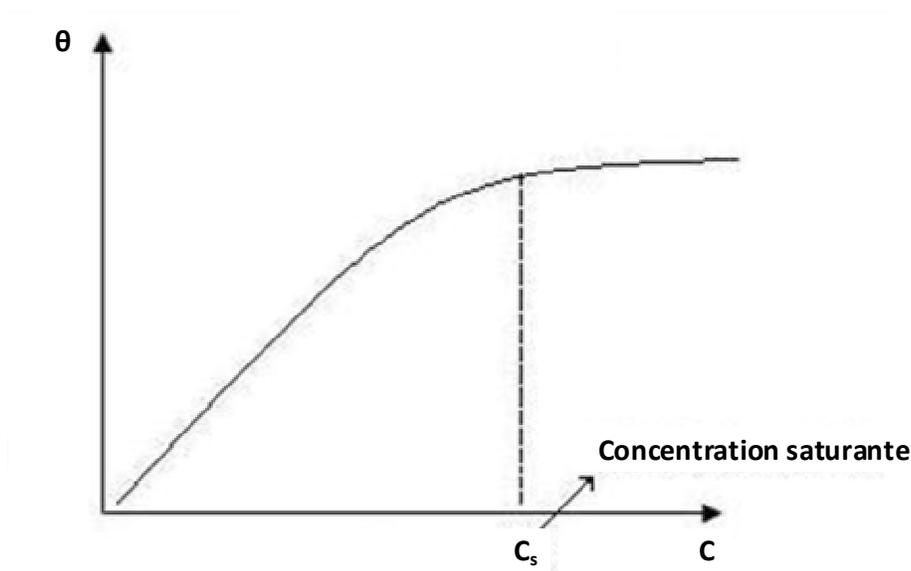


Figure 4.18 Tendence observée pour l'isotherme de Langmuir. Figure tirée du site web :

<http://www.chemistrylearning.com/adsorption-isotherm/>.

L'isotherme de Langmuir a été appliqué à une des mesures d'étalonnage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type A (petit levier) pour des concentrations allant de 1 à 500 nM (Figure 4.19). La tendance observée par les mesures d'étalonnage suit la courbe de Langmuir dont la modélisation a été effectuée à partir de la droite d'équation $y = (a*x) / (1+a*x)*b$ où y correspond à θ , a à K_{ads} , et x à C , et affichant un coefficient de régression $R^2 = 0,947$.

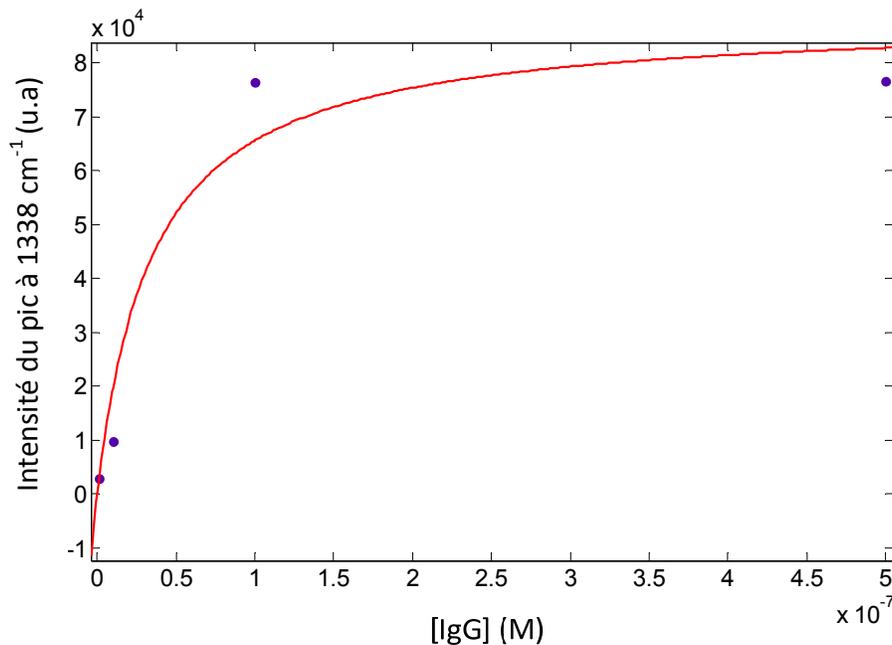


Figure 4.19 Modélisation de l'isotherme de Langmuir appliqué sur la courbe d'étalonnage pour la détection secondaire d'IgG sur les leviers de type A (petit levier) pour des concentrations allant de 1 à 500 nM.

Ainsi, à de plus hautes concentrations de molécules de soluté, une saturation du signal sera observée pour la fraction de sites actifs disponibles. Cette hypothèse pourrait expliquer la tendance de saturation du signal Raman observée pour les courbes d'étalonnage. En effet, en augmentant la concentration d'IgG, les sites actifs correspondants aux anti-IgG à la surface des leviers sont de plus en plus occupés, diminuant ainsi leur disponibilité pour plus d'adsorbats. Les nanoparticules conjuguées aux anti-IgG, et à la monocouche DSNB responsable du pic principal mesuré en Raman, sont donc moins nombreuses à pouvoir former un système de détection en sandwich avec l'IgG immobilisé sur l'anti-IgG, et le signal TERS n'évolue donc plus.

4.2.1.3.2 Couplage plasmonique

Le champ proche situé au niveau d'une nanoparticule peut interagir avec celle d'une nanoparticule voisine à raison d'une forte proximité. Cette interaction ayant lieu entre les champs proches des nanoparticules permet de varier la fréquence de l'oscillation du plasmon de surface du système de nanoparticules couplées. Ce phénomène appelé couplage plasmonique^{161, 180} a permis de constater que le rassemblement ou l'agrégation des nanoparticules d'or sphériques impliquées en structure compactée, déplaçait le signal d'absorption SPR vers de plus grandes longueurs d'ondes (*redshift*). Ce déplacement de la bande d'absorption SPR est confirmé par les estimations d'extinctions de Mie évaluées pour des agrégats de nanoparticules.¹⁸¹ Le déplacement SPR relatif au couplage entre deux particules dépend de la distance entre ces mêmes nanoparticules. Certaines recherches ont permis de constater que le déplacement de la bande SPR diminuait de façon exponentielle avec une plus grande séparation inter-particulaire.¹⁸²

La longueur d'onde du plasmon de résonance d'une nanoparticule métallique peut être affectée par les autres nanoparticules environnantes. En effet, lorsque deux nanoparticules d'or se retrouvent à proximité, il se produit un couplage de leurs modes plasmoniques résonants respectifs, ce qui aura pour conséquence directe de déplacer la longueur d'onde de résonance dépendamment de la séparation entre les deux nanoparticules.¹⁶¹ Ceci favorise la formation d'agrégats de nanoparticules visibles détectés par un changement de couleur de la suspension colloïdale. Le phénomène de couplage plasmonique est aussi la cause de l'apparition de régions de forts champs électriques permettant une amplification du signal SERS. Ces régions de fort champ sont des points chauds (*hot spots*) favorisant le recouvrement des champs électriques des différents matériaux LSPR.

Ainsi, les interactions inter-particulaires constituent une des nombreuses propriétés de la résonance de plasmons de surface.^{99, 180, 182-183} L'oscillation du plasmon génère une amplification du champ électrique localisé à la surface des nanoparticules. Celle-ci diminue en fonction de la distance entre deux nanoparticules, ainsi que de la taille des nanoparticules. En utilisant des nanoparticules d'or de diamètre d'environ 40 nm, le signal de diffusion de la lumière

sera assez intense, tout en assurant la minimisation des effets des particules sur les biomolécules pouvant se trouver à proximité, telles que les anticorps.

Le signal SERS dépend fortement de l'induction de l'excitation du plasmon par le laser. Le couplage plasmonique change fortement la longueur d'onde du plasmon et donc, change les conditions d'excitation en SERS. Ainsi, un changement dans la longueur d'onde d'excitation du laser utilisé lors des mesures en TERS pourrait modifier les résultats de façon favorable. En effet, il est possible que la saturation du signal qui serait induite par le couplage plasmonique maximal à une certaine concentration d'anticorps détecté, puisse être déplacée vers de plus grandes concentrations. En choisissant une longueur d'onde qui exciterait moins les plasmons de surface des nanoparticules et des leviers d'AFM recouverts d'or, la saturation du signal pourrait être déplacée vers de plus hautes concentrations d'IgG, et le domaine de linéarité des courbes d'étalonnage serait davantage étendu. Il serait alors intéressant de varier la longueur d'onde d'excitation du laser Raman dans le cadre de mesures de courbes d'étalonnage pour la mesure de détection secondaire d'IgG, et déterminer quel laser correspondrait le mieux au déplacement du point dans la courbe correspondant au couplage plasmonique maximal.

Ainsi, les différentes mesures TERS effectuées pour la détection secondaire de protéine IgG à l'aide de nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps secondaires, ont permis d'obtenir des spectres Raman ayant un signal fortement amplifié, localisé, spécifique, sélectif, et une gamme linéaire de concentration d'analyte définie à 100 nM pour le système étudié dans le cadre de ce mémoire. En effet, les mesures ont permis de démontrer que la détection de l'IgG par l'anti-IgG s'effectuait correctement, et que le signal d'amplification était localisé à la pointe du levier AFM, prouvant ainsi l'application de la technique TERS pour ces mesures. De plus, les mesures ont également permis de démontrer la sélectivité du signal TERS à la détection de l'IgG par les nanoparticules d'or conjuguées. Les mesures d'étalonnage ont également permis d'apporter des renseignements sur la gamme dynamique de concentration d'IgG détecté à la surface des leviers grâce au système de détection secondaire utilisant des nanoparticules d'or. Les mesures TERS ont démontré une augmentation relative d'intensité du signal Raman en fonction de la concentration d'IgG détecté et ceci jusqu'à une concentration limite de 100 nM à

laquelle le signal plafonnait. Cette tendance a pu être expliquée par deux principes, à savoir l'isotherme de Langmuir et le couplage plasmonique.

4.2.1.4 Localisation de l'exaltation du signal

Afin de localiser précisément la zone amplificatrice du signal Raman, la réponse Raman a été mesurée à différentes régions du levier AFM. En effet, la fonctionnalisation avec l'anti-IgG a été effectuée sur la totalité du bras de levier AFM, à savoir les régions planes ainsi que la pointe, étant la partie surélevée du levier. Il faut donc prendre en considération que tout le bras du levier, préalablement métallisé, agira comme un biocapteur. Comme il a été décrit préalablement dans l'introduction de ce mémoire, les régions amplificatrices du champ EM, et donc du signal Raman, sont principalement localisées au niveau des pointes et arêtes de nanostructures ayant une forme triangulaire. La pointe du levier devrait logiquement présenter le signal le plus intense par rapport aux régions planes du bras du levier, prouvant ainsi que le signal obtenu est bien un signal TERS.

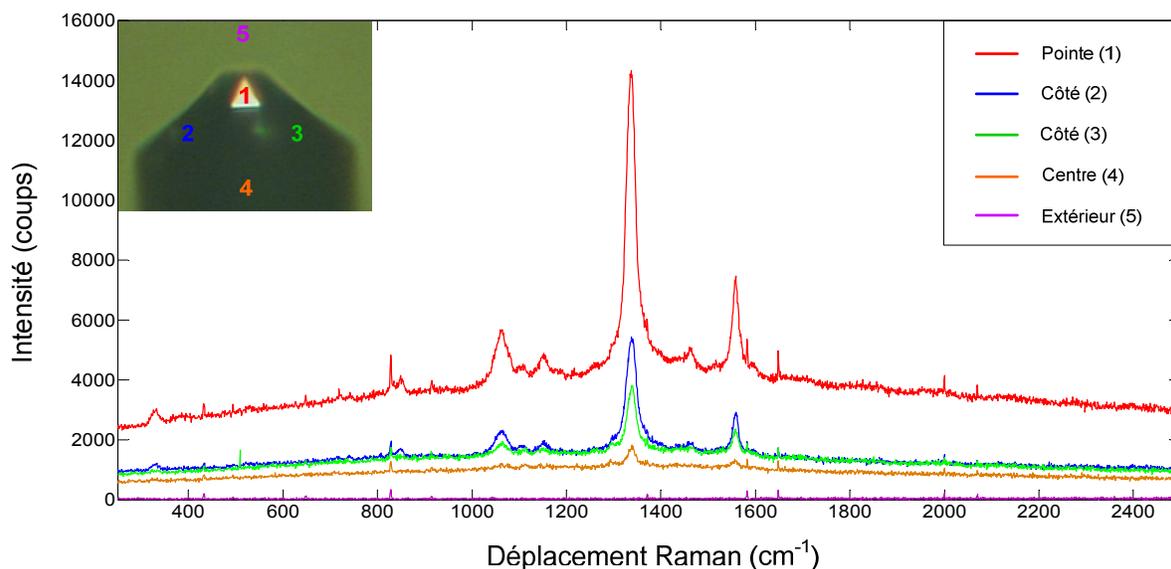


Figure 4.20 Comparaison de l'intensité du signal Raman pour la biodétection secondaire de 100 nM d'IgG à l'aide de AuNP-DSNB-anti-IgG sur leviers fonctionnalisés d'une couche d'or

et d'anti-IgG à différentes régions du bras du levier. Les analyses TERS ont été effectuées à l'aide d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations.

Ainsi, il est possible d'observer sur la Figure 4.20 que le signal Raman caractéristique de l'empreinte du DSNB adsorbé à la surface des AuNPs est le plus intense au niveau de la pointe du levier AFM (courbe rouge). Les parties planes du bras du levier sont également représentés (courbes bleue et verte) et démontrent un signal caractéristique du DSNB mais nettement moins intense. Un point au centre du levier a été également balayé, et un léger signal a pu être observé. Quant au point situé à l'extérieur du levier d'or, il ne présentait aucun signal caractéristique au signal Raman pour le DSNB. Ces observations permettent de décrire la pointe du levier comme étant la principale région permettant une exaltation du signal Raman, dû au champ EM local fortement amplifié. Ceci permet alors de démontrer que le signal Raman obtenu est donc bien dû au phénomène TERS. Une fois ces résultats obtenus, il a été possible d'effectuer la biodétection secondaire de la protéine IgG par l'utilisation de nanoparticules conjuguées. De nouvelles expériences ont été réalisées afin de démontrer l'IgG était correctement détecté par le système en sandwich.

4.2.1.5 Sélectivité et spécificité du biocapteur pour l'IgG

Il est primordial de démontrer la sélectivité et la spécificité des mesures effectuées sur la pointe du levier. Donc, des contrôles ont été effectués afin de prouver que la réponse observée à la section précédente était bien due à la détection d'IgG par les nanoparticules d'or. Afin de prouver que les AuNPs augmentent de façon significative le signal Raman pour la détection de matériel biologique, et que les résultats TERS démontrent un signal très faible pour la détection directe de l'IgG par l'anti-IgG, des mesures ont été faites à la surface des leviers, sans présence des AuNPs. De plus, afin de vérifier que ces AuNPs s'adsorbaient spécifiquement pour la détection d'IgG, une seconde série d'analyses a été effectuée avec, à la place de l'analyte cible IgG, un autre analyte tel que la BSA à une concentration de 100 nM. La troisième série d'analyse correspondait à la détection spécifique d'une concentration similaire de 100 nM d'IgG grâce au

système de détection secondaire par les nanoparticules. Ces mesures ont permis de comparer la réponse Raman pour trois types de détections distinctes, et ainsi de déterminer si ce système s'avérait être une technique de détection sensible, sélective et spécifique.

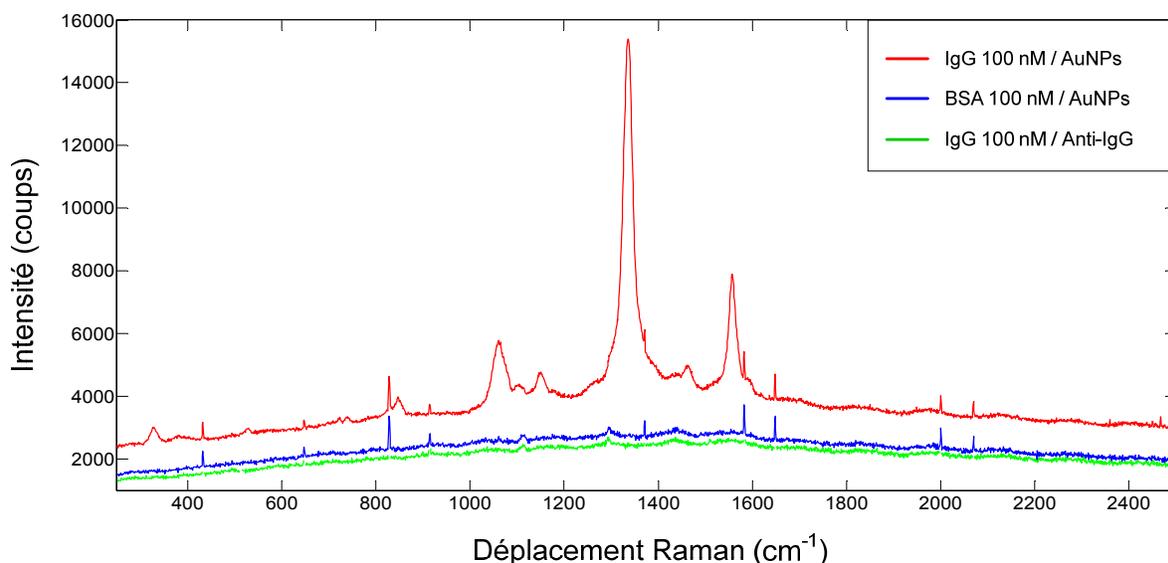


Figure 4.21 Comparaison de l'intensité du signal Raman pour la biodétection de 100 nM d'IgG à l'aide des AuNPs conjuguées à l'anti-IgG via le DSNB sur leviers fonctionnalisés d'une couche d'or et d'anti-IgG (courbe bleue). On compare cette variation d'intensité Raman à celle obtenue pour la biodétection de 100 nM de BSA (courbe verte), ainsi qu'à celle correspondant à la détection de 100 nM d'IgG par l'anti-IgG directement (courbe rouge). Les analyses TERS ont été effectuées à l'aide d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, à une puissance de 150 μ W, avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations.

La comparaison des signaux TERS obtenus pour différents systèmes de détection pour l'IgG (Figure 4.21), a permis d'établir plusieurs conclusions. Premièrement, la détection directe d'IgG par l'anti-IgG (courbe verte de la Figure 4.21) montre une quasi-absence de signal TERS comparativement au signal obtenu lors de la détection secondaire avec les nanoparticules d'or conjuguées à l'anti-IgG (courbe rouge de la Figure 4.21). En effet, la présence de DSNB sur les

nanoparticules d'or garantissait la présence de pics caractéristiques (situés à 849, 1063, 1338 et 1558 cm^{-1}). Cependant ces pics ne peuvent être visibles que lorsque les nanoparticules sont présentes à la surface des leviers, formant le système pour la détection de l'IgG. En observant le spectre relatif au système de détection secondaire, il est donc possible de déterminer les pics correspondants aux pics caractéristiques du DSNB, puisque les nanoparticules ont été immobilisées à la surface des leviers grâce à l'interaction IgG / anti-IgG. La comparaison entre le système de détection directe IgG / anti-IgG et le système de détection secondaire permet ainsi de conclure que l'utilisation de nanoparticules d'or conjuguées amplifie de façon significative le signal TERS pour la détection de l'IgG. Lorsque l'IgG est remplacé par une autre protéine, comme la BSA, la reconnaissance protéique ne s'effectue plus, et la BSA est incapable de s'immobiliser à la surface du levier par interaction avec l'anti-IgG. Puisqu'il n'y a plus d'analyte disponible pour permettre l'immobilisation des nanoparticules d'or conjuguées aux anti-IgGs secondaires, il n'y a donc plus de signal Raman relatif au DSNB présent à la surface de ces nanoparticules. Le remplacement de l'IgG par la BSA à une concentration identique a donc permis de déterminer la spécificité de l'interaction de l'anti-IgG avec l'IgG. Ainsi, en mesurant le signal Raman pour la détection d'un autre analyte que l'IgG, tel que la BSA (courbe bleue de la Figure 4.21) à une concentration identique, une faible réponse du signal TERS est également observée, permettant de conclure que les AuNPs conjuguées s'adsorbaient spécifiquement à la protéine IgG, et non à un autre analyte. Il est donc possible de déterminer la sélectivité de la liaison de l'IgG à l'anti-IgG et donc de la spécificité du signal Raman émis par le DSNB pour la détection de l'analyte. Les trois types de réponses TERS sont illustrés graphiquement à la Figure 4.21. Les résultats démontrent l'absence de signal caractéristique au DSNB pour la détection standard IgG / anti-IgG, ainsi que pour la détection secondaire avec nanoparticules d'or conjuguées du BSA à la place de l'IgG. Ceci prouve ainsi la spécificité du signal à la détection de protéine IgG par les nanoparticules d'or conjuguées à l'anti-IgG secondaire.

4.3 Utilisation de nanoparticules "framboises"

Afin de vérifier s'il était possible d'éliminer la décroissance du signal à de plus hautes concentrations d'analyte tout en conservant une haute sensibilité, les AuNPs sphériques ont été remplacées par un autre type de nanoparticules d'or. Le signal SERS de ces nouvelles particules, dont la forme était davantage complexe, a été mesuré. Cette étude voulait démontrer l'impact du changement de forme d'une nanostructure sur l'intensité du signal spectroscopique, et par conséquent l'effet sur l'amplification du signal SERS pour une biodétection. Des nanoparticules d'or ayant une forme de framboise (nano-ramboses, AuNFs) ont donc été synthétisées (comme expliqué à la section 2.2.1.2) et leur signal SERS a été mesuré.

4.3.1 Caractéristiques physiques des nano-ramboses d'or (AuNFs)

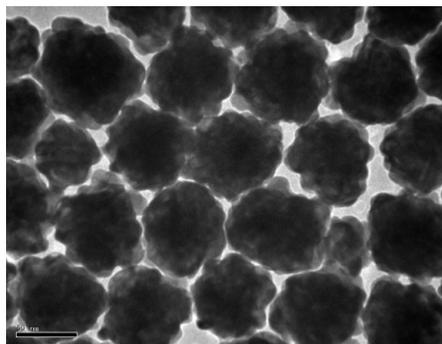


Figure 4.22 Image TEM de nano-ramboses ayant un diamètre d'environ 73 nm.

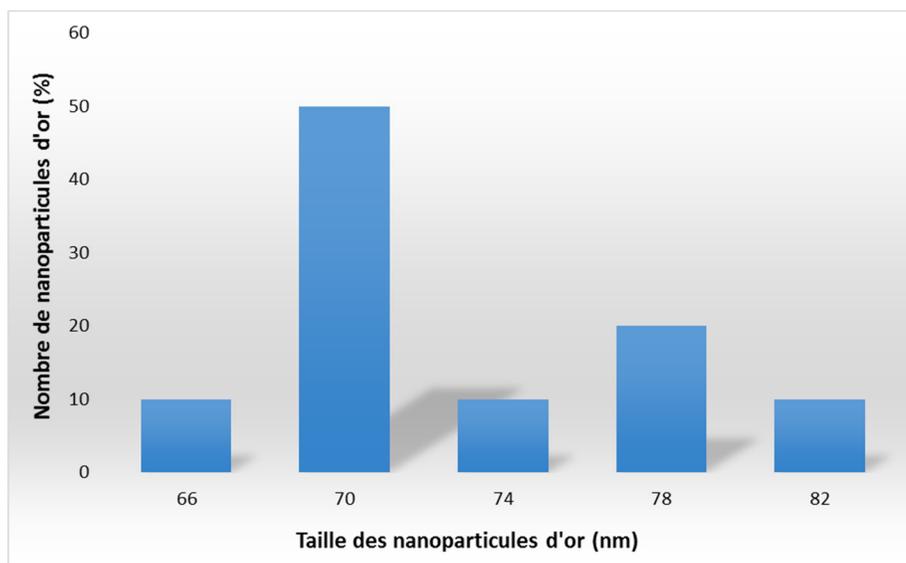


Figure 4.23 Histogramme de la taille des nano-framboises d'or déterminé par des mesures en TEM. Le diamètre moyen est de 73 ± 6 nm.

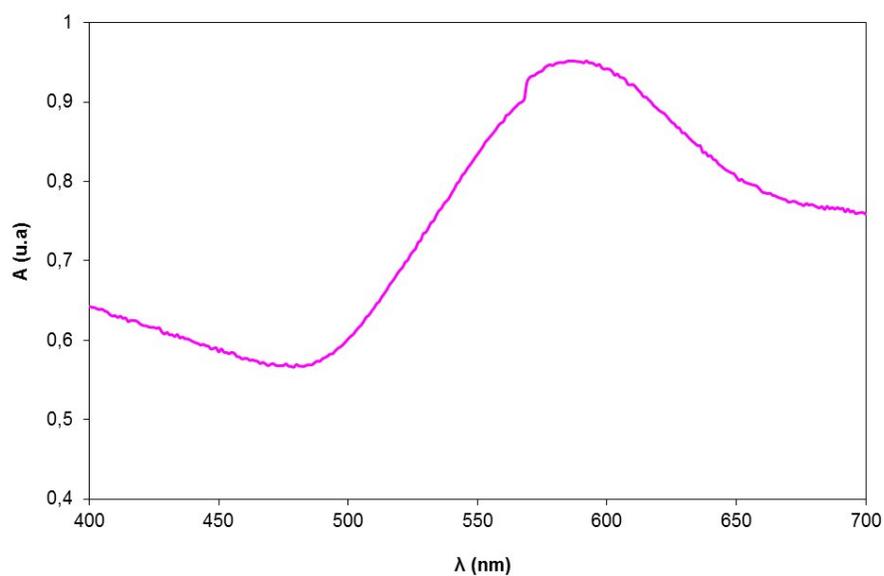


Figure 4.24 Spectre d'absorption UV-Vis des nano-framboises d'or. L'absorbance maximale est observée à une longueur d'onde de 592 nm.

Les nano-framboises d'or, en dehors de leurs différences de rugosité avec les nanoparticules d'or sphériques, possèdent également un plasmon situé à de plus grandes longueurs d'ondes. Ceci leur confère la capacité d'entrer en résonance avec le laser d'excitation, (contrairement aux nanoparticules sphériques hors résonance avec le laser), et d'augmenter ainsi l'intensité du couplage plasmonique entre le laser et les nanoparticules. Le couplage des nanoparticules avec la pointe AFM restera cependant relativement le même et ne changera pas particulièrement avec la forme de la particule.

Les nano-framboises synthétisées possèdent une surface rugueuse caractéristique, ainsi qu'une faible distance inter-particulaire. La proximité relative entre les nano-framboises crée alors des points chauds. Dès lors que deux nanoparticules métalliques se rapprochent l'une de l'autre, il y aura couplage de leurs dipôles oscillants de transitions respectifs. Les principes EM classiques prédisent alors que les champs d'amplification autour de chaque particule interfèrent de façon cohérente. Plus la distance entre chaque particule diminuera, plus le plasmon de résonance couplé se déplacera vers de plus hautes longueurs d'ondes (*redshift*), et plus le champ EM amplifié augmentera à l'interface entre les particules, et l'interférence destructive des champs aura lieu en d'autres points de l'espace.⁸⁹ La jonction entre deux nanoparticules peut donc agir comme un point chaud électromagnétique de façon analogue à ceux observés dans les agrégats de particules.¹⁸⁴ Van Duyne *et al.*¹⁸⁵ ont ainsi démontré l'efficacité de la présence de points chauds, pouvant former des crevasses à la jonction entre des particules métalliques coalescentes, pour une amplification EM maximale et localisée du signal SERS. L'étude des dimères leur a permis de suggérer que les propriétés d'extinction des nano-antennes étaient fortement dépendantes de la distance de la jonction entre les nanoparticules (d_{gap}).¹⁸⁶⁻¹⁸⁷ En augmentant d_{gap} , il s'effectue un déplacement bathochromique significatif de longueur d'onde. De plus, d_{gap} a un impact significatif sur le facteur d'amplification (EF). En étudiant différents facteurs susceptibles de contribuer à l'amplification du champ EM, ils ont pu déterminer que l'agrégation, et donc la présence de davantage de points chauds, n'avait aucun effet sur l'augmentation du EF. Un seul point chaud peut donc suffire à amplifier le champ local. De plus, la λ_{LSPR} n'avait également aucun effet sur le EF. Cependant, cette absence de corrélation n'implique pas que le couplage de la λ_{exc} du laser avec la LSPR des nanostructures ne soit pas

important. Enfin, une faible corrélation était observée entre le EF et la longueur d'onde du plasmon de résonance du dipôle, en cohérence avec leur dépendance commune à d_{gap} . Ainsi, les nano-framboises, de par leur structure leur attribuant des propriétés plasmoniques avantageuses, comme la formation de crevasses, permettent d'amplifier de façon significative le signal SERS. Cette particularité leur confère l'avantage d'une meilleure détection, de même que la possibilité d'exalter l'identification protéique directe par SERS.

4.3.2 Caractérisation SERS des nano-framboises d'or

Une fois les nano-framboises d'or synthétisées, elles ont été recouvertes d'une monocouche de DSNB, de la même manière que pour les nanoparticules d'or sphériques. Les nano-framboises ont par la suite été caractérisées grâce à une analyse SERS à différentes longueurs d'onde d'excitation, à savoir $\lambda = 633$ nm et $\lambda = 785$ nm. En effet, les nano-framboises démontrant un déplacement de la bande plasmonique vers de plus grandes longueurs d'onde (Figure 4.24), celles-ci présenteraient un signal SERS plus intense grâce à une longueur d'onde d'excitation du laser plus élevée correspondant au plasmon des nano-framboises d'or utilisées. En comparant les spectres obtenus aux deux longueurs d'onde d'excitation, il est possible d'observer des spectres relativement semblables. Cependant, le spectre SERS pour les nano-framboises obtenu pour une longueur d'onde d'excitation de 785 nm montre quelques bandes vibrationnelles de plus que pour le spectre obtenu à une longueur d'onde de 633 nm.

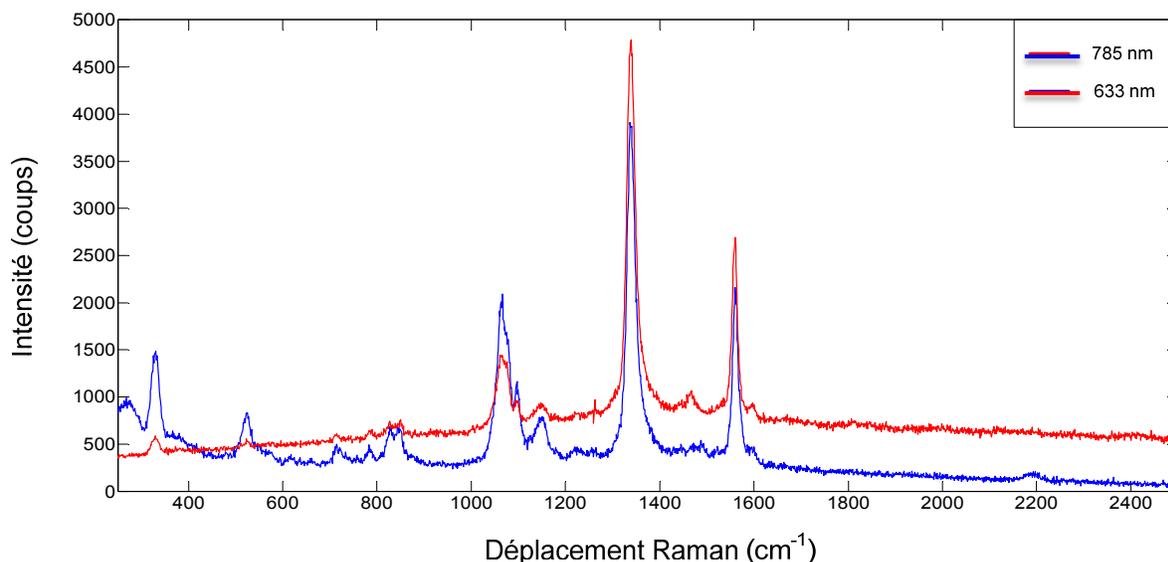


Figure 4.25 Spectres SERS de nano-framboises d'or fonctionnalisées avec le DNSB. La courbe bleue représente le signal SERS obtenu avec un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 633 nm. La courbe rouge représente le signal SERS obtenu avec un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 785 nm. Les analyses TERS ont été effectuées avec un laser à 633 nm ou 785 nm à une puissance de 150 μW , avec un temps d'intégration de 15 secondes / accumulation pour 10 accumulations.

Il serait alors intéressant de poursuivre les études sur la détection par des nano-framboises. En explorant les différentes capacités d'amplification de ces structures lors de mesures TERS, il serait alors possible de comparer directement les résultats avec ceux obtenus pour les nanoparticules sphériques.

5 Conclusions

Les travaux réalisés pour ce mémoire ont permis de développer plusieurs aspects ayant rapport avec le couplage de la spectroscopie SPR et la microscopie à force atomique. En partant de réactions biologiques et chimiques localisés pouvant être effectuées lors du balayage de la pointe AFM dans un milieu biologique, la formation de biocapteurs à la surface de ces leviers a pu être étudiée. L'étude d'une technique récente telle que la spectroscopie de diffusion Raman exaltée par effet de pointe (TERS) a permis de déterminer l'effet d'amplification d'une pointe AFM, ainsi que la réalisation d'une détection biologique secondaire grâce à l'utilisation de nanoparticules d'or.

Premièrement, des substrats nano-structurés ressemblant fortement à des pointes de leviers AFM, de par leur forme triangulaire, ont permis d'anticiper les résultats plasmoniques attendus pour la détection d'analyte. Cette détection a été effectuée de façon directe sur les réseaux de nano-triangles d'or et a été suivie cinétiquement. Les résultats ont permis de démontrer la possibilité d'une détection sur des substrats complexes et similaires aux pointes AFM.

En utilisant des nanoparticules d'or sphériques comme outil pour la détection d'analyte, il s'agissait d'amplifier fortement le signal spectroscopique associé à ces structures plasmoniques. La synthèse de ces nanoparticules, puis leur caractérisation par l'utilisation de diverses techniques ont été menées à bien. Ainsi, la spectroscopie UV-Vis a permis la détermination de la bande d'absorption correspondant à la résonance des plasmons des AuNPs en solution, la TEM permettait d'imager les nanoparticules et de déterminer leur forme et taille, la SEM caractérisait la présence de nanoparticules à la surface d'une pointe, tandis que la microscopie en champ sombre permettant d'obtenir le spectre de diffusion des AuNPs immobilisées sur la pointe. De récentes études ont toutefois démontré qu'un diamètre de nanoparticules plus grand (e.g., 60 nm) permettait une meilleure amplification de surface qu'en utilisant les nanoparticules de 30 nm de diamètre.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰

Par la suite, les résultats ont permis d'exploiter les avantages d'amplification de la spectroscopie TERS, fournissant par conséquent de l'information moléculaire à l'échelle nanométrique. De plus, la détection secondaire avec l'utilisation de nanoparticules d'or fonctionnalisées à l'aide d'un rapporteur Raman, permettait également la liaison aux anticorps. L'analyte détecté pouvait alors être emprisonné dans un système de détection efficace et sensible à la surface d'une pointe de levier AFM. Grâce aux propriétés plasmoniques particulières de la pointe TERS, ainsi que des nanoparticules d'or fonctionnalisées, le signal TERS pouvait alors être fortement amplifié, de façon localisée au niveau de l'apex de la pointe. Différentes mesures ont ainsi été effectuées afin de déterminer la caractérisation d'anticorps à la surface d'une pointe, de l'amplification du signal par détection en sandwich, ainsi que de la localisation du maximum d'amplification. En effet, l'étude de la réponse TERS des protéines IgG et anti-IgG a également permis de démontrer qu'un signal Raman était visible, avec des bandes caractéristiques des vibrations correspondant à certains acides aminés constituant en partie les protéines. Il a également été prouvé par comparaison que ces bandes vibrationnelles ressemblaient fortement à celles retrouvées dans la littérature^{123, 177} pour l'étude SERS du même type de protéine.

Les résultats TERS obtenus ont permis de démontrer que la détection secondaire réalisée à la surface d'une pointe AFM était spécifique, sélective et localisée, puisque il s'agissait de détecter uniquement un analyte (IgG) en utilisant des nanoparticules conjuguées aux anticorps (anti-IgG) et d'observer l'amplification maximale située à la pointe du levier. De plus, en effectuant un étalonnage pour la détection TERS de différentes concentrations d'analyte, il était possible de déterminer de la gamme dynamique de la détection. Une saturation du signal Raman a pu être observée à de hautes concentrations d'analyte (IgG) détecté. Deux hypothèses ont pu alors être développées afin d'en connaître la cause, et pouvoir apporter des réponses et alternatives possibles à cet obstacle constituant une des limites à l'amplification du signal à de plus hautes concentrations.

La première hypothèse impliquait un des phénomènes les plus couramment observés lors de l'utilisation de nanoparticules métalliques, pouvant coupler entre elles, mais également avec le substrat également recouvert d'un métal noble : le couplage plasmonique. Celui-ci induirait

une agrégation de nanoparticules à la surface du levier faisant en sorte que le couplage plasmonique serait maximal dès lors qu'une certaine concentration en IgG serait détectée, créant alors la saturation du signal spectroscopique dans les spectres d'étalonnage étudiés. Un changement dans la longueur d'onde d'excitation du laser pourrait être une alternative à un couplage plasmonique trop intense à de faibles concentrations de matériel biologique détecté. Il serait donc intéressant d'essayer de nouvelles longueurs d'onde pour les mesures d'étalonnage et voir si elles permettent d'étendre le domaine de linéarité. La seconde hypothèse était basée sur le phénomène d'adsorption reposant sur l'isotherme de Langmuir. En tenant compte de la saturation pour le nombre de sites actifs disponibles pour les molécules d'IgG, et à une certaine concentration limite, la présence de molécules d'IgG additionnelles sera sans effet sur l'augmentation du signal spectroscopique, montrant alors une saturation dans le signal lors de mesures pour des courbes d'étalonnage.

5.1 Perspectives : vers le développement de biocapteurs basés sur le *patch-clamp* avec l'utilisation de capillaires étirés comme pointes alternatives

Les capillaires étirés comportant une nanoparticule d'or unique immobilisée à l'extrémité de la pointe est une des perspectives de ce projet à long terme. En effet, la pointe utilisée lors des expériences effectuées, est située sur un bras de levier AFM assez large, pouvant bloquer le champ de vision en microscopie. L'utilisation de capillaires de verre plus petit permettrait de réduire les interférences liées au champ de vision bloqué. De plus, la présence d'une cavité cylindrique, fin conduit se trouvant au centre du capillaire et formant la pointe, permet d'apporter un réactif ou stimuli chimique. En étirant mécaniquement des capillaires, il est alors possible de les utiliser en tant que sondes optiques en champ proche. En fonction de la nature du capillaire, ainsi que des paramètres d'étirement physiques, il sera possible de former une sonde capable grâce à sa pointe d'induire un signal d'amplification similaire à celui produit par les leviers d'AFM. Les capillaires ainsi produits par étirement physique possèdent des angles de cône plus larges et produisent ainsi un débit optique plus intense.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ Un des inconvénients de

la formation de ces capillaires étirés reste toutefois la sensibilité de la forme de ces sondes procurée par des facteurs d'étirement, tels que les vibrations ou les déviations de température.¹³⁷ Au-delà de l'avantage d'augmenter le champ de vision en microscopie, ces substrats gardent toutefois les mêmes paramètres analytiques qu'une pointe de levier AFM. Leur fabrication a été validée par étirement physique, puis les capillaires ont été observés en SEM avant et après immersion de la pointe dans une solution colloïdale (Figure 5.1).

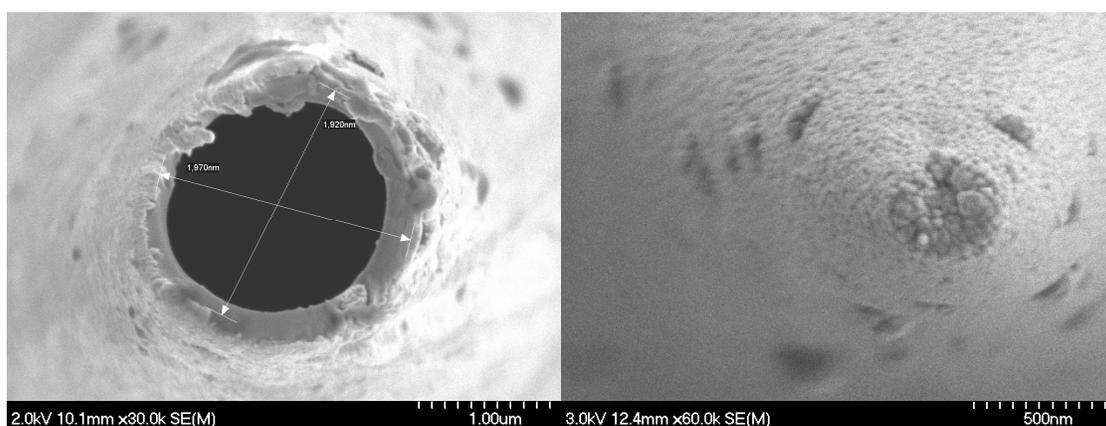


Figure 5.1 Images SEM de l'ouverture à la pointe d'un capillaire de verre. L'image de gauche représente le capillaire recouvert d'une fine couche d'or. L'image de droite représente le capillaire recouvert d'or qui a été immergé dans une suspension colloïdale.

Ainsi, le potentiel propre à la technique TERS et les défis lui étant associés sont de plus en plus sollicités. L'évolution et l'amélioration de cette technique au fil des années lui permettent ainsi de s'inscrire dans un nouveau chapitre scientifique prometteur, tendant à se développer pour une recherche de plus en plus poussée dans le cadre de la détection médicale.

6 Bibliographie

1. Haes, A. J.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P., Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (7), 2264-2271.
2. Haes, A. J.; Duyne, R. P. V., Preliminary studies and potential applications of localized surface plasmon resonance spectroscopy in medical diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2004**, *4* (4), 527-537.
3. Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (12), 1578-1586.
4. Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* **2007**, *2* (5), 681-693.
5. El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A., Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Lett.* **2005**, *5* (5), 829-834.
6. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J.-F., Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *PCCP* **2013**, *15* (27), 11190-11216.
7. Chung, J.; Kim, S.; Bernhardt, R.; Pyun, J., Application of SPR biosensor for medical diagnostics of human hepatitis B virus (hHBV). *Sens. Actuators B: Chem.* **2005**, *111*, 416-422.
8. Yager, P.; Edwards, T.; Fu, E.; Helton, K.; Nelson, K.; Tam, M. R.; Weigl, B. H., Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* **2006**, *442* (7101), 412-418.

9. Vaisocherová, H.; Homola, J., SPR biosensors for medical diagnostics. In *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer: **2006**; pp 229-247.
10. Mauriz, E.; Calle, A.; Montoya, A.; Lechuga, L. M., Determination of environmental organic pollutants with a portable optical immunosensor. *Talanta* **2006**, *69* (2), 359-364.
11. Mauriz, E.; Calle, A.; Manclus, J.; Montoya, A.; Lechuga, L. M., Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387* (4), 1449-1458.
12. Nabok, A.; Hassan, A.; Ray, A.; Omar, O.; Kalchenko, V., Study of adsorption of some organic molecules in calix [4] resorcinolarene LB films by surface plasmon resonance. *Sens. Actuators B: Chem.* **1997**, *45* (2), 115-121.
13. Urashi, T.; Arakawa, T., Detection of lower hydrocarbons by means of surface plasmon resonance. *Sens. Actuators B: Chem.* **2001**, *76* (1), 32-35.
14. Homola, J., Surface Plasmon resonance (SPR) biosensors and their applications in food safety and security. In *Frontiers in Planar Lightwave Circuit Technology*, Springer: **2006**; pp 101-118.
15. Piliarik, M.; Párová, L.; Homola, J., High-throughput SPR sensor for food safety. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (5), 1399-1404.
16. Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377* (3), 528-539.
17. Hock, B., Antibodies for immunosensors a review. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347* (1), 177-186.
18. Jayasena, S. D., Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **1999**, *45* (9), 1628-1650.

19. Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Corn, R. M., Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (20), 5161-5168.
20. Ansell, R. J.; Ramström, O.; Mosbach, K., Towards artificial antibodies prepared by molecular imprinting. *Clin. Chem.* **1996**, *42* (9), 1506-1512.
21. Knoll, W.; Liley, M.; Piscevic, D.; Spinke, J.; Tarlov, M. J., Supramolecular architectures for the functionalization of solid surfaces. *Adv. Biophys.* **1997**, *34*, 231-251.
22. Wood, R. W., XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philos. Mag. Series 6* **1902**, *4* (21), 396-402.
23. Wood, R., XXVII. Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1912**, *23* (134), 310-317.
24. Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Phys.* **1968**, *216* (4), 398-410.
25. Kretschmann, E.; Raether, H., Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light(Surface plasma waves excitation by light and decay into photons applied to nonradiative modes). *Z. Naturforsch. A Phys. Sci.* **1968**, *23*, 2135.
26. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267-297.
27. Daniel, M.-C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (1), 293-346.
28. Kerker, M., The optics of colloidal silver: something old and something new. *J. Colloid Interface Sci.* **1985**, *105* (2), 297-314.

29. Abdulhalim, I.; Zourob, M.; Lakhtakia, A., Surface plasmon resonance for biosensing: a mini-review. *Electromagnetics* **2008**, *28* (3), 214-242.
30. Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 462-493.
31. De Feijter, J.; Benjamins, d. J.; Veer, F., Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface. *Biopolymers* **1978**, *17* (7), 1759-1772.
32. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G., Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuators B: Chem.* **1999**, *54* (1), 3-15.
33. Burstein, E.; Chen, W.; Chen, Y.; Hartstein, A., Surface polaritons—propagating electromagnetic modes at interfaces. *J. Vac. Sci. Technol.* **1974**, *11* (6), 1004-1019.
34. Barnes, W. L.; Dereux, A.; Ebbesen, T. W., Surface plasmon subwavelength optics. *Nature* **2003**, *424* (6950), 824-830.
35. Homola, J., On the sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation. *Sens. Actuators B: Chem.* **1997**, *41* (1), 207-211.
36. Raether, H., *Surface plasmons on smooth surfaces*. Springer: **1988**.
37. Stuart, D.; Haes, A.; Yonzon, C.; Hicks, E.; Van Duyne, R. Biological applications of localised surface plasmonic phenomena. *IEE Proc.-Nanobiotechnol.* **2005**, *152* (1), 13-32.
38. Haes, A. J.; Zou, S.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P., Nanoscale optical biosensor: short range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (22), 6961-6968.

39. Barbillon, G.; Bijeon, J.-L.; Plain, J.; Royer, P., Sensitive detection of biological species through localized surface-plasmon resonance on gold nanodisks. *Thin Solid Films* **2009**, *517* (9), 2997-3000.
40. Haes, A. J.; Zou, S.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P., A nanoscale optical biosensor: the long range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (1), 109-116.
41. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J.-F., High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta* **2009**, *77* (5), 1680-1687.
42. Karlsen, S.; Johnston, K.; Jorgenson, R.; Yee, S., Simultaneous determination of refractive index and absorbance spectra of chemical samples using surface plasmon resonance. *Sens. Actuators B: Chem.* **1995**, *25* (1), 747-749.
43. Live, L. S.; Murray-Methot, M.-P.; Masson, J.-F., Localized and propagating surface plasmons in gold particles of near-micron size. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *113* (1), 40-44.
44. Hu, J.; Wang, Z.; Li, J., Gold nanoparticles with special shapes: controlled synthesis, surface-enhanced Raman scattering, and the application in biodetection. *Sensors* **2007**, *7* (12), 3299-3311.
45. Sharma, P.; Brown, S.; Walter, G.; Santra, S.; Moudgil, B., Nanoparticles for bioimaging. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *123*, 471-485.
46. Qian, X.-M.; Nie, S., Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (5), 912-920.
47. Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K., PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Del. Rev.* **2003**, *55* (3), 403-419.
48. Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Au nanoparticles target cancer. *Nano Today* **2007**, *2* (1), 18-29.

49. Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **2008**, *23* (3), 217-228.
50. Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A., Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 2115-2120.
51. El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A., Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* **2006**, *239* (1), 129-135.
52. Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Del. Rev.* **2008**, *60* (11), 1307-1315.
53. Kreibig, U.; Vollmer, M., Optical properties of metal clusters. Springer: **1995**.
54. Hutter, E.; Fendler, J. H., Exploitation of localized surface plasmon resonance. *Adv. Mater.* **2004**, *16* (19), 1685-1706.
55. Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P., Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (45), 10549-10556.
56. Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E., Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications: I. Theory. *Anal. Biochem.* **1998**, *262* (2), 137-156.
57. Schultz, S.; Smith, D. R.; Mock, J. J.; Schultz, D. A., Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (3), 996-1001.
58. Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P., *Electromagnetic Mechanism of Surface-Enhanced Spectroscopy*. Handbook of vibrational spectroscopy. Wiley: **2002**.

59. Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P., Nanosphere lithography: a versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (24), 5599-5611.
60. El-Sayed, M. A., Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34* (4), 257-264.
61. Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (10), 2957-2976.
62. Eustis, S.; El-Sayed, M. A., Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 209-217.
63. Sun, Y.; Xia, Y., Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science* **2002**, *298* (5601), 2176-2179.
64. Underwood, S.; Mulvaney, P., Effect of the solution refractive index on the color of gold colloids. *Langmuir* **1994**, *10* (10), 3427-3430.
65. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (3), 668-677.
66. Rosi, N. L.; Mirkin, C. A., Nanostructures in biodiagnostics. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1547-1562.
67. Halas, N. J., Plasmonics: an emerging field fostered by Nano Letters. *Nano Lett.* **2010**, *10* (10), 3816-3822.
68. Dieringer, J. A.; McFarland, A. D.; Shah, N. C.; Stuart, D. A.; Whitney, A. V.; Yonzon, C. R.; Young, M. A.; Zhang, X.; Van Duyne, R. P., Introductory Lecture Surface enhanced

Raman spectroscopy: new materials, concepts, characterization tools, and applications. *Faraday Discuss.* **2006**, *132*, 9-26.

69. Yonzon, C. R.; Stuart, D. A.; Zhang, X.; McFarland, A. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P., Towards advanced chemical and biological nanosensors—an overview. *Talanta* **2005**, *67* (3), 438-448.

70. Raman, C.; Krishnan, K., A new type of secondary radiation. *Nature* **1928**, *121* (3048), 501-502.

71. McCreery, R. L., *Raman spectroscopy for chemical analysis*. Vol. 225, John Wiley & Sons: **2005**.

72. Zhang, X.; Yonzon, C.; Young, M.; Stuart, D.; Van Duyne, R. Surface-enhanced Raman spectroscopy biosensors: excitation spectroscopy for optimisation of substrates fabricated by nanosphere lithography, *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **2005**, *152*, 195-206.

73. Schrader, B.; Dippel, B.; Erb, I.; Keller, S.; Löchte, T.; Schulz, H.; Tatsch, E.; Wessel, S., NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects. *J. Mol. Struct.* **1999**, *480*, 21-32.

74. Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I. U., Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2007**, *42* (5), 493-541.

75. Petrich, W., Mid-infrared and Raman spectroscopy for medical diagnostics. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2001**, *36* (2-3), 181-237.

76. Keller, S.; Löchte, T.; Dippel, B.; Schrader, B., Quality control of food with near-infrared-excited Raman spectroscopy. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, *346* (6-9), 863-867.

77. Vandenabeele, P.; Wehling, B.; Moens, L.; Edwards, H.; De Reu, M.; Van Hooydonk, G., Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *407* (1), 261-274.

78. Bell, I. M.; Clark, R. J.; Gibbs, P. J., Raman spectroscopic library of natural and synthetic pigments (pre- \approx 1850 AD). *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1997**, *53* (12), 2159-2179.
79. Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P., Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, *84* (1), 1-20.
80. Albrecht, M. G.; Creighton, J. A., Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (15), 5215-5217.
81. Pettinger, B.; Picardi, G.; Schuster, R.; Ertl, G., Surface Enhanced Raman Spectroscopy : Towards Single Moleculer Spectroscopy (E). *Electrochemistry* **2000**, *68* (12), 942-949.
82. Moskovits, M., Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **1985**, *57* (3), 783.
83. Campion, A.; Kambhampati, P., Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27* (4), 241-250.
84. Hildebrandt, P.; Stockburger, M., Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (24), 5935-5944.
85. Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Population pumping of excited vibrational states by spontaneous surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76* (14), 2444.
86. Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78* (9), 1667.
87. Kneipp, K.; Kneipp, H.; Kartha, V. B.; Manoharan, R.; Deinum, G.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. E* **1998**, *57* (6), R6281.

88. Nie, S.; Emory, S. R., Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science* **1997**, *275* (5303), 1102-1106.
89. Michaels, A. M.; Jiang, J.; Brus, L., Ag nanocrystal junctions as the site for surface-enhanced Raman scattering of single rhodamine 6G molecules. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (50), 11965-11971.
90. Xu, H.; Aizpurua, J.; Käll, M.; Apell, P., Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. E* **2000**, *62* (3), 4318.
91. Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 65-87.
92. Shalaev, V. M.; Botet, R.; Tsai, D.; Kovacs, J.; Moskovits, M., Fractals: localization of dipole excitations and giant optical polarizabilities. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **1994**, *207* (1), 197-207.
93. Romero, I.; Aizpurua, J.; Bryant, G. W.; García De Abajo, F. J., Plasmons in nearly touching metallic nanoparticles: singular response in the limit of touching dimers. *Opt. Express* **2006**, *14* (21), 9988-9999.
94. Sheikholeslami, S.; Jun, Y.-w.; Jain, P. K.; Alivisatos, A. P., Coupling of optical resonances in a compositionally asymmetric plasmonic nanoparticle dimer. *Nano Lett.* **2010**, *10* (7), 2655-2660.
95. Carrier, S. L.; Kownacki, C. M.; Schultz, Z. D., Protein–ligand binding investigated by a single nanoparticle TERS approach. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (7), 2065-2067.
96. Gunnarsson, L.; Rindzevicius, T.; Prikulis, J.; Kasemo, B.; Käll, M.; Zou, S.; Schatz, G. C., Confined plasmons in nanofabricated single silver particle pairs: experimental observations of strong interparticle interactions. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (3), 1079-1087.

97. Encina, E. R.; Coronado, E. A., Plasmon coupling in silver nanosphere pairs. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (9), 3918-3923.
98. Hao, E.; Schatz, G. C., Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *J. Chem. Phys.* **2003**, *120* (1), 357-366.
99. Rechberger, W.; Hohenau, A.; Leitner, A.; Krenn, J.; Lamprecht, B.; Aussenegg, F., Optical properties of two interacting gold nanoparticles. *Opt. Commun.* **2003**, *220* (1), 137-141.
100. Liu, Z.; Boltasseva, A.; Pedersen, R. H.; Bakker, R.; Kildishev, A. V.; Drachev, V. P.; Shalaev, V. M., Plasmonic nanoantenna arrays for the visible. *Metamaterials* **2008**, *2* (1), 45-51.
101. Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. *J. Phys.: Condens. Matter* **2002**, *14* (18), R597.
102. Bailo, E.; Deckert, V., Tip-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (5), 921-930.
103. Pettinger, B.; Schambach, P.; Villagómez, C. J.; Scott, N., Tip-enhanced Raman spectroscopy: near-fields acting on a few molecules. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 379-399.
104. Deckert-Gaudig, T.; Deckert, V., Tip-enhanced Raman scattering (TERS) and high-resolution bio nano-analysis—a comparison. *PCCP* **2010**, *12* (38), 12040-12049.
105. Wessel, J., Surface-enhanced optical microscopy. *JOSA B* **1985**, *2* (9), 1538-1541.
106. Wokaun, A.; Gordon, J.; Liao, P., Radiation damping in surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *48* (14), 957.
107. Emory, S. R.; Nie, S., Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy on single silver nanoparticles. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (14), 2631-2635.

108. Stöckle, R. M.; Suh, Y. D.; Deckert, V.; Zenobi, R., Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *318* (1), 131-136.
109. Khan, I.; Cunningham, D.; Littleford, R. E.; Graham, D.; Smith, W. E.; McComb, D. W., From micro to nano: Analysis of surface-enhanced resonance Raman spectroscopy active sites via multiscale correlations. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (1), 224-230.
110. Kodama, T.; Umezawa, T.; Watanabe, S.; Ohtani, H., Development of apertureless near-field scanning optical microscope tips for tip-enhanced Raman spectroscopy. *J. Microsc.* **2008**, *229* (2), 240-246.
111. Bortchagovsky, E. G.; Fischer, U. C., A tetrahedral tip as a probe for tip-enhanced Raman scattering and as a near-field Raman probe. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40* (10), 1386-1391.
112. Ossikovski, R.; Nguyen, Q.; Picardi, G., Simple model for the polarization effects in tip-enhanced Raman spectroscopy. *Phys. Rev. B* **2007**, *75* (4), 045412.
113. Yang, Z.; Aizpurua, J.; Xu, H., Electromagnetic field enhancement in TERS configurations. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40* (10), 1343-1348.
114. Pettinger, B.; Domke, K. F.; Zhang, D.; Picardi, G.; Schuster, R., Tip-enhanced Raman scattering: influence of the tip-surface geometry on optical resonance and enhancement. *Surf. Sci.* **2009**, *603* (10), 1335-1341.
115. Wang, J.; Saito, Y.; Batchelder, D.; Kirkham, J.; Robinson, C.; Smith, D., Controllable method for the preparation of metalized probes for efficient scanning near-field optical Raman microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86* (26), 263111.
116. Anderson, M. S., Locally enhanced Raman spectroscopy with an atomic force microscope. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *76* (21), 3130-3132.

117. Hayazawa, N.; Inouye, Y.; Sekkat, Z.; Kawata, S., Metallized tip amplification of near-field Raman scattering. *Opt. Commun.* **2000**, *183* (1), 333-336.
118. Hartschuh, A.; Sánchez, E. J.; Xie, X. S.; Novotny, L., High-resolution near-field Raman microscopy of single-walled carbon nanotubes. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90* (9), 095503.
119. Pettinger, B.; Picardi, G.; Schuster, R.; Ertl, G., Surface-enhanced and STM-tip-enhanced Raman Spectroscopy at Metal Surfaces. *Single Molecules* **2002**, *3* (5-6), 285-294.
120. Kawata, S., *Near-field optics and surface plasmon polaritons*. Vol. 20 Springer: **2001**.
121. Huang, F.; Baumberg, J. J., Actively tuned plasmons on elastomerically driven Au nanoparticle dimers. *Nano Lett.* **2010**, *10* (5), 1787-1792.
122. Tamaru, H.; Kuwata, H.; Miyazaki, H. T.; Miyano, K., Resonant light scattering from individual Ag nanoparticles and particle pairs. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80* (10), 1826-1828.
123. Alexander, K. D.; Schultz, Z. D., Tip-enhanced Raman detection of antibody conjugated nanoparticles on cellular membranes. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (17), 7408-7414.
124. Festy, F.; Demming, A.; Richards, D., Resonant excitation of tip plasmons for tip-enhanced Raman SNOM. *Ultramicroscopy* **2004**, *100* (3), 437-441.
125. Krug II, J. T.; Sanchez, E. J.; Xie, X. S., Design of near-field optical probes with optimal field enhancement by finite difference time domain electromagnetic simulation. *J. Chem. Phys.* **2002**, *116* (24), 10895-10901.
126. Micic, M.; Klymyshyn, N.; Suh, Y. D.; Lu, H. P., Finite element method simulation of the field distribution for AFM tip-enhanced surface-enhanced Raman scanning microscopy. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (7), 1574-1584.
127. Martin, Y. C.; Hamann, H. F.; Wickramasinghe, H. K., Strength of the electric field in apertureless near-field optical microscopy. *J. Appl. Phys.* **2001**, *89* (10), 5774-5778.

128. Mauser, N.; Hartschuh, A., Tip-enhanced near-field optical microscopy. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (4), 1248-1262.
129. Yeo, B.-S.; Stadler, J.; Schmid, T.; Zenobi, R.; Zhang, W., Tip-enhanced Raman Spectroscopy—Its status, challenges and future directions. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *472* (1), 1-13.
130. Wood, B. R.; Asghari-Khiavi, M.; Bailo, E.; McNaughton, D.; Deckert, V., Detection of Nano-oxidation sites on the surface of hemoglobin crystals using tip-enhanced Raman scattering. *Nano Lett.* **2012**, *12* (3), 1555-1560.
131. Ogawa, Y.; Yuasa, Y.; Minami, F.; Oda, S., Tip-enhanced Raman mapping of a single Ge nanowire. *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *99* (5), 053112.
132. Reparaz, J.; Peica, N.; Kirste, R.; Goni, A.; Wagner, M.; Callsen, G.; Alonso, M.; Garriga, M.; Marcus, I. C.; Ronda, A., Probing local strain and composition in Ge nanowires by means of tip-enhanced Raman scattering. *Nanotechnology* **2013**, *24* (18), 185704.
133. Böhmler, M.; Wang, Z.; Myalitsin, A.; Mews, A.; Hartschuh, A., Optical imaging of CdSe nanowires with nanoscale resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (48), 11536-11538.
134. Georgi, C.; Green, A. A.; Hersam, M. C.; Hartschuh, A., Probing exciton localization in single-walled carbon nanotubes using high-resolution near-field microscopy. *ACS Nano* **2010**, *4* (10), 5914-5920.
135. Maciel, I. O.; Anderson, N.; Pimenta, M. A.; Hartschuh, A.; Qian, H.; Terrones, M.; Terrones, H.; Campos-Delgado, J.; Rao, A. M.; Novotny, L., Electron and phonon renormalization near charged defects in carbon nanotubes. *Nat. Mater.* **2008**, *7* (11), 878-883.
136. Berweger, S.; Neacsu, C. C.; Mao, Y.; Zhou, H.; Wong, S. S.; Raschke, M. B., Optical nanocrystallography with tip-enhanced phonon Raman spectroscopy. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4* (8), 496-499.

137. Stöckle, R.; Fokas, C.; Deckert, V.; Zenobi, R.; Sick, B.; Hecht, B.; Wild, U. P., High-quality near-field optical probes by tube etching. *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *75* (2), 160-162.
138. Schmid, T.; Sebesta, A.; Stadler, J.; Opilik, L.; Balabin, R. M.; Zenobi, R. In *Tip-enhanced Raman spectroscopy and related techniques in studies of biological materials*, LASE, International Society for Optics and Photonics: **2010**; pp 758603-758603-13.
139. Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J., Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (4), 735-743.
140. Chang, R. K.; Furtak, T. E., *Surface enhanced Raman scattering*. Plenum Press New York: **1982**; Vol. 233.
141. Pettinger, B.; Picardi, G.; Schuster, R.; Ertl, G., Surface-enhanced and STM tip-enhanced Raman spectroscopy of CN⁻ ions at gold surfaces. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *554*, 293-299.
142. Mehtani, D.; Lee, N.; Hartschuh, R.; Kisliuk, A.; Foster, M.; Sokolov, A.; Maguire, J., Nano-Raman spectroscopy with side-illumination optics. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36* (11), 1068-1075.
143. Steidtner, J.; Pettinger, B., High-resolution microscope for tip-enhanced optical processes in ultrahigh vacuum. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78* (10), 103104-103104-8.
144. Live, L. S., « Fabrication des films microstructurés et leurs caractéristiques en spectroscopie de résonance des plasmons de surface », Thèse de Doctorat, Université de Montréal, **2012**.
145. Li, J.-R.; Henry, G. C.; Garno, J. C., Fabrication of nanopatterned films of bovine serum albumin and staphylococcal protein A using latex particle lithography. *Analyst* **2006**, *131* (2), 244-250.

146. Hulteen, J. C.; Treichel, D. A.; Smith, M. T.; Duval, M. L.; Jensen, T. R.; Van Duyne, R. P., Nanosphere lithography: size-tunable silver nanoparticle and surface cluster arrays. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (19), 3854-3863.
147. Enustun, B.; Turkevich, J., Coagulation of colloidal gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (21), 3317-3328.
148. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (7), 2313-2322.
149. Grubisha, D. S.; Lipert, R. J.; Park, H.-Y.; Driskell, J.; Porter, M. D., Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (21), 5936-5943.
150. Driskell, J. D.; Kwart, K. M.; Lipert, R. J.; Porter, M. D.; Neill, J. D.; Ridpath, J. F., Low-level detection of viral pathogens by a surface-enhanced Raman scattering based immunoassay. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (19), 6147-6154.
151. Lesaichere, M.-L.; Uttamchandani, M.; Chen, G. Y.; Yao, S. Q., Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (16), 2079-2083.
152. Hohenau, A.; Krenn, J.; Schider, G.; Ditlbacher, H.; Leitner, A.; Aussenegg, F.; Schaich, W., Optical near-field of multipolar plasmons of rod-shaped gold nanoparticles. *EPL (Europhysics Letters)* **2005**, *69* (4), 538.
153. Dickreuter, S.; Gleixner, J.; Kolloch, A.; Boneberg, J.; Scheer, E.; Leiderer, P., Mapping of plasmonic resonances in nanotriangles. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2013**, *4* (1), 588-602.
154. Galarreta, B. C.; Norton, P. R.; Lagugné-Labarthet, F., Hexagonal Array of Gold Nanotriangles: Modeling the Electric Field Distribution. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (47), 19952-19957.

155. Deckman, H.; Dunsmuir, J., Natural lithography. *Appl. Phys. Lett.* **1982**, *41* (4), 377-379.
156. Fischer, U. C.; Zingsheim, H., Submicroscopic pattern replication with visible light. *J. Vac. Sci. Technol.* **1981**, *19* (4), 881-885.
157. Live, L. S.; Masson, J.-F., High sensitivity of plasmonic microstructures near the transition from short-range to propagating surface plasmon. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (23), 10052-10060.
158. Live, L. S.; Bolduc, O. R.; Masson, J.-F. o., Propagating surface plasmon resonance on microhole arrays. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (9), 3780-3787.
159. Wang, G.; Park, H.-Y.; Lipert, R. J.; Porter, M. D., Mixed monolayers on gold nanoparticle labels for multiplexed surface-enhanced Raman scattering based immunoassays. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (23), 9643-9650.
160. Ni, J.; Lipert, R. J.; Dawson, G. B.; Porter, M. D., Immunoassay readout method using extrinsic Raman labels adsorbed on immunogold colloids. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (21), 4903-4908.
161. Sönnichsen, C.; Reinhard, B. M.; Liphardt, J.; Alivisatos, A. P., A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (6), 741-745.
162. Reimer, L.; Kohl, H., *Transmission electron microscopy: physics of image formation*. Springer: **2008**; Vol. 36.
163. Roth, J., The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. *Histochem. Cell Biol.* **1996**, *106* (1), 1-8.

164. Haiss, W.; Thanh, N. T.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (11), 4215-4221.
165. Foldy, L. L., The multiple scattering of waves. I. General theory of isotropic scattering by randomly distributed scatterers. *Phys. Rev.* **1945**, *67* (3-4), 107.
166. Kennedy, B.; Spaeth, S.; Dickey, M.; Carron, K., Determination of the distance dependence and experimental effects for modified SERS substrates based on self-assembled monolayers formed using alkanethiols. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (18), 3640-3646.
167. Blanchard, C. R., Atomic force microscopy. *Chem. Educator* **1996**, *1* (5), 1-8.
168. Sönnichsen, C.; Franzl, T.; Wilk, T.; von Plessen, G.; Feldmann, J.; Wilson, O.; Mulvaney, P., Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88* (7), 077402.
169. Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics* **2007**, *2* (3), 107-118.
170. McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P., Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nano Lett.* **2003**, *3* (8), 1057-1062.
171. Raschke, G.; Kowarik, S.; Franzl, T.; Sönnichsen, C.; Klar, T.; Feldmann, J.; Nichtl, A.; Kürzinger, K., Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering. *Nano Lett.* **2003**, *3* (7), 935-938.
172. Yeo, B.-S.; Schmid, T.; Zhang, W.; Zenobi, R., Towards rapid nanoscale chemical analysis using tip-enhanced Raman spectroscopy with Ag-coated dielectric tips. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387* (8), 2655-2662.

173. Bailo, E.; Deckert, V., Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Single RNA Strands: Towards a Novel Direct-Sequencing Method. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (9), 1658-1661.
174. Hecht, B.; Sick, B.; Wild, U. P.; Deckert, V.; Zenobi, R.; Martin, O. J.; Pohl, D. W., Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112* (18), 7761-7774.
175. Novotny, L.; Bian, R. X.; Xie, X. S., Theory of nanometric optical tweezers. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *79* (4), 645.
176. Hao, E.; Bailey, R. C.; Schatz, G. C.; Hupp, J. T.; Li, S., Synthesis and optical properties of “branched” gold nanocrystals. *Nano Lett.* **2004**, *4* (2), 327-330.
177. Grabbe, E. S.; Buck, R. P., Evidence for a conformational change with potential of adsorbed anti-IgG alkaline phosphatase conjugate at the silver electrode interface using SERS. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1991**, *308* (1), 227-237.
178. Sohn, S.; Kim, D., Modification of Langmuir isotherm in solution systems—definition and utilization of concentration dependent factor. *Chemosphere* **2005**, *58* (1), 115-123.
179. Bawn, C., The adsorption of gases and vapors on plane surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54* (1), 72-86.
180. Jain, P. K.; Eustis, S.; El-Sayed, M. A., Plasmon coupling in nanorod assemblies: optical absorption, discrete dipole approximation simulation, and exciton-coupling model. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (37), 18243-18253.
181. Quinten, M.; Kreibig, U., Optical properties of aggregates of small metal particles. *Surf. Sci.* **1986**, *172* (3), 557-577.
182. Su, K.-H.; Wei, Q.-H.; Zhang, X.; Mock, J.; Smith, D. R.; Schultz, S., Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.* **2003**, *3* (8), 1087-1090.

183. Lazarides, A. A.; Schatz, G. C., DNA-linked metal nanosphere materials: structural basis for the optical properties. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (3), 460-467.
184. Markel, V.; Shalaev, V.; Zhang, P.; Huynh, W.; Tay, L.; Haslett, T.; Moskovits, M., Near-field optical spectroscopy of individual surface-plasmon modes in colloid clusters. *Phys. Rev. B* **1999**, *59* (16), 10903.
185. Wustholz, K. L.; Henry, A.-I.; McMahon, J. M.; Freeman, R. G.; Valley, N.; Piotti, M. E.; Natan, M. J.; Schatz, G. C.; Duyne, R. P. V., Structure– Activity Relationships in Gold Nanoparticle Dimers and Trimers for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (31), 10903-10910.
186. McMahon, J. M.; Henry, A.-I.; Wustholz, K. L.; Natan, M. J.; Freeman, R. G.; Van Duyne, R. P.; Schatz, G. C., Gold nanoparticle dimer plasmonics: finite element method calculations of the electromagnetic enhancement to surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394* (7), 1819-1825.
187. Danckwerts, M.; Novotny, L., Optical frequency mixing at coupled gold nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98* (2), 026104.
188. Novotny, L.; Pohl, D.; Hecht, B., Scanning near-field optical probe with ultrasmall spot size. *Opt. Lett.* **1995**, *20* (9), 970-972.
189. Hoffmann, P.; Dutoit, B.; Salathé, R.-P., Comparison of mechanically drawn and protection layer chemically etched optical fiber tips. *Ultramicroscopy* **1995**, *61* (1), 165-170.
190. Zeisel, D.; Nettesheim, S.; Dutoit, B.; Zenobi, R., Pulsed laser-induced desorption and optical imaging on a nanometer scale with scanning near-field microscopy using chemically etched fiber tips. *Appl. Phys. Lett.* **1996**, *68* (18), 2491-2492.
191. Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C., Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56* (9), 930-933.

192. Hoh, J. H.; Schoenenberger, C.-A., Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J. Cell Sci.* **1994**, *107* (5), 1105-1114.
193. Sun, Y.; Pang, J. H., Nanoscale Deformation and Strain Analysis by AFM/DIC Technique. In *Nano-Bio-Electronic, Photonic and MEMS Packaging*, Springer: **2010**; pp 695-718.
194. Wei, N.; You, J.; Friehs, K.; Flaschel, E.; Nattkemper, T. W., In situ dark field microscopy for on-line monitoring of yeast cultures. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29* (3), 373-378.
195. Mock, J.; Barbic, M.; Smith, D.; Schultz, D.; Schultz, S., Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 6755.

7 Annexe

7.1 Techniques de caractérisation physiques basées sur la microscopie

À des fins de caractérisations physiques, plusieurs techniques de microscopie peuvent être employées. Toutes les techniques développées dans cette section, que ce soit la microscopie à force atomique, la microscopie en champ sombre, ou encore la microscopie électronique à balayage, ont des caractéristiques importants à connaître permettant d'avoir une meilleure compréhension des propriétés physiques des substrats analysés, et d'ainsi, mieux les caractériser.

7.1.1 Microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy, AFM*)

Il est essentiel de s'attarder sur la technique de microscopie à force atomique, puisque celle-ci constitue la technique que l'on désire coupler avec la spectroscopie SPR. Les principes physiques de ce type de microscopie seront traités ici de façon à mieux comprendre les mécanismes de balayage de sonde à la surface d'un substrat.

Les microscopes à sonde locale (*Scanning Probe Microscopes, SPM*) sont des instruments permettant d'imager et de mesurer les propriétés physico-chimiques de surfaces de l'ordre nanoscopique, en cartographiant le relief à l'aide d'une sonde sous forme de pointe. La technique SPM permet également d'analyser les interactions ayant lieu entre la pointe et l'échantillon. Quelques-uns des types de SPM les plus connus sont la microscopie à effet de tunnel (*Scanning Tunneling Microscopy, STM*), la microscopie électrochimique à balayage (*Scanning ElectroChemical Microscopy, SECM*), et la microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy, AFM*).¹⁶⁷ Cette technique permet de balayer mécaniquement une sonde à la surface d'un échantillon en proche contact (distance de l'ordre de quelques nm). Ce balayage permettra alors de mesurer les paramètres électroniques, physiques (topographie de surface) et

électrochimiques de l'échantillon analysé. De ces informations, une image de la surface pourra être enregistrée. De plus, les instruments SPM peuvent effectuer les mesures de plusieurs façons : en mode contact, la déflexion statique de la sonde lors du balayage de l'échantillon est mesurée, tandis qu'en mode non-contact, ce sont les changements de propriétés dynamiques de la sonde lors de son oscillation qui seront mesurés.

7.1.1.1 Principe de la microscopie à force atomique

Au milieu des années 1980, une nouvelle technique microscopique voit effectivement le jour afin de pallier la technique de microscopie à effet tunnel (STM), technique ne pouvant imager que des surfaces conductrices ou semi-conductrices. Il s'agit de la microscopie à force atomique (AFM) qui est un outil puissant permettant d'imager et de caractériser une grande variété de surfaces à l'échelle atomique. Cette technique fournit une multitude d'avantages par rapport aux autres techniques de microscopies conventionnelles.¹⁶⁷ En plus d'analyser les surfaces non-conductrices, telles que des polymères ou encore des échantillons biologiques, cette nouvelle méthode microscopique élaborée par Binnig, Quate et Gerber¹⁹¹, mesure les forces d'interactions créées entre une pointe et la surface de l'échantillon à l'échelle atomique. Les caractéristiques de surface de divers échantillons, pouvant être nanoscopiques, sont observées tout en conservant une résolution allant jusqu'à l'ordre atomique. De plus contrairement à la STM, la technique AFM ne requiert pas d'environnement sous vide, ou de préparation de l'échantillon, et peut être utilisée dans l'air ambiant ou encore en immersion dans un liquide.¹⁶⁷ Il est cependant important de considérer les caractéristiques instrumentales de l'AFM, telles que la forme de la pointe sur le levier, ou encore la force de contact utilisée, afin d'offrir une meilleure résolution pour cette technique et d'avantager la dépendance de la force exercée par la pointe sur la distance jusqu'au substrat. Il est possible de modifier ces paramètres facilement, ce qui offre à la technique d'AFM une flexibilité dans les mesures, avantage inexistant avec la STM. De plus, l'AFM permet le contrôle indépendant du voltage et de l'espacement entre la pointe et le substrat, contrairement à la technique STM.

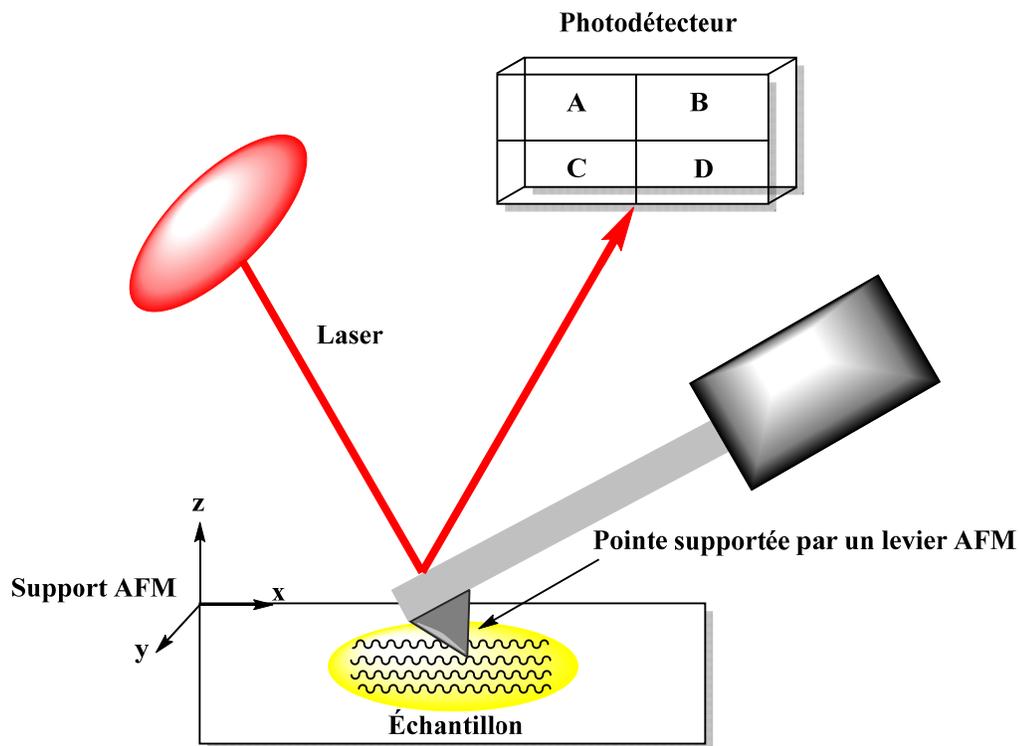


Figure 7.1 Représentation schématique d'un système de balayage AFM

Ce type de microscopie en champ proche utilise un rayon laser incident envoyé sur l'extrémité du levier supportant la pointe. Ce rayon est réfléchi vers un photodétecteur, ce qui permet la détection de la flexion du levier, donnant ainsi les informations relatives à la topographie de l'échantillon, par les mesures de variations d'intensité en fonction du balayage de la surface par la pointe (Figure 7.1). La position verticale (hauteur z) de l'échantillon est modifiée de façon à ce que les forces d'interactions existant entre la pointe du levier d'AFM et la surface de l'échantillon restent constantes tout au long du balayage. Ce système d'ajustement permettra alors une description complète de la topographie et une représentation en trois dimensions x , y et z de la surface analysée. Le système de balayage de l'AFM permet les déplacements du support de l'échantillon suivant les directions x et y avec une résolution de 10 nm, tandis que la résolution suivant la direction z sera de l'ordre de l'angström.

7.1.1.2 Modes d'analyses AFM

Il existe plusieurs modes d'analyse de l'échantillon avec lesquels l'instrument AFM peut opérer. Les trois principaux modes sont les modes *contact*, *tapping* et *mode force*. Un mode en progression est également proposé, il s'agit du *mode force-volume*, mode adapté et utilisé pour l'étude des mécanismes cellulaires, s'adaptant ainsi aux exigences du projet à long terme. Chaque mode possède des avantages mais également des inconvénients pour les mesures de surface, et peut être utilisé dans des conditions ambiantes ou encore dans des environnements liquides.

En mode *contact*, la pointe du levier AFM est en contact direct avec la surface de l'échantillon analysé, et appuie sur celle-ci. Il se crée une force répulsive causée par la répulsion électronique entre la surface de l'échantillon et la pointe. Il est alors possible de maintenir cette faible interaction de façon constante en faisant varier la hauteur de l'échantillon dans l'appareil. Ce mode, également le plus simple d'entre tous, permet un balayage rapide de surfaces (0,1 à 0,5 sec / ligne scannée), tout en conservant un bon rapport signal sur bruit. Cependant, le mode *contact* peut causer des éraflures à la surface de l'échantillon ou encore à la pointe du levier AFM lors du balayage. Ceci peut mener à la formation d'artefacts donnant des images et mesures non représentatives de l'échantillon analysé. La pointe peut également endommager l'échantillon en enlevant des petits morceaux et ainsi être contaminée. Ce mode s'applique essentiellement pour des surfaces solides et bien fixées.

En mode *tapping*, le levier est maintenu en oscillation à une fréquence et amplitude fixes. La pointe du levier tapote ainsi la surface en oscillant de bas en haut très rapidement durant un court laps de temps. En dépit de sa lenteur de balayage (0,5 à 2 sec / ligne scannée), le mode *tapping* permet de réduire les éraflures, et d'éviter les artefacts causés par le mode *contact*, permettant par la même occasion l'observation et la mesure de surfaces biologiques molles.

Le mode *force* permet, comme son nom l'indique, d'effectuer la mesure de force entre la pointe et la surface à un point précis de l'échantillon. Ce mode ne permet pas d'imager la surface (topographie), ni d'effectuer le balayage de surface dans une direction latérale comme

les deux modes précédemment étudiés. Le mode *force*, permettant d'acquérir de l'information sur la force d'adhésion entre la pointe du levier et la surface, requiert des surfaces très propres et homogènes, ce qui n'est pas le cas des échantillons biologiques ayant des surfaces très hétérogènes.

Enfin, le mode *force-volume*¹⁹² permet d'effectuer simultanément l'analyse topographique de la surface ainsi que de la force d'adhésion entre la pointe du levier et la surface de l'échantillon. La pointe descend préalablement vers la surface à une distance prédéfinie (rampe de distance), se déplace vers le bas, sans déplacement latéral, jusqu'à ce qu'il y ait contact entre la pointe et la surface, permettant au levier d'atteindre un certain niveau de déflexion. Enfin, le mouvement du levier est inversé. Le mode *force-volume* permet de mesurer ces cycles d'approches et de rétraction du levier par rapport à la surface, tout en balayant au fur et à mesure latéralement, afin de fournir une analyse d'une portion de la surface de l'échantillon. Ce mode d'analyse permet ainsi de combiner les avantages du mode *force* tout en fournissant de l'information topographique de façon simultanée. Malgré le fait que ce mode nécessite énormément de temps pour effectuer l'analyse de surfaces, celles-ci n'ont pas besoin d'être homogènes et très propres, ce qui en fait un mode approprié pour les analyses de surfaces biologiques.

Avec l'utilisation d'une pointe AFM comme sonde en TERS, il devient alors nécessaire d'adapter le mode d'analyse AFM dans le cadre de mesures dans un environnement biologique. C'est le mode *force-volume* qui apparaît comme le choix approprié pour de futures mesures dans le cadre d'analyses impliquant un environnement cellulaire. Ceci permettra alors d'en faire une analyse topographique, ainsi que d'observer les différentes interactions partagées, par la mesure de force d'adhésion entre la pointe du levier et la surface cellulaire.

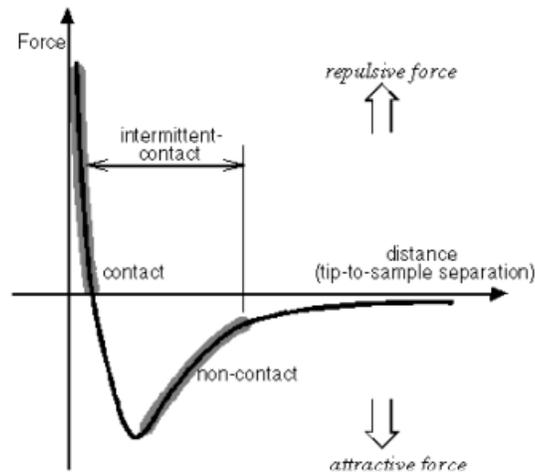


Figure 7.2 Courbe représentant les forces de Van Der Waals en fonction de la distance interatomique et des modes AFM. Reproduit avec la permission de la référence ¹⁹³.

Copyright © 2010, Springer.

Il est possible de corrélérer le comportement interactif entre la pointe et l'échantillon à celui qu'empruntent les atomes entre eux grâce à la courbe de potentiel interatomique (Figure 7.2). À l'extrémité droite de la courbe, les atomes sont séparés par une grande distance. Au fur et à mesure que la distance interatomique diminue, les atomes sont dans un premier temps attirés l'un par l'autre. Cette attraction croît jusqu'à un certain point où les atomes sont tellement rapprochés que leurs électrons exercent une force électrostatique dite répulsive. Celle-ci affaiblit progressivement la force d'attraction initiale dépendamment de la diminution de distance entre les atomes jusqu'à atteindre une valeur de zéro et rendre les forces de Van Der Waals majoritaires et positives.

7.1.1.3 Rôles alternatifs d'une pointe AFM

La pointe située à l'extrémité du levier (longueur de 100 à 200 μm) peut être fabriquée à partir de silicium ou de diamant, être de forme arrondie ou pyramidale, et varier en taille selon le type d'échantillon analysé. Elle possède généralement une longueur de quelques microns et un diamètre de moins de 100 \AA . La pointe du levier AFM peut également servir de prisme en

SPR ou encore d'émetteur Raman. Tel que développé dans le cadre de ce projet, la pointe pourrait jouer le même rôle qu'un prisme dans un système de mesure SPR conventionnel en configuration de Kretschmann. En effet, au même titre qu'un prisme, la pointe AFM pourrait induire un couplage avec le métal le recouvrant, ce qui permettrait à l'onde lumineuse de passer à travers la pointe, et d'être totalement réfléchie à la surface, induisant alors une onde évanescente caractéristique. La pointe permettrait ainsi de soutenir le substrat métallique possédant un plasmon de surface et pouvant être excité par une source lumineuse incidente.

Les principes de la microscopie à force atomique, ainsi que les propriétés relatives à la pointe du levier doivent être maîtrisés dans le cadre de ce mémoire. En effet, les concepts étudiés dans cette section relatent à la façon dont sera intégrée l'AFM au projet de couplage SPR-AFM. En utilisant une pointe AFM comme substrat pour aligner un signal SPR de façon localisée, tel un prisme dans les mesures SPR conventionnelles, il devient important de bien maîtriser les principes fondamentaux de cette microscopie que l'on veut coupler à la spectroscopie SPR. De plus, les caractéristiques physiques de surface des pointes de leviers AFM ont dû être étudiées de façon approfondie, puisqu'elles ont servi de substrats pour la formation de biocapteurs servant à détecter du matériel protéique.

7.1.2 Microscopie en champ sombre

La microscopie en champ sombre est une technique capable de donner des informations tant au niveau microscopique, en permettant de visualiser l'agrégation de nanoparticules à la surface d'un substrat, qu'au niveau de la réponse plasmonique en donnant des informations sur le maximum d'absorption de cette population nano-particulaire. C'est pourquoi cette technique a été employée pour ce projet afin de mieux localiser l'agrégation de nanoparticules métalliques, et donc l'effet de résonance plasmonique à la surface de leviers AFM, et de rendre compte d'une possible détection par celles-ci.

En bloquant la lumière transmise provenant de la source, il est possible de dévier cette lumière grâce à l'échantillon ce qui crée alors une dispersion du faisceau à travers l'échantillon

analysé : seule cette lumière diffusée sera observée. On crée alors un contraste entre l'échantillon et le champ environnant. L'échantillon va alors apparaître clair sur un fond sombre. On appelle ce type de microscopie : microscopie en champ sombre, ou encore microscopie *dark-field* (DFM). Cette technique permet à des analytes transparents et non colorés de pouvoir être observables par microscopie. Grâce à un condenseur, les rayons lumineux frapperont l'échantillon sous différents angles, et ce sera cette lumière diffusée par l'échantillon qui sera collectée pour former l'image observée.

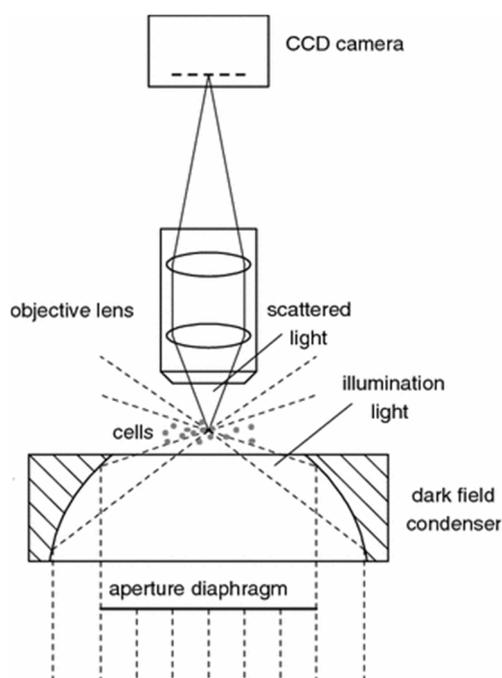


Figure 7.3 Représentation schématique du principe d'un microscope en champ sombre.

Reproduit avec la permission de la référence ¹⁹⁴. Copyright © 2006, Springer.

La résonance du plasmon des nanoparticules métallique varie en fonction de leur taille ainsi que de leur forme. Ainsi lorsque les nanoparticules sont observées en optique en champ proche, et que les régions au voisinage de ces structures plasmoniques sont sondées, il existe une réponse spectrale différente et distincte pour chaque morphologie de nanoparticules.¹⁹⁵

Le diamètre des nanoparticules métalliques observées doit être choisi afin d'assurer une bonne intensité de la diffusion de la lumière tout en minimisant les effets des nanoparticules sur

les molécules situées à proximité.¹⁶¹ Grâce à l'utilisation de la microscopie optique en champ sombre, il est alors possible de démontrer la réponse de la résonance de plasmon de surface localisé λ_{max} de nanoparticules individuelles.