



Biopuces sans marquage : structuration pour la haute sensibilité pour l'imagerie dans l'ultraviolet

Kristelle Robin-Bougot

► To cite this version:

Kristelle Robin-Bougot. Biopuces sans marquage : structuration pour la haute sensibilité pour l'imagerie dans l'ultraviolet. Optique [physics.optics]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT : . pastel-00718042

HAL Id: pastel-00718042

<https://pastel.hal.science/pastel-00718042>

Submitted on 16 Jul 2012

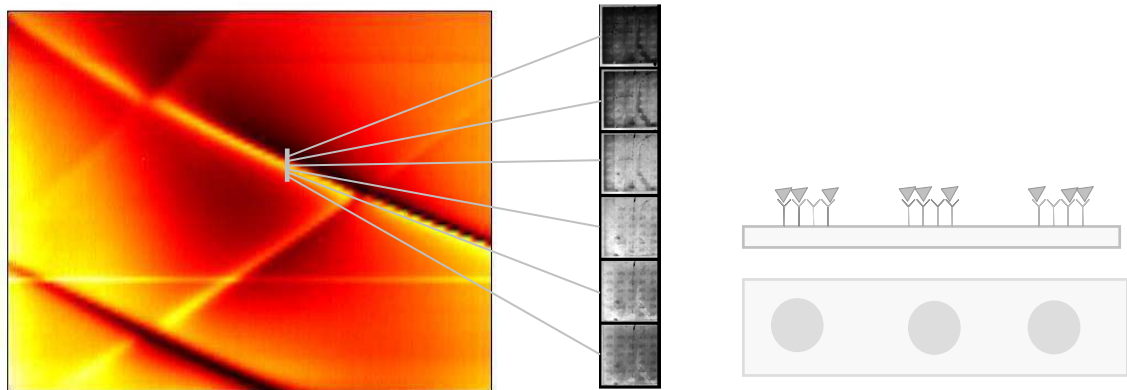
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS SUD XI
Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique
THALES RESEARCH AND TECHNOLOGY

Ecole doctorale Ondes et Matière
Thèse présentée pour l'obtention du grade de :
DOCTEUR ES SCIENCES
par
Kristelle ROBIN-BOUGOT

BIOPUCES SANS MARQUAGE
STRUCTURATION POUR LA HAUTE SENSIBILITE
POUR L'IMAGERIE DANS L'ULTRAVIOLET



Soutenue le 14 décembre 2009, devant la commission d'examen :

Henri BENISTY (IOGS, Palaiseau)

Jean-Luc REVERCHON (Thales Research and Technology, Palaiseau)

Rabah BOUKHERROUB (IRI, Lille)

Olivier PARRIAUX (Université Jean Monnet, Saint-Etienne)

Ulrich BOCKELMANN (ESPCI, Paris)

Hafsa KORRI-YOUSSOUFI (Université Paris XI, Orsay)

Pierre PLATEAU (Ecole Polytechnique, Palaiseau)

Directeur de thèse

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président

Invité

Résumé

L'utilisation de bio-puces est basée sur la détection d'interactions biologiques ayant lieu entre des espèces immobilisées à la surface d'une puce, appelées sondes, et des espèces à détecter, appelées cibles. Ces dispositifs ouvrent de nombreuses applications biologiques, par exemple dans le domaine médical. On développe ici une méthode optique, avec imagerie bidimensionnelle et détection multiplexe, basée de façon originale sur l'absorption dans l'ultraviolet des molécules biologiques. Elle fait ainsi partie des techniques sans marquage toujours attrayantes. L'ADN et les protéines présentent en effet une forte absorption aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm respectivement, que l'on exploite en imagerie. Dans ce cadre, les nouveaux composants à base d'AlGaIn, employés en émission comme en détection, sont particulièrement adaptés car ils permettent de sélectionner précisément la bande spectrale d'intérêt.

La sensibilité des méthodes de détection est un critère déterminant. Pour l'améliorer, on étudie ici des configurations qui amplifient l'interaction entre l'éclairage incident et l'élément biologique. On s'attache d'abord à des structures multicouches d'épaisseur "quart d'onde" qui permettent de placer un ventre du champ électrique au niveau de l'élément biologique. Ensuite, pour une meilleure sensibilité, on s'attache à utiliser des propriétés des "réseaux résonants", qui concentrent bien davantage le champ électrique au niveau des éléments biologiques.

La protéine modèle utilisée dans de ce manuscrit est la méthionyl-ARNt synthétase. Elle est représentative et garantit l'applicabilité à n'importe quelle autre molécule biologique. Les étapes de définition des structures, de fabrication, de caractérisation, de dépôt biologique et enfin l'étape finale d'imagerie des biopuces sont décrites. L'imagerie de biopuces optiquement résonantes sur réseau est peu développée, même dans le domaine visible, mais on vérifie qu'elle atteint cependant de bonnes sensibilités. La résolution instrumentale ainsi que la finesse et l'étendue spatiale du mode sont aussi discutées. Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit, il est suggéré d'intégrer le signal sur toute la résonance en pré-dispersant l'éclairage, pour ainsi bénéficier de tous les photons utiles de la source et maximiser la sensibilité.

Mots clés : Biodétection – Imagerie – Absorption- Réseaux- Résolution- Sensibilité- Achromatisation- méthionyl-ARNt synthetase

Label-free biochips

Highly sensitive structures for ultraviolet imaging

Abstract

Biosensors enables to detect biological interactions, between probes localized at the surface of a chip, and targets of a solution. Biological applications of biosensing are wide. They can be used for instance for medical applications. Here, we present an optical transduction, enabling 2D imaging, and consequently parallel detection of several reactions. It is based on the absorption of biological molecules. Thus, it is based on an intrinsic property of biological molecules and does not require any labelling of the biological molecules. DNA and proteins absorb UV light at 260 and 280 nm respectively. The property is used here for biochip imaging. In this framework, recently developed AlGaN components can be used, either as sources or detectors. Their emission/responsivity spectrum enables to select the spectral band of interest.

Sensitivity is a major requirement of biosensing devices. Configurations leading to enhancement of the interaction between light and biological molecules are of interest. The first structures are multilayer structures. Choosing a quarter-wave thinckness transparent dielectric layer above a mirror enables to locate the biological molecules at the antinode of the electric field and to increase the interaction between the stationary wave and the biological layer. For a better sensitivity, resonant grating structures are then studied. They enable to confine the electric field close from the biological layer.

The protein used in this study is the methionyl-tRNA synthetase. Its absorption is representative of protein absorption, and it can then serve as a model for biological macromolecules detection. The successive steps of chip modelling, fabrication, characterization, biological preparation and then imaging of the chips are described. Imaging of resonant grating is not largely studied, even for visible wavelengths, but it results in good sensitivity. Instrumental resolution and spatial extent of the mode are discussed. In order to increase signal to noise ration, a pre-dispersed illumination is proposed. It enables to take benefit of all the useful photons of the source by illuminating the chip in (λ, θ) resonant condition for each wavelength.

Keywords:

Biodection – Imaging- Absorption- Resonant gratings – Resolution- Sensitivity- methionyl-tRNA-synthetase.

Abréviations

ADN Acide désoxyribo nucléique
ARN Acide ribonucléique
AFM Microscopie à force atomique
MEB Microscopie électronique à balayage
DEL Diode électro-luminescente
B champ magnétique
E champ électrique
P polarisation
I intensité
R signal réfléchi
m ordre de diffraction
R_m Efficacité de diffraction dans la direction θ_m de l'ordre **m**
N indice optique
n partie réelle de l'indice
 κ partie imaginaire de l'indice optique
C contraste
 Γ amplification du contraste
 α coefficient d'absorption
 ℓ épaisseur de la couche absorbante
G vecteur d'onde du réseau réciproque
 Λ période du réseau
e épaisseur des couches
f facteur de remplissage
h profondeur de gravure
 λ longueur d'onde
 $\Delta\lambda$ largeur spectrale à mi-hauteur de la résonance
 θ angle d'incidence
 $\Delta\theta$ largeur angulaire à mi-hauteur de la résonance
 ω pulsation
 k_0 vecteur d'onde dans le vide
 $k_{//}$ composante tangentielle du vecteur d'onde
 n_{eff} indice effectif du mode guidé
 β constante de propagation du mode guidé
 v_g vitesse de groupe
F finesse spectrale

Remerciements

Ces trois années de thèse ont été d'une très grande richesse, à la fois sur le plan humain et sur le plan scientifique. Le travail présenté dans ce manuscrit est le fruit d'un ensemble d'étapes permises par l'intervention de différents acteurs que je tiens ici à remercier.

Un grand merci tout d'abord à Jean-Luc et Henri, qui ont encadré ce travail. Ils ont toujours répondu présents lorsque j'avais des questions, et ont su me laisser avancer lorsque j'avais besoin de prendre du recul. Leur enthousiasme communicatif et leur recul dans le domaine de la recherche et du développement ont participé à mes motivations. Ils m'ont permis une meilleure appréhension sur un sujet ayant de nombreux paramètres nouveaux pour l'ensemble des personnes impliquées. D'approches complémentaires, ils m'ont formée à différents domaines allant de la fabrication, la détection, l'imagerie, l'électromagnétisme notamment par ses aspects d'absorption et de structures optiquement résonantes... A travers eux, j'ai aussi pu apprendre de leurs expériences et différents environnements de travail, à la fois à Thales et à l'institut d'optique.

La richesse de ces années a aussi été permise par des interactions au sein des équipes à la fois à Thales avec notamment Alfredo, Sylvain, Pierre, Gilles, Gaelle, ainsi qu'à l'Institut d'optique avec Cyrille, Omer et Bunta. Je remercie aussi Simone, Arnaud, Jean-Pierre, Guy, François-Xavier et Jean-Paul pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et les discussions intéressantes que j'ai pu entretenir avec eux.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ma formation en salle blanche, et à la fabrication des puces. Ce travail n'aurait été possible sans Maryline, Didier, Martine, Yannick, Bunta, Odile, Shailendra et Stéphane. Je remercie aussi toutes ces personnes pour avoir permis la réalisation de ce travail dans un cadre agréable.

Je remercie aussi Laurent, Michel et Pierre de laboratoire de biochimie, pour avoir su interagir avec moi sur des questions spécifiques de la biologie et de la biochimie. La différence d'approche et de culture que nous avons eue a été pour moi une expérience très formatrice. Leur intérêt et conviction dans ce travail a permis de valider l'application de l'imagerie dans

l'ultraviolet à la détection d'éléments biologiques, et a donc donné une autre dimension à ce travail.

Je remercie Olivier Parriaux et Rabah Boukerroub d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi qu'Hafsa-Korri Youssoufi, Ulrich Bockelman, et Pierre Plateau pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie aussi Claude Weisbush pour ses conseils et pour la confiance qu'il m'a accordée pour la suite de mon parcours professionnel.

Enfin, un grand merci à mes amis, ma famille, et bien sûr Nicolas, pour leur compréhension, leur soutien et pour avoir toujours répondu présent tout au long de ces trois ans. Merci aussi à eux pour les moments extraordinaires que nous partageons au jour le jour.

Table des matières

Introduction	13
Chapitre I : Etat de l'art en biodétection optique et composants dans l'ultraviolet.....	19
I – Biopuce	19
I-1. Définition.....	19
I-2. Propriétés.....	21
I-3. Interactions biologiques	23
I-3. a) Structure de l'ADN	23
I-3. b) Structure des protéines	25
I-3. c) Interactions	27
I-4. Modèle biologique considéré dans ce travail	27
I-5. Méthodes de détection	29
II - Biodétection optique	29
II-1. Critères de comparaison	29
II-2. Détection avec marquage	30
II-2. a) Tests Elisa	30
II-2. b) Fluorescence	31
II-2. c) Marqueurs absorbants	32
II-3. Méthodes optiques sans marquage	32
II-3. a) Méthodes optiques réflectométriques directes	33
II-3. b) Méthodes optiques à ondes évanescentes	33
III - Détection en absorption dans l'ultraviolet	43
III-1. Généralités	43
III-2. Absorption UV de l'ADN et des protéines	44
III-2. a) Absorption de l'ADN à 260 nm	44
III-2. b) Absorption des protéines à 280 nm	47
III-2. c) Absorptions surfaciques	49
III-2. d) Sensibilité	50
IV – Détection UV	51
IV-1. Détecteurs	52
IV-2. Filtres	54
IV-3. Différents types de sources.....	55
IV-3. a) Les lampes	55
IV-3. b) Diodes électroluminescentes (DEL)	56
IV-3. c) Lasers	56
IV-3. d) Comparaison de la puissance des différentes sources	57
IV-4. Sensibilité limite	58
V – Discussion	59

Chapitre II : Théorie des renforcements de contrastes..... 65

I - Contraste sur structures multicouches	65
I-1. Définition du contraste	65
I-2. Absorption.....	67
I-2. a) Approche dipolaire	67
I-2. b) Absorption en transmission	68
I-2. c) Absorption imagée en réflexion	69
I-2. d) Exaltation du contraste d'absorption	71
I-3) Absorption /Partie réelle de l'indice optique	78
II - Structures résonantes	80
II-1. Réseau résonant	81
II-1. a) Guide d'onde asymétrique	81
II-1. b) Réseau de couplage	83
II-1. c) Condition de résonance	83
II-2. Propriétés des réseaux résonants	84
II -2. a) Modes de Bloch	85
II-2. b) Matrices de diffusion	86
III - Contraste sur structures résonantes	89
III-1. Structures définies	89
III-1. a) Caractéristiques requises	89
III-1. b) Influence des différents paramètres du réseau	89
III-1. c) Propriétés	92
III-2. Contraste d'absorption en réflectivité	96
III-2. a) Spectre de réflectivité	96
III-2. b) Modes guidés	98
III – 3. Effet partie réelle/absorption de l'élément biologique	102
IV - Finesse de la résonance	105
IV-1. Position du problème	105
IV-2. Limites dues aux résolutions expérimentales	105
IV-3 Finesse et résolution instrumentale	106
IV-4. Finesse et résolution spatiale	109
V – Conclusion	110

Chapitre III : Résultats expérimentaux..... 115

I - Préparation de la puce	116
I-1. Etapes de fabrication	116
I-2. Caractérisation par ellipsométrie	116
I-2. a) Ellipsométrie	116
I-2. b) Mesures	117
I-2. c) Modèle de Lorentz	120
I-2. d) Loi de dispersion des matériaux de la puce	120
I-2. e) Structures fabriquées	120
I-3. Biopuce structurée	121
I-3. a) Réseau de diffraction	121
I-3. b) Structure réseau	122
II - Préparation biologique	124
II-1. Absorption de la protéine	124

II-2. Greffage de la protéine	124
II-2. a) Préparation de la surface	124
II-2. b) Silanisation	126
II-2. c) Immobilisation de la protéine	128
II-3. Caractérisation en ellipsométrie et loi de dispersion de la protéine	129
II-4. Caractérisation AFM des spots biologiques	130
II-4. a) Epaisseur et homogénéité des spots	130
II-4. b) Spots de protéines sur réseau	131
III - Imagerie sur puce quart d'onde	132
III-1. Rappels des résultats sur puce silice/aluminium	134
III-1. a) Calibration avec spots de dioxyde de titane	134
III-1. b) Premières expériences biologiques	134
III-2. Puce silice sur silicium	135
III-2. a) Montage optique	135
III-2. b) Détermination des contrastes attendus	135
III-2. c) Analyse des images	135
III-3. Résultats expérimentaux	138
IV - Imagerie sur puce guide d'onde	139
IV-1. Puce utilisée	139
IV-2. Analyse spectroscopique	141
IV-2. a) Montage goniométrique	141
IV-2. b) Mesures spectroscopiques	141
IV-2. c) Modification des conditions de résonance	142
IV-2. d) Imagerie en conditions résonantes	143
IV-2. e) Imagerie dans l'ordre 0	145
IV-2. f) Imagerie dans l'ordre-1	149
V- Conclusion	150

Chapitre IV: Intégration sur la résonance..... 153

I – Achromatisation	154
I-1. Intégration	154
I-2. Condition de résonance	155
I-3. Relation de dispersion	155
I-3. a) Caractéristiques spectrales	155
I-3. b) Pré-dispersion de l'éclairage à obtenir	156
II - Compensation de dispersion	157
II-1. Eléments dispersifs	157
II-1. a) Prisme	157
II-1. b) Réseau	159
II-1. c) Association d'éléments dispersifs	160
II-2. Couplage au mode guidé avec un réseau pré-disperseur	161
II-2. a) Réseau coupleur	161
II-2. b) Configuration avec réseau sur mesure	161
II-2. c) Réseau commercial utilisé au 3eme ordre	162
III - Gain en rapport signal sur bruit	165
III-1. Gain en signal	165
III-2. Gain en sensibilité	166
III-2. a) Dispositif considéré	166
III-2. b) Gain en rapport signal sur bruit	167

III-3. Application à l'imagerie	169
III-3. a) Biopuce de finesse $F \sim 200$	169
III-3. b) Images obtenues pour différentes fineses	170
IV – Conclusion	172
Conclusion.....	177
Annexe A : Dispositif de détection.....	183
Eclairage	183
Optique d'imagerie	184
Résolution	185
Détecteur	185
Bruit du dispositif	187
Limite de sensibilité	189
Annexe B : Detection of biologic macromolecules on a chip dedicated to UV specific absorption.....	191
Annexe C : Fabrication des réseaux résonants.....	199
Annexe D : Expériences préliminaires de fluidique.....	205

Introduction

Ce travail se situe à l'intersection des domaines de la biologie et de la nanophotonique. Il a impliqué Thales Research and Technology (TRT), l'Institut d'Optique Graduate School (IOGS) et le laboratoire de Biochimie de Polytechnique (BIOC). Pour mieux le décrire, nous rappelons brièvement les motivations des biologistes autour des biopuces et des protéines, puis le contexte spécifique autour de la détection UV par la technologie AlGaIn (TRT) mais aussi autour de l'exaltation des interactions dans les nanostructures (IOGS).

La détection d'interactions biologiques est un besoin essentiel dans de nombreux domaines. Il peut par exemple s'agir du diagnostic médical, de la recherche de nouveaux médicaments, des contrôles environnementaux, du suivi de la pollution ou bien encore de la détection d'attaques bactériologiques dans le domaine de la défense.

La biodétection est loin d'être un domaine nouveau, et est utilisée depuis longtemps en laboratoire, et même dans le grand public pour des tests simples à base d'interaction anticorps-antigène ciblées (test de grossesse par exemple). Le besoin de tests plus complexes, dits aussi "multiplexes", existe dans tous les domaines cités : médical, environnemental, etc. Les nanotechnologies et la miniaturisation ont permis de voir se développer de nouvelles méthodes qualifiées de "laboratoire sur puce" ou "lab-on-chip". En effet, la miniaturisation permet de développer des systèmes plus compacts, moins chers, plus sensibles, plus rapides, nécessitant ainsi moins de consommables. Ceci permet de réaliser des systèmes de détection portables sensibles et élargi de ce fait les applications.

Les technologies appliquées à la biodétection sont nombreuses, et certaines ont déjà vu le jour aujourd'hui sur le marché. Les méthodes de détection ne nécessitant pas de marquage et permettant une détection multiplexe sont particulièrement intéressantes. Elles permettent d'observer plusieurs réactions simultanément avec un unique appareil de mesure. Les méthodes d'imagerie 2D, qui permettent naturellement l'observation de plusieurs interactions en même temps sur différents points de l'image sont donc particulièrement intéressantes. Dans certaines méthodes, un marquage (fluorescent, radioactif) des molécules biologiques à détecter est nécessaire. Ceci rend difficile l'observation des interactions en temps réel, non pas tant à cause de l'étape de marquage, qui peut encore être intégrée au processus, mais à cause de la grande sensibilité des réactivités très spécifiques des protéines vis à vis des modifications moléculaires comme le marquage. Ainsi, les méthodes de détection sans

marquage sont particulièrement intéressantes. Par exemple, la microscopie ou imagerie par plasmons de surface constitue une méthode de référence pour le suivi en parallèle d'interaction protéines-protéines en temps réel. Elle est basée sur les propriétés d'interaction entre une onde évanescente plasmonique à la surface d'un dépôt métallique et les molécules biologiques à la surface de la puce. Cependant, pour le couplage plasmon, une surface métallique est parfois le siège d'interactions non spécifiques. De plus, le couplage de l'onde avec le plasmon, le plus souvent réalisé avec un prisme, amène des difficultés de mise en oeuvre notamment au niveau de l'encombrement ou de la faisabilité d'un consommable bas-coût. Ainsi, la biodétection basée sur l'imagerie de guides d'onde résonants peut offrir des perspectives intéressantes. La géométrie de la structure permet le choix de certaines propriétés, telles que les angles de couplage, ou bien encore le recouvrement de l'onde électromagnétique à la surface de la puce. On peut ainsi sonder des éléments de taille plus ou moins importante. Il s'agit d'un nouveau paramètre de liberté par rapport aux résonances plasmoniques. L'utilisation des guides d'ondes résonants en biologie a été jusqu'ici développée pour réaliser des mesures spectrales. Nous montrerons que l'imagerie de telles structures semble prometteuse tout en se distinguant de certaines caractéristiques plutôt plus figées des plasmons.

Par ailleurs, les récentes avancées dans les technologies de l'ultraviolet (composants à base de nitrure de gallium), et notamment à Thales Research and Technology permettent d'explorer l'imagerie de biopuces dans ce domaine de longueur d'onde. Ceci est particulièrement intéressant, puisque les sensibilités des méthodes d'optique linéaire sont inversement proportionnelles à la longueur d'onde. Dans le domaine de l'ultraviolet, il est aussi possible d'exploiter l'absorption des éléments biologiques. En effet, les brins d'ADN comme les protéines présentent des bandes d'absorption, respectivement à 260 nm et 280 nm. Il est possible d'utiliser des détecteurs AlGa_N centrés à ces longueurs d'onde, et de largeur spectrale du même ordre de grandeur que la largeur du spectre biologique, c'est-à-dire de l'ordre de 20 nm. L'absorption de l'ADN et des protéines est classiquement utilisée pour mesurer leur concentration en solution. Un avantage majeur de cette propriété est que le coefficient d'absorption d'une molécule donnée peut être calculé à partir de sa séquence en nucléotides ou acides aminés respectivement, ce qui permet une quantification. Dans le cadre de l'imagerie sur biopuce, l'absorption sera, là aussi, responsable d'une diminution de signal. Un avantage de l'absorption est sa moindre dépendance à la température en comparaison à la partie réelle de l'indice optique (l'absorption résulte des transitions entre les différentes

orbitales moléculaires proches alors que la variation d'indice dépend des choix stériques adoptés par la protéine, très liés à l'environnement, l'hydratation, etc.). Nous verrons en revanche que lors du rajout par hybridation d'une couche biologique, la variation de réflectivité est une combinaison des deux effets d'absorption et du déphasage induit par la partie réelle de l'indice optique. Cependant, même pour de très faibles absorptions, un effet de diminution non négligeable du signal est observé, et peut venir renforcer une variation de signal due à la composante réelle de l'indice optique.

Enfin, les connaissances de l'interaction lumière-matière montrent régulièrement depuis quelques décennies que la structuration de l'environnement optique, par des résonances, des renforcements des champs locaux, etc. apporte un fort potentiel dans le domaine des "senseurs" et des biosenseurs en particulier.

Notre but est donc de combiner les possibilités ouvertes en UV par la technologie AlGaIn à Thales, à la fois aux spécificités des biomolécules (absorption) et au potentiel des exaltations par les nanostructures, en les concrétisant dans des biopuces innovantes.

Plus spécifiquement, de manière à être fortement sensibles à des variations d'absorption ou d'indice optique à la surface d'une puce, des biopuces seront modélisées afin de renforcer les interactions entre le champ électromagnétique et l'élément biologique à la surface de la puce. Les premières structures sont de simples structures multicouches. Nous verrons qu'elles permettent d'ores et déjà l'observation d'une monocouche de protéines de forte densité. Ensuite, la mise en œuvre de structure de type réseaux résonants, où le renforcement du champ local en surface est une propriété déjà exploitée dans d'autres domaines de longueurs d'onde, permettra d'atteindre de meilleures sensibilités.

Mon travail a d'abord consisté à modéliser ces structures. J'ai ensuite pu mettre en œuvre leur fabrication et leur caractérisation grâce aux moyens technologiques de salle blanche. La bonne compréhension des contrastes attendus par caractérisation spectroscopique et le retour d'expérience sur la modélisation nous a permis d'interpréter les contrastes obtenus en imagerie UV, et de déterminer ainsi les performances de notre système de biodétection.

Les amplifications de contraste et les résolutions instrumentales seront prises en compte pour déterminer les seuils de détection et la sensibilité de notre dispositif. L'analyse sera poussée en suivant les pratiques reconnues dans le domaine des biopuces. Nous serons ainsi amené à en traiter en terme de flux, de nombre de pixels, de finesse du mode et résolution instrumentale, d'étendue spatiale du mode, de façon à améliorer le rapport signal-sur-bruit

dans le cadre des détecteurs AlGaIn qui possèdent typiquement 10 nm de bande passante vers 280 nm.

Nous nous intéresserons enfin à une façon innovante d'améliorer le rapport signal-sur-bruit par une illumination pré-dispersée pour "coller" aux conditions d'imagerie résonantes en présence d'une source large comme une DEL UV. Cette proposition, survenue au cœur de mes travaux de thèse, a fait l'objet d'une demande de brevet entre Thales (J.L Reverchon et moi-même) et l'IOGS (H. Benisty).

Avant de présenter le plan, nous faisons remarquer que les résultats qui seront présentés dans ce manuscrit, bien qu'ils concernent le domaine ultraviolet, peuvent être étendus et transposés à d'autres domaines, ce qui peut ouvrir des perspectives intéressantes sur l'imagerie de biopuces diélectriques résonantes. Enfin, la mise en œuvre des protéines n'aurait pu avoir lieu sans la large implication du laboratoire BIOC, qui nous a fait profiter d'un ensemble de savoir-faire pour la formation des puces et des dépôts et interactions de protéines, sans lesquelles nous n'aurions guère pu crédibiliser les aspects biologiques de nos dispositifs.

L'organisation du manuscrit prend donc la forme suivante :

Dans le chapitre 1, nous présentons l'état de l'art des technologies de bio-détection optiques ainsi que des composants ultraviolet. Ceci nous permet de mettre en évidence le côté innovant de notre technique, à la fois par sa mise en œuvre dans le domaine de l'ultraviolet et par l'application des réseaux résonants à l'imagerie de biopuces permettant un multiplexage de la détection.

Dans le chapitre 2, nous présentons la théorie optique des renforcements de contraste en s'appuyant sur un formalisme de matrice de diffusion. Nous discutons alors les effets d'indice et d'absorption sur le contraste. Ceci permet de définir une puce permettant de fortes interactions entre le champ électrique et l'élément absorbant.

Dans le chapitre 3, nous mettons en œuvre la théorie du chapitre 2 en présentant la fabrication et la caractérisation de biopuces renforçant le contraste. Ces biopuces sont ensuite hybridées par une couche de protéines et imagées dans l'ultraviolet. Ceci nous permet de comparer les contrastes obtenus en imagerie UV à la théorie.

Dans le chapitre 4, enfin, nous décrivons l'innovation que nous proposons et qui adapte une illumination "prédispersée" (déjà présente dans la littérature) pour la mettre en œuvre dans le cadre de l'imagerie de biopuce résonantes.

Pour clore cette introduction, le travail présenté ici se veut être une mise en évidence, sous plusieurs angles, du potentiel de l'imagerie de biopuces diélectriques optiquement résonantes. Nous y montrons comment nous avons concrétisé autant que possible ce potentiel dans le domaine ultraviolet, où l'on bénéficie à la fois de l'absorption des molécules biologiques, et de la faible longueur d'onde favorable pour la sensibilité de la détection. On explicitera bien sûr davantage dans la conclusion les perspectives ouvertes dans ce domaine exploratoire mais prometteur.

Chapitre I

Etat de l'art en biodétection optique et composants dans l'ultraviolet

I – Biopuce

I-1. Définition

Une biopuce est un dispositif destiné à caractériser des interactions biochimiques ayant lieu entre deux espèces, l'une étant immobilisée à la surface de la puce, et l'autre en solution, ("l'analyte") étant mise en contact dans un second temps. L'immobilisation est réalisée de telle sorte que le site de "reconnaissance" spécifique des molécules d'intérêts introduites dans la solution soit stériquement accessible pour les analytes. La détection est basée sur la mesure du résultat des réactions, biochimiquement spécifiques, qui ont lieu à la surface de la puce. Cette reconnaissance biochimique est transformée en un signal mesurable macroscopiquement par l'utilisation d'un transducteur, qui permet de déterminer le taux de reconnaissance et de quantifier les éléments biologiques d'intérêt dans la solution. L'usage de plusieurs espèces en parallèle à la surface de la puce permet de réaliser une détection multiplexe particulièrement intéressante. Les espèces sont ainsi immobilisées sous forme de

plots ou « spots » de taille typique 10-150 μm de diamètre. La Figure 1.1 donne en coupe le schéma d'une biopuce générique.

Différents protocoles existent pour immobiliser les espèces à la surface de la puce, aboutissant à un attachement physico-chimique ou chimique covalent. Les interactions pouvant être étudiées sont diverses. On distingue les puces à ADN et les puces à protéines.

Dans le cas des biopuces à ADN, la molécule greffée à la surface de la puce est le brin d'ADN complémentaire au brin que l'on cherche à détecter. Les puces à ADN permettent, par exemple d'analyser le niveau d'expression des différents gènes d'une cellule, de détecter des mutations génétiques, de déceler la présence de pathogènes dans l'environnement et dans les aliments...

Par comparaison avec l'expression génétique, le comportement des protéines est plus complexe. En contrepartie, les puces à protéines permettent une compréhension fondamentale de l'origine d'une maladie ou de l'action d'un médicament par exemple. Les puces à protéines peuvent être appliquées pour différents types de couples ligand/récepteur. On peut ainsi analyser les interactions antigène/anticorps, enzyme/substrat, protéine/ADN, protéine/ARN... La molécule greffée sur la puce sera alors l'un des deux partenaires du couple ligand/récepteur. Par exemple, pour identifier un antigène donné dans une solution, on greffe à la surface de la puce un anticorps spécifique de cet antigène. Pour la détection de virus ou de bactéries entières, on greffe à la surface de la puce des anticorps dirigés contre des protéines qui se trouvent sur leur paroi. Le Tableau 1.1 donne la taille typique des éléments à détecter.

Macromolécules (ADN, protéines)	Virus	Bactérie
1-10 nm	20-250 nm	200 nm – 5 μm

Tableau 1.1: Tailles caractéristiques des éléments biologiques

Par interaction moléculaire, si les antigènes sont présents dans la solution, ils viennent s'associer de manière spécifique à leur partenaire immobilisé à la surface de la puce. La

reconnaissance qui aura lieu en certains sites de la puce permettra a priori d'identifier les molécules détectées.

Les applications des biocapteurs sont très vastes : domaine médical, synthèse de composés pharmaceutiques, environnement (détection de pesticides), pollution, défense et sécurité ... Les applications les plus intéressantes pour Thales sont la défense (détection de bactéries ou autres composés biologiques dans les attaques bioterroristes ou en cas de guerre bactériologique) ainsi que le risque pandémique pour les applications de santé publique.

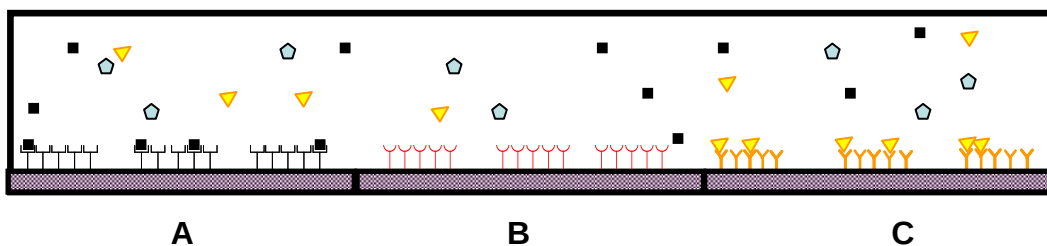


Figure 1.1: Reconnaissance de molécules biologiques à la surface d'une biopuce. Les spots sont des régions de molécules connues immobilisées

I-2. Propriétés

Les caractéristiques importantes que doivent satisfaire les systèmes de biodétection sont :

- la spécificité : la reconnaissance est basée sur la complémentarité entre l'élément biologique à la surface de la biopuce, et l'élément biologique d'intérêt dans la solution. Il est important que des éléments non spécifiques ne viennent pas s'accrocher à la surface du capteur pour ne pas gêner la reconnaissance des espèces recherchées ou conduire à des analyses de "faux positifs".

- la sensibilité : elle doit être élevée afin de pouvoir détecter des variations d'éléments biologiques les plus faibles possibles. En ce qui concerne les capteurs immunologiques, une sensibilité de l'ordre de 10 pg/mm^2 est adéquate. Ceci correspond à 10^{-12} moles de carbone par mm^2 soit 1 atome de carbone C par nm^2 dans une géométrie à 2D répartie uniformément.

- le caractère multiplexe : la détection de plusieurs analytes en parallèle est particulièrement intéressante. Pour ce faire, le dispositif de détection doit être commun pour tous les sites de la puce.

- la détection en continu (ou à intervalles de temps réguliers) : ceci permet au capteur d'être utilisé tant qu'il n'a pas reconnu l'élément biologique d'intérêt et de pouvoir déterminer des constantes cinétiques de réaction.

- le coût : d'une part en ce qui concerne la biopuce, et d'autre part en ce qui concerne l'appareil de mesure (transducteur).

- la rapidité de la détection : elle doit être compatible avec la mise en place d'actions rapides et doit permettre une réponse dans des constantes de temps de l'ordre de la minute pour l'étape d'identification. Ce paramètre est surtout lié au transport de masse dans le milieu environnant, mais la sensibilité du système permet de diminuer le temps nécessaire à la mesure.

- la compacité du système (poids et encombrement).

- l'absence de marquage : les méthodes de détection ne nécessitant pas de lier un marqueur sur la molécule à détecter sont particulièrement avantageuses. En effet, le marquage (particules radioactives, marqueurs fluorescents, particules absorbantes) constitue une étape supplémentaire, coûteuse en temps et en réactif et peu compatible avec les mesures en temps réel. De plus, les marqueurs peuvent parfois interférer avec les interactions moléculaires en se liant de manière non spécifique sur un site de liaison, et ainsi provoquer des "faux positifs".

I-3. Interactions biologiques

I-3. a) Structure de l'ADN

L'ADN est composé de chaînes de nucléotides, comprenant chacun trois éléments liés entre eux :

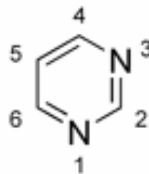
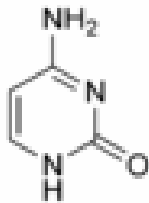
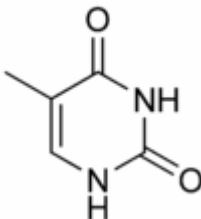
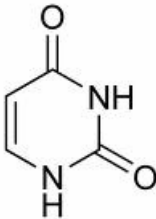
- un groupement phosphate
- une base azotée
- un sucre : le désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN.

Dans un brin d'ADN ou d'ARN, les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons entre les groupes phosphate et les groupements 5'-OH et 3'-OH du sucre, formant ainsi des liaisons covalentes 5'-3' phosphodiester.

On trouve principalement cinq bases dans la composition de l'ADN et de l'ARN. Elles peuvent être partagées en deux familles, les bases puriques et les bases pyrimidiques. Les nucléotides de l'ADN, comme ceux de l'ARN ne comportent que quatre de ces bases azotées :

- deux bases puriques communes aux deux types d'acides nucléiques : l'adénine et la guanine
- une base pyrimidique commune : la cytosine
- une base pyrimidique spécifique : l'uracile pour l'ARN et son dérivé méthylé, la thymine pour l'ADN

Nous donnons Figure 1.2 les formules chimiques des groupements purine et pyrimidine, ainsi que des différents nucléotides dont elles font partie. La Figure 1.3 donne la structure double hélice d'un brin d'ADN.

(a)	(b)	(c)	(d)
			
Pyrimidine 1,3 diazine	Cytosine 4-amino-2-oxypyrimidine	Thymine 5-méthyl-2,4-dioxypyrimidine	Uracile 2,4-dioxypyrimidine

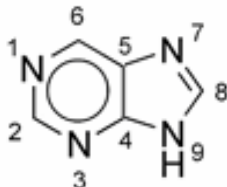
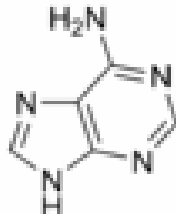
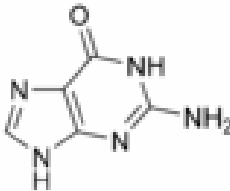
(e)	(f)	(g)
		
Purine 3-imidazo[4,5-d]pyrimidine	Adénine 6-aminopurine	Guanine 2-amino-6-oxopurine

Figure 1.2: Formules chimiques de (a) la pyrimidine, et (e) la purine ainsi que des différents nucléotides

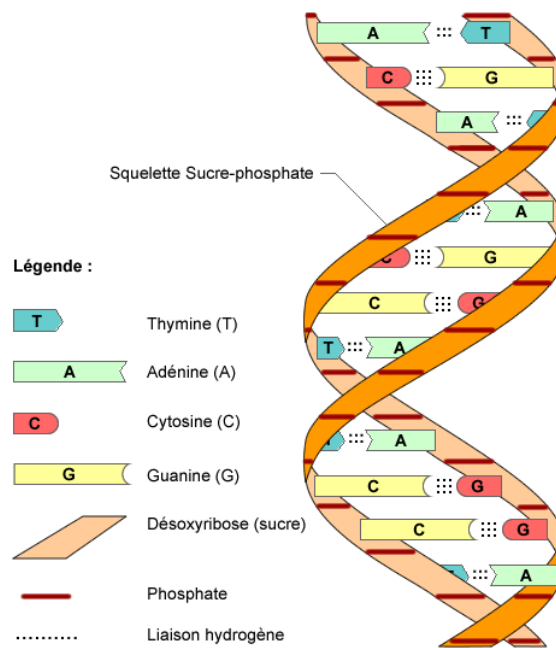


Figure 1.3: Structure d'un brin d'ADN. Dans cette double hélice, les bases d'un des brins établissent des liaisons hydrogène avec les bases de l'autre brin. Les règles de complémentarité font qu'en face d'une adénine, il y a toujours une thymine, et qu'en face d'une guanine, il y a toujours une cytosine.

I-3. b) Structure des protéines

Les protéines sont constituées de chaînes linéaires d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. La Figure 1.4 donne la formule générique d'un acide aminé. Chacun des 20 acides aminés comprend:

- une chaîne carbonée
- une amine -NH_2
- un acide carboxylique -COOH

La séquence de ces acides aminés dans une protéine constitue sa structure primaire. Le repliement tridimensionnel de la chaîne d'acides aminés ou structure tertiaire confère aux protéines leurs fonctionnalités complexes. Leurs fonctions sont diverses, avec notamment le transport, le métabolisme (enzymes), la défense de l'organisme basée sur les réactions immunitaires... Dans le cadre de la biodétection, on s'intéresse ainsi notamment à

l'identification de molécules biologiques basée sur les réactions immunitaires entre un antigène et un anticorps spécifique.

Tous les anticorps sont constitués de deux chaînes lourdes longues L et deux chaînes légères courtes C. La Figure 1.5 donne un schéma de la forme générale d'un anticorps. Ces quatre chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne possède une région variable v dont la séquence en acides aminés varie d'un anticorps à l'autre, et une région constante c. La séquence variable et sa conformation sont responsables de la spécificité vis à vis d'un antigène donné.

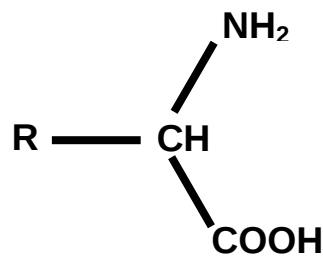


Figure 1.4: Formule générique d'un acide aminé

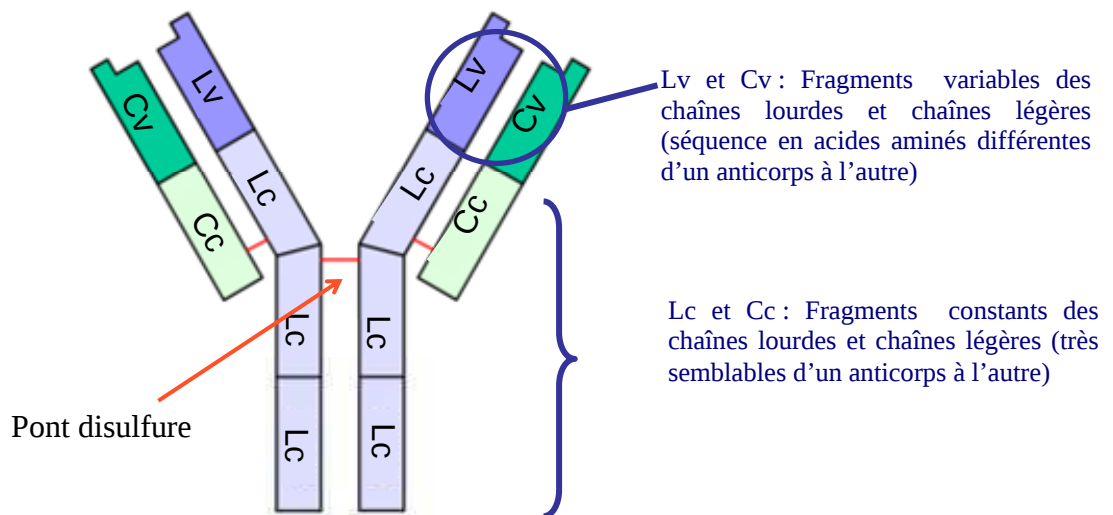


Figure 1.5: Schéma type d'un anticorps, constitué de deux chaînes lourdes longues et deux chaînes légères courtes, reliées entre elles par des ponts disulfures. Chacune des chaînes contient une partie constante et une partie variable.

I-3. c) Interactions

Les interactions entre molécules biologiques paraissent plus complexes que celles que nous rencontrons dans un système physique ou chimique de base. Pourtant, elles résultent des mêmes forces que celles qui s'exercent dans tout type de molécules : forces de van der Waals, interactions électrostatiques, liaisons hydrogène... [Leckband, 2001]. Leur complexité réside dans leur organisation et imbrication les unes avec les autres. La diffusion joue aussi un rôle important dans les processus de reconnaissances moléculaires. Les forces en elles-mêmes ne sont pas spécifiques. On parle de spécificité lorsque qu'une macromolécule biologique possède la propriété de n'interagir fortement qu'avec un seul composé (ou avec un petit nombre de composés). Cette spécificité résulte d'une synergie entre ensemble d'interactions non covalentes. Ces phénomènes sont parfois qualifiés de "reconnaissance" biologique. Bien que non covalentes, ces liaisons par le biais de considérations thermodynamiques que nous ne développons pas peuvent être caractérisées par la constante d'affinité du couple. Les couples de molécules biologiques qui interagissent spécifiquement sont parfois dénommés "complémentaires". Si l'on considère plusieurs couples A_1B_1 , A_1B_2 , ... A_1B_n de constante d'affinité $K(A_1B_j)$ avec $j = 1, 2, \dots, n$, on dira que A_1 est spécifique de B_1 si:

$$K(A_1B_1) \gg K(A_1B_j), \text{ pour } j \neq 1.$$

Cette relation traduit la spécificité du couple A_iB_i . L'idée de la biopuce est de révéler l'interaction entre A_1 et B_1 , alors que les autres composés B_j sont également présents. Ainsi, les affinités croisées doivent rester minimales.

I-4. Modèle biologique considéré dans ce travail

La protéine modèle utilisée dans ce travail est la méthionyl-ARNt synthétase (MetRS) [Mellot, 1989].

Cette enzyme appartient à la famille des aminoacyl-ARNt synthétases. Ces protéines ont un rôle particulièrement important dans les cellules vivantes, car ce sont elles qui assurent la correspondance entre l'information à 4 lettres (A, C, G, U) portée par l'ARN messager et

l'alphabet à 20 acides aminés de protéines. Pour cela, elles agissent sur des molécules d'ARN intermédiaires appelées ARN de transfert (ARNt) qui comportent entre 70 et 100 bases [Söll, 1994].

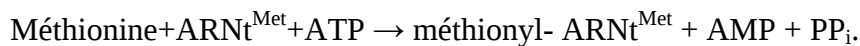
La méthionyl-ARNt-synthétase est ainsi une enzyme E qui catalyse une réaction d'estérification entre l'acide aminé méthionine et les ARN de transfert spécifiques de cet acide aminé (ARNt^{Met}). L'enzyme forme tout d'abord un complexe avec l'ATP (adénosine tri-phosphate) et l'acide aminé méthionine. Puis l'enzyme catalyse une réaction chimique entre ces deux composés, ce qui aboutit à la formation d'une molécule de méthionyl-adénylate (méthionyl-AMP) qui reste liée à l'enzyme, et à la libération d'une molécule de pyrophosphate (PPi).



Par ailleurs, l'enzyme est spécifique de l'ARNt^{Met}. Elle fixe donc cet ARNt avec une forte affinité, mais pas les autres ARNt. Lorsqu'un ARNt^{Met} se lie au complexe E :méthionyl-AMP, l'enzyme catalyse le transfert sur l'ARNt^{Met} de la partie méthionine du méthionyl-AMP, ce qui conduit à la formation du méthionyl-ARNt^{Met} et à la libération d'AMP.



Le bilan des deux réactions s'écrit alors :



Le coefficient d'extinction de la méthionyl-ARNt synthétase (MetRS) est représentatif de l'absorption des protéines en ultraviolet. Ainsi, du point de vue optique, la validation de notre système de biopuce avec cette protéine pourra être généralisée à d'autres protéines, ainsi qu'aux biopuces à reconnaissance d'ADN d'un ordre de grandeur plus absorbant. D'autre part, comme l'ARNt a un fort coefficient d'extinction à 260 nm, on pourra envisager par la suite de suivre par absorption UV la fixation d'ARNt sur de la MetRS immobilisée.

I-5. Méthodes de détection

En ce qui concerne le signal mesuré, celui-ci peut être de différentes natures. Il existe ainsi des biocapteurs électrochimiques, piézoélectriques, magnétiques, mécaniques, optiques...

Pour mieux lire la présentation qui va suivre sur les méthodes optiques existantes, nous précisons ici la méthode qui sera présentée dans ce manuscrit. La détection est basée sur l'absorption dans l'ultraviolet des molécules biologiques. En effet, l'ADN et les protéines présentent une absorption respectivement à 260 nm et 280 nm. Bénéficiant d'une propriété intrinsèque des molécules biologiques, notre technologie ne nécessite pas de marquage des molécules biologiques. A notre connaissance, cette approche n'a pas été développée jusqu'ici. Ceci est principalement dû à la faible maturité des technologies dans l'ultraviolet. Ceci est en fort contraste avec l'usage courant des UV dans le monde de la biologie (par exemple pour la mesure de l'absorption en spectrométrie). Thales a ainsi souhaité bénéficier de son avance dans le domaine de l'UV pour étudier les potentiels d'une détection par absorption UV [Brevet, 2005][Reverchon, 2006]. Le dynamisme de la recherche et du développement des composants à base de semi-conducteurs AlGaIn rendra les composants UV facilement accessibles d'où l'importance d'évaluer les potentiels d'une telle méthode.

Nous présentons dans le paragraphe suivant les différentes méthodes de biodétection optiques, avec et sans marquage. En effet, certaines s'étant déjà montrées compétitives, une comparaison aux méthodes optiques semble appropriée pour déterminer les performances de notre méthode.

II - Biodétection optique

II-1. Critères de comparaison

Du point de vue optique, les différentes méthodes de détection peuvent être décrites sur les critères de marquage, sensibilité, et possibilité de multiplexage pour une détection en parallèle. En effet, les critères de coût et compacité étant très dépendants des évolutions des

technologies, ils ne seront pas traités ici. La dynamique des réactions étant régie par la diffusion, elle est donc favorisée par les faibles dimensions du système. Ainsi, il semble que tous les systèmes optiques peuvent atteindre des temps de détection du même ordre de grandeur pour des dimensions de système données. Seul le seuil de détection relève de la sensibilité du transducteur. La spécificité de reconnaissance est aussi un critère important des biopuces, mais cette partie rentre dans le cadre de la biochimie. En ce qui concerne les puces multiplexes, la taille des spots (plots) est typiquement d'une taille de 150 μm de diamètre, espacés de 400 μm .

II-2. Détection avec marquage

Nous décrivons ici brièvement les méthodes ELISA et la détection par fluorescence, qui sont les méthodes de détection optiques avec marquage les plus courantes. Un inconvénient majeur de ces méthodes est l'utilisation de consommables non réutilisables pour marquer les molécules. De plus, il s'agit d'une détection en deux temps, ce qui rend difficile le suivi de réaction en temps réel.

II-2. a) Tests ELISA

Les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) sont basés sur la spécificité de la reconnaissance antigène-anticorps. Ils peuvent être utilisés, par exemple pour détecter, à l'aide d'anticorps spécifiques, la présence d'une protéine donnée (antigène) dans un échantillon. Dans un premier temps, les protéines présentes dans l'échantillon analysé sont déposées sur une surface, le plus souvent celle d'un puits d'une plaque de microtitration. Après une étape de rinçage, on injecte des anticorps dits "primaires", qui vont se fixer spécifiquement sur les antigènes liés à la surface. Les anticorps primaires non fixés sont alors éliminés par rinçage. On ajoute ensuite des anticorps « secondaires » qui, eux reconnaissent les anticorps primaires. Ces anticorps sont couplés à une enzyme qui va permettre de transformer par ajout d'un substrat la reconnaissance en un signal d'absorption, de fluorescence ou d'électrochimie. Le cas le plus fréquent est l'utilisation de l'absorption,

observé à l'œil ou au moyen d'un spectromètre. L'absorbance (ou densité optique DO) est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$DO = A_{\lambda} = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_o}\right) = \varepsilon_{\lambda} l c \quad (1.1)$$

où c désigne la concentration massique, en g/mL, l est la distance traversée, et ε_{λ} est le coefficient d'extinction massique en mL $\mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\sim\mu\text{g}^{-1}\text{cm}^2$) à la longueur d'onde λ .

La mesure de l'absorbance de la solution permet ainsi de déterminer la concentration d'antigène cible à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée de manière préalable avec des concentrations connues d'antigènes. Cette méthode est classiquement utilisée en laboratoire. Cependant, elle nécessite des temps de réactions longs (3-5h), et ne permet pas le suivi d'interaction en temps réel, puisqu'il s'agit d'une méthode de détection en deux étapes.

Des alternatives de la méthode ELISA en sandwich (anticorps fixé sur la surface), ou par compétition peuvent aussi être mises en œuvre.

II-2. b) Fluorescence

L'imagerie par fluorescence constitue à ce jour une méthode de référence [Affymetrix]. De manière similaire à la méthode ELISA, la détection par fluorescence est basée sur deux reconnaissances, l'une entre l'anticorps localisé sur la puce et son antigène spécifique, la seconde entre l'antigène et un marqueur fluorophore. Les fluorophores sont soit des quantum dots (~ 100 - 10000 atomes, 2-10 nm), soit des petites molécules (~ 30 atomes), telles que cyanine 3 (excitation 530 nm, émission 570 nm) ou cyanine 5 (excitation 630 nm, émission 670 nm). Cette méthode implique aussi une étape de rinçage avant la détection, afin de ne pas être gêné par la fluorescence des molécules restant en solution. Des astuces ont cependant été développées pour permettre une détection en temps réel en associant l'appareil de lecture à un mélange et à un contrôle précis de la température [Marcy, 2008]. La détection par fluorescence est une méthode sur fond noir et donc très sensible ne demandant pas de résolution optique. En effet, en cas de faible quantité d'éléments biologiques, le signal de fluorescence peut être augmenté en imposant une puissance d'excitation plus forte.

Cependant, la détection par fluorescence est difficile à calibrer, ce qui pose un problème pour avoir une bonne quantification des résultats. De plus, l'utilisation d'une excitation trop puissante provoque un phénomène de photo blanchiment (lorsqu'une molécule fluorescente est excitée, elle peut soit émettre un photon, soit subir une oxydation biochimique qui va empêcher son retour à un état excitable). Le signal de fluorescence peut être exalté en réalisant des biopuces multicouches [Choumane, 2005], guidantes diélectriques [Karvinen, 2008] ou plasmoniques [Liebermann, 2000] permettant d'augmenter les interactions des fluorophores sur la puce avec le champ électrique local. Cette méthode de détection peut facilement être utilisée en détection multiplexe en réalisant l'image de plusieurs plots biologiques en parallèle.

II-2. c) Marqueurs absorbants

Il serait aussi possible de marquer les molécules avec des absorbants (particules ou autres molécules absorbantes) et de détecter une atténuation du signal transmis ou réfléchi selon que le montage fonctionne en transmission ou bien en réflexion. Si l'on se base sur une atténuation du signal global, les marqueurs n'ont pas besoin d'être résolus optiquement même si une mauvaise résolution diminue l'effet de l'absorption. Comme nous le verrons dans ce manuscrit, l'absorption des molécules biologiques elles-mêmes peut aussi être exploitée, ce qui constitue de ce fait une méthode de détection sans marquage. De la même manière qu'en imagerie de fluorescence, cette méthode est utilisable en détection multiplexe.

II-3. Méthodes optiques sans marquage

Les méthodes optiques sans marquage peuvent être classifiées en deux catégories : les premières exploitent des propriétés de déphasage et changement d'amplitude directes, alors que les secondes exploitent des ondes guidées qui interagissent avec un élément biologique. L'onde guidée peut alors être utilisée directement ou en exploitant la modification de conditions de résonance.

II-3. a) Méthodes optiques réflectométriques directes

L'ellipsométrie est la première méthode réflectométrique introduite pour l'étude des interactions biologiques entre antigène et anticorps [Cuypers, 1978]. Elle permet de mesurer l'épaisseur et l'indice de la couche biologique à la surface de la puce [Ostroff, 1998]. Une autre méthode réflectométrique est la spectroscopie interférentielle réflectométrique, qui permet d'utiliser une lumière non polarisée, en exploitant le déphasage de la courbe de réflectivité [Birkert, 2002] [Möhler, 2006].

Ces deux méthodes ont donné lieu à une parallélisation permettant de faire de la détection multiplexe [Eing, 2002] [Birkert, 2002]. En ce qui concerne l'ellipsométrie, le seuil de détection est de 0.05 à 0.2 nm, correspondant à une sensibilité limite approximative de 50 à 200 pg/mm² [Eing, 2002]. Du fait de l'angle d'incidence important, il est nécessaire de translater l'échantillon pour reconstruire l'image totale de la puce. La spectroscopie interférentielle réflectométrique permet une sensibilité de l'ordre de 10 pg/mm² [Fujimura, 2005] [Möhler, 2006]. L'image de la puce est réalisée en utilisant un spectro-imageur.

L'imagerie basée sur l'absorption des éléments biochimiques en transmission ou bien en réflectivité peut aussi être utilisée [Robin, 2009, a]. Ceci est particulièrement intéressant dans le domaine ultraviolet, où l'absorption est une propriété générale des molécules biochimiques. Les sensibilités expérimentales sur des puces quart d'onde ont montré une sensibilité de 4000 pg/mm². Comme nous le verrons, des méthodes basées sur les ondes guidées permettent d'augmenter le contraste d'absorption.

II-3. b) Méthodes optiques à ondes guidées

Nous donnons ici un aperçu des différentes méthodes à ondes guidées et commentons notamment leur capacité de multiplexage (détection de plusieurs éléments en parallèle), ainsi que leur limite de sensibilité.

➤ Méthodes basées sur une onde guidée

Ces méthodes sont basées sur l'interaction de cette onde guidée avec un milieu contenant les éléments biologiques dont on cherche à déterminer la variation d'indice effectif. Généralement, elles exploitent uniquement la variation de la partie réelle de l'indice optique sondée par l'onde guidée. Certaines exploitent aussi la partie imaginaire de l'indice optique, témoin de l'absorption. L'onde guidée peut être mesurée directement par transmission au bout d'un guide d'onde, ou en exploitant la modification des conditions de résonance induite par les éléments biologiques à la surface.

➤ Méthodes basées sur la mesure directe de l'onde guidée

Les méthodes interférométriques (interféromètres Mach-Zehnder [Heidemann, 1993], Young [Schmitt, 2007]...) exploitent l'interférence entre deux ondes guidées. L'une sert de référence, alors que la seconde est déphasée du fait de l'interaction entre le champ de l'onde guidée et le milieu biologique. Pour plus de précisions, plusieurs longueurs d'onde peuvent être utilisées. La mesure du déphasage entre le bras de référence non fonctionnalisé, et le bras fonctionnalisé permet de déterminer la quantité de biomolécules qui se sont accrochées à la surface du guide d'onde.

La spectroscopie de réflexion totale atténuée est basée sur la partie imaginaire de l'indice optique; elle exploite l'absorption de la couche biologique [Mendes, 1999]. Pour être mise en œuvre, le milieu biologique à étudier doit être absorbant [Araci, 2007]. Cette méthode peut être utilisée à une longueur d'onde donnée ou bien sur un large domaine de longueurs d'onde pour obtenir le spectre d'absorption, mais avec un dispositif de faible taille. Pour une propagation de 1.6 cm à une longueur d'onde centrale de 550 nm, le système permet d'amplifier l'absorption par un facteur 10^4 . On aura donc typiquement un seuil de détection de 1 pg/mm² pour une protéine de coefficient d'absorption typique de 2×10^{-3} cm²/μg. Cependant, la condition d'absorption limite le nombre de molécules auxquelles on peut appliquer cette technique. Des projets de recherche sont en cours pour appliquer cette méthode au domaine ultraviolet, de 190 à 450 nm [Mendes, 2009]. Cependant, l'absorption des matériaux constituant le guide est problématique puisque la longueur de propagation recherchée ici est de l'ordre du centimètre.

➤ Méthodes basées sur une résonance

D'autres méthodes sont basées sur la modification du comportement résonant d'une onde guidée. L'adsorption des molécules biologiques à la surface de la puce modifie l'indice effectif de l'onde guidée et influence le comportement résonant de cette onde. Ceci se traduit par une modification de la phase et de l'amplitude de l'onde transmise/réfléchi. On distingue les couplages par plasmon de surface et les couplages dans les guides d'ondes diélectriques.

La méthode optique la plus répandue et commercialisée est la résonance par plasmon de surface (Genoptics, BIACORE, Applied Biosystems...). Les interactions biologiques à la surface de la puce sont analysées en observant le comportement résonant de l'onde guidée à l'interface métal/diélectrique.

De manière similaire à la SPR, il est possible d'utiliser les propriétés de couplage d'une onde guidée avec les éléments biologiques en utilisant des structures guidantes diélectriques [Schmitt, 2008]. Dans ce cas, le guide d'onde diélectrique est conçu pour pouvoir guider une onde localisée près de l'élément biologique. Ceci permet d'obtenir une interaction plus importante et une meilleure sensibilité.

Que ce soit avec les résonances plasmoniques ou avec les modes guidés dans les diélectriques, la mesure est basée sur la modification des conditions de résonance. La sensibilité maximale à la présence d'un élément biologique est obtenue à la résonance. Pour qu'il y ait couplage avec l'onde guidée, la projection du vecteur d'onde de l'onde incidente sur la surface de la puce doit être égale au vecteur d'onde du mode guidé.

Celui-ci a pour expression :

$$k_{//}^{biopuce}(\lambda) = n_{eff}(\lambda) \times (2\pi / \lambda), \quad (1.2)$$

où λ désigne la longueur d'onde et $n_{eff}(\lambda)$ désigne l'indice effectif du mode guidé. Le couplage au mode guidé à partir de l'extérieur peut être réalisé en injectant la lumière par la tranche, ou bien en utilisant un prisme ou bien un réseau de couplage.

La condition de résonance correspond à l'existence d'une onde guidée qui interagit avec la couche biologique et se manifeste sur la courbe de réflectivité comme une variation brutale du signal réfléchi/transmis (Figure 1.6 (a) et (b)). Le signal mesuré peut être l'onde guidée elle-même, découplée du guide ou bien un ordre diffracté permettant de mesurer l'énergie non

guidée. On distingue les monocapteurs, pour lesquels le signal mesuré est un spectre et les capteurs multiplexes avec lesquels on réalise une image en conditions résonantes de plusieurs plots de la puce simultanément.

Les mesures de spectres sont réalisées soit en interrogation spectrale ou soit en interrogation angulaire. On s'intéresse au changement de la fréquence de résonance, en mesurant soit la longueur d'onde de résonance, soit l'angle de résonance, par la recherche du minimum/maximum du signal réfléchi/transmis. En ce qui concerne l'imagerie, jusqu'ici mise en oeuvre essentiellement en SPR, on mesure alors la variation de la réflectivité à une longueur d'onde et un angle d'incidence donnés. On peut dans ce cas réaliser une détection multiplexe en réalisant l'image de plusieurs plots biologiques en même temps.

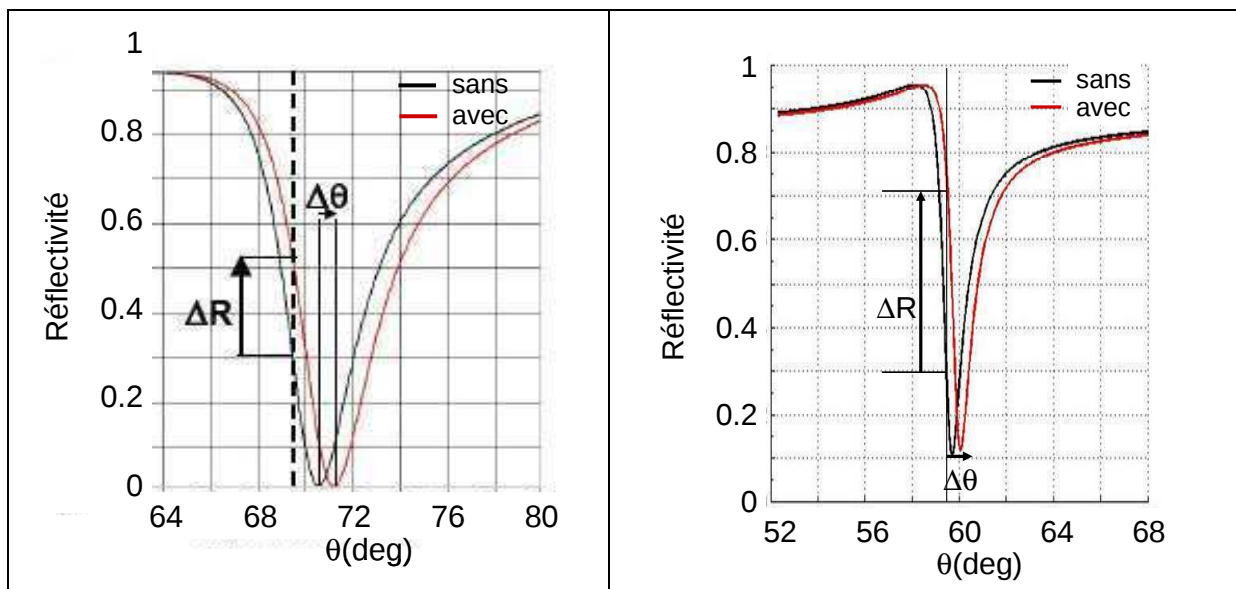


Figure 1.6: Signal réfléchi/diffracté (a) en SPR, polarisation TM (b) Réflexion sur un guide d'onde diélectrique avec couplage dans et en dehors du guide par un réseau de coupage, polarisation TE.

➤ Résonance de plasmons de surface :SPR

L'application de la SPR dans le domaine de la biodétection a été décrite pour la première fois en 1983 [Liedberg, 1983]. Dans le cas des plasmons de surface, le couplage par un prisme d'indice n_p est le plus souvent utilisé. Des couplages par réseau peuvent aussi être développés. La configuration la plus classique est la configuration de Kretschmann [Kretschmann,1979], qui est représentée Figure 1.7.

Dans ce cas, on a :

$$(2\pi / \lambda) \times n_p \sin(\theta) = k_{SPR} \quad (1.3)$$

où $n_p \sin(\theta)$ est l'indice effectif du plasmon. En comparaison avec une excitation laser, la sensibilité est diminuée de 5% pour un éclairage avec une LED de largeur spectrale de 30 nm centrée à 600 nm. En effet, les conditions de résonance plasmoniques sont assez relaxées. Le prisme assure un accord de phase ou "phase-matching" essentiellement achromatique et non critique de l'onde incidente avec le plasmon de surface.

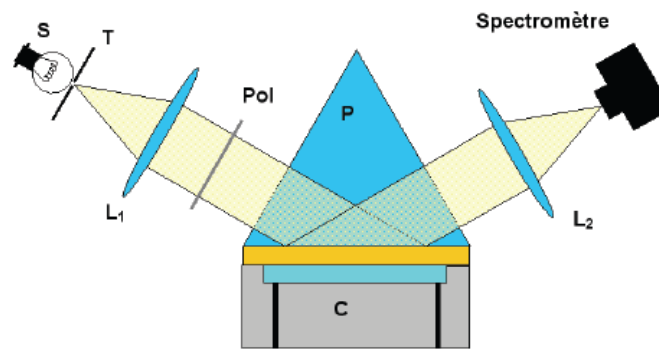


Figure 1.7: Biocapteur SPR couplé par prisme à interrogation spectrale. C-cuve, L1, L2: lentilles, P: prisme dont l'une des faces est recouverte d'or, Pol: polariseur, S: Source, T: trou source [Maillart, 2004]

La Figure 1.6 (a) donne la courbe de réflectivité typique obtenue pour les résonances plasmoniques, avec et sans élément biologique.

En interrogation angulaire, la sensibilité maximale est de 1 pg/mm². Ceci requiert une précision angulaire de 1.7 μrad (1×10⁻⁴ degrés) [Biacore], en considérant un indice optique de 1.45 pour la protéine, à une longueur d'onde de 660 nm. Des sensibilités identiques sont obtenues en interrogation spectrale.

En ce qui concerne l'interrogation en réflectivité, un seuil de détection de +/-0.02 % (moyenne sur plusieurs images et plusieurs pixels d'un même plot biologique) permet d'obtenir un seuil de détection de 4 pg/mm². Ce résultat est obtenu avec une DEL de 30 nm de demi-largeur spectrale centrée à 630 nm, et avec une divergence angulaire $2 \cdot \Delta\alpha = 4$ mrad. Dans le cas le plus général d'un changement d'indice effectif sans absorption, la sensibilité maximale est obtenue là où la pente du signal réfléchi/diffracté est maximale.

➤ Couplage par réseau de diffraction

L'application des guides d'onde diélectriques à la détection biologique a été introduite en 1983 [Lukosz, 1983]. Le couplage réseau est le plus communément utilisé. Dans ce cas, l'équation de couplage s'écrit :

$$n_a \sin(\theta_{in}) = n_{eff}(\lambda) - m \frac{\lambda}{\Lambda}, \quad (1.4)$$

où λ désigne la longueur d'onde, Λ la période du réseau, m l'ordre de diffraction utilisé.

Le couplage peut être réalisé en entrée [Nellen, 1998] ou en sortie [Lukosz, 1990]. Dans ce cas, l'injection/extraction de la lumière se fait par la tranche du guide d'onde, ou à la fois en entrée et en sortie [Cottier, 2003].

➤ Interrogation de la condition de résonance en monocapteur

La Figure 1.8 donne une configuration avec couplage au mode guidé au moyen d'un réseau ainsi que pour l'extraction du mode guidé [Cottier, 2003]. Les biopuces sont constituées de deux parties : un guide d'onde et un réseau de couplage. De manière à satisfaire des conditions de couplage différentes et éviter la réflexion spéculaire, les réseaux d'entrée et sortie ont une période différente. Une alternative est de garder la même période, mais de changer l'épaisseur du guide, ce qui modifiera la valeur de son indice effectif. La Figure 1.6 (b) donne l'allure d'un spectre diffracté typique en fonction de l'angle de sortie. Les sensibilités angulaires sont en général meilleures que les sensibilités spectrales. Les résolutions sont limitées par les résolutions instrumentales. Pour une précision angulaire de 0.17 mrad (0.01°), la sensibilité correspondante est de 0.13 pg/mm², en considérant un indice de 1.45 pour la protéine et de 1.33 pour la solution. Pour cette même résolution angulaire, on avait une sensibilité de 100 pg/mm² avec les plasmons de surface. Ceci est dû à la plus grande finesse de la résonance permise par la qualité du résonateur. En interrogation spectrale, la détection est réalisée en scannant la longueur d'onde de résonance en utilisant une diode laser accordable. Pour atteindre une sensibilité similaire en interrogation spectrale, la résolution de spectromètre requise est de 0.03 nm. Ce type de résolution est possible mais nécessite un spectromètre à forte résolution.

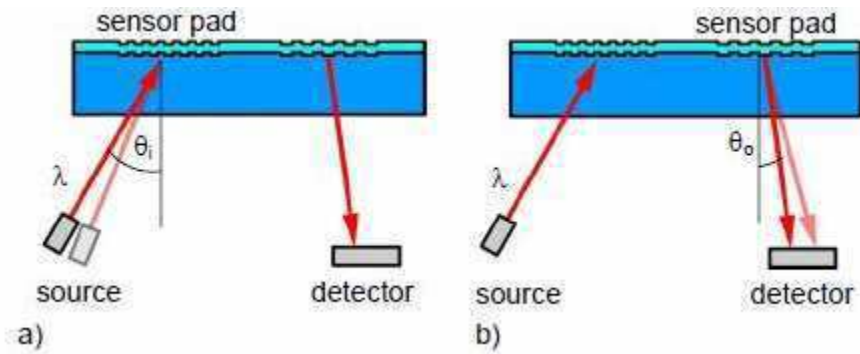


Figure 1.8: Biocapteur à guide d'onde diélectrique avec lecture angulaire en configuration (a) d'entrée et (b) de sortie [Cottier, 2003]

➤ Mesure directe d'un ordre diffracté

De manière similaire aux plasmons de surface, avec les guides d'ondes diélectriques, il est possible d'exploiter directement l'onde réfléchie ou l'intensité diffractée dans un ordre de diffraction donné [Brandenburg, 1993]. Le même réseau est alors utilisé pour l'entrée et la sortie. Dans ce dernier cas, on ne mesure pas directement le mode guidé, mais l'énergie couplée et découplée du guide. La Figure 1.9 donne un schéma de cette configuration en interrogation spectrale.

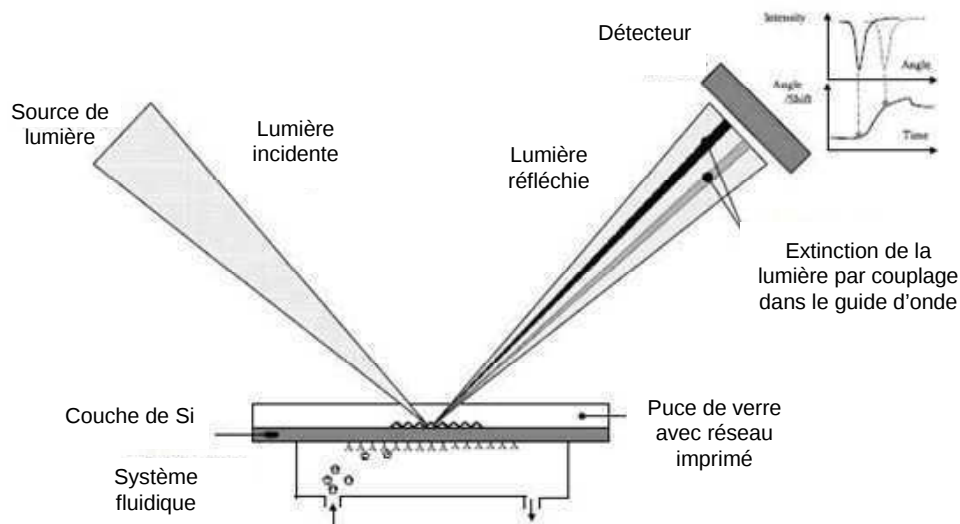


Figure 1.9: Guide d'onde résonant en réflexion en interrogation spectrale. La position du minimum de réflectivité permet de déterminer la quantité de molécules biologiques accrochées à la surface de la puce.

Une alternative à ce type d'approche est l'interrogation en réflectivité. Dans ce cas, on mesure l'intensité du signal réfléchi à une longueur d'onde donnée et pour un angle d'incidence donné. C'est ce type de configuration que nous utilisons, en configuration d'imagerie essentiellement [Robin, 2009, b]. A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de dispositif d'imagerie utilisant directement un ordre diffracté. Ceci est pourtant particulièrement intéressant pour la mesure de plusieurs ordres diffractés en parallèle (multiplexage). Un intérêt de l'utilisation de réseaux résonants en imagerie est aussi la possibilité d'utiliser n'importe quel ordre de diffraction et ainsi d'éviter la réflexion spéculaire. De plus, ceci peut permettre certaines libertés sur la direction de l'imagerie. On pourra ainsi choisir des configurations exploitant un ordre diffracté émis proche de la normale à l'échantillon donc avec l'ensemble de la biopuce dans la profondeur de champ.

Dans le cas général d'un contraste d'indice uniquement, la sensibilité maximale est obtenue là où la pente de la réflectivité est maximale. La sensibilité sera d'autant plus grande que le facteur de qualité de la résonance sera élevé. Ceci permet donc de meilleures sensibilités qu'en imagerie de plasmons de surface. Cependant, plus la finesse $F = \lambda / \Delta\lambda$ sera élevée, plus le mode sera spatialement étendu, ce qui pourra avoir des effets négatifs sur les résolutions en imagerie [Yeatman, 1996]. De plus, une faible largeur spectrale implique aussi un moindre flux incident (à l'exception des sources laser). Le compromis entre finesse et résolution spatiale sera discuté au chapitre 2.

➤ Cas particulier : Spectro imagerie à éclairage polychromatique d'incidence normale

En ce qui concerne les biocapteurs basés sur des résonances réseau, il est aussi possible d'éclairer la puce par un faisceau polarisé à spectre large. La puce étant éclairée à incidence normale, on obtient un couplage pour une longueur d'onde donnée. Le mode guidé va ensuite rayonner une unique longueur d'onde dépendant de la couche adsorbée à la surface du capteur [Golubenko, 1985]. La détection est réalisée par mesure du spectre diffracté. La Figure 1.10 donne un schéma d'un tel dispositif.

Pour chaque mesure, on détermine la différence de longueur d'onde de résonance en comparant la valeur avant et après reconnaissance biologique. La modification de cette longueur d'onde permet de quantifier les molécules biologiques reconnues à la surface de la

puce. Avec cette méthode, il est possible de faire l'image d'une seule ligne à la fois. Ce type de capteur est par exemple développé par SRU Biosystems [SRU Biosystems][Cunningham, 2002, a] et par Corning [Corning]. Ce type de capteur peut être multiplexé pour réaliser une image sur toute une ligne de plots biologiques. Cependant, il s'agit en fait ici d'une multiplication du dispositif de détection, en utilisant un spectromètre par plot (spectro-imagerie). Une translation de l'échantillon est nécessaire entre chaque image pour reconstituer l'image de la puce en totalité. Avec une résolution spectrale de 0.03 nm, la sensibilité obtenue avec cette méthode est de 0.1 pg/mm² [Cunningham, 2002, b].

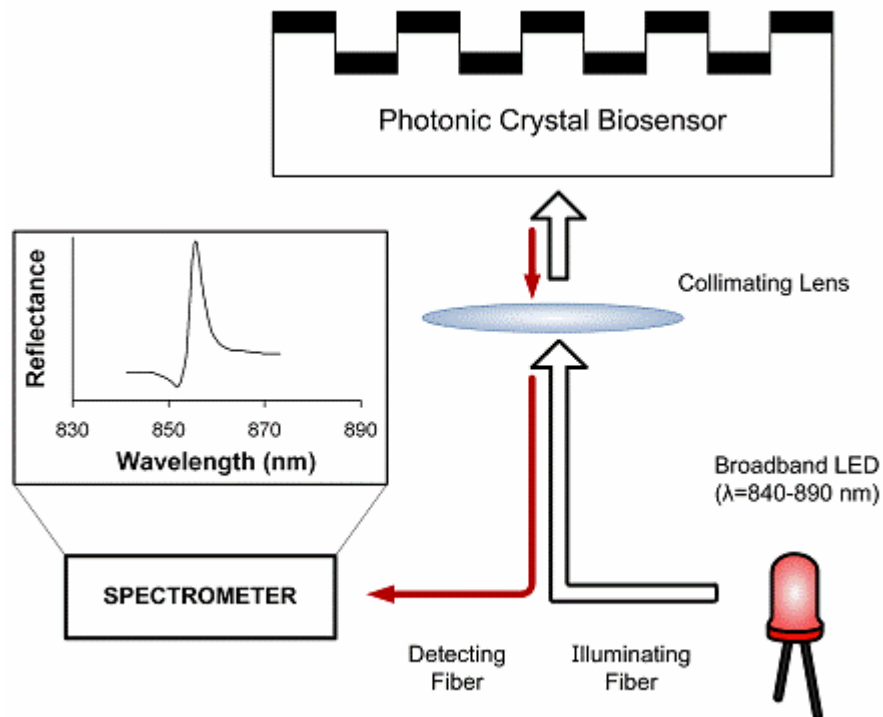


Figure 1.10: Structure biopuce éclairée par une source polychromatique de polarisation TM et rayonnant une longueur d'onde unique. L'image de la puce peut être réalisée en mesurant la longueur de résonance, et en faisant la différence avec la référence [SRU Biosystems].

➤ Comparaison SPR/biopuces diélectriques

Nous donnons Figure 1.6 l'allure des signaux utilisés. La présence d'un élément biologique à la surface influe à la fois sur la longueur d'onde de résonance ou bien sur l'angle de résonance

selon la mesure réalisée et sur l'intensité du signal réfléchi à travers la forme de la courbe. La forme sera d'autant plus modifiée que l'élément à la surface de la puce est absorbant.

En comparaison avec les méthodes plasmoniques, un avantage des biocapteurs mettant en jeu des réseaux de diffraction diélectrique avec réseau est que le choix des paramètres de la structure (choix des diélectriques, épaisseur des différentes couches, épaisseur de gravure) permet d'optimiser les propriétés de résonance de la puce. Il est ainsi possible de choisir le domaine de longueur d'onde d'utilisation. Des capteurs permettant une détection dans le bleu ou l'UV sont donc réalisables ce qui n'est pas possible avec les métaux biocompatibles tels que l'or. Le domaine ultraviolet peut ainsi être choisi avec les réseaux, ce qui permet de bénéficier de l'absorption des éléments biologiques. De plus, indépendamment de tout effet d'absorption, la longueur caractéristique du système étant la longueur d'onde λ , l'UV permet d'être plus sensible à des variations d'épaisseur effective h_{eff} , le rapport h_{eff}/λ étant augmenté [Ganesh, 2006]. Un inconvénient de l'ultraviolet est par contre la diffusion, l'échelle de la longueur d'onde étant alors comparable à celle de la rugosité de surface.

Selon la taille des éléments biologiques à sonder, la géométrie des réseaux permet d'optimiser le recouvrement du champ électrique et du milieu contenant les espèces biologiques. Une optimisation peut ainsi être réalisée selon la taille de ces éléments (du nanomètre à quelques centaines de nanomètres [Kunz, 2007]). Ceci constitue un avantage majeur des réseaux en comparaison aux caractéristiques plus figées des résonances plasmoniques. De plus, si l'on souhaite une bonne résolution en imagerie il est nécessaire de prendre en compte l'étendue spatiale du mode, et d'établir les compromis entre résolution spatiale du système optique, finesse angulaire et spectrale de la résonance. Ceci pourra donc être optimisé dans le cas des réseaux diélectriques. Un autre avantage des réseaux de diffraction, est la possibilité d'exploiter la direction des ordres de diffractions pour permettre l'imagerie. Il est aussi possible d'utiliser un ordre de diffraction différent de la réflexion spéculaire dont la direction d'émission sera choisie proche de la normale à l'échantillon, de telle sorte que l'ensemble de la biopuce puisse être placée dans le plan focal image d'un détecteur 2D.

De plus, dans les structures diélectriques, il est possible d'exploiter les deux polarisations. On peut ainsi déconvoluer les informations concernant l'épaisseur et l'indice de la couche adsorbée [Nellen, 1998]. A l'inverse, en SPR, seule la composante TM est exploitable.

III - Détection en absorption dans l'ultraviolet

La méthode que nous développons est basée sur des guides d'onde diélectriques résonants. Elle exploite à la fois les variations d'indice effectif à la surface de la puce, mais aussi la propriété d'absorption de ces molécules. Ainsi, le domaine de longueur d'onde que nous avons choisi est l'ultraviolet, où les molécules biologiques absorbent autour de 260 nm pour l'ADN et l'ARN, et autour de 280 nm pour les protéines. Nous pouvons aussi profiter de la faible longueur d'onde, longueur caractéristique du système et être plus sensible à des variations d'épaisseur effective h_{eff} , le rapport h_{eff}/λ étant favorisé. Il a en effet été montré que le passage d'un domaine de longueur d'onde centré à 795 nm à un domaine centré à 405 nm permet d'augmenter la sensibilité par un facteur de 4.5 [Ganesh, 2006].

III-1. Généralités

Plusieurs méthodes de biodétection ont étudié l'intérêt d'exploiter l'absorption pour augmenter la sensibilité. Ceci a par exemple été mis en œuvre dans les méthodes de biodétection avec plasmons de surface, en marquant des brins d'ADN avec des chromophores, présentant une forte absorption à la longueur d'onde plasmon (en l'occurrence $\lambda=657\text{nm}$) [Nakkach, 2008]. Pour les chromophores présentant une forte variation de l'absorption autour de la longueur d'onde d'intérêt, il a été montré une augmentation de la sensibilité du signal SPR d'un facteur 1.6. Cette étude était possible en marquant l'ADN avec une protéine particulière, présentant un pic d'absorption à la longueur d'onde d'intérêt. Cependant, l'absorption à ces longueurs d'ondes n'est pas une propriété générale de l'ADN ou bien des protéines. Ainsi, l'exploitation de telles propriétés nécessite l'utilisation d'un marqueur et la SPR perd alors sa qualité d'être une méthode de détection sans marquage.

En ce qui concerne les méthodes de détection mettant en jeu des couplages dans les diélectriques, l'absorption a aussi suscité un intérêt dans la spectroscopie de réflexion totale atténuée (ATR) [Mendes, 1999]. Ceci a aussi été démontré avec des chromophores absorbant autour de 550 nm et est donc restreint à un nombre restreint de molécules biologiques.

Les molécules biologiques absorbent dans l'UV. Cette propriété est d'ailleurs couramment exploitée par les biologistes pour déterminer la concentration de molécules ADN ou protéines dans une solution, respectivement à 260 nm et 280 nm. L'absorption UV peut donc être exploitée pour développer une méthode de biodétection sans marquage. Ainsi, dans notre dispositif nous exploitons l'absorption pour faire de l'imagerie de biopuces. Un intérêt de l'exploitation de l'absorption des molécules est la moindre dépendance du coefficient d'absorption à la température en comparaison des mesures liées à la partie réelle de l'indice. En effet, les techniques basées sur l'absorption sonde les transitions moléculaires et sont donc moins sensibles à la dilatation des matériaux. En comparaison à l'absorption, la partie réelle de l'indice optique des protéines est moins bien connue et les déterminations massiques partent souvent sur l'approximation que l'indice des protéines est de l'ordre de 1.45. Un avantage des méthodes basées sur l'absorption est donc une meilleure quantification.

III-2. Absorption UV de l'ADN et des protéines

III-2. a) Absorption de l'ADN à 260 nm

➤ Propriétés spectrales des bases azotées

Les hétérocycles des différentes bases ainsi que leurs dérivés, nucléosides ou nucléotides, présentent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'ultraviolet. Ces propriétés optiques sont communément utilisées pour la détection, le dosage et le contrôle de pureté d'acides nucléiques. La fluorescence de ces bases est par contre inutilisable : l'émission se situe dans la région UV 300-320 nm et elle est très faible (400 fois plus faible que celle du tryptophane pour les purines et 2500 fois pour les pyrimidines).

Le Tableau 1.2 donne les valeurs des coefficients d'absorption maximum des différents nucléotides [Cavaluzzi, 2004], ainsi que le spectre d'absorption des différents nucléotides de l'ADN et la moyenne de ces spectres. Les données des spectres proviennent des publications de H. Du, mesurées à pH = 7 et à une température de 25°C, dans l'eau [Du, 1998].

➤ Coefficient d'extinction

La concentration de l'ADN est déterminée à partir de l'absorption de la solution et de son coefficient d'extinction. Le coefficient d'extinction peut être déterminé par la méthode du plus proche voisin [Fasman, 1975], dans laquelle on utilise les coefficients d'extinction des mono et di-nucléotides monophosphates. Les valeurs de ces coefficients sont données dans le Tableau 1.3 [Sugimoto, 1996], déterminés à pH=7, à une température de 25°C. L'Equation 1.5 donne le coefficient d'absorption de la séquence de nucléotides dATGCTTC-3'. On n'attachera pas d'importance aux préfixes et suffixes minuscules d et p qui décrivent le désoxyribose et le phosphate, en réalité identiques dans toutes les comparaisons pertinentes ici [Owczarzy, 2009].

$$\epsilon_{dATGCTTC} = \epsilon_{dApdT} + \epsilon_{dTpdG} + \epsilon_{dGpdC} + \epsilon_{dCpdT} + \epsilon_{dTpdT} + \epsilon_{dTpdC} - \epsilon_{pdT} - \epsilon_{pdG} - \epsilon_{pdC} - \epsilon_{pdT} - \epsilon_{pdT} \quad (1.5)$$

Mononucléotides		Dinucléotides							
pdA	15.4	dApdA	27.4	dCpdA	21.2	dGpdA	25.2	dTpdA	23.4
pdC	7.4	dApdC	21.2	dCpdC	14.6	dGpdC	17.6	dTpdC	16.2
pdG	11.5	dApdG	25.0	dCpdG	18	dGpdG	21.6	dTpdG	19
pdT	8.7	dApdT	22.8	dCpdT	15.2	dGpdT	20	dTpdT	16.8

Tableau 1.2: Coefficients d'extinctions des mono et di-nucléotides monophosphates à la longueur d'onde de 260 nm en $M^{-1}cm^{-1}$.

➤ Hypochromicité

Le coefficient d'extinction d'un brin d'ADN double brin est inférieur à la somme des coefficients d'absorption de chacun des brins. Cet effet lié au couplage des orbitales s'appelle l'hypochromicité [Cantor, 1970]. Il peut être évalué par les formules suivantes :

$$\epsilon_D = (1 - h_{260\text{ nm}}) \times (\epsilon_{S1} + \epsilon_{S2}) \quad (1.6)$$

$$h_{260\text{ nm}} = 0.287 f_{AT} + 0.059 f_{GC} \times (\epsilon_{S1} + \epsilon_{S2}) \quad (1.7)$$

où f_{AT} et f_{GC} sont les fractions de paires de base AT et GC respectivement, et ϵ_{S1} et ϵ_{S2} sont les coefficients d'absorptions de chacun des brins.

Notons que lorsque nous traiterons de sensibilité, les unités utilisées seront le plus généralement les coefficients massiques plus parlant en vue des comparaisons entre les différentes configurations. Cependant, les absorptions molaires sont les plus courantes en biologie, c'est pourquoi ces unités ont aussi été utilisées dans cette présentation.

A température ambiante et pour une concentration ionique de 0.3M, l'absorption spécifique d'un brin d'ADN monobrin de composition moyenne est $\epsilon_{260nm} = 0.027 \text{ cm}^2/\mu\text{g}$ alors que pour une molécule double brin (dsDNA), l'absorption spécifique est seulement de $\epsilon_{260nm} = 0.020 \text{ cm}^2/\mu\text{g}$.

Il est aussi possible de calculer l'ensemble du spectre d'une séquence d'ADN double brin ou simple brin sur un domaine allant de 215 nm à 310 nm. Ceci peut être intéressant dans notre cas, où du fait du spectre de sensibilité du détecteur AlGaIn utilisé, le domaine spectral de la mesure a une largeur de 15-20 nm. Cependant, les spectres d'absorption étant relativement constants, la valeur à 260 nm donne déjà une bonne idée de l'absorption attendue. Des logiciels en ligne peuvent souvent être utilisés pour calculer le coefficient d'absorption d'un brin d'ADN à 260 nm [Tataurov, 2008].

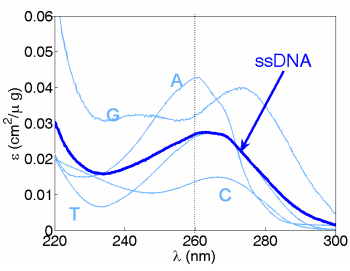
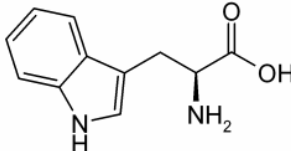
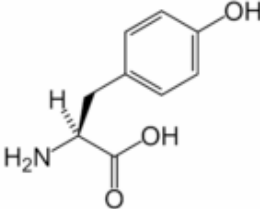
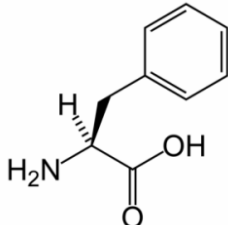
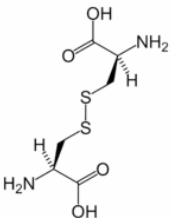
Molécule	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\Delta\lambda$	$\epsilon_{\max} \cdot 10^{-3} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	
Adénine	259	31.5	15	
Cytosine	271	>26.4	8.7	
Guanine	252	>32.4	14.1	
Thymine	267	34.5	9.5	

Tableau 1.3 : Longueur d'onde d'absorption maximale voisine de 260 nm et largeur spectrale à mi-hauteur des éléments biologiques

III-2. b) Absorption des protéines à 280 nm

➤ Absorption des acides aminés

L'absorption des protéines autour de 280 nm est due aux groupements phénol, indole, et phényl contenus dans les acides aminés aromatiques (tryptophane (Trp), Tyrosine (Tyr) et Phénylalanine (Phe), et dans une moindre mesure en cystine (2 molécules de cystéine (Cys) unies par un pont dissulfure). Les formules chimiques de ces molécules sont données Figure 1.11.

			
Tryptophane	Tyrosine	Phénylalanine	Cystine

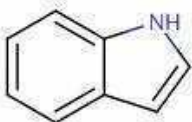
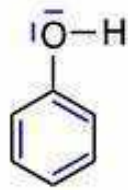
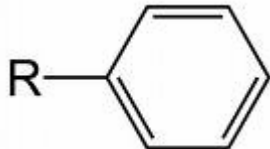
		
Indole	Phénol	Phényl

Figure 1.11: Acides aminés et principaux groupements responsables de l'absorption des protéines dans l'ultraviolet

➤ Coefficient d'extinction

Le coefficient d'absorption à 280 nm d'une protéine peut être calculé à partir de la connaissance de sa séquence d'acides aminés. Le coefficient d'extinction des protéines à 280 nm peut être calculé comme étant la somme pondérée des coefficients d'extinction du contenu en tryptophane, tyrosine et cystéine, normalisé par leur masse molaire. En 1989, Gill et von Hippel [Gill, 1989] développent un modèle qui permet de déterminer le coefficient

d'absorption des protéines à 280 nm à partir de leur séquence en acides aminés. Ce modèle est établi à partir de l'étude du coefficient d'absorption de 18 protéines classiques (mesures de 44 coefficients d'absorption (pH=6.5, 6.0 M guanidium hydrochloride, 0.02 M de tampon phosphater). Les valeurs prédites étaient d'une manière générale valides à $\pm 5\%$, mais différaient de plus de 10% pour 6 d'entre elles. L'Equation 1.8 donne l'expression du coefficient d'extinction établie par ce modèle.

$$\epsilon_{280nm} = ((n_{\text{Trp}} \times 5690) + (n_{\text{Tyr}} \times 1280) + (n_{\text{cystéine}} \times 120)) / \text{MW} \quad (1.8)$$

Ce modèle est ensuite revu par Pace *et al.* [Pace, 1995], qui étudient un ensemble de 80 protéines différentes (mesures de 116 coefficient d'extinction). L'écart type des valeurs prédites en comparaison avec les valeurs calculées est de 3.8%. Pour les 94 protéines contenant des résidus de tryptophane, l'écart type est de 3.2%. Par contre, pour les protéines ne contenant pas de tryptophane, les valeurs peuvent différer de plus de 10%. La formule établie est donnée par l'Equation 1.9.

C'est ce dernier modèle qui est actuellement le plus utilisé pour déterminer le coefficient d'absorption des protéines à partir de leur séquence en acides aminés.

$$\epsilon_{280nm} = ((n_{\text{Trp}} \times 5500) + (n_{\text{Tyr}} \times 1490) + (n_{\text{cystéine}} \times 125)) / \text{MW} \quad (1.9)$$

L'absorption à 280 nm est très largement utilisée par les biologistes et peut servir pour une grande majorité des protéines. Cependant, certaines protéines peuvent avoir un contenu en Trp, Tyr, et Phe insuffisant pour une telle mesure. Dans ce cas, il est aussi possible d'utiliser l'absorption à 200 nm, due aux liaisons peptidiques [Takashima, 1960].

Les longueurs d'absorption maximales des acides aminés responsables de l'absorption à 280 nm et la largeur spectrale à mi-hauteur sont données dans le Tableau 1.4. Les spectres d'absorption des acides aminés aromatiques, responsables de l'absorption dans l'ultraviolet, ainsi que de notre protéine modèle (MetRS) sont aussi donnés dans ce tableau.

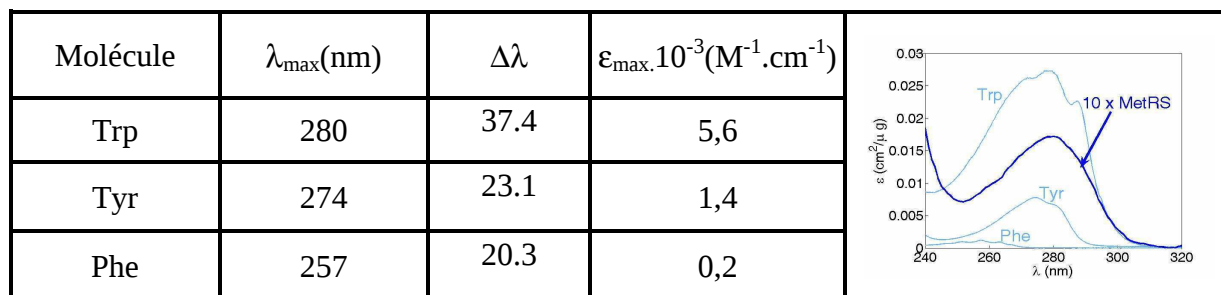


Tableau 1.4: Longueur d'onde d'absorption maximale voisine de 280 nm et largeur spectrale à mi-hauteur des éléments biologiques et coefficient d'extinction à $\lambda_{\max}$

III-2. c) Absorptions surfaciques

Le domaine de longueur d'onde permettant d'exploiter l'absorption UV des éléments biologiques est centré à 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines. On tire ici parti de la largeur spectrale (~20-30 nm) des propriétés d'absorption UV (par opposition aux raies d'absorption Infrarouges).

Cette valeur peut être convertie en coefficient d'absorption surfacique. La mesure de l'absorption d'ADN ou protéines à la surface d'une puce permet de

- contrôler le greffage et la densité de greffage
- contrôler la reconnaissance spécifique entre un antigène et un anticorps
- quantifier ces reconnaissances

La densité de surface de brins d'ADN ou de protéines greffées sur une surface est typiquement comprise entre 2×10^{12} et 1.2×10^{13} molécules par cm^2 pour une saturation effective. Dans le Tableau 1.5, nous donnons les absorptions surfaciques de surface pour des brins de 70 et 500 bases, pour différentes densités de surface. Le Tableau 1.6 donne le coefficient d'absorption de différentes protéines.

Absorption de l'ADN		
Poids moléculaire (Da)	70 bases 22750	500 bases 162500
Densité $2 \cdot 10^{12}$ sondes/cm ²	A_{260nm} 1.9×10^{-3} 0.7 ng/mm ²	A_{260nm} 13.7×10^{-3} 10 ng/mm ²
Densité $1.2 \cdot 10^{13}$ sondes/cm ²	A_{260nm} 11.5×10^{-3} 4.3 ng/mm ²	A_{260nm} 79.5×10^{-3} 30 ng/mm ²

Tableau 1.5: Absorption surfacique de brins d'ADN de 70 bases et 500 bases pour différentes densités surfaciques

Absorption des protéines						
Poids moléculaire (Da)	BSA 66430 Da	Insuline 5734 Da	Lysozyme 14600 Da	Streptavidin 53000 Da	MetRS 64000 Da	IgG 210000 Da
Densité $2 \cdot 10^{12}$ sondes/cm ²	A_{280nm} $1,54 \times 10^{-4}$ 2.2 ng/mm ²	A_{280nm} $1,83 \times 10^{-5}$ 1.8 ng/mm ²	A_{280nm} $1,26 \times 10^{-4}$ 0.5 ng/mm ²	A_{280nm} $5,99 \times 10^{-4}$ 0.5 ng/mm ²	A_{280nm} 3.7×10^{-4}	A_{280nm} $6,98 \times 10^{-4}$
Densité $1.2 \cdot 10^{13}$ sondes/cm ²	A_{280nm} $9,27 \times 10^{-4}$ 13.2 ng/mm ²	A_{280nm} $1,10 \times 10^{-4}$ 10.6 ng/mm ²	A_{280nm} $7,6 \times 10^{-4}$ 2.9 ng/mm ²	A_{280nm} $3,59 \times 10^{-3}$	A_{280nm} 2.2×10^{-3}	A_{280nm} $4,19 \times 10^{-3}$

Tableau 1.6: Absorption surfacique pour différentes protéines et différentes densité surfaciques

III-2. d) Sensibilité

Pour une forte densité surfacique d'éléments biologiques, la sensibilité instrumentale de notre dispositif (rapport signal/bruit de 359, détaillé annexe A) permet de mesurer une absorption minimale de 3×10^{-3} pour un taux de remplissage de 90%. Il est ainsi possible d'observer des monocouches d'ADN ou de protéines de fortes densités, mais la moyenne de plusieurs images successives et sur plusieurs pixels d'un spot biologique peut être nécessaire pour améliorer le seuil de détection. De manière à détecter de plus faibles quantités d'éléments biologiques, nous avons développé des biopuces permettant d'amplifier le contraste d'absorption dans l'ultraviolet. Deux types de puce ont été développées: des structures miroirs quart d'onde, permettant d'obtenir un facteur de l'ordre de $\Gamma=4$ sur le renforcement du contraste. Ceci correspond à une sensibilité de 4000 pg/mm² avec un seuil de détection de 1×10^{-3} [Robin,

2009, a] et a pu être vérifié expérimentalement. Cette sensibilité est suffisante pour observer une monocouche de protéines de densité 4×10^{12} molécules/cm² et identifier la reconnaissance spécifique entre un antigène et un anticorps pour une densité identique. Pour une comparaison avec la sensibilité des capteurs SPR en interrogation de réflectivité, nous prenons un seuil de détection de 2×10^{-4} (moyenne sur plusieurs images successives, et sur différents pixels d'un plot) [Maillart, 2004]. Ceci correspond à une sensibilité de 800 pg/mm² pour les protéines typiques, et 80 pg/mm² pour l'ADN. L'imagerie par réflectivité directe sur puce quart d'onde constitue ainsi une méthode de contrôle de greffage sans marquage et permet de vérifier la spécificité d'une reconnaissance antigène/anticorps pour une forte densité.

Pour obtenir une meilleure sensibilité, des structures mettant en jeu des ondes guidées ont été développées. Elles permettent de renforcer l'interaction lumière-matière. L'approche développée met en jeu des guides d'onde résonants, et permet d'exalter le contraste d'absorption. Avec un facteur d'amplification de 50 sur le contraste, nous aurons une sensibilité de l'ordre de 16 pg/mm² pour les protéines, et de 1.6 pg/mm² pour l'ADN. Ainsi, l'absorption dans l'ultraviolet est une propriété intéressante pour l'imagerie de biopuces.

IV – Détection UV

Le montage utilisé doit comporter une source émettant en UV aux longueurs d'ondes 260-280 nm, une biopuce et un détecteur sensible à ces longueurs d'onde qui va permettre de faire l'image de la puce. Le montage utilisé est un montage en réflexion (Figure 1.12). Des configurations en transmission sont aussi possibles, à condition de disposer de substrats transparents dans l'UV. Ce schéma donne aussi la distribution typique du champ électrique dans la structure pour une structure multicouche (vert) et pour une structure résonante (rouge). Ceci sera revu dans la suite du manuscrit.

Les spectres d'absorption des éléments biologiques sont relativement larges (~20-30 nm) (Tableau 1.3 et Tableau 1.4). De manière à être sensible uniquement à la bande d'absorption des molécules biologiques, une sélection en longueur d'onde sera nécessaire. Celle-ci peut être obtenue soit en insérant un spectroscopie après une source large, soit en utilisant une instrumentation sensible uniquement au domaine d'intérêt, via l'utilisation de sources à spectre étroit (DEL ou laser), de filtres, ou bien de détecteurs spectralement sélectifs. Selon

qu'on souhaite faire de l'imagerie sur puce quart d'onde ou bien en conditions résonantes, on utilisera un filtrage plus ou moins exigeant. Dans le cas d'un spectre large, on bénéficie de plus de flux, mais l'imagerie en conditions résonantes implique un filtrage exigeant (λ_r , θ_r). Le domaine UV suscite depuis quelques années un intérêt croissant avec l'apparition sur le marché de composants à base d'AlGaIn permettant intrinsèquement une sélectivité spectrale. Nous décrivons ici les éléments pouvant être utilisés en imagerie UV.

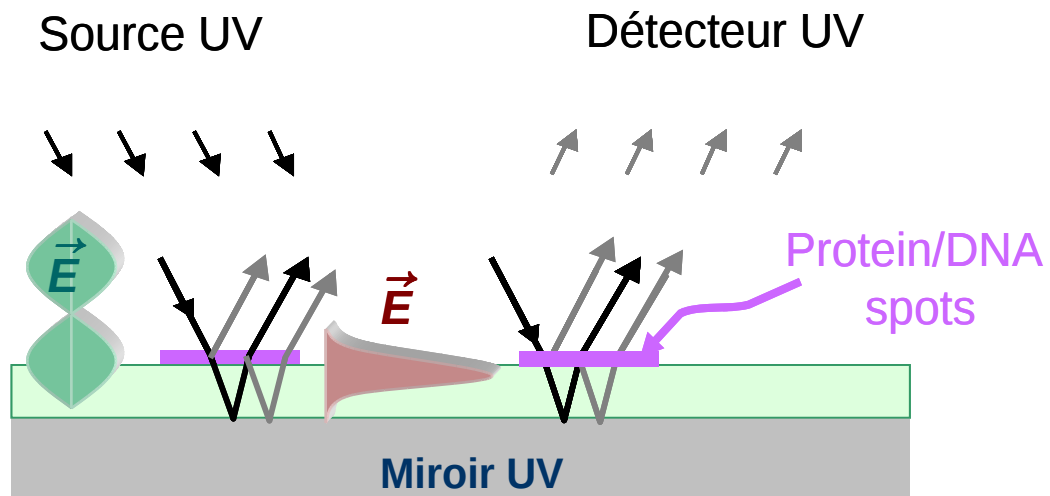


Figure 1.12 : Schéma du dispositif de détection: une source éclaire une biopuce réfléchissante dans l'ultraviolet. Le signal réfléchi est mesuré au moyen d'un détecteur sensible en UV. Selon les spectres d'émission et réponse du détecteur, un filtrage en longueur d'onde peut être nécessaire. La puce peut être simplement un miroir réfléchissant (champs électrique E représenté en vert sur la figure pour une épaisseur de diélectrique quart d'onde), ou bien permettre de guider une onde à proximité des molécules biologiques (champ électrique représenté en rouge). Ceci sera détaillé au chapitre 2.

IV-1. Détecteurs

Dans le domaine de l'imagerie dans l'ultraviolet, on distingue les tubes photomultiplicateurs et les photodiodes semi-conductrices. Selon la largeur spectrale de la réponse de ces détecteurs, ils devront être associés soit à des sources à spectre d'émission étroit (DEL ou laser), soit à des filtres ou bien un spectroscopie.

Les photocathodes permettent un fort rendement et un bon rapport signal/bruit. Cependant, ces détecteurs de faible résolution et dynamique sont assez coûteux et fragiles, et imposent une forte tension d'alimentation (plusieurs centaines d'électrons-volts). Ils sont sensibles de

l'ultraviolet à l'infrarouge, et nécessitent ainsi une sélection des longueurs d'onde pour l'imagerie de biopuce autour de 260 ou 280 nm.

Les photodétecteurs à base de semi-conducteurs sont peu encombrants, légers, et peu coûteux. Ils sont sensibles, et permettent d'obtenir une réponse linéaire, et d'avoir une fréquence d'acquisition élevée. Les détecteurs silicium, CCD ou CMOS, sont pour l'instant les plus courants. Cependant, des filtres sont là aussi nécessaires pour la sélection des longueurs d'onde d'intérêt. Un autre inconvénient du silicium est le vieillissement, du fait de l'absorption des radiations d'énergie très supérieure au gap du semi-conducteur (plus faible énergie de liaisons dans le silicium que dans l'AlGaIn). Cependant, les faibles flux utilisés dans l'imagerie de biopuces ne devraient pas poser de problèmes de vieillissement. Ainsi, ces dernières années, les matériaux à grand gap suscitent un intérêt particulièrement important dans le domaine de la détection UV.

Le gap direct de l'AlGaIn permet de développer des composants sensibles à l'UV mais ne nécessitant pas de filtrage. Selon les proportions d'aluminium et de gallium, le seuil peut être ajusté de 200 nm (pour l'AlN) à 360 nm (pour le GaN). Initialement, les détecteurs AlGaIn ont été développés par Thales pour les applications solar-blind avec une longueur d'onde de coupure de 280 nm, les radiations solaires d'énergie supérieure sont bloquées par la couche d'ozone. La largeur spectrale de la réponse du détecteur est de l'ordre de 20 nm. Le taux de réjection du visible à la coupure est de 3 à 4 ordres de grandeur. Il est actuellement limité par la réponse de photoémission interne dans les contacts. Pour une proportion d'aluminium de 45%, la longueur d'onde de coupure est de 280 nm, et le détecteur est alors insensible à la lumière diurne et facilite la mise en œuvre du dispositif. L'absorption de l'ADN et des protéines étant maximale autour de la longueur d'onde de 260 nm et 280 nm respectivement, et les spectres d'absorption étant relativement larges, des détecteurs ont été adaptés pour des applications d'imagerie de biopuces. Selon que l'on souhaite détecter de l'ADN ou des protéines, la composition des couches du détecteur utilisé sera différente.

Pour une détection d'ADN ou ARN centrée à 260 nm, le taux d'aluminium est de 47%, alors qu'il est de 39% pour une détection centrée à 280 nm. La Figure 1.13 donne les réponses spectrales des photocathodes, ainsi que de détecteurs AlGaIn centrés à 260 nm, et 280 nm respectivement.

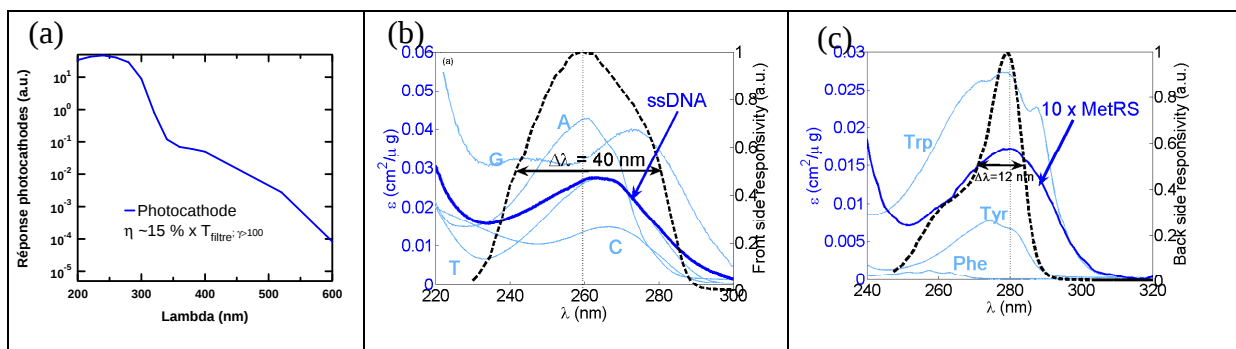


Figure 1.13 : (a) Réponse spectrale des photocathodes et (b) Réponse spectrales centrées à 260 nm superposées au spectre d'absorption de l'ADN et de ses nucléotides et (c) Réponse spectrale d'un détecteur AlGaIn centrée à 280 nm superposée aux spectres des acides aminés aromatiques responsables de l'absorption des protéines à 280 nm, ainsi que de la méthionyl-ARNt synthétase, protéine modèle utilisée dans ce travail.

IV-2. Filtres

Pour sélectionner le domaine spectral d'intérêt, les photocathodes ou capteurs à base de silicium doivent être associées à des filtres, ou à un éclairage spectralement sélectif. Ce qui n'est pas le cas avec nos imageurs AlGaIn dans les situations les plus usuelles. Parmi les filtres, on distingue les verres colorés, les filtres interférentiels, les filtres à polymères dopés par des colorants, et les filtres à matériaux inorganiques.

Les filtres à colorants dans une matrice polymère associés aux autres matériaux précités offrent une largeur spectrale compatible avec l'imagerie d'éléments biologiques ($\Delta\lambda \sim 15$ -20 nm). Un avantage majeur est leur large acceptante angulaire. Ils permettent une transmission de 10-25% dans la bande d'intérêt et une transmission de 9 ordres de grandeurs plus faibles sur le reste du spectre jusqu'à 700 nm [Linder, 1998]. Les filtres interférentiels (Fabry-Perot) permettent d'obtenir la bonne largeur spectrale mais ils sont très sensibles à l'angle d'incidence. Les filtres à cristaux inorganiques ont une mauvaise stabilité aux variations hygrométriques. De transmission large (>50 nm), ils peuvent être utilisés avec une source spectralement sélective pour sélectionner le domaine de longueur d'onde autour du pic d'absorption des éléments biologiques. Cependant, dans le choix des filtres, nous devons aussi prendre en compte la fluorescence des éléments biologiques et des supports. En effet, pour une excitation autour de 280 nm par exemple, le tryptophane présente un pic de fluorescence centré à 360 nm.

IV-3. Différents types de sources

Les sources à vapeur sont longtemps restées les seules sources existant en UV. Les DELs AlGaIn et les sources laser modifient le paysage des sources UV existant actuellement.

IV-3. a) Les lampes

Les autres sources émettant aux longueurs d'onde qui nous intéressent sont les sources deutérium, xénon, mercure. Ces sources sont de plus en plus puissantes, stables et compactes aux courtes longueurs d'onde. Pour des problématiques de toxicité, les lampes deutérium et xénon sont aujourd'hui privilégiées par rapport aux sources mercure. Le spectre du mercure présente de nombreuses raies dans le domaine UV-visible qui peuvent être utilisées pour la calibration d'instrument tels que des spectroscopes, mais sont un inconvénient lorsque l'on souhaite réaliser un spectre. Les sources Xénon flash permettent une forte puissance, mais elles restent très bruyantes (Fluctuations rms 3% d'un flash à l'autre). Sur la Figure 1.14, nous donnons les spectres de différentes lampes à vapeur existant actuellement sur le marché [Hamamatsu, 2009], ainsi que leur intensités.

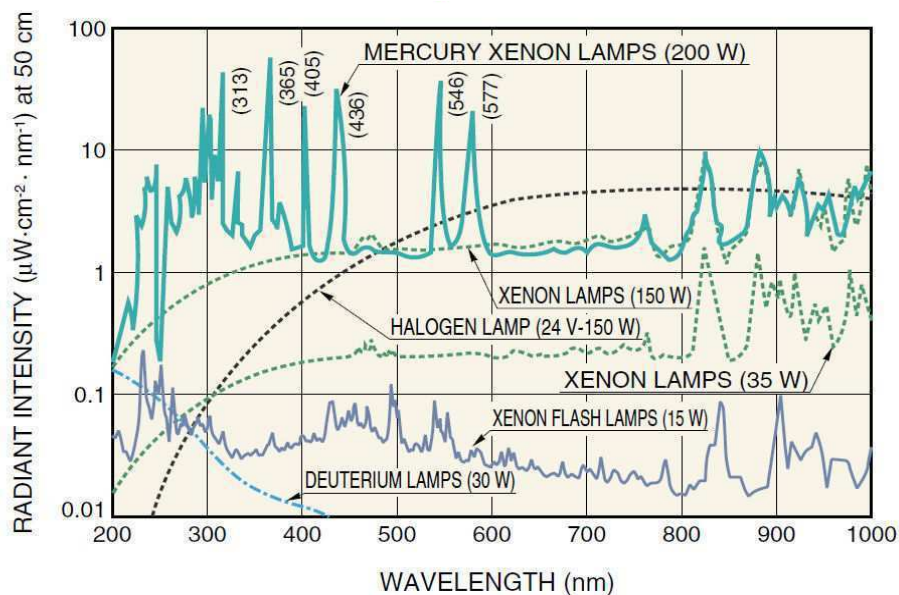


Figure 1.14: Réponse spectrale de différentes sources à vapeur continues ou flash.
Copyright Catalogue Hamamatsu [Hamamatsu, 2009]

IV-3. b) Diodes électroluminescentes (DEL)

Les récents progrès dans le domaine de l'AlGaIn ont rendues les DELs UV d'autant plus intéressantes [Gaska, 2006] qu'elles permettent de réduire les coûts de manière importante.

Cependant, elles sont encore peu puissantes, avec une puissance de 0.5 mW pour les DELs centrées à 280 nm par exemple. L'ouverture angulaire dans laquelle elles émettent est de 120°. La Figure 1.15 donne les spectres d'émission de DELs à base d'AlGaIn. Une source à 280 nm de 42 mW alimentée 1 A a été annoncée très récemment [Adivarahan, 2009], mais sa topologie contrainte par les problématiques de thermiques la rend inutilisable pour une mise en forme de faisceau adéquate.

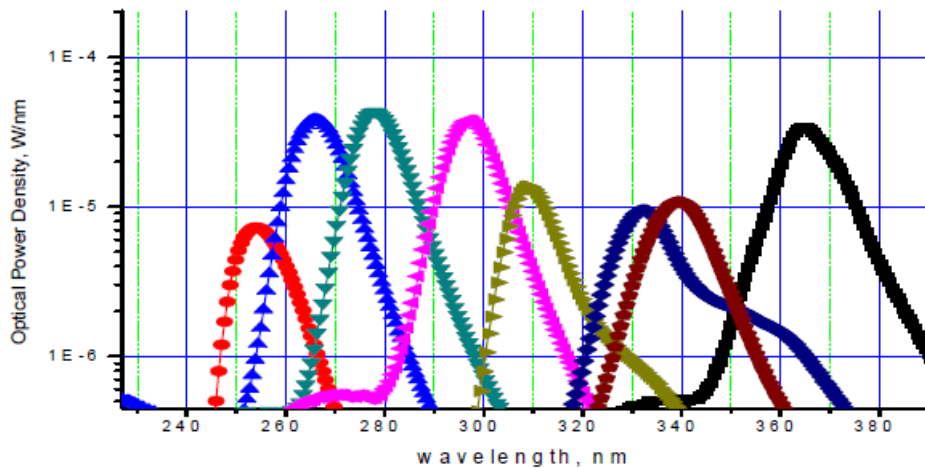


Figure 1.15: Spectre d'électroluminescence de DEL deep-UV avec 8 longueurs d'onde centrales différentes [Gaska, 2008].

IV-3. c) Lasers

Il est aussi possible d'utiliser des sources lasers, mais en limitant la puissance pour l'éclairage des éléments biologiques de manière à limiter la dénaturation. Ainsi, des lasers continus doivent être choisis. Cependant, peu de lasers continus ont été développés jusqu'ici, et ils restent très chers.

Les lasers à semi-conducteurs commerciaux sont disponibles à la longueur d'onde de 405 nm pour les applications d'enregistrement optique (blue-ray). Cependant, ils ne sont pas encore

disponibles aux longueurs d'onde qui nous intéressent. De plus la qualité de faisceau attendue n'est pas très bonne.

Les lasers à gaz sont encombrants et peu efficace (plusieurs kW de puissance électrique pour quelques mW d'émission dans l'UV). Les lasers utilisés pour obtenir une illumination à 266 nm sont obtenus en quadruplant un laser YAG de longueur d'onde 1064 nm. Les lasers UV développés par Sony utilisent ce principe : un laser monofréquence à 532 nm est doublé en cavité externe non linéaire résonante. La seconde conversion peut être très efficace si la finesse de la cavité est très grande. Elle doit être réglée sur la fréquence exacte de la source laser à 532 nm, ce qui implique que cette dernière doit être très stable et sans saut de mode, et qu'un système d'asservissement rapide de la cavité doit être mis en place. Par conséquent ces sources sont très sensibles aux vibrations externes et sont encombrantes et coûteuses.

Des progrès pourraient être apportés par des lasers en cavité monolithiques extrêmement stables en fréquence. Les seules variations de fréquence étant d'origine thermique, elles sont de faibles amplitude et peuvent être limitées grâce à un contrôle de température précis [Oxxius]. Les puissances attendues sont de 5 mW.

Pour un faisceau gaussien, la divergence à mi-hauteur θ est donnée par :

$$\theta = \frac{\lambda}{\pi\omega_0}, \quad (1.10)$$

où λ désigne la longueur d'onde et ω_0 le diamètre minimal du faisceau. Pour une longueur d'onde de $\lambda=280$ nm, et un diamètre de faisceau de 0.5 mm, on aura une divergence de 0.017 mrad (0.1°).

IV-3. d) Comparaison de la puissance des différentes sources

Nous réalisons ici une comparaison des différentes sources entre elles. Etant donné que nous nous intéressons à l'imagerie en conditions résonantes, les chiffres seront exprimés par nm et par degré d'ouverture angulaire du faisceau.

Si les lasers sont de loin les sources les plus puissantes pour réaliser de l'imagerie en conditions résonantes, et permettant d'avoir une puissance de 0.5 mW à la longueur d'onde de

266 nm, ils restent aujourd'hui très coûteux, et la grande cohérence de la source induit des problèmes de travelure (speckle) en imagerie.

En ce qui concerne les DELs, la puissance totale centrée à 280 nm est de 0.5 mW. Le spectre d'émission est de forme gaussienne et sa largeur à mi-hauteur est de 12 nm. Pour un éclairage en conditions résonantes, nous considérons le flux dans une largeur spectrale de 1.5 nm. Ainsi, dans la bande spectrale d'intérêt, ceci correspond à une puissance de $63\mu\text{W}/1.5\text{ nm}$ dans un angle d'ouverture de 120° . Une source étendue est considérée comme un ensemble d'objets ponctuels indépendants les uns des autres. La conservation du flux lumineux est décrite par la relation des sinus d'Abbe :

$$S_{\text{source}} \sin^2(\theta_{\text{source}}) = S_{\text{biopuce}} \sin^2(\theta_{\text{biopuce}}) \quad (1.11)$$

Comme nous le verrons dans ce manuscrit, la loi (λ, θ) suivie par la résonance est quasiment linéaire de pente $0.57^\circ/1.5\text{nm}$. L'ouverture angulaire de la DEL est de 120° , et la taille de la puce de $200 \times 200\ \mu\text{m}^2$. Ainsi, pour $\theta_{\text{biopuce}} = 0.57^\circ$, on aura : $S_{\text{biopuce}}/S_{\text{source}} = 1224$. Ceci correspond à une surface éclairée sur la puce de $35 \times 35\ \text{mm}^2$. Si l'on considère une surface utile sur la puce de $3.8 \times 4.8\ \text{mm}^2$, on aura alors un flux utile de $0.9\ \mu\text{W}$ sur le détecteur.

Pour la source Xénon 75W, la puissance émise est de $0.4\ \mu\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2$ à 50 cm. Cette puissance est émise dans un angle Ω de 60° (surface $2100\ \text{cm}^2$), ce qui correspond à une puissance de $0.8\ \text{mW}/\text{nm}$, et $1.2\ \text{mW}/1.5\text{nm}$.

Dans un angle de 0.57° , on a un flux sur le détecteur de $2.2\ \mu\text{W}/1.5\text{nm}$, soit par rapport à la DEL, environ 2.5 fois plus de signal. À partir de ces chiffres nous discuterons au chapitre 4 des temps d'intégration nécessaires pour obtenir un rapport signal sur bruit convenable pour l'imagerie de biopuces.

IV-4. Sensibilité limite

Les valeurs du bruit du détecteur sont développées en annexe. Pour un temps d'acquisition de 100 msec, le rapport signal/bruit est de 359. Comme nous l'avons vu en III-2. c), l'absorption d'une monocouche d'ADN ou de protéine pour les densités surfaciques typiques correspondant à des monocouches est de l'ordre de 10^{-2} - 10^{-3} . Pour une comparaison avec les

sensibilités obtenues en imagerie par plasmons de surface, on prend un seuil de détection de 2×10^{-4} . Ceci permet d'obtenir des sensibilités de 800 pg/mm² pour des protéines en transmission, et de 80 pg/mm² pour une détection d'ADN. Pour être sensible à des variations de la densité surfacique à la surface de la puce de l'ordre de 10 pg/mm² (~sensibilité de l'imagerie SPR), il est nécessaire d'amplifier le contraste. Ceci sera réalisé en concevant des biopuces permettant d'augmenter l'interaction lumière/matière, et donc de favoriser le contraste d'absorption. Nous verrons dans un premier temps que les biopuces multicouches permettent de gagner de l'ordre d'un facteur $\times 4$ sur l'amplification du contraste. Les biopuces structurées permettant de renforcer les propriétés de couplage lumière-matière permettront d'obtenir de plus fort facteur de renforcement de contraste. Un seuil de détection de 16 pg/mm² pour les protéines et 1.6 pg/mm² pour l'ADN pour un renforcement du contraste d'absorption d'un facteur 50.

V - Discussion

Dans ce chapitre, nous avons vu les différentes méthodes de biodétection existantes, et plus particulièrement les méthodes de biodétection optiques. Ceci nous a permis de mettre en évidence les paramètres essentiels nécessaires.

Notre méthode est une méthode d'imagerie permettant une détection multiplexe. Elle exploite entre autre les propriétés d'absorption des molécules biologiques dans l'ultraviolet. Deux mises en œuvre seront étudiées. La première consistera en l'imagerie sur structures multicouches. La seconde mettra en jeu des propriétés de résonance pour une meilleure sensibilité.

On exploitera alors des ondes guidées, qui permettront de sonder la surface recouverte d'éléments biologiques. Nous exploitons les résonances des modes guidés. La mesure est réalisée directement sur les ordres diffractés vers l'extérieur, et ne mesure pas l'onde guidée. Ainsi, il n'est pas nécessaire d'extraire l'onde vers l'extérieur du guide pour pouvoir réaliser la mesure. Notre dispositif permet donc de faire de l'imagerie, point essentiel pour la détection multiplexe. Comme il sera détaillé dans la suite du manuscrit, de manière similaire aux autres méthodes basées sur des ondes guidées, les sensibilités théoriques qu'il est possible

d'obtenir sont du même ordre de grandeur que celle de ces autres techniques ayant déjà fait leur preuve. Tout comme en SPR, aujourd'hui méthode de biodétection sans marquage de référence, nous pouvons faire de l'imagerie multiplexe.

L'avantage des couplages dans les structures diélectriques est la modulation du recouvrement du mode guidé avec les éléments à détecter. Selon les paramètres de la structure, on pourra l'adapter pour sonder des éléments biologiques de taille plus ou moins importante. Ces paramètres permettront aussi d'adapter la finesse des résonances, permettant d'être plus sensible en imagerie que la SPR. De plus, les guides d'ondes résonants ne sont pas restrictifs par rapport à la longueur d'onde, et nos structures ont donc été conçues pour être utilisées dans l'ultraviolet. Ceci permet de bénéficier de l'absorption des éléments biologiques, ainsi que de la courte longueur d'onde. Le travail présenté dans ce manuscrit s'appuie sur un exemple modèle de biopuces à protéines, greffée avec de la méthionyl-ARNt synthétase. Le coefficient d'absorption de cette protéine est représentatif des absorptions des biopuces immunologiques. La MetRS reconnaît spécifiquement l'ARNt^{Met}. Les interactions avec les molécules d'ARN pourront donc être observées si l'on introduit une solution contenant de l'ARNt^{Met}. Pour une densité surfacique massique donnée l'absorption de l'ADN est d'un ordre de grandeur plus important que celui des protéines. Ainsi, la validation de notre sensibilité avec des biopuces immunologiques valide a fortiori notre limite de détection pour les biopuces à ADN (identification génétique).

Du fait de l'absorption des molécules biologiques, le domaine de longueur d'onde que nous avons choisi est l'ultraviolet. L'effet de la partie réelle de l'indice optique pourra aussi être exploité pour augmenter le contraste. La détection dans l'ultraviolet permet de bénéficier de la courte longueur d'onde, qui permettra d'être plus sensible aux variations d'indice effectif du fait des faibles dimensions. L'intérêt croissant dans les technologies UV rendra notre dispositif de détection facilement accessible.

Références

- [Adivarahan, 2009] V. Adivarahan, A. Heidari, B. Zhang, Q. Fareed, S. Hwang, M. Islam and A. Khan “280 nm Deep Ultraviolet Light Emitting Diode Lamp with an AlGaIn Multiple Quantum Well Active Region” *Applied Physics Express* 2, 102101 (2009)
- [Affymetrix] <http://www.affymetrix.com/index.affx>
- [Araci, 2007] I.E. Araci, S.B. Mendes, N. Yurt, S. Honkanen, and N. Peyghambarian, “Highly sensitive spectroscopic detection of heme-protein submonolayer films by channel integrated optical waveguide” *Optics Express*, Vol. 15 (9): 5595-5603, 2007.
- [Biacore] Biacore Product Brochure, “Biacore 3000,” 2007.
- http://www.biacore.com/lifesciences/products/systems_overview/3000/system_information/index.html
- [Birkert, 2002] O. Birkert, R. Tünnemann, G. Jung, and Günter Gauglitz, “Label-Free Parallel Screening of Combinatorial Triazine Libraries Using Reflectometric Interference Spectroscopy” *Analytical Chemistry*, Vol. 74 (4): 834–840, 2002.
- [Brandenburg, 1993] A. Brandenburg and A. Gombert, “Grating couplers as chemical sensors: a new optical configuration”, *Sensors and Actuators, B*, Vol. 17 : 35-40, 1993.
- [Brevet, 2005] Brevet FR0511346, J.L. Reverchon, G. Maezzo, « Dispositif d'imagerie pour biopuces, et biopuce associée », Thales, 2005.
- [Cantor, 1970] C.R. Cantor, M.M. Warshaw, and H. Shapiro, “Oligonucleotide interactions. III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides”, *Biopolymers*, Vol. 9 (9): 1059-1077, 1970.
- [Cavaluzzi, 2004] M.J. Cavaluzzi, P.N. Borer, “Revised UV extinction coefficient for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA”, *Nucleic Acid Research*, Vol. 32(13), 2004.
- [Choumane, 2005] H. Choumane, N. Ha, C. Nelep, A. Chardon, G. O. Reymond, C. Goutel, G. Cerovic, F. Vallet, C. Weisbuch, and H. Benisty, “Double interference fluorescence enhancement from reflective slides: Application to bicolor microarrays”, *Applied Physics Letters*, Vol. 87, p. 031102, 2005.
- [Corning] www.corning.com
- [Cottier, 2003] K. Cottier, M. Wiki, G. Voirin, H. Gao, and R.E. Kunz, “Label-free highly sensitive detection of (small) molecules by wavelength interrogation of integrated optical chips” *Sensors and Actuators B*, Vol. 91: 241-251, 2003.
- [Cuypers, 1978] P.A. Cuypers, W.T. Hermens, and H.C. Hemker, “Ellipsometry as a tool to study protein films at liquid-solid interfaces” *Analytical Biochemistry*, Vol. 84: 56-57, 1978.
- [Cunningham, 2002, a] B.T. Cunningham, P. Li, B. Lin, and J. Pepper, “Colorimetric Resonant Reflection as a Direct Biochemical Assay Technique”, *Sensors and Actuators B*, Vol. 81, pp. 316-328, 2002.

- [Cunningham, 2002, b] B.T. Cunningham, J. Qiu, P. Li, and C. Baird, "Enhancing the surface sensitivity of colorimetric resonant optical biosensors" *Sensors and Actuators B*, Vol. 87 (2): 365-370, 2002.
- [Du, 1998] H. Du, R.A. Fuh, J. Li, A. Corkan, and J.S. Lindsey, "PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry" *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 68: 141-142, 1998.
- [Eing, 2002] A. Eing and M. Vaupel, "Imaging Ellipsometry in Biotechnology" EP3 Biotech report, Nanofilm Technologie, Scientific Series, 2002.
- [Fasman, 1975] G.D. Fasman, *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, (CRC Press, Cleveland, Ohio), volume 1:Nucleic acids, 1975.
- [Fujimura, 2005] T. Fujimura, K. Takenaka, and Yasushi Goto, "Silicon-Based Optical Thin-Film Biosensor Array for Real-time Measurements of Biomolecular Interaction" *Japanese Journal of Applied. Physics* Vol. 44: 2849-2853, 2005.
- [Ganesh, 2006] N. Ganesh, I.D. Block, and B.T. Cunningham, "Near ultraviolet-wavelength photonic-crystal biosensor with enhanced surface-to-bulk sensitivity ratio" *Applied Physics Letters*, Vol. 89 (2): 023901-023904, 2006.
- [Gill, 1989] S.C. Gill and P.H. von Hippel, "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data" *Analytical Biochemistry*, Vol. 182(2), 319-326, 1989.
- [Gaska, 2006], R. Gaska, and J. Zhang, "Deep-UV DELs: Physics, Performance and applications", *Proc. SPIE*, Volume 6037, pp. 37-49, 2006.
- [Golubenko, 1985] G.A. Golubenko, A.S. Svakhin, V.A. Sychugov, A.V. Tishchenko, "Total reflection of light from a corrugated surface of a dielectric waveguide", *Soviet Journal of Quantum electronics*, Vol. 15, 886-887, 1985.
- [Heidemann, 1993] R. Heidemann, R. Kooyman and J. Greve, "Performance of a highly sensitive optical waveguide MachZehnder interferometer" *Sensors and Actuators*, Vol. 10: 209-217, 1993.
- [Karvinen, 2008] P. Karvinen, T. Nuutinen, O. Hyvärinen, and P.Vahimaa, "Dielectric subwavelength resonant waveguide grating enhancing laser -induced fluorescence", *Proc. of EOS Annual Meeting*, 2008.
- [Kretschmann, 1979] E. Kretschmann, H. Raether, "Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light", *Z. Naturforsch.*, Vol. 23A, 2135–2136, 1968.
- [Kunz, 2007] R.E. Kunz, K. Cottier "Optimizing integrated optical chips for label-free (bio-)chemical sensing", *Analytical and bioanalytical chemistry*, Vol. 384(1), 2006.
- [Leckband, 2001] D. Leckband and J. Israelachvili, "Intermolecular forces in biology" , *Quarterly Reviews of Biophysics*, Vol 34 (2) pp. 105-267, 2001
- [Liebermann, 2000] T. Liebermann, W. Knoll, P. Sluka, and R. Herrmann, "Complement hybridization from solution to surface-attached probe-oligonucleotides observed by surface-plasmon-field-enhanced fluorescence spectroscopy" *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 169 (1-3): 337-350, 2000.

- [Liedberg, 1983] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, “Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing”, *Sensors and Actuators*, 4: 299–304, 1983
- [Linder, 1998] M. B. Linder, S. Elstein, J. Wallace, P. Lindner, “Solar blind bandpass filters for UV imaging devices”, *Proc. SPIE Vol. 3302*, p. 176-183, 1998.
- [Lukosz, 1983] W. Lukosz and K. Tiefenthaler, “Directional switching in planar waveguides effected by adsorption–desorption processes,” *Proceedings of the Second European Conference on Integrated Optics*, Florence, Italy, Conf. Pub. 227 ~IEE, London, pp. 152-155, 1983.
- [Lukosz, 1990] W. Lukosz, P.M. Nellen, C. Stamm, and P. Weiss, “Output grating couplers on planar waveguides as integrated optical chemical sensors” *Sensors and Actuators*, Vol. B1: 585-588, 1990.
- [Maillart, 2004] E. Maillart, «Imagerie par résonance des plasmons de surface pour l’analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel », thèse de doctorat Université Paris XI, France, 2004.
- [Marcy, 2008] Y. Marcy, H. Benisty, C. Weisbuch, J.C. Avarre, P.Y. Cousin, M. Rattier, G. Cerovic, G. Escalier, G. Béna, M. Guéron, L. McDonagh, F. le Boulaire, “Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays”, *BioTechniques*, Vol. 44(7), 2008, pp. 913–920, 2008.
- [Mellot, 1989] P. Mellot, Y. Mechulam, D. LeCorre, S. Blanquet, G. Fayat, “Identification of an amino acid region supporting specific methionyl-tRNA synthetase: tRNA recognition”, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 208 ,429-443, 1989.
- [Mendes, 1999] S. B. Mendes and S. S. Saavedra “On probing molecular monolayers: a spectroscopic optical waveguide approach of ultra-sensitivity.”, *Optics Express*, Vol. 4(11): pp 449-456, 1999.
- [Mendes, 2009] <http://www.physics.louisville.edu/sbmendes/research.htm>
- [Möhler, 2006] B.P. Möhrle, K. Köhler, J. Jaehrling, R. Brock, G. Günter, “Label-free characterization of cell adhesion using reflectometric interference spectroscopy (RIfS)” *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 384 (2): 407-413, 2006.
- [Nakkach, 2008] M. Nakkach, P. Lecaruyer, F. Bardin, J. Sakly, Z. B. Lakhdar, and M. Canva, “Absorption and related optical dispersion effects on the spectral response of a surface plasmon resonance sensor” *Applied Optics*, Vol. 47 (33): 6177-6182, 2008.
- [Nellen, 1998] P.M. Nellen, K. Tiefenthaler, and W. Lukosz, “Integrated optical input grating couplers as biochemical sensors” *Sensors and Actuators*, Vol. 15: 285-295, 1998.
- [Ostroff, 1998] R.M. Ostroff, D. Maul, G.R. Bogart, S. Yang, J. Christian, D. Hopkins, D. Clark, B. Trotter, and G. Moddel, “Fixed polarizer ellipsometry for simple and sensitive detection of thin films generated by specific molecular interactions: applications in immunoassays and DNA sequence detection” , *Clinical Chemistry*, 1998.
- [Owczarzy, 2008] <http://www.owczarzy.net/extinct.htm>
- [Oxxius] <http://www.oxxius.com/pages/en/home.php>

- [Pace, 1995] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray, "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein?" *Protein Science*, Vol.4 (11): 2411-2423, 1995.
- [Reverchon, 2006] J.L. Reverchon, C. Meyer, G. Mazzeo, and S.Cassette, "UV imaging of biochips: limitations of contrast" *Proc. of SPIE Europe n°6398-25 Optics and photonics in Security and Defence*, 2006.
- [Robin, 2009,a] K. Robin, J.L. Reverchon, L. Mugherli, M. Fromant, P. Plateau, H. Benisty, "Detection of biological macromolecules on a biochip dedicated to UV specific absorption", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol 24(6), Pages 1585-1591, 2009.
- [Robin, 2009,b] K. Robin, J.L. Reverchon, L. Mugherli, M. Fromant, H. Benisty, "Biodetection of DNA and proteins using enhanced UV absorption by structuration of the chip surface", Vol 7188, 2009.
- [Schmitt, 2007] K. Schmitt, B. Schirmer, C. Hoffmann, A. Brandenburg, and P. Meyrueis, "Interferometric biosensor based on planar optical waveguide sensor chips for label-free detection of surface bound bioreactions" *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 22 (11): 2591-2597, 2007.
- [Schmitt, 2008] K. Schmitt, K. Oehse, G. Sulz and C. Hoffmann, "Evanescent field Sensors Based on Tantalum Pentoxide Waveguides – A Review", *Sensors*, Vol. 8, 711-738, 2008.
- [Söll, 1994] D. Söll and U.L. RajBhandary "tRNA : structure, biosynthesis and function"
- [SRU Biosystems] <http://www.srubiosystems.com/>
- [Sugimoto, 1996] N. Sugimoto, S. Nakano, M. Yoneyama, K. Honda, "Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes" *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, 4501–4505, 1996.
- [Takashima, 1960] S. Takashima, "Ultra-violet Absorption Spectra of Proteins in Deuterium Oxide" *Nature*, Vol. 187: 597-598, 1960.
- [Tataurov, 2008] A.V. Tataurov, Y. You, R. Owczarzy, "Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids" *Biophys. Chem.*, Vol.133(1-3):66-70, 2008. <http://biophysics.idtdna.com/>
- [Yeatman, 1996] E. M. Yeatman, "Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing" *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 11 (617): 635-649, 1996.

Chapitre II

Théorie des renforcements de contrastes

Dans ce chapitre, nous présentons des biopuces permettant d'exalter l'influence de la couche biologique à la surface de la puce. Les premières structures sont des structures multicouches. Elles ont une épaisseur quart d'onde, permettant de maximiser l'interaction avec l'élément biologique, celui-ci se trouvant dans le ventre de l'onde stationnaire. Pour permettre de meilleures sensibilités, on réalise une structuration de la puce, qui va permettre d'exploiter des propriétés de couplage lumière-matière. Le couplage se manifeste par des anomalies sur l'efficacité des ordres diffractés. Les influences du déphasage et de l'absorption sur le contraste sont discutées.

I - Contraste sur structures multicouches

I-1. Définition du contraste

Notre méthode de détection étant une méthode d'imagerie, la quantité qui nous intéresse est la contraste au niveau des spots, résultant de la variation de signal induite par les espèces biologiques qui se sont accrochées au niveau des spots. La Figure 2.1 donne une image typique d'une image de biopuce, avec 3 différents types d'espèce biologique. La couche biologique a pour coefficient d'absorption α , et pour épaisseur ℓ . Pour le choix de α et de

l'épaisseur de la couche ℓ , on évalue d'abord l'absorption attendue pour une monocouche, correspondant au produit $\alpha\ell$. La réflectivité de la puce en dehors des spots est notée I_{puce} . Les éléments biologiques induisent une variation du signal. On note I_{spot} le signal au niveau des spots biologiques. Le contraste est alors défini par:

$$C = \frac{\Delta I}{I} = \frac{I_{puce} - I_{spot}}{I_{puce}} \quad (2.1)$$

La définition $2 \times (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min})$ n'est pas utilisée ici : nous choisissons de normaliser par le signal de la puce I_{puce} qui constitue ainsi notre signal de référence. Le signe est choisi de telle sorte qu'un contraste d'absorption, c'est-à-dire une diminution de signal corresponde à un contraste positif.

Les variations de réflectivité mesurées étant faibles, les valeurs calculées par notre définition seront en général très proches de celles obtenues en divisant par la moyenne. Le contraste est inversement proportionnel à la transmission/réflectivité de la puce. Le seuil de détection est aussi limité par le rapport signal/bruit de la mesure. Un trop faible signal impliquera d'intégrer sur plus de temps ou une détérioration du rapport signal sur bruit pour une durée d'intégration donnée. Nous serons donc vigilants sur le fait de ne pas avoir un signal optique trop faible.

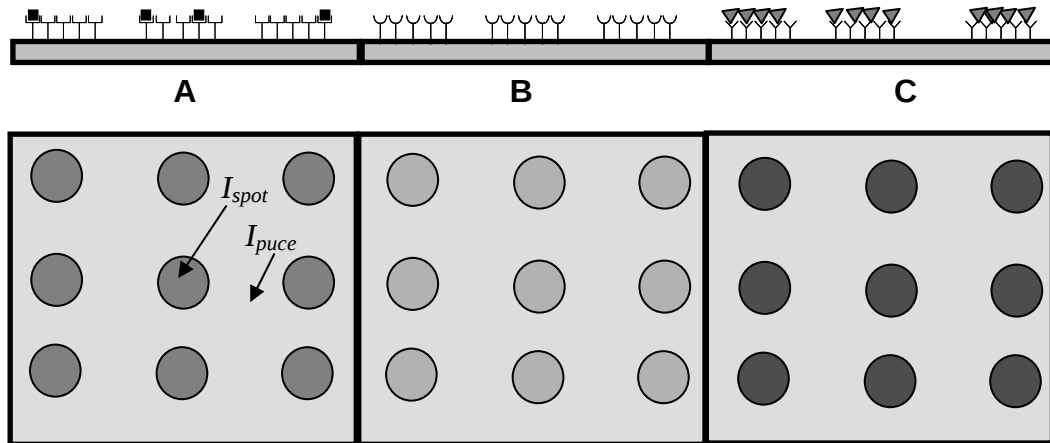


Figure 2.1 : Image typique d'une biopuce avec 3 types d'anticorps différents à la surface de la puce. La présence d'éléments biologique induit une variation du signal I_{spot} au niveau des spots biologiques. En

I-2. Absorption

I-2. a) Approche dipolaire

L'absorption peut être décrite de manière macroscopique dans le cadre des équations classiques de l'électromagnétisme [Basu, 2003] [Bonin, 1997]. Nous écrivons ici les équations de Maxwell pour une onde monochromatique dans un milieu isotrope non-magnétique et dépourvu de charges libres.

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{div } \vec{B} = 0 \\ \text{div } \vec{D} = 0 \quad \Leftrightarrow \quad \text{div } \vec{E} = \frac{\rho_p}{\epsilon_0} \\ \text{rot } \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\ \text{rot } \vec{B} = \mu_0 \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \end{array} \right. \quad (2.2)$$

où ρ_p désigne la densité de charge électrique du milieu, et $\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}$. La couche absorbante peut être considérée comme une couche de dipôles rayonnants. Cette couche est éclairée par une onde plane, de champ électrique E_{inc} .

Si on note χ sa susceptibilité, la polarisation induite par le champ électrique est donnée par :

$\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E}_{\text{inc}}$, où $\vec{E}_{\text{inc}}$ correspond au champ électrique incident, soit :

$$\vec{D} = \epsilon_0 (1 + \chi) \vec{E}$$

On établit ensuite l'équation satisfaite par le champ électrique en utilisant l'égalité vectorielle : $\text{rot}(\text{rot}(\vec{E})) = \text{grad}(\text{div}(\vec{E})) - \Delta \vec{E}$

$$\text{rot} \left(-\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) = \text{grad} \left(\frac{\rho_p}{\epsilon_0} \right) - \Delta \vec{E}, \text{ soit}$$

$$-\frac{\partial}{\partial t} \left(\mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial (1 + \chi) \vec{E}}{\partial t} \right) = -\Delta \vec{E}$$

$$\Delta \vec{E} - \frac{(1 + \chi)}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = 0 \quad (2.3)$$

La solution de cette équation s'écrit alors :

$$\vec{E} = \text{Re} \left(\vec{E}_0 e^{i(qr - \omega t)} \right), \quad (2.4)$$

où q désigne le vecteur de propagation complexe, soit :

$$q = \frac{\omega}{c} \sqrt{1 + \chi}$$

Le vecteur d'onde q peut aussi s'écrire :

$$q = \frac{\omega}{c} N \vec{u} \text{ avec } N = n + i\kappa = \sqrt{1 + \chi}, \text{ et } \chi = \chi' + i\chi'' \quad (2.5)$$

Soit $n^2 + 2i n \kappa - \kappa^2 = 1 + \chi' + i\chi''$

$$\begin{cases} 1 + \chi' = n^2 - \kappa^2 \\ \chi'' = 2 n \kappa \end{cases} \quad (2.6)$$

I-2. b) Absorption en transmission

En incidence normale (propagation suivant z):

$$\vec{E} = \text{Re} \left(\vec{E}_0 e^{i \left(\frac{2\pi}{\lambda} n r u - \omega t \right)} \right) \times e^{-\frac{2\pi}{\lambda} \kappa z}$$

Par conséquent, l'intensité transmise $I = |E|^2$ aura pour expression :

$$I(z) = I_0 \exp \left(-2 \frac{2\pi}{\lambda} \kappa z \right).$$

L'intensité transmise après la traversée de la couche est $I = I_0 e^{-\alpha \ell}$. Pour $\alpha \ll 1$, on a $I = I_0 (1 - \alpha \ell)$.

Le contraste sera alors donné par $C = \alpha \ell$. (2.7)

Pour une couche d'absorption d'épaisseur ℓ , et d'absorption en transmission $\alpha \ell$, on prendra $\kappa = \frac{\lambda \alpha}{4\pi}$, avec $\alpha \ell$ correspondant à l'absorption d'une monocouche de protéines. Par

ailleurs, pour n unité on a : $\chi'' = 2 n \kappa = \frac{\lambda \alpha}{2\pi}$.

L'absorption peut aussi se définir en terme d'énergie rayonnée par une couche de dipôles. Cette approche permet de mettre en évidence l'effet du renforcement du champ électromagnétique au niveau de ces dipôles. La couche de dipôles rayonne $\alpha \ell / 2$ vers le haut,

et $-\alpha\ell/2$ vers le bas¹ (Figure 2.2). Ainsi, l'intensité rayonnée vers le haut sera du second ordre, alors que l'amplitude transmise sera $t = 1 - \alpha\ell/2$, soit une intensité transmission $T = I_0 (1 - \alpha\ell)$. Nous utiliserons cette approche pour déterminer le contraste obtenu dans une configuration en réflectivité.

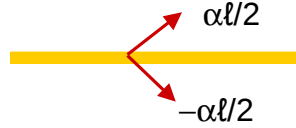


Figure 2.2: Couche de dipôles de coefficient d'absorption α et d'épaisseur ℓ

I-2. c) Absorption imagée en réflexion

La réflectivité de la structure est obtenue en utilisant les coefficients de Fresnel. Afin de suivre un chemin analogue à ce qui sera présenté pour les structures résonantes, nous explicitons ici le calcul des grandeurs optiques de transmission, réflexion et absorption à partir des expressions des coefficients de Fresnel. Les coefficients de Fresnel dépendent de la polarisation du champ électromagnétique. On considère les ondes transverses électriques (TE) pour lesquelles le champ électrique est polarisé perpendiculairement au plan d'incidence, et les ondes transverses magnétiques (TM), pour lesquelles le champ magnétique est polarisé perpendiculairement au plan d'incidence. Pour les ondes TE et TM respectivement, les solutions des équations de Maxwell ont alors la forme :

$$\text{TE} \quad \vec{E} = \begin{pmatrix} 0 \\ E_y \\ 0 \end{pmatrix} \quad \text{et} \quad \vec{B} = \begin{pmatrix} B_x \\ 0 \\ B_z \end{pmatrix} \quad \text{TM} \quad \vec{E} = \begin{pmatrix} E_x \\ 0 \\ E_z \end{pmatrix} \quad \text{et} \quad \vec{B} = \begin{pmatrix} 0 \\ B_y \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

A l'interface entre un milieu p et un milieu $p+1$, les coefficients de Fresnel ont les expressions suivantes :

¹ Pour l'absorption le rayonnement des dipôles est en phase et non en quadrature par rapport au champ incident (rayonnement vers le haut comme vers le bas à l'émission). Ceci est conforme au principe d'Huygens Fresnel, où la partie réelle de la polarisation est en quadrature par rapport au champ incident, mais la partie imaginaire est par contre en phase (ou opposition de phase).

$$\begin{aligned}
r_{TE\ p,p+1} &= \frac{n_p \cos(\theta_p) - n_{p+1} \cos(\theta_{p+1})}{n_p \cos(\theta_p) + n_{p+1} \cos(\theta_{p+1})} \\
r_{TM\ p,p+1} &= \frac{n_{p+1} \cos(\theta_p) - n_p \cos(\theta_{p+1})}{n_{p+1} \cos(\theta_p) + n_p \cos(\theta_{p+1})} \\
t_{TE\ p,p+1} &= \frac{2n_p \cos(\theta_p)}{n_p \cos(\theta_p) + n_{p+1} \cos(\theta_{p+1})} \\
t_{TM\ p,p+1} &= \frac{2n_{p+1} \cos(\theta_p)}{n_{p+1} \cos(\theta_p) + n_p \cos(\theta_{p+1})}
\end{aligned} \tag{2.9}$$

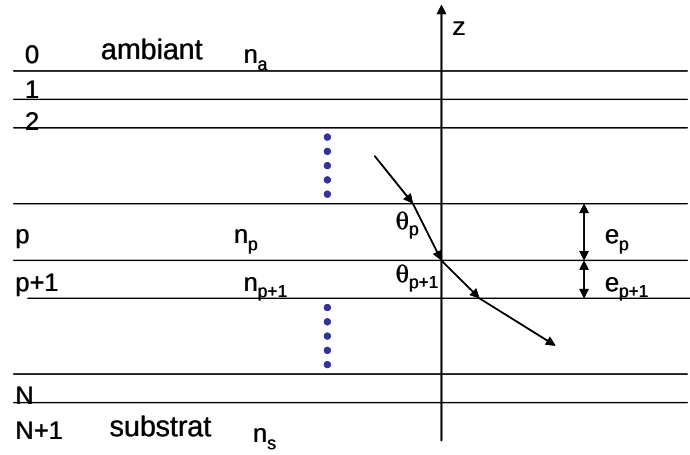


Figure 2.3: Diagramme d'une structure multicouche constitué de N couches, où on définit les épaisseurs e_p , les indices des milieux n_p , et les angles par rapport à la normale θ_p dans chacune des couches.

On considère une structure de $N+2$ couches (soit $N+1$ interfaces). Les couches 0 et $N+1$ correspondant au milieu ambiant et au substrat sont semi infinies. Chaque couche p a un indice de réfraction n_p et une épaisseur e_p . On note n_a l'indice de réfraction du milieu ambiant, et n_s l'indice du substrat. Afin de tenir compte du déphasage φ_p lié à la propagation dans l'épaisseur de la couche, on peut exprimer les coefficients de réflexion et de transmission à l'interface p par :

$$r_p = \frac{r_{p,p+1} + r_{p+1} e^{i2\varphi_p}}{1 + r_{p,p+1} r_{p+1} e^{i2\varphi_p}} \quad \text{et} \quad t_p = \frac{t_{p,p+1} t_{p+1} e^{i2\varphi_p}}{1 + r_{p,p+1} r_{p+1} e^{i2\varphi_p}} \tag{2.10}$$

$$\text{avec} \quad 2\varphi_p = \frac{2\pi}{\lambda} 2n_p e_p \cos(\theta_p) \tag{2.11}$$

En appliquant ces formules de manière récursive, il est possible de déterminer la réflectivité ainsi que la transmission de la structure. La réflectivité, la transmission et l'absorption sont données respectivement par :

$$R = |r|^2 \quad (2.12)$$

$$T = \operatorname{Re} \frac{n_s \cos \theta_s}{n_0 \cos \theta_0} \quad (2.13)$$

$$A = 1 - R - T. \quad (2.14)$$

Pour déterminer ces grandeurs, on peut'utiliser des logiciels libres tels que IMD développé par David L. Windt [Windt, 1998]. Les codes basés sur les matrices de diffusion développés pour les structures réseaux (voir paragraphe 2 de ce chapitre) peuvent de manière évidente s'appliquer aux structures multicouches. C'est la méthode que j'ai utilisée pour une simplicité de traitement des résultats (contraste, prise en compte des résolutions expérimentales), ceux-ci étant alors sous une forme identique aux résultats concernant les réseaux.

I-2. d) Exaltation du contraste d'absorption

Nous présentons ici l'approche utilisée pour calculer le contraste d'absorption. Nous utilisons une approche perturbative exploitant le rayonnement des dipôles de la couche absorbante. Ils sont ainsi vus comme des termes sources [Benisty, 1998]. Le modèle développé est simple mais permet d'obtenir de très bonnes évaluations du contraste d'absorption.

Des modèles beaucoup plus généraux mais dont la complexité est superflue pour décrire notre cas ont été développés. On pense notamment aux travaux sur l'électroréflectance et la photoréflectance dans les semi-conducteurs [Seraphin, 1965]. Les variations de réflectivités $\Delta R/R$ sont induites par la perturbation (modulation de la polarisation de l'échantillon en appliquant un champ électrique directement via des contacts électriques dans le cas de l'électroréflectance ou par modulation optique au moyen d'un faisceau laser pour la photoréflectance). Dans les deux cas, il s'agit d'une modulation électrique qui induit des modifications de la fonction diélectrique, et se mesure via les variations de réflectivité. Les variations de la réflectivité sont exprimées en fonction des parties réelles et imaginaires de la fonction diélectrique, mettant en jeu deux coefficients de Seraphin.

Un autre domaine exploitant l'absorption se situe dans le cadre de l'exploitation d'effets interférentiels d'absorbants [Baghdasaryan, 1988]. Ces modèles sont aussi inadaptés à nos problématiques. Ainsi, basées sur une formulation simple de l'interaction du champ électrique avec la couche absorbante, nous exprimons ici l'augmentation du contraste d'absorption en comparaison avec une mesure en transmission.

➤ Structure considérée

La structure considérée est une couche absorbante située au dessus d'une structure réfléchissante. Cette couche interagit avec le champ électrique local. Selon la localisation de la couche, l'intensité du champ électrique sera plus ou moins forte, ce qui conduira à un contraste plus ou moins important. Nous détaillons ici les expressions de l'amplification de contraste.

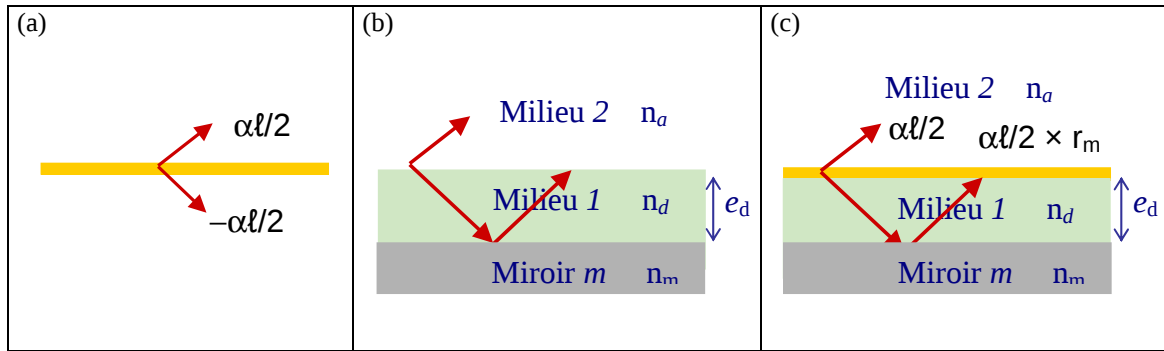


Figure 2.4: Absorption d'une couche mince située au dessus d'une structure réfléchissante

➤ Champ électrique

Le cas considéré ici ne comprend que deux matériaux sur un miroir. Les coefficients à prendre en compte seront r_{12} , t_{12} , r_{21} , t_{21} , et la réflexion sur le miroir arrière r_{m2} . On note 2ϕ le déphasage introduit par l'aller-retour dans le diélectrique d'indice n_d . Pour un angle de réfraction θ_d tel que $\theta_d = \arcsin(n_a \sin(\theta)/n_d)$, on a

$$2\phi = \frac{2\pi}{\lambda} 2n_d e_d \cos(\theta_d). \quad (2.15)$$

Pour déterminer le contraste d'absorption dans une configuration en réflexion, on utilise une approche perturbative. Dans un premier temps, on considère le champ électrique réfléchi en l'absence d'absorbant.

$$\begin{aligned} E_r &= E_{inc} r_{21} + t_{12} r_{m2} t_{21} e^{i2\phi} + t_{12} r_{m2} (r_{m2} r_{12}) t_{21} e^{i4\phi} + t_{12} r_{m2} (r_{m2} r_{21})^2 t_{21} e^{i6\phi} + \dots \\ E_r &= E_{inc} (r_{21} + t_{12} t_{21} r_{m2} e^{i2\phi} (1 + r_{m2} r_{12} e^{i2\phi} + (r_{m2} r_{12} e^{i2\phi})^2 + \dots)) \\ E_r &= E_{inc} \left(r_{21} + t_{12} t_{21} r_{m2} e^{i2\phi} \left(\frac{1}{1 - r_{m2} r_{21} e^{2i\phi}} \right) \right) \end{aligned} \quad (2.16)$$

En notant r l'amplitude du champ réfléchi et ψ le déphasage entre le champ incident et le champ réfléchi, on a :

$$E_r = r e^{i\psi} E_{inc}. \quad (2.17)$$

➤ Interaction avec la couche absorbante

La fine couche absorbante présente à la surface de la puce interagit avec le champ électrique. Nous exprimons ici la perturbation induite par la présence de cette couche absorbante. En l'absence de couche absorbante, le champ électrique local dans la couche de dipôles est donné par :

$$E_{\text{local}} = (1 + re^{i\psi}) E_{\text{inc}} \quad (2.18)$$

Si l'on ajoute une couche absorbante, elle va interagir avec le champ et rayonner de l'énergie. La polarisation induite a alors comme expression :

$$P = \epsilon_0 \chi E_{\text{local}} = \epsilon_0 \chi \times (1 + re^{i\psi}) E_{\text{inc}}. \quad (2.19)$$

Cette polarisation rayonne du fait de l'excitation par l'onde incidente E_{inc} , amplifiée de la réflexion $re^{i\psi} E_{\text{inc}}$.

$$\text{Ainsi : } E_{\text{perturbation}} = (\alpha\ell/2) (1 + re^{i\psi})^2 E_{\text{inc}} \quad (2.20)$$

Le champ total rayonné a comme expression :

$$E = E_{\text{biopuce}} + E_{\text{perturbation}} \quad (2.21)$$

$$E = r e^{i\psi} E_{\text{inc}} + (\alpha\ell/2) \times (1 + re^{i\psi})^2 E_{\text{inc}}$$

$$\text{Soit } R^{\text{abs}} = |r e^{i\psi} + (\alpha\ell/2)(1 + re^{i\psi})^2|^2 \quad (2.22)$$

$$R^{\text{abs}} = r^2 + r e^{i\psi} \times (\alpha\ell/2) (1 + re^{-i\psi})^2 + r e^{-i\psi} \times (\alpha\ell/2) (1 + re^{i\psi})^2 + \underbrace{(\alpha\ell/2)^2 |(1 + re^{i\psi})^2|^2}_{\text{Terme du second ordre} \Rightarrow \text{négligé}}$$

Terme du second ordre => négligé

La différence de réflectivité induite par l'absorbant est donc :

$$\Delta R = R - R^{\text{abs}} = r e^{i\psi} \times (\alpha\ell/2) (1 + re^{i\psi})^2 + r e^{-i\psi} \times (\alpha\ell/2) (1 + re^{-i\psi})^2 \quad (2.23)$$

On obtient alors pour le contraste :

$$C_p = \Delta R / R = [e^{i\psi} \times (\alpha\ell/2) (1 + re^{-i\psi})^2 + e^{-i\psi} \times (\alpha\ell/2) (1 + re^{i\psi})^2] / r. \quad (2.24)$$

$$C_p = \Delta R / R = \alpha\ell \times \text{Re}(e^{i\psi} \times (1 + re^{-i\psi})^2 / r).$$

➤ Exaltation du contraste en réflectivité

Le contraste traduit la variation de signal induite par les éléments biologiques. Afin d'avoir une quantité caractéristique de la puce, on introduit l'amplification du contraste Γ donnée par :

$$\Gamma_p = C_p / (\alpha\ell) \quad (2.25)$$

L'expression 2.24 donne :

$$\Gamma_p = \text{Re}\left(e^{i\psi} \times (1 + re^{i\psi})^2\right) / r \quad (2.26)$$

Afin de vérifier la pertinence de l'utilisation de l'approximation dipolaire pour le calcul de l'amplification de contraste, nous allons calculer les valeurs Γ_p obtenues par cette expression, et les amplifications de contraste obtenues en calculant la réflectivité en présence et en l'absence de couche absorbante et en calculant le contraste à partir de l'Equation 2.1.

Les calculs de la réflectivité de notre structure multicouche seront réalisés par simulations électromagnétiques basées sur des matrices de diffusion. La structure considérée sera une couche de silice d'indice $n_d = 1.495$, sur différents miroirs de coefficients de réflectivité r_m . La dispersion des matériaux ne sera pas prise en compte ici. Les miroirs considérés seront l'aluminium $n_{Al} = 0.23 + 3.36i$, le silicium $n_{Si} = 2.97 + 5.3i$, et l'argent $n_{Ag} = 1.47 + 1.26i$, correspondant respectivement à des coefficients de réflectivité $R_{Al} = 0.92$, $R_{Si} = 0.73$, et $R_{Ag} = 0.24$ (Tableau 2.1).

➤ Exaltation du contraste en configuration quart d'onde

Pour une détection de protéines, on recherche une amplification de contraste maximale autour de la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm (pour de l'ADN, on aurait $\lambda = 260$ nm).

L'amplification maximale correspond à une épaisseur de diélectrique quart d'onde, permettant à la couche absorbante d'être localisée dans le maximum du champ électrique. La configuration quart d'onde donnant un déphasage dans le diélectrique tel que $e^{i\psi} = 1$. En configuration quart d'onde, d'après l'expression 2.23 on a : $\Delta R = (1+r)^2 \times r \times \alpha l$. Ainsi, la différence de réflectivité n'est donc pas proportionnelle au carré du champ électrique à l'interface comme on aurait pu s'attendre. L'amplification de contraste est alors donnée par :

$$\Gamma_p = (1+r)^2 / r. \quad (2.27)$$

L'amplification du contraste Γ_p est une fonction décroissante de r . Ceci implique que l'utilisation d'un miroir de faible coefficient de réflectivité peut être bénéfique au niveau du contraste. Cependant, on sera vigilant pour que le signal ne soit pas trop faible, conduisant ainsi à une dégradation du rapport signal sur bruit pour un temps d'intégration donné. Lors de sa réflexion sur un miroir, l'onde subit un déphasage équivalent à une épaisseur δ_m . Il est important de prendre en compte cette distance lors du calcul de l'épaisseur de la couche recouvrant le miroir et permettant de se trouver en configuration quart d'onde.

L'épaisseur de diélectrique correspondante doit satisfaire la relation :

$$n_d e_d \cos \theta_d + \delta_m (\theta, n_d) = \frac{\lambda}{4} \quad (2.28)$$

➤ Déphasage dans le miroir

En utilisant les coefficients de Fresnel, il est possible de calculer le coefficient de réflectivité r_{2m} du miroir et de déterminer déphasage φ_m correspondant à l'argument de la réflectivité en champ .

L'épaisseur δ_m à retrancher au diélectrique sera alors :

$$\delta_m = \frac{\lambda}{4n_d \cos(\theta_d)} \frac{\varphi_m}{\pi}. \quad (2.29)$$

Les valeurs sont reportées dans le Tableau 2.1 pour les 3 miroirs considérés couverts par de la silice d'indice $n_d = 1.495$ et éclairés en incidence normale.

➤ Epaisseur de peau δ

L'épaisseur de peau δ dont nous allons donner l'expression exacte ci-dessous n'est pas rigoureusement égale à δ_m . Elle est caractéristique de la décroissance du champ électrique dans le miroir. Comme il a été vu précédemment, l'expression du champ électrique transmis dans le métal est donnée par :

$$E(r) = E_o e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} = E_o e^{i((\vec{k}_{//} \cdot \vec{r}_{//} \pm k_z z) - \omega t)}$$

L'épaisseur de peau correspond à la distance à laquelle l'amplitude de l'intensité est divisée par e et s'exprime par: $\delta = 1/2\text{Im}(k_z)$, où k_z désigne la composante perpendiculaire du vecteur d'onde. Par conservation de la composante tangentielle du vecteur d'onde à l'interface miroir/diélectrique, on a :

$$k_{//d} = k_{//m} = k_{//} = \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\theta_d) \quad (2.30)$$

Ceci permet de déterminer la composante perpendiculaire du vecteur d'onde k_{zm} dans le métal : $k_{zm}^2 = k_m^2 - k_{//m}^2 = (n_m K)^2 - k_{//}^2$ et de manière similaire dans le diélectrique $k_{zd}^2 = (n_d K)^2 - k_{//}^2$. La composante du vecteur d'onde dans le miroir s'exprime alors :

$$k_{zm}^2 = k_{zd}^2 + (n_m^2 - n_d^2)K^2 \quad (2.31)$$

$$k_{zm}^2 = (n_m^2 - n_d^2 \cos^2(\theta_d))K^2.$$

$$k_{zm}^2 = k_{zRe}^2 - k_{zIm}^2 + i2k_{zRe}k_{zIm} = K_{Re} + iK_{Im}$$

$$\begin{cases} k_{zRe}^2 = \frac{1}{2}(\sqrt{K_{Re}^2 + K_{Im}^2} + K_{Re}) \\ k_{zIm}^2 = \frac{1}{2}(\sqrt{K_{Re}^2 + K_{Im}^2} - K_{Re}) \end{cases}$$

On peut ainsi déterminer l'épaisseur de peau $\delta=1/2\text{Im}(k_z)$ pour les différents miroirs (Tableau 2.1).

n_{miroir}	R_{miroir}	$R_{\lambda/4}$	δ_m (nm)	δ (nm)	$\Gamma_{p \text{ max}}$
$n_{\text{Al}}=0.23+3.36i$	$R_{\text{Al}} = 0.92$	$R_{\text{Al},\lambda/4} = 0.85$	12.2 nm	6.1 nm	4.00
$n_{\text{Si}} = 2.97+5.3i$	$R_{\text{Si}} = 0.73$	$R_{\text{Si},\lambda/4} = 0.5$	6.6 nm	4.1 nm	4.11
$n_{\text{Ag}}=1.47+1.26i$	$R_{\text{Ag}} = 0.24$	$R_{\text{Ag},\lambda/4} = 0.04$	17.8 nm	17.6 nm	7.04

Tableau 2.1: Indice, réflectivité, profondeur de pénétration, amplification de contraste pour différents miroirs

La fonction 2.27 étant croissante monotone, les amplifications de contraste en configurations quart d'onde sont d'autant plus importantes que la réflectivité du miroir est faible. Les amplifications de contraste maximales obtenues en configuration quart d'onde ont pour valeur $\Gamma_{\text{Al}} = 4$, $\Gamma_{\text{Si}} = 4.1$, et $\Gamma_{\text{Ag}} = 7.0$ pour chacun des miroirs. Ainsi, le moins bon miroir se retrouve en meilleure position en ce qui concerne l'amplification de contraste.

➤ Détermination du contraste pour différents miroirs

Les différentes structures sont définies pour avoir une épaisseur quart d'onde à la longueur d'onde $\lambda=280$ nm déterminée par l'équation 2.28. De la même manière que précédemment, les calculs sont réalisés pour trois différents miroirs : Al, Si et Ag par simulation électromagnétique. L'indice optique $N=n+ik$ est considéré constant sur tout le domaine spectral. L'absorption α variant alors en fonction inverse de la longueur d'onde, elle n'est ainsi pas constante sur le domaine de longueur d'onde. Ainsi, on retrouve la même amplification de contraste à chaque fois que la configuration quart d'onde est satisfaite. Les

résultats des simulations sont donnés Figure 2.5, où l'on donne aussi l'amplification de contraste $\Gamma = \Delta R/R$ calculée à partir de la réflectivité avec et sans absorbant (expression 2.1) et en utilisant la formule établie en considérant le rayonnement d'une couche de dipôle (expression 2.26). On observe que les courbes sont exactement superposées (courbes bleu et cyan Figure 2.5), ce qui confirme la pertinence de notre approche.

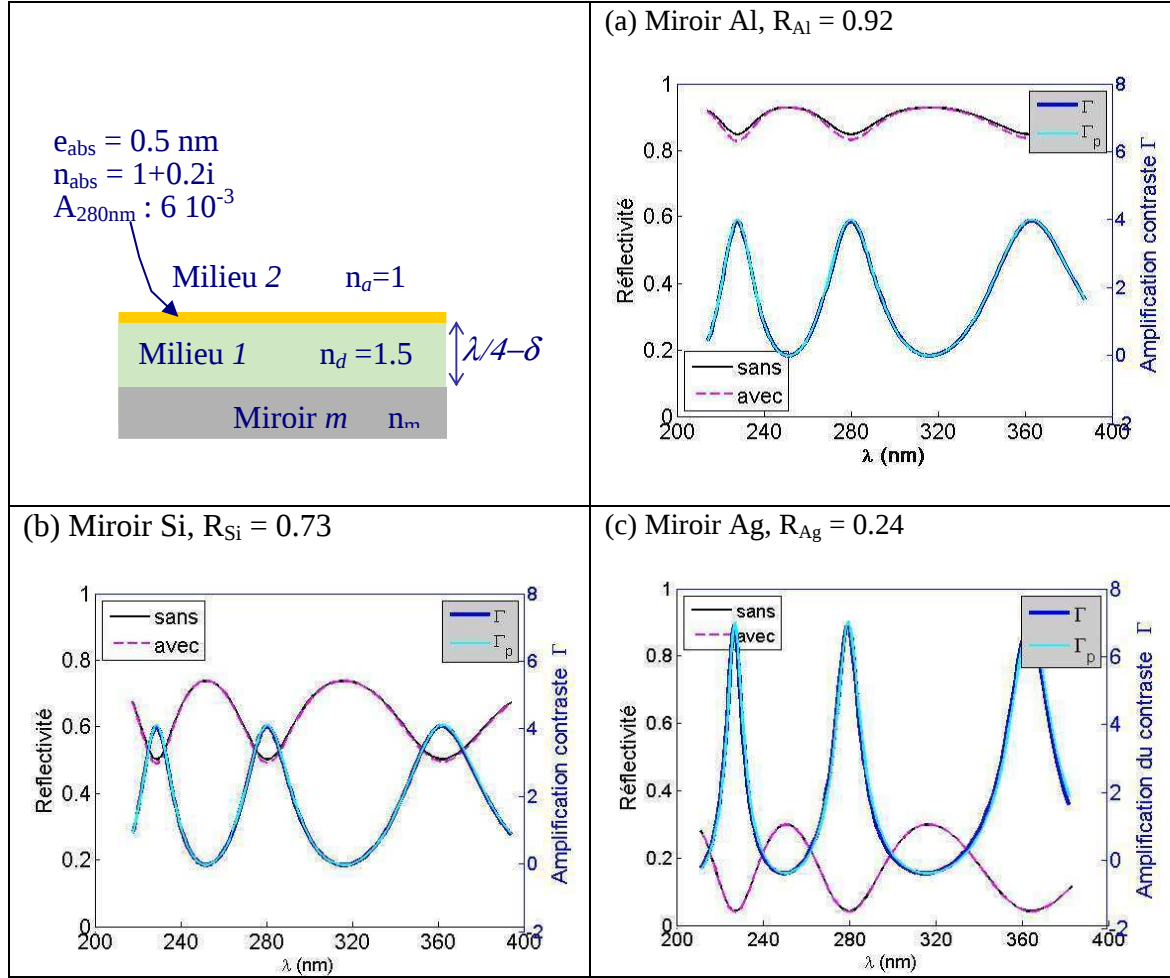


Figure 2.5: Réflectivité en présence et en l'absence d'éléments absorbants (noir et rose, échelle de gauche) et amplification de contraste Γ calculée en approche perturbative et à partir des équations de Maxwell ($\Delta R/R$)/ αd (courbes cyan et bleue, échelle de droite) obtenues pour une couche d'absorption 5×10^{-3} (couche de 0.5 nm , avec comme indice de réfraction $n = 1 + 0.2i$) pour différents miroir (a) Miroir d'aluminium de réflectivité $R_{280\text{nm}} = 0.92$ (b) Miroir de silicium de réflectivité $R_{280\text{nm}} = 0.73$ et (c) Miroir Argent $R_{280\text{nm}} = 0.24$. Les amplifications de contraste en configurations quart d'onde sont d'autant plus importantes que la réflectivité du miroir est faible.

I-3) Absorption /Partie réelle de l'indice optique

Dans le paragraphe précédent, l'indice optique utilisé pour modéliser l'absorption avait comme partie réelle de l'indice optique $n=1$. Ceci permettait de ne pas introduire de déphasage par la couche absorbante (seuls les coefficients de réflexions aux interfaces sont légèrement modifiés, mais cet effet est négligeable). Le déphasage influe aussi sur le contraste au niveau des spots biologiques.

Afin de discuter les influences des déphasages et absorption, nous allons considérer trois cas, tous correspondant à une absorption de 5×10^{-3} , mais avec une influence plus ou moins importante de la partie réelle de l'indice optique. Les cas considérés seront :

- (a) couche absorbante d'épaisseur 0.5 nm et d'indice $1+0.2i$
- (b) couche absorbante d'épaisseur 0.5 nm et d'indice $1.5+0.2i$
- (c) couche absorbante d'épaisseur 2.5 nm et d'indice $1.5+0.04i$

Les trois cas seront présentés pour une structure quart d'onde silice/silicium, sans prendre en compte la loi de dispersion des matériaux, et en utilisant leur indice optique à 280 nm. Le silicium, de réflectivité $R=0.73$ et $R_{\lambda/4}=0.5$, est choisi comme miroir pour les puces fabriquées présentées dans ce manuscrit. Le milieu ambiant considéré est l'air. Les spectres $R(\lambda)$ en présence et en l'absence de couche absorbante sont représentés Figure 2.6.

Le premier cas (Figure 2.6 (a)) est celui qui a été présenté dans la section précédente, avec comme indice optique $n=1+0.2i$, et comme épaisseur $e=0.5\text{nm}$. Dans ce premier cas, le changement de réflectivité à une longueur d'onde donnée est quasiment exclusivement dû à l'absorption ($\epsilon = N^2=0.96+0.4i$: la partie réelle reste quasiment identique alors que la partie imaginaire est beaucoup plus affectée).

Le second cas (Figure 2.6.(b)) considère un indice optique $n=1.5+0.2i$. L'indice de 1.5 est de l'ordre de grandeur de l'indice des protéines, pour lesquelles on observe un indice situé entre 1.35 et 1.6 [Vörös, 2004]. L'épaisseur de la couche est ici de 0.5 nm. Ceci permet d'avoir un déphasage équivalent à ce qu'on aurait pour des expériences en solution, d'indice optique $n=1.39$ à 280 nm. . En effet, dans l'eau la différence d'indice avec la protéine $\Delta n=n_{\text{prot}}-n_{\text{eau}} \sim 0.1$, alors que dans l'air, $\Delta n=n_{\text{prot}}-n_{\text{air}} \sim 0.5$ Pour une mono couche de protéine d'épaisseur 2.5 nm, la différence de chemin optique induite est $\Delta n \times e=0.25\text{ nm}$. Ici, comme l'indice du

milieu ambiant choisi est $n=1$, l'épaisseur de la couche absorbante modélisée est ramenée à $e=0.5\text{nm}$, afin de conserver un déphasage équivalent.

Le troisième cas (Figure 2.6.(c)) est le cas le plus proche de nos configurations expérimentales. Il s'agit d'une mono couche de protéine, avec pour indice $n = 1.5+0.04i$ sur une épaisseur de 2.5 nm . Dans ce cas ; le déphasage correspondant à la couche absorbante est $\Delta n \times e = 1.25\text{ nm}$. La partie imaginaire est 5 fois plus faible que dans le cas (b) afin de garder une absorption identique. L'essentiel du contraste sera dans ce cas expliqué par la partie réelle de l'indice optique.

La variation de réflectivité induite par la présence de la couche biologique sur la puce combine des effets de déphasage et de diminution de la réflectivité du fait de l'absorption. Notons que la partie réelle de l'indice peut aussi influencer sur le niveau du signal de réflectivité (réflexion sur la première interface). La valeur de la réflectivité R est ainsi le résultat des deux effets.

Les résultats des simulations des différents cas décrits précédemment sont donnés Figure 2.6. Dans le premier cas, comme il a été vu précédemment, la variation de signal est due à l'absorption. L'amplification de contraste maximale vaut $\Gamma_{\text{Si}}=4.1$. Dans le second cas, correspondant à la situation la plus proche des expériences en solution, on observe que le déphasage est trop faible pour induire une inversion de contraste. Par contre, l'amplification de contraste maximale obtenue sur silicium est d'un facteur $\Gamma=6.2$.

Dans le cas d'une épaisseur plus importante de 2.5 nm (mais toujours à $\alpha\ell/\lambda=\text{cte}$), le contraste s'inverse, mais la tendance nettement prédominante est un contraste positif qui reste le même qu'un contraste d'absorption de base.

Le décalage de la courbe induit par le déphasage est inversement proportionnel à la longueur d'onde. Comme précédemment, l'amplification du contraste est calculée par rapport au contraste en absorption $\alpha\ell$, mais en supposant un indice constant pour la couche. On observe que l'amplification de contraste suit des variations similaires (et des extrema égaux) au cours de chaque ordre d'interférence.

La définition d'indice choisie ($\alpha\ell/\lambda$ constant, soit $\text{Im}(N)$ constant) masque l'effet de la longueur d'onde sur le contraste, effet favorable pour l'UV, comme on doit s'y attendre naïvement. En effet, pour un indice de couche donné, plus le rapport h_{eff}/λ est élevé, plus la structure sera sensible à la présence d'une couche biologique d'épaisseur effective h_{eff} . Cette définition permet par contre de voir plus facilement l'influence de chacun des deux effets sans

être troublé visuellement par des changements d'amplitude des amplifications de contraste. Par des cas très simples, nous avons mis en évidence l'effet de l'absorption sur le contraste obtenu pour la couche biologique. Le contraste est bien entendu une combinaison des deux effets, mais la propriété d'absorption peut être exploitée de manière à renforcer les effets de la couche biologique sur la réflectivité.

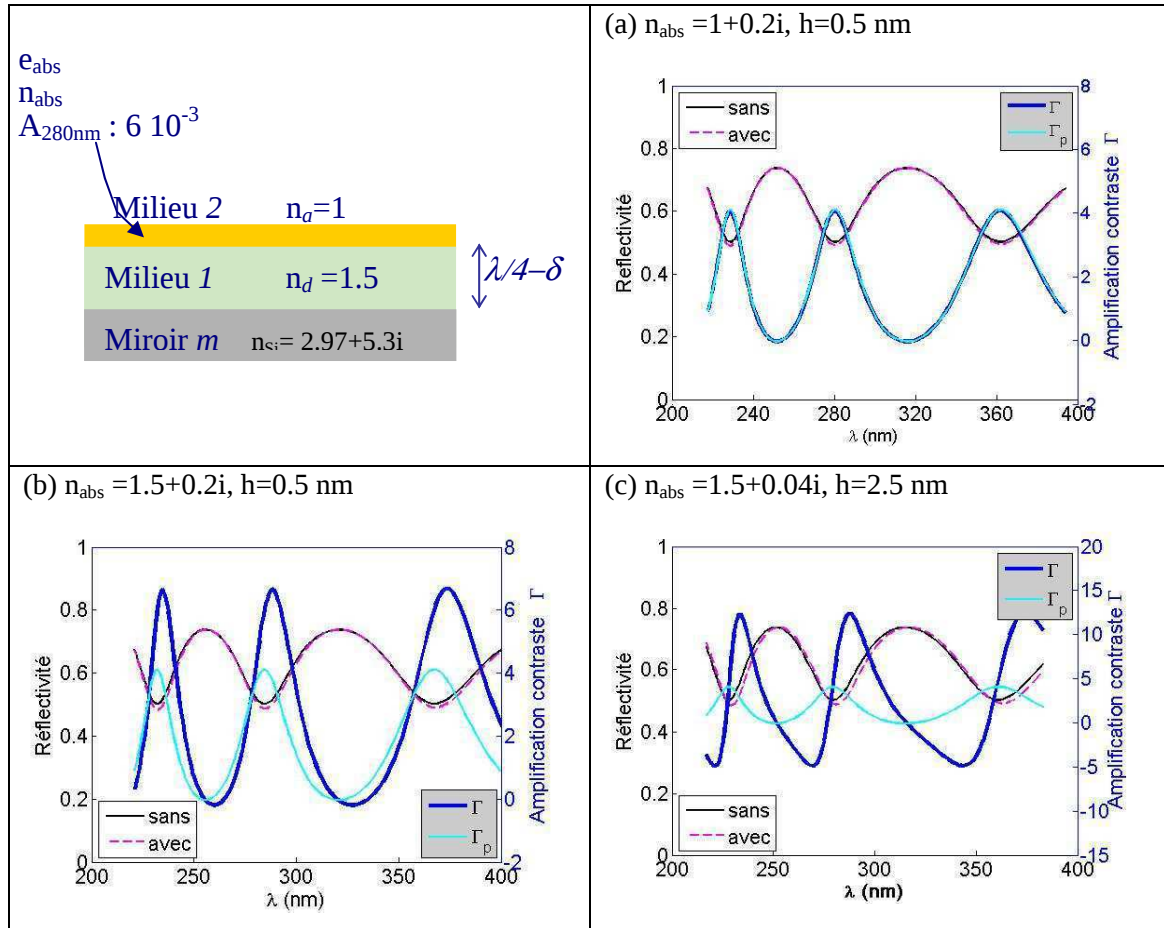


Figure 2.6: Réflectivité et amplification de contraste obtenues pour une couche d'absorption 5×10^{-3} , avec un déphasage dû à différentes valeurs de l'indice optique (a) couche de 0.5nm, avec comme indice de réfraction $n = 1+0.2i$ (b) couche de 0.5nm, avec comme indice de réfraction $n = 1.5+0.2i$ (c) couche de 2.5 nm, avec comme indice de réfraction $n = 1.5+0.04i$. L'amplification de contraste obtenue $\Gamma = (\Delta R/R)/\alpha d$ est représentée en bleu sur ces courbes (échelle de droite). On rappelle en cyan sur tous les graphes l'amplification Γ_p obtenue en l'absence de déphasage.

II - Structures résonantes

Les structures quart d'onde permettent d'avoir un champ électrique plus fort à la surface de la puce, et donc de renforcer le contraste d'absorption par un facteur de $\Gamma \sim 4$ pour un miroir de réflectivité classique (R de 0.7 à 1, permettant un niveau de signal suffisant). Afin d'obtenir une influence plus forte de la couche biologique sur la réflectivité, il est possible d'exploiter

des conditions de résonance. Ceci est une des applications très courantes des résonances plasmoniques. Les biopuces développées sont basées sur des propriétés de résonance diélectriques. Dans notre cas, il s'agit de structures réseaux, qui permettent aussi de coupler l'énergie dans le guide d'onde avant de la guider.

II-1. Réseau résonant

Nous présentons ici les deux éléments optiques essentiels qui constituent les réseaux résonants : le guide d'onde ainsi que le réseau de couplage [Pietroy, 2007]. Les propriétés des réseaux résonants dépendent de différentes caractéristiques : indices des matériaux, épaisseurs des couches, période du réseau, rapport cyclique, ainsi que profondeur de gravure.

II-1. a) Guide d'onde asymétrique

Un guide d'onde plan est une structure qui permet de guider la lumière. Elle est constituée d'une couche de haut indice n_h située entre deux couches de bas indice : le milieu ambiant d'indice n_a et le substrat d'indice n_s . Si l'indice du milieu guidant n_h est suffisamment important, et que l'angle θ est supérieur à l'angle critique de réflexion totale interne, la lumière peut se propager à l'intérieur de la couche de haut indice. L'énergie du mode guidé est ainsi confinée dans la couche d'indice n_h . Pour une structure infinie telle que représentée Figure 2.7, les dérivées par rapport à y sont nulles. Les solutions des équations de Maxwell sont réparties en deux sous-ensemble : les modes de type transverse électrique (TE) et les modes de type transverse magnétique (TM), le champ électrique (respectivement magnétique) étant dans la direction transverse y comme exprimé par les équations 2.8.

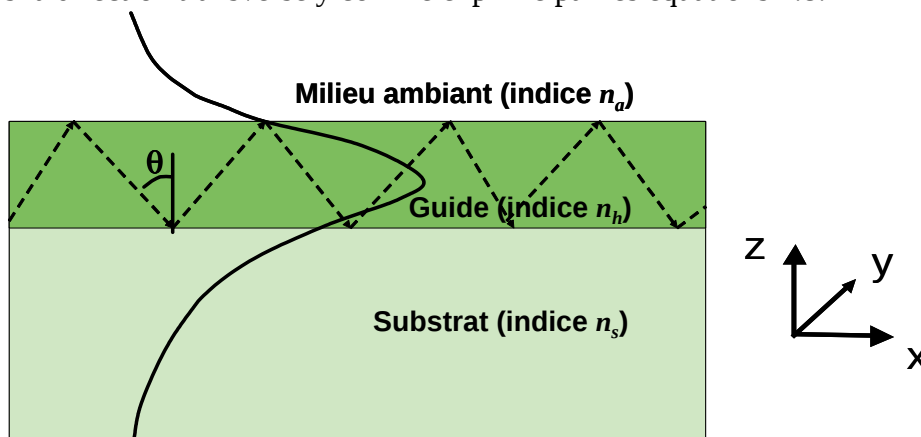


Figure 2.7 Guide d'onde asymétrique, constitué d'un milieu guidant de haut indice n_h entre un milieu ambiant d'indice n_a et un substrat d'indice n_s .

On note $u = u(x,z)$ le champ de l'onde se propageant dans le guide. Dans le cas d'une polarisation TE, on a $u=E_y$, alors que dans le cas d'une polarisation TM, on a $u=B_y$. Dans un milieu homogène d'indice n , l'équation satisfaite par le champ est :

$$\frac{\partial^2 u}{\partial z^2} + n^2 k_0^2 u = \beta^2 u \quad \text{ou de manière équivalente} \quad \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} + (n^2 - n_{eff}^2) k_0^2 u = 0 \quad (2.31)$$

La constante $\beta = 2\pi n_{eff} / \lambda$ est la constante de propagation du mode d'indice effectif n_{eff} . Ces équations sont vérifiées dans chacun des milieux. Les solutions correspondantes aux modes guidés sont de type oscillatoire dans le milieu de plus haut indice, et évanescents dans les autres milieux (énergie confinée dans le guide).

La solution est alors de la forme :

$$u(z) = \begin{cases} A e^{k_0 \sqrt{n_{eff}^2 - n_a^2} z} \\ A \cos\left(k_0 \sqrt{n_h^2 - n_{eff}^2} z\right) + B \sin\left(k_0 \sqrt{n_h^2 - n_{eff}^2} z\right) \\ \left(A \cos\left(k_0 \sqrt{n_h^2 - n_{eff}^2} \omega\right) + B \sin\left(k_0 \sqrt{n_h^2 - n_{eff}^2} \omega\right) \right) e^{-k_0 \sqrt{n_{eff}^2 - n_s^2} (z-\omega)} \end{cases} \quad (2.32)$$

En prenant en compte les conditions aux limites sur le champ et ses dérivées, il est possible de déterminer les équations satisfaites par la constante de propagation du mode guidé [Tien, 1971]. Ainsi, pour une structure de paramètres donnés (indices, épaisseurs, période, rapport cyclique), seules certaines valeurs de l'indice effectif satisferont ces équations. Pour un mode guidé ordre m , l'indice effectif satisfait les équations (2.33a) et (2.33b) dans une polarisation TE ou TM respectivement.

$$k_0 \omega \sqrt{n_h^2 - n_{eff}^2} - \arctan\left(\sqrt{\frac{n_{eff}^2 - n_a^2}{n_h^2 - n_{eff}^2}}\right) - \arctan\left(\sqrt{\frac{n_{eff}^2 - n_s^2}{n_h^2 - n_{eff}^2}}\right) = m\pi \quad (2.33a)$$

$$k_0 \omega \sqrt{n_h^2 - n_{eff}^2} - \arctan\left(\frac{n_h^2}{n_a^2} \sqrt{\frac{n_{eff}^2 - n_a^2}{n_h^2 - n_{eff}^2}}\right) - \arctan\left(\frac{n_h^2}{n_s^2} \sqrt{\frac{n_{eff}^2 - n_s^2}{n_h^2 - n_{eff}^2}}\right) = m\pi \quad (2.33b)$$

II-1. b) Réseau de couplage

Pour se coupler au mode guidé, il est possible d'utiliser un prisme, une injection frontale, ou encore un réseau de couplage. Le couplage au mode guidé sera maximal lorsque la projection du vecteur d'onde incident et la constante de propagation du mode guidé sont identiques. Cette condition d'accord de phase ("phase-matching") peut être satisfaite en utilisant des éléments optiques dispersifs qui vont rendre cette égalité possible. Nous utilisons ici un réseau de diffraction. Il s'agit d'une structure périodique, dont chaque motif se comporte comme une source secondaire réémettant l'onde incidente. La périodicité impose des conditions d'interférences constructives, qui résulte en des directions privilégiées pour l'émission d'énergie. On note $G=2\pi/\Lambda$ le vecteur du réseau réciproque.

Les directions de propagation des ondes réfléchies et transmises sont données par:

$$\sin(\theta_{r_m}) = \sin(\theta_0) + m \frac{\lambda}{n_0 \Lambda}, \quad m=0, \pm 1, \pm 2 \quad (2.34)$$

$$n_h \sin(\theta_{t_m}) = -\left(n_0 \sin(\theta_0) + m \frac{\lambda}{\Lambda} \right), \quad m=0, \pm 1, \pm 2$$

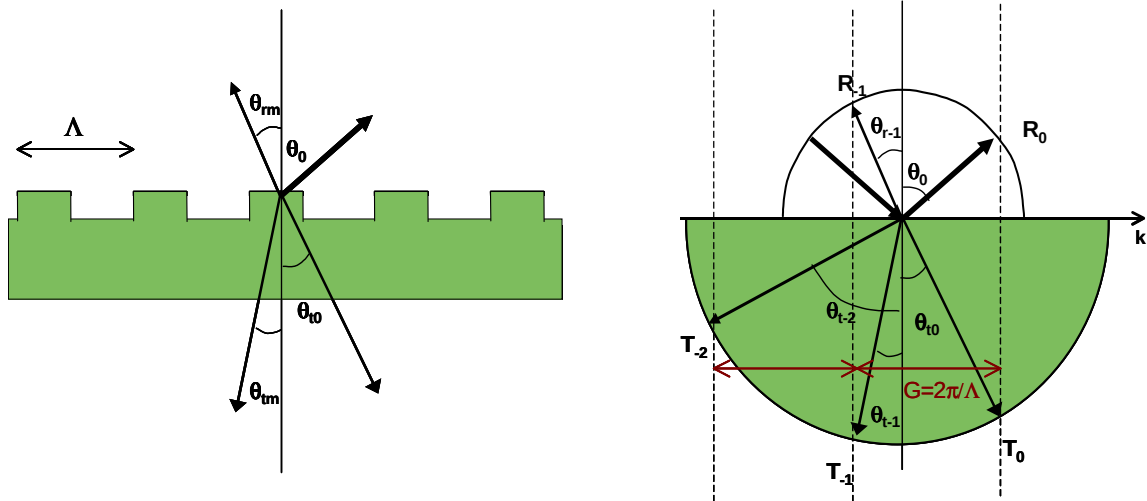


Figure 2.8 : Réseau de diffraction et direction d'émission des différents ordres

II-1. c) Condition de résonance

Afin d'exciter un mode guidé, il est possible d'utiliser un réseau de diffraction. Le réseau de diffraction permet en effet d'injecter la lumière dans le guide par un ordre diffracté d'angle

suffisamment grand par rapport à la normale, de telle sorte que l'onde subisse ensuite une réflexion totale sur les deux interfaces. De telles structures sont appelées réseaux résonants et sont représentées Figure 2.9.

Les biopuces sont conçues de manière à renforcer le contraste d'absorption. Les meilleures sensibilités étant obtenues en conditions résonantes, la puce est optimisée de manière à obtenir un mode guidé localisé proche de l'élément biologique à la longueur d'onde de 280 nm. Ceci permet un recouvrement maximal entre le champ électrique et l'élément biologique. Le contraste d'absorption est déterminé en calculant les efficacités de diffraction de la puce dans chacun des ordres avec ou sans élément biologique.

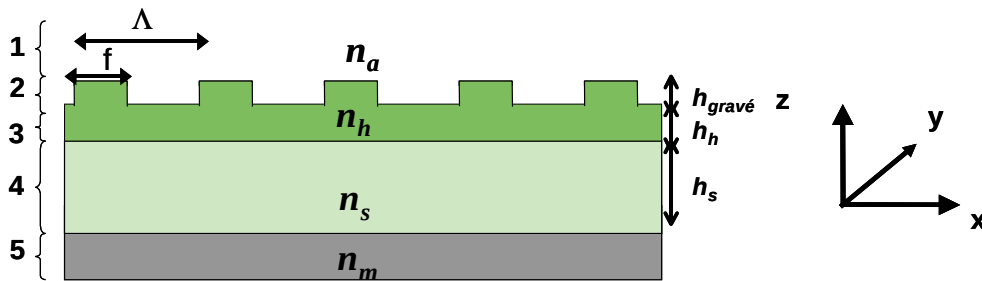


Figure 2. 9 : Structure guidante couplée par réseau. Chaque couche est caractérisée par son épaisseur et son indice de réfraction. En ce qui concerne la couche structurée, la période du réseau Λ et le rapport cyclique f est aussi à prendre en compte.

Pour exciter un mode guidé de constante de propagation $\beta = 2\pi n_{\text{eff}}/\lambda$, l'onde plane incidente de vecteur d'onde $k_0 = 2\pi/\lambda$ doit arriver sous une incidence telle que la projection de sa composante horizontale sur le guide va permettre d'exciter un mode guidé d'indice effectif n_{eff} . La direction du vecteur d'onde incident peut être quelconque, mais nous nous limiterons ici à une incidence dans le plan perpendiculaire aux lignes du réseau. La condition de couplage au mode guidé s'écrit alors :

$$n_{\text{eff}} = n_0 \sin \theta_0 + m \frac{\lambda_r}{\Lambda} \quad (2.35)$$

II-2. Propriétés des réseaux résonants

La présence de modes guidés est caractéristique des réseaux résonants. Au cours de sa propagation dans le guide d'onde, le mode rayonne de l'énergie vers le substrat et le milieu ambiant. Il subit alors une décroissance de forme exponentielle caractérisée par ce qu'on

appelle coefficient de rayonnement en m^{-1} . Les ondes ainsi rayonnées sont émises dans les différents ordres de diffraction transmis et réfléchis dans le réseau de diffraction.

Les propriétés optiques de telles structures résonantes dépendent des différents paramètres opto-géométriques de la structure. Pour des structures simples de type guide d'ondes, les propriétés optiques peuvent être formulées de manière analytique [Parriaux, 1998][Brioude, 2000]. Dans le cas de structures plus complexes un formalisme analytique peut aussi être développé, mais nécessite cependant des approximations sur la structure afin d'obtenir des équations exploitables [Sychugov, 1996]. Un formalisme matriciel basé sur des matrices de diffusion permet de déterminer les propriétés optiques de telles structures. L'utilisation d'un tel outil physique simplifie grandement le calcul lors de l'empilement de plusieurs couches. Ce formalisme est basé sur une décomposition des solutions des équations de Maxwell sur la base des harmoniques tel que décrit dans la section suivante.

II -2. a) Modes de Bloch

Dans une structure périodique, les solutions des équations de Maxwell peuvent être décomposées sur la base des ondes planes. Le mode de Bloch résultant a pour expression :

$$E = \sum_G E_G(z) e^{i(k_{//} + G)r} \quad (2.36)$$

ou de manière équivalente pour une structure invariante suivant la direction y :

$$E = \sum_m E_m(z) e^{imG_0x} e^{ik_{//}x} \quad (2.37)$$

Le mode est ainsi décrit comme une combinaison linéaire des harmoniques couplées entre elles. La direction d'émission des harmoniques peut être visualisée sur la construction d'Ewald. Pour une harmonique de vecteur d'onde $k_{//}$, la condition de diffraction vers le milieu ambiant n_0 est donnée par : $|k_{//} + G| < n_0 k_0$. Lorsque cette condition est remplie, l'harmonique est "propagative", et diffracte de l'énergie du mode guidé vers le milieu ambiant. Dans la condition inverse, l'harmonique est évanescence. Dans le cas d'un mode guidé, l'essentiel de l'énergie est en général portée sur une des harmoniques. De manière à déterminer les conditions qui seront sensibles à la présence d'un élément biologique à la surface de la puce, nous utilisons un formalisme de matrices de diffusion.

II-2. b) Matrices de diffusion

➤ Principe

La structure est décrite en tant qu'un empilement de couches diélectriques, structurées ou non. Chaque couche est caractérisée par sa constante diélectrique ou de manière équivalente par son indice de réfraction complexe n_p tel que $\varepsilon_p = n_p^2$. On cherche à déterminer les champs en sortie de la structure pour chacun des modes, afin de déterminer la puissance émise dans une direction donnée. Le formalisme utilisé pour cela est la matrice de diffusion (S-matrix) qui permet d'exprimer les champs en sortie de la structure à partir des champs en entrée [Li, 1996] [Tikhodeev, 2002]. La matrice S est développée sur une base d'onde plane exponentielle. L'implémentation des codes utilisés a été réalisée par A. David à l'Institut d'Optique [David, 2006]. Les codes étaient initialement développés pour des cristaux photoniques de maille hexagonale, dans des problématiques d'extraction de lumière pour des applications de DELs. Pour nos applications, j'ai adapté ces codes à des structures réseaux, en tronquant adéquatement l'espace réciproque et implémenté la prise en compte de la loi de dispersion des matériaux constituant la puce. Le calcul de la répartition du champ dans la structure a aussi été implémenté. Le formalisme de la matrice de diffusion permet de calculer les modes de Bloch et de déterminer la réflectivité et la transmission de la structure. Les champs sont décomposés sur la base des harmoniques. Pour chacune des harmoniques, on calcule sa propagation dans la structure, en tenant compte des conditions de continuité entre chaque couche. Les régions d'intérêt sont les couches elles-mêmes ainsi que les interfaces entre chacune des couches. Les couches sont numérotées de 0 à N, et on note p leur numéro.

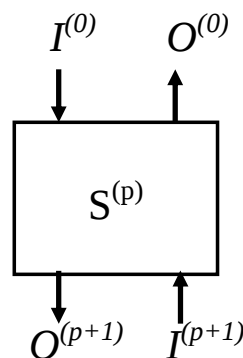


Figure 2.10: Principe de la matrice S dans la couche p.

➤ Fonctionnement

La matrice de diffusion S permet de relier les champs en entrée aux champs en sortie. Ainsi, on a la relation suivante : $A_{out} = S A_{in}$.

Le formalisme de la matrice S est récursif et indépendant du nombre de couches de la structure. La matrice $S^{(p)}$ caractérise la propagation entre les champs dans la couche $p+1$ et le milieu ambiant 0. Son fonctionnement est représenté Figure 2.10 : $S^{(p)}$ opère sur les entrées de chaque côté de la structure (input $I^{(0)}$ et $I^{(p+1)}$) et donne les sorties de chaque côté de la structure (output $O^{(0)}$ et $O^{(p+1)}$). La matrice $S^{(0)}$ est initialisée à la matrice unité.

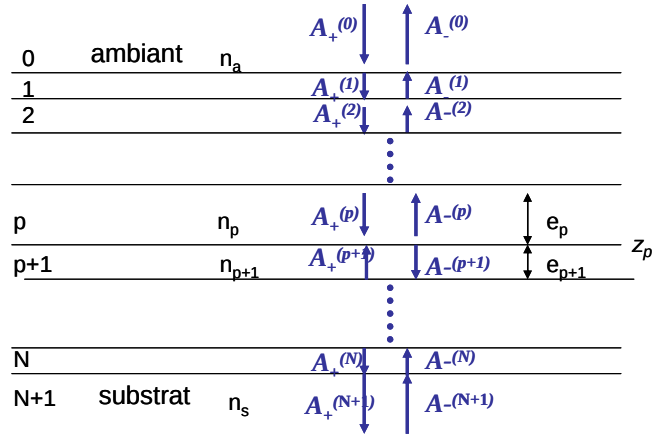


Figure 2.11: Le champ dans chacune des couches est décomposé en une superposition d'onde se propageant vers le haut A_+ et vers le bas A_- .

Pour chacune des couches on a la relation (2.38) où $T_{++}^{(p)}$ et $R_{+-}^{(p)}$ sont les matrices de transmission et de réflexion qui donnent les amplitudes des ondes dans la couche $p+1$ résultant de la transmission des ondes se propageant dans le sens positif depuis le milieu 0, et dans le sens négatif depuis la couche $p+1$ du fait de la traversée de l'empilement des couches 0 à $p+1$. On a une définition analogue pour $T_{--}^{(p)}$ et $R_{-+}^{(p)}$.

$$\begin{bmatrix} A_+^{(p+1)} \\ A_-^{(0)} \end{bmatrix} = S^{(p)} \begin{bmatrix} A_+^{(0)} \\ A_-^{(p+1)} \end{bmatrix} \quad \text{avec} \quad S^{(p)} = \begin{bmatrix} T_{++}^{(p)} & R_{+-}^{(p)} \\ R_{-+}^{(p)} & T_{--}^{(p)} \end{bmatrix} \quad (2.38)$$

➤ Continuité entre couches voisines

La continuité entre deux couches voisines peut être décrite en définissant une matrice représentative de l'interface $s^{(p)}$, et une matrice correspondant à la couche p comme ce qui suit $\tilde{s}^{(p)}$:

$$\begin{bmatrix} A_+^{(p+1)}(z_p + 0) \\ A_-^{(0)}(z_p - 0) \end{bmatrix} = s^{(p)} \begin{bmatrix} A_+^{(p)}(z_p - 0) \\ A_-^{(p+1)}(z_p + 0) \end{bmatrix} \text{ avec } s^{(p)} = \begin{bmatrix} t_{11}^{(p)} & -t_{12}^{(p)} t_{22}^{(p)-1} t_{21}^{(p)} & t_{12}^{(p)} t_{22}^{(p)-1} \\ -t_{22}^{(p)-1} t_{21}^{(p)} & t_{22}^{(p)-1} \end{bmatrix} \quad (2.39)$$

$$\text{et } \begin{bmatrix} A_+^{(p+1)} \\ A_-^{(0)} \end{bmatrix} = \tilde{s}^{(p)} \begin{bmatrix} A_+^{(p)} \\ A_-^{(p+1)} \end{bmatrix} \quad \text{avec } \tilde{s}^{(p)} = \begin{bmatrix} t_{++}^{(p)} & r_{+-}^{(p)} \\ r_{-+}^{(p)} & t_{--}^{(p)} \end{bmatrix} \quad (2.40)$$

➤ Propagation au sein d'une couche

La matrice de la couche p $\tilde{s}^{(p)}$ est décrite par :

$$\tilde{s}^{(p)} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & e^{-i\kappa^{(p)}L} \end{bmatrix} s^{(p)} \begin{bmatrix} e^{-i\kappa^{(p)}L} & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}. \quad (2.41)$$

Ces éléments permettent d'obtenir de manière récursive la réponse de la structure avec :

$$\begin{cases} T_{++}^{(p)} = \tilde{t}_{++}^{(p)} [1 - R_{+-}^{(p-1)} \tilde{r}_{-+}^{(p)}]^{-1} T_{++}^{(p-1)}, \\ R_{+-}^{(p)} = \tilde{r}_{+-}^{(p)} + \tilde{t}_{++}^{(p)} R_{+-}^{(p-1)} [1 - \tilde{r}_{-+}^{(p)} R_{+-}^{(p-1)}]^{-1} \tilde{t}_{--}^{(p)} \\ R_{-+}^{(p)} = R_{-+}^{(p-1)} + T_{--}^{(p-1)} \tilde{r}_{-+}^{(p)} [1 - R_{+-}^{(p-1)} \tilde{r}_{-+}^{(p)}]^{-1} T_{++}^{(p-1)} \\ T_{--}^{(p)} = T_{--}^{(p-1)} [1 - \tilde{r}_{-+}^{(p)} R_{+-}^{(p-1)}]^{-1} \tilde{t}_{--}^{(p)} \end{cases} \quad (2.42)$$

et avec comme conditions initiales $S^{(0)} = s^{(0)}$.

Dans le cas d'une structure réfléchive, les quantités qui nous intéressent sont les amplitudes des modes ré émis vers le milieu incident. L'équation 2.42 permet de définir les amplitudes émises vers l'extérieur de la structure comme suit :

$$\begin{bmatrix} A_+^{(p+1)} \\ A_-^{(0)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} T_{++}^{(p)} & R_{+-}^{(p)} \\ R_{-+}^{(p)} & T_{--}^{(p)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_+^{(0)} \\ A_-^{(p+1)} \end{bmatrix} \quad (2.43)$$

Grâce à ce formalisme, il est possible de calculer les modes de Bloch, ainsi que la réflectivité et la transmission de la structure à un angle d'incidence et à une fréquence donnée. Ceci va

nous permettre de définir des structures hautement sensibles à la présence d'un absorbant à la surface de la puce à la longueur d'onde de 280 nm.

III - Contraste sur structures résonantes

III-1. Structures définies

III-1. a) Caractéristiques requises

Les structures développées sont des structures constituées d'un empilement de deux diélectriques transparents en UV sur un miroir. Comme précédemment, nous choisissons un montage en réflexion de manière à (i) bénéficier du double passage de l'onde dans le milieu absorbant et (ii) éviter la problématique de transparence de substrat du fait de la difficulté de trouver des diélectriques transparents en couche épaisse (absorption des diélectriques dans l'ultraviolet sur des couches épaisses).

Selon la période du réseau et la direction de l'onde incidente, il existera un nombre variable d'ordres diffractés vers l'air. Pour l'imagerie 2D, il est possible d'utiliser un ordre de diffraction émis dans une direction voisine à la normale de l'échantillon. Il peut aussi être intéressant de profiter d'une configuration proche de la configuration Littrow $\theta_0 = \theta_{-1}$.

De manière à obtenir un bon confinement du champ électromagnétique à proximité des éléments biologiques, les éléments biologiques sont localisés sur une couche de diélectrique de fort indice, déposé sur un diélectrique de plus bas indice. La configuration choisie étant un montage en réflexion, ces couches sont déposées sur un miroir permettant de renvoyer l'énergie émise dans les ordres diffractés en transmission.

III-1. b) Influence des différents paramètres du réseau

Les différentes caractéristiques définissant la structure sont :

- les matériaux caractérisés par leur indice complexe,
- les épaisseurs des couches h ,
- le facteur de remplissage f
- la période du réseau Λ ,
- la profondeur de gravure $h_{gravé}$.

Le milieu ambiant a aussi une influence sur le comportement résonant de la structure. Selon le choix de ces paramètres, on pourra définir une structure sensible à la présence d'un élément biologique à 280 nm [Rosenblatt, 1997]. Toutes les structures présentées dans ce manuscrit correspondront à une optimisation réalisée en polarisation TE. Dans le choix de la structure, la résolution instrumentale ainsi que l'étendue spatiale du mode seront à prendre en compte. Ceci sera discuté en fin de chapitre.

➤ Matériaux

Comme il a été souligné auparavant, un fort contraste d'indice entre les deux matériaux permettra un meilleur confinement de l'onde guidée, et donc un meilleur renforcement de contraste. Cependant, dans l'ultraviolet, la plupart des matériaux de haut-indice usuellement utilisés dans le visible sont absorbants (dioxyde de titane TiO_2 , pentoxide de tantale Ta_2O_5). L'oxyde d'hafnium ($n \sim 2.2$) HfO_2 , le diamant ($n \sim 2.42$) ou le nitrure de silicium SiN sont cependant de bons candidats. Les matériaux transparents dans l'UV dont nous disposons sont la silice ($n_{280\text{nm}} \sim 1.5$) et le nitrure ($n_{280\text{nm}} \sim 2$) en dépôt PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition). En ce qui concerne le miroir sur lequel on dépose ces matériaux, on choisit un miroir de silicium d'indice $n_{280\text{nm}} \sim 1.86 + 4.49i$ et de réflectivité $R=0.73$.

➤ Epaisseur des couches diélectriques h

La réponse spectrale d'un réseau résonant montre des formes de type Fano [Fano, 1961], de symétrie différente selon l'épaisseur de diélectrique constituant la structure [Fan, 2002]. On choisit une épaisseur totale de diélectrique est légèrement supérieure à l'épaisseur quart d'onde. Ainsi, on peut tirer profit de la dérivée positive de la réflectivité $\partial R(\lambda)/\partial \lambda$. Dans ce cas, le contraste dû au déphasage vient alors renforcer le contraste d'absorption (voir discussion plus loin). De plus, en se plaçant au voisinage de la condition quart d'onde, en dehors de la résonance, on bénéficie du facteur $\Gamma \sim 4$ d'augmentation du contraste, qui reste un avantage pour de larges résolutions angulaires ou spectrales. Afin que l'onde soit confinée à la surface du guide, l'épaisseur de la couche guidante ne doit pas être trop élevée.

➤ Facteur de remplissage ("duty cycle")

En ce qui concerne le rapport entre les surfaces gravées et non gravées, pour des rapports compris entre 0.35 et 0.65, l'efficacité de diffraction de la structure est peu modifiée. Par contre, on aura un meilleur recouvrement entre le champ et l'élément biologique si la surface gravée est supérieure à la surface non gravée. En effet, l'allure du mode guidé dans le milieu ambiant est une onde évanescence, dont le maximum est situé dans le milieu diélectrique de haut indice. Ainsi, on aura une interaction plus forte si l'élément biologique est essentiellement localisé au fond du réseau.

➤ Profondeur de gravure

La profondeur de gravure du réseau contrôle directement l'efficacité de diffraction et la finesse de la résonance. Le domaine d'angle permettant de se coupler au mode sera d'autant plus important que la résonance est large. Plus la profondeur du réseau est importante, plus le mode va être étendu spatialement suivant la direction z . Par contre, du fait de la conservation de l'énergie, si le mode est plus étalé spatialement dans la structure, l'intensité du champ électrique là où est localisé l'élément absorbant est plus faible. Ainsi, on a une moindre influence de l'élément biologique et un renforcement du contraste plus faible. La finesse de la résonance est discutée en fin de ce chapitre.

➤ Indice du milieu ambiant

Pour un guide d'onde asymétrique, le maximum du champ électrique du mode guidé est localisé plus proche du milieu environnant d'indice le plus élevé. L'indice optique du milieu ambiant est déterminant en ce qui concerne la répartition du champ de l'onde guidé et les conditions de résonance. Plus l'indice du milieu environnant est élevé, plus le maximum du champ sera localisé proche de ce milieu, ce qui peut être exploité pour favoriser les interactions avec la couche biologique. Dans les structures qui seront présentées ici le milieu ambiant est l'air. Le mode a donc tendance à aller plus vers la silice d'indice $n \sim 1.5$ que vers l'air. L'élément biologique étant situé à la surface de la puce, un indice du milieu ambiant plus élevé permettra un meilleur recouvrement entre le champ et l'élément biologique, et donc une meilleure sensibilité.

III-1. c) Propriétés

Les structures définies ont une épaisseur totale de l'ordre de la longueur d'onde. On choisit une épaisseur de silice de 140 nm, et une épaisseur de nitrure de 78.4 nm de manière à confiner le champ à la surface de la structure. La période de la structure va permettre de définir les directions de diffraction des ordres réfléchis. La profondeur de gravure est de 20 nm, ce qui est un bon compromis pour obtenir une bonne efficacité de diffraction, et une finesse de résonance à la fois sensible et compatible avec l'imagerie.

Cette étude étant réalisée en vue de la caractérisation expérimentale suivante, nous prenons en compte les lois de dispersion des matériaux, contrairement à ce qui était fait dans le cas 1D. Par simulations électromagnétiques, il est possible de déterminer la réponse spectrale d'une structure, ainsi que sa sensibilité à la présence d'un élément biologique. La période Λ est de l'ordre de 280 nm. Comme on le verra sur les diagrammes d'Ewald, avec une telle période, les modes guidés auxquels nous allons avoir affaire différeront de $3G$ (où $G = 2\pi/\Lambda$). Ainsi, en terme de repliement et de comptage de branches dans la zone de Brillouin, nous irons jusqu'au 3eme ordre, ce qui donne une apparence relativement complexe au diagramme de bande, mais constitue le prix pour travailler "doublement" au-dessus de la ligne de lumière (ordre 0 et -1).

Pour notre application d'imagerie, nous prenons en compte la direction d'émission des ordres de diffraction. Pour un réseau de période Λ , et un mode d'ordre m , on a :

$$n_0 \sin(\theta_m) = n_0 \sin(\theta_0) + m \frac{\lambda}{\Lambda}.$$

Ceci peut être visualisé sur les représentations d'Ewald. Les premières structures définies avaient une épaisseur de silice de 140 nm et étaient recouvertes de 78.4 nm de nitrure, pour un indice du nitrure de 1.956 et un indice de la silice de 1.495. Une caractérisation plus fine de la relation de dispersion sera présentée dans le prochain chapitre.

Cette présentation se base sur un formalisme de matrice de diffusion. Un formalisme plus phénoménologique aurait aussi pu être utilisé [Sychugov, 1996] mais avec des expressions analytiques compliquées du fait de la complexité de notre structure (nombre de couches, miroir, nombre d'ordre afin d'avoir deux ordres diffractés dans le milieu ambiant). Le diagramme d'efficacité de diffraction de la structure présentée ici est donnée Figure 2.12 en coordonnées $(u, k_{//})$ avec $k_{//}$ donné en unité inverse de période, pour une polarisation TE. Sur

cette courbe, nous donnons aussi les droites correspondant à la ligne de l'air et des milieux diélectriques, d'équations ($k//=1/(2 \pi n u)$), avec n indice du milieu considéré. Les points correspondants aux structures réalisées sont indiquées sur cette figure.

➤ Premières structures de période $\Lambda=280$ nm

Les premières structures étaient conçues de manière à permettre une mesure de l'ordre -1 proche de la direction normale à l'échantillon. Pour un éclairage vers 42° , ceci correspond à une direction d'émission de l'ordre -1 de -20° . Ces conditions d'éclairage correspondent au croisement entre le mode guidé de la silice et le mode guidé du nitrure. Ceci correspond à une zone où les couplages entre harmoniques sont plus forts. C'est une cause supplémentaire qui tend à rendre les diagrammes de bandes (ou les cartes de réflectivités qui en sont les analogues) plus riches et plus complexes à analyser.

Les résultats de modélisation électromagnétiques et des caractérisations expérimentales de ces premières structures ont été reportés dans une publication [Robin, 2009]. Les structures fabriquées visaient une épaisseur de silice de 140 nm, et l'épaisseur de nitrure déposée était de 78.4 nm. En réalité lors de la fabrication, les épaisseurs des couches étaient de 135 nm pour la silice et 94 nm pour le nitrure, donc un peu supérieure à l'épaisseur optique désirée. Ceci implique que l'on ne peut bénéficier de la pente positive $\partial R(\lambda)/\partial \lambda$ puisqu'on est situé sur un minimum de réflectivité dans les puces fabriquées expérimentalement.

Par retour sur ce premier design, nous avons dû adapter la structure. En effet, dans cette première structure, la finesse de la résonance à 280 nm n'était que de ~ 40 , ce que nous attribuons à la proximité d'un couplage vers d'autres modes guidés (ici le mode de la silice) et des pertes vers les harmoniques rayonnantes qui en découlent.

➤ Structures de période $\Lambda=270$ nm.

En gardant le même support de couche, mais en adaptant la période de 280 nm à 270 nm, nous nous sommes éloignés de cette condition de couplages entre modes. Il a alors été possible d'adapter la structure à nos exigences expérimentales. Les analyses présentées ici correspondent à cette seconde structure (épaisseur de nitrure légèrement inférieure de manière à être sur une pente montante $\partial R(\lambda)/\partial \lambda$). Cette structure nous suivra ensuite tout au long de cette étude.

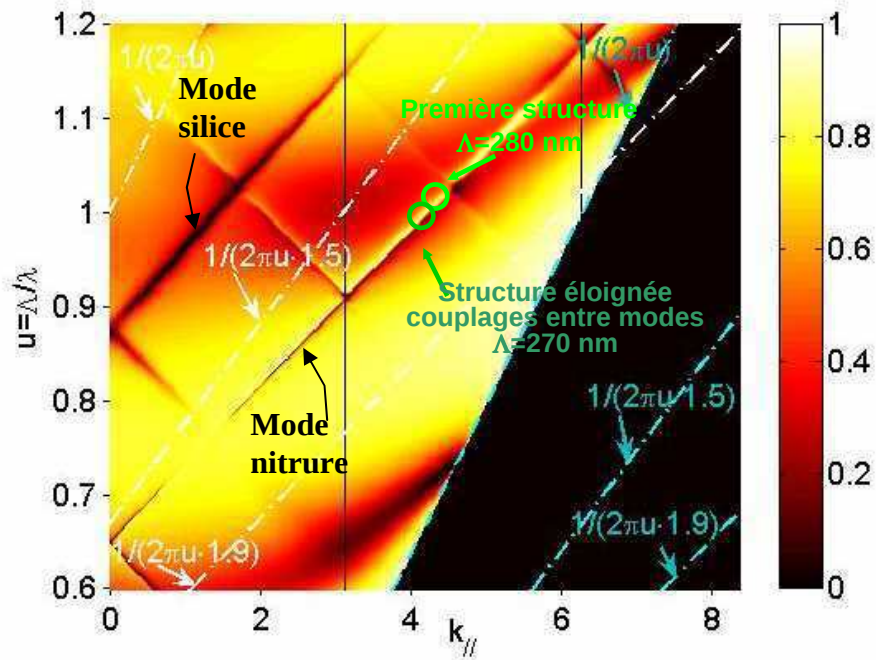


Figure 2.12 : Diagramme d'efficacité de diffraction de la structure

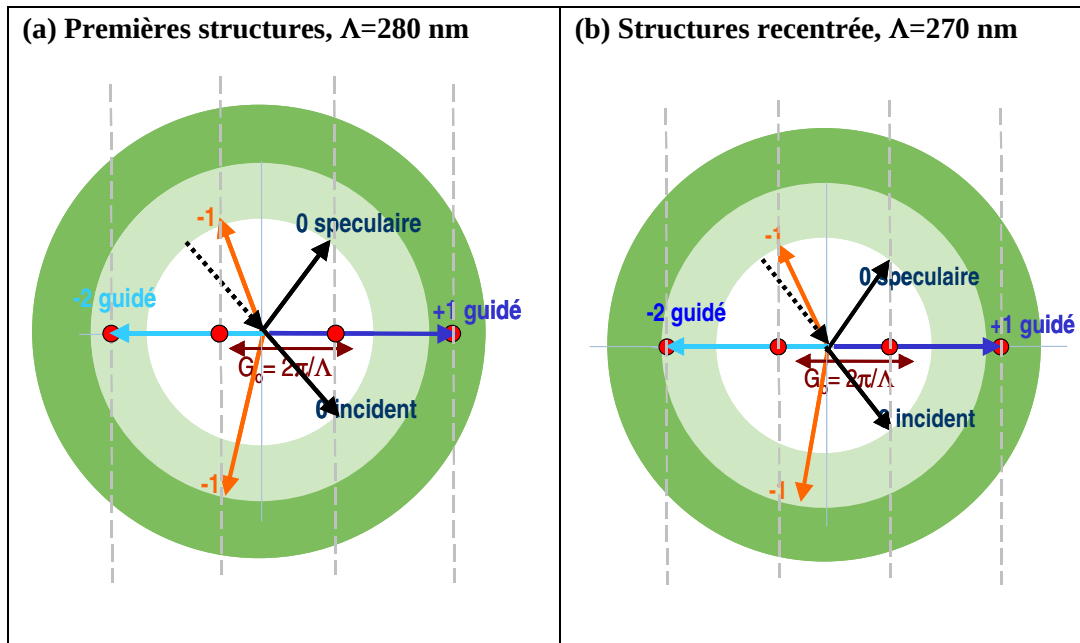


Figure 2.13 : Direction d'émission des ordres de diffraction pour une résonance excitée à la longueur d'onde $\lambda=280$ nm (a) Pour une structure de $\Lambda=280$ nm, à un angle d'incidence de 42° , l'angle de diffraction -1 est émis à -20° par rapport à la normale à l'échantillon (b) Pour une structure de $\Lambda=270$ nm de période, et un angle d'incidence de 38° et un angle d'émission, de l'ordre -1 de -25° .

➤ Efficacité de diffraction

Les codes basés sur les matrices de diffusion permettent de calculer l'efficacité de diffraction pour chaque condition incidente (λ , θ). Les efficacités de diffraction sont calculées en présence et en l'absence de couche biologique. On calcule ensuite le contraste induit par la variation de réflectivité au niveau des spots biologiques : $C=\Delta R/R$. Les structures réalisées sont constituées de nitrure sur silice sur silicium. En ce qui concerne la couche biologique, elle est définie comme une couche d'épaisseur supplémentaire h_{abs} d'indice complexe n_{abs} [Kunz, 2000]. Le dépôt éventuel sur les bords de dents du réseau n'est pas pris en compte dans notre modèle mais pourrait l'être facilement en considérant un facteur de remplissage différent.

Dans ce chapitre, nous décrivons une structure sensible permettant de centrer la longueur d'onde de 280 nm et de bien comprendre nos choix de paramètres. L'épaisseur de diélectrique est légèrement inférieure à celle des structures fabriquées pour permettre une meilleure sensibilité.

De la même manière que précédemment, on considère d'abord un contraste induit par l'effet d'absorption uniquement. Nous analyserons ensuite l'effet du contraste d'indice sur les spectres de réflectivité. Les cas considérés sont identiques à ce que l'on avait pour la structure quart-d'onde. L'absorption sera toujours de 5×10^{-3} , mais l'indice optique de la protéine sera de 1 ou de 1.5 selon que l'on souhaite avoir un déphasage dû à l'indice ou non. La loi de dispersion de la protéine n'est pas prise en compte ici de manière à avoir une absorption et un déphasage induit par la protéine constant sur tout le domaine de longueur d'onde. De la même manière que précédemment, deux cas seront considérés pour l'indice réel de 1.5 : une couche de 0.5 nm d'épaisseur et une couche de 2.5 nm d'épaisseur.

III-2. Contraste d'absorption en réflectivité

III-2. a) Spectre de réflectivité

Comme nous le confirmerons par la suite en nous intéressant au profil des harmoniques, les conditions les plus sensibles à la présence d'une couche biologique sur la puce correspondent à l'excitation du mode guidé dans le nitrure. Le couplage se traduit par une forme résonante sur le spectre de réflectivité. Nous donnons Figure 2.14 l'efficacité de diffraction (a) dans l'ordre 0 et (b) dans l'ordre -1 obtenu pour une condition d'éclairage de 38° , correspondant à l'excitation du mode guidé dans le nitrure à la longueur d'onde de 280 nm. L'efficacité de diffraction est déterminée en l'absence et en présence d'une couche biologique d'épaisseur 0.5 nm, et d'indice de réfraction $n=1+0.2i$, correspondant à une absorption de 5×10^{-3} . On observe que l'efficacité de diffraction est diminuée en présence d'éléments biologiques à la surface de la puce. Par contre, les conditions de résonance (λ_r , θ_r) ne sont pas modifiées.

A partir des spectres de réflectivité, il est possible de déterminer le contraste $C=\Delta R/R_{\text{puce}}$, ainsi que l'amplification de contraste $\Gamma=C/(\alpha l)$. Le contraste est donné sur l'ensemble du spectre Figure 2.14. A l'ordre 0, on obtient un contraste de 0.3, correspondant à une amplification de contraste de $\Gamma=60$. A l'ordre -1 , on obtient un contraste de 0.11 soit une amplification de contraste de 23. Notons que l'amplification de contraste est moins bonne sur l'ordre -1 que sur l'ordre 0. Ceci s'explique par la définition du contraste, où l'on normalise par la réflectivité. L'amplification de contraste maximale est ainsi obtenue au minimum de réflectivité.

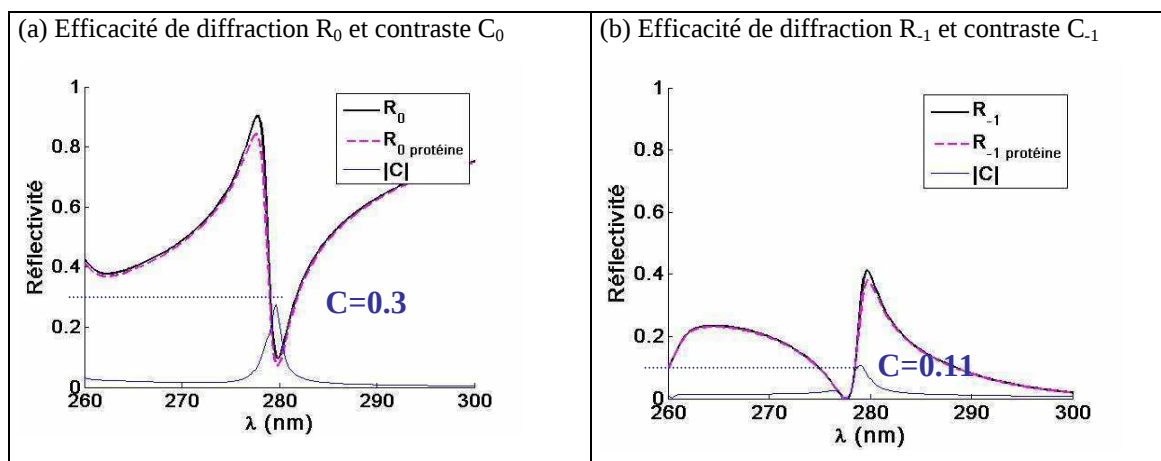


Figure 2.14 : Efficacité de diffraction en présence (courbe noire) et en l'absence (courbe rose) d'élément biologique sur la surface. Le contraste $C = \Delta R/R$ est aussi donné en bleu sur ces figures (a) Pour l'ordre 0, l'amplification de contraste maximale est de 60 correspondant à un contraste $c=0.3$ (b) Pour l'ordre -1 excité à une incidence de 38° , on a un contraste de 0.11, soit une amplification de contraste de 23.

Les cartes d'efficacité de diffraction sont représentées Figure 2.15 pour les (a) ordre 0 et (b) ordre -1 . Ces cartes sont en fait la juxtaposition de chacun des spectres tels que montrés Figure 2.14 représentés côte à côte pour reformer la carte de l'efficacité de diffraction en échelle de couleur.

Ceci permet de déterminer les conditions les plus sensibles à la présence d'éléments biologiques et d'observer et identifier les modes guidés. En calculant les efficacités en présence et en l'absence d'élément biologique, on peut déterminer les variations de réflectivités induites, ainsi que le contraste C et l'amplification du contraste Γ . La Figure 2.15 donne la carte d'amplification du contraste obtenue à l'ordre 0 et à l'ordre -1 . Les modes guidés dans la silice et dans le nitrure de silicium sont indiqués par des flèches sur cette figure. Avec ces structures, il est possible d'obtenir des amplifications de contraste de l'ordre de 60 à l'ordre 0 et de 25 à l'ordre -1 . Des améliorations de ces structures sont possibles (changement des matériaux diélectriques, biopuces fonctionnant en solution, miroir présentant moins de pertes...). Cependant, de telles amplifications de contraste semblent déjà intéressantes. Nous allons maintenant nous intéresser à la répartition du champ électrique dans la structure lors du couplage au mode guidé, afin de mettre en évidence le recouvrement du champ électrique et des éléments biologiques à la fois pour le mode de la silice et celui du nitrure. La modification d'amplitude du champ dans la structure en présence et en l'absence d'éléments biologiques sera aussi observée.

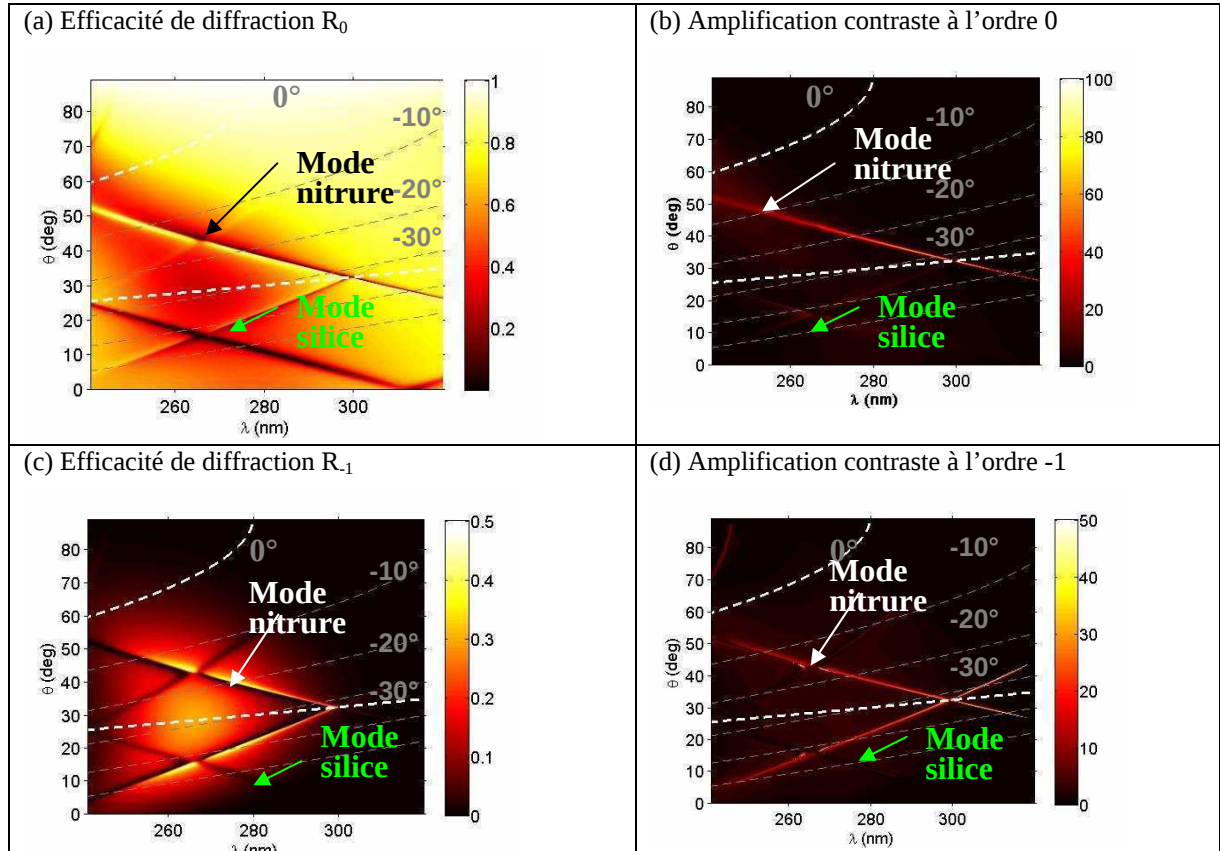


Figure 2.15 : Diagramme de réflectivités (θ, λ) et amplification du contraste obtenus dans les ordres de diffraction -1 et 0 . Les modes guidés dans la silice et dans le nitrure sont indiqués par des flèches, ainsi que la condition Littrow, correspondant à $\theta_0 = \theta_{-1}$. Sur la carte d'amplification des contrastes, on peut noter que le mode guidé dans le nitrure est plus sensible à la présence d'un élément absorbant. Les directions d'émission de l'ordre -1 sont indiquées par les abaques gris pointillés. Les échelles de couleurs utilisées sont différentes pour l'ordre R_0 et l'ordre R_{-1} .

III-2. b) Modes guidés

Comme observé sur les cartes de réflectivité, le mode guidé dans le nitrure est plus sensible à la présence de l'élément absorbant. En effet, le mode est localisé proche de l'élément biologique et interagit par conséquent plus fortement avec lui.

Nous donnons Figure 2.16 et 2.17 le profil des modes guidés dans la structure dans la silice puis dans le nitrure, en présence et en l'absence d'absorbant sur la puce. Le mode guidé de la silice peut être excité en l'éclairant à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm, et $\theta = -11^\circ$. Le mode guidé dans le nitrure est quant à lui excité en éclairant la puce à un angle d'incidence $\theta = 38.1^\circ$.

L'interaction est étudiée avec un élément biologique d'absorption 5×10^{-2} (soit 10 fois supérieure aux autres simulations de manière à voir nettement l'effet de l'absorption).

L'analyse des spectres de diffraction au voisinage de la résonance a montré que seule l'efficacité de diffraction est affectée, alors que les conditions de résonance sont peu modifiées. Ainsi, on observe l'effet de l'absorbant sur le profil des harmoniques dans les mêmes conditions (λ_r , θ_r).

En ce qui concerne le mode guidé dans le nitrure (Figure 2.16), le profil des champs des harmoniques met en évidence que l'harmonique $m=+1$ est la plus intense. L'harmonique fondamentale correspondant au champ de l'onde incidente dans le cas d'une puce non structurée est peu affectée. La construction d'Ewald permet de confirmer que les harmoniques $+1$, et -2 sont guidées dans le nitrure, et interagissent avec la couche absorbante sur la surface.

En ce qui concerne le mode guidé dans la silice (Figure 2.17), le profil du champ électrique de l'harmonique $m=0$ a une forme et une période relativement identique à ce qu'on obtiendrait lorsque la puce ne présente pas de réseau sur la surface. Le profil du champ électrique de l'harmonique $m=+1$ présente une amplitude relativement importante par rapport à l'harmonique fondamentale (2.5 fois plus importante que celui de l'harmonique fondamentale là où est localisé l'élément biologique). Les harmoniques d'ordre $m=+2$ et $m=-1$ sont localisées dans le nitrure mais ont de faibles amplitudes. L'essentiel de l'énergie étant localisé loin de l'élément absorbant, l'effet de la couche biologique est faible. Ceci s'observe sur le profil des harmoniques et se retrouve sur la carte de réflectivité où l'on voit que l'amplification de contraste est peu élevée pour le mode guidé dans la silice.

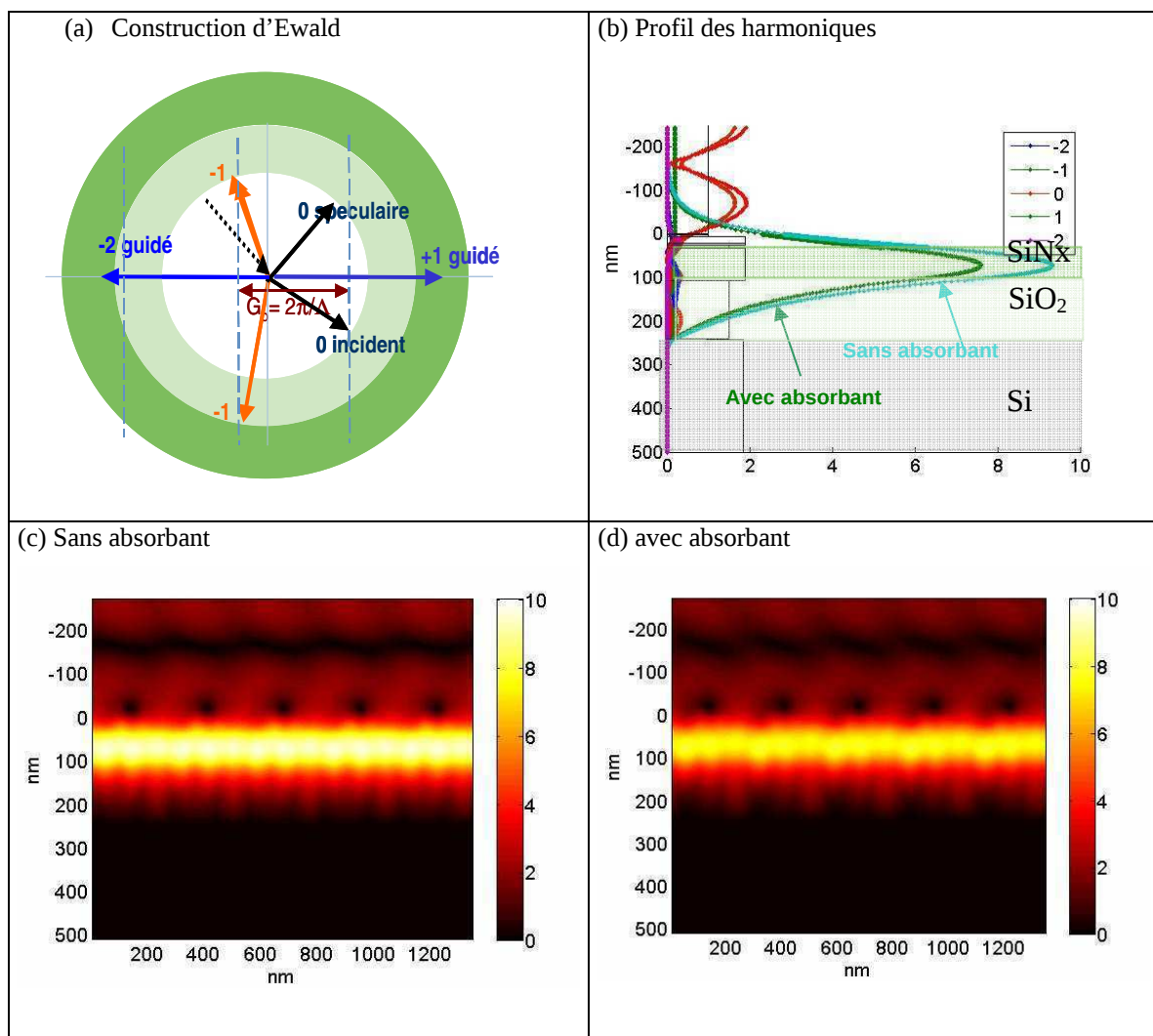


Figure 2. 16: (a) Construction d'Ewald et (b) profil du module du champ des harmoniques pour un mode guide dans le nitrure ($\lambda=280$ nm, $\theta=38^\circ$), avec et sans élément biologique (couleur plus foncées pour les simulations en présence d'élément biologique). Afin de bien voir l'effet de l'absorption, on considère ici un élément biologique d'absorption 2.5% (indice $1+0.2i$ sur une épaisseur de 2.5 nm). (c) Module du champ E (c) en l'absence et (d) en présence d'éléments biologiques sur la puce

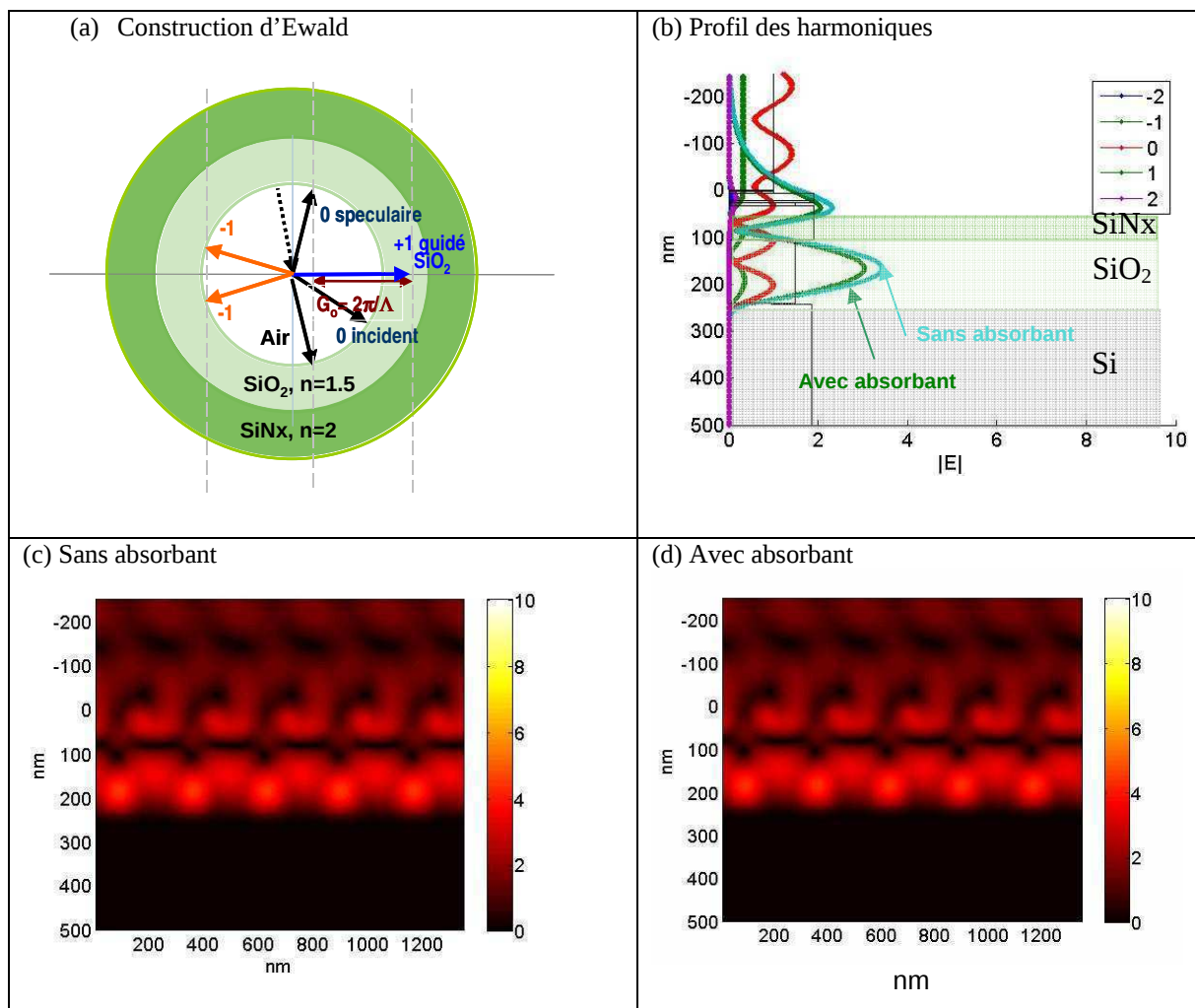


Figure 2.17 (a) Construction d'Ewald et (b) profil du module du champs des harmoniques pour un mode guide dans la silice ($\lambda=280$ nm, $\theta=11^\circ$), avec et sans élément biologique (couleur plus foncées pour les simulations en présence d'élément biologique). Afin de bien voir l'effet de l'absorption, on considère ici un élément biologique d'absorption 2.5% (indice $1+0.2i$ sur une épaisseur de 2.5 nm). (c) Module du champ E (c) en l'absence et (d) en présence d'éléments biologiques sur la puce

III – 3. Effet partie réelle/absorption de l'élément biologique

Comme dans le cas de la structure multicouche, nous donnons ici la réponse spectrale de la puce couverte d'un élément biologique d'indice (a) $1+0.2i$, (b) $1.5+0.2i$ sur une épaisseur de 0.5 nm et (c) $1.5+0.04i$ sur une épaisseur de 2.5 nm.

Sur la Figure 2.18, on donne la réponse spectrale dans l'ordre 0 en présence et en l'absence d'élément biologique, ainsi que la valeur absolue du contraste obtenu. La réponse spectrale observée résulte à la fois des effets d'absorption et des effets de contraste d'indice.

Dans le cas d'un contraste d'absorption (Figure 2.18 (a)) le contraste est positif. La modification de signal induite par l'élément biologique est une diminution de l'efficacité de diffraction sans changement de fréquence.

Avec un déphasage sur une épaisseur de 0.5 nm (Figure 2.18 (b)) le contraste est essentiellement positif, sauf au niveau du pic de résonance où on a une légère inversion de contraste. Le contraste maximal obtenu est de 0.39 contre 0.3 pour un contraste d'absorption uniquement, soit une amplification du contraste de 80 au lieu de 60. Ainsi, l'effet de l'élément biologique résulte d'une combinaison des effets d'absorption et de déphasage, mais l'effet d'absorption reste prédominant sur le signal mesuré. Au niveau de la pente la plus forte de la courbe de résonance, on a inversion de contraste mais le décalage est de 0.05 nm au maximum de l'inversion, alors qu'il est dix fois supérieur en dehors de la résonance. Le fait que le contraste reste essentiellement positif est aussi dû au fait qu'on ait placé la résonance de Fano sur une pente positive $\partial R(\lambda)/\partial \lambda$. Ainsi, en dehors du pic de résonance, le contraste est forcément positif lors d'une translation de la courbe vers les grandes longueurs d'onde.

Dans le troisième cas (Figure 2.18 (c)), pour une épaisseur de 2.5 nm, le déphasage dû à la partie réelle de l'indice optique est élevé. Ainsi, l'essentiel du contraste est dû au décalage spectral de la courbe et non à la modification d'efficacité de diffraction du fait de l'absorption. Le contraste maximal est obtenu sur la pente maximale de la résonance. La valeur de contraste maximale est obtenue en contraste négatif (spots clairs sur fond noir d'après notre définition). Le contraste est alors de 0.8, soit une amplification de contraste de 160. Cette amplification est obtenue là où la pente du pic de réflectivité est maximale. La courbe de résonance a une forme asymétrique de type Fano. L'amplification de contraste maximale obtenue en contraste positif est de 125. La valeur du contraste est alors de 0.62. Le contraste maximal est aussi obtenu là où l'on a la plus forte pente sur la courbe de réflectivité.

Cependant, la pente étant ici moins importante, et on a une amplification de contraste moins élevée.

La Figure 2.19 donne les efficacités de diffraction à l'ordre -1 . La forme Fano a une allure « symétrique » à ce qui est obtenu sur la réflectivité spéculaire. Ainsi, le contraste a une influence inverse sur le contraste par rapport à l'absorption. En ce qui concerne l'efficacité de diffraction sur l'ordre -1 , dans le cas (a) en présence uniquement d'absorption, le contraste est comme attendu positif. On obtient une annulation là où l'efficacité de diffraction est quasiment nulle. Dans le cas (b), on a une inversion de contraste due au contraste d'indice au niveau et en dehors de la résonance. Cet effet d'inversion de contraste est renforcé dans le cas (c), puisqu'on a un déphasage $5\times$ supérieur au cas (b). Dans les trois cas, on observe cependant bien une diminution de l'efficacité de diffraction sur l'allure globale de la courbe. Ainsi, l'effet de l'absorption a une signature non négligeable sur les efficacités de diffraction obtenue sur l'ordre -1 .

On retrouve que les tendances entre absorption et indice changent lorsqu'on passe à des épaisseurs encore très petites devant λ , comme c'était déjà le cas pour les structures quart d'onde, malgré les complexités supplémentaire du réseau résonant. Dans tous les cas analysés, bien qu'étant uniquement de 5×10^{-3} , l'effet de l'absorption a un effet notable sur les efficacités de diffraction, et pourra être exploité pour l'imagerie, en étant renforcé par un effet d'indice le cas échéant.

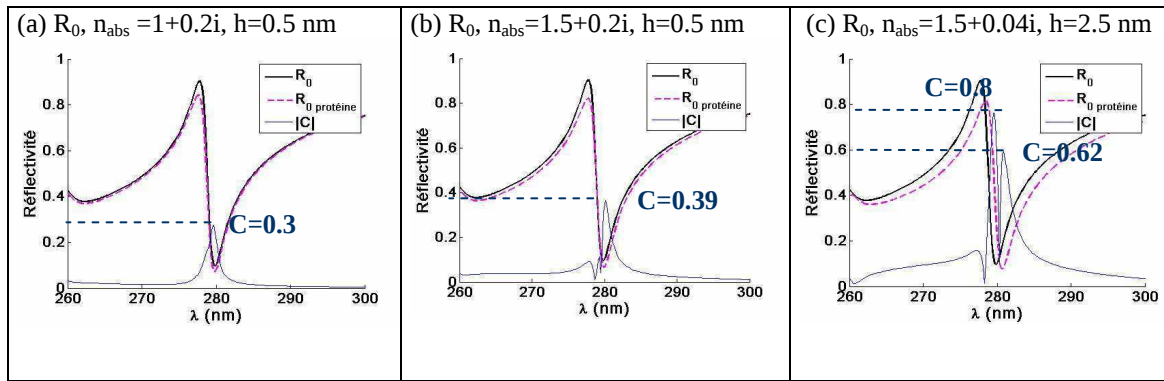


Figure 2.18: Profil de la réflectivité spéculaire avec (1) couche de 0.5 nm, avec comme indice de réfraction $n = 1+0.2i$ (2) couche de 0.5 nm, avec comme indice de réfraction $n = 1.5+0.2i$ (3) couche de 2.5 nm, avec comme indice de réfraction $n = 1.5+0.04i$

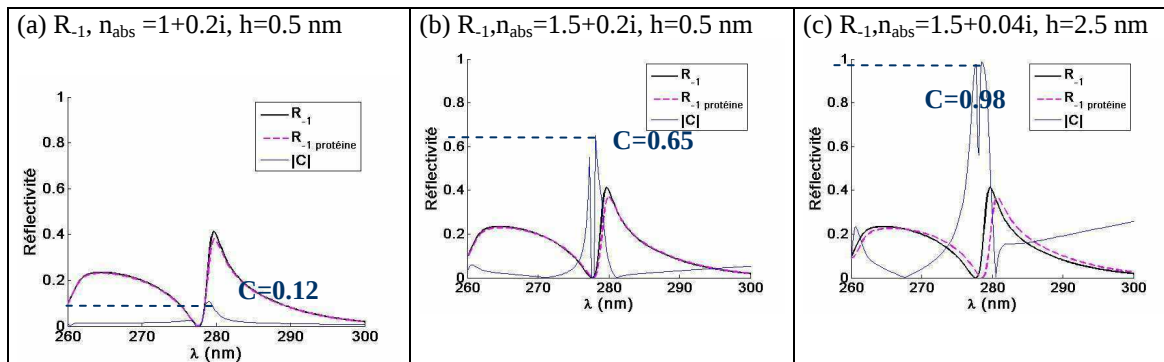


Figure 2.19: Profil de l'efficacité de diffraction à l'ordre -1 avec (1) couche de 0.5 nm, avec comme indice de réfraction $n = 1+0.2i$ (2) couche de 0.5 nm, avec comme indice de réfraction $n = 1.5+0.2i$ (3) couche de 2.5 nm, avec comme indice de réfraction $n = 1.5+0.04i$

IV - Finesse de la résonance

IV – 1. Position du problème

La possibilité d'influer sur les propriétés du réseau résonant en faisant varier ses paramètres opto-géométriques est un avantage majeur de ces structures. Les guides d'onde de forte finesse correspondent aussi à une longue distance de propagation, c'est à dire que l'onde est confinée à la surface et interagit avec l'élément biologique plus longtemps. L'excitation du mode guidé implique dans ce cas une faible largeur spectrale et angulaire. L'éclairage en condition résonante est généralement réalisé avec une source laser, de faible divergence et largeur spectrale. Cependant en imagerie, le "speckle" et le coût des sources lasers sont problématiques. Lorsque l'éclairage n'est pas réalisé avec une source laser, une sélection en longueur d'onde et en angle est nécessaire, d'où une diminution du flux par rapport au flux total de la source. Un compromis est donc à trouver entre forte sensibilité théorique obtenue pour des résonances de fort facteur de qualité et flux suffisant. Dans notre cas, l'éclairage en conditions résonantes est réalisé avec une source Xénon, filtrée sur une largeur spectrale $\Delta\lambda$ par un spectromètre à réseau. Le faisceau est collimaté et a pour largeur angulaire à mi-hauteur $\Delta\theta$. Nous discutons ici le compromis entre réseau fortement résonant et résolution instrumentale.

IV- 2. Limites dues aux résolutions expérimentales

Les résolutions angulaires et spectrales sont responsables d'un amortissement apparent de la courbe de résonance, c'est à dire d'une diminution des finesses des résonances, et donc une moindre sensibilité.

Afin de prendre en compte la résolution instrumentale sur les signaux calculés, on réalise une convolution entre une fonction de sensibilité instrumentale $S(\lambda)$ et le signal réfléchi. La résolution angulaire $G(\theta)$ est aussi prise en compte par le même type de traitement. La réflectivité mesurée dans l'ordre 0 est ainsi donnée par l'expression suivante :

$$R_0 = R_0(\theta_r, \lambda_r) \otimes G(\theta) \otimes S(\lambda) \quad (2.50)$$

En ce qui concerne l'ordre de diffraction -1 , il est aussi nécessaire de prendre en compte la direction d'émission. Ceci est réalisé en convoluant avec une fonction $\delta(\theta, \lambda)$ qui peut être de

forme gaussienne correspondant aux directions collectées par le détecteur. Ainsi, le signal mesuré par le détecteur aura comme expression :

$$\begin{aligned} R_{-1} &= R_{-1}(\theta_r, \lambda_r) \otimes S(\lambda) \otimes G(\theta) \otimes \delta(\theta', \lambda) \\ R_{-1} &\equiv R_{-1}(\theta_r, \lambda_r) \otimes S(\lambda) \otimes G'(\theta, \theta', \lambda) \end{aligned} \quad (2.51)$$

où la fonction $G'(\theta, \theta', \lambda)$ prend en compte la direction de diffraction.

La distribution angulaire du faisceau incident est supposé de forme gaussienne et s'exprime alors :

$$G(\theta) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\Delta\theta} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(\theta - \theta_r)^2}{\Delta\theta^2}\right) \quad (2.52)$$

En ce qui concerne la résolution spectrale, soit on prend la réponse instrumentale elle-même si la mesure expérimentale est disponible (en normalisant l'intégrale à 1), soit de la même manière que pour la résolution angulaire, on utilise aussi une fonction gaussienne de largeur spectrale à mi-hauteur $\Delta\lambda$. Cette seconde solution permet d'avoir une forme commune pour toutes les résolutions instrumentales. Elle est donnée par l'expression 2.53 et sera utilisée dans les résultats présentés ici, en considérant des largeurs spectrales $\Delta\lambda=1.5$ nm et de $\Delta\lambda=10$ nm.

$$S(\lambda) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\Delta\lambda} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(\lambda - \lambda_r)^2}{\Delta\lambda^2}\right) \quad (2.53)$$

IV-3 Finesse et résolution instrumentale

Nous comparons ici les réponses spectrales obtenues pour deux profondeurs de corrugation différentes, de 7 nm et 20 nm respectivement. La profondeur de corrugation agit directement sur la finesse de la résonance. Une description phénoménologique des propriétés de notre structure permet d'exprimer les largeurs angulaires et spectrales de la résonance directement à partir des paramètres opto-géométriques de la structure et du coefficient de rayonnement [Sychugov, 1989]. Notre analyse est ici basée sur l'exploitation directe des efficacités de diffraction. On définit la finesse $F = \lambda/\Delta\lambda$ en prenant pour $\Delta\lambda$ la largeur spectrale du flanc le plus abrupt de la réflectivité.

Afin de mettre en évidence la contribution de la profondeur de corrugation uniquement, on adapte la géométrie du guide d'onde afin d'obtenir une configuration équivalente. En effet, lorsque la profondeur de corrugation est modifiée, l'indice effectif du guide varie, ainsi que

son épaisseur. Pour observer le rôle de l'épaisseur de corrugation, on adapte l'épaisseur des couches afin de conserver l'épaisseur équivalente du guide d'onde.

Nous donnons Figure 2.20 la réponse spectrale obtenue pour deux épaisseurs de corrugations différentes : la première est de 7 nm, alors que la seconde est de 20 nm (cas détaillé dans la section précédente). Le premier cas correspond à une finesse $F \sim 800$, alors que le second correspond à une finesse $F \sim 200$. Pour simplifier les discussions, on ne prend ici en compte que la résolution spectrale, mais la prise en compte de la résolution angulaire a un effet similaire. Les largeurs spectrales considérées sont 1.5 nm et 10 nm. Nous présentons d'abord les résultats obtenus à l'ordre 0 (Figure 2.20 (a)), puis à l'ordre de diffraction -1 (Figure 2. 20 (b)).

Sur la Figure 2. 20 (a) et (b), on voit que lorsqu'on prend en compte la résolution, spectrale l'amplification de contraste d'absorption obtenue à l'ordre 0 pour la corrugation de 7 nm passe de $\Gamma=160$ à $\Gamma=21$ pour une largeur spectrale à mi-hauteur de 1.5 nm, et $\Gamma=6$ pour une largeur spectrale de 10 nm. Pour la corrugation de 20 nm, l'amplification passe de $\Gamma=60$ à $\Gamma=43$ pour $\Delta\lambda=1.5$ nm, et $\Gamma=8$ pour une résolution de 10 nm. Ainsi, si en théorie les meilleures finesesses correspondent aux meilleures sensibilités, on voit que dès que l'on considère les réponses instrumentales, les chiffres sont nettement dégradés. Pour un éclairage en condition résonante de largeur spectrale $\Delta\lambda=1.5$ nm (correspondant à un temps d'intégration de 1 Hz pour remplir la capacité avec une LED filtrée) la structure la moins résonante ($F \sim 200$) donne de meilleurs résultats que celle la plus résonante ($F \sim 800$).

Sur la Figure 2.20 (c) et (d), on donne l'efficacité de diffraction et les amplifications de contraste obtenues à l'ordre -1 pour une profondeur de corrugation de (a) 7 nm, et de (b) 20 nm. L'amplification de contraste maximale obtenue est $\Gamma=86$; elle passe à $\Gamma=36$ pour la résolution de $\Delta\lambda=1.5$ nm et à $\Gamma=12$ pour la largeur $\Delta\lambda=10$ nm.

Pour la corrugation de 20 nm, le signal réfléchi à l'ordre -1 permet des amplifications de contraste de $\Gamma=23$ sans prendre en compte la résolution spectrale, diminuée à $\Gamma=21$ pour résolution de 1.5 et à $\Gamma=8$ pour une résolution de 10 nm.

Les valeurs des amplifications de contraste sont plus élevées pour la corrugation la plus faible. On observe aussi que l'efficacité de diffraction est nettement inférieure dans le cas de la corrugation de 7 nm.

En effet, le faible niveau du signal, augmente le contraste calculé. Pour la corrugation de 7 nm on a une efficacité $R_1=0.14$, alors que pour la corrugation de 20 nm on a $R_1=0.42$. Le

contraste étant défini par $C=\Delta R/R$ augmente la valeur de contraste mais correspond aussi à un faible rapport signal sur bruit, et donc une moins bonne sensibilité.

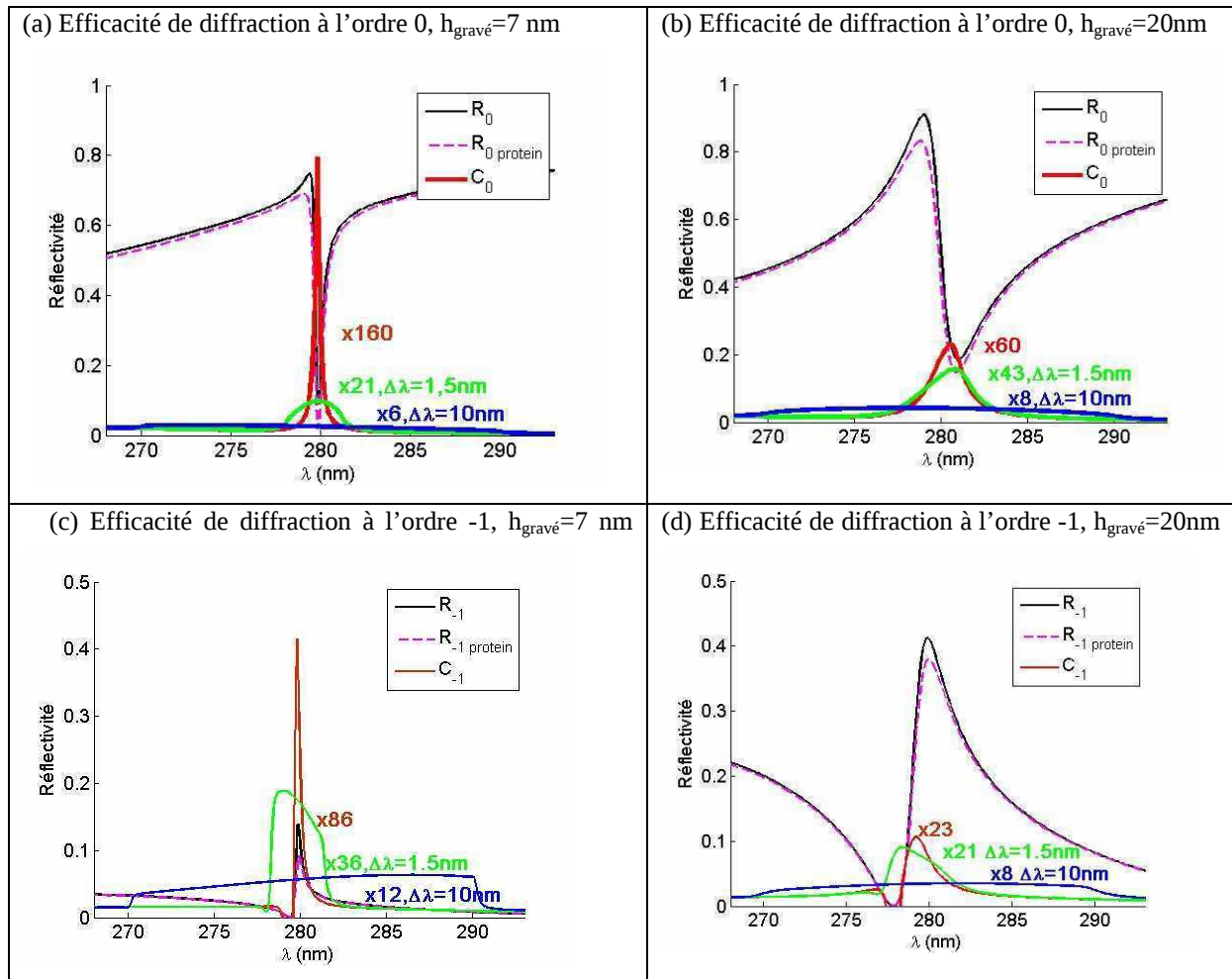


Figure 2.20: Efficacités de diffraction (a) et (b) dans les ordres 0 et (c) et (d) dans l'ordre -1 pour différentes épaisseurs de corrugation : gravure de 7 nm, et gravure sur 20 nm. Sur chacune des courbes, on représente le contraste pour différentes largeurs spectrales : $\Delta\lambda=0\text{nm}$ (rouge), $\Delta\lambda=1.5\text{ nm}$ (vert), et $\Delta\lambda=10\text{ nm}$ (bleu)

Les résolutions instrumentales influent fortement sur le contraste. Ainsi, des très fortes sensibilités obtenues en théorie pour des réseaux très résonants peuvent correspondre en réalité à de moins bonnes sensibilités expérimentales. Dans l'ultraviolet, bien qu'en plein essor, les composants permettent de faibles flux. Les valeurs d'amplification de contraste sont largement diminuées lorsqu'on prend en compte les largeurs spectrales et/ou angulaire du dispositif de mesure. Nous verrons aussi dans le chapitre 4 comment il est possible d'exploiter toute la largeur spectrale d'une DEL en pré-dispersant l'éclairage. Les progrès dans

l'ultraviolet permettront sans doute des résolutions angulaires et spectrales plus fines et amélioreront ainsi les sensibilités obtenues expérimentalement.

IV – 4. Finesse et résolution spatiale

Un autre aspect à prendre en compte en imagerie pour les réseaux à forte finesse est la longueur de propagation du mode. Une distance de propagation élevée signifie que la distance sondée par l'onde est grande. Le signal mesuré dépend de l'ensemble des propriétés optiques vues par le mode lors de sa propagation. La résolution spatiale en imagerie est alors perdue dans la direction de propagation du mode. Ceci limite la surface du spot exploitable, et donc la quantité d'information qui peut être contenue sur la puce.

L'étendue spatiale du mode Δx est d'autant plus importante que le mode est résonant. L'étendue spatiale du mode et la finesse spectrale sont reliées par la vitesse de groupe. La vitesse de groupe correspond à la vitesse de propagation du mode définie par :

$$v_g = \frac{\partial \omega}{\partial k} = \frac{c}{n_g}, \text{ où } c \text{ est la vitesse de la lumière, et } n_g \text{ l'indice effectif du mode. L'étendue}$$

spatiale du mode est définie comme la distance à laquelle l'amplitude a été divisée par 2 [Yeatman, 1996].

$$\text{Elle est donnée par : } \Delta x = \ln(2) F \lambda / n_g. \quad (2.54)$$

L'indice effectif de notre puce n_g est de l'ordre de 2 (déterminé par la pente du mode guidé sur la carte d'efficacité de diffraction. Ainsi, pour les deux épaisseurs de corrugations étudiées, correspondant à une finesse de 800 pour $h_{\text{gravé}} = 7 \text{ nm}$, et une finesse de 200 pour le réseau gravé de 20 nm, on a une étendue spatiale du mode Δx de 80 μm dans le premier cas, et de 20 μm dans le second cas. Cependant, dans le domaine de la biodétection, la miniaturisation et la densité d'information sont primordiales. Les applications des réseaux de diffraction à la détection d'éléments biologiques développés exploitent à notre connaissance des résonances de fort facteur de qualité [Cottier, 2003] [Cunningham, 2002]. Ceci peut permettre de fortes sensibilités en spectroscopie si la taille de la surface sondée est suffisamment grande. Cependant, dans l'ultraviolet, nous bénéficions de la courte longueur d'onde qui permet d'avoir une étendue spatiale plus faible, cette dernière étant proportionnelle à la longueur d'onde. Cet aspect sera rediscuté au chapitre 4, avec un support d'images simulées permettant de visualiser l'effet de l'étendue spatiale du mode.

V - Conclusion

L'imagerie de puce comportant des éléments biologiques sur sa surface nécessite l'observation de très faibles variations de signal. Ainsi, de manière à augmenter la sensibilité de la détection, il est possible d'amplifier les variations de signal induites par les éléments biologiques. Ceci est réalisé en modélisant puis en fabriquant des biopuces qui vont permettre d'amplifier le contraste d'absorption.

Le point de départ de cette thèse était d'étudier la pertinence de l'exploitation des propriétés d'absorption des éléments biologiques dans l'ultraviolet. Ainsi, le contraste d'absorption a été étudié et modélisé dans un premier temps. L'absorption étant quantifiable et pouvant être déterminée à partir de la séquence en acides aminés d'une protéine ou en nucléotides d'un brin d'ADN, une détection basée uniquement sur l'absorption serait très intéressante en biologie. En effet, aussi bien en détection par plasmon de surface que dans l'utilisation de réseaux résonants en biodétection, la détection est basée sur la partie réelle de l'indice optique qui est une valeur mal tabulée et dépendante de la température.

Cependant, les effets d'absorption et de déphasage sont indissociables lors de l'étude des variations de réflectivité. Ainsi, basée sur des simulations électromagnétiques, nous avons mis en évidence les deux effets, et montré la présence de contrastes plus importants en présence d'absorption (contraste positif plus fort que contraste négatif d'après notre définition du contraste 2.1).

Les premières structures étudiées consistaient en des structures simples quart d'onde, permettant d'amplifier le contraste par un facteur $\Gamma=(1+r)^2/r$. Bien que très simples, ces structures nous ont permis d'évaluer les limites de sensibilité et la capacité de fonctionnaliser les biopuces avec une monocouche de protéine. Il a aussi été mis en évidence que l'augmentation du contraste de réflectivité n'était pas proportionnelle au carré du champ local dans la couche absorbante. Ce résultat non attendu nous a amené à modéliser l'absorption de la couche en adoptant une approche perturbative, non développée dans la littérature à notre connaissance. Les augmentations de contraste permises par ces structures restant faibles, des biopuces exploitant les propriétés de résonances ont ensuite été étudiées.

L'exploitation de propriétés de résonance est intéressante pour obtenir des variations de réflectivité plus importantes lors d'une faible variation de l'indice effectif à la surface de la puce. En effet, en favorisant l'interaction entre le champ électrique et les éléments biologiques, les variations induites sur la réflectivité sont plus fortes. Des structures permettant un renforcement du contraste de l'ordre de plusieurs dizaines peuvent être obtenues en prenant en compte uniquement le contraste d'absorption et ce à des résolutions instrumentales (angulaire et spectrale) réalisables expérimentalement. Il s'agit ici d'une mise en évidence du potentiel des réseaux résonants en biodétection. D'autres optimisations peuvent certainement encore être réalisées afin d'obtenir de meilleurs renforcements de contraste. Des meilleurs renforcements de contrastes, sont attendus pour des puces optimisées pour des expériences en solution, puisque l'onde guidée peut être localisée plus proche de l'interface, ce qui favorise l'interaction avec l'élément biologique.

Pour notre application d'imagerie, il est aussi intéressant d'exploiter la direction des angles d'émission. Ainsi, les variations de réflectivités ont été étudiées à la fois sur l'ordre de diffraction 0 et sur l'ordre de diffraction -1 . De la même manière que sur les structures multicouches, l'effet de l'absorption ainsi que l'effet induit par la partie réelle de l'indice optique a été étudié. Nous avons pu constater que l'absorption était favorable pour renforcer les contrastes, mais que le contraste d'indice avait un effet non négligeable sur le contraste. L'inversion de contraste n'a pas été observée pour de faibles déphasages, c'est à dire que selon les paramètres choisis pour la biopuce, il est possible de combiner les variations induites par le déphasage et par l'absorption afin d'obtenir un meilleur renforcement de contraste.

Références

- [Avrutsky, 1989] I.A. Avrutsky, V.A. Sychugov “Reflection of a beam of finite size from a corrugated waveguide”, *Journal of modern optics*, Vol. 36(11), 1989.
- [Baghdasaryan, 1988] H. V. Baghdasaryan, T. M. Knyazyan, S. S. Berberyan, and A. A. Mankulov, “Correct analysis of Gires-Tournois absorbing interferometer by the method of single expression”, *Microwave and Optical Technology Letters*, Vol. 37(1), 1988.
- [Basu, 2003] P.K. Basu, “Theory of optical processes in semiconductors: bulk and microstructures”, 2003.
- [Benisty, 1998] H. Benisty, R. Stanley, and M. Maier, “Method of source terms for dipole emission modification in modes of arbitrary planar structures” *Journal of the Optical Society of America A*, Vol. 15 : 1192-1201, 1998.
- [Bonin, 1997] K.D. Bonin, V.V. Kresin, “Electric-dipole polarizabilities of atoms, molecules, and clusters”, 1997.
- [Brioude, 2000] V. Brioude, O. Parriaux “Normalised analysis for the design of evanescent-wave sensors and its use for tolerance evaluation”, *Optical and Quantum Electronics*, Vol. 32, 2000.
- [Cottier, 2003] K. Cottier, M. Wiki, G. Voirin, H. Gao, and R.E. Kunz, “Label-free highly sensitive detection of (small) molecules by wavelength interrogation of integrated optical chips” *Sens. Actuators*, Vol. B 91: 241-251, 2003.
- [Cunningham, 2002, a] B.T. Cunningham, P. Li, B. Lin, and J. Pepper, “Colorimetric Resonant Reflection as a Direct Biochemical Assay Technique”, *Sensors and Actuators B*, Vol. 81, pp. 316-328, 2002.
- [David, 2006] A. David, “High efficiency GaN-based LEDs: light extraction by photonic crystals” *Annales de Physique*, Vol. 31 (6), 2006.
- [Fan, 2002] Shanhui Fan, “Sharp asymmetric line shapes in side-coupled waveguide-cavity systems” *Applied Physics Letters*, Vol. 80 (908), 2002.
- [Fano, 1961] U. Fano, “Effects of Configuration Interaction on Intensities and Phase Shifts” *Physical Review*, Vol. 124 : 1866, 1961.
- [Li, 1996] L. Li, "Formulation and comparison of two recursive matrix algorithms for modeling layered diffraction gratings” *Journal of the Optical Society of America A*, Vol 13(5) : 1024-1035, 1996.
- [Kunz, 2000] M. Wiki, and R. E. Kunz, "Wavelength-interrogated optical sensor for biochemical applications" *Optics Letters*, Vol. 25 (7), 2000.
- [Rosenblatt, 1997] D. Rosenblatt, A. Sharon, and A.A. Friesem “Resonant Grating Waveguide Structures” *IEEE Journal of Quantum electronics*, Vol. 33(11), 1997.
- [Parriaux, 1998] O. Parriaux, G.J. Veldhuis, “Normalized analysis for the sensitivity optimization of integrated optical evanescent-wave sensors”, *Journal of lightwave technology*, Vol. 16(4) : 573, 1998.
- [Pietroy, 2007] D. Pietroy, “Contrôle de la phase d'un réseau résonnant pour la mise en forme temporelle d'impulsions laser ultra-brèves” *Thèse 2007*, Université Saint-Etienne, 2007.

- [Seraphin, 1965] B.O. Seraphin, N. Bottka, “Franz-Keldysh Effect of the Refractive Index in Semiconductors”, *Physical Review*, Vol. 139(2A) : 560-564, 1965.
- [Robin, 2009] K. Robin, J.L. Reverchon, L. Mugherli, H. Benisty, "Design of specific biochips for contrast enhancement of UV biological absorption" *SPIE Photonics West*, 2009.
- [Sychugov, 1996] V. A. Sychugov, A. V. Tishchenko, and B. A. Usievich, and O. Parriaux “Optimization and control of grating coupling to or from a silicon-based optical waveguide”, *Optical Engineering*, Vol. 35 : 3092 , 1996.
- [Tien, 1971] P.K. Tien, “Light Waves in Thin Films and Integrated Optics”, *Applied Optics*, Vol 10(11) : 2395, 1971.
- [Tikhodeev, 2002] S.G. Tikhodeev, A.L. Yablonskii, E.A. Muljarov, N.A. Gippius, and T. Ishihara, “Quasiguidded modes and optical properties of photonic crystal slabs” *Physical Review B*, Vol. 66(4), 2002.
- [Vörös, 2004] J Vörös, “The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers” *Biophysical Journal*, Vol. 87: 553-551, 2004.
- [Windt, 1998] D.L. Windt, “IMD-Software for modeling the optical properties of multilayer films” *Computers in Physics*, Vol. 12(4): 360-370, 1998.
- [Yeatman, 1996] E.M. Yeatman, “Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing” *Biosensors and Bioelectronics*, Vol.11: 635-649, 1996.

Chapitre III

Résultats expérimentaux

Dans ce chapitre, nous présentons la fabrication et la caractérisation des biopuces présentées précédemment. Elles sont conçues pour permettre une bonne sensibilité à la longueur d'onde de 280 nm. Une caractérisation fine de la puce fabriquée permet par retour sur le design de départ d'affiner la modélisation, et donc de mieux prédire les contrastes attendus. Dans le domaine de l'ultraviolet, les matériaux sont fortement dispersifs et ont tendance à absorber. Ceci est à l'origine de pertes qui sont à prendre en compte concernant la réponse spectrale et les contrastes obtenus en imagerie. Les puces puis les dépôts biologiques ont ainsi été caractérisés par ellipsométrie spectroscopique. Ceci a permis de déterminer leur loi de dispersion de manière précise dans le domaine de longueur d'onde qui nous intéresse. La caractérisation de la surface est aussi importante, afin d'en comprendre sa rugosité, et éventuellement de la prendre en compte dans le modèle. L'AFM nous a permis de contrôler les épaisseurs de gravure (aussi déterminées par ellipsométrie). La prise en compte de ces résultats dans les simulations électromagnétiques a permis de déterminer les caractéristiques spectrales de la puce. Ceci a ensuite pu être confirmé par caractérisation spectroscopique réalisée sur un montage goniométrique (θ , 2θ). Les mesures expérimentales se sont montrées en accord avec les efficacités de diffraction déterminées par simulations électromagnétiques. Nous verrons que les contrastes obtenus en imagerie sont aussi conformes à ce que l'on attend. A notre connaissance, ce travail constitue la première réalisation d'imagerie de biopuces sur réseaux résonants. La prédictibilité des résultats est un élément qui conforte la pertinence de l'interprétation de ce qu'on obtiendra en imagerie.

I - Préparation de la puce

I-1. Etapes de fabrication

La fabrication des puces comprend plusieurs étapes successives. Les détails techniques des paramètres de fabrication sont donnés en annexe C. Nous en donnons ici uniquement les étapes principales. Tout d'abord, un dépôt de silice PECVD (Plasma Enhanced Vapor Chemical Deposition) est réalisé. Dans le cas des biopuces quart d'onde, il est directement suivi des étapes biologiques.

Dans le cas des biopuces guides d'onde diélectrique, afin de permettre un couplage évanescent, on réalise un dépôt de nitrure PECVD ($n \sim 2$) sur la couche de silice ($n \sim 1.5$). Ceci permet à l'onde d'être guidée dans la couche de nitrure proche de l'élément biologique. Pour permettre le couplage, un réseau de diffraction de période 270 nm est réalisé par lithographie électronique. Le nitrure est ensuite gravé par un plasma (RIE, reactive ion etching) SF_6 (hexafluorure de soufre) avant d'enlever la résine PMMA par un plasma oxygène. L'étape de lithographie électronique est réalisée en dernier. Ce choix permet une flexibilité pour l'adaptation des paramètres du réseau sans changer de support multicouche, ces derniers étant réalisés sur de plus grandes surfaces. Cependant, afin d'avoir la même épaisseur effective pour la couche guidante sur toute la surface, il serait préférable d'enterrer le réseau entre la couche de silice et la couche de nitrure.

La hauteur de gravure est directement liée à la finesse des résonances. La méthode de greffage utilisée dans notre protocole nécessite une silanisation de la surface, et donc la présence d'atomes d'oxygène à la surface de la puce. Ainsi, après réalisation du réseau, on dépose sur la plaque une fine couche de silice par PECVD, d'épaisseur 5 nm.

I-2. Caractérisation par ellipsométrie

I-2. a) Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une méthode de caractérisation des couches minces basée sur les modifications de la polarisation d'une onde incidente lors de sa réflexion sur une structure multicouche [Bashara, 1999]. Cette méthode permet de déterminer les lois de dispersion et épaisseurs des couches.

Si l'on considère une onde incidente de champ électrique $\vec{E} = E_p \vec{e}_p + E_s \vec{e}_s$ décomposée sur les axes perpendiculaires ou parallèles au plan d'incidence.

On définit les quantités complexes appelées réflectances :

$$r_p = |r_p| \times e^{i\varphi_p} \quad (3.1)$$

$$r_s = |r_s| \times e^{i\varphi_s} \quad (3.2)$$

Le rapport des réflectances est caractéristique de la variation de l'état de polarisation.

$$\text{Ainsi : } \frac{r_p}{r_s} = \tan(\psi) \times \exp(i\Delta) \quad (3.3)$$

La tangente de l'angle Ψ est le rapport du module des atténuations, alors que Δ correspond au déphasage subi à la réflexion, soit $\Delta = \phi_p - \phi_s$. Les quantités Ψ et Δ sont directement liées aux épaisseurs et indice de la structure. Par un formalisme basé sur les matrices de Müller, il est donc possible de déterminer les indices et épaisseurs des matériaux. Notons cependant que plusieurs modèles possibles peuvent donner de bons résultats pour une même mesure ellipsométrique. Ainsi, lors de la réalisation d'une structure multicouche, il est nécessaire de réaliser une mesure entre chaque nouveau dépôt de couche. Des mesures parallèles telles que AFM, spectre de réflectivité ou spectre d'absorption sont aussi des vérifications pertinentes afin de déterminer le modèle ayant le plus de sens "physique".

I-2. b) Mesures

A chaque étape, qu'il s'agisse de la fabrication de la puce ou bien de la préparation biologique, une caractérisation par ellipsométrie spectroscopique est réalisée. Les lois de dispersion et épaisseurs des couches minces permettent de modéliser la biopuce, et d'en déterminer ses propriétés optiques par simulation. On pourra par exemple déterminer l'absorption de la protéine et la comparer avec le spectre mesuré. Les lois de dispersion seront aussi prises en compte pour la détermination des propriétés de diffraction calculées par simulation basée sur les matrices de diffusion. Une comparaison avec les mesures des spectres diffractés dans l'ordre 0 et l'ordre -1 sera ainsi également réalisée. L'épaisseur des couches et les profondeurs de gravure pourront être vérifiées par mesures d'AFM (Atomic Force Microscopy). Ceci donnera aussi des informations essentielles sur la rugosité des couches.

I-2. c) Modèle de Lorentz

Les indices sont modélisés en prenant une somme d'oscillateurs de Lorentz. La formule de dispersion de Lorentz est établie à partir du modèle de l'électron élastiquement lié. Dans ce modèle, on fait l'hypothèse que l'électron est soumis à trois forces, une force attractive exercée par le noyau, une force sinusoïdale due au champ électrique local de fréquence ω , et une force d'amortissement [Stackowki, 2008].

La constante diélectrique du matériau a comme expression :

$$\tilde{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}) \cdot \omega_t^2}{\omega_t^2 - \omega^2 + i \cdot \Gamma_0 \cdot \omega} + \sum_{j=1}^2 \frac{f_j \cdot \omega_{0j}^2}{\omega_{0j}^2 - \omega^2 + i \cdot \gamma_j \cdot \omega} \quad (3.4)$$

où :

- ε_{∞} est la constante diélectrique à haute fréquence, généralement égale à 1 sauf si d'autres oscillateurs ne sont pas pris en compte
- ε_s est la constante diélectrique à fréquence nulle. La différence $\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}$ est proportionnelle à la force de l'oscillateur de Lorentz considéré.
- ω_t représente la fréquence de résonance de l'oscillateur
- Γ_0 est la largeur à mi-hauteur de l'oscillateur

De même, dans le cas d'oscillateurs multiples :

- ω_{0j} représente la fréquence de résonance de l'oscillateur
- γ_j est la largeur à mi-hauteur de l'oscillateur considéré
- f_j la force de l'oscillateur

I-2. d) Loi de dispersion des matériaux de la puce

A chaque étape de fabrication on réalise donc une mesure en ellipsométrie, sur un témoin de substrat silicium ainsi que sur la puce. De manière à mieux connaître les matériaux dans le domaine ultraviolet autour de 280 nm, les mesures sont réalisées jusqu'à la longueur d'onde de 190 nm, avec un ellipsomètre spectroscopique d'Horiba Jobin Yvon.

Nous donnons Figure 3.1 les lois de dispersion du silicium ainsi que celles de la silice et du nitrure. Les lois de dispersion du silicium proviennent de valeurs tabulées dont nous avons pu vérifier l'adéquation avec nos mesures ellipsométriques. Une fine couche de silice native d'épaisseur 25 nm se trouve à la surface du silicium. Elle est aussi prise en compte dans le modèle de la puce.

Les coefficients obtenus par la modélisation ellipsométrique pour les lois de dispersion de la silice sont : $\epsilon_{\infty}=1$, $\epsilon_s=2.12$, $\omega_t=14.47$, $\Gamma_0=0.001$

Pour le nitrure nous obtenons : $\epsilon_{\infty}=1$, $\epsilon_s=2.98$, $\omega_t=9.055$, $\Gamma_0=0.003$

L'indice optique de la silice à la longueur d'onde de 280 nm est de 1.495. Pour le nitrure, on obtient un indice de 1.898. Les mesures permettent aussi de prendre en compte l'absorption de la silice et du nitrure dans l'ultraviolet. L'effet de l'absorption des matériaux constituant la puce est de diminuer le signal et d'amortir la résonance. La distance de propagation du mode guidé est diminuée et la structuration optique est alors moins sensible à la modification d'indice en surface de la biopuce. L'absorption de la silice est ici non significative. Bien que faible ($k \sim 10^{-4}$), l'absorption du nitrure va être responsable d'un amortissement de la résonance.

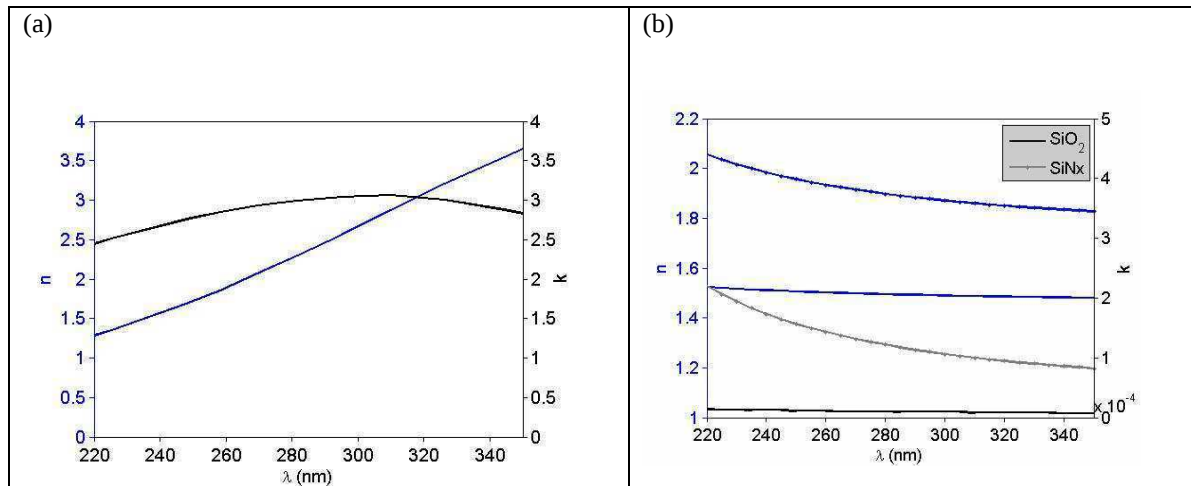


Figure 3.1: (a) Loi de dispersion (n , k) du silicium. La réflectivité à incidence normale à 280 nm est de 75% (b) Loi de dispersion de la silice et du nitrure. A 280 nm, on a $n_{\text{SiO}_2}=1.495$, et $n_{\text{SiNx}} = 1.898+0.0001i$

I-2. e) Structures fabriquées

Deux types de puce sont réalisés : des puces quart d'onde permettant d'augmenter le contraste par un facteur 4 et des puces exploitant les propriétés de résonance pour permettre une forte sensibilité.

➤ Puce quart d'onde

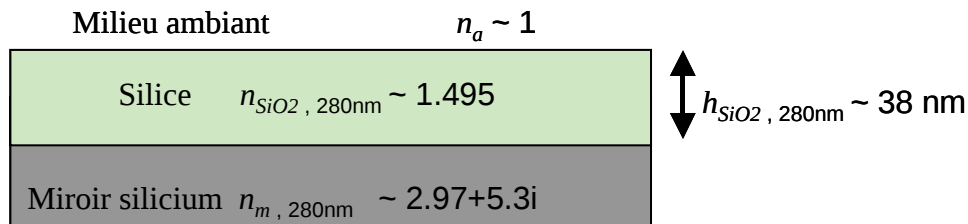


Figure 3.2: Structure quart d'onde silice ($h = 38 \text{ nm}$) sur miroir de silicium

La condition d'interférence constructive à la surface de la puce s'écrit :

$$2n_{SiO_2} \cos \theta_{SiO_2} + 2\delta_{Si}(n_{SiO_2}) = \frac{\lambda}{4} \quad (3.5)$$

où θ_{SiO_2} désigne l'angle après transmission dans la silice. Pour un angle d'incidence de 10° dans l'air, on a $\theta_{SiO_2} = 6.7^\circ$. L'indice optique du silicium à 280 nm est $n_{Si} = 2.97+5.3i$.

Pour un angle dans la silice de $\theta = 6.7^\circ$, le déphasage correspond à une épaisseur de 6 nm . L'épaisseur de silice totale nécessaire pour obtenir la condition quart d'onde est ainsi diminuée de 47.1 nm à 41.1 nm (incluant les 2.5 nm de silice native). Après dépôt PECVD de 35.5 nm de silice, l'épaisseur totale de silice est de 2.5 nm . Ainsi, l'épaisseur de silice est légèrement inférieure à l'épaisseur désirée, ce qui fait que l'on sera également sensible au contraste d'indice. Cette structure est donnée Figure 3.2.

➤ Puce guide d'onde avant structuration

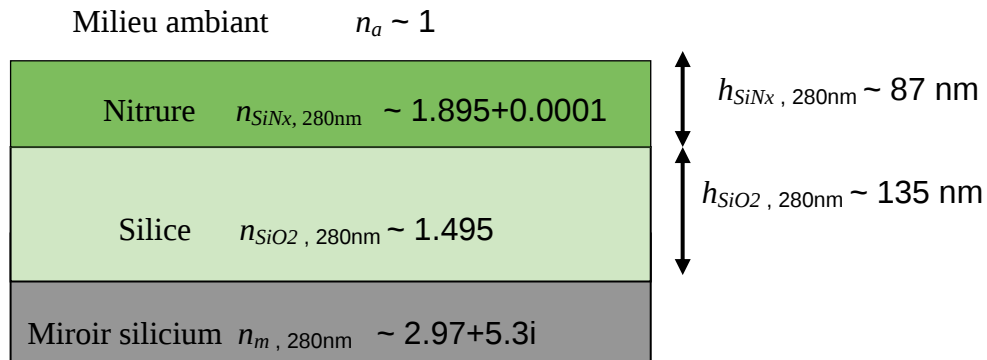


Figure 3.3: Structure guidante avant réalisation du réseau de diffraction composée d'un miroir de silicium recouvert d'une couche de silice ($h=135 \text{ nm}$) et d'une couche de nitrure ($h=87 \text{ nm}$)

Les puces résonantes sont constituées de la superposition de deux diélectriques : une couche de silice recouverte d'une couche de nitrure (Figure 3.3). Les épaisseurs de silice et nitrure mesurées par ellipsométrie en utilisant les lois de dispersion présentées ci-avant sont de 135 nm pour la silice, et 87 nm pour le nitrure. Ainsi, on a une épaisseur légèrement supérieure à l'épaisseur visée de 78 nm correspondant à la structure présentée dans le chapitre précédent.

I-3. Biopuce structurée

I-3. a) Réseau de diffraction

Sur les dépôts décrits précédemment on réalise des réseaux de diffraction de taille $2 \times 2 \text{ mm}^2$. Nous donnons Figure 3.4 une photo de notre puce. Les réseaux présentent une teinte légèrement plus jaune sur cette photo.

Ils sont réalisés par lithographie électronique au moyen d'un nanomasqueur de marque Nanobeam, récemment acquis par l'institut d'optique et installé dans les locaux de Thales Research and Technology.

Les processus de fabrication ont nécessité de nombreuses itérations pour l'étalonnage des doses d'insolation fonction de la rétro-diffusion des électrons par la structure particulièrement critique pour des motifs de faible période. En particulier, la réalisation des motifs sur des surfaces relativement grandes de l'ordre de $2 \times 2 \text{ mm}^2$ ont mis à l'épreuve les capacités de

raccord de champ. Nous avons ainsi pu déterminer les paramètres adéquats pour nos motifs, et obtenir des réseaux reproductibles sur des champs de surface $400 \times 400 \mu\text{m}^2$, correspondant chacun à un spot biologique. Les contrôles des paramètres de fabrication peuvent être réalisés par microscopie électronique à balayage (MEB). Une image MEB d'un réseau de 280 nm de période est donnée Figure 3.4.

Les premières structures avaient pour période 280 nm. Cependant, les mesures expérimentales ont montré que l'on était plus proche d'un croisement entre mode que désiré d'où une moins bonne finesse des résonances et une moins bonne sensibilité. Ainsi, pour les structures présentées ici, la période choisie sera de 270 nm. Elle permet d'obtenir des angles de couplage adéquats à une longueur d'onde de 280 nm. Les spots biologiques sont définis dans un second temps par lithographie optique.

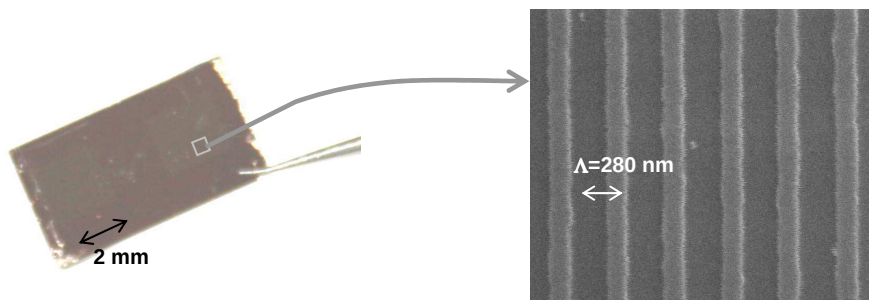


Figure 3.4: Photo de la puce et image MEB d'une puce de période 280 nm, réalisée pour les tests de procédure de lithographie électronique

I-3. b) Structure réseau

La profondeur de gravure est déterminée par ellipsométrie. La mesure d'AFM sur les réseaux de diffractions confirme l'épaisseur de gravure de notre structure. Des incertitudes sont dues à la durée de gravure très courte.

La caractérisation AFM permet de vérifier la hauteur de gravure et d'observer la forme des réseaux (facteur de remplissage, verticalité des motifs). Le facteur de remplissage observé est de 50/50. Après une calibration des vitesses de gravure, le réseau est gravé sur une hauteur de

20 nm, à une puissance de 15 W et une pression de 10 mTorr. La Figure 3.5 donne l'image obtenue par caractérisation AFM. Cette image AFM est réalisée sur les réseaux fabriqués en vue de l'imagerie et ayant subi l'ensemble des étapes de fonctionnalisation biologique. Les bords des réseaux ne sont pas très rectilignes. Ceci peut être dû à la mauvaise résolution latérale de l'AFM, aux différents dépôts de résine intervenus lors de la fabrication, à un mauvais rinçage ou un dépôt non spécifique de protéines lors de la préparation biologique.

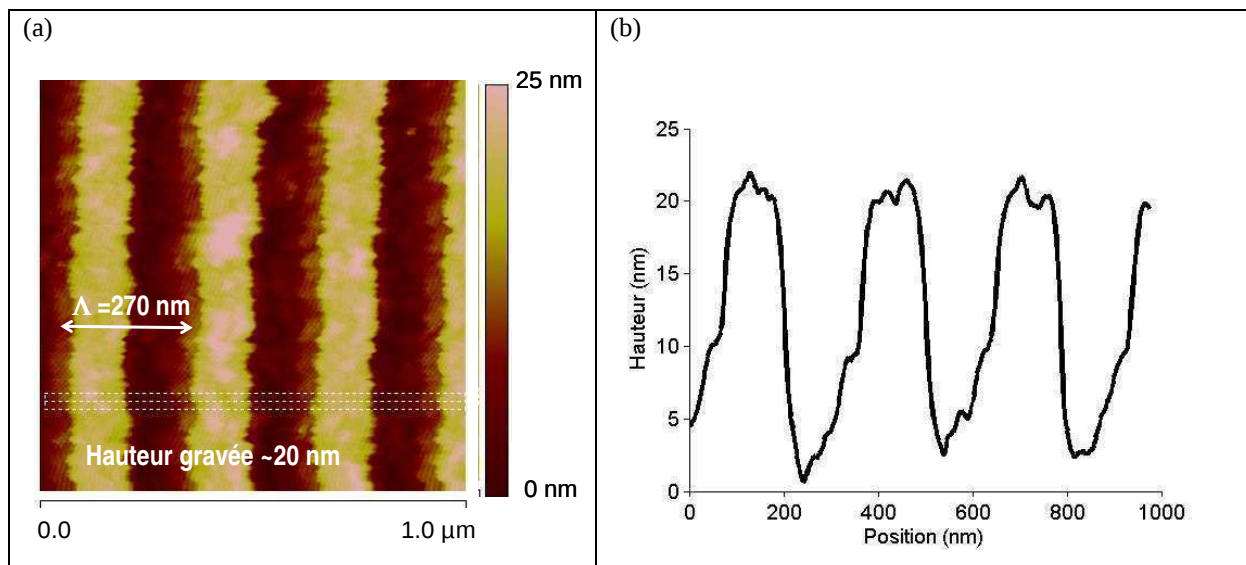


Figure 3.5: Caractérisation AFM des réseaux de diffraction. La hauteur de gravure est de 20 nm, et le taux de remplissage de 50%. La période mesurée simulée ici de 300 nm au lieu de 270 nm du fait d'une mauvaise caractérisation de l'AFM.

II - Préparation biologique

II-1. Absorption de la protéine

La Figure 3.9 (a) donne le spectre d'absorption entre 220 et 350 nm de la MetRS à une température de 25°C. Bien que non mesuré en spectroscopie d'absorption, on sait que les protéines présentent d'une manière générale un pic d'absorption à 190 nm (6.53 eV), du fait de l'absorption des liaisons peptidiques. L'absorption à 205 nm est par ailleurs parfois utilisée. A cette longueur d'onde, l'absorption est en moyenne deux fois moindre que l'absorption à 190 nm. La largeur à mi-hauteur du pic d'absorption est approximativement de 30 nm. Le pic d'absorption à 190 nm semble être situé à une longueur d'onde plus importante ici d'après l'allure de la courbe. Cependant, il est à noter que des éléments autres que la MetRS présents dans la solution peuvent absorber à ces longueurs d'onde. En effet, ce spectre a été initialement mesuré pour déterminer le coefficient d'absorption à 280 nm, et aucune précaution particulière n'a été prise concernant la composition de la solution pour l'absorption aux plus faibles longueurs d'onde. Nous comparerons ces mesures d'absorption ainsi que les éléments issus de la littérature aux mesures d'ellipsométrie.

II-2. Greffage de la protéine

II-2. a) Préparation de la surface

Les étapes biologiques ont été réalisées par le laboratoire de biochimie de l'école Polytechnique. La prise en compte de nos contraintes a suscité le développement et la validation du protocole biologique. En effet, certains points clés des fonctionnalisations de surface étaient à vérifier pour valider le protocole. Les échelles caractéristiques des éléments à détecter étant de l'ordre du nanomètre, il était nécessaire d'utiliser des méthodes de caractérisation physique adaptées sur les dépôts de protéines. Ainsi, des caractérisations en AFM et ellipsométrie ont pu être réalisées. De leur côté, des mesures d'activité, des mesures de fluorescence (avec l'inconvénient de la nécessité de marquer les éléments biologiques) ont pu confirmer la fonctionnalisation.

La première étape consiste à définir les sites d'accueil permettant une reconnaissance biologique localisée à la surface de la puce. La problématique est donc de pouvoir localiser les dépôts avec un protocole biologiquement compatible. Les plots sont réalisés en utilisant un

masque de résine qui définit les paramètres géométriques de la matrice périodique : en particulier leur taille et la distance centre à centre. Cette étape est réalisée par lithographie optique en utilisant une résine Shipley qui pourra être enlevée en cours de processus de préparation de la puce. La résine doit ensuite pouvoir être enlevée sans influencer sur la préparation biologique à la surface de la puce. Pour les expériences d'imagerie on choisit typiquement une taille de plot de $140\text{ }\mu\text{m}$ tous les $400\text{ }\mu\text{m}$ (correspondant à 10 pixels sur la largeur d'un spot pour un grandissement de 2). Pour la caractérisation AFM, on choisit des tailles plus réduites (typiquement $5\text{ }\mu\text{m}$ tous les $10\text{ }\mu\text{m}$ afin d'éviter les difficultés de positionnement de l'objet.

La première étape nécessaire au greffage des protéines est la préparation de la surface de la puce en vue de l'immobilisation des molécules biologiques. Dans notre cas, le substrat à fonctionnaliser est une surface de silice SiO_2 . Pour fixer les molécules biologiques, on utilise une molécule intermédiaire qui doit permettre deux interactions fortes : l'une avec la surface de la puce, et l'autre avec la molécule biologique à immobiliser.

On exploite la présence d'atome d'oxygène à la surface pour réaliser des liaisons avec la molécule intermédiaire. La molécule choisie pour la chimie de surface est le 3-aldéhyde propyltriméthoxysilane (de United Chemical Technologies Inc.). Elle va pouvoir d'une part d'un côté de la molécule de se fixer de manière covalente au substrat, et de l'autre de fixer la protéine par liaison covalente.

Les molécules utilisées pour réaliser ces liaisons chimiques sont des silanes. Les silanes sont des molécules composées d'un atome de silicium lié à trois groupement R, et une chaîne carbonée se terminant par une fonction chimique Y (Figure 3.6 (a)). En ce qui concerne les groupements R, ils sont choisis pour réaliser une interaction avec le substrat, alors que les groupements Y seront choisis pour créer des liaisons avec la protéine. Le groupement R peut par exemple être un groupement méthoxy OCH_3 , ou chloré Cl. La molécule choisie comporte trois groupements méthoxy. En ce qui concerne le groupement Y, il est choisi de telle sorte qu'il puisse fixer la sonde. Dans notre cas, les sondes sont des protéines, composées d'acides aminés. Il est ainsi possible de tirer profit de la réactivité des fonctions amines avec d'autres groupements chimiques tels que les groupements aldéhyde (CHO) ou époxyde (caractérisés

par un oxygène ponté sur deux carbones). Dans notre cas, un groupement aldéhyde est choisi. La molécule utilisée est représentée Figure 3.6 (b).

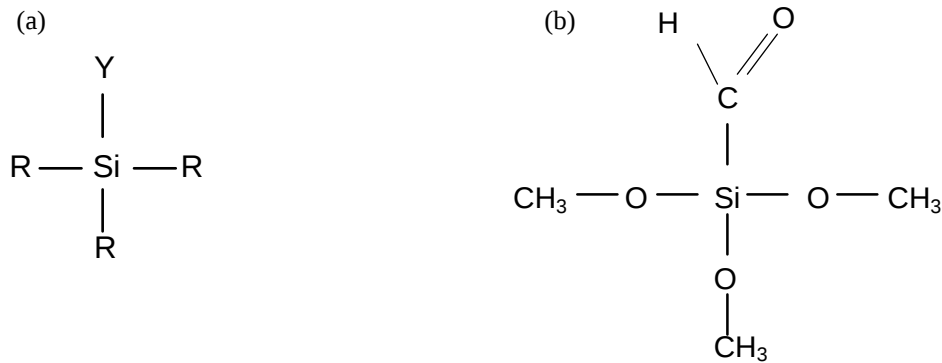


Figure 3.6: (a) Formule générique d'un silane (b) Formule du 3-aldéhydropropyltriméthoxysilane

II-2. b) Silanisation

Les étapes successives du mécanisme d'accroche d'un silane sur une surface de silice sont représentées sur la Figure 3.7. La première étape est l'activation de la surface par un plasma argon/oxygène (20% O, 0.5 mbar, 100 W, 120 secondes), qui permet de créer des groupements OH à la surface de la puce (a). La présence d'eau résulte en une hydrolyse des groupements méthoxy OCH₃ (b). Une réaction de condensation a alors lieu entre molécules voisines à la surface de la puce (c). La même réaction se produit à la surface de la puce entre le groupement OH disponible et le substrat. Les étapes (c) et (d) permettent de créer des liaisons Si-O-Si en libérant des molécules d'eau. Elles peuvent d'ailleurs être inversées ou réalisées simultanément.

Dans notre cas, une silanisation en phase vapeur a été choisie. Ceci permet d'éviter de mettre la résine en solution, au risque qu'elle soit dissoute dans le solvant et ne permette plus la localisation des spots biologiques. Après l'étape de silanisation, les puces sont portées à la température de 100°C pendant 1 heure. On les place ensuite sous vide pendant 1 heure avant de retirer la résine avec de l'acétone, ce qui n'altère pas les liaisons des silanes à la surface de la puce.

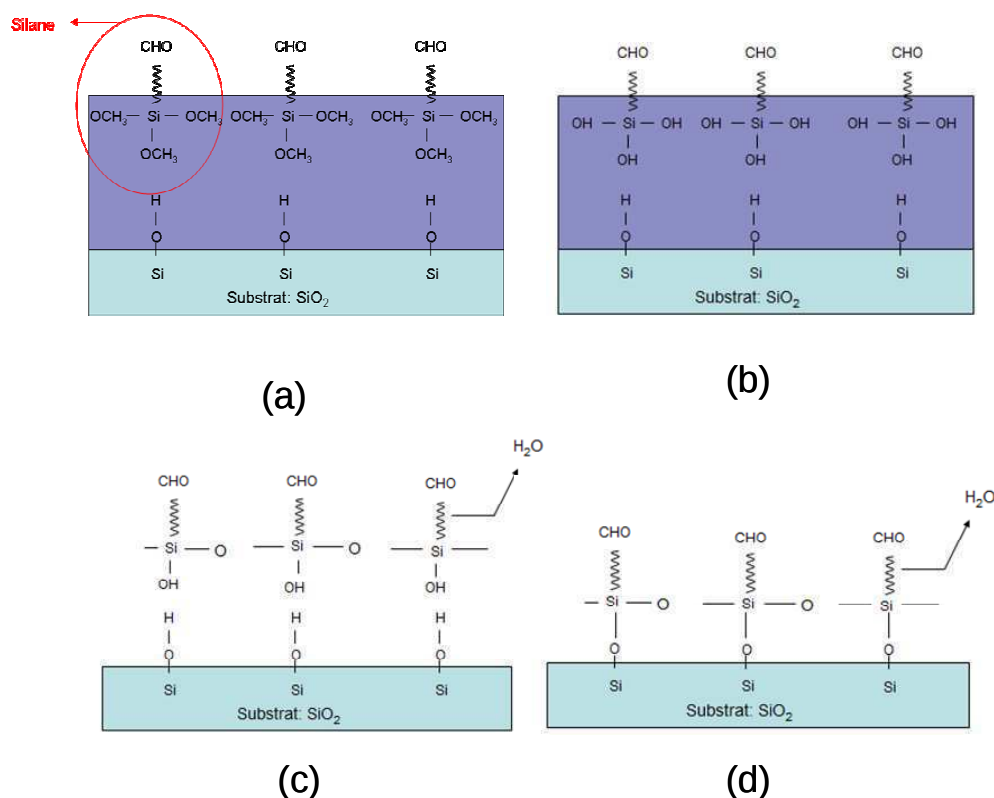


Figure 3.7: (a) Création de groupement OH à la surface de la puce par réalisation d'un plasma oxygène, et mise en présence de la molécule intermédiaire (b) Hydrolyse des groupements méthoxy OCH_3 (c) et (d) Réaction de condensation à la surface de la puce ou entre molécules voisines, créant des liaisons $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$

II-2. c) Immobilisation de la protéine

La résine ayant permis de localiser les plots silanisés, la protéine se fixe préférentiellement au niveau des plots. L'immobilisation de la protéine résulte de la réaction entre le groupement aldéhyde du silane et un groupement amine de la protéine.

Pour immobiliser la protéine, on place la puce dans une solution contenant la protéine à température ambiante pendant une durée de 15 heures. La solution contient une concentration de 100 μ M de MetRS (20 mM de phosphate de potassium, 450 mM de chlorure de potassium KCl, pH 8.5) et 40 mM de cyanoborohydrure de sodium $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$. Une atmosphère humide permet d'empêcher l'évaporation de la solution entre la puce et une lamelle. Le cyanoborohydrure de sodium permet de réduire les bases de Schiff qui se forment lors de la réaction entre le groupement aldéhyde du silane et un groupement amine de la protéine. On rince ensuite la puce dans une solution contenant 10 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl et 0.2 % de Triton X-100. Le bilan des réactions chimiques entre le groupement aldéhyde et le groupement amine ainsi que la réduction des bases de Schiff est présenté Figure 3.8.

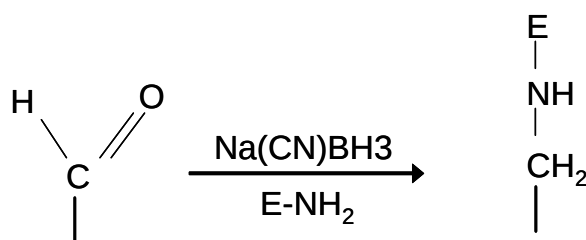


Figure 3.8 : Immobilisation de la protéine par réaction du groupement aldéhyde du silane et la fonction amine de la protéine

Le point essentiel de cette étape est que la protéine ne reste pas liée de manière non spécifique sur la partie qui n'a pas été silanisée (géométrie en plots), mais reste liée au niveau des plots. De plus, nous souhaitons avoir une monocouche au niveau des plots. Ainsi, seules les protéines liées à la surface doivent rester, et on ne doit pas avoir d'amas de protéines. Les mesures d'ellipsométrie sur des dépôts pleines plaques ainsi que les mesures d'AFM permettent de vérifier ces étapes. L'imagerie UV doit aussi permettre ce contrôle, mais la fiabilité de notre dispositif étant lui-même en cours de validation par ces mêmes dépôts, elle ne pouvait pas être choisie comme référence. Nous présentons dans la suite ces différentes caractérisations.

II-3. Caractérisation en ellipsométrie et loi de dispersion de la protéine

L'ellipsométrie peut être utilisée pour étudier les interactions biologique à la surface d'une puce à une longueur d'onde donnée, en déterminant l'épaisseur au cours du temps [Cuypers, 1978]. En effet, dans le visible, l'indice des protéines est connu pour être de l'ordre de 1.5 [Vörös, 2004].

Ici, nous sommes intéressés par sa loi de dispersion précise dans l'ultraviolet. Pour modéliser l'indice des protéines, on utilise une somme d'oscillateur de Lorentz [Prêtre, 1998][Nakkach, 2008]. Les protéines présentent plusieurs bandes d'absorption dans l'ultraviolet qui peuvent être mesurées par ellipsométrie [Goyal, 2008]. La loi de dispersion est obtenue de manière cohérente avec le spectre d'absorption de la protéine. D'après les mesures expérimentales, on observe un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 278 nm ($\omega_{01}=4.46$ eV), dont la largeur à mi-hauteur est de 30 nm ($\gamma_1=0.048$ eV). L'autre oscillateur a une longueur d'onde de résonance de 190 nm ($\omega_{02}=6.53$ eV) et une largeur à mi-hauteur de 30 nm ($\gamma_2 = 1.03$ eV). Les paramètres de la loi de dispersion sont les suivants : $\epsilon_{\infty} = 1$, $\epsilon_s = 1.9767$, $\omega_t=10$, $\Gamma_0=0$, $f_1 = 0.0013$, $\omega_{01} = 4.46$, $\gamma_1 = 0.048$, $f_2 = 0.014$, $\omega_{02} = 6.53$, $\gamma_2 = 1.03$ eV. La loi de dispersion de la protéine est donnée sur la Figure 3.9 pour un domaine de longueur d'onde de 220 nm à 350 nm. L'épaisseur de protéines mesurée sur la silice est de 3.5 nm pour un dépôt pleine plaque, en considérant un indice réel pour la protéine 1.42 à 630 nm. A la longueur d'onde de 280 nm, l'indice est de $1.497+0.006i$. Ainsi, l'absorption d'une couche de protéine sur la puce est de 0.7×10^{-3} sans renforcement de contraste.

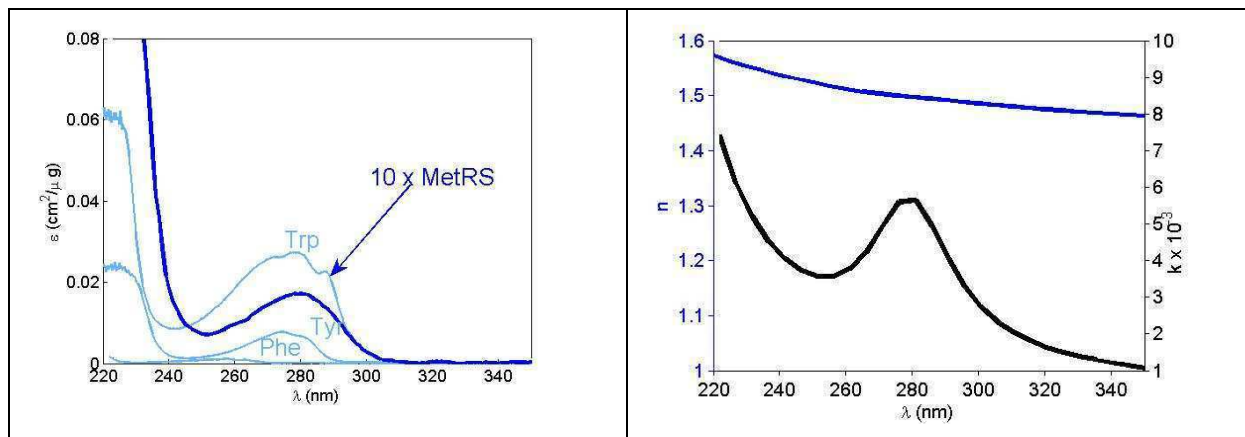


Figure 3.9 : (a) Spectre d'absorption expérimental de la MetRS (b) Loi de dispersion de la MetRS. A 280 nm, on a $n(\text{MetRS})=1.497+0.006i$

II-4. Caractérisation AFM des spots biologiques

II-4. a) Epaisseur et homogénéité des spots

De manière à observer la façon dont se déposent les protéines, on réalise aussi une caractérisation AFM de la biopuce. La première étape est la définition de motifs en lithographie optique. Le masque choisi pour cette caractérisation AFM comporte des plots de 5 μm de diamètre espacés de 10 μm centre à centre sur l'ensemble de la surface. L'image AFM ainsi que le profil de hauteur au niveau d'un plot biologique est donnée Figure 3.10. Ceci permet de tomber sur un plot à n'importe quel endroit de la puce. L'épaisseur supplémentaire au niveau des plots qui ont été silanisés est de 2 nm, alors qu'on attend 4 nm d'après les résultats d'ellipsométrie. Ceci permet de suspecter un dépôt de protéines en dehors des plots. L'épaisseur moyenne correspondant aux dépôts en dehors des plots serait de l'ordre de 2 nm, et de 2 nm supplémentaires sur les plots. La déshydratation des protéines au cours du temps peut être responsable d'une diminution d'épaisseur. Ainsi, dans nos expériences d'imagerie, on considère une épaisseur de 2.5 nm avec la loi de dispersion présentée précédemment. Les mesures d'ellipsométrie ont en effet été réalisées juste après la fixation de la protéine sur la surface. Une rugosité est aussi observée sur le reste de la puce. L'état de surface de la silice PECVD avant dépôt, un dépôt non spécifique ou un mauvais nettoyage de la surface peut expliquer cette rugosité.

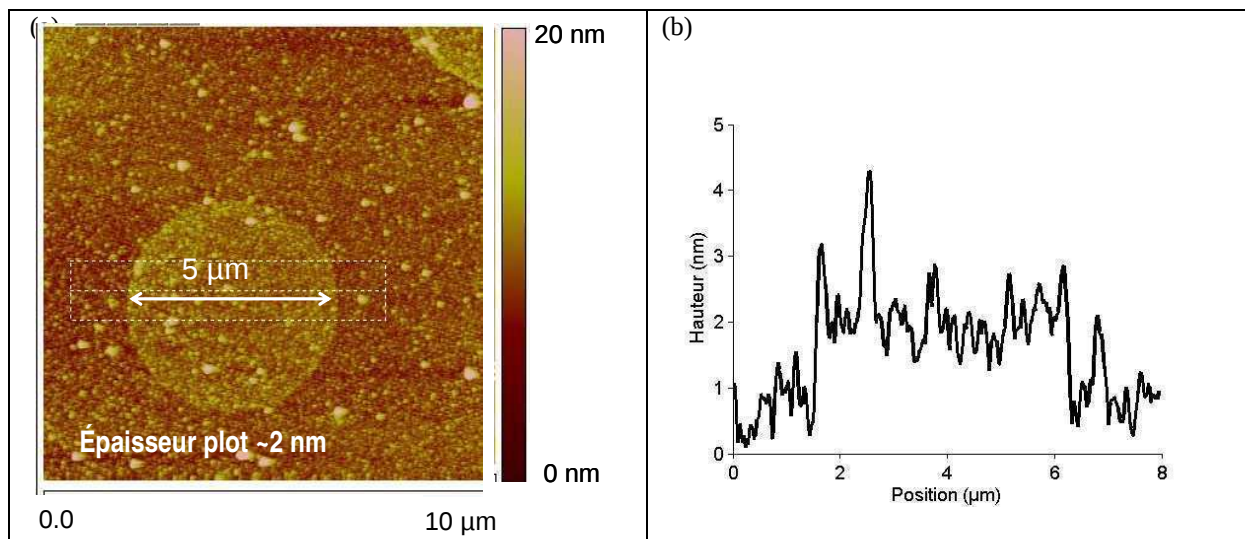


Figure 3.10: Image AFM d'un plot de protéine de 5 nm de diamètre. Il semble que la protéine se dépose majoritairement au niveau des plots silanisés, mais qu'un dépôt a aussi lieu sur le reste de la puce d'après les études ellipsométriques. L'épaisseur supplémentaire de protéine mesurée en AFM au niveau du plot est de 2 nm.

II-4. b) Spots de protéines sur réseau

La Figure 3.11 présente une image AFM de protéines greffées sur réseau. La profondeur du réseau observée est légèrement inférieure à celle qui a été observée en l'absence de protéines. Ainsi, on déduit que plus de protéines restent accrochées au fond du réseau qu'à la surface. Ceci sera favorable au niveau des renforcements de contraste optique, puisque le champ de l'onde évanescente a une amplitude plus importante à cet endroit (plus grande valeur du champ électromagnétique et de l'indice effectif local). L'accessibilité des sites de reconnaissance peut par contre être diminuée. La structure de la MetRS en solution correspond à un volume de $5 \times 5 \times 10 \text{ nm}^3$. Une fois sèche, le volume est inférieur et correspond à une épaisseur d'environ 2.5 nm pour les protéines accrochées en surface. Cependant, si l'image AFM ne permet pas de l'affirmer avec certitude (on cherche ici une variation d'épaisseur de l'ordre de 5 nm sur la période), on peut supposer que des protéines s'accrochent aussi au bord des dents du réseau. On observe cependant que la surface plane en fond de réseau est inférieure à celle qu'on mesure en l'absence de protéines (Figure 3.9).

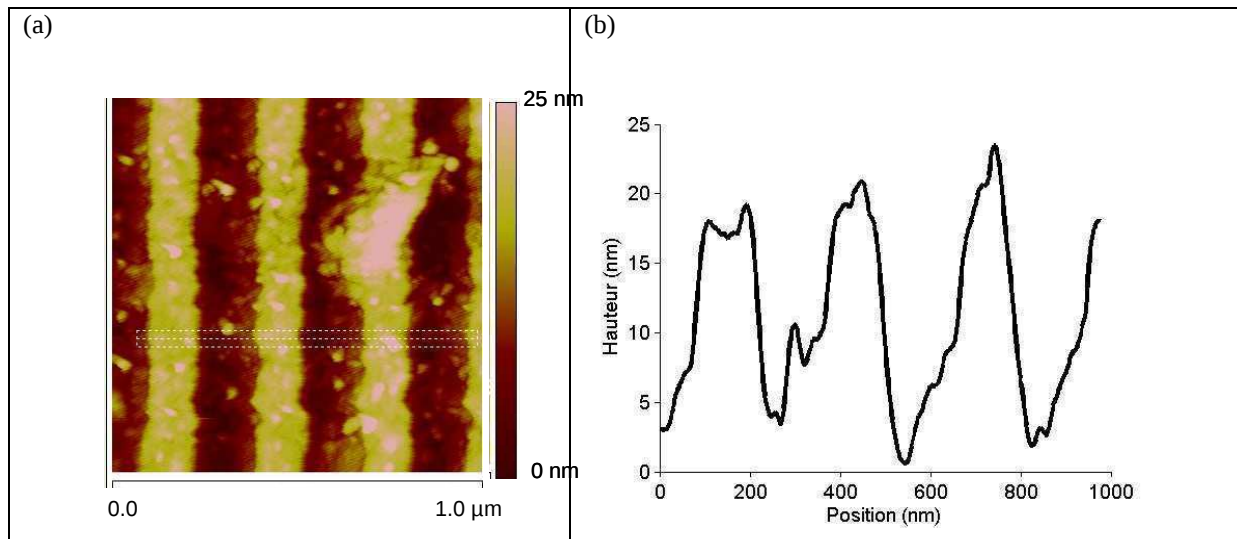


Figure 3.11 : Images et profil AFM réalisés sur le réseau après la fonctionnalisation biologique sur la partie protégée par de la résine lors de la silanisation.

III - Imagerie sur puce quart d'onde

Pour la clarté du manuscrit, s'agissant à la fois d'un montage optique différent et d'un matériau différent pour le miroir, la description de premières expériences biologique ainsi que des détails sur les expériences avec du dioxyde de titane publiées dans [Robin, 2008] a été reportée en annexe B. Nous en reportons ici uniquement les résultats principaux. Nous présentons ensuite les résultats obtenus avec des puces quart d'onde et résonantes sur substrat silicium issues d'une même préparation biologique et imagés avec la dernière génération de détecteur AlGaIn.

III-1. Rappels des résultats sur puce silice/aluminium

III-1. a) Calibration avec spots de dioxyde de titane

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'absorption due à une monocouche de protéine est du même ordre de grandeur que le bruit de mesure. La première étape de cette thèse a consisté à montrer notre capacité à détecter une monocouche de protéine.

Pour ce faire, j'ai d'abord calibré le montage optique en utilisant des matériaux minéraux absorbant dans l'ultraviolet afin de remplacer l'absorption des éléments biologiques. Le dioxyde de titane est très fortement absorbant dans l'ultraviolet. Une couche de 3 nm absorbe 25 % de l'onde incidente en simple passage (mesure en spectroscopie de transmission de TiO_2 sur substrat suprasil transparent en UV).

Les expériences avec le dioxyde de titane ont permis de vérifier expérimentalement la dépendance du contraste avec l'épaisseur de diélectrique. La réalisation d'un dépôt de silice suivi de plusieurs gravures ioniques pour obtenir différentes épaisseurs de silice a permis de mettre en évidence la dépendance du contraste par rapport à l'épaisseur de silice. On a pu vérifier que la configuration quart d'onde (corrigée de l'épaisseur de pénétration) permet d'obtenir les meilleurs contrastes puisque l'absorbant est dans ce cas localisé dans le ventre de l'onde stationnaire.

Ces expériences ont été réalisées à la fois avec de la silice et sur nitrure de silicium [Robin, 2008], ces deux matériaux montrant une transparence suffisante dans l'ultraviolet. Le miroir choisi était en aluminium, réfléchissant à 93% dans l'ultraviolet d'après les valeurs tabulées

[Palik, 1998]. Du fait de l'oxydation et de la rugosité, le coefficient de réflexion expérimental est diminué de 93% à 83% (mesure spectroscopique). En effet, aux faibles longueurs d'onde, la rugosité entraîne une diminution de la réflectivité [Tikhonravov, 2003] [Duparré, 2002]. La couche intermédiaire peut être prise en compte en la modélisant par une couche d'indice effectif n_e définie dans l'approximation de Bruggeman [Bruggeman, 1935][Stroud, 1998]. L'approximation de Bruggeman permet de modéliser un milieu inhomogène en considérant qu'il est composé de grains de métal A et diélectrique B de formes sphériques en quantité p et $1-p$ dans un milieu effectif de constante diélectrique ϵ_e . Dans ce cas, la constante diélectrique ϵ_e ($\epsilon_e = n_e^2$) satisfait l'équation suivante : $p \frac{3\epsilon_e}{\epsilon_A + 2\epsilon_e} + (1-p) \frac{3\epsilon_e}{\epsilon_B + 2\epsilon_e} = 1$. Dans notre cas, il s'agit d'une couche de 3 nm de composition 50/50 $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Al}$. Un exemple d'image est donné Figure 3.12, pour 3 épaisseurs de silice différentes sur un substrat d'aluminium. En traçant les profils de réflectivité, il est possible de déterminer la réflectivité de la puce pour chaque épaisseur de silice, sur et en dehors des plots. Les résultats de la modélisation et les mesures de réflectivité sur et en dehors des spots de TiO_2 sont en très bon accord.

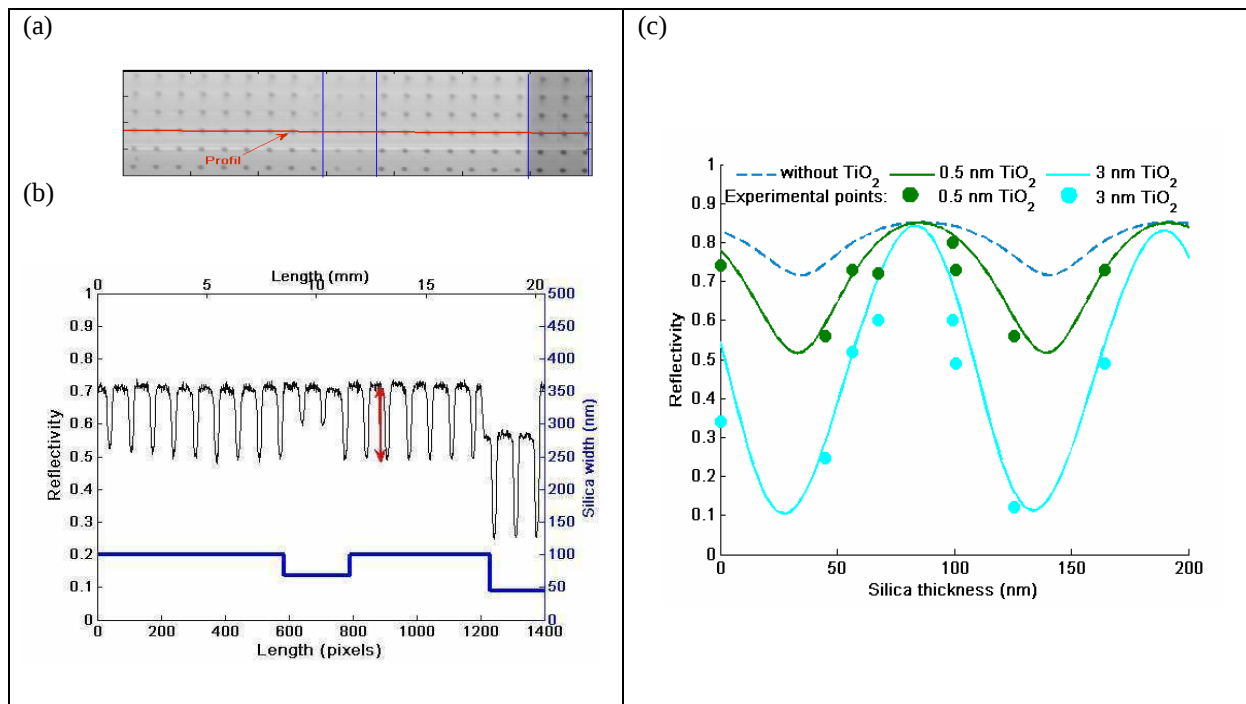


Figure 3.12 : (a) Image d'une puce silice sur aluminium présentant différentes épaisseurs de silice et des spots de dioxyde de titane absorbants dans l'ultraviolet. (b) L'image est alignée avec le profil de réflectivité obtenu suivant une ligne de spots de dioxyde de titane. Pour chaque épaisseur de silice, il est ainsi possible de déterminer la réflectivité sur et en dehors des spots (c) Pour les différentes épaisseurs de silice, il est possible de reporter la réflectivité mesurée en imagerie. La puce ayant été réalisée par un masque de géométrie symétrique de celle désirée pour les spots désirés pour ne pas introduire de résine dans le bâti de pulvérisation du TiO_2 on observe que 0.5 nm de TiO_2 sont présents en dehors des spots.

Les images présentées avec absorbant et des puces silice/aluminium ont été réalisées avec la première génération de détecteur AlGaIn [Maezzo, 2006]. Il s'agissait alors d'une barrette linéaire, l'image totale étant réalisée par translation micrométrique de l'échantillon entre chaque acquisition. Du fait du mauvais vieillissement du détecteur, le bruit était devenu très élevé, et l'acquisition d'une image de biopuce de 3 mm nécessitait alors plusieurs heures pour pouvoir moyenner suffisamment pour distinguer de très faibles contrastes. Avec les détecteurs matriciels utilisés aujourd'hui [Reverchon, 2007], une telle image prend quelques secondes en prenant en compte les moyennes nécessaires pour diminuer le bruit de mesure. De plus, l'image 2D facilite grandement les réglages puisqu'on a une image de l'objet en sa totalité au lieu d'observer uniquement un profil. Des expériences similaires ont pu être réalisées en solution, en mettant la lame dans l'eau dans une cuve en quartz. Les résultats obtenus étaient similaires à ceux présentés ici, ce qui démontre la compatibilité de notre système pour des expériences en solution.

III-1. b) Premières expériences biologiques

Notre dispositif ayant été caractérisé avec un absorbant minéral, nous avons ensuite pu réaliser des puces quart d'onde silice sur aluminium pour faire des images d'éléments biologiques. Ces expériences ont permis de valider notre capacité à contrôler le greffage sans marquage. Ceci est un point essentiel car le marquage des molécules est une étape supplémentaire coûteuse en temps et en réactifs, et il n'est pas forcément possible de vérifier le greffage sur la même puce que celle utilisée pour la bio-détection.

Les biopuces silice sur aluminium nous ont aussi permis de montrer notre capacité à détecter une reconnaissance entre un antigène et un anticorps. En réalisant deux expériences similaires : l'une avec un anticorps spécifique et l'autre avec un anticorps non spécifique, nous avons pu comparer les renforcements d'absorption. Cette expérience comparative a mis en évidence une augmentation d'absorption dans le cas de l'anticorps spécifique alors qu'aucune augmentation de contraste n'a été observée pour l'anticorps non spécifique. Ceci a donc permis de valider les méthodes de préparation biologique utilisées, et a démontré notre capacité de mesure d'une reconnaissance spécifique pour une forte densité d'anticorps correspondant à une monocouche de molécules. Le lecteur peut se référer à l'annexe B pour les détails de ces premières expériences biologiques.

Les puces suivantes ont été réalisées sur un substrat de silicium. En effet, le silicium est un matériau beaucoup mieux connu et plus stable que l'aluminium en particulier vis-à-vis de l'oxydation). De plus, un inconvénient observé sur les puces fabriquées sur de l'aluminium était une rugosité de surface apparaissant après le dépôt de silice.

III-2. Puce silice sur silicium

Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons des résultats d'imagerie quart d'onde sur des puces silice sur silicium puis sur les puces résonantes.

La préparation biologique pour les puces quart d'onde et les puces résonantes est identique. Il s'agit aussi des mêmes préparations que pour les caractérisation AFM et ellipsométriques des dépôts. Ceci est essentiel pour une bonne interprétation des résultats.

III-2. a) Montage optique

Comme il l'a été détaillé en annexe A, le montage optique utilisé met en jeu une source Xénon, éclairant la puce en configuration de Köhler. Le signal réfléchi par la puce est mesuré au moyen d'un détecteur spectralement sélectif centré autour de 280 nm. Dans le cas de l'imagerie en conditions résonantes présentée dans la section suivante, on utilisera un polariseur ainsi qu'un monochromateur pour sélectionner la longueur d'onde de 280 nm. Ici, on exploite toute la largeur spectrale du détecteur et on réalise les images en faisceau non polarisé. Ceci permet de bénéficier d'un flux lumineux plus important correspondant à une largeur spectrale à mi-hauteur de 20 nm.

III-2. b) Détermination des contrastes attendus

La biopuce quart d'onde étudiée est composée de silice déposée sur du silicium. L'épaisseur déposée étant inférieure de ~ 3 nm à l'épaisseur attendue, nous sommes légèrement en dehors de la condition quart d'onde. Par simulation, nous pouvons déterminer les contrastes attendus au voisinage du minimum de réflectivité, là où le contraste est le plus sensible à l'absorption.

III-2. c) Analyse des images

Etant donné la faiblesse des contrastes attendus, des outils de traitements d'image permettant la mise en évidence de très faibles contrastes doivent être mis en oeuvre. Le signal est codé

sur 14 bits, correspondant à 16384 niveaux de gris. Les images sont sauvegardées sous un format .tif, qui permet d'étendre la dynamique sur 16 bits (65536 niveaux de gris, soit une variation minimale de $1.5 \cdot 10^{-5}$) avant de réaliser des moyennes. Ainsi, notre sensibilité n'est pas limitée par le bruit de numérisation.

Pour chaque image finale, on réalise un nombre N de 100 images intermédiaires dont on étend la dynamique sur une échelle de 16 bits avant de réaliser la moyenne, permettant ainsi d'augmenter le rapport signal sur bruit d'un facteur $\sqrt{N} = 10$.

Les variations de réponse d'un pixel à l'autre sont un problème courant en imagerie. La première correction consiste à réaliser une image D à l'obscurité (dark field), correspondant aux différentes contributions de bruit temporel et spatial. Cette image est aussi réalisée en moyennant 100 acquisitions successives étendues sur une dynamique de 16 bits, de manière à ne pas réintroduire de bruit dans le traitement de l'image A .

De plus, chaque pixel ne présente pas la même sensibilité à un flux incident donné. La proportionnalité entre le flux incident et le signal mesuré est caractérisée par le gain du pixel. De plus l'éclairage peut présenter des inhomogénéités qui doivent être corrigées. Ainsi, on réalise une image de normalisation F (flat field) qui va permettre d'uniformiser l'image. Cette image F est réalisée en éclairant un miroir homogène avant de le remplacer par la biopuce à imager. Ainsi, les deux objets (miroir puis puce) sont imagés dans les mêmes conditions d'éclairage. Le miroir de référence peut être soit une partie homogène de la puce elle-même ne contenant pas de spots biologiques, soit un miroir collé sur le support de la puce pour laquelle seule une translation du support sera effectuée entre l'image de normalisation et l'image de la puce. L'image finale I aura donc comme expression :

$$I = 65536 \left(\frac{A - D}{F - D} \right) \quad (3.6)$$

De cette expression, on voit que le dénominateur peut contenir des pixels à valeur nulle. Ainsi, avant de normaliser par $F-D$, on remplace les pixels en dessous d'un seuil s de manière à ne pas faire diverger cette normalisation. La valeur de remplacement choisie est celle du seuil s choisi est 5000. On pourrait choisir de remplacer par un pixel voisin, mais les clusters de pixels à valeur nulle ne sont alors pas remplacés.

L'image I étant obtenue, on va ensuite réaliser un filtrage médian de l'image, qui remplace chacun des pixels par la valeur médiane du pixel considéré et ses 3 voisins. Par rapport à une moyenne, ceci permet d'éliminer les pixels "morts" et d'améliorer l'apparence de l'image.

Ce traitement est détaillé dans la section suivante pour la puce quart d'onde, où l'on donne chacune des images intermédiaires utilisées pour la renormalisation (Figure 3.13). Un traitement équivalent est réalisé pour la puce structurée.

Afin de déterminer le contraste de l'image, on réalise des profils sur l'image obtenue suivant des lignes de spots. Ces profils sont moyennés entre eux, ce qui permet de bénéficier du nombre important de pixels à l'intérieur des spots biologiques.

III-3. Résultats expérimentaux

Les images présentées ici concernent les puces quart d'onde silice sur silicium. Chacune des images servant au traitement a été donnée Figure 3.13. Ensuite, afin d'analyser les contrastes, on réalise un filtrage médian sur l'image résultante I. Sur l'image on voit que les spots biologiques ne sont pas homogènes. Pour obtenir la valeur du contraste expérimental, on réalise un nombre de 21 profils de spots (7 profils de 3 spots). Chacun des spots biologiques comportant au moins 10 pixels exploitables, ceci permet d'améliorer notre seuil de détection par une valeur de 15. L'image après traitement et la moyenne des profils obtenus est présentée Figure 3.14. On observe une diminution du signal d'une valeur de 7.9×10^{-3} , correspondant à un contraste de 1.39%. Ainsi, par rapport à une monocouche de protéines d'absorption 0.7×10^{-3} , on a un renforcement de contraste d'un facteur 20. Ce fort renforcement de contraste est ici du au fait qu'on ne soit pas tout à fait en configuration quart d'onde : l'épaisseur de silice est légèrement inférieure à l'épaisseur $\lambda/4$. Le contraste est donc augmenté du fait du déphasage induit par la couche absorbante.

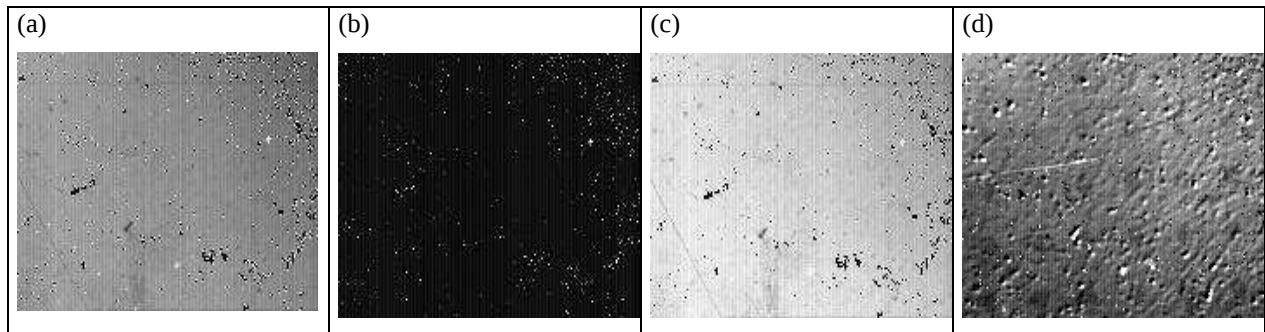


Figure 3.13: (a) Image avant correction A (b) Image du bruit de fond D (c) Image d'un miroir homogène de réflectivité 85% F (d) Image renormalisée avec étalement de la dynamique

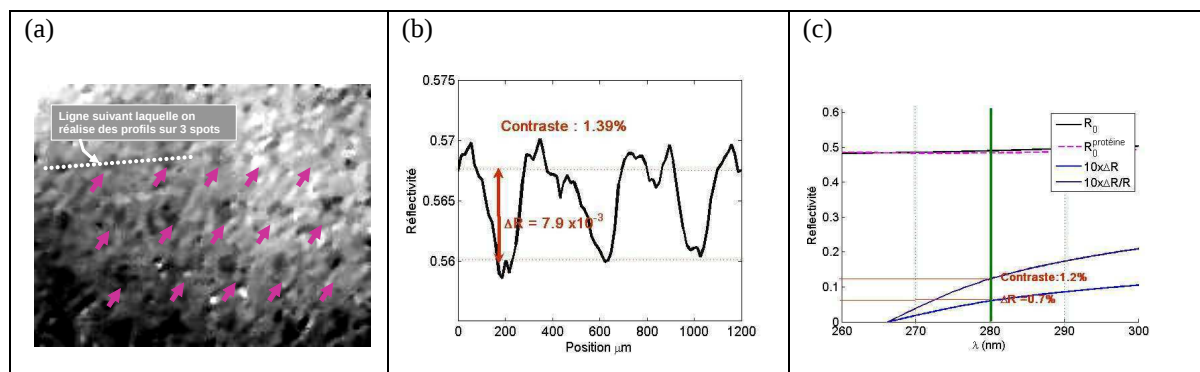


Figure 3.14 : (a) Image de la puce couverte de protéine après greffage de la protéine. (b) Profils de réflectivité obtenu en moyennant 7 profils. La diminution du signal de réflectivité est de 0.7%, ce qui correspond à un contraste de 1.2%.

D'après les simulations théoriques dont les résultats sont donnés Figure 3.14 (c), pour une épaisseur de protéine de 2.5 nm, la diminution du signal réfléchi est de 0.7%, ce qui correspond à un contraste de 1.2%. Cette valeur correspond au contraste obtenu en intégrant sur la largeur spectrale instrumentale. On a en effet une allure symétrique de la courbe des contrastes autour de la valeur 280 nm.

IV - Imagerie sur puce guide d'onde

IV-1. Puce utilisée

La fabrication de la puce ainsi que les dépôts biologiques ont été présentés au début de ce chapitre. Nous présentons ici les caractéristiques spectroscopiques et les images obtenues en conditions résonantes. Afin de ne pas être tributaire des différences de réglages optiques dans la caractérisation de la puce, les réseaux destinés à la caractérisation spectroscopique et à l'imagerie sont fabriqués sur le même support. Les formes des dépôts sont définies par un masque réalisé par lithographie optique préalablement à la préparation biologique, enlevé après l'étape de silanisation permettant de définir la géométrie des plots. Les images AFM de réseaux présentées au début de ce chapitre ont aussi été réalisées sur ces mêmes supports.

La Figure 3.15 donne un schéma de la puce utilisée. Pour la caractérisation spectroscopique, on réalise un dépôt pleine plaque de protéines sur le réseau. Pour l'imagerie, on réalise des plots de diamètre $140\text{ }\mu\text{m}$ espacés de $400\text{ }\mu\text{m}$.

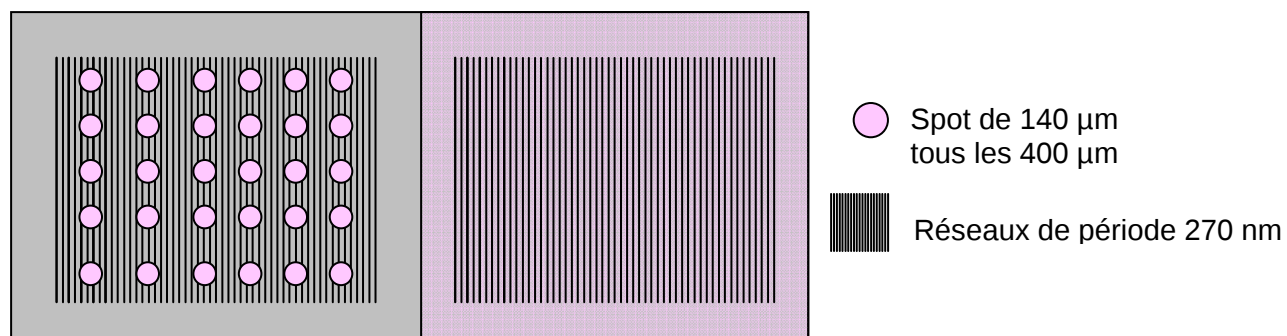


Figure 3.15 : Répartition des protéines (rose) sur la puce, d'après la définition du masque de lithographie optique

IV-2. Analyse spectroscopique

IV-2. a) Montage goniométrique (θ , 2θ)

La mesure des cartes de réflectivité spectroscopique permet de déterminer les conditions les plus sensibles pour réaliser l'imagerie des biopuces. Cette caractérisation est réalisée en utilisant un montage goniométrique donné Figure 3.16 permettant une rotation (θ , 2θ). La source utilisée ici est une source Xénon continue, qui éclaire la puce par un faisceau collimaté d'ouverture $\Delta\theta=0.6^\circ$ (largeur à mi-hauteur). La puce est placée au centre du goniomètre et va tourner d'un angle θ . Le signal réfléchi est mesuré sur le bras tournant de 2θ en utilisant une fibre UV Ocean Optics pour guider le signal vers un spectromètre Opton 300i. Ainsi, en mesurant successivement un spectre pour chaque angle d'incidence, il est possible de reconstituer la carte de réflectivité de la puce. Pour normaliser le signal, on réalise un spectre de l'éclairage en plaçant la fibre à 180° par rapport à l'axe de l'éclairage.

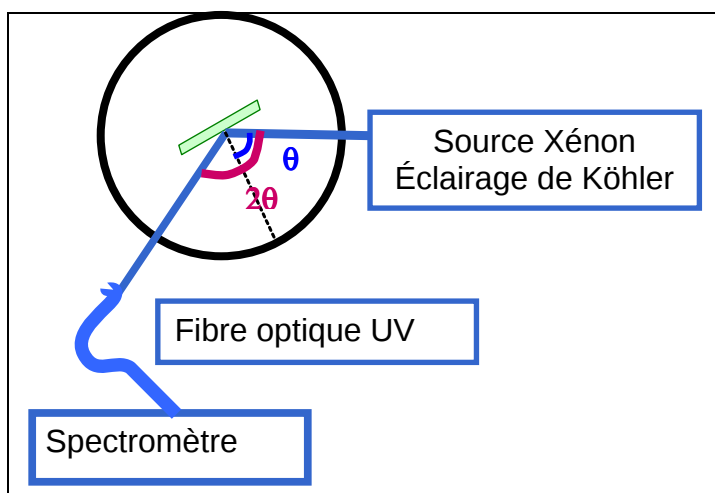


Figure 3.16 : Montage goniométrique (θ , 2θ) permettant de mesurer la carte de réflectivité spectroscopique de la puce

IV-2. b) Mesures spectroscopiques

Sur la Figure 3.17, nous donnons le résultat des simulations électromagnétiques réalisées avec des codes basés sur les matrices de diffusion ainsi que les mesures expérimentales. La résolution angulaire de la mesure est de 0.6° . Un très bon accord entre la théorie et les mesures expérimentales est trouvé. Le mode guidé suit bien la même dispersion que celle attendue d'après les simulations. Du fait des aberrations chromatiques, l'inhomogénéité du faisceau incident rend la normalisation du signal délicate, ce qui peut expliquer certains écarts

de mesure. Du fait de la largeur spectrale expérimentale, on observe un élargissement de la résonance. La localisation du minimum de réflectivité en dehors de la résonance (type Fabry-Perot) est aussi retrouvée à la fois sur la simulation théorique et sur les résultats expérimentaux.

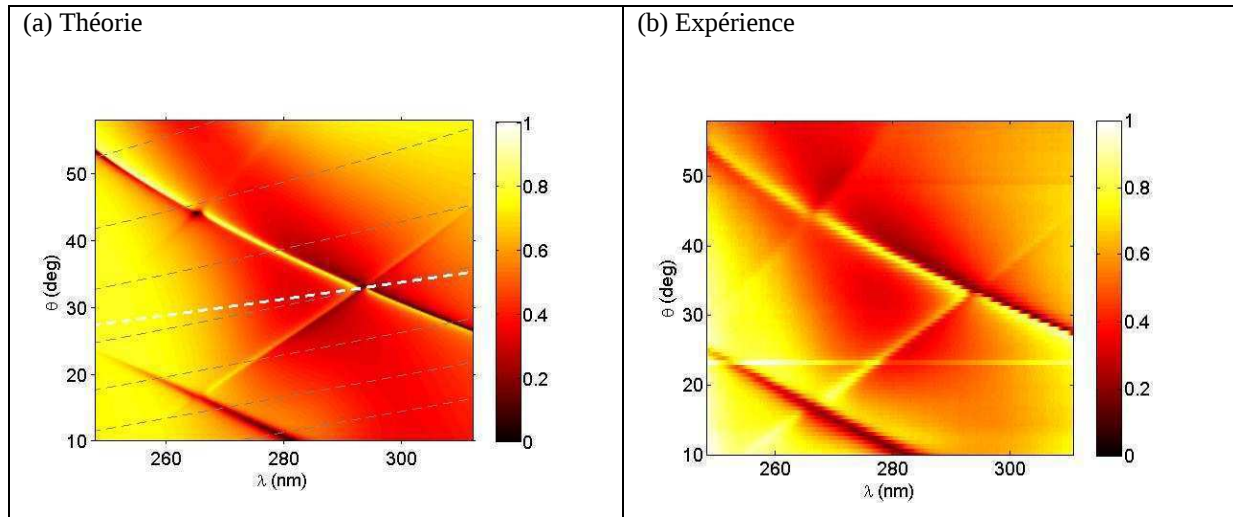


Figure 3.17 : Simulations et résultats expérimentaux mesurés sur la structure fabriquée et caractérisée

IV-2. c) Modification des conditions de résonance

La reconnaissance d'un élément biologique à la surface de la puce induit une modification des conditions de résonance. Ceci peut se mesurer en interrogation spectrale ou bien en interrogation angulaire. De manière similaire à ce qui a été présenté Figure 3.15 pour les mesures spectroscopiques, afin de déterminer la sensibilité spectrale à un élément biologique, deux réseaux distincts identiques sont réalisés sur la même puce. L'un sert de référence alors que l'autre est couvert par une monocouche de protéines sur toute sa surface. Seule une translation est effectuée entre les deux mesures. Les modifications des conditions de résonance sont alors attribuées à la présence de protéines sur l'un des deux réseaux.

La Figure 3.18 donne les résultats expérimentaux de mesures spectroscopiques réalisées sur la même plaque mais avec une translation de l'échantillon entre les deux mesures. Les résultats ont été obtenus avec une biopuce issue d'une autre fabrication. La période de cette puce est de 280 nm contre 270 nm sur la puce employée pour l'imagerie. De telles géométries de fonctionnalisation n'ayant pas été réalisées avec la puce utilisée dans cette étude, nous

présentons pour l'étude spectroscopique les résultats de l'échantillon avec une période de 280nm [Robin, 2009]. Comme il a été vu au chapitre 2, ce type de biopuce correspondait à un ordre de diffraction -1 émis plus proche de la normale à l'échantillon, donc plus favorable pour l'imagerie 2D dans l'ordre -1 .

Des mesures angulaires identiques peuvent être réalisées par mesure du signal réfléchi à une longueur d'onde donnée, mais des modifications induites par des changements de réglages optiques non désirés comme le jeu apparaissent lors du changement de sens de rotation du goniomètre, peuvent fausser l'interprétation.

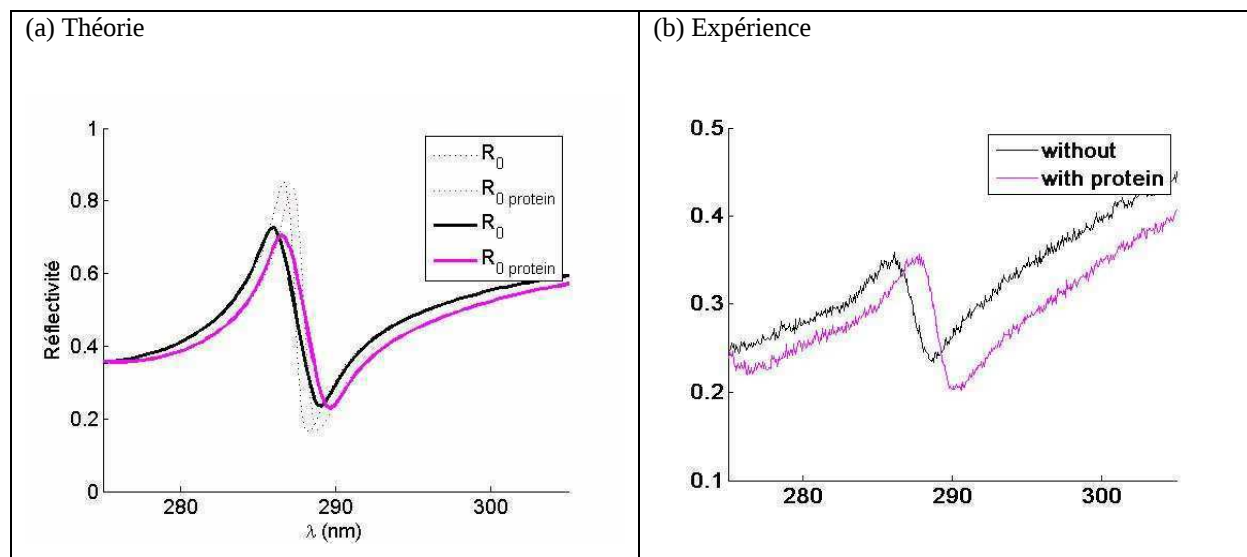


Figure 3.18 : Spectre (a) simulés et (b) expérimentaux pour une structure résonante nitrure/silice/silicium avec et sans protéines (épaisseur de 2.5 nm). Une translation du support est effectuée entre les mesures sans et avec protéines, afin de minimiser les modifications de réglages optiques entre les mesures.

IV-2. d) Imagerie en conditions résonantes

D'une manière générale, la bio-détection basée sur des propriétés des réseaux de diffraction mesure le changement des conditions de résonance en interrogation spectrale ou angulaire. Il est aussi possible d'utiliser le changement d'efficacité de diffraction à une longueur d'onde donnée et un angle donné, en utilisant cette propriété dans un but d'imagerie. De telles méthodes sont classiquement utilisées avec les plasmons de surface. L'interrogation en réflectivité est particulièrement intéressante pour mesurer plusieurs réactions biologiques en parallèle comme il a été signalé au premier chapitre. Ceci n'est possible avec l'interrogation

spectrale que par spectro-imagerie, mais nécessite alors une translation de l'échantillon pour reconstituer l'image de la puce [Cunningham, 2004].

Sur la Figure 3.19, nous donnons la réflectivité simulée de notre structure à la longueur d'onde de 280 nm, ainsi que les contrastes attendus. Expérimentalement, l'éclairage en conditions résonantes est obtenu en filtrant une source Xénon à large bande spectrale avec un monochromateur. La largeur spectrale à mi-hauteur $\Delta\lambda$ du flux incident est de 1.5 nm, et la largeur angulaire est de 0.6° . Le milieu ambiant étant l'air, la contribution de la partie réelle de l'indice optique est dominante sur le contraste par rapport à celle de l'absorption. Un changement de forme de la courbe d'efficacité de diffraction est mesuré. Ceci traduit une modification des conditions de couplage, qui combine l'effet d'absorption et les changements d'efficacité de couplage du fait de la modification de la structure.

Les courbes simulées permettent de déterminer la valeur du contraste. Selon l'angle d'incidence, on attend un contraste positif (spot brillants sur fond noir) ou négatif (spots noirs sur fond brillant). On observe une annulation du contraste à l'angle de 38.8° , qui correspond approximativement au maximum du signal réfléchi.

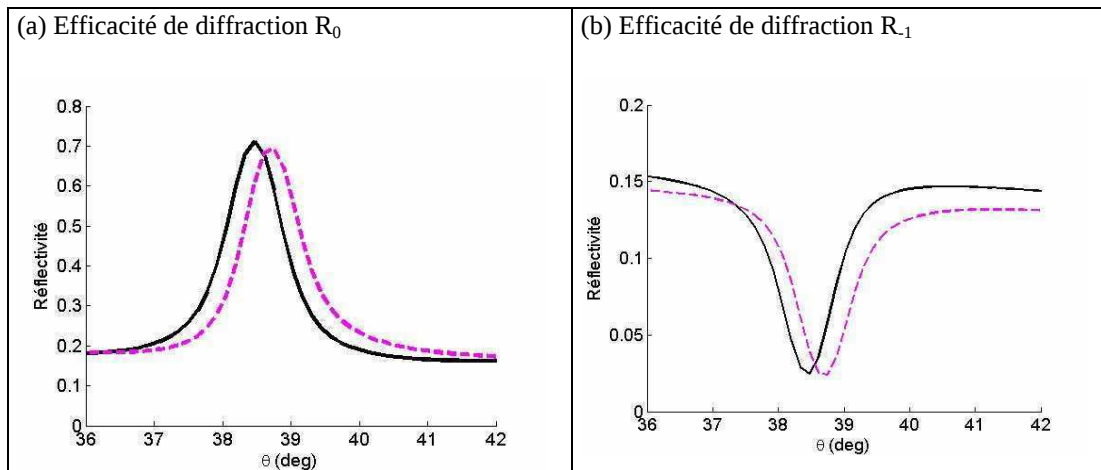


Figure 3.19: Efficacité de diffraction en absence et en présence d'une monocouche de protéine d'épaisseur $h=2.5$ nm, et d'indice $1.49+0.006i$.

IV-2. e) Imagerie dans l'ordre 0

➤ Images

La Figure 3.20 donne les différentes images expérimentales réalisées pour des angles d'incidence variant entre 36° et 42° . Les valeurs des angles lues et données sur cette figure sont à corriger de 2° du fait du décentrage de l'axe du détecteur. Les mesures sont réalisées tous les 0.5° . La réflectivité du fond de l'image correspond à l'efficacité de diffraction dans l'ordre 0. Selon l'angle d'incidence, la réflectivité de la puce est plus ou moins intense. Cette réflectivité correspond à l'efficacité de diffraction qui a été mesurée en spectroscopie, à un angle donné et à la longueur d'onde $\lambda=280$ nm. Sur les images réalisées, on vérifie le passage d'un contraste positif à un contraste négatif. L'intensité du signal réfléchi correspond à ce qui a été simulé. Ceci signifie que les pertes sont correctement prises en compte dans notre modélisation.

Les images obtenues sont données Figure 3.20. Elles mettent en évidence les spots biologiques sur les réseaux de diffraction. Des spots sont aussi présents en dehors des réseaux mais ne sont pas visibles sur ces images. On observe aussi un "quadrillage" tous les $400\text{ }\mu\text{m}$. Ceci correspond aux champs de la lithographie électronique. En effet, l'écriture est réalisée en répétant un motif carré de taille $400\times 400\text{ }\mu\text{m}^2$. Ce décalage peut être expliqué par un mauvais contrôle mécanique du nanomasqueur électronique (encore à l'état de *prototype*) ou bien par une sur-insolation de la résine en bord de réseau, le faisceau électronique passant plusieurs fois.

Les spots biologiques ayant aussi une période de $400\text{ }\mu\text{m}$, ils sont alignés sur les champs de la lithographie électronique. Le diamètre des spots biologiques défini par le masque de résine est de $140\text{ }\mu\text{m}$. Sur les images, le diamètre observé est de l'ordre de $200\text{ }\mu\text{m}$. Grâce aux mesures spectroscopiques, on peut déterminer une finesse du mode $F\sim 150$. Ainsi, l'étendue spatiale du mode sera de $\Delta x=16\text{ }\mu\text{m}$. Le grandissement de notre montage $G = 2.3$ correspond à une taille de pixel de $13\text{ }\mu\text{m}$. Ainsi, les pixels du bord ne sont pas significatifs déterminer le contraste. L'étalement des spots observé est aussi bien vertical qu'horizontal et ne peut être expliqué par l'étendue spatiale du mode guidé. Ceci signifie que les spots biologiques se sont étalés. Notons que dans l'imagerie de biopuces non structurées mais ayant subi la même préparation biologique, le diamètre des spots observés est de $140\text{ }\mu\text{m}$, comme attendu.

Les contrastes des images sont mesurés à partir de l'intensité du signal réfléchi en dehors et au niveau des spots. Le niveau de réflectivité est obtenu en réalisant des moyennes sur 7 profils réalisés le long de ligne de 3 spots. Pour plus de clarté, nous avons sélectionné 3 de ces profils, correspondant à un contraste positif ($\theta=38^\circ$, lu $\theta=40^\circ$), un contraste négatif ($\theta=40^\circ$, lu $\theta=42^\circ$) et un contraste quasiment nul, mais avec une bonne efficacité de diffraction ($\theta=39^\circ$, lu 41°).

Les niveaux de réflectivité peuvent ainsi être obtenus pour chaque angle d'incidence. Les réflectivités déterminées en imagerie en fonction de l'angle d'incidence sont reportées Figure 3.21 (a). On reporte aussi Figure 3.21 (b) le signal réfléchi à la longueur d'onde de 280 nm, mais mesuré par spectroscopie pour différents angles d'incidence.

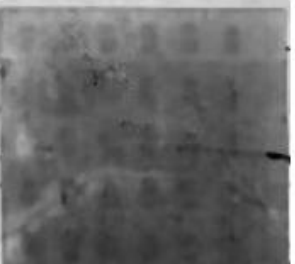
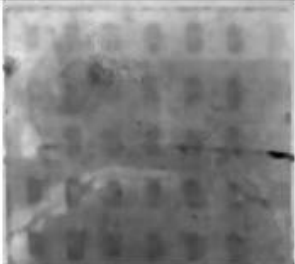
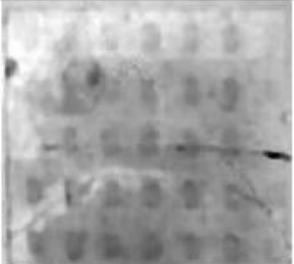
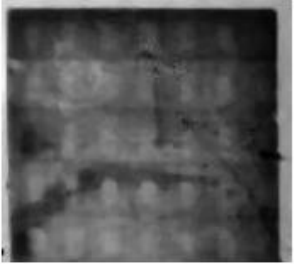
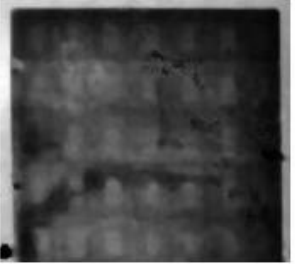
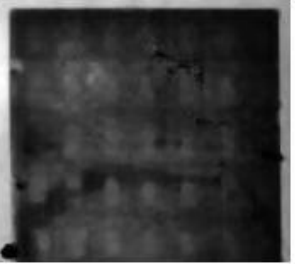
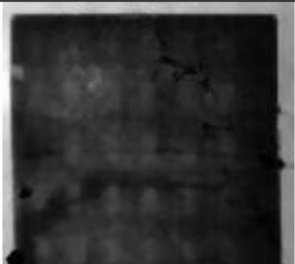
194 ($\theta=38^\circ$)	194 ($\theta=38^\circ$)	193 ($\theta=38.5^\circ$)	192 ($\theta=39^\circ$)
			
191 ($\theta=39.5^\circ$)	190 ($\theta=40^\circ$)	189 ($\theta=40.5^\circ$)	188 ($\theta=41^\circ$)
			
187 ($\theta=41.5^\circ$)	186.5 ($\theta=41.75^\circ$)	186 ($\theta=42^\circ$)	185.5 ($\theta=42.25^\circ$)
			
185 ($\theta=42.5^\circ$)	184 ($\theta=43^\circ$)	183 ($\theta=43.5^\circ$)	182 ($\theta=44^\circ$)
			

Figure 3.20 : Images obtenues pour différents angles d'incidence. On observe qu'on passe d'un contraste noir sur fond clair à un contraste clair sur fond noir. Les angles indiqués sur cette figure sont à corriger de 2° du fait du décentrage de l'axe du détecteur. Pour l'angle de 39° (lu 41°) on a une annulation du contraste. Le traitement est identique sur chaque image. Nous n'étendons pas la dynamique pour garder l'information de l'efficacité de diffraction.

➤ Comparaison aux mesures spectroscopiques

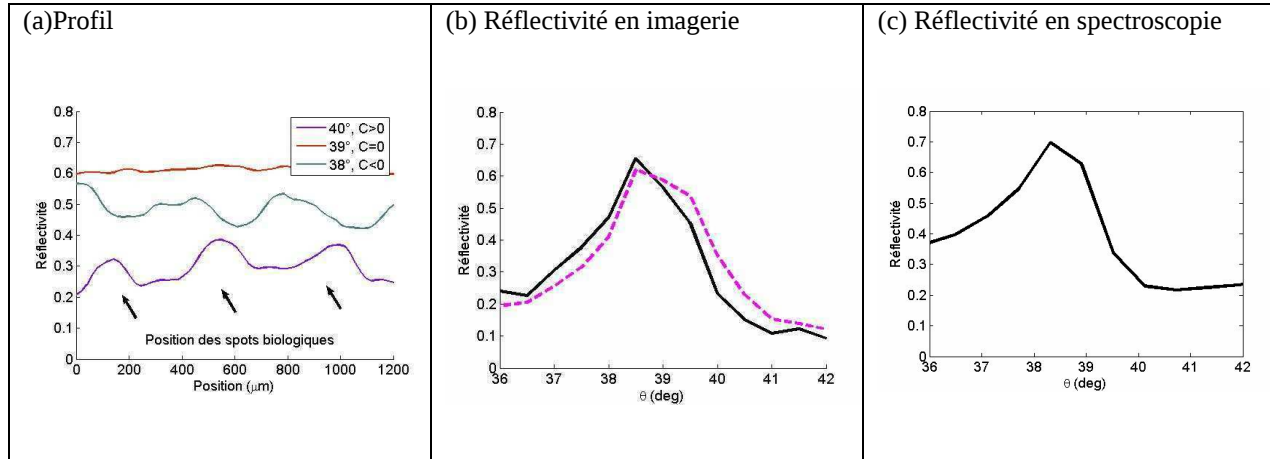


Figure 3.21 : Profils de réflectivités obtenus (a) par mesure spectroscopique (b) en reportant le niveau de réflectivité obtenu en imagerie UV en dehors des spots biologiques et sur les spots biologiques.

Le signal réfléchi en fonction de l'angle d'incidence est reporté Figure 3.21 (c). On vérifie aussi la bonne correspondance avec la courbe mesurée en spectroscopie, les mesures d'imagerie et les propriétés optiques calculées à partir de la modélisation. La différence de signal maximum est obtenue là où la pente du signal réfléchi en fonction de l'angle d'incidence est maximale.

IV-2. f) Imagerie dans l'ordre-1

Il est aussi possible d'utiliser l'ordre diffracté -1 pour réaliser les images. Ceci est notamment intéressant pour exploiter des directions plus proches de la normale à l'échantillon en vue de l'imagerie 2D. La puce caractérisée ici présente la longueur d'onde de résonance plus centrée entre les repliements du nitrure, permettant une meilleure finesse des résonances à la longueur d'onde de 280 nm. Ceci implique que la direction de l'ordre -1 à 280 nm en conditions résonantes est proche de la configuration Littrow. Pour des problèmes de fenêtrage, les angles d'incidence trop proches de la configuration Littrow ne peuvent pas être imagés. Ici l'angle le plus proche de la résonance que nous pouvons exploiter est 40° , qui correspond à une direction d'émission de l'ordre -1 de 42° (valeur lue 44°). Ceci correspond à un angle $\sin(\theta_{-1}) = \sin(\theta_0) - \frac{280}{270}$, soit $\theta_{-1} = -21^\circ$ par rapport à la normale à l'échantillon, et 19° entre l'éclairage et le détecteur. On est alors en dehors de la condition de résonance, mais on garde une forte influence de l'élément biologique sur le signal diffracté. L'image traitée obtenue est présentée Figure 3.22 (a). Sur la Figure 3.22 (b), nous avons étendu la dynamique obtenue. La moyenne de 7 profils réalisés sur 3 spots est donnée Figure 3.22 (c). Le niveau de signal mesuré est de 3%, au lieu d'une efficacité de diffraction attendue de 20%. Ceci peut être dû à de mauvais réglages optiques, les directions étant plus sensibles sur l'ordre -1 . Le contraste obtenu est ici de 46%, soit supérieur au contraste attendu de 30%. Ceci peut être expliqué par la rugosité au niveau des spots biologiques. Par comparaison aux images mesurées dans l'ordre de diffraction 0, il n'y a pas de signal réfléchi par la puce en dehors du réseau. On a donc une image du réseau sur fond noir.

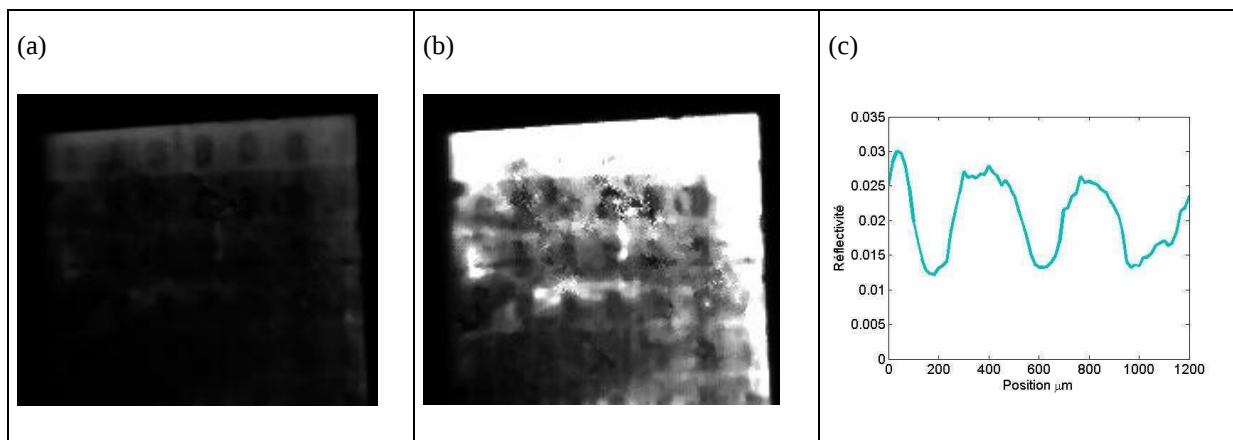


Figure 3.22 : Images à l'ordre -1 (a) sans et (b) avec étalement de la dynamique (c) profil moyen de 7 lignes de 3 spots

V- Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons d'abord décrit la fabrication des biopuces, ainsi que les étapes de la préparation biologique. Des caractérisations expérimentales d'ellipsométrie et d'AFM ont été réalisées sur nos structures afin de mieux connaître les contrastes attendus. Suivant cette démarche, il a été possible d'obtenir une bonne prédictibilité et compréhension des contrastes d'imagerie attendus. Cette caractérisation et bonne compréhension de nos structures seront utiles par la suite pour la réalisation de nouvelles puces. Des étapes telles que la caractérisation AFM ou MEB ont servi de contrôle. Les mesures d'ellipsométrie pour l'épaisseur des couches et leur loi de dispersion sont cependant essentielles. La détermination des contrastes de la biopuce réalisée a mis en évidence des contrastes conformes à ceux attendus d'après les simulations électromagnétiques. A notre connaissance, il s'agit des premières expériences d'imagerie 2D d'éléments biologiques sur réseau. La mise au point de biopuces permettant un bon renforcement de contraste en solution est en cours. De premières biopuces ont pu être fabriquées et caractérisées spectralement. Ces expériences sont présentées en annexe D. Ne disposant pas de dispositif fluide établi, nous avons pu mettre place ces expériences en utilisant une lamelle tenant par capillarité à la surface de la puce, et ainsi réaliser la caractérisation spectrale de telles biopuces, ainsi que de premières images UV en conditions résonantes.

Par ailleurs, des images de puces quart d'onde ont pu être réalisées en mettant la puce dans une cuve en quartz transparente en UV. Ceci montre donc la compatibilité de notre technique de détection à un montage fluide plus établi..

Nous avons en tout cas ici montré les sensibilités suffisantes de notre dispositif pour des applications telles que l'imagerie de biopuces. La fabrication et la caractérisation de premières biopuces permettant de fortes augmentations du contraste à 280 nm a été réalisée, et a permis de démontrer une bonne prédictibilité des contrastes. Le potentiel de notre technique pour la détection de réelles expériences biologiques a pu être démontré au cours de cette thèse, même si un gros travail de mise en œuvre doit être poursuivi pour des facilités d'utilisation.

Références

- [Bashara, 1999] R. M. A. Azzam, and N. M. Bashara, “Ellipsometry and polarized light”, North-Holland, 1999.
- [Bruggeman, 1935] D. A. G. Bruggeman , “Calculation of various physical constants of heterogeneous substances” , *Annalen der Physik*, 24, 636-679, 1935.
- [Cuypers 1978] P.A. Cuypers, W.TH. Hermens, and H.C. Hemker, “Ellipsometry as a Tool to Study Protein Films at Liquid-Solid Interfaces” *Analytical Biochemistry*, Vol. 84: 56-57, 1978.
- [Duparré 2002] A. Duparré, J. Ferre-Borrull, S. Gliech, G. Notni, J. Steinert, and J.M. Bennett, “Surface characterization techniques for determining the root-mean-square roughness and power spectral densities of optical components” *Applied Optics*, Vol. 41 (1), 2002.
- [Goyal, 2008] D.K. Goyal, G.K. Pribil, J.A. Woollam, and A. Subramanian, “Detection of ultrathin biological films using vacuum ultraviolet spectroscopic ellipsometry”, *Materials Science and Engineering B*, Vol. 149: 26-33, 2008.
- [Maezzo, 2006] G. Maezzo, J.L. Reverchon, J. Y. Duboz, A. Dussaigne, “An AlGa_N based Linear array for UV solar blind Imaging from 240nm to 280nm”, *IEEE-Sensors-Journal*, Vol. 6(4), 957-63, 2006.
- [Nakkach 2008] M. Nakkach, P. Lecaruyer, F. Bardin, J. Sakly, Z. Ben Lakhdar, and M. Canva, “Absorption and related optical dispersion effects on the spectral response of a surface plasmon resonance sensor” *Applied Optics*, Vol. 47 (33), 2008.
- [Palik, 1998] E.D. Palik, *Handbook of Optical Constants of Solids*, Academic Press, Orlando, 1998.
- [Prêtre 1998] P. Prêtre, L.M. Wu, A. Knoesen, and J.D. Swalen, “Optical properties of nonlinear optical polymers: a method for calculation” *Journal of the Optical Society of America B*, Vol. 15 (1), 1998.
- [Reverchon, 2007] J.L. Reverchon, J.A Robot, J.P. Truffer, J.P. Caumes, I. Mourad, J. Brault, J.Y. Duboz, “AlGa_N-based focal plane arrays for selective UV imaging at 310nm and 280nm and route toward deep UV imaging”, *Proceedings SPIE*, Vol. 6744-9, 2007.
- [Robin, 2008] K. Robin, J.L. Reverchon, L. Mugherli and H. Benisty “Detection of proteins and DNA on a biochip in UV”, *Proceedings SPIE*, 7188-04, 2008.
- [Robin, 2009] K. Robin, J.L. Reverchon, L. Mugherli, M. Fromant, P. Plateau, H. Benisty “Detection of biological macromolecules on a biochip dedicated to UV specific absorption”, *Biosensors and bioelectronics*, Vol. 24, 6, pp. 1585-1591, 2009.

[Stackowki, 2008] Lorentz dispersion model, Technical notes, Horiba Jobin Yvon, 2008.

[Stroud, 1998] D. Stroud, “The effective medium approximations: Some recent developments” *Superlattices and Microstructures*, Vol. 23(3/4), 1998.

[Tikhonravov 2003] A.V. Tikhonravov, M.K. Trubetskov, A.A. Tikhonravov, and A. Duparre, “Effects of interface roughness on the spectral properties of thin films and multilayers” *Applied Optics*, Vol. 42 (25), 2003.

[Vörös, 2004] J Vörös, “The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers” *Biophysical Journal*, Vol. 87: 553-551, 2004.

Chapitre IV

Intégration sur la résonance

Dans le chapitre 2, nous avons décrit des structures permettant une augmentation du contraste d'absorption. Les biopuces décrites sont hautement sensibles à la présence d'un élément biologique dans les conditions de résonance, pour lesquelles on obtient un couplage fort entre le champ électrique et l'élément biologique. A une longueur d'onde de résonance donnée λ_r correspond un angle de résonance d'excitation θ_r . Du fait de la largeur spectrale à la fois du spectre d'absorption des éléments biologiques, ainsi que des sensibilités instrumentales des éléments de notre montage (détecteur AlGaN ($\Delta\lambda \sim 20\text{nm}$) et/ou DEL AlGaN ($\Delta\lambda \sim 12\text{nm}$)), il semble intéressant d'intégrer le contraste sur toute la résonance (λ_r, θ_r). Ceci permet d'augmenter le niveau de signal et le rapport signal sur bruit, et donc d'obtenir une meilleure sensibilité. A notre connaissance, des dispositifs permettant d'exciter un large domaine de résonance n'ont pas été développés dans les problématiques d'imagerie. Dans ce chapitre, nous décrivons les avantages au niveau du seuil de détection et la façon dont de telles pré-dispersions peuvent être obtenues. L'étendue spatiale du mode sera aussi discutée en fin de chapitre.

I – Achromatisation

I-1. Intégration

Une haute sensibilité peut être obtenue pour tous les couples (λ_r, θ_r) satisfaisant la condition de résonance. Pour bénéficier de toute la sensibilité expérimentale de notre dispositif sur un domaine spectral D , chaque longueur d'onde λ_r de la résonance doit être excitée à son angle correspondant θ_r . L'intensité du signal mesuré R correspond alors à l'intégration de la réflectivité de la biopuce $R_0(\lambda)$ pondérée par la réponse instrumentale. Comme il a été vu au chapitre 2, la résolution angulaire ainsi que la largeur spectrale sont prises en compte dans $R_0(\lambda)$ en réalisant un produit de convolution avec des fonctions gaussiennes $G(\theta)$ et $S(\lambda)$, de largeur spectrale $\Delta\theta=0.5^\circ$, et $\Delta\lambda=1.5$ nm respectivement.

L'intégration est réalisée suivant les conditions de résonances (λ_r, θ_r) pour λ appartenant à un domaine spectral D . L'idée générale de cette pré-dispersion est représentée Figure 4.1. La réponse instrumentale $F(\lambda)$ inclut à la fois le spectre de réponse du détecteur et le spectre d'émission de la source. La réflectivité est alors donnée par l'expression suivante :

$$R = \int_{\lambda_r \in D} R_0(\lambda_r, \theta_{\lambda_r}) F(\lambda_r) d\lambda_r \quad (4.1)$$

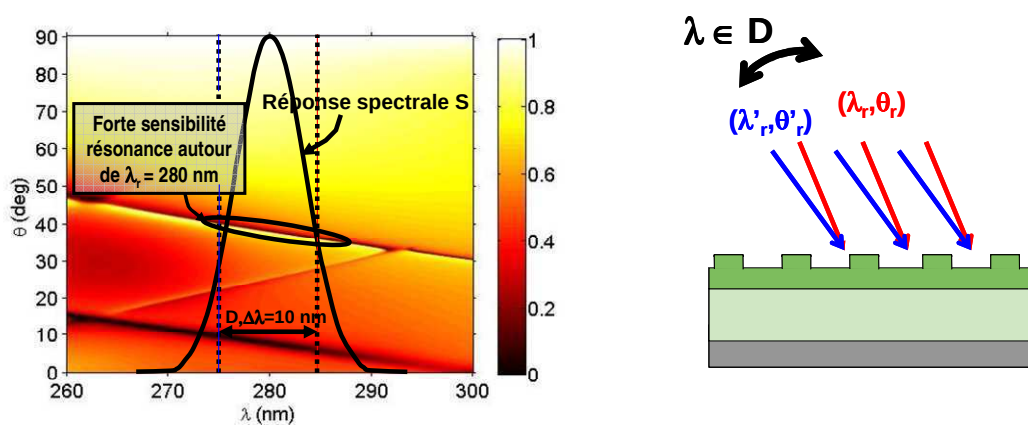


Figure 4.1: Idée générale de la pré-dispersion de l'éclairage : Chaque longueur d'onde λ_r du domaine spectral d'intérêt D doit arriver sous l'angle d'incidence θ_r correspondant à la condition de résonance. Ceci permet de bénéficier de l'ensemble du flux du domaine spectral d'intérêt

I-2. Condition de résonance

La technique classique de couplage dans l'utilisation de structures résonantes est l'utilisation d'un laser, naturellement monochromatique de longueur d'onde λ_{laser} et de divergence limitée par la diffraction. L'éclairage avec source laser est dans ce cas réalisé sous une incidence $\theta_r(\lambda_{\text{laser}})$. L'utilisation de sources larges et incohérentes permet d'éviter le speckle, toujours problématique en imagerie. Dans ce cas, la sélection d'une longueur d'onde unique λ_r est réalisée au moyen d'un monochromateur et on place la puce de telle sorte que cette longueur d'onde arrive sous une incidence $\lambda_r(\theta_r)$. Pour coupler un domaine spectral large $D = [\lambda_B, \lambda_H]$, il est nécessaire de disperser l'éclairage pour que chaque longueur d'onde λ_r arrive sur la puce sous l'incidence θ_r . Par une telle pré-dispersion, on récupère alors l'ensemble de la puissance utile de la source, ce qui permet de gagner en signal et en rapport signal/bruit. Les évaluations numériques des gains en signal sont données dans la section III.

On note $k_{//}^{\text{biopuce}}(\lambda) = n_{\text{eff}}(\lambda) \times \frac{2\pi}{\lambda}$ le vecteur d'onde du mode guidé d'intérêt de notre structure, où $n_{\text{eff}}(\lambda)$ désigne son indice effectif à la longueur d'onde λ . La condition de compensation de dispersion s'écrit :

$$k_{//}^{\text{coupleur}}(\lambda, \theta_{\lambda_r}^{\text{inc}}) = k_{//}^{\text{biopuce}}(\lambda_r), \forall \lambda \in D. \quad (4.2)$$

Il est possible d'obtenir de telles conditions d'éclairage en utilisant des éléments dispersifs, tels que prisme ou réseau.

I-3. Relation de dispersion

I-3. a) Caractéristiques spectrales

Les paramètres de la structure servant aux évaluations ont été présentés au chapitre 2. Nous donnons Figure 4.2 et Figure 4.3 les efficacités de diffraction dans l'ordre 0 et l'ordre -1

respectivement. Ces figures donnent aussi la différence de réflectivité induite par un élément absorbant d'absorption 5×10^{-3} , ainsi que le facteur de renforcement de contraste Γ . Les cartes de réflectivité des biopuces les plus sensibles à l'absorption montrent que la dispersion est quasiment linéaire en (λ, θ) , ce qui implique que le dispositif dispersif utilisé de manière intermédiaire doit fournir une dispersion linéaire sur un domaine de longueur d'onde D .

Pour l'éclairage, il est particulièrement intéressant d'utiliser des DEL UV. D'autres sources larges UV (Xénon, mercure) peuvent aussi être envisagées. Si la largeur de la source est supérieure à la largeur de la résonance, il sera alors nécessaire de sélectionner les longueurs d'onde de résonance en réception. Ceci peut être réalisé en utilisant un détecteur AlGaIn.

I-3. b) Pré-dispersion de l'éclairage à obtenir

La résonance de la puce est centrée à 280 nm. Pour un éclairage en conditions résonantes, il est nécessaire que:

- la longueur d'onde centrale $\lambda_c = 280$ nm arrive sous une incidence $\theta_c = 38.1^\circ$.
- la dispersion angulaire de la puce soit identique à celle de l'éclairage.

Sur un domaine centré à $\lambda_c = 280$ nm, nous observons un mode guidé linéaire. La dispersion à obtenir est importante. En effet, si l'on regarde les longueurs d'ondes extrêmes, on lit sur cette figure que $\theta_{0, 275 \text{ nm}} = 40^\circ$, et que $\theta_{0, 285 \text{ nm}} = 36.2^\circ$. Ceci correspond donc à une dispersion de 3.8° pour un domaine D de largeur spectrale 10 nm, soit 6.6 mrad/nm. La dispersion de notre biopuce implique ainsi d'obtenir de fortes dispersions en illumination.

Pour une meilleure idée de la distribution de l'éclairage, on peut dès à présent se référer à la Figure 4.9 (c) qui montre l'éclairage d'une puce de finesse $F=200$, dans le cas particulier d'une sensibilité instrumentale pour une largeur spectrale à mi-hauteur de 10 nm.

Nous présentons dans la suite les éléments optiques qui peuvent être utilisés pour pré disperser l'éclairage. Le choix de ces éléments pour obtenir la pré dispersion voulue sur le domaine D est aussi discuté.

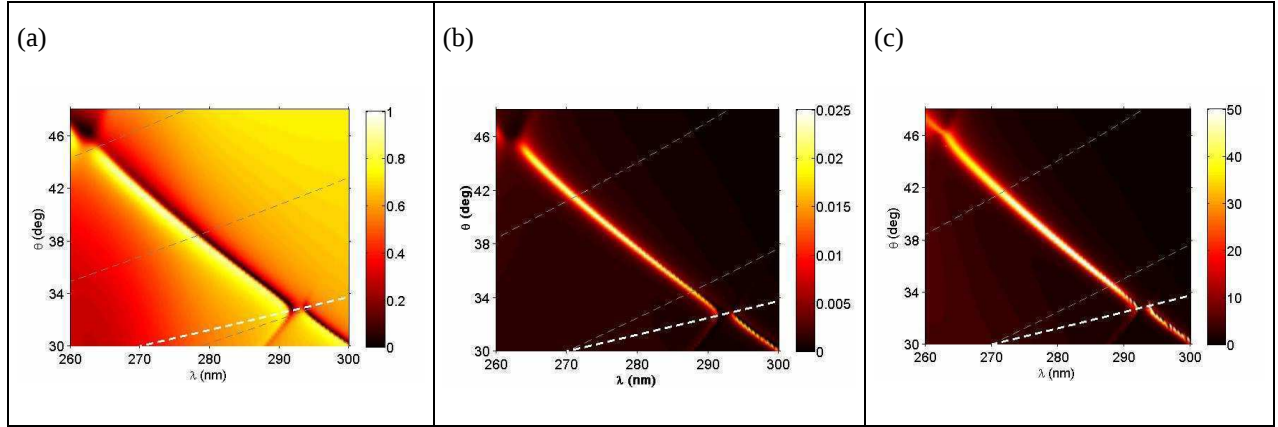


Figure 4.2: (a) Réflectivité, (b) différence de signal induite par la présence de l'absorbant, et (c) amplification du contraste obtenues pour la réflexion spéculaire

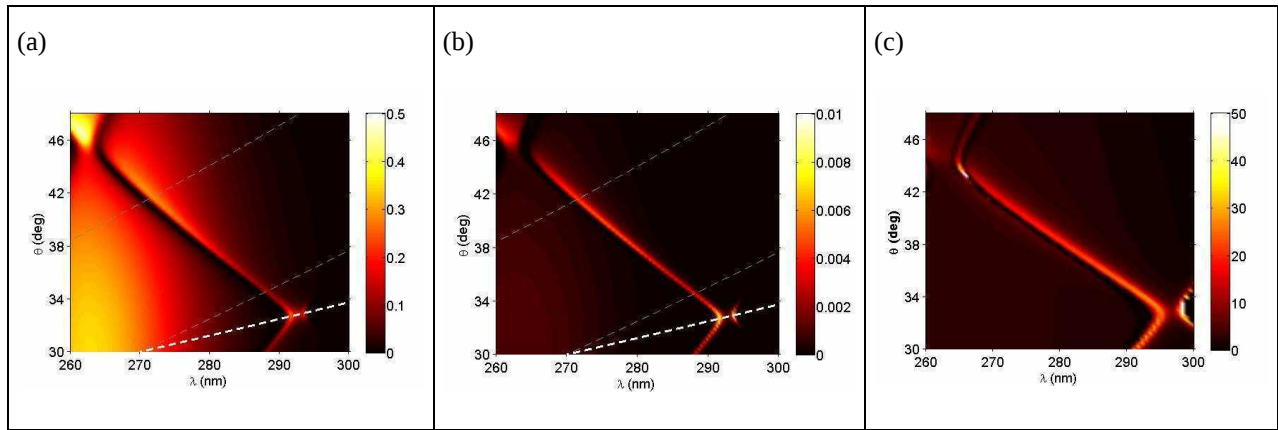


Figure 4.3: (a) Efficacité de diffraction dans l'ordre de diffraction -1, (b) différence induite par la présence de l'absorbant, et (c) amplification du contraste

II - Compensation de dispersion

II-1. Éléments dispersifs

II-1. a) Prisme

Parmi les éléments dispersifs, il est possible d'utiliser des prismes. L'angle de dispersion interne dans le prisme $\theta_{r,\lambda}$ est alors donné par :

$$n_p(\lambda) \sin(\theta_{r,\lambda}) = n_i \sin(\theta_i), \quad (4.3)$$

ou de manière équivalente :

$$\theta_{r,\lambda} = \arcsin\left(\frac{n_i \sin(\theta_i)}{n_p(\lambda)}\right). \quad (4.4)$$

où n_i désigne l'indice optique du milieu incident, θ_i désigne l'angle d'incidence, $\theta_{r,\lambda}$ l'angle dans le prisme, $n_p(\lambda)$ l'indice du prisme à la longueur d'onde λ . On suppose dans la suite que le milieu incident est l'air. L'angle de sortie par rapport à la normale du prisme $\theta'_{r,\lambda}$ est tel que:

$$\sin(\theta'_i) = n_p(\lambda) \sin(\theta'_{r,\lambda}). \quad (4.5)$$

La déviation d'un faisceau lumineux à la longueur d'onde λ dans le prisme est donnée par :

$$D = \theta_i + \theta'_i - A, \text{ avec } A \text{ angle au sommet du prisme } A = \theta_{r,\lambda} + \theta'_{r,\lambda}.$$

La dispersion dans le prisme conduit alors à la dispersion suivante :

$$\frac{dn_p}{d\lambda} \sin(\theta_{p,\lambda}) + n_p(\lambda) \frac{d\theta_p}{d\lambda} \cos(\theta_{p,\lambda}) = 0 \quad (4.6)$$

La variation de déviation du prisme $dD/d\lambda$ est donnée par:

$$\frac{dD}{d\lambda} = \frac{di'}{d\lambda} = n \frac{dn_p}{d\lambda} \frac{\sin(A)}{\sqrt{n_p^2 - \sin^2(\theta_i)}} \times \frac{1}{\sqrt{1 - (\sin(A) \sqrt{n_p^2 \sin^2 \theta_i} - \cos(A) \sin(\theta_i))^2}} \quad (4.7)$$

Elle est donc d'autant meilleure que la dispersion du matériau $dn_p/d\lambda$ est importante. Parmi les matériaux possibles pour les prismes UV (MgF_2 , CaF_2 , SiO_2 , Al_2O_3), aucun des matériaux ne permet d'obtenir une dispersion suffisante en dehors des conditions extrêmes d'utilisation du prisme (incidence rasante). Une succession de plusieurs prismes peut par contre permettre d'obtenir cette dispersion.

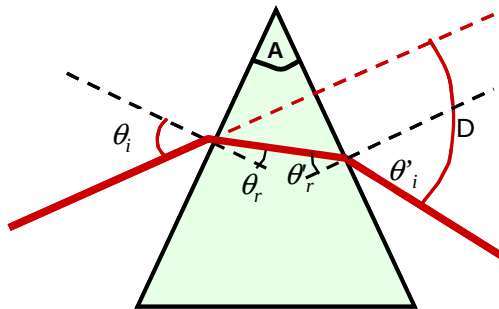


Figure 4.4: Dispersion par un prisme

II-1. b) Réseau

Les directions de diffraction obtenues lors de l'utilisation de réseaux sont données par la relation classique :

$$n(\lambda) \sin(\theta_m) = n(\lambda) \sin(\theta_o) + m \frac{\lambda}{\Lambda} . \quad (4.8)$$

On suppose que le milieu ambiant est l'air. La dispersion d'un réseau est obtenue en dérivant cette équation. On obtient alors :

$$\frac{d\theta_m}{d\lambda} = m \frac{1}{\Lambda \cos(\theta)} . \quad (4.9)$$

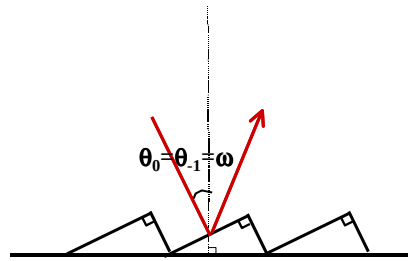


Figure 4.5: Réseau blazé en réflexion

Plus la dispersion désirée est élevée, plus la période du réseau devra être faible. Pour obtenir une forte dispersion, il est aussi possible d'utiliser un réseau de plus faible densité, mais à un ordre de diffraction m plus élevé. En effet, pour les réseaux échelles de longueur d'onde de blaze λ_B , la dispersion à un ordre de diffraction m sera importante au voisinage de la longueur d'onde λ_B/m . La Figure 4.4 représente un réseau blazé en réflexion. Les réseaux blazés à l'angle ω sont blazés en condition Littrow. A la longueur d'onde de blaze λ_B (correspondant à la longueur d'onde à laquelle l'efficacité du réseau est maximale), on a :

$$\sin(\theta_{\lambda_B}) = \sin(\theta'_{\lambda_B}) = (m / \Lambda^{\text{coupleur}}) \lambda_B, \text{ avec } \theta = \theta' = \omega, \text{ soit: } 2\sin(\omega) = (m / \Lambda^{\text{coupleur}}) \lambda_B.$$

En ce qui concerne les réseaux holographiques à forme sinusoïdale, des ordres de diffraction plus élevés que l'ordre -1 peuvent aussi être utilisés. La correspondance entre les longueurs d'onde d'efficacité maximale est alors moins immédiate [Palmer, 2005].

II-1. c) Association d'éléments dispersifs

Pour obtenir la dispersion désirée, il est aussi possible de combiner des éléments dispersifs tels que prisme et réseau. Ceci peut notamment permettre d'obtenir des conditions de compensation de dispersion sur un domaine de longueur d'onde plus important. Nous donnons ici les approches qui ont été développées jusqu'ici pour de telles applications.

Tout d'abord, Spaulding et Morris [Spaulding, 1991], [Spaulding, 1992] suggèrent deux approches différentes. La première consiste en un réseau de couplage sur la face d'un prisme. La largeur à mi-hauteur de la bande spectrale couplée obtenue est de 41 nm. La seconde combine un réseau de couplage avec un réseau en transmission tilté d'un certain angle. La largeur spectrale couplée était alors de 13 nm. La réalisation était faite pour une longueur d'onde de 500 nm. En 1993, Hetherington *et al.* proposent d'utiliser un réseau holographique en transmission tilté d'un certain angle par rapport à un réseau de couplage [Hetherington, 1993]. La largeur de couplage obtenue est de 5 nm. Leur démonstration est limitée par la largeur spectrale de la diode laser utilisée pour la démonstration, centrée à 780 nm. En 1994, Strasser et Gupta proposent une méthode de compensation combinant un réseau de couplage avec un réseau en réflexion incliné [Strasser, 1994]. Ce dispositif de couplage leur permet d'obtenir une largeur de couplage de 17 nm autour de la longueur d'onde de 650 nm. Pour augmenter la largeur de couplage, et faciliter l'alignement des éléments optiques, Li et Brazas proposent une méthode qui met en jeu l'utilisation d'un prisme et de deux réseaux parallèles. Les dispositifs de démonstration mettaient en jeu des sources centrées à 660 et 685 nm [Brazas, a, 1995] [Brazas, b, 1995]. Par la suite, Mendes *et al.* poussent la compensation de dispersion à un degré de perfectionnement remarquable, en compensant à des ordres plus élevés la compensation à l'aide de paramètres libres du design général de Li et Brazas. Les matériaux d'indices variables sont choisis judicieusement et surtout l'angle du prisme est adapté. Cette méthode met aussi en jeu un prisme préliminaire et deux réseaux solidaires de la pièce de support principale. La largeur spectrale à mi-hauteur obtenue est alors de 70 nm [Mendes, 1995][Mendes, 1997]. Les dispositifs permettant une compensation de dispersion sont donc nombreux. Cependant, à notre connaissance ceci n'a pas encore été mis en œuvre dans des dispositifs d'imagerie.

II-2. Couplage au mode guidé avec un réseau pré-disperseur

II-2. a) Réseau coupleur

La règle générale est qu'un des ordres de diffraction du réseau coupleur doit faire le lien entre la composante du vecteur d'onde de la lumière incidente dans le plan du guide et le vecteur d'onde du mode guidé. Ceci s'écrit :

$$k_{//}^{inc}(\lambda, \theta^{inc}) + mG^{coupleur} = k_{//}^{biopuce}(\lambda_r), \forall \lambda \in D. \quad (4.10)$$

avec $k_{//}^{inc}(\lambda) = n_{inc} \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\theta_{inc})$ vecteur d'onde incident sur le réseau coupleur à la longueur d'onde λ , $G^{coupleur} = \frac{2\pi}{\Lambda^{coupleur}}$ vecteur d'onde du réseau de diffraction de période $\Lambda^{coupleur}$ permettant d'obtenir la relation décrite par l'équation 4.10, et m est l'ordre de diffraction utilisé pour ce réseau.

Enfin, $k_{//}^{biopuce}(\lambda) = n_{eff}(\lambda) \frac{2\pi}{\lambda}$ est le vecteur d'onde du mode visé, aussi caractérisé classiquement par l'indice effectif $n_{eff}(\lambda)$.

Ceci s'écrit de manière équivalente :

$$n_{inc}(\lambda) \sin(\theta_{inc}) + m \frac{\lambda}{\Lambda^{coupleur}} = n_{eff}(\lambda). \quad (4.11)$$

II-2. b) Configuration avec réseau sur mesure

➤ Paramètres du réseau

La Figure 4.1 représente l'idée générale de pré-dispersion pour éclairer la puce en condition résonante. Pour notre puce, les grandes longueurs d'onde doivent arriver sur la puce avec un angle d'incidence plus faible par rapport à la normale. Ceci peut amener certaines restrictions concernant les réalisations expérimentales, notamment si l'on veut utiliser un montage de type

4f ou avec un miroir parabolique permettant de former l'image du réseau pré-disperseur sur la puce. De telles configurations permettent de conserver l'ensemble du flux.

La dispersion de notre puce guide d'onde $d\theta/d\lambda$ est de -6.6 mrad/nm, soit -0.15 nm/mrad. Ceci nécessite donc des prismes ou réseaux fortement dispersifs pour l'éclairage. Afin de conserver l'ensemble du flux lumineux, les relations suivantes doivent être satisfaites simultanément:

$$\begin{cases} \frac{d\theta_m}{d\lambda} = m \frac{1}{\Lambda^{coupleur} \cos(\theta_m)} = -6.6 \text{ mrad/nm, avec } \theta_m = -38.1^\circ. \\ \sin(\theta_m) = \sin(\theta_0) + m \frac{\lambda}{\Lambda} \end{cases} \quad (4.12)$$

La première équation donne une période $\Lambda^{coupleur} = 192$ nm, soit un nombre de 5200 traits/mm. Ceci correspond à un angle d'émission de l'ordre 0 de $\theta_0 = 50.6^\circ$.

Pour obtenir une dispersion identique sous la même incidence, il est possible d'utiliser des réseaux de période plus grande mais à un ordre supérieur. Dans ce cas, pour un réseau utilisé à l'ordre -2, avec une même direction d'émission on aura une période de 2600 traits/mm, et de 1733 traits/mm à l'ordre -3.

Afin de faire l'image de la puce, sur le détecteur, on utilise un montage 4f pour l'imagerie. L'encombrement devra aussi être pris en compte pour l'imagerie. Un renvoi vertical de l'image via un miroir peut aussi être envisagé.

II-2. c) Réseau commercial utilisé au 3eme ordre

➤ Paramètres du réseau

Nous développons ici le cas de l'utilisation d'un réseau blazé en réflexion. Le réseau choisi est un réseau de 1200 traits par mm (période de 278 nm), blazé pour 750 nm à un angle d'incidence de 26.24° . Il est utilisé à l'ordre -3, ce qui permet d'obtenir une bonne efficacité de diffraction autour de la longueur d'onde de 250 nm.

A la longueur d'onde de blaze, la dispersion a une valeur de 6.6 mrad/nm.

$$d\theta'_\lambda / d\lambda = m/a / \cos(\theta'_\lambda).$$

Le réseau est utilisé à l'ordre $m=-3$ à un angle d'incidence proche de 57° . L'angle de diffraction à 280 nm est de -10° . L'efficacité de diffraction à cet angle d'incidence devra par contre être vérifiée. La puce est ensuite suivie d'une optique d'imagerie de configuration $4f$, permettant de reformer l'image de la puce sur le détecteur.

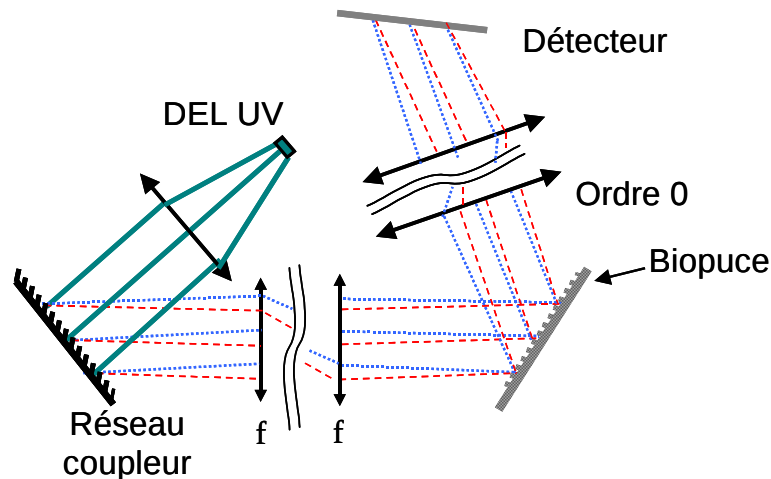


Figure 4.6: Montage optique avec réseau sur mesure

➤ Configuration optique : Spectromètre d'Offner

Afin de simplifier les réglages, il est possible d'utiliser la configuration d'un spectromètre d'Offner pour réaliser l'éclairage de la puce. Ceci nous permet, en utilisant un réseau permettant d'obtenir une dispersion correspondant à notre biopuce, de l'éclairer en condition résonante. Ceci signifie que chaque longueur d'onde λ_r arrive sur la puce à un angle d'incidence θ_r . De manière à faire des images de l'ensemble de la puce avec notre détecteur matriciel, il est alors nécessaire d'éclairer toute sa surface, et de plus de conserver les propriétés de l'image. Nous présentons donc dans cette partie le dispositif utilisé pour réaliser la dispersion, en prenant en compte les ouvertures angulaires, ainsi que l'étendue spatiale du faisceau d'éclairage.

Le réseau dont nous disposons est un réseau de 1200 traits/mm , de taille $25\text{ mm} \times 25\text{ mm}$. Lorsque ce réseau est éclairé sous une incidence de 57° , la dispersion a une valeur 6.6 mrad/nm , ce qui correspond bien à la dispersion que nous souhaitons obtenir pour notre puce.

Dans ce type de spectromètre, la fente d'entrée est située au foyer d'un miroir sphérique permettant d'envoyer un faisceau collimaté vers le réseau découplage C. La biopuce B est placée après ce réseau de diffraction coupleur C. L'ouverture angulaire est donnée par

l'ouverture de la fente O_f sur la distance focale du miroir de $f_m=15$ cm. Une configuration $4f$ est ensuite utilisée pour reformer l'image sur le détecteur.

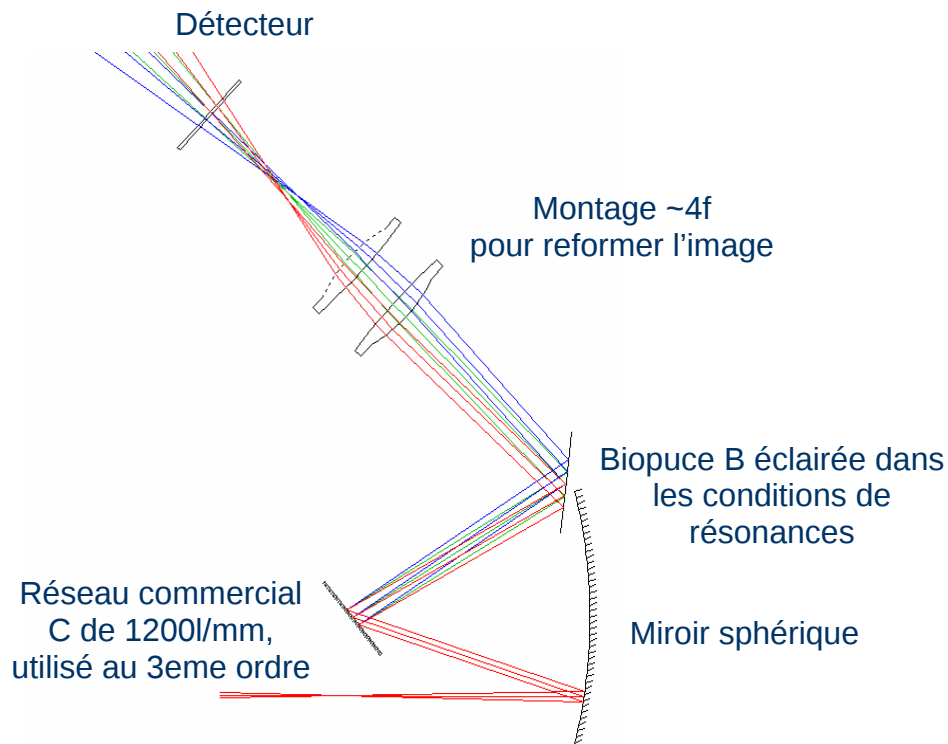


Figure 4.7 : Configuration spectromètre d'Öffner pour éclairer la puce, suivi d'un montage $4f$ pour reformer l'image sur le détecteur

➤ Divergence du flux

Dans de telles configurations optiques, l'encombrement est un critère primordial pour la réalisation. Dans le cas où le réseau coupleur et la biopuce ne sont pas conjugués, il y aura une perte de flux du fait de la divergence du faisceau. Nous évaluons cette perte pour une distance $d=10$ cm entre les deux éléments. On note β l'angle correspondant à l'étalement spectral du faisceau. Pour $d = 10$ cm, la distance correspondante sur la puce est $t=0.26$ cm. Pour une section de faisceau initiale de 1 cm, la surface couverte est de $(1-2 \times 0.26) = 4.8$ mm. Ainsi, on perd dans ce cas la moitié du flux. Par ailleurs, la puce fait un angle $\theta=38^\circ$ par rapport au faisceau incident. On perd alors un facteur de 1.2 sur le flux par unité de surface sur la puce.

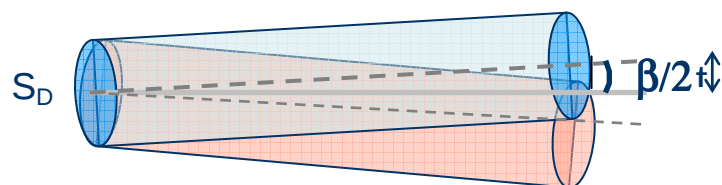


Figure 4.8 : Perte de flux du fait de la divergence angulaire du faisceau

III - Gain en rapport signal sur bruit

III-1. Gain en signal

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, en dehors des sources lasers, l'ouverture angulaire d'émission des sources est très supérieure à ce que requiert l'éclairage en conditions résonantes. Nous réalisons ici les évaluations numériques résultant de l'intégration sur la largeur spectrale instrumentale. Les configurations instrumentales considérées sont les suivantes :

- DEL AlGaIn
- Détecteur AlGaIn associé à une source Xénon
- Détecteur AlGaIn associé à DEL AlGaIn

La puissance totale dont nous pouvons bénéficier par intégration sur la largeur de la réponse instrumentale est de 12 nm pour la DEL seule, et de 10 nm lorsqu'elle est associée à un détecteur AlGaIn spectralement sélectif de largeur à mi-hauteur $\Delta\lambda=20$ nm.

Le spectre de la source Xénon peut être considéré comme constant sur le domaine considéré. Dans ce cas, la largeur spectrale est limitée par le détecteur, soit $\Delta\lambda=20$ nm. Notons que l'adaptation de la composition des couches $\text{Al}_x\text{Ga}_{1-x}\text{N}$ du détecteur peut permettre d'adapter la largeur spectrale et la longueur d'onde centrale du détecteur [Walker, 1996].

Pour une DEL, la puissance émise dans un angle de 0.57° (correspondant à une largeur spectrale de 1.5 nm, soit une finesse de 200) est de 0.5mW/1.5 nm pour la DEL, alors que pour une source Xénon, on a une puissance de 1.2 mW/1.5 nm, soit un temps d'intégration 2.4 fois plus faible.

De manière classique, lorsqu'on utilise une source large pour réaliser un éclairage en conditions résonantes, on utilise un monochromateur. En ce qui concerne les pertes pouvant être introduites par les éléments optiques, elles sont considérées identiques à celles obtenues lors de l'utilisation d'un monochromateur puisque l'élément dispersif mis en jeu peut aussi être un réseau, et les pertes obtenues avec un prisme sont limitées. Le gain en signal obtenu par intégration sur le domaine D peut être exprimé comme suit :

$$\int_{\lambda \in D} F(\lambda) d\lambda = \text{Gain} \times \int_{(280 / F) \text{ nm}} F(\lambda) d\lambda \quad (4.13)$$

où $F(\lambda)$ désigne la réponse instrumentale. Pour les évaluations numériques, on suppose F de forme gaussienne, avec comme largeur à mi-hauteur $\Delta\lambda$. Les valeurs de gain en signal obtenues lors de l'intégration sur la condition de résonance sont données dans le Tableau 4.1 pour une finesse de 200.

F=200	<i>Signal</i>
$\Delta\lambda=1.5 \text{ nm}$	$\times 1$
$\Delta\lambda=10 \text{ nm}$	$\times 6.7$
$\Delta\lambda=12 \text{ nm}$	$\times 8$
$\Delta\lambda=20 \text{ nm}$	$\times 13$

Tableau 4.1 : Gain en signal

III-2. Gain en sensibilité

L'intégration sur le domaine $\Delta\lambda$ permet de gagner en signal. Nous explicitons ici le gain en signal et en rapport signal sur bruit.

III-2. a) Dispositif considéré

Pour ne pas transformer cette présentation en une énumération de chiffres, nous nous référons ici à un dispositif donné. Prenant en compte les perspectives prometteuses des composants AlGaIn, il nous semble ici intéressant de considérer de tels composants en particulier en terme de coût et compacité du dispositif de biodétection, [Robin, 2009]. Pour une finesse $F = 200$ et un montage optique correspondant à un domaine d'intégration de $\Delta\lambda=10 \text{ nm}$, le gain en signal est d'un facteur $\times 6.7$ pour l'illumination.

Dans la section précédente, pour rester général, nous n'avons pas pris en compte les variations de signal $R(\lambda)$ dues à la biopuce sur le domaine spectral D . En effet, le domaine D étant de largeur spectrale limitée, la réflectivité peut être considérée constante sur ce domaine. Par exemple, dans le cas précis qui nous occupe ici, la réflectivité moyenne sur le domaine D pondérée avec la réponse spectrale correspond en fait à un gain de signal de 6.25 au lieu de 6.7. Ceci s'écrit :

$$\int_{\Delta\lambda=10\text{nm}} R(\lambda) S(\lambda) d\lambda = 6.25 \times R_{280\text{nm}} \times \int_{\Delta\lambda=1.5\text{nm}} S(\lambda) d\lambda . \quad (4.14)$$

Nous donnons Figure 4.9 l'allure de la pré-dispersion obtenue pour ce dispositif et une finesse de 200, soit une résolution angulaire de 0.57° . La Figure 4.9 (a) donne la sensibilité spectrale $F(\lambda)$ de notre dispositif, prenant en compte le spectre d'émission de la DEL ($\lambda_{\text{max}}=280$ nm, $\Delta\lambda=12$ nm), convoluée avec la réponse spectrale de notre détecteur AlGaIn ($\lambda_{\text{max}}=278$ nm, $\Delta\lambda=20$ nm). L'utilisation de cet éclairage sans le pré-disperser (Figure 4.9 (a)) ne permet pas de bénéficier du renforcement de contraste obtenu en conditions résonantes, et il est donc nécessaire de le filtrer. La Figure 4.9 (b) représente l'éclairage filtré en l'absence de pré-dispersion. Ceci est obtenu expérimentalement en utilisant un monochromateur et en l'ouvrant à une largeur de 1.5 nm centrée à 280 nm. Les conditions d'éclairage de la Figure 4.9 (c) suivent une distribution identique à celle de la résonance. Cet éclairage pré-dispersé permet de récupérer un maximum de photons utiles tout en gardant les sensibilités obtenues en imagerie résonante.

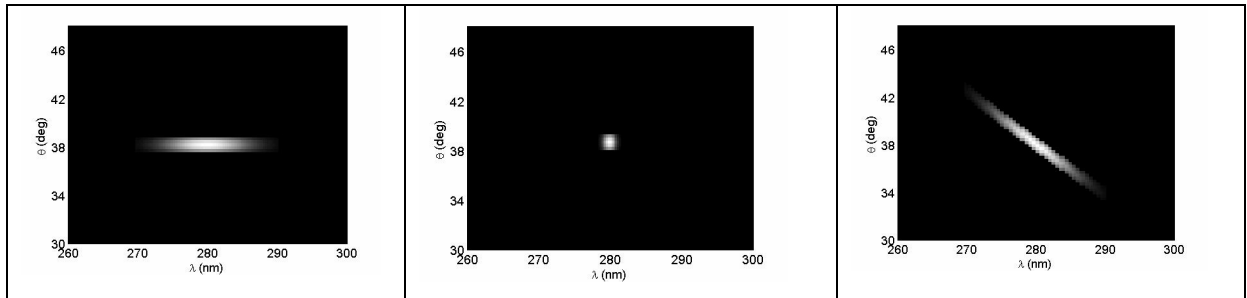


Figure 4.9 : Distribution de l'éclairage pour une finesse $F = 200$, soit une ouverture angulaire de 0.57° à mi-hauteur., et une largeur spectrale $\Delta\lambda=1.5$ nm pour θ donné (a) Eclairage non pré-dispersé, correspondant au spectre instrumental (b) Spectre filtré sur une largeur spectrale à mi-hauteur de 1.5 nm (c) Spectre pré-dispersé, pour lequel l'ensemble du spectre est disponible pour l'éclairage en conditions résonantes.

III-2. b) Gain en rapport signal sur bruit

L'évaluation du bruit a été détaillée en Annexe A. La contribution principale est le bruit photonique. Cependant, pour de faibles flux, les autres contributions ne peuvent plus être négligées. L'intégration permet ainsi d'améliorer le rapport signal sur bruit de 104 à 359 pour un temps d'intégration de 1 seconde.

Les valeurs de gain en signal et rapport signal sur bruit sont reportées dans le Tableau 4.2, où nous reportons aussi le seuil de détection après avoir réalisé la moyenne sur plusieurs images, et pris en compte le nombre de pixels exploitables par plots de diamètre 150 μm sur la puce.

La taille des pixels du détecteur est de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$, avec des dimensions du détecteur de 320×256 pixels. Le grandissement choisi est de 2, soit une surface de détecteur de $7.6 \times 9.6 \text{ mm}^2$, ce qui correspond à un champ de $3.8 \times 4.8 \text{ mm}^2$. Pour une taille de spots biologiques de diamètre 150 μm , l'image est alors un spot de 300 μm de diamètre. La distance centre à centre entre deux plots voisins sur la puce est de 400 μm . La surface par un spot est de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$, sur la puce. Une distance de 250 μm entre 2 bords de plots biologiques semble convenable tant au niveau de la biologie pour l'influence des interactions entre plots voisins, qu'au niveau de l'étendue spatiale du mode. Ceci correspond alors à un nombre de plots biologiques dans le champ de 10×12 , soit 120 plots, et permet donc de multiplexer les réactions sur différents plots. Pour évaluer le nombre de pixels par plot que l'on va pouvoir exploiter, il est nécessaire de prendre en compte l'étendue spatiale du mode. La finesse considérée dans cette analyse est toujours de $F \sim 200$. Comme il a été présenté dans le chapitre 2, l'étendue spatiale est donnée par l'équation (2.54): $\Delta x = \ln(2)F\lambda/n_g$.

Avec un indice de groupe $n_g = 1.98$ et une longueur d'onde de 280 nm, ceci correspond à une distance de 20 μm . Le spot a alors une forme de coma sur la matrice du détecteur de diamètre $a = 300 \mu\text{m}$ verticalement, et de diamètre exploitable $b = 260 \mu\text{m}$ horizontalement. Ceci correspond à une surface exploitable $S = \pi \times \frac{a^2 + b^2}{8}$, soit un nombre de 69 pixels. Les pixels

du bord n'étant pas nécessairement couverts de molécules biologiques sur toute leur surface, leur valeur n'est pas prise en compte. Ceci correspond à un nombre de spots de

$P = 2\pi \sqrt{\frac{a^2 + b^2}{8}}$ soit 29 pixels. Le nombre de pixels qui peuvent être exploités est ainsi

$N = S - P = 27$ pixels. Ceci permet une augmentation du rapport signal sur bruit de 5.5, et améliore notre seuil de détection¹.

¹ Le choix de la forme pour la réalisation des plots biologiques est circulaire. Ce choix a été fait du fait des masques existants dans nos laboratoires. Une forme de plots carrés serait plus favorable pour nos applications, puisqu'on aurait un nombre de pixel par spots $N = 10 \times 6 = 60$ en prenant soin des alignements de pixels, tout en gardant une surface utile par spots sur la puce de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$.

Au final, en moyennant sur une trentaine de pixels et sur 10 images, il est possible d'améliorer le seuil de détection par un facteur 17. Une taille de plot légèrement supérieure permettra d'augmenter la valeur de l'amélioration du rapport signal sur bruit.

En ce qui concerne le signal, nous avons vu que le gain est d'un facteur 6.25. Ces évaluations numériques montrent donc que nous gagnons quasiment un ordre de grandeur sur le signal, sans perdre pour autant d'amplification. A temps d'intégration constant le gain en rapport signal sur bruit est de 3.5.

$\Delta\lambda$, F=200	Signal	SNR	Seuil de détection
1.5 nm	$\times 1$	104	5.6×10^{-4}
10 nm	$\times 6.25$	359	1.6×10^{-4}

Tableau 4.2: Signal et limite de sensibilité avec et sans intégration sur un domaine spectral de 10 nm pour une fréquence d'acquisition de 6.25 Hz . Le seuil de détection correspond à une intégration sur 10 images et 30 pixels par plots.

III-3. Application à l'imagerie

III-3. a) Biopuce de finesse F~200

De manière à rendre plus visuel ce que représente le gain en signal et rapport signal sur bruit, nous avons simulé des images prenant en compte le niveau de signal et le seuil de détection.

Les images simulées sont données Figure 4.10, ainsi que leurs profils. Elles correspondent à un contraste $C = \Delta R/R$ de 5×10^{-3} . L'absorption d'une monocouche de protéine de densité typique 4 ng/mm² est de 0.8×10^{-3} . Avec un renforcement de contraste d'un facteur 50, ceci correspond à une densité surfacique de 40 pg/mm². L'ouverture angulaire est prise en compte dans ces simulations. On prend aussi en compte l'étendue spatiale du mode, en utilisant une convolution de l'image avec une fonction asymétrique de décroissance exponentielle, de constante caractéristique de décroissance à mi-hauteur Δx . Ceci donne une forme de comète au plot observé.

L'image simulée correspond à ce qu'on aurait avec une fréquence d'acquisition de 6.25 Hz (Tableau 4.2). En l'absence d'intégration, le signal réfléchi est de 14.4%. Un contraste $c=5 \times 10^{-3}$ correspond à une variation de réflectivité de 7×10^{-4} . Le rapport signal sur bruit de

104 correspond à un bruit de 1.39×10^{-3} . Dans ce cas, une moyenne sur plusieurs images ou bien sur plusieurs plots d'un pixel est nécessaire. C'est d'ailleurs par cet effet de moyenne naturelle que nous pouvons distinguer les spots sur l'image, car l'amplitude du bruit est en fait supérieure à la variation de réflectivité.

En intégrant sur la résonance par un éclairage pré-dispersé, on obtient un signal 6.25 fois plus important. L'image obtenue est donnée Figure 4.10 (b). La variation de réflectivité due à l'absorption est dans ce cas de 4.5×10^{-3} , et le bruit de 2.5×10^{-3} . La variation de signal est dans ce cas supérieure au bruit. A titre de comparaison, la dynamique de la première image est étendue en multipliant l'image de la Figure 4.10 (a) par 6.25. On obtient alors la même échelle que l'image résultant de l'intégration, mais pouvons observer visuellement le bruit plus important (Figure 4.10 (c)).

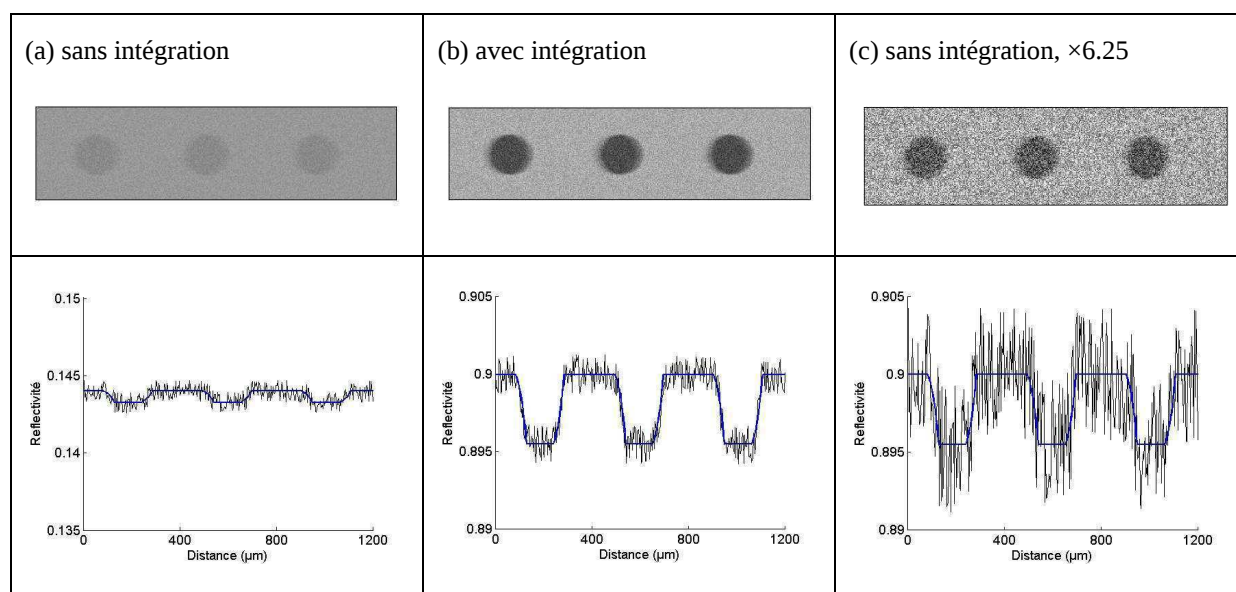


Figure 4.10 : Images pour un contraste de 5×10^{-3} (a) Sans intégration sur la largeur spectrale (b) Après intégration. (c) Sans intégration spectrale mais étendue sur la même dynamique que l'image intégrée. Les échelles de gris sont identiques à ce qui donnent les axes sur les profils. L'intégration permet de gagner en rapport signal sur bruit, ainsi qu'en niveau de signal, ce qui permet d'avoir une fréquence d'acquisition plus élevée. Ceci est intéressant pour les applications biologiques nécessitant de faibles temps de réaction.

III-3. b) Images obtenues pour différentes finesses

Il nous semble intéressant de profiter de cette présentation pour revenir sur les notions de finesse et d'étendue spatiale du mode. En effet, l'imagerie sur réseaux de diffraction a été à ma connaissance assez peu étudiée. Les conséquences de l'étendue spatiale du mode sur la résolution des images est discutée dans ce paragraphe. L'application des réseaux de

diffraction utilisée jusqu'ici en détection biologique correspond à de fortes finesesses, qui permettent une très bonne sensibilité. Il s'agit pour l'instant de détection spectroscopique [Cunningham, 2002] [Cottier, 2003]. Comme nous avons vu dans ce manuscrit, il est possible de réaliser de l'imagerie bidimensionnelle de telles structures, en localisant les espèces sous forme de plots à la surface de la puce.

De la même manière qu'avec les plasmons de surface, pour un contraste d'indice uniquement, la variation de la réflectivité dans une condition (λ, θ) donnée est d'autant plus grande que la pente $dR/d\lambda$ (ou de manière équivalente $dR/d\theta$) est importante. Ainsi, la variation de réflectivité est proportionnelle à la finesse, et montre l'influence des résolutions instrumentales (selon le domaine des longueur d'onde, des composants plus puissants que ceux trouvés en UV existent et diminuent ces limitations).

Notre cas de référence, est là aussi une biopuce de finesse de 200 imagée à la longueur d'onde de 280 nm, avec une taille de plot de 150 μm . L'étendue spatiale du mode $\Delta x = \ln(2)F\lambda/2n_g$ est proportionnelle à la longueur d'onde et à la finesse. Les finesesses étudiées varient de 200 à 1000, soit une étendue du mode de Δx variant de 20 à 100 μm à $\lambda=280$ nm.

Les images simulées prenant en compte l'étendue spatiale du mode sont proportionnel sont données Figure 4.11. On donne aussi le profil asymétrique des plots. Le contraste est normalement proportionnel à la finesse (en tout cas lorsqu'il s'agit d'un contraste d'indice et qu'il n'y a pas de limitations instrumentales). Comme le contraste est suffisant ici pour l'interprétation des images, et que nous souhaitons voir l'effet de l'étendue spatiale uniquement, nous ne prenons pas en compte cette augmentation de contraste. Ceci nous permet de nous focaliser sur la notion d'étendue spatiale du mode et résolution spatiale en imagerie.

S'agissant de la largeur à mi-hauteur, on voit que lorsque l'étendue spatiale du mode est trop importante ($>80\mu\text{m}$ pour une taille de plot de 150 μm), le minimum de réflectivité ne peut plus être atteint.

Nous avons considéré ici une longueur d'onde de 280 nm. Cependant, cette étude n'est pas restreinte à l'ultraviolet. En effet, une finesse F imagée à 280 nm équivaut à une finesse $F \times 280/\lambda(\text{nm})$ imagée à λ . La faible longueur d'onde est ainsi favorable pour observer des effets liés à une forte finesse pour une faible étendue spatiale du mode.

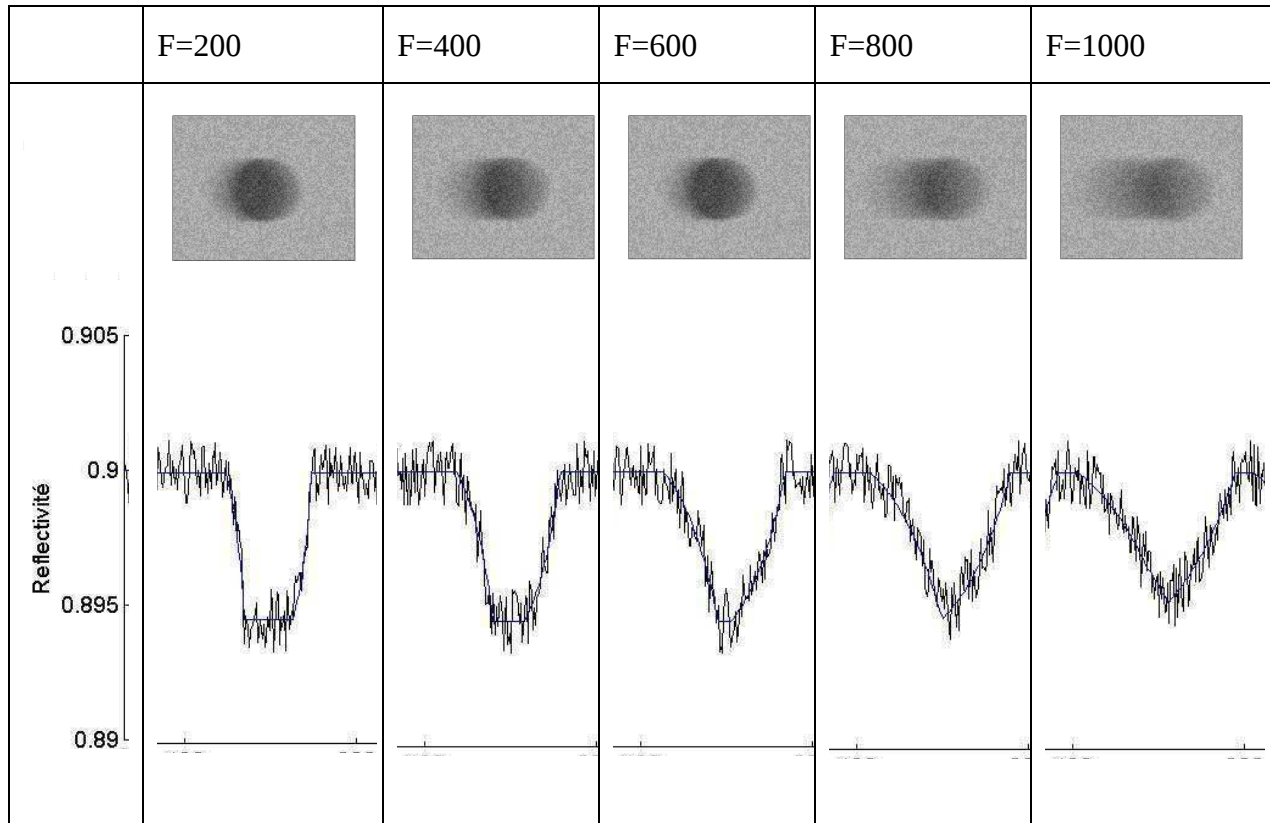


Figure 4.11 : Image d'un plot de $150\ \mu\text{m}$ de diamètre simulé pour différentes finesses, à la longueur d'onde de $280\ \text{nm}$. L'étendue spatiale du mode est proportionnelle à la longueur d'onde. Cette longueur d'onde est donc favorable pour l'étendue spatiale, et donc la résolution obtenue en imagerie. De manière à observer uniquement l'étendue spatiale du mode, le contraste est identique sur chacune des figures. Tout comme l'axe des graphiques, l'échelle de gris utilisée ici est $[0.89 ; 0.905]$

IV - Conclusion

L'intégration sur le domaine $\Delta\lambda = 10\ \text{nm}$ permet d'améliorer le seuil de détection d'un facteur 3.5 par rapport à une intégration sur $1.5\ \text{nm}$ pour un temps d'intégration de 1 seconde. Pour gagner un tel facteur une moyenne sur $3.5^2=12.25$ serait nécessaire afin d'obtenir le même seuil de détection. Ceci correspond à 12.25 secondes par image, ce qui semble trop long pour les applications biologiques. L'obtention d'un éclairage pré-dispersé a déjà été développée pour des applications de spectroscopie. Ici, nous associons une dimension d'imagerie à ce dispositif. Les éléments optiques permettant d'obtenir une telle pré-dispersion ont pu être discutés, ainsi que de premières idées de montage. Nous avons ensuite illustré le gain en rapport signal/bruit en simulant des images. Ceci nous a permis de discuter l'étendue spatiale du mode, proportionnelle à la finesse de la résonance et à la longueur d'onde. De fortes

finesses correspondent à une étendue spatiale du mode plus grande, et donc une meilleure interaction avec l'élément biologique. Ceci est cependant incompatible avec une bonne résolution spatiale en imagerie. Un nombre N de pixels exploitables permet d'augmenter notre sensibilité par un facteur $\sqrt{N}$. En ce qui concerne l'intégration sur la résonance, celle-ci permet des gains en signal et rapport signal/bruit importants. Ceci est particulièrement intéressant dans le domaine ultraviolet, où les composants actuellement disponibles offrent de faibles flux. Dans un domaine où les temps d'acquisition et la sensibilité sont des critères essentiels, ces améliorations peuvent être déterminantes.

Références:

- [Brazas, 1995, a] J.C. Brazas, L. Li, “Analysis of input grating couplers having finite lengths” *Applied Optics*, Vol.34: 3786-3792, 1995.
- [Brazas, 1995, b] J.C. Brazas, L. Li, “A method for achromatically coupling a beam of light into a waveguide” *U.S. patent* 5: 420,947, 1995.
- [Cottier, 2003] K. Cottier, M. Wiki, G. Voirin, H. Gao, and R. E. Kunz, “Label-free highly sensitive detection of (small) molecules by wavelength interrogation of integrated optical chips” *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 91 (1-3): 241-251, 2003.
- [Hetherington, 1993] D.L. Hetherington, R.K. Kostuk, and M. Gupta, "Dispersion compensation for an integrated optic grating coupler utilizing a transmission volume hologram" *Applied Optics*, Vol. 32: 303-308, 1993.
- [Mendes, 1995] S.B. Mendes, L. Li, J.J. Burke, J.E. Lee, and S.S. Saavedra, "70-nm-bandwidth achromatic waveguide coupler" *Applied Optics*, Vol. 34: 6180-6186, 1995.
- [Mendes, 1997] S.B. Mendes, “Broadband attenuated total reflection spectroscopy in the optical waveguide regime” Ph.D. dissertation, University of Arizona, 1997.
- [Palmer, 2005] C. Palmer, “Diffraction Grating Handbook”, 6th edition, Newport Corporation, 2005.
- [Parriaux, 1998] O. Parriaux, and G.J. Veldhuis, “Normalized analysis for the sensitivity optimization of integrated optical evanescent-wave sensors” *Journal of Lightwave Technology*, Vol. 16 (4): 573-582, 1998.
- [Spaulding, 1991] K.E. Spaulding, and M. Morris, “Achromatic Waveguide Input/Output Coupler Design” *Applied Optics*, Vol. 30: 1096-1112, 1991.
- [Spaulding, 1992] K.E. Spaulding, and M. Morris, “Achromatic waveguide couplers” *Journal of Lightwave Technology*, Vol. 10: 1513–1518, 1992.
- [Strasser, 1994] T.A. Strasser, and M.C. Gupta, “Grating coupler dispersion compensation with a surface-relief reflection grating” *Applied Optics*, Vol. 33: 3220-3226, 1994.
- [Robin, 2009] K. Robin, J.L. Reverchon, A. Brignon, L. Mugherli, M. Fromant, P. Plateau, and H. Benisty, “Contrast Enhancement of UV Absorption and Improved Biochip Imaging” *Conference on Lasers and Electro-Optics/International Quantum Electronics Conference, Optical Society of America*, paper CMG5, 2009.

[Walker, 1996] D. Walker, X. Zhang, P. Kung, A. Saxler, S. Javadpour, J. Xu, and M. Razeghi “AlGaN ultraviolet photoconductors grown on sapphire” *Applied Physics Letters*, Vol. 68: 2100-2101, 1996.

Conclusion

Chacun connaît l'ampleur des développements actuels des nanotechnologies et des biotechnologies, dans lesquels s'inscrit à sa façon le présent mémoire. Le but de ce travail était d'étudier le potentiel de l'imagerie de biopuces dans l'ultraviolet : dans ce domaine, le contraste d'absorption constitue une originalité d'intérêt pour des détections fiables et qu'on peut espérer plus sélectives que pour le contraste d'indice. La courte longueur d'onde permet aussi d'être plus sensible à des variations représentant de faibles épaisseurs. De plus, l'ultraviolet est une "nouvelle frontière" de la photonique, ainsi qu'en témoigne l'arrivée des DELs et des détecteurs matriciels AlGaIn.

Dans ce contexte, trois acteurs m'ont permis de concrétiser et quantifier ce potentiel, avec leurs apports respectifs : TRT dans les nanotechnologies et la détection AlGaIn, IOGS pour les aspects optiques et le renforcement de l'interaction lumière-matière, et le laboratoire de Biochimie, pour la mise en œuvre contrôlée de protéines sur les biopuces. J'ai pour ma part porté les diverses étapes qui ont permis de concrétiser ce potentiel, tant dans la modélisation électromagnétique, que dans la mise en œuvre sur tout son versant "technologique" en participant à la fabrication et la caractérisation des puces, puis dans les montages, les mesures et leur interprétation.

La première étape de ce travail a ainsi consisté en la caractérisation combinée du montage et de biopuces les plus simples, à savoir des puces multicouches. Avant la mise au point du protocole biologique, l'amplification du contraste a été étudiée en utilisant un absorbant modèle : le dioxyde de titane. Les capacités d'imagerie d'absorption dans l'ultraviolet étant démontrées, nous avons ensuite pu réaliser des mesures d'imagerie UV avec des espèces biologiques. Dans cette étude, nous avons utilisé une protéine modèle, la méthionyl-ARNt synthétase. L'absorption dans l'ultraviolet étant une propriété générale des molécules biologiques, ces résultats sont généralisables à d'autres protéines ainsi qu'à la détection de l'ADN, encore plus absorbant dans l'UV.

Les contrastes se sont montrés conformes à ce qui était attendu pour une monocouche de protéines d'absorption en transmission de l'ordre de 10^{-3} . Nous avons pu analyser les effets combinés d'absorption et déphasage sur le contraste de manière théorique, et interpréter les contrastes obtenus en imagerie UV. L'amplification de contraste d'absorption a été modélisée

dans une approche perturbative permettant de mettre en évidence les interactions avec le champ local. Les résultats sur l'amplification de contraste obtenus dans cette modélisation simple se sont montrés très proches de la variation de réflectivité induite par l'absorbant calculée exactement à partir des équations de Maxwell. L'amplification de contraste obtenue pour les puces silice/silicium est ainsi d'un facteur 4.

L'étude sur les structures multicouches nous a aussi permis de mettre au point les traitements d'image adaptés à des détecteurs encore en cours d'évolution. Le passage d'un détecteur linéaire à bruit très important (temps d'acquisitions pour une image de 5h pour pouvoir moyenner suffisamment) à un détecteur bidimensionnel a permis de faciliter les acquisitions (quelques secondes) puis le traitement des images.

Ayant mesuré sans surprise que sur ces puces quart d'onde, les contrastes induits par une monocouche de protéine sont très faibles (du même ordre de grandeur que le bruit de notre dispositif optique), une *étude électromagnétique* a permis de définir des structures permettant d'exalter le contraste d'absorption en suivant la stratégie du réseau résonnant, encore peu exploitée en combinaison avec l'imagerie. Pour notre application d'imagerie bidimensionnelle, nous avons exploité la direction des ordres de diffraction -1 et 0 pour réaliser les images, et montré que l'ordre -1 , peut être imagé à des angles proche de la normale donc sans besoin excessif de profondeur de champ. L'étude électromagnétique a été réalisée par des modélisations basées sur des matrices de diffusion.

Dans la stratégie du réseau résonant, l'augmentation du contraste résulte du renforcement des interactions entre le champ électrique local à la surface de la puce et l'élément biologique. Les biopuces avec leur "spots" consistent en des réseaux diélectriques résonants de grande dimension, permettant ainsi le couplage puis le guidage de l'onde à proximité des éléments biologiques pour induire une forte interaction. L'étude de la répartition spatiale du champ a permis de confirmer et mieux comprendre les interactions conduisant à de fortes variations de contraste. Nous avons aussi pu mettre en évidence le rôle de l'absorption et de la partie réelle de l'indice optique, le contraste obtenu résultant d'une combinaison des deux effets. L'exaltation du contraste d'absorption obtenu pour ces premières structures est voisine de -50 en considérant des résolutions angulaires et spectrales raisonnables pour la mise en œuvre expérimentale. En définissant une structure résonante de manière à exploiter les deux effets d'indice et d'absorption, et en appliquant les techniques de traitement d'image et moyennes

habituelles dans le domaine des biopuces, les sensibilités obtenues sont de l'ordre de 10 pg/mm^2 .

L'influence de la finesse et de la résolution angulaire et spectrale de la détection a aussi pu être discutée. Une forte finesse permet en théorie d'avoir une meilleure sensibilité mais elle entraîne aussi une efficacité de diffraction plus fine spectralement et angulairement, et donc correspondant à moins de signal utilisable si l'on part d'une source large bande. En ce qui concerne la finesse, nous avons aussi pu discuter son influence sur l'étendue spatiale du mode, et sur la résolution spatiale des images. Ainsi, pour des finesse supérieures à 800, et des spots de $150 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre imagés à la longueur d'onde de 280 nm , l'étendue spatiale du mode est de l'ordre de grandeur du diamètre du spot. Ce qui constitue un seuil rédhibitoire. Des plots de taille supérieure doivent donc être envisagés, mais un tel choix semble contraire aux désirs de miniaturisation des dispositifs. L'étendue spatiale du mode étant proportionnelle non seulement à la finesse mais aussi à la longueur d'onde, le domaine UV reste toutefois privilégié pour combiner d'assez hautes finesse avec une résolution spatiale décente de l'image.

Le niveau de signal a aussi été étudié. Nous avons discuté le rapport signal sur bruit et les temps d'acquisitions permis par les composants UV actuellement développés. Pour l'imagerie en condition résonante, un temps d'acquisition de l'ordre de 1 seconde doit être utilisé pour utiliser la capacité du détecteur si l'on considère une finesse $F \sim 200$ (montage LED UV associée à détecteur AlGaN).

Comme détaillé dans le chapitre 4, et, à notre connaissance, de façon innovante en imagerie, une intégration du signal sur toute la branche résonante de la dispersion du mode guidé $\omega(k)$, obtenue en pré-dispersant l'éclairage, doit permettre un fort signal, donc un gain substantiel en fréquence d'acquisition ou en rapport signal sur bruit. Il devient alors possible de bénéficier de tous les photons utiles d'une source large comme une DEL UV pour l'imagerie en conditions résonantes.

Prenant en compte les résultats des simulations électromagnétiques, j'ai ensuite pris en charge la *fabrication des biopuces* au sein de la plateforme technologique. J'ai ensuite caractérisé les échantillons, en utilisant des techniques telles que l'ellipsométrie, la caractérisation MEB, et la caractérisation AFM. En effet, seule une caractérisation fine de la structure permet un retour vers la modélisation théorique, essentielle pour interpréter les résultats obtenus. Prenant

en compte ces éléments, la caractérisation spectroscopique de type $(\theta, 2\theta)$ s'est trouvée en très bon accord avec les résultats modélisés pour cette structure fabriquée.

Les résultats obtenus en imagerie sur réseau de diffraction se sont aussi montrés très conformes à ce qui était attendu. Enfin, les dépôts biologiques réalisés par le laboratoire de biochimie ont permis de valider l'application de cette technique à la détection de protéines. La détection de l'ADN est aussi optiquement validée a fortiori, puisqu'elle présente une absorption massique d'un ordre de grandeur supérieur.

Ainsi, au cours de cette thèse nous avons pu démontrer la validité de l'imagerie dans l'ultraviolet pour la biodétection. L'imagerie sur réseaux de diffractions nous semble prometteuse, facilitée notamment par les degrés de liberté sur la longueur d'onde et sur la géométrie de la structure. Les résultats présentés ici dans le cadre de l'imagerie dans l'ultraviolet ne se limitent pas à ce domaine de longueur d'onde et pourraient ainsi voir d'autres développements. Le domaine ultraviolet permet par contre de bénéficier de la courte longueur d'onde (le rapport n_{eff}/λ étant favorisé) ainsi que des propriétés d'absorption. Ce domaine de longueur d'onde est aussi favorable pour réduire l'étendue spatiale du mode guidé résonant, et donc la résolution en imagerie dans cette stratégie. L'évolution rapide des technologies de l'ultraviolet devrait rapidement conduire à une diminution du temps d'acquisition et une augmentation de la résolution des images.

Les perspectives directes de cette thèse poussent d'abord vers des expériences similaires en solution. De meilleurs contrastes sont attendus, du fait de la localisation plus favorable du champ électrique du côté solution de l'interface. Les structures définies doivent être légèrement adaptées aux expériences en solution. La compatibilité de notre dispositif avec des expériences en solution dans une cuve en quartz pour l'imagerie, et en mettant une lame de quartz à la surface de la puce pour la caractérisation spectroscopique a déjà été démontrée. Ainsi, le travail réalisé ici ouvre directement sur des expériences biologiques de visualisation d'interaction moléculaires en temps réel. Pour l'aspect biologique, les premières expériences à réaliser consisteront très probablement à étudier les interactions de l'ARN de transfert avec notre protéine modèle.

Notre étude nous a enfin permis de jauger la distance qui sépare un concept et un système, même au stade du prototype de laboratoire. A l'inverse, nous pensons avoir montré comment la physique dimensionne les éléments cruciaux de la biopuce au sein du système considéré.

Avoir bénéficié de la mise en œuvre contrôlée de protéine a enfin été un élément majeur pour crédibiliser nos études et concrétiser le maillon crucial entre les technologies génériques des micro et nano-structures d'une part et les biopuces d'autre part.

Annexe A :

Dispositif de détection

Le dispositif utilisé est constitué d'une source Xénon, la biopuce, ainsi qu'un détecteur AlGaIn. La source choisie est une source Xénon continue, de marque OSRAM (Xenon Short Arc XBO 75W/2 OFR) et de puissance 75 W. Elle permet d'obtenir une source de forte puissance, de bande spectrale plus large et plus homogène que les DELs UV. Les détecteurs utilisés sont des détecteurs AlGaIn développés à Thales Research and Technology. Les premiers détecteurs utilisés au cours de cette thèse étaient des détecteurs linéaires de 300 pixels au pas de 26 μm [Mazzeo, 2006]. Une translation de l'échantillon était alors réalisée entre chaque image afin de reconstituer l'image de la puce. Les progrès réalisés ont abouti à des détecteurs matriciels de format 320×256 de pixels de 30×30 μm^2 [Reverchon 2009]. Ces derniers permettent de faire l'image de l'ensemble de la puce de manière simultanée, d'où des gains de temps d'acquisition, mais aussi des facilités de réglages non négligeables permises par la vision 2D. Pour l'imagerie, nous choisissons un montage en réflexion, car les matériaux et supports transparents de qualité de surface et de planéité suffisantes sont rares. La biopuce est donc conçue en conséquence.

➤ Eclairage

Afin d'obtenir un éclairage optimal, une configuration de Köhler est choisie. La configuration de Köhler permet d'obtenir un éclairage homogène de l'échantillon. Dans cette configuration, l'image de la source n'est pas superposée à l'image de l'échantillon, ce qui permet d'éviter de refaire l'image de la source sur le détecteur. Ce type de configuration d'éclairage est classiquement utilisé en microscopie.

Nous donnons Figure A.1 un schéma de cette configuration. La source est placée au foyer d'une première lentille de collection L_1 de distance focale 5 cm, suivie d'une seconde lentille permettant de focaliser la lumière sur le diaphragme d'ouverture du condenseur noté L_2 sur la Figure A.1. Un diaphragme intermédiaire noté D_1 permet de contrôler la taille du champ éclairé sur l'objet, et ainsi de limiter la lumière parasite.

Le diaphragme D_2 est au foyer d'une lentille de grande focale $f=20$ cm. Le diaphragme a pour diamètre d_2 . L'ouverture angulaire de l'éclairage sera alors donnée par $\Delta\theta=d_2/f_2$. Ainsi, pour un diamètre $d_2=1$ mm, on aura une ouverture angulaire de 5 mrad, soit 0.3° . Cette ouverture angulaire est critique pour la mise en œuvre des puces avec guide d'onde et réseau de couplage.

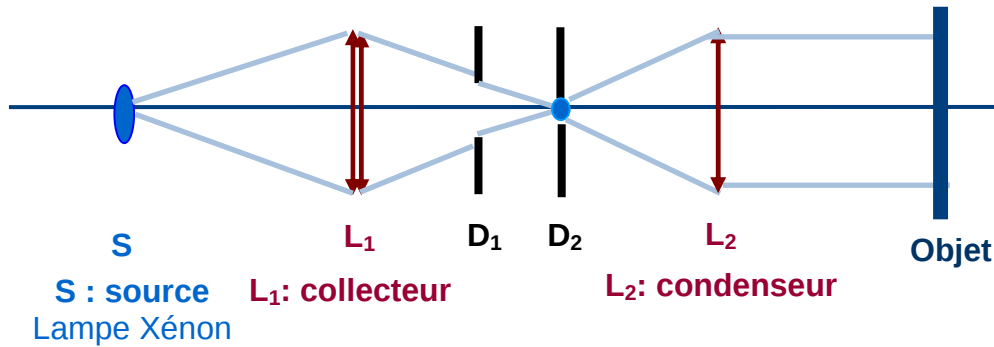


Figure A.1 : Configuration Köhler utilisée pour l'éclairage

➤ Optique d'imagerie

Afin d'obtenir de bonnes performances d'imagerie, on s'inspire d'un microscope à configuration infinie. La Figure A.2 représente la configuration utilisée pour l'imagerie. L'objet est placé dans le plan focal de l'objectif, qui projette l'image à l'infini. On place ensuite une lentille de tube, qui va permettre de refocaliser l'image sur le détecteur. Dans cette configuration confocale, on obtient alors une image grandie de l'objet, dont le grandissement

est donné par $G = \frac{f_{tube}}{f_{obj}}$. L'objectif de marque Olympus est choisi à une distance focale de

43 mm, et une distance de travail de 19 mm. Il est initialement dédié à l'usinage laser à 193 nm et n'est donc pas optimisé pour l'imagerie et la correction d'aberration spatiale. La lentille de tube est une lentille en silice fondue de distance focale 100 mm (référence LB4941 de Thorlab focale donnée pour 588 nm). Le grandissement du système est donc de 2.3.

➤ Résolution

L'ouverture numérique de l'objectif choisi est de 0.1. Elle est donnée par $NA = n \sin(\alpha)$, où n désigne l'indice optique du milieu entre l'objet et la première lentille. L'ouverture angulaire de l'objectif a par conséquent une valeur de 11.4° . L'ouverture numérique détermine aussi le pouvoir de résolution r calculée par le critère de Rayleigh : $r = \frac{1.22\lambda}{2NA}$. On obtient ainsi une valeur de $1.6 \mu\text{m}$ à 260 nm , et $1.7 \mu\text{m}$ à 280 nm . Avec un grandissement de 2.3, la valeur correspondante sur le détecteur est respectivement de $3.7 \mu\text{m}$ et $3.9 \mu\text{m}$ respectivement. En comparaison à une taille de pixel de $30 \mu\text{m}$, la diffraction n'est donc pas un facteur limitant pour la résolution de l'image.

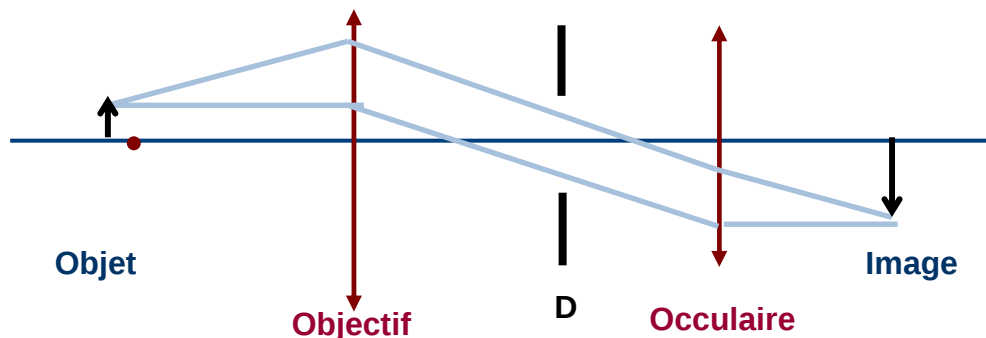


Figure A.2 : Configuration d'imagerie conjugué-conjugué

➤ Détecteur

Le détecteur présenté ici est un détecteur matriciel AlGaIn. Son format est de 320×256 pixels, au pas de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. Il a été développé pour présenter une réponse piquée de 260 à 280 nm en étant le plus insensible possible aux autres longueurs d'onde. La longueur d'onde de coupure peut être adaptée en fonction de la composition des couches du détecteur, entre 360 nm pour le GaN et 200 nm pour l'AlN. Ici, le taux d'aluminium est de 45%, ce qui permet une réponse centrée à 280 nm . La Figure A.3 donne l'empilement des couches du détecteur. L'empilement des couches a été étudié pour éviter les fissures et limiter les défauts et dislocations dans la structure.

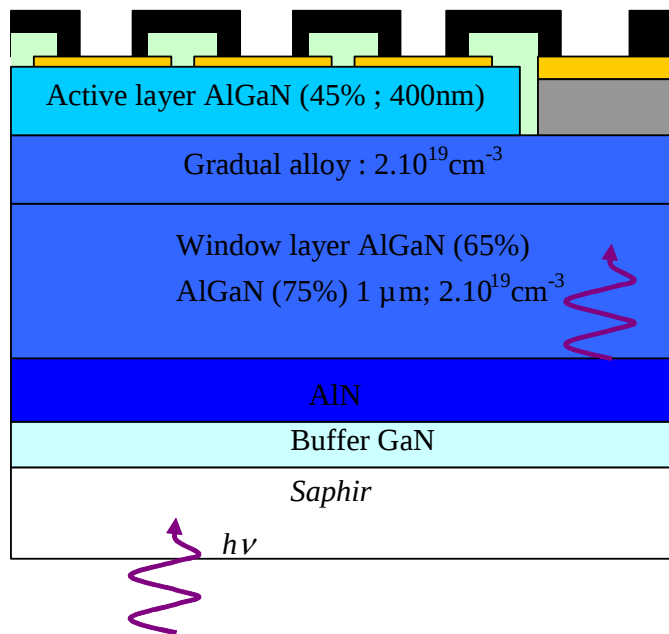


Figure A.3 : Structure du détecteur basée sur des photodiodes Schottky.

Ces détecteurs sont basées sur une architecture de photodiode Schottky (semi-conducteur avec 2 contacts métal-semi-conducteur : un contact ohmique et un contact Schottky à l'origine de la zone de charge d'espace dans laquelle le photocourant est formé).

Il s'agit d'une technologie dite hybride pour laquelle une matrice de photodiodes AlGaN est hybridée à un multiplexeur conférant à l'ensemble toutes les fonctionnalités liées à l'imagerie. Le circuit de lecture est un circuit d'Indigo Systems de référence ISC9809. Les étapes de fabrication de ce détecteur sont présentées Figure A.4 (a). La première étape est l'épitaxie par jet moléculaire des différentes couches de la structure donnée Figure A.3, sur substrat saphir transparent en UV [Grandjean 1997]. De telles structures ont également été obtenues en phase vapeur par MOCVD [Omnes, 1999]. Les plaques sont ensuite découpées avant d'être hybridées au circuit de lecture par une étape dite « flip-chip ». Les contacts sont réalisés par des billes d'indium. La maîtrise de cette étape est délicate. Le capteur peut ensuite être intégré (Figure A.4(b)) et associé à une optique d'imagerie telle que présentée ci-avant.

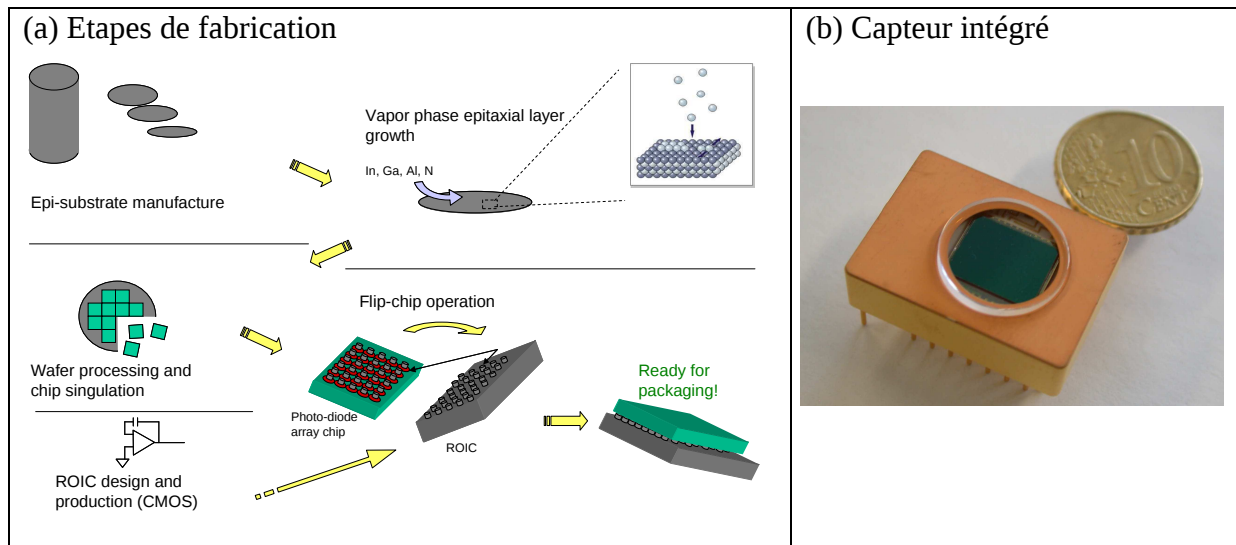


Figure A.4 : (a) Etapes de fabrication du détecteur et (b) capteur intégré

➤ Bruit du dispositif

La limite de détection est limitée par le bruit, et nous présentons ici les différentes sources de bruit de notre montage.

Une première limitation pour détecter de très faibles contrastes peut être la numérisation. Dans notre cas, la conversion analogique se fait au niveau de la carte d'acquisition, qui nous permet d'obtenir des images sous un format de 14 bits (14532 niveaux de gris). Ainsi, le signal n'est pas limité par le bruit de conversion.

Le bruit sur une mesure peut être décomposé en plusieurs contributions.

Le **bruit de photons** est intrinsèque à la source. Il est égal à la racine carrée du nombre de photons reçus. La capacité du détecteur est de 170000 électrons. Pour un remplissage de la capacité du détecteur de 90% (153000 électrons), le bruit photonique (ramené en nombre d'électrons après prise en compte du rendement quantique) est de 391 e-.

Les différentes contributions du bruit provenant du détecteur sont le bruit de lecture, le bruit thermique, le bruit de grenaille (shot noise), le bruit en $1/f$, et le bruit de génération-recombinaison.

Le **bruit de lecture** est relié à au vidage de la capacité d'intégration lors de la lecture du courant intégré et mesuré. Il s'agit d'un bruit thermique en $\sigma^2 \sim kTC$. Auquel on doit rajouter

le bruit de commutation tout au long de la chaîne de mesure. Le bruit de lecture observé est de 40 électrons pour le circuit de lecture seul et de 120 à 170 électrons après hybridation : la capacité électrique de la photodiode est à l'origine de cet excès [Reverchon, 2009].

Le **bruit thermique** (aussi appelé bruit de Johnson-Nyquist) résulte de l'agitation thermique des porteurs de charge, qui permet aux électrons d'atteindre des états intermédiaires d'où ils vont être émis dans la bande de conduction. La déviation standard du courant correspondant est donnée par : $\sigma_i^2 = 4 k_B T / R \times \Delta f$, où k_B est la constante de Boltzmann ($k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$), R est la résistance du détecteur en ohms, et Δf la bande passante considérée. Avec des photodiodes basées sur des semi-conducteurs à grand gap, $R > 10^{16} \Omega$, le bruit de Johnson est inférieur à $10^{-18} \text{ A/Hz}^{1/2}$ ou 70 électrons pour un temps d'intégration de 10 msec.

Le **bruit de grenaille (shot noise)** provient des fluctuations du nombre de porteurs franchissant une barrière de potentiel. En l'occurrence la barrière Schottky. Il est dû à la nature discrète du courant électrique, dans laquelle les porteurs de charge suivent une distribution de Poisson.

La densité de courant résultante est donnée par : $\sigma_i^2 = 2qI\Delta f$.

Le **bruit rose**, ou bruit en $1/f$ a des origines variées. Il peut être dû à des impuretés dans les matériaux, qui libèrent aléatoirement des porteurs de charges, ou bien à des recombinaisons électrons/trous parasites, etc. Sa densité de courant standard est donnée par : $\sigma_i^2 = \beta I^2 / f \times \Delta f$, où f est la fréquence de mesure, β un paramètre caractéristique de la structure dont la relation avec les paramètres physiques des semi-conducteurs est mal expliquée, mais dont la modélisation repose sur la distribution des défauts dans la bande interdite.

Le **bruit de génération recombinaison** est dû aux fluctuations sur le nombre de porteurs du semi-conducteur, on peut citer les processus de génération et de recombinaison à partir de pièges ou vers des pièges situés dans la bande interdite du semi-conducteur ou en surface. Ce sont également des processus de Poisson sans corrélation entre événements. Dans un photoconducteur, on peut considérer ce bruit comme le bruit de génération ajouté au bruit de recombinaison, le tout amplifié par le gain de photoconduction g .

Ces contributions sont liées au temps de pose. Il n'est pas possible d'en déterminer leur valeur de manière séparée. Les différentes contributions ne peuvent être évaluées séparément. Pour un temps d'intégration de 10 msec, la mesure de la totalité des contributions du bruit du détecteur donne une valeur totale de 170 électrons. Pour un remplissage de la capacité du

détecteur de 90% (153000 electrons), le bruit photonique est de 391 e-, et est donc la contribution dominante.

Pour un temps d'intégration de 10 msec, on aura alors un rapport signal sur bruit de 360, soit un contraste minimum de 0.28%.

➤ Limite de sensibilité

La limite de sensibilité pour un temps d'intégration de 10 msec et un remplissage de 90% de la capacité d'intégration du circuit de lecture, le contraste minimum détectable est de 0.28%. Afin d'augmenter la sensibilité, on moyenne sur plusieurs pixels et plusieurs images successives. Ainsi, en moyennant sur 10 images, on peut diminuer le seuil de détection à 0.088%. Le nombre de pixels par spots est ici de ~ 30 (diamètre de 150 μm avec un grandissement $\times 2.3$ en ne prenant pas en compte les pixels du bord, non entièrement recouverts par la protéine). Le seuil de détection est alors de 1.6×10^{-4} . L'absorption d'une monocouche d'ADN ou de protéine pour les densités surfaciques typiques correspondant à des monocouches est de l'ordre de 10^{-2} - 10^{-3} . Une amplification du contraste par un facteur de l'ordre de 50 devrait donc permettre d'avoir des seuils de détection de $\sim 13 \text{ pg/mm}^2$ pour les protéines, et de $\sim 1.3 \text{ pg/mm}^2$ pour l'ADN. Le seuil de sensibilité est ici diminué par une évaluation analogue à ce qu'on trouve en imagerie par plasmon de surface, où après moyennage pour obtenir un seuil de détection de 2×10^{-4} de variation de réflectivité permet une limite de sensibilité de 4 pg/mm^2 . Notons que le contraste dû à l'indice optique peut venir renforcer les variations de réflectivité attendues. Bénéficiant aussi de la courte longueur d'onde, nous pouvons potentiellement atteindre de meilleurs seuils de détection.

Références

- [Grandjean 1997] N. Grandjean, J. Massies, P. Vennéguès, M. Leroux, F. Demongeot, M. Renucci and J. Frandon, *Journal of Applied Physics*, Vol. 83, 1379, 1997.
- [Mazzeo 2006] G. Mazzeo, J.L. Reverchon, J.Y. Duboz, A. Dussaigne, “An AlGa_N Based Linear Array for UV Solar Blind Imaging from 240 nm to 280 nm”, *IEEE-Sensors-Journal*, Vol. 6(4): 957-63, 2006.
- [Omnes, 1999] F. Omnès, N. Marengo, B. Beaumont, Ph. De Mierry, E. Monroy, F. Calle and E. Muñoz, “Metalorganic vapour-phase epitaxy grown AlGa_N materials for visible-blind ultraviolet photodetector applications”, *Journal of Applied Physics*, Vol. 86, 5286, 1999.
- [Reverchon, 2007] J-L Reverchon, J.A. Robin J.P. Truffer, J.P. Caumes, I. Mourad, J. Brault, J.Y. Duboz, “AlGa_N-based focal plane arrays for selective UV imaging at 310nm and 280nm and route toward deep UV imaging” *Proc. of SPIE* N° 6744-94, 2007.
- [Reverchon, 2009] J-L Reverchon, K. Robin, S. Bansropun, Y. Gourdel, J.A. Robo, J.-P. Truffer, E. Costard, J. Brault, E. Frayssinet and J.-Y. Duboz, *EAS “Detector for astrophysics, workshop 2008”*, EDP Science Vol. 37, 2009.

Annexe B :

Detection of biological macromolecules on a biochip dedicated to UV specific absorption

Biosensors and Bioelectronics, Volume 24, Issue 6, 15 February 2009
K. Robin, J.L. Reverchon, L. Mugherli, M. Fromant, P. Plateau and H. Benisty



Detection of biological macromolecules on a biochip dedicated to UV specific absorption

Kristelle Robin^{a,*}, Jean-Luc Reverchon^a, Laurent Mugherli^b, Michel Fromant^b, Pierre Plateau^b, Henri Benisty^c

^a Thales Research and Technology, RD 128, 91767 Palaiseau Cedex, France

^b Laboratoire de Biochimie, Ecole Polytechnique, CNRS, 91128 Palaiseau Cedex, France

^c Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, Campus Polytechnique, RD 128, 91127 Palaiseau Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2008

Received in revised form 18 July 2008

Accepted 11 August 2008

Available online 27 August 2008

Keywords:

Specific biodetection

Label-free

Enhanced optical absorption

Ultraviolet imaging AlGaIn detectors

Methionyl-tRNA synthetase

ABSTRACT

This work describes an ultraviolet biosensing technique based on specific molecular absorption detected with a previously developed spectrally selective aluminum gallium nitride (AlGaIn) based detector. Light absorption signal of DNA and proteins, respectively at 260 nm and 280 nm, is used to image biochips. To allow detection of protein or DNA monolayers at the surface of a biochip, we develop contrast-enhancing multilayer substrates. We analyze them through models and experiments and validate the possibility of measuring absorptions of the order of 10^{-3} . These multilayer structures display a high reflectivity, and maximize the interaction of the electric field with the biological element at the chip surface. Optimization of the experimental absorption, which includes effects such as roughness of the biochip, spectral and angular resolution of the optics, illumination, etc., is carried out with an inorganic ultraviolet absorber (titanium dioxide) deposit. We obtained an induced absorption contrast enhanced by a factor of 4.0, conferring enough sensitivity to detect monolayers of DNA or proteins. Experimental results on an *Escherichia coli* histidine-tagged methionyl-tRNA synthetase protein before and after complexation with an anti-polyHis specific antibody validate our biosensing technique. This label-free optical method may be helpful in controlling biochip coatings, and subsequent biological coupling at the surface of a biochip.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

1.1. Label-free optical biosensors

Biosensors detect and quantify target compounds. They involve a biological molecule intimately connected to a transducer, which can be of diverse nature. For optical detection, fluorescent labels are often used to report binding events. However, labeling is expensive and time consuming. Moreover, hydrophobic fluorophores can cause false binding and lead to false positives. Thus, optical label-free biosensors are presently of foremost interest.

The most widespread label-free optical sensors exploit surface plasmon resonance (Smith and Corn, 2003). A drawback of this method is the metallic surface, which often induces non-specific interactions.

An alternative method is ultraviolet (UV) imaging. An advantage of UV imaging is the possible use of dielectric surface, to limit non-

specific interactions. Absorption of DNA and proteins at 260 nm and 280 nm is widely used to measure their concentration in solution. This absorption may also reveal biological compounds present at the surface of a substrate or a chip. To provide a good sensitivity and minimize UV illumination, the intrinsically weak optical contrast of surface absorption signal has to be optimized. This paper shows the feasibility of this approach, including optical, technological and biochemical aspects.

1.2. Absorption of DNA and proteins in UV

We start with a quantification of the useful DNA and protein absorption. To get rid of unwieldy size effects in molar absorption, we use mass absorption.

1.2.1. DNA absorption at 260 nm

Fig. 1(a) gives the absorbance spectra of the four nucleotides composing DNA (water, pH 7, Du et al., 1998). For an equimolar nucleotidic composition, absorbance peaks at a wavelength $\lambda = 260$ nm. For single-stranded DNA (ssDNA) specific absorption is $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 0.027 \text{ cm}^2/\mu\text{g}$ (300 mM potassium phosphate buffer, pH

* Corresponding author. Tel.: +33 1 69 41 58 01; fax: +33 1 69 41 57 38.

E-mail address: kristelle.robin@thalesgroup.com (K. Robin).

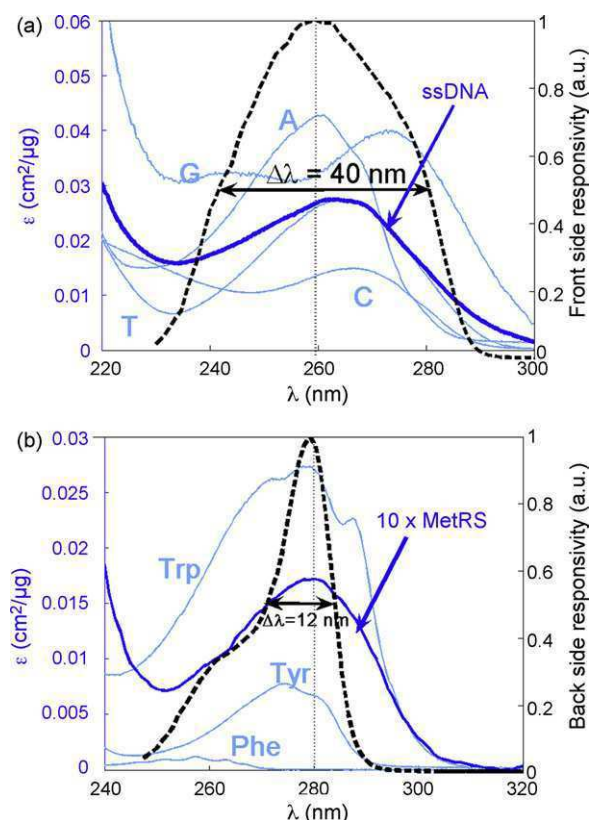


Fig. 1. (a) (solid line) Nucleotide and single stranded DNA absorption spectra, and (dashed line) responsivity spectra of the spectrally selective AlGaIn detector for front side illumination. (b) (solid line) Aromatic amino acid and MetRS absorption spectra, and (dashed line) responsivity of the detector for back side illumination.

7, Fasman, 1975). The absorbance A_λ is given by the Beer-Lambert law:

$$A_\lambda = -\log \left(\frac{I_\lambda}{I_{\lambda_0}} \right) = \epsilon_\lambda l c \quad (1)$$

with c the mass concentration in μg/cm³, l the path length in cm, I_{λ_0} and I_λ the intensities without and with absorber, and ϵ_λ the mass extinction coefficient at the wavelength λ in cm²/μg.

Considering $l = 1$ cm, we can express A_λ as a surface absorption related to the surface density lc . Typical densities of DNA probes lie from 2×10^{12} to 1.2×10^{13} molecules/cm² (Peterson et al., 2001). The absorbance values at 260 nm are given in Table 1. The target absorption ranges from 1.9×10^{-3} (70 bases, density 2×10^{12} molecules/cm²) to 7.9×10^{-2} (500 bases, density 1.2×10^{13} molecules/cm²).

1.2.2. Protein absorption at 280 nm

For a similar mass, protein absorption at 280 nm is roughly one order of magnitude smaller than that of DNA at 260 nm (depending on the amino acid sequence (Gill and von Hippel, 1989; Pace et al., 1995) and on the nucleotide sequence (Fasman, 1975)). Proteins

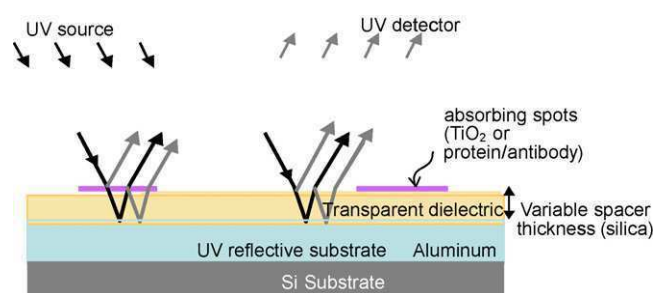


Fig. 2. Biochip and set-up.

absorb UV light in proportion to their aromatic amino acids content. This absorption is roughly centered at 280 nm. As an example, we consider here a histidine-tagged methionyl-tRNA synthetase (MetRS). The MetRS protein, whose $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ is 1.72×10^{-3} cm²/μg (Cassio and Waller, 1971), is used in the experiments of Section 3. Fig. 1(b) gives the experimental absorption spectrum of MetRS (20 mM potassium phosphate buffer, pH 8.5) and of the aromatic amino acids (measured in water, pH 7 for phenylalanine, and in 100 mM phosphate buffer, pH 7 for tyrosine and tryptophan (Du et al., 1998)).

In solution, the MetRS protein occupies a volume of $5 \text{ nm} \times 5 \text{ nm} \times 10 \text{ nm}$ (Mechulam et al., 1999). Thus, the minimum surface per one MetRS molecule is $5 \text{ nm} \times 5 \text{ nm}$, and consequently, the maximum density reached for a monolayer coverage, is 4×10^{12} molecules/cm², or $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. This yields an absorption in transmission of only $A_{280 \text{ nm}} = 0.73 \times 10^{-3}$, too small for standard measurement techniques and thus calling for enhancement methods. As an example, absorbance values at 280 nm of MetRS and anti-polyHis antibody (antiHis-Ab), whose $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ is 1.47×10^{-3} cm²/μg (see Section 2.3.3) are given in Table 1.

2. Materials and methods

We present the UV imaging setup, and evaluate its noise and instrumental resolution limitations. Design, fabrication and assessment of contrast enhancing biochips are then described, followed by biological assay preparation.

2.1. Imaging set-up

2.1.1. Reflection set-up

Experiments are based on a reflection set-up composed of a lamp with Köhler illumination, the sample and a camera. Köhler illumination avoids glare from the source, with a controlled illuminating flux (Murphy, 2001). The camera detector is a linear array, perpendicular to the set-up plane. Placing the sample on a translation stage, successive lines are acquired to reconstruct a full chip image. Fig. 2 gives a scheme of the set-up and the biochip.

2.1.2. Instrumental resolution

2.1.2.1. Objective: angular resolution. The Olympus objective numerical aperture is NA=0.1, corresponding to an angular

Table 1

Absorbance values of (a) single-stranded DNA (70 bases and 500 bases) at 260 nm and (b) MetRS and antiHis-Ab at 280 nm

Density (molecules/cm ²)	(a) DNA absorption, $A_{260 \text{ nm}} \times 10^3$		(b) Protein absorption, $A_{280 \text{ nm}} \times 10^3$	
	70 bases, 23 kDa	500 bases, 163 kDa	MetRS, 64 kDa	antiHis-Ab, 150 kDa
2×10^{12}	1.9	13.7	0.37	0.73
4×10^{12}	3.8	27.2	0.73	1.47
1.2×10^{13}	11.5	79.5	2.2	4.40

aperture $2\alpha = 11.4^\circ$, α being the half-cone angle. At $\lambda = 280$ nm, according to the Rayleigh criterion, this NA translates into an object plane resolution of $1.4 \mu\text{m}$. Given the detector pitch of $26 \mu\text{m}$ and a $\gamma = 3.8$ magnification providing a $26/3.8 = 7 \mu\text{m}$ resolution in the object plane, diffraction is by far not a limiting factor. Resolution would be increased by using a smaller pixel pitch or an objective with larger magnification.

2.1.2.2. Camera: spectral resolution. Our AlGaIn detector is a linear array of 300 pixels, with CCD readout circuits (Maezzo et al., 2006). Fig. 1(a) and (b) gives the spectral responsivity of the detector for a bias of 4 V, superposed to the biological absorption spectra. A detailed description of the internal structure of the pixel and of the spectral responses is reported in Maezzo et al. (2006). For front side illumination, the spectral responsivity is centered at 260 nm, and applies well to DNA assay (Reverchon et al., 2006). For back side illumination, the responsivity centered at 280 nm and applies better to protein assay. The spectral selectivity (40 nm for front side, 12 nm for back side) enables to measure the contribution around the absorption maximum, and to have a sensitive measure.

2.1.3. Noise effects on detection limit

As shown in Section 1.2, a monolayer of proteins induces a single-pass absorption of 10^{-3} . A limitation to detect such a low absorption is photon and electrical noise arising from the UV source and from the detector.

Concerning the illumination, the Xenon lamp displays a flash-to-flash output stability of about 3%. For a $\tau = 100$ ms integration time, at 200 Hz flash frequency, it causes a relative noise of $3\%/\sqrt{20} = 0.7\%$, reduced to 0.2% when further averaging over 10 frames. Limitation in sensitivity arises from different contributions in the noise of the photodiode array (Maezzo et al., 2006). The 7 mV electrical noise is not due to the detector itself, but to the readout and polarization circuitry. With an output saturation voltage of 7 V but an actual output of 5 V for convenience, the dynamic range ratio is about 700 (5 V/7 mV). Hence, a dynamic range ratio above 10^3 is possible by averaging a few successive images.

2.1.4. Non-uniformity correction

Non-uniformities among the responsivity of pixels are a severe problem in arrays of photodiodes. They result in a fixed-pattern “noise”, which needs to be corrected. Firstly, in the dark, a readout offset correction is realized separately on the two CCD circuits. Subsequently, a gain correction is carried out. To normalize the array, or “flatten it”, each pixel signal is divided by its corresponding gain. A gain calibration frame is obtained by Köhler illumination of a uniform sample. All subsequent frames are divided by this calibration frame, reducing the 5% pixel-to-pixel gain variation to an acceptable 0.6% variation.

2.1.5. Image conversion limitation

A required specification to detect minute contrasts (10^{-3}) is bit depth. Sensors used here have 12-bit (4096) analog-to-digital converters, so digitization noise is usually not an issue at the sensor level. Each line of the image is the average over at least 10 frames with a dynamical range growing from 12 to 16 bits (65536). Thus, the result is not limited by conversion noise.

2.2. Design and properties of specific slides

We describe here the design of the contrast-enhancing substrate which makes our biochip viable for detection of biological ultraviolet absorbers. The design uses the knowledge of the

electromagnetic field structure to get stronger electromagnetic interactions at the chip surface.

2.2.1. Basic design

The biochip is a UV reflective multilayer structure. It consists in a UV reflective metal, covered with transparent dielectric for both contrast enhancement and biocompatibility. The dielectric used here is silica, with index $n_d = 1.495$. The thickness e of the dielectric layer has to maximize the local electric field at the surface to enhance the absorption of the biological entity. It is well known that standing waves at normal incidence have antinodes spaced by a half wavelength optical thickness (the optical thickness is then just $n_d \times e$). Above a perfect metallic mirror, the first antinode lies at a quarter wavelength optical thickness. A basic normal incidence design thus consists in coating such an optical thickness above the metal, so that the biological entity is located at the antinode. For a perfect standing wave (doubled amplitude $1 + \sqrt{R} \cong 2$ at antinode, due to constructive interference (Seraphin and Bottka, 1965; Benisty et al., 1998)), absorption contrast is enhanced by a factor 4.

In practice, experiments differ from this model. First, at non-normal incidence, the optical path comprises a factor $\cos \theta'$ where θ' is the refracted angle in the dielectric, $\theta' = \arcsin(\sin \theta / n_d)$. For our case $\theta = 45^\circ$, $\theta' = 28^\circ$. Second, the metal has a penetration depth $\delta_{Al}(\theta, n_d)$, defining an effective plane inside the metal where the wave is apparently reflected (Bass et al., 2000). The more general quarter wave condition thus reads:

$$n_d e \cos \theta' + \delta_{Al}(\theta, n_d) = \frac{\lambda}{4} \quad (2)$$

The wave exponentially vanishes in the metal. The penetration depth δ_{Al} is quantitatively defined as the depth at which the squared electric field inside the metal falls to $1/e$ of its surface value (Bass et al., 2000). At normal incidence, its expression is $\delta_{Al} = \lambda / (2\pi k)$, where k denotes the imaginary part of the refractive index $\tilde{n}_{Al} = n + ik$. At $\lambda = 280$ nm, $\tilde{n}_{Al} = 0.23 + 3.36i$, corresponding to $\delta_{Al} = 13.3$ nm. In reality, due to the oxidation and roughness of the aluminum film (Smith et al., 1985), the optical penetration in the aluminum is deeper. This is modeled by an extra thin layer at the aluminum surface, defined in the Bruggeman method (Bruggeman, 1935; Stroud, 1998). This layer is composed of alumina and aluminum. The main trend induced by alumina inclusions is to increase the electric field penetration in the structure, and to diminish reflectivity.

2.2.2. Optical properties determination

The experimental optical properties such as reflectance, transmittance, absorbance are assessed by modeling the multilayer sample. Their optical response functions $F(\theta, \lambda)$ are calculated using IMD software (Windt, 1998). However, data are acquired in practice with limited angular and/or spectral resolution, possibly diminishing the contrast much as in two-wave interferometers, Michelson type or others. The resolution-limited values are taken into account by convolving the optical functions with a Gaussian of width $\Delta\theta$ for the angular resolution of the camera, and $\Delta\lambda$ for the sensitivity of the linear array.

The spectral resolution of our detector is $\Delta\lambda = 40$ nm for front side illumination centered at $\lambda = 260$ nm ($\Delta\lambda/\lambda = 15\%$), and $\Delta\lambda = 12$ nm for back-side illumination centered at $\lambda = 280$ nm ($\Delta\lambda/\lambda = 4.3\%$). The spectral responsivity mainly depends on the AlGaIn multilayer composition. In transparent dielectric of index n_d , the interference order m is given by $m = 2n_d e \cos(\theta')/\lambda$. For a nominal interference order, the absolute change in interference order is $0.15m$ for backside, and $0.043m$ for front side.

A full excursion of $\Delta m = 0.25$ is needed to diminish the antinode contrast by 10%, which happens for roughly $m = 2$ for front side, and

$m = 6$ for back side. Since our basic design works at $m = 0.5$, we have a large margin, and virtually retain 100% of the antinode effect.

A similar approach holds for the angular resolution. For our set-up, the angular variation being $\Delta\theta = 11.4^\circ$ around 45° in air, $\cos(\theta')$ spans the interval 0.63–0.77, causing a change in interference order of 0.2*m*. Consequently, the decrease in antinode contrast is less than 10% for our quarter wave design.

2.3. Chip fabrication and preparation

Calibration “bio”chips are first fabricated with a known inorganic absorber (titanium dioxide). Similar biochips are then functionalized, coated with MetRS and further complexed with an antiHis-Ab.

2.3.1. Slide fabrication and characterization

Aluminum is first deposited by thermal vacuum evaporation on a silicon wafer. Silica is next deposited by plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD) at 340°C . To obtain variable silica thicknesses on the same sample, successive masked etching are realized by reactive ion etching (RIE). The mask provides stripes of about 2 mm width for each thickness.

The structure is characterized experimentally by spectroscopic reflectometry (Cary spectrometer) and spectroscopic ellipsometry (UVISSEL from HORIBA Jobin Yvon). Models are crucial to spectroscopic ellipsometry data interpretation. Dispersion laws specific to our Al mirror (200 nm thick) are determined by measurements before silica deposition. To take into account its roughness and oxidation, the Al mirror is modeled by a bulk aluminum basis covered with an extra thin layer (3 nm) of effective medium defined in the Bruggeman approximation. With 41% of alumina and 59% of Al, the model fits the measured reflectivity (83% at 260–280 nm). Modeling is precious in understanding the different contributions to experimental contrast, notably through the knowledge of the exact reflectivity. Ellipsometric data after silica deposition are also consistent with the model.

2.3.2. Coating with inorganic absorber

For assessment of detection limits, small amounts of titanium dioxide are sputtered on the sample. Indeed, TiO_2 is strongly absorbent in the wavelength range of 260–280 nm (a 3-nm thick layer roughly yields a 25% absorption, measured with a Cary spectrometer). The sample is then covered with a layer of SPR 220 positive photoresist (Shipley) which is lithographically processed, to obtain spots of diameter 100 μm , with a 500 μm center-to-center distance (a typical pitch of biological spots on biochips). The sample is then ion-etched, before removing the photoresist with acetone. This provides a calibrated absorption, an essential data for further evaluation of biological results.

2.3.3. Biological coating of the sensor chip

A similar biochip is coated with the MetRS protein. The biochip is first covered with photoresist protecting the support, and lithographically processed to leave holes of the very same geometry as the TiO_2 spots (complementary geometry of the mask used for TiO_2), ready for chemical modification.

2.3.3.1. Production and purification of histidine-tagged methionyl-tRNA synthetase. An *Escherichia coli* histidine-tagged methionyl-tRNA synthetase (MetRS) was produced from a plasmid derived from pBSM547 (Mellot et al., 1989). The polyhistidine tag allows immunodetection of the MetRS with antiHis-Ab. By site-directed mutagenesis, the GCCTACTATG sequence encompassing the ATG start codon of methionyl-tRNA synthetase gene of pBSM547 was replaced by a GTCGAGTATGCCACATCACCATCACCAT sequence.

The obtained plasmid, named pBSM547-6His, was used to transform an *E. coli* strain JM101Tr (Hirel et al., 1988). Transformed cells were grown at 37°C in 500 mL of a culture medium (1.6% bacto-tryptone, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl) containing 80 μg of ampicillin/mL and 0.3 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside. When the optical density of the culture reached 2.8 at 650 nm, cells were harvested and disrupted by sonication as described in Mellot et al. (1989). Cell extract, diluted in 15 mM of a 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8) containing 300 mM NaCl, was applied on a Talon column (1 cm $\times$ 6 cm; Clontech Laboratories, inc.) equilibrated in the same buffer. Elution was carried out at a flow rate of 0.6 mL/min with a linear gradient of 0–250 mM imidazole in the same buffer (94 mM/h). The purified MetRS protein solution in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 8) containing 0.1 mM EDTA was brought to 70% ammonium sulfate saturation and kept at 4°C . Before use, enzyme aliquots were dialysed against 20 mM potassium phosphate buffer (pH 8.5).

2.3.3.2. Chemical modification of substrate. Chemical modification of surfaces was carried out by chemical vapour deposition of 3-aldehydopropyltrimethoxysilane (from United Chemical Technologies Inc.) at 50°C , after activation by Ar/O_2 plasma treatment with a Diener Electronic plasma cleaner (20% O_2 , 0.5 mbar, 100 W, 2 min). Slides were then heated at 100°C under vacuum for 1 h. The protecting photoresist was removed with acetone, leaving aldehyde-functionalised spots, which will react readily with protein amino groups.

2.3.3.3. Immobilisation of MetRS and complexation with antiHis-Ab. The biochip surface (36 mm²) was incubated at room temperature for 15 h by placing a coverslip over 1.5 μL of a buffered solution of 100 μM MetRS (20 mM potassium phosphate, 450 mM KCl, pH 8.5) containing 40 mM sodium cyanoborohydride (Sigma–Aldrich). A humidified atmosphere prevented evaporation of the liquid film between slide and coverslip, and sodium cyanoborohydride stabilized covalent binding by reducing Schiff bases.

Slides dedicated to UV detection of coated MetRS were washed at pH 8, with a solution containing 10 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl and 0.2% Triton X-100 (buffer A). Remaining slides, dedicated to UV detection of complexation with a specific antibody (antiHis-Ab) were passivated at room temperature for 15 h by placing a coverslip over 1.5 μL of an ethanolamine solution (100 mM ethanolamine, 40 mM sodium cyanoborohydride, 20 mM potassium phosphate, pH 8.5), washed with buffer A, incubated with Penta-His Alexa Fluor 647 conjugate (Qiagen, 1/2000 in buffer A) for 2 h and washed again with buffer A. Prior to imaging, all slides were soaked in deionized water and dried. According to literature, $\epsilon_{280\text{ nm}}$ of Immunoglobulin G is $1.4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\mu\text{g}$ (Pierce Biotechnology, 2004). This value must be increased by 5% to take into account the presence of Alexa Fluor 647 in the above conjugate (result not shown).

3. Results and discussion

Optimization of the set-up and biochip multilayer structure is first performed with TiO_2 . Then, experiments with proteins are carried out on biochips that showed the best surface absorption contrast. Thanks to contrast enhancement, we demonstrate that it is possible to image these protein spots.

3.1. Calibration: images with titanium dioxide spots

3.1.1. Images on variable dielectric thicknesses

Images assembled from line scans are made with the set-up presented in Section 2, providing the reflectivity map of the biochip.

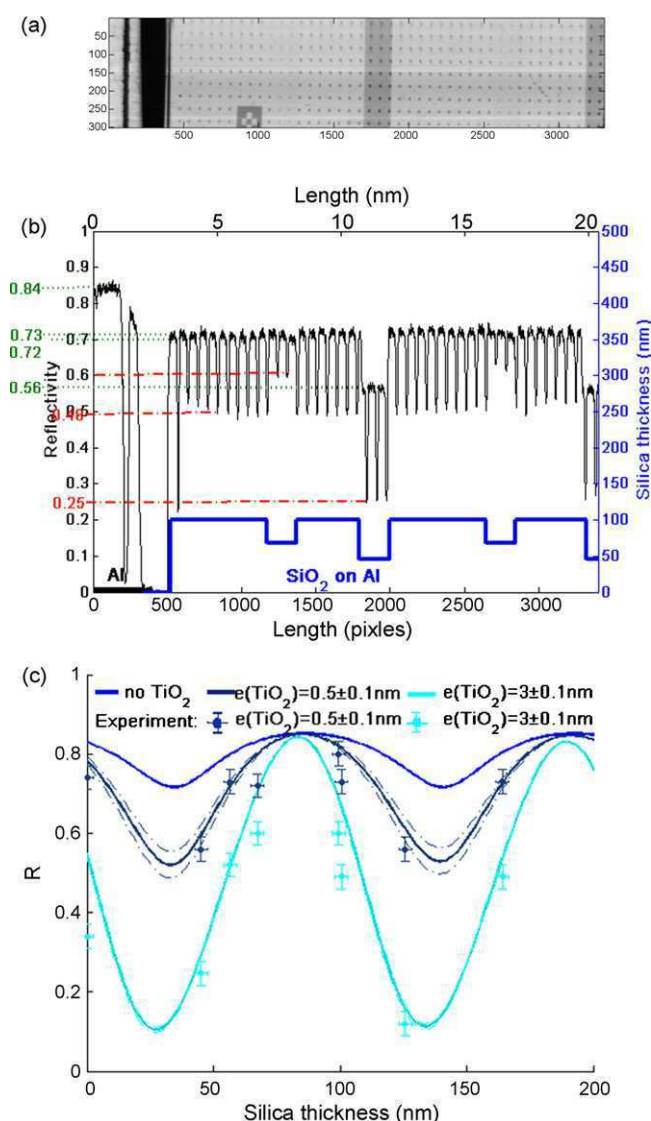


Fig. 3. (a) Image of a sample with TiO₂ spots on three different thicknesses of silica. On the left part of the image, a piece of raw deposited aluminum of reflectivity 83% is displayed. (b) Reflectivity profile along a line of TiO₂ spots: the absorption is enhanced for some silica thicknesses. (c) Experimental points (dots) obtained for eight thicknesses of the silica layer, inside the spots (3-nm thick TiO₂ layer) and outside the spots (0.5-nm thick TiO₂ layer). Results of the electromagnetic modeling (solid line) are superposed on the experimental points.

Fig. 3(a) displays the image obtained on a sample with three different thicknesses of silica on Al, covered with TiO₂ spots. In total, eight different silica thicknesses are obtained by combining several deposits and etching processes.

To determine the absolute reflectivity, measurements are normalized by using bare aluminum of known reflectivity (determined by spectroscopic reflectometry measurements). This piece of aluminum is at the left of the image displayed in Fig. 3(a). The profile along the long axis is given in Fig. 3(b). Fig. 3(c) shows the experimental reflectivity as a function of silica thickness e together with the simulations. The simulation curves are obtained including the extra 3 nm composite layer on Al described in Section 2.3. TiO₂ layer thickness is determined through transmission spectroscopic measurement and has a standard deviation of 0.1 nm. Due to instrumental characteristics and different deposit and etching process, silica thickness standard deviation is estimated to ± 2.5 nm. The reflectivity outside the lithographically defined spots reveals that

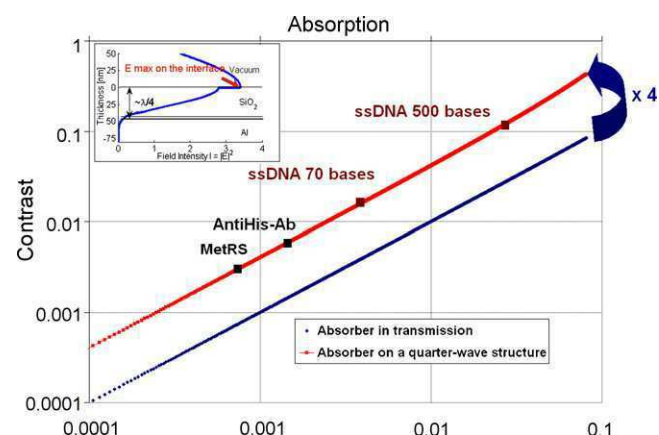


Fig. 4. Contrast in log scale of contrast absorption in transmission (blue diamonds) and absorption-induced reflectivity contrast on a quarter-wave spacer dielectric thickness (red squares). The quarter wave structure enables a contrast enhancement by a factor of 4. Calculated biological contrast of ssDNA, MetRS and antiHis-Ab (Table 1) are plotted for a density of 4×10^{12} molecules/cm². Inset shows the irradiance profile (square of the electric field) for quarter wave silica spacer at $\lambda = 280$ nm and $\theta = 45^\circ$. The electric field is maximal at the interface (whereas it would be zero for half-wave spacer). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3 nm-thick TiO₂ layer is not totally etched away: a 0.5-nm-thick layer still remains. The error in reflectivity is estimated to $\pm 3\%$, due to fabrication fluctuations and optical adjustment. For small local variation ΔR the error is then $(1 \pm 0.03) \times \Delta R$, and will not appreciably influence the determination of protein absorption in Section 3.2.

As expected, the TiO₂-induced contrast markedly depends on the silica thickness e : the absorption is higher (reflection minima are deeper) when the absorbent is at an antinode of the electric field. The data are consistent altogether. Notably the TiO₂ data are validated as well, so that the reflection changes vs. absolute single-pass absorption can be calibrated.

3.1.2. Sensitivity

We compare here the contrast obtained as a function of silica thickness e , and more precisely for quarter-wave and half-wave thicknesses. In Fig. 4, we plot on a log scale the absorption-induced reflectivity contrast $\Delta R/R$. For a quarter-wave silica layer, the irradiance antinode is located just at the air-silica interface. The experimental reflectivity of the quarter-wave silica layer structure being $R = 0.72$, the contrast is enhanced by a factor of $4.0 \equiv (1 + \sqrt{R})^2 / \sqrt{R}$ for weak absorption (Seraphin and Bottka, 1965; Benisty et al., 1998). For biological elements displaying an absorption in the per mil order, such an enhancement is obviously interesting. This quarter-wave situation is therefore chosen to image proteins bound to the biochip surface.

3.1.3. Resolution and dynamic

By analyzing the set-up imaging properties, we found that it has a modest spatial frequency bandwidth: for example the relative decrease at sharp edges is 15% per pixel, 6–7 pixels being needed for full decrease. The pixel size is 26 μm , and the magnification is $\gamma = 3.8$. It corresponds to a low modulation transfer function (MTF) at pixel frequency $19.2 \times 3.8 = 73$ lines/mm in the object plane. The self-MTF of the linear array is estimated to 0.45 (Maezzo et al., 2006). Other losses in contrast are due to the microscope objective and tube lens, uncorrected from aberration. Nevertheless, the spatial resolution remains sufficient to image typical 100 μm spots.

3.2. Images of biochip coated with proteins

Images of biochips coated with 70 bases ssDNA have already been observed in our group (Reverchon et al., 2006). Imaging of proteins is much more challenging since their absorption is at least one order of magnitude weaker (Table 1). Fig. 5 gives images of the optimized biochip coated with MetRS before and after complexation with an anti-polyHis specific antibody.

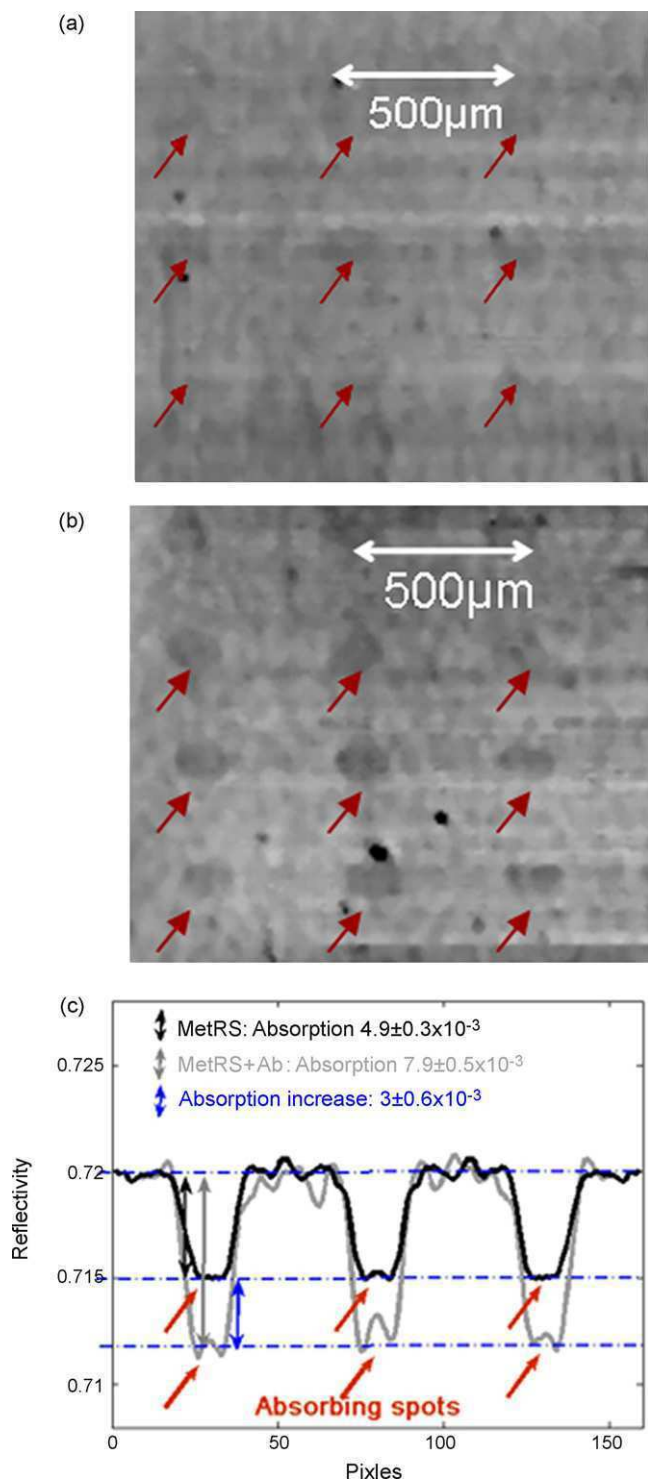


Fig. 5. Biochip images of (a) MetRS and (b) MetRS complexed with an antiHis-Ab. (c) Average line profiles on three spots. Spots are indicated by arrows.

The absorption profile is obtained by averaging the absorption on several spots. The mass extinction coefficient of MetRS is $1.72 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\mu\text{g}$, corresponding to a monolayer absorption $A_{280 \text{ nm}} = 0.73 \times 10^{-3}$ without contrast enhancement (Table 1). At 280 nm, absorption due to silanisation of the surface, and to polyhistidine tag can be neglected. With a 4.0 contrast enhancement, the contrast is then $\Delta R/R = 4.0 \times A_{280 \text{ nm}}$. With $R = 0.72$ and a MetRS surface density of 4×10^{12} molecules/cm² (maximum density for monolayer coverage, Section 2.1.2), the calculated reflectivity decrease ΔR is 2.1×10^{-3} . The drop measured experimentally with the uncomplexed protein is $\sim 4.9 \pm 0.3 \times 10^{-3}$, averaged on a number of 45 spots profiles. The somewhat higher absorption can be explained by a larger than expected number of proteins at the chip surface and optical effects such as scattering due to roughness and optical index contrast. The density of proteins on the surface is not well calibrated. To have a better insight in the amount of proteins present on the chip surface, ellipsometric analysis was carried out on a chip homogeneously coated with MetRS (6 mm × 6 mm). With an optical index between 1.35 and 1.6 in visible (Vörös, 2004), a layer of thickness between 3.2 nm and 5.4 nm is obtained for the dried protein. In solution, the volume of the protein is $\sim 5 \text{ nm} \times 5 \text{ nm} \times 10 \text{ nm}$. Therefore, it is reasonable to conclude that we are close from monolayer coverage.

The reflectivity drop measured on the biochip coated with MetRS complexed with an antiHis-Ab (Fig. 5(b)) is $7.9 \pm 0.5 \times 10^{-3}$, averaged on 45 spot profiles, to be compared to the experimental value of $4.9 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ with the MetRS alone. If one assumes that the roughness of the surface and the optical index contrast are similar in the two cases, the measured $\Delta R = 3 \pm 0.6 \times 10^{-3}$ increase in absorption upon antibody complexation can be attributed to the antibody absorbance. The corresponding single-pass absorption $A_{280 \text{ nm}} = (\Delta R/R)/4$ is $1.04 \pm 0.02 \times 10^{-3}$, corresponding to a surface density of $2.8 \pm 0.5 \times 10^{12} \text{ Ab/cm}^2$ (Table 1). Such a value is close to that of a densely packed IgG monolayer (650 ng/cm² i.e. $2.6 \times 10^{12} \text{ Ab/cm}^2$ (Esser, 1988)). Thus, the surface density of antibodies in the monolayer is maximal. This may explain why a 1:1 MetRS/Ab stoichiometry cannot be reached. Furthermore, no absorption increase was observed after incubation of a MetRS-coated slide in the presence of anti-mouse IgG Horseradish-Peroxidase-linked whole antibody (Amersham Biosciences, 1/2000) (data not shown). This establishes the specificity of the interaction observed between antiHis-Ab and MetRS.

4. Conclusion and perspectives

A UV reflective set-up using an AlGaIn spectrally selective detector, together with optimized multilayer structures, proved to be sensitive enough to detect monolayers of proteins/DNA, without need for labeling. These multilayer structures consist of an Al mirror covered with UV transparent dielectric (here silica). The experimental results on an inorganic test system (TiO₂ “spots”) demonstrated a contrast amplification by a factor of 4.0, consistent with detailed multilayer analysis including roughness and oxidation layers. With this set-up capable of measuring sub 10^{-3} single-pass absorption, UV absorption of a protein layer was observed experimentally as well as absorption increase due to specific antibody complexation.

The measurement of uncomplexed protein absorption gave a value larger than expected for monolayer coverage. It can be explained by a larger amount of immobilized proteins. Optical effects such as scattering due to surface roughness are also likely. The absorption increase measured after specific antibody complexation, in good agreement with the expected value, validates biological recognition imaging.

The sensitivity of our set-up is readily sufficient to control the grafting of proteins, and the complexation with an antibody. Experiments were carried out with line-scan detectors, not well adapted to real-time acquisitions. Currently, new generation detectors, arrayed in 2D, are elaborated in Thales Research and Technology (Reverchon et al., 2007). They also display a signal-to-noise ratio compatible with monolayer biological imaging. With the same absorption detection set-up and optimized reflective biochip, these 2D imagers should enable multiplex real-time imaging. Future developments will include guiding structures that might offer extra photonic improvements and the design of a set-up compatible with UV detection of biological events in aqueous solutions.

Acknowledgements

The authors acknowledge Sylvain Blanquet, Arnaud Brignon, and Simone Cassette for fruitful discussions, and Jean-Michel Vignolle for image processing.

References

- Bass, M., Stryland, E.W.V., Williams, D.R., Wolfe, W.L., 2000. Optical Society of America, Handbook of Optics, vol. I, 2nd ed. MacGraw-Hill, New York.
- Benisty, H., Stanley, R., Maier, M., 1998. J. Opt. Soc. Am. A 15, 1192–1201.
- Bruggeman, D.A.G., 1935. Ann. Phys. 24, 636–679.
- Cassio, D., Waller, J.P., 1971. Eur. J. Biochem. 20 (2), 283–300.
- Du, H., Fuh, R.A., Li, J., Corkan, A., Lindsey, J.S., 1998. Photochem. Photobiol. 68, 141–142.
- Esser, P., 1988. Nunc Bull. 6.
- Fasman, G.D., 1975. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, vol. I. CRC Press, Cleveland, OH.
- Gill, S.C., von Hippel, P.H., 1989. Anal. Biochem. 182 (2), 319–326.
- Hirel, P.H., Lévêque, F., Mellot, P., Dardel, F., Panvert, M., Mechulam, Y., Fayat, G., 1988. Biochimie 70, 773–782.
- Maezzo, G., Reverchon, J.L., Duboz, J.Y., Dussaigne, A., 2006. IEEE Sensors J. 6 (4), 957–963.
- Mechulam, Y., Schmitt, E., Maveyraud, L., Zelwer, C., Nureki, O., Yokoyama, S., Konno, M., Blanquet, S., 1999. J. Mol. Biol. 294, 1287–1297.
- Mellot, P., Mechulam, Y., LeCorre, D., Blanquet, S., Fayat, G., 1989. J. Mol. Biol. 208, 429–443.
- Murphy, B.D., 2001. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Wiley-Liss, New York.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T., 1995. Protein Sci. 4 (11), 2411–2423.
- Peterson, A.W., Heaton, R.J., Georgiadis, R.M., 2001. Nucleic Acids Res. 29 (24), 5163–5168.
- Pierce Biotechnology, 2004. Technical resource TR0006.0.
- Reverchon, J.L., Meyer, C., Mazzeo, G., Cassette, S., 2006. Proc. SPIE no. 6398-25.
- Reverchon, J.L., Robot, J.A., Truffer, J.P., Caumes, J.P., Mourad, I., Brault, J., Duboz, J.Y., 2007. Proc. SPIE no. 6744-9.
- Seraphin, B.O., Bottka, N., 1965. Phys. Rev. 139 (2A), 560–564.
- The general issue is how much a surface layer absorption translates into a reflectivity change. This is accessible through full multilayer simulations, but was also addressed in the early days of photo/electroreflectance measurements, e.g. by Seraphin on semiconductor, leading to two Seraphin coefficients relating the reflectivity modulation to the real and imaginary parts of the dielectric perturbation. This was revisited later for interference effects when probing multilayers. Essentially, the reflected amplitude has a basic term $\sqrt{R}$, and an in-phase term due to the upwards radiation of the absorbing layer, which turns out to be of the form $(\alpha l)(1 + \sqrt{R})^2/2$ (see ref (Benisty et al., 1998) Eq. (17) with $r_2 = 0$, $t_2 = 1$). The squared modulus of the total reads $R + \sqrt{R}(\alpha l)(1 + \sqrt{R})^2$ to first order in absorption. The relative change is thus as indicated. To our knowledge, only needlessly sophisticated versions of this basic physics exist in the literature.
- Smith, D.Y., Shiles, E., Inokuti, M., 1985. In: Palik, E.D. (Ed.), Handbook of Optical Constants of Solids. Academic Press, San Diego, pp. 369–406.
- Smith, E.A., Corn, R.M., 2003. Appl. Spectrosc. 57 (11), 320–332.
- Stroud, D., 1998. Superlattice Microstruct. 23, 567–573.
- Vörös, J., 2004. Biophys. J. 87, 551–553.
- Windt, D.L., 1998. Comput. Phys. 12, 360–370.

Annexe C:

Fabrication des réseaux résonants

Dépôts PECVD de diélectriques

La première étape est le dépôt d'une couche de silice par PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) à une température de 340°C. Pour la silice, les précurseurs sont SiH_4 (40 sccm) et N_2O (2000 sccm). Pour le nitrure, le mélange de gaz est constitué de SiH_4 (20 sccm), N_2 (2600 sccm) et NH_3 (200 sccm).

L'épaisseur du dépôt est ensuite déterminée par ellipsométrie en réalisant une mesure spectroscopique de 260 à 800 nm par pas de 5 nm, à un angle d'incidence de 70°.

Un témoin de substrat de silicium est utilisé pour caractériser le dépôt de nitrure uniquement. Ce témoin est utilisé pour la caractérisation par ellipsométrie spectroscopique en réalisant de manière similaire au dépôt de silice, une mesure sous un angle d'incidence de 70° et sur un domaine spectral de 260 nm à 800 nm.

Des mesures allant jusqu'à 190 nm ont aussi été réalisées au cours de cette thèse pour une meilleure caractérisation de l'indice aux faibles longueurs d'ondes. Celles-ci ont été réalisées chez Horiba Jobin-Yvon, qui dispose d'ellipsomètres couvrant ce domaine spectral. Cependant, pour les mesures générales sur les biopuces, seul un domaine spectral allant jusqu'à 260 nm est exploité, permettant de faire des mesures à Thales Research and Technology.

Réalisation de la nano-structuration

L'étape suivante est ensuite la réalisation des réseaux de diffraction par lithographie électronique.

La lithographie électronique repose sur l'insolation d'une résine (ici le polyméthacrylate de méthyle PMMA) par un faisceau électronique.

Ces réseaux ont pour période typique $\Lambda=270$ nm. La lithographie électronique permet d'atteindre de telles résolutions (limites de l'ordre de 10-20 nm). La lithographie électronique permet une souplesse certaine (écriture directe des motifs) en faisant varier le pas du réseau, mais sa vitesse d'écriture est limitée. La fabrication de telles structures en grande quantité

impliquerait un passage à des techniques telles que le nano-impression des réseaux (nanoimprint). Cependant, dans ce cas, le « master » gèle le choix de la structure.

Etalement résine

Les réseaux dessinés sur la puce ont pour dimensions $2 \times 2.8 \text{ mm}^2$, qui constituera la surface utile de la puce. La taille du support de la biopuces réalisée est de 1 cm^2 . Un nombre de 16 puces peut ainsi être réalisé sur une plaque de 2 pouces.

La résine est déposée par spin coating. Après une accélération de 5 sec à capot ouvert pour atteindre la vitesse de 4000 tours/min, la rotation de la tournette a une durée de 30 sec. Le recuit du PMMA (environ 200 nm) est ensuite réalisé à une température de 200°C pendant 5 min.

Le dessin de la puce est réalisé à l'aide d'un logiciel de conception, le logiciel L-Edit, adapté à la réalisation de dessin de masques de lithographie. Les motifs sont exportés du format gds au format .npf, autoriser ensuite une fracturation des motifs par le logiciel nbpat, pour permettre une exploitation finale par le nanomasqueur électronique, qui utilisera un dernier format binaire nsf. Des paramètres de fracturation doivent être choisis de manière à obtenir une bonne qualité et uniformité des réseaux. Dans notre cas, on choisit des sous-champs de l'ordre de $10 \mu\text{m}$, et des champs de l'ordre de $400 \times 400 \mu\text{m}$, de manière à pouvoir superposer un spot biologique sur chaque champ.

Pour l'utilisateur, la localisation en x,y des motifs à grande échelle (sur le wafer) est définie au moyen d'un script très simple écrit sous forme d'un fichier texte.

La résine est ensuite insolée par le faisceau électronique (de nuit pour de nombreux réseaux) . Un point crucial est la prise en compte des effets de proximité. En effet, sous l'effet de l'impact du faisceau d'électrons, des électrons secondaires ou rétrodiffusés sont inévitables. Pour des motifs très fins, les électrons envoyés sur un motif ont tendance à impressionner les motifs voisins, d'où une sur-insolation de la résine, et un élargissement des motifs. Ces effets doivent être pris en compte dans les paramètres d'écriture (intensité du faisceau d'électrons, définit par la « dose », de 6.5 C/m^2 , avec une tension de travail de 80 kV. Cette forte tension permet aux électrons de pénétrer plus profondément et de limiter les électrons secondaires qui pourraient insoler la résine. Pour conclure, le choix de la dose dépend des n° atomiques Z des éléments du substrat et des couches sous la résine.

Développement de la résine

Les chaînes de PMMA cassées par le faisceau électronique sont dissoutes dans un développeur (MIBK méthyl isobutyl cétone / IPA alcool isopropylique ou isopropanol), en proportion 1:3. La température de développement est de 25°C. La durée du développement est de 40 secondes. Le développement est réalisé sous ultrasons à faible puissance. L'échantillon est ensuite séché au moyen d'une soufflette à très faible puissance, de manière à évacuer délicatement la résine mal développée sur l'échantillon.

Les premières réalisations sur 1 cm² ayant montré des problèmes d'uniformité, il est préférable d'employer une plaque de taille suffisamment importante pour une meilleure homogénéité de la résine sur la surface. Ainsi, il peut être avantageux de réaliser plusieurs puces pendant un même procédé technologique de manière à bénéficier de l'ensemble de la plaque. Le protocole qui a été mis au point au cours de cette thèse a permis de valider la fabrication de plusieurs puces sur un même échantillon.

Gravure des réseaux

L'étape suivante est la réalisation des réseaux de diffraction. La gravure réalisée ici correspond à une profondeur de 20 nm. Elle est obtenue par un plasma SF₆ à une puissance de 10W, et une pression de 10 mTorr, réalisé pendant une durée de l'ordre de 20 sec. Etant donné la faible épaisseur de gravure, une bonne reproductibilité n'est pas évidente.

Ensuite, le PMMA est enlevé par un plasma oxygène d'une durée de 2 min, avec une puissance de 50W et une pression de 100 mTorr.

Définition des spots biologiques

Les spots biologiques sont ensuite définis par lithographie optique, au moyen d'un masque de résine. Il s'agit d'un masque de résine Shipley de 1.2 µm. L'étalement de la résine est réalisé sur une durée de 30 sec, à une vitesse de 4000 tours/min. Le temps de recuit est ensuite de 1 min à une température de 110°C.

L'insolation UV de la résine est réalisée au moyen d'une source mercure, sur le domaine de longueur d'onde 305-465 nm. La durée de l'insolation est de 7 sec, à une puissance de 10mW/cm². Le développement de la résine insolée est ensuite réalisé dans un développeur MF 319. La résine non insolée est dissoute à l'acétone après la silanisation, constituant la première étape physico-chimique (à visée biologique).

Spots biologiques consistant en des réseaux localisés

Une méthode alternative à l'utilisation de spots réalisés par un masque de résine est la réalisation de réseaux localisés pour constituer des spots biologiques. En effet, par cette méthode, on évite ainsi l'étape de lithographie optique. L'ensemble de la plaque est alors fonctionnalisé et une comparaison à l'instant initial t_0 peut être exploitée comme signal de référence.

On peut de cette manière fonctionnaliser la plaque sur une grande surface, mais sans utiliser la technique classique de spotting. Un avantage peut être d'obtenir des spots uniformes en épaisseur avec comme épaisseur la monocouche d'éléments biologiques (protéines ou ADN) sans être confronté à des effets de bord (dépôt de sels employés dans la solution tampon des utilisateurs de spotters). La détection multiplexe nécessite cependant de définir des régions localisées avec différentes espèces biologiques. Ainsi, des astuces telles que de graver des tranchées pour empêcher le mélange de plusieurs espèces biologiques peuvent être envisagées. De telles géométries de spots sont aussi plus simples pour l'analyse du signal. En effet, dans le cas de spots ronds, certains pixels de l'image du spot ne sont pas exploitables car ils ne sont pas couverts d'éléments biologiques sur l'ensemble de leur surface. De plus, en vue d'une exploitation algorithmique, il est plus aisé de définir la position des pixels d'un carré que de ceux d'un rond. Ainsi, sur plusieurs aspects, la définition de réseaux localisés semble à la fois originale par rapport aux plots ronds classiques, et doit permettre d'obtenir plus facilement des monocouches d'éléments biologiques, d'où de meilleures homogénéités sur la surface du spot.

La figure C.1 donne l'image d'une telle puce. Sur cette puce, pour donner une idée des possibilités ouvertes par l'imagerie de réseaux résonants, nous donnons l'image d'une puce comportant des réseaux de période différente sur sa surface. Ainsi, dans une position d'imagerie donnée, on peut exploiter différentes conditions de résonances pour une longueur d'onde donnée. On a ainsi à la fois une information spectrale (pour un angle d'incidence donné, la résonance de chacun des réseaux est centrée à une longueur d'onde différente, on balaye ainsi la résonance dans une image donnée).

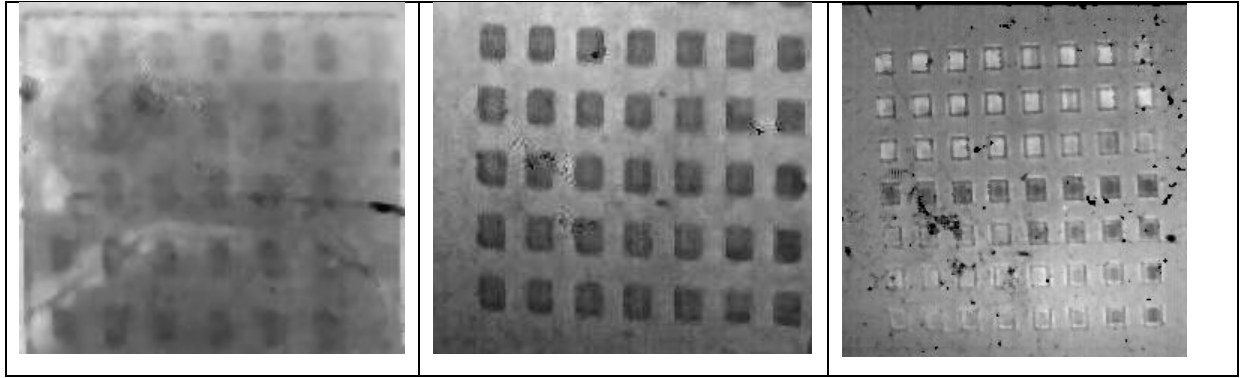


Figure C.1 : Images UV de différentes puces fabriquées (a) Réseau pleine plaque avec spots biologiques réalisés localisés par une étape de masque de résine insolé en lithographie optique (b) Plots définis par des réseaux de même période (c) Plots définis par des réseaux localisés de différentes périodes (une période par ligne, (ici $\Lambda=260\text{ nm} - 262\text{ nm} - 264\text{ nm} - 265\text{ nm} - 266\text{ nm} - 268\text{ nm} - 270\text{ nm}$), permettant d'obtenir une information spectrale.

Annexe D :

Expériences préliminaires de fluidique

Ne disposant pas de montage permettant un fonctionnement stable en solution, les expériences permettant de valider le concept et la caractérisation des puces en milieu liquide a été réalisé en utilisant une lamelle afin de mettre la puce en contact avec la solution. La lamelle est ici une lamelle de suprasil, transparente dans l'ultraviolet. Son épaisseur est de 500 μm . Une découpe préliminaire a permis d'obtenir des lamelles de taille 1 cm^2 . Lors de l'application d'une goutte de liquide entre la puce et la lamelle, la lamelle peut tenir par capillarité à la surface de la puce, ce qui permet de réaliser la caractérisation spectroscopique de la puce, ainsi que l'imagerie sur un montage vertical de manière adaptée à notre montage optique de départ. Ce dispositif simple doit permettre d'observer le greffage de la protéine en temps réel sur la surface de la puce. Une fois la puce fonctionnalisée, un suivi de reconnaissance spécifique à la surface de la puce peut être réalisé. Une autre application peut être le suivi en temps réel de l'interaction entre l'ARN de transfert spécifique de la méthionyl-ARNt synthétase, celle-ci étant préalablement greffée à la surface de la puce.

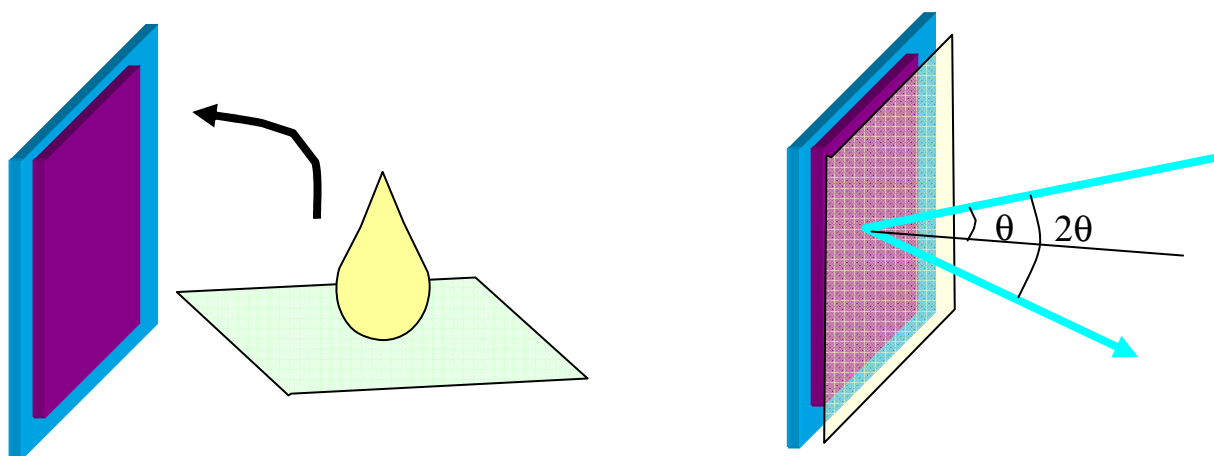


Figure D.1 : Schéma du "dispositif" utilisé pour des expériences en solution

Sur la Figure D, nous donnons un schéma de l'expérience de spectroscopie réalisée. La puce comporte dans ce cas un réseau de taille suffisamment grande ($2 \times 2 \text{ mm}^2$) pour que le faisceau mesuré provienne uniquement du réseau de diffraction. Le volume de la goutte est de 2 mL. Elle est étalée sur une surface de 1 cm^2 . Ainsi, l'espace entre puce et lamelle est de 20 μm .

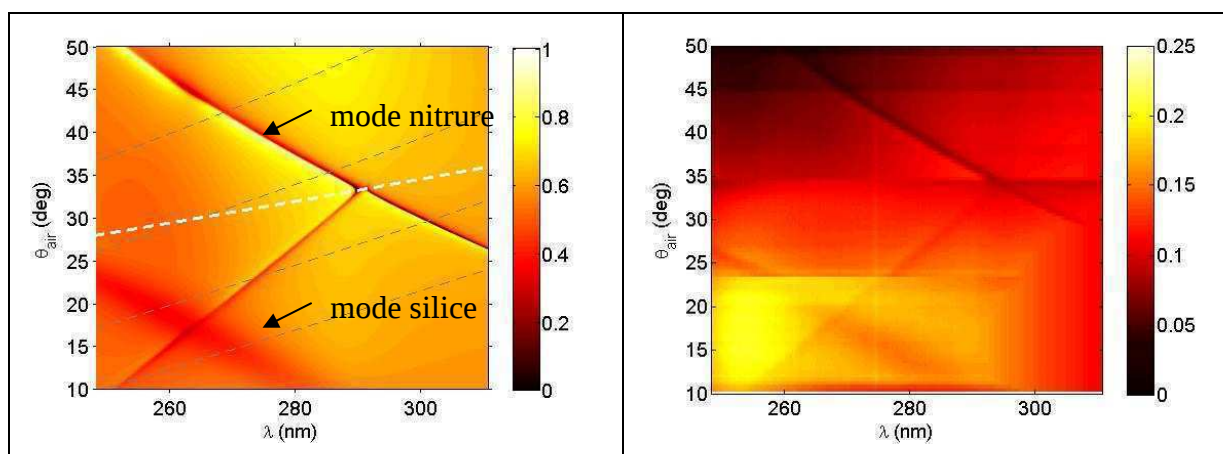


Figure D.2 (a) Simulation et (b) mesure expérimentale de la réponse spectrale de la puce optiquement résonante. Le mode dans la silice est très large spectralement. En comparaison à une puce identique dans l'air, on observe une moindre efficacité de diffraction car l'épaisseur de gravure est plus faible que celle visée.

De manière à être optimisé pour des expériences en solutions à angle d'incidence convenable (ici $\theta_{0 \text{ air}} = 35^\circ$), nous avons adapté la période de notre biopuce à $\Lambda = 265 \text{ nm}$. Les épaisseurs optimales pour notre biopuces sont de 140 nm pour la silice, et 85 nm pour le nitrure. La caractérisation ellipsométrique de notre puce à donner des épaisseurs de 140 nm pour la silice, et 70 nm pour le nitrure.

De plus, du fait du moindre contraste d'indice entre le milieu ambiant et le nitrure, le réseau doit être gravé sur une profondeur plus importante de manière à conserver une efficacité de diffraction équivalente. La profondeur de gravure est de 22 nm, et donc inférieure à ce qui était visée pour avoir une meilleure efficacité de diffraction. Une épaisseur de 30 nm aurait en effet été plus adaptée.

La Figure D.2 donne la simulation numérique de notre biopuce dans l'eau, ainsi que la mesure expérimentale. Les angles d'incidence indiqués sur l'axe des ordonnées sont les angles d'incidence à l'interface air/lamelle. L'indice optique de l'eau à 280 nm est de 1.39. Les modes de la silice et du nitrure sont indiqués par des flèches. Le mode dans la silice est très large spectralement. Un bon accord entre la réflectivité calculée à partir de notre modèle et la mesure expérimentale est observé. Ainsi, on confirme la bonne prédictibilité théorique du

comportement optique de notre puce. La réflectivité non résonante ne semble cependant pas bien correspondre à la théorie. Ceci s'explique par une erreur de normalisation, le faisceau incident étant très peu homogène spectralement.

De telles biopuces ont aussi été réalisées pour des expériences d'imagerie, avec des réseaux localisés. Des périodes différentes ont été choisies pour avoir des images à plusieurs endroits du pic de résonance.

Nous présentons Figure D.3 les images UV de notre biopuce à la fois (a) dans l'air et (b) dans l'eau. On observe bien les différentes efficacités de diffraction au voisinage de la résonance, pour un angle d'incidence de 37° ($\Delta\theta=0.6^\circ$), et une longueur d'onde de 280 nm ($\Delta\lambda=1.5$ nm). Nous confirmons par ces images les efficacités de diffractions attendues à partir de la caractérisation spectroscopique.

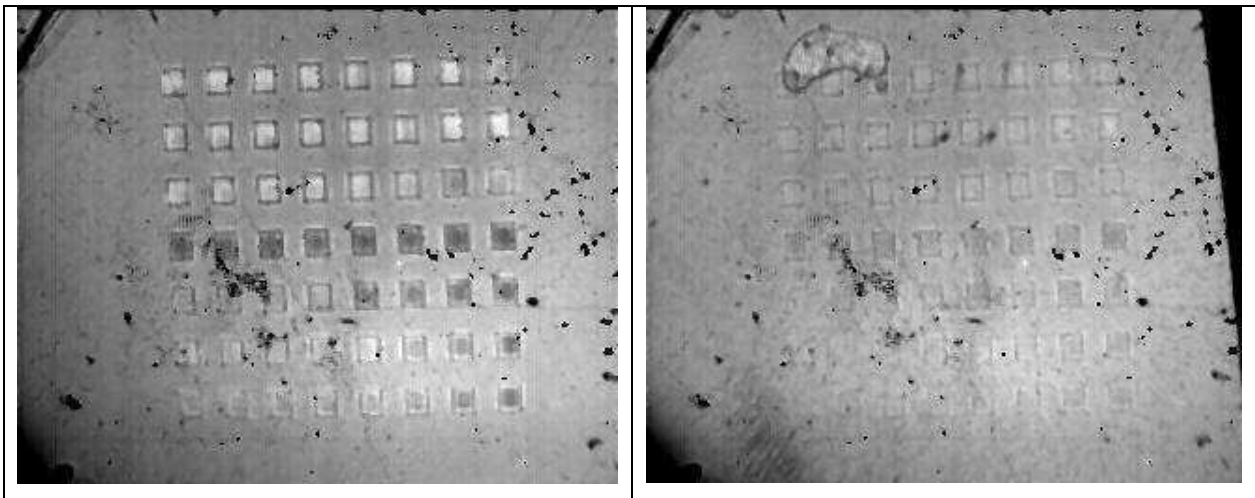


Figure D.3 Images (a) dans l'air et (b) dans l'eau de la biopuce fabriquée pour l'imagerie. Chaque ligne correspond à une période différente pour les réseaux (260-262-264-265-266-268-270 nm), et comporte un nombre de 8 réseaux, correspondants chacun à un spot biologique.

Le but ultime des expériences en temps réel présentées ici est d'observer le greffage de la protéine sur la biopuce. Ainsi, la goutte mise à la surface de la puce comporte une certaine concentration de protéines. Au cours du greffage, une forte variation du signal diffracté par les réseaux localisés est attendue, puisque l'accrochage de la protéine à la surface de la puce modifie l'indice effectif du mode guidé. Dans de telles conditions expérimentales, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est très faible (distance entre puce et lamelle de 20 μm , la diffusion étant vraisemblablement déterminante et le temps de diffusion variant comme $\Delta x^2=2Dt$, avec t temps de diffusion, et D constante de diffusion). Un volume plus important et une concentration plus faible permettraient donc d'observer une cinétique plus lente.

Nous présentons ainsi Figure D.3(c) l'évolution de la réflectivité au cours du temps sur un des plots. La constante de temps observée ici est de l'ordre de 20 sec. On est ainsi dans les bons ordres de grandeurs en ce qui concerne les temps de réaction. Cependant, il s'agit de résultats très préliminaires. Ces mesures permettent en tout cas de valider le principe d'un tel montage pour la mesure de cinétiques de réaction.

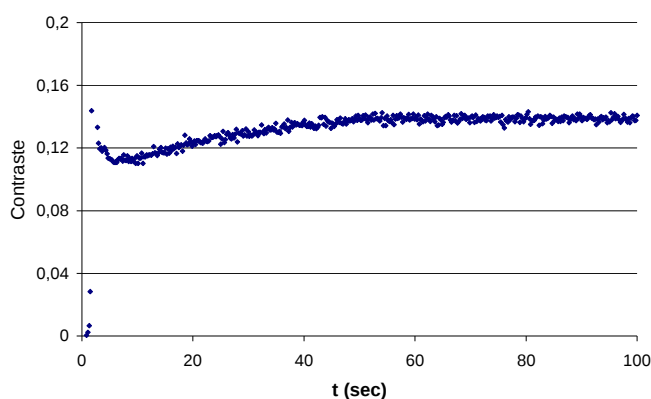


Figure D.4: Evolution du contraste d'un spot biologique au cours du temps corrigé de l'évolution du fond

Des mesures spectrales du greffage sont aussi envisageables. Dans ce cas, au cours de la réaction, on s'attend à mesurer un décalage du pic de résonance vers les hautes longueurs d'onde (augmentation de l'indice effectif à la surface de la puce), ainsi qu'une modification de l'efficacité de diffraction du fait de l'absorption de la protéine.

Du fait de la faible distance entre lame et lamelle, l'analyse des images a aussi mis en évidence un phénomène d'interférence, qui sera à prendre en compte pour l'interprétation quantitative des images réalisées. D'autres expériences sont nécessaires pour interpréter précisément ces expériences de greffage, mais nous avons présenté ici une méthode à la fois simple et astucieuse pour permettre la caractérisation et l'utilisation des puces en solution, pouvant ainsi permettre de la mise en place d'expériences biologiques avant d'avoir un dispositif fluide stabilisé.

Le principe mis en place peut être appliqué pour un monocapteur ne nécessitant pas de dispositif de fluide autonome (analyse d'une goutte de sang ou de salive pour les applications médicales et/ou de sécurité routière...), et ouvre ainsi des perspectives intéressantes.